

UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA HEMIJU

**OPTIMIZACIJA, VALIDACIJA I PRIMENA ICP-OES METODA  
ODRE IVANJA SADRŽAJA METALA  
U REALNIM UZORCIMA**

Doktorska disertacija

Dragan Velimirović

Niš, 2013. godine

*Rad je rađen u laboratorijama Katedre za analitičku i fizičku hemiju, Departmana za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Radom je rukovodila dr Snežana Tošić, docent PMF-a u Nišu kojoj se ovim putem zahvaljujem na pomoći i sugestijama u toku izrade i pisanja rada.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Snežani Mitić red. profesoru PMF-a u Nišu na idejama i stručnim savetima prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Takođe se zahvaljujem dr Bišani Kaličanin, vanred. profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu, na korisnim savetima, saradnji i razumevanju.*

*I na kraju, ništa manje važna, podrška i pomoć mog prijatelja dr Vuča Miloševića.*

*Zahvaljujem se svim kolegama, prijateljima a posebno porodici na strpljenju i podršci.*



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
NIŠ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	Monografska
Tip zapisu, TZ:	Tekstualni
Vrsta rada, VR:	Doktorski rad
Autor, AU:	Velimirović Dragan
Mentor, MN:	Dr Snežana Tošić
Naslov rada, NR:	Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u realnim uzorcima
Jezik publikacije, JP:	srpski
Jezik izvoda, JI:	srpski
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Srbija
Godina, GO:	2013.
Izdavač, IZ:	autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Niš, Višegradska 33
Fizički opis rada, FO: (poglavlja,strana/citata/tabela/slika/grafika/priloga)	Strana 183, poglavljia 9, slika 50, tabela 88, referenci 174
Naučna oblast, NO:	Hemija
Naučna disciplina, ND:	Fizika hemija
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	Metali, ICP-OES, jezgrasto voće, pšenica, brašno hleb, bistro i gusti vojni sokovi, voćna vina, med
UDK	543.42 + 005.591.1 : 543.632.495
Uputa se, U:	Biblioteka
Važna napomena, VN:	Izvršena je optimizacija plazme optičkog emisionog spektrometra sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-OES) menjanjem RF snage generatora; radna emisiona linija za svaki od ispitivanih elemenata izabrana je upoređivanjem nagiba kalibracione prave standarda sa nagibom kalibracione prave dobijene spajkovanjem standarda uzorkom; dobijene metode su validirane preko sledećih parametara: talasna dužina analitičke emisione linije (λ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), relativna standardna devijacija (RSD); tačnost i preciznost metoda ispitana je određivanjem sadržaja svakog ispitivanog elementa u rastvoru multielementnog standarda; razvijene metode su primenjene za određivanje 19 elemenata u različitim uzorcima hranljivih proizvoda (jezgarsto voće, žitarice, brašno, hleb, voćna vina, vojni sokovi, med); dobijeni rezultati su diskutovani i statistički obrađeni primenom testova ANOVA i t-testa

Datum prihvatanja teme, DP: \_\_\_\_\_

Datum odbrane, DO: \_\_\_\_\_

Izlanovi komisije, KO: \_\_\_\_\_ Predsednik: \_\_\_\_\_

Izan: \_\_\_\_\_

Izan, mentor: \_\_\_\_\_

---



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
NIŠ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph
Type of record, TR:	Textual/graphic
Contents code, CC:	
Author, AU:	Velimirović Dragan
Mentor, MN:	Dr Snežana Tošić
Title, TI:	Optimization, validation and application of ICP-OES method for metal content determination in real samples
Language of text, LT:	serbian
Language of abstract, LA:	serbian
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2013.
Publisher, PB:	author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33
Physical description, PD: <small>(chapters, pages, tables, figures, graphs, appendices)</small>	Pages 183, chapters 9, figures 50, tables 88, references 174
Scientific field, SF:	chemistry
Scientific discipline, SD:	Physical chemistry
Subject/Key words, S/KW:	Metals, ICP-OES, nuts, wheat, flour, bread, clear and cloudy fruit juices, fruit wines, honey
UC	543.42 + 005.591.1 : 543.632.495
Holding data, HD:	Library
Note, N:	
Abstract, AB:	The optimization of plasma optical emission spectrometer with inductively coupled plasma (ICP-OES) was conducted by changing the RF power of generator; operating emission lines for each of the analyzed elements was selected by comparing the slope of calibration curve of standard solutions with the slope of calibration curve for spiked standard solution with samples; given methods are validated through the following parameters: wavelength of analytical emission lines ( ), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), the correlation coefficient ( $R^2$ ), the relative standard deviation (RSD); accuracy and precision of the method was tested by determination of each element in the test solution of multi-element standards; developed method was applied for the determination of 19 elements in different samples of foodstuffs (nuts, grains, flour, bread, fruit wine, fruit juice, honey); the obtained results are discussed and analyzed statistically using ANOVA test and t-test.

Accepted by the Scientific Board on, ASB:	
Defended on, DE:	
Defended Board, DB:	President:
	Member:
	Member, Mentor:

## SADRŽAJ

### Uvod

<b>1 TEORIJSKI DEO .....</b>	<b>5</b>
1.1 Atomske spektrometrijske metode .....	6
1.2 Atomska emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom .....	7
1.2.1 Osnovni principi nastanka induktivno kuplovane plazme .....	8
1.2.2 Termodinamička ravnoteža u plazmi .....	9
1.2.3 Intenzitet linija.....	11
1.2.4 Profil linija.....	12
1.2.5 Odnos intenziteta linija jon/atom .....	14
1.2.6 ICP-OES instrumentacija .....	16
1.2.7 Izvori plazme.....	16
1.2.8 Induktivno kuplovana plazma .....	17
1.2.9 Radiofrekventni generatori.....	19
1.2.10 Unošenje uzorka .....	19
1.2.11 Spektrometri .....	20
1.2.12 Detektori.....	23
1.2.13 Radijalna i aksijalna plazma.....	25
1.2.14 Efekti interferencija i korekcija pozadine .....	27
1.3 Optimizacija i validacija ICP-OES metoda .....	29
1.3.1 Optimizacija .....	29
1.3.2 Validacija .....	34
1.4 Metali.....	42
1.4.1 Hemijske osobine metala .....	42
1.4.2 Podela metala .....	43
1.4.3 Biološka funkcija metala .....	45
1.4.4 Putevi dospevanja metala u hranu .....	49
1.4.5 Biodostupnost metala u hrani .....	51
1.4.6 Dnevne potrebe za esencijalnim metalima.....	52
1.4.7 Metali u hrani – analitički pristup .....	55

<b>2 EKSPERIMENTALNI DEO.....</b>	<b>67</b>
2.1 Program eksperimentalnog rada .....	68
2.2 Aparati .....	69
2.2.1 Karakteristike ICP spektrometra serije iCAP 6000.....	69
2.3 Reagensi .....	70
2.4 Priprema uzorka za analizu.....	70
2.4.1 Jezgrasto voće .....	70
2.4.2 Žitarice, brašno i hleb.....	71
2.4.3 Voće sokovi i voće na vina .....	72
2.4.4 Med.....	72
2.5 Statistička obrada podataka .....	73
2.5.1 Jednosmerna analiza varijanse – ANOVA.....	73
2.5.2 Studentov t-test.....	74
<b>3 REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>75</b>
3.1 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima jezgrastog voća .....	76
3.1.1 ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme .....	76
3.1.2 Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih .....	76
3.1.3 Evaluacija tačnosti i preciznosti .....	78
3.1.4 Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u različitim uzorcima jezgrastog voća .....	79
3.1.5 Statistička obrada dobijenih rezultata određivanja sadržaja metala u uzorcima jezgrastog voća.....	86
3.2 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima žitarica, brašna i hleba .....	87
3.2.1 ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme .....	87
3.2.2 Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih .....	87
3.2.3 Evaluacija tačnosti i preciznosti .....	88
3.2.4 Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u različitim uzorcima zrna žitarica, brašna i hleba.....	89
3.2.5 Sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima brašna .....	102
3.2.6 Statistička obrada dobijenih rezultata određivanja sadržaja metala u uzorcima žitarica, brašna i hleba .....	106
3.3 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima voćnih sokova i voćnih vina .....	107

3.3.1	ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme .....	107
3.3.2	Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih .....	107
3.3.3	Evaluacija ta nosti i preciznosti .....	108
3.3.4	Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u razli itim uzorcima vo nih sokova i vo nih vina .....	109
3.3.5	Statisti ka obrada dobijenih rezultata odre ivanja sadržaja metala u uzorcima vo nih sokova i vo nih vina .....	123
3.4	Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda odre ivanja sadržaja metala u uzorcima meda .....	124
3.4.1	ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme .....	124
3.4.2	Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih .....	124
3.4.3	Evaluacija ta nosti i preciznosti .....	125
3.4.4	Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u razli itim uzorcima meda .....	126
3.4.5	Statisti ka obrada dobijenih rezultata odre ivanja sadržaja metala u uzorcima meda .....	137
<b>4</b>	<b>IZVOD.....</b>	<b>138</b>
<b>5</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>PRILOG I .....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>PRILOG II.....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>170</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIJA SA BIOGRAFIJOM.....</b>	<b>180</b>

## UVOD

Zna ajne razlike u hemijskim osobinama izme u metala i nemetala, kao što su redoks potencijali, kiselinsko/bazna hemija, strukturne, ligandne i koordinacione osobine koje odre uju ulogu metala u biološkim procesima.

U živim organizmima, metalni joni kao komponente enzima i drugih molekulskih kompleksa, regulišu široki spektar fizioloških mehanizama sa zna ajnim nivoom specifi nosti i selektivnosti. Reaktivnost kompleksa zavisi kako od specifi nih osobina odre enog biološkog proteina, ili drugih organskih molekula za koji je metal vezan, tako i od raznovrsnosti i fleksibilnosti osobina koje sam metal poseduje. Oko 30% svih enzima ima vezan metal za svoj aktivni centar.

Analiza pepela dobijenog od tkiva pojedinih organa pokazuje prisustvo gotovo svih metala, nekih u koncentracijama koje su vrlo niske, dok su neki u zna ajnim koli inama. U ve im koncentracijama mogu se detektovati kalcijum, natrijum, kalijum i magnezijum. Pored ovih makro elemenata u organizmu se nalazi i zna ajan broj elemenata u tragovima. Devet metala (gvož e, cink, hrom, kobalt, nikl, bakar, mangan, molibden i selen) se ubrajaju u grupu tzv. esencijalnih elemenata u tragovima. Posebnu grupu ine tzv. teški metali (antimon, arsen, bizmut, kadmijum, hrom, kobalt, bakar, gvožde, olovo, živa, nikal, kalaj, cink) od kojih su neki (hrom, kobalt, bakar, gvož e, nikl, kalaj i cink) potrebbi organizmu u malim koli inama, dok svaki višak ovih metala može negativno uticati na zdravlje ljudi. Za razliku od njih arsen, kadmijum, olovo i živa su metali koji nemaju nikakvu hranljivu ulogu u ljudskom organizmu, a s obzirom na njihovu toksi nost i sposobnost da se deponuju u nekim vitalnim organima (mozak, jetra, bubrezi), oni mogu delovati jako štetno po zdravlje ljudi. Ovi teški metali, ometaju veliki broj enzimskih reakcija i to na taj na in što deluju konkurentno na elemente u tragovima i istiskuju ih iz njihovih jedinjenja, tako da svako optere enje organizma teškim metalima rezultuje se nedostatak pojedinih elemenata u tragovima.

Prisustvo velikog broja metala u ljudskom organizmu je prevashodno posledica hrane koju konzumiramo. Iz tog razloga je neophodno pra enje sadržaja metala u razli itim namirnicama koje svakodnevno unosimo u odnosu na preporu ene dnevne potrebe za ovim elementima. Pored vazduha, zemljишta i vode, na sadržaj metala u hrani mogu uticati: upotreba agrotehni kih mera, industrijski procesi obrade hranljivih namirnica, upotreba konzervanasa i aditiva, pakovanje, skladištenje i transport gotovih proizvoda. Ve e prisustvo nekih teških toksi nih metala važan je parametar kako u proceni eventualnog štetnog uticaja tih proizvoda na zdravlje ljudi, tako i kao indikator zaga enja životne sredine.

Iz svega iznetog, a u skladu sa svetskom tendencijom i preporukom konzumiranja zdrave hrane, unosa namirnica bogatih esencijalnim elementima i stalnog pra enja stanja životne sredine, name e se i zna aj i uloga savremenih, osetljivih, selektivnih i ta nih analiti kih metoda pra enja sadržaja metala gde primarno mesto svakako zauzimaju multielementne ICP-MS i ICP-OES metode.

Cilj ovog rada je optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda odre ivanja sadržaja metala u uzorcima košutnjavog vo a (brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah i pista i); u uzorcima žitarica (pšenica, ovas, raž, je am, kukuruz i heljda), brašna (belo tip 400, belo tip 500, celo zrno pšenice, kukuruzno i heljdino) i hleba (beli, raženi, crni, polubeli, kukuruzni i mešavina pšeni nog, ovsanog i reženog); u uzorcima bistrih (višnja, kupina, crno grož e i borovnica) i gustih (breskva, jabuka, jagoda, kajsija i multivitamin) vo nih

sokova i vo nih vina (kupina, višnja, borovnica i malina); u uzorcima meda, doma im (livadski, bagremov, šumski i cvetni) i komercijalnim (manuka, biomed 6, livadski, bagremov, šumski, cvetni i planinski).

Rad je podeljen na: Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Izvod, Summary, Prilog I, Prilog II, Literatura, Biografija sa bibliografijom.

U *Teorijskom delu* eni su osnovni principi nastanka induktivno kuplovane plazme, intenziteti i profili spektralnih linija, ICP-OES instrumentacija, efekti interferencija i korekcija pozadine, osnovni pojmovi vezani za optimizaciju i validaciju jedne analitičke metode, podela metala i njihova biološka funkcija, putevi dospevanja metala u hranu, dnevne potrebe i preporu eni dnevni unos pojedinih metala, literaturni pregled primenjenih ICP-OES i ICP-MS analitičkih metoda u određivanju metala u različitim uzorcima hrane kao i osnovne informacije o vrstama i nutritivnoj vrednosti namirnica ispitivanih u ovom radu.

U *Eksperimentalnom delu* je dat program eksperimentalnog rada, primenjeni aparati i reagensi kao i primenjene procedure.

U delu *Rezultati i diskusija* izloženi su rezultati do kojih se došlo u postupku optimizacije i validacije metoda kao i rezultati određivanja sadržaja metala u različitim uzorcima hrane primenom optimizovanih i validiranih ICP-OES metoda. Dobijeni sadržaji su diskutovani u kontekstu potreba oveka za istim; sa aspekta uticaja različitih faktora na sadržaj određivanih metala; sa aspekta sadržaja toksičnih metala kao indikatora zagađenosti životne sredine. Izvedene korelacije su proverene statističkom obradom dobijenih rezultata.

U delu *Izvod* dat je kratak pregled dobijenih rezultata.

U delu *Prilog I* dat je histogramski prikaz dobijenih sadržaja detektovanih elemenata kao prose na vrednost u odnosu na ispitivane uzorke.

U delu *Prilog II* dati su rezultati statističke obrade dobijenih vrednosti sadržaja određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima.

# **1 TEORIJSKI DEO**

## 1.1 Atomske spektrometrijske metode

Metode kao što su atomska apsorpciona (eng. *Atomic Absorption Spectroscopy* - AAS), atomska emisiona (eng. *Atomic Emission Spectroscopy* - AES) i atomska fluorescentna spektrometrija (eng. *Atomic Fluorescence Spectroscopy* - AFS) su grupa opti kih spektrometrijskih tehnika koje su se poslednjih godina zna ajno razvijale. Ove metode se zasnivaju na merenju apsorpcije, emisije ili fluorescencije zra enja koje poti e od slobodnih, nejonizovanih atoma ili atomskih jona koji su u gasnoj fazi. Razli ite komponente instrumentalnih aparata koje se koriste kod ovih tehnika kao i njihova svojstva, dosta su sli ne jedna drugoj i zavise pre svega od talasne dužine spektralne oblasti u kojoj se primenjuju. Tako, ako se uprosti, može se re i da se kod svih ovih tehnika koriste spektrometri i detektori sli ne konstrukcije i sastava. Ispitivani uzorci, koji su naj eš e u te nom stanju, uvode se u aparat uz pomo sistema za raspršivanje rastvora.

Kvantitativna apsorpciona spektrometrijska analiza izvodi se metodom atomske apsorpcione spektrometrije kojom se nepoznata koncentracija analita odre uje na osnovu merenja apsorpcije monohromatskog zra enja odre ene talasne dužine od strane slobodnih atoma odre ivanog elementa. Danas se AAS koristi za odre ivanje oko 70 elemenata u koncentracionom opsegu od  $\mu\text{g/ml}$  do  $\mu\text{g/l}$  i nižem, naj eš e u rastvorima, ali i u vrstima uzorcima razli ite prirode i porekla.

AFS predstavlja kombinaciju apsorpcione i emisione spektrometrije. Fizi ki proces se sastoji u apsorpciji fotona  $h_1$  i emisiji fotona manje energije  $h_2$ . Pobu eni nivo može da se deekscituje razli itim putevima, odnosno preko razli itih kaskadnih prelaza. Za posmatranje emisionog procesa pogodne su linije ve eg intenziteta. Kod atoma može nastati rezonantna fluorescencija, kada se emituje foton iste energije kao i pobu iva ki, samo u nekom drugom pravcu. Kada se neki nivo pobudi, deo energije može da se izgubi sudarom ili nekim drugim procesom, pri emu atom prelazi na niže pobu eno stanje sa koga se vrši emisija. Uz apsorpciju pobu iva kog fotona, atom može deo energije da dobije ili izgubi preko topotne energije, pri emu može da se emituje foton ve e (antistoksova komponenta) ili manje energije (stoksova komponenta).

Izvor za pobu ivanje je „srce“ svakog od primjenjenih spektralnih aparata. Kod AAS i AFS izvori pobu ivanja bi trebalo da daju veliki broj atoma ispitivanog uzorka u njihovom osnovnom stanju. Treba voditi ra una da matriks ispitivanog sistema ne uti e na nivo atomizacije. Ukoliko se pak uticaj matriksa ne može izbe i, onda dolazi do pojava hemijskih interferencija. Kod ovih tehnika tako e je bitno da izvor zra enja bude stabilan i da emituje intenzivne linije uže od apsorpcionih koje se koriste za merenje. Zato se kao izvori zra enja koriste lampe sa šupljom katodom ili bezelektrodne lampe za odre ivanje lako isparljivih elemenata, kao što su As, Se i Te [1].

Pobu iva kod atomskih emisionih spektrometrijskih tehnika mora imati veliku efikasnost ina e, u protivnom, samo elementi koji imaju niske energije pobu ivanja mogu biti detektovani sa dovoljno dobrom osetljivoš u. Ove zahteve ispunjavaju razli iti izvori plazme, naro ito induktivno kuplovana plazma (eng. *Inductively Coupled Plasma* - ICP).

Najzna ajniji napredak u razvoju ovih tehnika desio se usavršavanjem njihove elektronike. Mikroprocesori su zna ajno uprostili rad ovim instrumenatima tako da su današnji instrumenti brži i bezbedniji, a osobine su im poboljšanje i to naro ito u domenu njihove preciznosti i

ta nosti odre ivanja. Upotreba autosemplera omogu ava odre ivanje velikog broja elemenata u velikom broju uzoraka za kratko vreme.

Intenzitet emitovanog zra enja i broj emisionih linija, kod AES, zavisi od temperature upotrebljenog izvora zra enja. Plamen je najstariji izvor zra enja. Jednostavan je i ekonomski je pristupa an i naj e se koristi prilikom odre ivanja alkalnih i zemnoalkalnih metala. Elektri ni lukovi i varnice mogu da pobude gotovo sve stabilne elemente, osim onih sa izuzetno visokim energijama za pobu ivanje, kao što su azot, kiseonik, halogeni i plemeniti gasovi. Razli ite vrste plazmi kao što su induktivno kuplovana plazma (ICP), direktno-strujna plazma (eng. *Direct Current Plasma* - DCP) i mikrotalasna plazma (eng. *Microwave-Induced Plasma* - MIP), imaju brojne analiti ke osobine koje ih favorizuju kao izvore za atomizaciju odnosno za pobu ivanje prilikom jedne multielementne analize. Pri prolasku kroz ICP, estice uzorka se izlažu dejstvu temperature plazme od 6000 do 10000 K. Vreme boravka produkata razgradnje uzorka u zoni posmatranja je 2 ms. Ovo vreme kao i temperatura koja deluje na uzorak su približno dva puta ve e od onih koje se postižu obi nim plamenom, tako da je ICP naj e se koriš eni izvor plazme.

Atomski emisioni spektrometar sa induktivno kuplovanom plazmom (eng. *Inductively Coupled Plasma* - *Atomic Emission Spectrometry* - ICP-AES ili eng. *Inductively Coupled Plasma* - *Optical Emission Spectrometry* - ICP-OES) ima nekoliko prednosti: jednostavan sistem za ubrizgavanje te nih uzoraka; sposobnost kvalitativne i simultane multielementne analize; merenja koja su mogu a i u vakumskoj UV oblasti; visoku osetljivost; nizak limit detekcije; male hemijske interferencije, zbog ega je ova tehnika našla veliku primenu za odre ivanja elemenata u tragovima za široki spektar uzoraka [2].

Može se tako e re i da se tehnike ICP-OES i AAS veoma dobro dopunjaju prilikom odre ivanje elemenata u tragovima. ICP-OES ima odli nu sposobnost detekcije velikog broja elemenata koji ne mogu biti odre eni ili se pak teško odre uju u malim koncentracijama pomo u plamene AAS (kao npr. B, P, S, W, U, Zr, La, V, Ti) ili pomo u elektrotermalne AAS (B, S, W, U). U tom smislu ove dve tehnike nisu jedna drugoj alternativa ve jedna drugu idealno dopunjaju. Trenutno je ICP-OES tehnikom mogu e odre ivati gotovo sve elemente periodnog sistema.

Pored ICP-OES tehnike, danas je sve više aktuelna i tehnika masene spektrometrije sa induktivno kuplovanom plazmom (eng. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* - ICP-MS). Uvo enje uzorka i pobu ivanje kod ICP-MS je identi no kao i kod ICP-OES. Suštinska razlika izme u ove dve tehnike je u sistemu za detekciju. Kod ICP-MS, joni koji se dobijaju u plazmi razdvajaju se i identifikuju u masenom spektrometu. Pored simultane analize, ICP-MS omogu ava i analizu izotopskog sastava. Ova tehnika se odlikuje izuzetnom osetljivoš u za veliki broj elemenata, reda veli ine kao za grafitno plamenu AAS (eng. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* - GFAAS), a za dosta elemenata osetljivost je ak i bolja [1].

## 1.2 Atomska emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom

Kod ICP-OES metode uzorak se uvodi u izvor plazme gde isparava i razgra uje se na slobodne atome i jone, pri emu se dodatna energija troši u cilju pobu ivanja slobodnih atoma i jona u visoko energetska stanja. Plazma prakti no ima dvostruku ulogu: kao atomizer i kao izvor

za pobuivanje i ona je u suštini ionizacioni gas koji ostaje makroskopski neutralan i dobar je provodnik elektriciteta. Procesi u plazmi kao što su disocijacija analita na atome i jone, pobuivanje nastalih estica kao i visoka temperatura plazme direktna su posledica sudara slobodnih elektrona sa svim prisutnim esticama sistema. Pobu ena stanja su nestabilna tako da atom ili atomski jon gubi energiju, bilo preko sudara (termalna razmena energije) sa drugim esticama sistema ili uz pomoč energetskog prelaza na niže energetske nivoje (radijativna razmena energije). Zračenje koje se tom prilikom dobija naziva se spontana emisija zračenja. AES metode se baziraju na tom spontano emitovanom spektru. Dobijeni emisioni spektar sadrži mnogo linija koje potiču od velikog broja različitih atoma i jona iz uzorka i izvora plazme. Iz tog razloga je neophodno da sistem za razlaganje AES instrumenta poseduje spektrometar koji ima dobru rezoluciju i sposobnost korekcije pozadine.

Svaki od prisutnih elemenata u plazmi se karakteriše talasnom dužinom emisione linije. Detekcija zračenja određuje talasne dužine se primenjuje za kvalitativnu analizu a izmereni intenzitet se koristi za kvantitativnu analizu uzorka [1].

### 1.2.1 Osnovni principi nastanka induktivno kuplovane plazme

Plazma, kao što je rečeno, predstavlja ionizujući gas koji je makroskopski neutralan (broj pozitivnih estica – jona i negativnih estica – elektrona je jednak). Ako se za nastajanje plazme koristi neki monoatomski gas X, sastav plazme se može predstaviti sledećom jednačinom:

$$X = \sum_{n=1}^q X^{n+} + \sum_{n=1}^q ne \quad (1.1)$$

gde  $X^{n+}$  predstavlja jon sa  $n$  nanelektrisanjem dok je  $e$  elektron.

Za razliku od plamena, za nastanak i održavanje plazme neophodno je da se obezbedi energija spolja u vidu električnog polja. Deo te energije je nastala plazma prenositi uzorku prije nego da vrši njegovu atomizaciju, ionizaciju i pobuivanje.

Uglavnom su analitički izvori plazme gasovi koji se prazne na atmosferskom pritisku. Najčešće se koristi argon. Kao i ostali plemeniti gasovi on je monoatomski element sa visokom ionizacionom energijom (15,76 eV) i hemijski je inertan.

Treba reći da u plazmi mogu nastati pojedini nestabilni pobušeni molekuli ili jonske vrste kao što je npr. ArH. Ova jedinjenja se uglavnom razgrađuju prilikom njihove deeksitacije. Jedini nedostatak argona je u tome što mu je termalna provodljivost mala u poređenju sa molekulskim gasovima kao što su azot ili vodonik [2].

Magnetno polje koje stvara radiofrekventni generator kod induktivno kuplovane plazme, ubrzava elektrone koji ionizuju gas plazme:



gde  $e_b$  označava brzi, a  $e_s$  spor elektron, odnosno elektron sa višom i nižom energijom.

Potom se joni argona radijativno rekombinuju sa elektronima što dovodi do pobuivanja atoma argona prije nego dolazi do pojave pozadinske emisije:



Pozadinska emisija koja se javlja je direktna posledica radijativne rekombinacije koja se dešava u UV oblasti. Osim rezonantnih linija koje se javljaju na 106,7 i 104,8 nm, argon ne daje više ni jednu spektralnu liniju ispod 300 nm.

Izvor zračenja kod AES, kao što je rečeno, ima dvostruku funkciju. Prva je da vrši atomizaciju uzorka koji se analizira pri čemu nastaju slobodni atomi analita uglavnom u osnovnom stanju, a druga uloga mu je da izaziva ionizaciju atoma analita i eksitaciju atoma i jona u viša energetska stanja. Plazma deluje kao rezervoar energije koju dobija uz pomoć radiofrekventnog polja i tu energiju prenosi analitu M. Treba reći da proces atomizacije traje relativno dugo (obično nekoliko ms), dok su procesi ionizacije i eksitacije veoma brzi. U plazmi se dešava više različitih eksitacionih i ionizacionih procesa koji su posledica prisustva vrsta koje nastaju prilikom formiranja plazme [2].

Glavni ionizacioni procesi su:

-ionizacija sa prenosom nadelektrisanja,



-ionizacija sudarom sa elektronom,



-Penning (Penning) ionizacija,



gde je  $Ar^m$  metastabilno stanje argona i to je energija veća od energije potrebne za ionizaciju analita M.

Glavni eksitacioni procesi su:

-eksitacija sudarom sa elektronom,



-jon-elektron radijativna rekombinacija,



Jonska linija biće osetljivija od odgovarajuće atomske u slučaju kada je zbir jonizacione i eksitacione energije niži od energije ionizacije argona (16 eV) [3]. To je slučaj kod elemenata kao što su: Al, Ba, Be, Ca, Co, Cr, Fe, Hg, Mg, Mo, Ni, Pb, Sn, Ti i Zn. Dobar primer ovog pravila je aluminijum, gde je jedina jonska linija koja ispunjava navedene zahteva Al II 167 nm koja je i najosetljivija linija za Al [3]. Sa druge strane, atomske linije su najosetljivije za sledeće elemente Ag, As, B, Bi, Ga, K, Li, Na, S, Se i Si. Mali je broj elemenata kod kojih su atomske i jonske linije slične osetljivosti, i to su npr. Cu, Pd, Pt, Rh i Ni.

### 1.2.2 Termodinamička ravnoteža u plazmi

Plazma je u stanju termodinamičke ravnoteže (eng. *Thermodynamic Equilibrium* - TE) ako, između ostalog, postoji i jednakost brzina svih inverznih mikroprocesa pri kojima se vrši razmena energije, uključujući i radijativne procese, što podrazumeva da se gubitak energije emisijom kompenzuje reapsorpcijom zračenja.

Termodinami ko ravnotežno stanje plazme se opisuje odgovaraju im zakonima (raspodelama) koji su funkcija temperature:

1. Maksvelova (*Maxwell*) raspodela brzina svih estica prisutnih u plazmi, koja je odre ena gasnom (kineti kom) temperaturom:

$$f(\epsilon) = 4\pi \epsilon^2 \left( \frac{m}{2\pi k T_{kin}} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{m\epsilon^2}{2kT_{kin}}\right) \quad (1.2)$$

gde je  $m$  – masa estice,  $T_{kin}$  – kineti ka temperatura,  $\epsilon$  – brzina;

2. Bolcmanova (*Boltzmann*) raspodela estica po energetskim nivoima, koja je odre ena temperaturom pobu ivanja.

Ako se popunjenoš dva pobu ena energetska nivoa  $E_m$  i  $E_k$  ozna i sa  $n_m$  i  $n_k$ , njihov odnos se može prikazati Bolcmanovim zakonom:

$$\frac{n_m}{n_k} = \frac{g_m \exp\left(\frac{-E_m}{kT_{pob}}\right)}{g_k \exp\left(\frac{-E_k}{kT_{pob}}\right)} \quad (1.3)$$

gde je  $k$  Bolcmanova konstanta ( $k = 1,380 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1} = 8,617 \cdot 10^{-5} \text{ eVK}^{-1}$ ),  $T_{pob}$  je temperatura izvora zra enja (koja se ovde naziva temperatura pobu ivanja) i  $g$  je statisti ka težina. Kako je popunjenoš pobu enih nivoa proporcionalna eksponentu ( $-E$ ), onda ona opada veoma brzo sa porastom  $E$ . Upotreba plazme omogu ava postizanje visoke eksitacione temperature, obi no izme u 3500 i 7000 K, što pove ava popunjenoš viših nivoa. U slu aju osnovnog stanja,  $E = 0$  sledi:

$$\frac{n_m}{n_0} = \frac{g_m \exp\left(\frac{-E_m}{kT_{pob}}\right)}{g_0} \quad (1.4)$$

U cilju da se poveže  $n_m$  sa totalnom popunjenoš u nivoa atoma (ili jona),  $N$

$$N = n_0 + n_1 + \dots + n_m + \dots \quad (1.5)$$

mogu e je sabrati termove kao  $g_m \cdot \exp(-E_m/kT_{pob})$  za sve moguće nivoe i tako definisati particonu funkciju ili sumu stanja,  $Z$ :

$$Z = g_0 + g_1 \exp\left(\frac{-E_1}{kT_{pob}}\right) + \dots + g_m \exp\left(\frac{-E_m}{kT_{pob}}\right) + \dots \quad (1.6)$$

Bolcmanov zakon tako dobija sledeći oblik:

$$\frac{n_m}{N} = \frac{g_m \exp\left(\frac{-E_m}{kT_{pob}}\right)}{Z} \quad (1.7)$$

Particiona funkcija ( $Z$ ) je funkcija temperature ( $T_{pob}$ ). U rangu temperatura koje se dobijaju kod ICP (3000-7000 K), ova varijacija je mala ili zanemarljiva.

3. Sahinova (*Saha*) raspodela koja definiše ionizaciono-rekombinacionu ravnotežu na temperaturi ionizacije čestica:

$$\frac{n_{q+1}n_e}{n_q} = \left(\frac{2Z_{q+1}}{Z_q}\right) \left(\frac{(2\pi m_0 k)^{1/2}}{h}\right)^3 T_{ion}^{3/2} \exp\left(\frac{-E_{ion}}{kT_{ion}}\right) \quad (1.8)$$

gde je  $h$  Plankova (*Planck*) konstanta ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  Js),  $E_{ion}$  je ionizaciona energija izme u  $q$  i  $q+1$  ionizacionih stanja,  $m_0$  je masa elektrona i  $Z$  je particiona funkcija. Kada se elektronska gustina izražava u  $\text{m}^{-3}$ , jedna ina 1.8 postaje:

$$\frac{n_{q+1}n_e}{n_q} = 4,825 \cdot 10^{21} \left(\frac{Z_{q+1}}{Z_q}\right) T_{ion}^{3/2} \exp\left(\frac{-E_{ion}}{kT_{ion}}\right) \quad (1.9)$$

Temperatura koja se koristi u Sahinovoj jedna ini se naziva ionizaciona temperatura.

4. Plankov zakon raspodele spektralne gustine zra enja na temperaturi zra enja:

$$\check{S} = \frac{2h\epsilon^3}{c^2} \frac{1}{\exp\left(\frac{h\epsilon}{kT_{zr}}\right) - 1} \quad (2.0)$$

gde je  $\epsilon$  frekvencija na kojoj se zra enje emituje,  $T_{zr}$  je temperatura zra enja a spektralna gustina zra enja ili spektralna emisiona mo .

U uslovima TE postoji jednakost svih temperatura tako da su sve raspodele odre ene istom temperaturom  $T$  ( $T = T_{kin} = T_{pob} = T_{ion} = T_{zr}$ ). U takvoj plazmi ne postoji ni gradijent temperature ni gradijent koncentracije; ona je homogena u svim delovima svoje zapremine [2].

U realnim, laboratorijskim plazmama (koje su kona nih dimenzija) TE ne može da se postigne. U njima postoje gradijenti temperature i koncentracije koji omogu avaju jednosmerne procese, pri kojima se iz plazme odvodi zra enje i estice. Verovatno a dešavanja ovih procesa mnogo je ve a za fotone, što stvara uslove da dobijena plazma odstupa od TE. Me utim, ako je razmena energije izme u estica procesom sudara dovoljno brza i ako je koncentracija elektrona dovoljno visoka, u plazmi može da se ostvari stanje u kome je Maksvelova, Boltmanova i Sahinova raspodela lokalno odre ena istom temperaturom. Tada se u svakom elementu zapremine plazme, zahvaljuju i velikoj brzini (frekvenciji) sudara koja prevazilazi brzinu radijativnih prelaza, postiže jednakost brzina svih prisutnih estica. Za takvu plazmu se kaže da je u stanju lokalne termodinami ke ravnoteže (eng. *Local Thermodynamic Equilibrium* - LTE).

Ukoliko je sistem u stanju LTE, onda se parametri plazme mogu odrediti samo koriš enjem Boltmanove i Sahinove raspodele, pri emu je temperatura plazme jednaka temperaturi elektrona  $T_e$ , što je u direknoj vezi sa njihovom prodornoš u [2].

### 1.2.3 Intenzitet linija

Prilikom spontanog prelaza elektrona u atomu (ili jonu) izme u višeg  $E_m$  i nižeg nivoa  $E_k$ , frekvencija emitovanog zra enja se može predstaviti na slede i na in:

$$\hbar = E_m - E_k \quad (2.1)$$

Kod OES, talasna dužina se obično koristi umesto frekvencije:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.2)$$

gde je  $c$  brzina svetlosti ( $c = 299792458 \text{ ms}^{-1}$ ). Talasna dužina se prikazuje u angstromima ( $\text{\AA}$ ,  $1 \text{\AA} = 10^{-9} \text{ m}$ ).

Kvantitativna analiza je mogu a ako se intenzitet spektralne linije može povezati sa koncentracijom emituju e vrste. Intenzitet zra enja na odre enoj talasnoj dužini, odnosno intenzitet spektralne linije, zavisi od:

- 1) razlike energija izme u višeg  $E_m$  i nižeg energetskog nivoa  $E_k$  jednog prelaza,
- 2) popunjenoši elektronima  $n_m$  višeg nivoa  $E_m$ ,
- 3) brojem mogu ih prelaza izme u  $E_m$  i  $E_k$  po jedinici vremena. Ova vrednost se izražava sposobnoš u prelaza  $A$ , i definisao ju je Ajnštajn (*Einstein*).

Intenzitet linije  $I$  je tada:

$$I \propto (E_m - E_k) A n_m \quad (2.3)$$

Ve re eno da je moguće povezati relativnu popunjenoši  $n_m$  sa totalnom popunjenoš u  $N$  preko Bolcmanove jedna ine pa se intenzitet linije može prikazati kao:

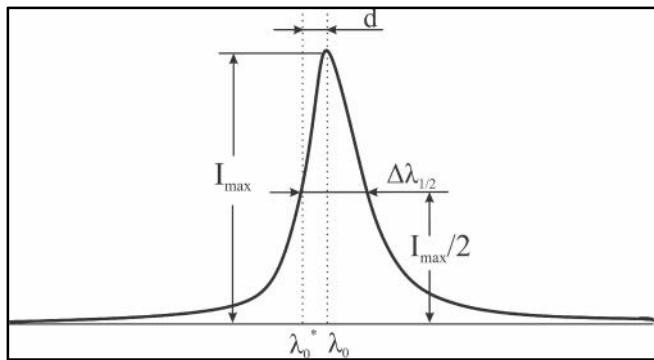
$$I = \Phi \left( \frac{hc g_m A N}{4\pi\lambda Z} \right) \exp \left( \frac{-E_m}{kT} \right) \quad (2.4)$$

gde je  $\Phi$  koeficijent koji se računa za izotropnu emisiju preko punog ugla od 4 steradijana.

Kada je izvor zra enja dovoljno stabilan da daje konstantnu temperaturu,  $Z$  ostaje konstantno, a broj atoma (ili jona)  $N$  bi e proporcionalan koncentraciji  $c$ . Za dati element koji se analizira,  $g_m$ ,  $A$ , i  $E_m$  su konstantne vrednosti tako da je  $I$  proporcionalno  $c$ , što daje mogu nost za primenu kvantitativne analize. Treba naglasiti da usled takih malih promena u osobinama izvora plazme može doći do promene temperature sistema, što izaziva varijacije u intenzitetu spektralne linije zbog promene popunjenoši pobude enog energetskog nivoa. Zato je neophodno da se osobine izvora plazme (snaga i brzina protoka gasa) održavaju konstantnim u cilju postizanja dobre reproduktivnosti odnosno da bi se izbegla bilo koja promena u analiti kom signalu [4].

#### 1.2.4 Profil linija

Pored intenziteta, jedna od najzna ajnijih osobina spektralnih linija jeste i oblik odnosno profil linije. Spektralna linija uvek ima odre en profil tj. neku raspodelu intenziteta zra enja u odre enom intervalu frekvencija (talasnih dužina). Profil ne mora obavezno biti simetri an. Oblik profila i širina snimljene spektralne linije zavise od vrste atoma emitera, fizi kih uslova prisutnih u plazmi, kao i od karakteristika spektralnog ureaja. Osnovna karakteristika profila linije je njegova poluširina  $\Delta\lambda_{1/2}$  tj. širina spektralne linije na polovini visine maksimalnog intenziteta (Slika 1.). Oblast unutar poluširine naziva se centralnom oblaš u linije, dok se delovi linije van ove oblasti nazivaju krilima linije.



Slika 1. Profil spektralne linije

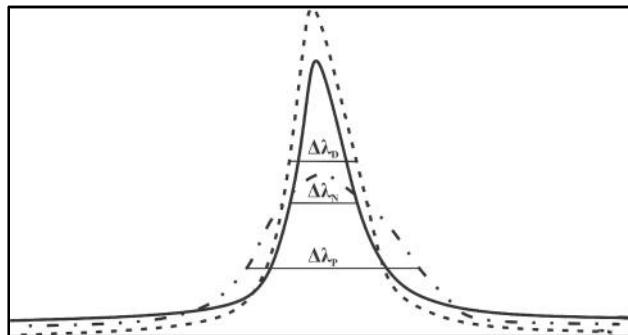
Pri analizi spektralnih linija zna se da su i druge karakteristike profila, kao što su: forma krila linije, asimetrija profila ili pomeraj spektralne linije  $d$  ( $d = \lambda_0^* - \lambda_0^*$ ). Pomeraj predstavlja rastojanje za koje je maksimum ispitivane spektralne linije pomeren ( $\lambda_0^*$ ) u odnosu na maksimum linijske intenzitete ( $\lambda_0$ ). Sve ove karakteristike profila linije govore o posebnim fizikalnim uslovima u kojima se nalaze emiteri prilikom emisije fotona. Ti posebni fizikalni uslovi su posledica istovremenog prisustva intenzivnog termičkog kretanja estica plazme i interakcije medija u njima.

Mehanizmi koji dovode do širenja spektralnih linija, koje emituju neutralni atomi ili joni iz plazme, mogu se podeliti u tri grupe:

- prirodno širenje, koje je posledica konanosti srednjeg vremena života atoma u pokušaju enom stanju;
- Doplerovo (*Doppler*) širenje, koje se javlja usled kretanja estica emitera u odnosu na optički sistem pomoću kojeg se zračenje posmatra;
- širenje usled pritiska, uzrokovano interakcijom estica emitera sa okolnim neutralnim i nanelektrisanim esticama.

Istovremeni uticaj svih gore navedenih efekata dovodi do promene položaja energetskih nivoa svakog pojedinačnog atoma ili jona emitera. Posmatrajući zračenje emitovano iz plazme, koje potiče od svih atoma ili jona emitera koji su se u datom trenutku našli na liniji duž pravca posmatranja, ustvari se registruje sumarni efekat. Dakle, u snimljenom spektru zračenja dobijaju se proširene i pomerene spektralne linije [4].

Na Slici 2 prikazan je profil prirodne linije, profil pod uticajem Doplerovog širenja kao i profil linije pod pritiskom.



Slika 2. Prirodni profil linije (—), Doplerov profil linije (----) i profil linije pod pritiskom (---)

Vrednosti širina linija koje se posmatraju kod ICP mogu dati odgovarajuće podatke o konkretnoj mjeri razlaganja odnosno rezoluciji disperzionog sistema. Idealno bi bilo kada bi primenjena rezolucija bila manja od 1 pm i time bi se u potpunosti odvojile najbliže linije. U svakom slučaju, dve linije sa sličnim intenzitetom mogu biti u potpunosti razdvojene ako bi moglo da se odvoje na rastojanju od najmanje 2 pm. Najbolji komercijalno zastupljeni uređaji imaju rezoluciju u UV oblasti oko 5 pm [5], što znači da je potpuno odvajanje biti postignuto za linije na rastojanju od najmanje 10 pm.

### 1.2.5 Odnos intenziteta linija jon/atom

Većina prethodnih teorijskih razmatranja u vezi sa nekim parametrima plazme ( $T$ ,  $E$ ,  $n$ ) i intenzitetom i profilom linija, nije moguće praktično sprovesti. Zato je potrebno pojednostaviti teorijska razmatranja određivanjem optimalnih operativnih uslova ICP-a. Najčešći pristup ovom problemu je merenje odnosa intenziteta spektralnih linija jon/atom jednog istog elementa. Cilj ovog pristupa je da se izradi teorijski odnos intenziteta linija prema LTE i da se uporedi sa eksperimentalno dobijenim odnosom. Obično su atomske linije manje osetljive na promenu eksitacionih stanja u odnosu na jonske linije tako da odnos njihovih intenziteta omogućava da se osobine ovih dve vrste linija normalizuju. Ako su ove dve linije bliske jedna drugoj, u smislu talasnih dužina, njihov odnos ne zavisi od osobina detektora (napona za fotomuliplikator).

Jon/atom odnos intenziteta linija  $I_i/I_a$  se može izvesti primenom Sahinove jednačine i Boltzmanove funkcije:

$$\frac{I_i}{I_a} = \left( \frac{4,83 \cdot 10^{21}}{n_e} \right) \left( \frac{g_i A_i \lambda_a}{g_a A_a \lambda_i} \right) T_e^{3/2} \exp\left(\frac{-E_{ion}}{kT_e}\right) \exp\left(\frac{-E_{pob \cdot i} - E_{pob \cdot a}}{kT_{pob}}\right) \quad (2.5)$$

gde su  $E_{pob}$  energija pobudivanja a  $E_{ion}$  ionizaciona energija. Kada je sistem u stanju LTE onda sledi da je  $T_e = T_{pob} = T$ . Indeksi a i i se odnose na atomske odnosno na jonske linije.

Od svih elemenata, najčešći se koristi odnos linija magnezijuma, pri čemu se biraju sledeće linije: Mg II 280,270 nm (ili Mg II 279,553 nm) i Mg I 285,213 nm (2-10). Postoje tri osnovna razloga koji favorizuju izbor ovih linija magnezijuma: a) dve izabrane talasne dužine su veoma bliske b) eksitacione energije atomske i jonske linije su istog reda veličine (35051 i 35669 cm<sup>-1</sup>) i c) vrednosti verovatnoće prelaza se znaju sa velikom tačnošću što stvara uslove da se izradi teorijski odnos izabranih linija (jednačina 2.5).

Odnos intenziteta jon/atom linija Mg pored toga što se koristi za procenu odstupanja sistema od LTE, primenjuje se i za ispitivanje ICP parametara kao što su frekvencija [6, 7], rezidualno vreme [8], brzina transporta aerosola [9, 10], brzina protoka nosačeg gasa [11] i mikroraspšršivača [12].

Tabela 1. Temperatura (K), gustina elektrona ( $\text{m}^{-3}$ ) i odnos intenziteta linija Mg II 280,270 nm/Mg I 285,213 nm [13]

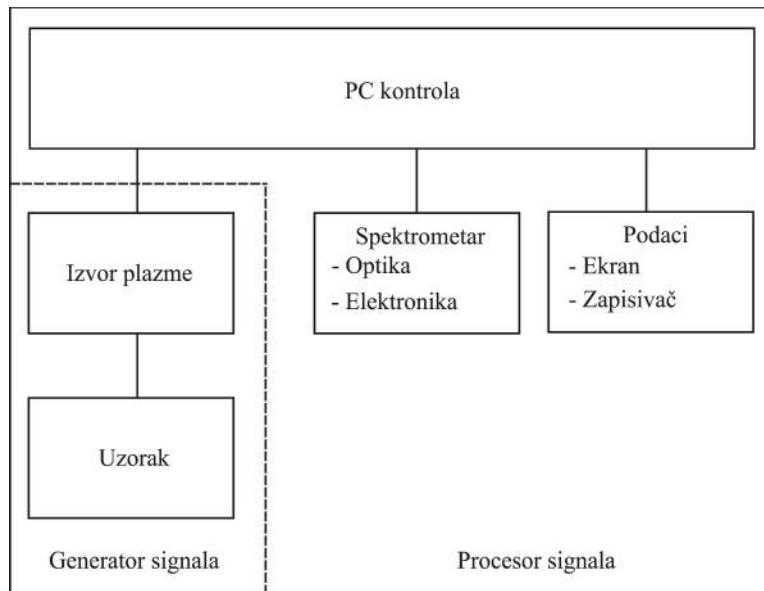
T (K)	$n_e (\text{m}^{-3})$	$I_i/I_a$
6500	$1,01 \cdot 10^{20}$	10,8
7000	$2,83 \cdot 10^{20}$	11,4
7500	$6,90 \cdot 10^{20}$	12,1
8000	$1,51 \cdot 10^{21}$	12,7
8500	$3,01 \cdot 10^{21}$	13,4
9000	$5,57 \cdot 10^{21}$	14,1
9500	$9,70 \cdot 10^{21}$	14,8
10000	$1,60 \cdot 10^{22}$	15,4

Teorijski odnos  $I_i/I_a$  se određuje kao funkcija od  $n_e$  (Tabela 1.). Kada je sistem u stanju LTE onda ovaj odnos varira između 10 i 14 za odgovarajući opseg  $n_e$  koji se obično koristi kod ICP. Praktično, eksperimentalni odnos se kreće od 1 do 14. Kada je on iznad vrednosti 8, takozvani robusni uslovi plazme su postignuti, što znači da se očekuje da dođe do kompletnih procesa atomizacije, ionizacije i eksitacije. Pod ovakvim radnim uslovima, koji se obično javljaju kada je visoka snaga radiofrekventnog generatora (eng. *Radio Frequency – RF*) i mala brzina nosećeg gasa, efekti matriksa su minimalni [10, 14]. Sa druge strane, kada je odnos ispod 4, proces nije optimizovan pa je analizirani analitički ICP pod jakim uticajem matriksa. Mada se odnos linija Mg II/Mg I najčešće koristi, postoje i drugi alternativni parovi linija koji se mogu upotrebljavati (Tabela 2.).

Tabela 2. Različiti parovi linija za procenjivanje odnosa intenziteta jon/atom

	$E_{\text{ion}} + E_{\text{pob}}$ (eV)		$E_{\text{pob}}$ (eV)
Cd II 226,502 nm	14,47	Cd I 228,802 nm	10,8
Cr II 267,716 nm	12,92	Cr I 357,868 nm	11,4
Ni II 231,604 nm	14,03	Ni I 232,138 nm	12,1
Pb II 220,353 nm	14,79	Pb I 217,000 nm	12,7
Zn II 206,200 nm	15,40	Zn I 213,857 nm	13,4

### 1.2.6 ICP-OES instrumentacija



Slika 3. Osnovne komponente ICP opti kog emisionog spektrometra

ICP-OES instrumentacija se sastoje iz dve glavne jedinice: generatora i procesora signala (Slika 3.). Generator signala se sastoje iz izvora plazme (plazmeni plamenik; generator radiofrekventnog zrajenja) i sistema za unošenje uzorka (različite vrste raspršiva a; raspršiva ka komora), dok se procesor signala sastoje od optičkog sistema elektronike i jedinice za prikazivanje podataka. Kontrola funkcija i rad spektrometra se vrši preko PC-ja i odgovarajućeg softvera.

### 1.2.7 Izvori plazme

Idealni izvor pobuđivanja morao bi da, pre svega, obezbedi efikasno isparavanje, potpunu atomizaciju pare uzorka i pobuđivanje atoma svih elemenata uz mogućnost kontrole sopstvene energije, kako bi se podjednako efikasno pobudili atomi elemenata sa niskim i sa visokim energijama pobuđivanja. Pored toga, idealni izvor morao bi da ima hemijski inertnu sredinu, kako bi se sprečile hemijske reakcije pri kojima nastaju termalno stabilna jedinjenja i minimalnu pozadinsku emisiju.

Da bi se izvor za eksitaciju smatrao idealnim za primenu u AES on mora da poseduje sledeće optimalne osobine:

- 1) potpuno isparavanje,
- 2) potpuna atomizacija,
- 3) mogućnost pobuđivanja atoma svih elemenata,
- 4) mogućnost istovremenog pobuđivanja atoma više elemenata,
- 5) hemijski inertna sredina,
- 6) odsustvo pozadinske emisije,
- 7) stabilnost rada,
- 8) reproduktivnost uslova atomizacije i pobuđivanja,
- 9) mogućnost primene za uzorce u svim agregatnim stanjima,

## 10) jednostavnost rukovanja.

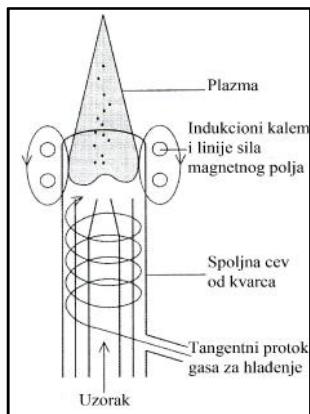
Klasi ni izvori eksitacije u AES ne ispunjavaju sve navedene uslove. Plamen, elektri na varnica i luk imaju malu stabilnost, nisku reproduktivnost i kod takvih izvora eksitacije znatan je efekat matriksa. Sa druge strane plazma kao izvor eksitacije, naro ito induktivno kuplovana plazma, je po svojim karakteristikama veoma blizu gore pomenutom idealnom izvoru za AES.

Prema na inu nastanka, razlikuju se tri vrste plazmi (plazmenih izvora):

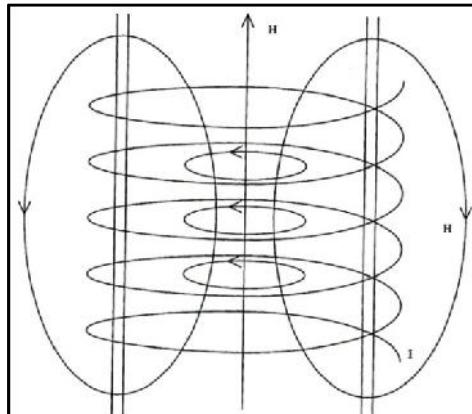
- *jednosmerna ili direktna strujna plazma (DCP)*, koja nastaje pražnjenjem izme u elektroda u kolu jednosmerne struje;
- *mikrotalasna plazma (MIP)*, koju proizvode visokofrekventna magnetna polja frekvencije 2000-3000 MHz i
- *radiofrekventna plazma (ICP)*, koju proizvode visokofrekventna magnetna polja frekvence od nekoliko MHz do nekoliko desetina MHz [4].

### 1.2.8 Induktivno kuplovana plazma

Induktivno kuplovana plazma je bezelektrodna plazma koja se formira na atmosferskom pritisku i održava induktivnim kuplovanjem sa visokofrekventnim elektromagnetskim poljem. Izvor se sastoji iz tri koncentrične kvarcne cevi postavljene u indukcionu kalem sa dva do tri navoja. Kalem je povezan sa radiofrekventnim (RF) generatorom od 5-50 MHz, izlazne snage 1-5 kW (Slika 4.). Kroz spoljnju cev tangencijalno se uvodi argon brzinom od oko 10 l/min koji hlađi cev i termi ki izoluje plazmu od zida cevi, ograničavaju i tako i njenu zapreminu. Kroz srednju cev ulazi argon, koji služi kao noseći gas i koji obezbeđuje primarne elektrone i jone za formiranje plazme. Kroz centralnu cev u plazmu se uvodi aerosol uzorka strujom argona koji protiče znatno sporije (oko 1 l/min) od gasa koji služi za hlađenje.



Slika 4. Šematski prikaz ICP izvora

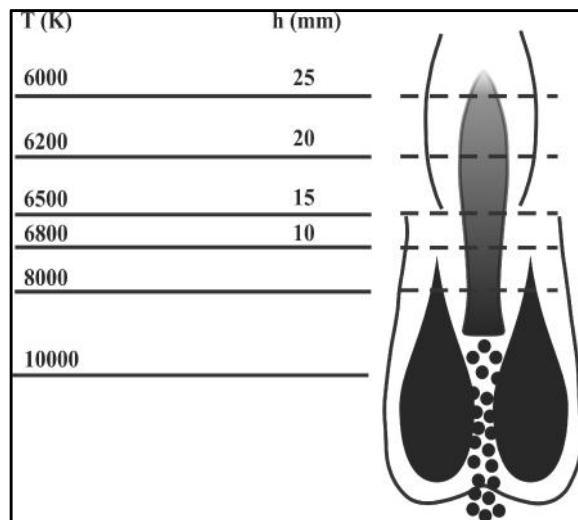


Slika 5. Magnetno polje koje se stvara oko indukcionog kalema

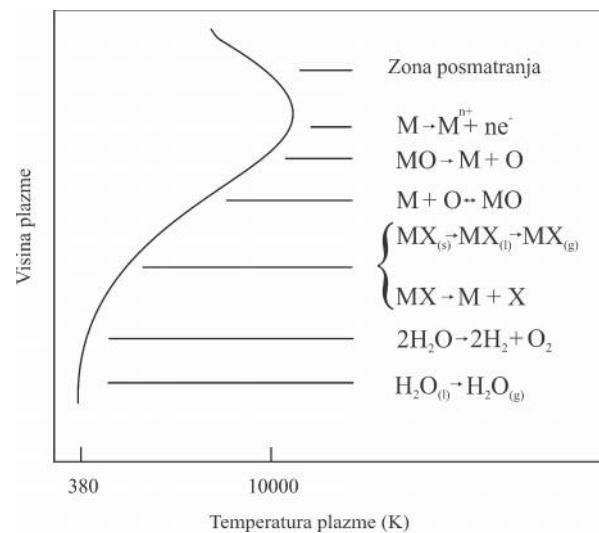
Prolaz radiofrekventne struje kroz kalem indukuje magnetno polje sa linijama sila koje su paralelne osi cevi (Slika 5.). Ovo polje u oblasti kalema indukuje električno polje u kome primarni elektroni vrše kružno kretanje i pri tom kretanju se ubrzavaju. Kada struja u indukcionom kalemu promeni smer, magnetno polje i vrtložna struja elektrona tako će menjaju svoj smer. Pri tome, ubrzani elektroni u sudaru sa atomima gasea izazivaju ionizaciju uz intenzivno zagrevanje gasea (6000 – 10000 K). Na taj način dolazi do formiranja plazme koja

sadrži visoku koncentraciju elektrona i jona nosećeg gasa, pored neutralnih atoma u osnovnom i visokopobudnim stanjima. Najvišu temperaturu ima jezgro plazme koje se nalazi unutar indukcionog kalema i nekoliko milimetara iznad njega (Slika 6.).

U plazmi mogu da se razlikuju tri oblasti različitih spektralnih osobina: visokotemperatursko jezgro u srednjem centralnom delu (kanalu plazme) uzorak podleže efikasnom isparavanju i atomizaciji; zona koja se nalazi 1-3 cm iznad indukcionog kalema, u kojoj se pobuduje većina elemenata i nisko temperaturni deo tzv. rep plazme, u kome se pobuduju elementi sa niskim energijama pobudivanja.



Slika 6. Temperature i zone u ICP plazmi



Slika 7. Uzorak (MX) u plazmi

Uzorak se injektira kao aerosol kroz unutrašnju cev. Aerosol dolazi do plazme kroz centralnu cev (eng. *Torch centre tube*) plazmenog plamenika (eng. *Torch*) ime se plazma snabdeva uzorkom za analizu. Sadržaj aerosola uzorka koji dospeva u plazmu zavisi od vrste centralne cevi:

- 1,5 mm kvarcna cev za vodene rastvore
- 1,0 mm kvarcna cev za organske rastvore
- 2,0 mm kvarcna cev za visokokoncentrovane rastvore
- 2,0 mm keramička cev za rastvore sa HF

Reakcije do kojih dolazi kada atmosfera uzorka pređe kroz plazmu prikazana je na Slici 7. U ICP-u se lako razlažu, ali i jako postojana jedinjenja. Važna osobina ICP-a koja nije karakteristična za ostale emisione izvore je ta što je aerosol uzorka koji je unet u ICP, okužen visoko temperaturnom plazmom relativno dugo, i to negde oko 2 ms. Upravo to dugo rezidulano vreme koje estice analita provedu u centru plazme je i zaslužno za odustrojstvo interferencija matriksa kod ICP-a. Za razliku od različitih vrsta oksidacionih plamenova, slobodni atomi i joni su kod ICP u inertnoj atmosferi, i zato je njihov život u plazmi duži nego u plamenu [4].

#### 1.2.8.1 Tipovi induktivno kuplovane plazme

Induktivno kuplovane plazme se mogu podeliti u dve osnovne grupe:

- 1) Visoko energetske, azot-argon ICP i

## 2) Nisko ili srednje energetske, argon ICP.

Visoko energetska ICP se takođe zove i „azot hla ena ICP“ jer ova plazma nastaje u relativnom velikim izvorima sa azotom koji se koristi kao spoljni gas (za hla enje) i argonom kao pomoćnim i nosećim gasom. Drugi gasovi koji se koriste u plazmi umesto argona npr.  $N_2$  imaju neke prednosti u odnosu argon. Termalna provodljivost molekula ovih gasova je veća nego kod argona i nešto je bolji transfer energije kroz aerosol uzorka. To omogućava bolji i efikasniji unos rastvora i bolje analitičke performanse u toku analize postojanih materijala. Sa druge strane, kod ovih gasova dolazi do pojave određenih spektralnih interferencija. U praksi većina komercijalnih instrumenata koristi isti argon kao plazma gas.

### 1.2.9 Radiofrekventni generatori

Radiofrekventni generator je deo koji se koristi za snabdevanje ICP-a snagom. Snaga koja je potrebana za merenja u AES je između 600 i 1800 W, što zavisi od tipa uzorka koji se analizira, dimenzija izvora plazme itd. Većina generatora ima kapacitet da dostigne snagu od 2000 W. Operativna snaga za analizu vodenih rastvora se kreće od 950 do 1400 W. Veća snaga je potrebna za analizu uzoraka u organskim rastvarima.

Frekvencija koju stvara generator kod većine komercijalnih instrumenata je 27,12 ili 40,68 MHz iako se instrumenti konstruišu tako da mogu da daju i mnogo veće frekvencije (npr. 56,64 pa čak i 148 MHz). Generatori sa frekvencijom od 40,68 MHz uglavnom daju dobru efikasnost kuplovanja, što ima za posledicu veće temperature i poboljšanu robusnost plazme kao i njenu stabilnost. Takva plazma bi mogla da koristi i druge gasove umesto argona a bila bi pogodna i za analizu uzoraka u organskim rastvarima. Kako je efikasnost kuplovanja poboljšana ovim generatorima daju robusnu i stabilnu plazmu pri manjoj snazi. To dovodi do nastanka manje pozadinske emisije a posle je signal pozadine smanjen takođe što dovodi do poboljšanja limita detekcije metode.

Generatori se mogu hladiti putem vode ili vazduha. Oba načina hla enja imaju svoje prednosti tako i svoje nedostake. Hla enje vazduhom je obično jeftinije ali sa druge strane može biti nedovoljno efikasno [2].

### 1.2.10 Unošenje uzorka

ICP se uspešno koristi za analizu uzoraka različite prirode i porekla (stene, minerali, voda, vazduh, biološki materijali itd.) u sva tri agregatna stanja. Međutim, uzorci se po pravilu prevode u rastvor koji se u obliku aerosola uvodi u plazmu. Sistem za unošenje uzorka se stalno unapređuje i to sve u cilju povećanja broja različitih vrsta analita koji dolaze do plazme (ime se povećava i osjetljivost) i smanjenje karakteristika šuma. Jedan od problema koji nosi sa sobom povećanje efekta transporta mase uzorka je taj što on dovodi i do povećanja količine uzorka u plazmi a samim tim dolazi do velike nestabilnosti plazme i uticaja matriksa na ispitivanu sistem [15, 16]. Pneumatski raspršivač daje široki spektar različitih veličina estica aerosola. Komore za raspršivanje vrše distribuciju estica aerosola prema veličini i njenom upotrebovi dolazi do smanjenja šuma koji se javlja prilikom interakcije aerosola sa plazmom [17].

#### 1.2.10.1 Raspršiva i komore za raspršivanje

Za raspršivanje rastvora koriste se uglavnom koncentri ni pneumatski raspršiva i (eng. *Nebulizer*). Osnovna funkcija raspršiva a je da izvrši transformaciju struje te nog uzorka u maglu tj. u izmaglicu kapljica. Na tržištu postoji veliki izbor različitih raspršiva a. Neki su specijalizovani za unos uzorka koji sadrže visok nivo rastvorenog vrstog materijala dok se drugi koriste za uzorke koji imaju visok sadržaj suspendovanog vrstog materijala. Svaki od ovih uzorka može dovesti do blokade pumpe samog raspršiva a. Kod nekih raspršiva a nije neophodno da se u njih pumpom ubacuje uzorak dok kod drugih je pumpa neophodna za unos uzorka u raspršiva . Mnogi raspršiva i imaju optimalni nivo unosa uzorka od 1 do 1,5 ml/min, dok neki mogu efikasno unositi od 30 do 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Materijali od kojih se izrađuju raspršiva i su od kvarcnog stakla ili teflona što zavisi od vrste uzorka i rastvara a koji se koristi. Kada se koriste organski rastvara i, koji imaju nižu tačku ključanja u odnosu na vodene rastvore, u plazmu se ubacuje više uzorka što može da utiče na analizu ili akcijski da ugasi plazmu. Kod organskih rastvara a velike gustine koriste se kvarcni raspršiva i sa V-urezom. Za uzorke rastvarane u HF-u koriste se HF otporan raspršiva od teflona. Upotrebom ultrazvu nog raspršiva a moguće je povećati granice detekcije elemenata od 5-50 puta u poređenju sa standardnim raspršivanjem.

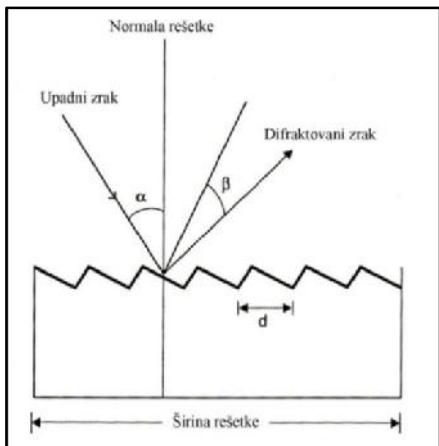
Komore za raspršivanje (eng. *Spray Chamber*) imaju dve osnovne uloge. Jedna je da razdvajaju velike kapi koje formira raspršiva od manjih. Najveće kapi se uklanjaju, dok se najmanje putem protoka gasa kroz raspršiva dovode do plazme. Druga uloga komora za raspršivanje je da deluju kao amortizer šuma koji dolazi od uzorka. I komore se, kao i raspršiva i, izrađuju od kvarcnog stakla ili teflona u zavisnosti od vrste rastvara a. Za isparljive organske rastvara e koriste se vodom hlađene kvarcene raspršiva ke komore a za uzorke u HF teflonski raspršiva i. Za eliminisanje mogu nastati za epljenja raspršiva a postoje različiti dodaci: ovlaživa argona, AeroSalt raspršiva i raspršiva sa V-urezom [2].

#### 1.2.11 Spektrometri

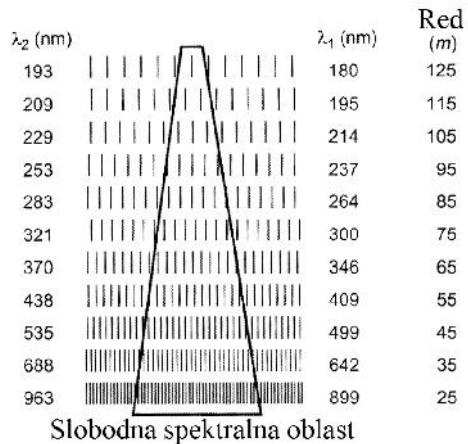
Uloga spektrometara je da, iz spektra koji emitiše izvor plazme, izdvoje talasnu dužinu od interesa (analitičku talasnu dužinu). Sve do 90-tih godina dvadesetog veka je za disperziju različitih talasnih dužina korištena difrakciona rešetka, dok su stariji instrumenti koristili prizmu ili filtre. Ovi uređaji su mogli da izdvoje samo jednu talasnu dužinu na detektoru, a nakon njihove rotacije pod različitim uglovima mogla se pratiti naredna talasna dužina. Od 1990. po danje je da se koristi novi disperzioni uređaji koji je omogućavao da se istovremeno prati veliki broj talasnih dužina. To je povećalo brzinu analize i tako je omogućilo da se korekcija pozadine obavlja u realnom vremenu. Ovaj uređaj se naziva ešeletna<sup>1</sup> rešetka (Slika 8.).

Ešeletne rešetke se sastoje iz velikog broja ureza na ravnoj (ili konkavnoj) podlozi prevu enoj tankim slojem materijala koji za određenu spektralnu oblast ima visoku refleksiju. Radna, refleksiona površina rešetke može da bude paralelna osnovi rešetke ili pod nagibom za određeni ugao, koji se naziva ugao sjaja. Ugao sjaja ima znatnu ulogu u raspodeli intenziteta dobijenih spektara.

<sup>1</sup> Franc. échelle - lestvice

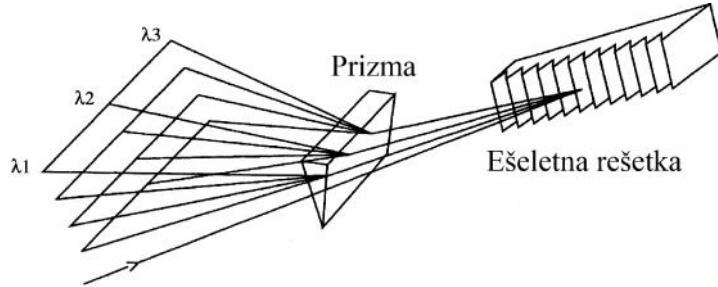


Slika 8. Ešeletna rešetka



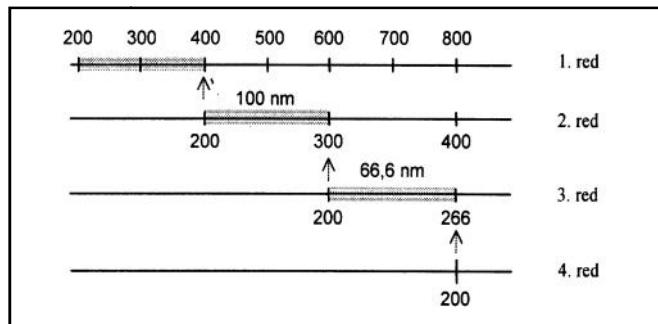
Slika 9. Dvodimenzionalna spektralna slika

Svetlost koja pada na rešetku difraktova je u zavisnosti od svoje talasne dužine. Svakoj talasnoj dužini odgovara određeni ugao difrakcije što i dovodi do prostornog razlaganja složenog zračenja na monohromatske komponente. Ešeletna rešetka daje istovremeno više spektara koji odgovaraju razliitim vrednostima reda spektra (Slika 9.). Ove rešetke proizvode spektre vrlo visokih redova (preko 100). Zbog toga su intervali, slobodni od preklapanja veoma mali, tako da se ne mogu izdvojiti na isti način kao u slučaju spektara nižih redova. U tom slučaju kao pomoćni disperzionalni element (razdvaja redove) koristi se prizma ili mala disperzna rešetka koja razlaže zračenje u ravni normalnoj na ravan disperzije ešeletne rešetke (Slika 10.). Otuda naziv „razlaganje sa ukrštanjem disperzije“. Ovakva kombinacija omogućava istovremenu detekciju više spektralnih redova u obliku dvodimenzionalne slike sa apscisom koja označava talasnu dužinu i ordinatom koja označava spektralne redove.



Slika 10. Razlaganje zračenja uz pomoć prizme

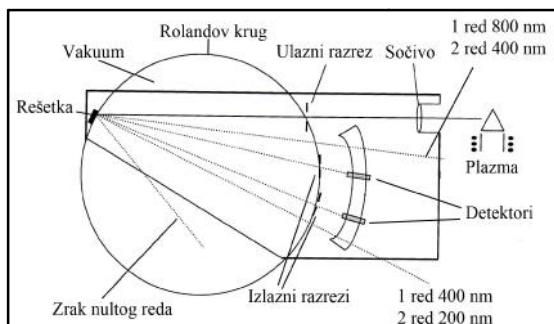
Spektri različitih redova se delimično preklapaju, što otežava njihovu identifikaciju. Npr. spektralna linija talasne dužine 600 nm iz prvog spektralnog reda preklapa se sa linijom talasne dužine 300 nm iz drugog reda, sa linijom 200 nm iz trećeg reda itd. Međutim u svakom spektru datog reda postoji određeni interval talasnih dužina koji je slobodan od preklapanja sa spektrom iz susednog višeg reda.



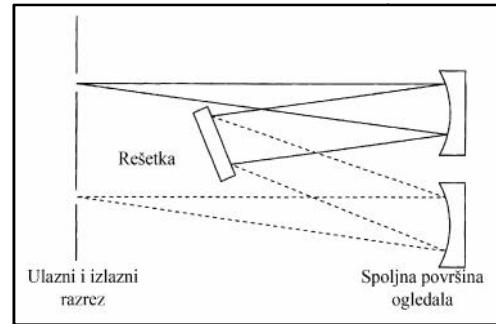
Slika 11. Preklapanje spektralnih redova

Multielementna analiza tj. određivanje većeg broja elemenata u istom uzorku, se ostvaruje na dva osnovna načina, korištenjem standardnih disperzionalnih uređaja - monohromatora i polihromatora. Kada se u jednom istom spektrometu koristi veći broj izlaznih razreza i detektora, takav uređaj se naziva polihromator. Simultana multielementna analiza uz pomoć polihromatora se ostvaruje na taj način što svakom izlaznom razrezu odgovara atomska ili jonska emisiona linija određenog elementa. Najčešće se kod standardnih polihromatora koristi Pašen-Rungeova (eng. Paschen-Runge) raspodela (Slika 12.). Ovaj spektrometar se sastoji od jednog ulaznog razreza, konkavne rešetke i većeg broja izlaznih razreza koji su periferno raspoređeni u tzv. Rolandovom (eng. Rowland) krugu [1].

Sa druge strane, kod monohromatora se koristi samo jedan izlazni razrez i detektor. Ovi spektrometri se koriste za multielementnu analizu tako što vrše brzo skeniranje idući od jedne spektralne linije do druge. To se ostvaruje promenom ugla difrakcijske rešetke ili njenom rotacijom ili pak pomeranjem detektora na izlaznu površinu monohromatora dok je rešetka tada u fiksnom položaju. Kada se monohromator dovoljno brzo okreće od linije do linije, moguće je da se izvrši brza sekvenčna multielementna analiza. Kod standardnih monohromatora se koristi Cerni-Tarnerov (eng. Czerny-Turner) raspored sa dva kolimatorska ogledala za fokusiranje zračenja i jednim izlaznim razrezom (Slika 13.) [1].



Slika 12. Šematski prikaz Pašen-Rungeovog polihromatora



Slika 13. Šematski prikaz monohromatora sa Cerni-Tarnerovim rasporedom

Polihromatori i monohromatori koji se koriste kod ICP-OES instrumenata imaju kako svoje prednosti tako i svoje nedostatke. Kada se koriste polihromatori, svaka emisiona linija može se pratiti za sve vreme unošenja uzorka, i teoretski, više uzoraka moglo bi se analizirati za kraći vremenski period. Isto vreme analize je potrebno za analizu kako 5 tako i 30 elemenata. Kako polihromatori imaju za svaku spektralnu liniju po jedan izlazni razrez i detektor (fotomultiplikator), oni su uglavnom limitirani, zbog raspoloživog prostora u samom

spektrometru, na 48 do 64 izlazna razreza. Tako je većina polihromatora programirana za 20 do 30 spektralnih linija.

Najvažnija prednost sistema koji koristi monohromator je spektralna fleksibilnost ovih uređaja. Pod time se podrazumeva mogućnost pristupa, u bilo kom trenutku, svakoj od talasnih dužina koje su u opsegu monohromatora. Drugim rečima uz pomoć ICP-OES instrumenata koji koriste monohromator mogu se odrediti svi oni elementi ija se emisija može izmeriti ovom tehnikom. Zahvaljujući i njihovoj sposobnosti skeniranja, instrumenati sa monohromatorima su mnogo bolji za primenu kada su u pitanju sistemi sa kompleksnom korekcijom pozadine. Tako da, skeniranje oblasti oko linije analita ili simultano određivanje njihove blizine doprinosi validaciji analitičkih rezultata.

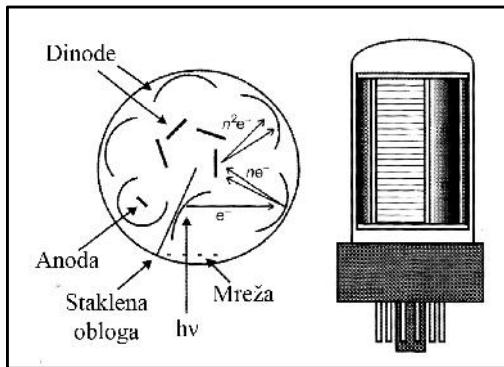
Kako se uz pomoć monohromatora elementi sekvencijalno određuju, to zahteva i veći utrošak uzorka nego što je potrebno kod instrumenata koji koriste polihromator. Uglavnom, se kod monohromatora, ukoliko postoje interferencije kod spektralne linije analita, preporučuje prelaz na drugu liniju analita kod koje ne postoje ometanja.

Najveći broj analitičkih korisnih linija kod ICP-OES-a se nalazi u oblasti od 190-450 nm tako da su svi spektrometri koji se koriste kod ICP-OES tehnike uglavnom optimizovani za rad u ovom opsegu talasnih dužina. Međutim, postoje i neke važne ICP emisione linije u oblasti od 160 do 190 nm kao i iznad 450 nm. Nažalost, elektromagnetsko zračenje u oblasti talasnih dužina od 160 do 190 nm brzo apsorbuju prisutni molekuli kiseonika, pa zato instrument mora biti tako dizajniran da ukloni vazduh iz spektrometra u cilju detekcije emisije iz ovog dela spektra. Uklanjanje kiseonika se ostvaruje oblikovanjem spektrometra gasom, uglavnom azotom ili argonom, koji ne apsorbuje emitovano zračenje u tom delu spektra, ili se pak vazduh uklanja iz spektrometra vakuumom [2].

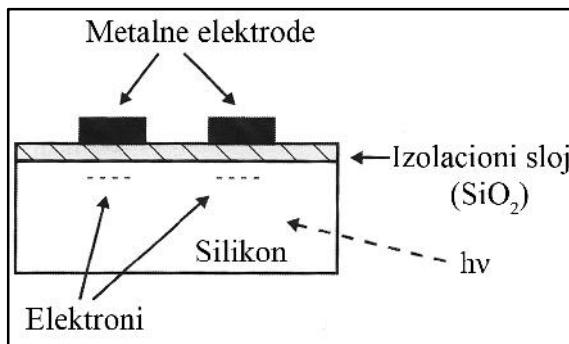
### 1.2.12 Detektori

Nakon što je odvajanje talasnih dužina izvršeno uz pomoć odgovarajućih spektrometara, za "itanje" dobijenih spektralnih informacija koriste se detektori. Fotomultiplikatori su se godinama koristili kao detektori kod ICP-OES instrumenata. Oni predstavljaju vakuumske fotoelije sa unutrašnjim pojačanjem anodne struje za  $10^6$  do  $10^8$  puta (Slika 14.). Slično fotoelijama, fotomultiplikatori se sastoje od evakuisanog balona sa fotoosetljivom katodom i kolektorskom anodom između kojih se nalazi 5-10 elektroda, tzv. dinoda, napravljenih od materijala na bazi MgO, GaP. Svaka dinoda je na pozitivnijem naponu za  $\sim 100$  V u odnosu na prethodnu, omogućavajući na taj način emisiju sekundarnih elektrona pomoću kojih se postiže pojačanje.

Primarni elektroni oslobođeni sa površine katode pod dejstvom fotona ubrzavaju se pozitivnim poljem prve dinode tako da pri udaru u njenu površinu izbijaju dva do pet sekundarnih elektrona, koji se ubrzavaju na putu prema drugoj dinodi sa iste površine svaki elektron izbija 2-5 novih sekundarnih elektrona, i proces multiplikacije se ponavlja do anode. Faktor pojačanja je obično  $10^6$  za deset dinoda [1].



Slika 14. Šematski dijagram fotomultiplikatora



Slika 15. Šematski prikaz CCD-a

U novije vreme jedna od najznačajnijih poboljšanja u tehnologiji ICP-OES detektora jeste zamena fotomultiplikatora i upotreba više kanalnih detektora koji se baziraju na tehnologiji ure aja za prenos nanelektrisanja (eng. *Charge-transfer device* - CTD). Za višekanalnu detekciju u AES se koristi ure aja sa kuplovanim nanelektrisanjem (eng. *Charge-coupled device* - CCD) i ure aja sa ubrizgavanjem nanelektrisanja (eng. *Charge-injection device* - CID). Njihova upotreba kod ICP-OES metode, omogućava visoku osjetljivost određivanja i pokrivanje širokog opsega talasnih dužina u UV i vidljivom delu spektra. Svi tipovi CTD ure aja su poluprovodnici koji se sastoje iz serije elija koje akumuliraju nanelektrisanje kada se izlože dejstvu zračenja. Zbir akumulovanog naboja je stoga mera kolичine svetlosti (zračenja) kojoj je odgovarajuća elija bila izložena. CTD predstavlja niz vrlo bliskih metal-izolator-poluprovodnik dioda koje se nalaze na oblozi od poluprovodnika. Praktično, CTD mora biti izložen dejstvu svetla na određeno vreme nakon čega se vrši „itanje”. Za vreme „itanja” detektor nije izložen dejstvu svetla. Kod CCD ure aja svetlost koja dolazi iz izvora plazme se skuplja određeno vreme i potom se „ita” i to „vrsta po vrstu”, što omogućava da se akumulovani naboj prenosi od elije do elije sve dok ne stigne do pojava ivice (Slika 15.). CID se nešto razlikuje od CCD-a po svom radu jer se kod ovog ure aja elije mogu nezavisno ispitivati u bilo kom trenutku za vreme dok su izložene dejstvu izvoru plazme [1].

Glavne prednosti CTD ure aja su sledeće:

- fleksibilnost prilikom odabira ispitivane linije (talasne dužine);
- upotreba više različitih linija za jedan isti element u cilju da se proširi linearni dinamički opseg;
- upotreba više različitih linija za jedan isti element u cilju poboljšanja tačnosti i identifikacije potencijalnih uticaja spektralnih interferencija ili matriksa;

Naravno treba napomenuti i da ovi ure aji imaju određene limite koji su u vezi sa njihovom funkcijom i operativnošću [18].

Kod ICP-MS se kao detektor najčešće koristi kontinualni dinodni elektron multiplikator. Operativni principi ovog ure aja su slični kao kod fotomultiplikatora (Slika 14.), s tim što ovde nema dinoda. Ovaj detektor mora raditi pod vakuumom.

U Tabeli 3 prikazani su limiti detekcije (LOD) za pojedine elemente primenom ICP-OES metode u poređenju sa MS tehnikom [2].

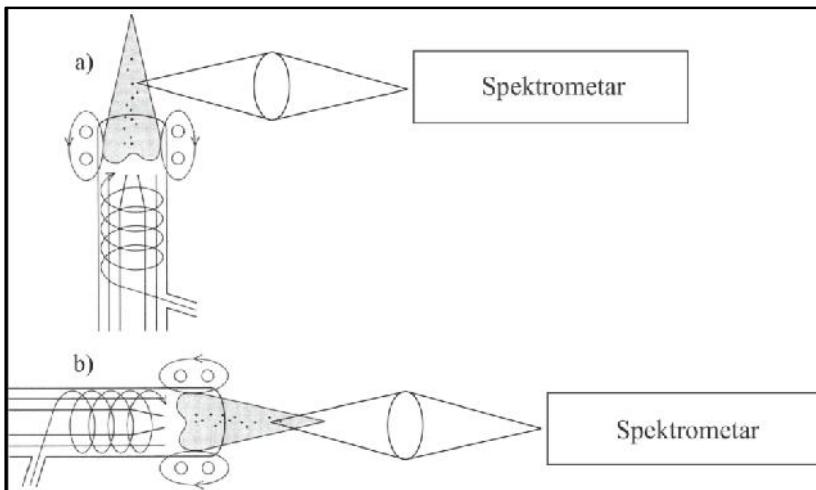
Tabel 3. Limiti detekcije pojedinih elemenata sa najosetljivijom linijom za ICP-OES i najzastupljenijim izotopom za ICP-MS

<b>Analit</b>	<b>ICP-OES/<math>\mu\text{g/l}</math></b>	<b>ICP-MS/ng/l</b>
Al	5	50
Cd	1	5
Ca	0,1	500
Fe	1	100
Pb	7	1
Mg	0,3	50
Mn	0,3	5
Hg	20	1
K	4	500
Na	2	50
Sn	7	5
Zn	1	5
Mo	1	5
Cr	2	5

### 1.2.13 Radijalna i aksijalna plazma

Zra enje koje se emituje iz plazme je usmereno na ulazni otvor spektrometra sistemom konveksnih so iva. Mogu a su dva moda posmatranja plazme. Jedan mod je tzv. „sa strane“ ili „lateralni ili radijalni“, gde se zra enja plazme posmatra ortogonalno kroz centralni kanal ICP-a i drugi „sa kraja“ ili „aksijalni“ kod koga se posmatranje zra enja plazme poklapa sa centralnim kanalom ICP-a (Slika 16.).

Kod radijalne plazme optika instrumenta se može lako zaštititi od pregravanja, pa tako delovi razgradjenog analita koji mogu da dospeju do ulaznog razreza i optike ne e dovoditi do ozbiljnijih problema prilikom jedne analize. Ali kod aksijalne plazme interferencije izme u plazme i optike mogu dovesti do ozbiljnih poteško a prilikom odre ivanja analita, o emu se mora posebno voditi ra una. Hladni rep plazme se zato mora ukloniti sa ose optike jer e u protivnom do i do smanjenja dinami kog linearног opsega usled apsorpcije atoma duž opti puta. Pored toga, prisustvo lako ionizuju ih elemenata može dovesti i do jonizacionih interferencija. Hladni rep plazme se može ukloniti protokom gasa (npr. Ar) koji se usmerava na desno u odnosno na plazmu, što dovodi do deformacije repa plazme. Drugi na in da se ukloni hladni rep plazme je da se gas propusti u suprotnom smeru od plazme. Na taj na in se hladni rep plazme uklanja simetri no uz pomo tog gasa koji ga „se e“ i koji proti e kroz vodom hla eni interfejs [4].



Slika 16. Šematski prikaz a) radikalne i b) aksijalne plazme

Moderni ICP-OES spektrometri su tako programirani da mogu da koriste obe vrste gledanja plazme, i radikalnu i aksijalnu, u zavisnosti od vrste uzorka koji se ispituje i analita koji se određuje. Kada je za neke analize potrebna manja osetljivost kao npr. za veće koncentracije elemenata primenjuje se radikalna plazma. U slučaju određivanja nižih koncentracija, narođito prelaznih elemenata, koristi se osetljivija aksijalna plazma. U Tabeli 4 prikazani su rezultati određivanja sadržaja dva standardna sertifikovana referentna materijala koji su dobijeni primenom oba moda posmatranja zračenja plazme [19].

Tabela 4. Analiza dva standardna sertifikovana referentna materijala upotrebom aksijalnog i radikalnog posmatranja plazme kod ICP-OES [19]

Element (koncentracija)	Aksijalno posmatranje	Radikalno posmatranje	Sertifikovana vrednost
<i>NIST 1515 Listovi jabuke<sup>a</sup></i>			
Ca (wt%)	1,32 ± 0,06	1,46 ± 0,03	1,526 ± 0,015
Cu (mg/kg)	4,98 ± 0,23	6,14 ± 0,06	5,64 ± 0,24
Fe (mg/kg)	61,9 ± 1,4	66,5 ± 4,3	83 ± 5
Mg (wt%)	0,241 ± 0,010	0,247 ± 0,003	0,271 ± 0,008
Mn (mg/kg)	44,5 ± 1,1	48,5 ± 2,5	54 ± 3
Zn (mg/kg)	10,9 ± 0,3	19,6 ± 2,7	12,5 ± 0,3
<i>NIST 1577b Gove a jetra<sup>a</sup></i>			
Ca (mg/kg)	146 ± 12	107 ± 5	116 ± 4
Cu (mg/kg)	142 ± 1	148 ± 1	160 ± 8
Fe (mg/kg)	164 ± 4	156 ± 4	184 ± 15
Mg (mg/kg)	546 ± 5	523 ± 4	601 ± 28
Mn (mg/kg)	7,20 ± 0,58	9,14 ± 0,75	10,5 ± 0,17
Zn (mg/kg)	114 ± 1	110 ± 3	127 ± 16

<sup>a</sup> NIST-Nacionalni institut nauke i tehnologije U.S.

### **1.2.14 Efekti interferencija i korekcija pozadine**

Interferencijski efekti kod ICP-OES tehnike mogu poticati od:

- 1) interferencije raspršiva a,
- 2) hemijskih interferencija,
- 3) ionizacionih interferencija i
- 4) spektralnih interferencija.

Udeo svake od navedenih interferencija zavisi od izvora plazme i spektrometara koji se koristi u jednom instrumentu. Među gore navedenima interferencijama efektima koji se mogu javiti, spektralne interferencije predstavljaju najveće u smetnju prilikom jedne ICP-OES analize.

#### *1.2.14.1 Interferencije raspršiva a*

Ove vrste interferencija se javljaju u slučaju kada količina raspršenog uzorka varira u toku vremena. Nejednako raspršivanje može biti posledica različitih fizikalno-hemijskih osobina rastvora odnosno rastvara a (viskoznost, površinski napon, gustina itd.). Ove interferencije se mogu takođe javiti i kod visoko koncentrovanih rastvora.

#### *1.2.14.2 Hemijske interferencije*

Usled vrlo visoke temperature gasa, znatnog rezidualnog vremena i inertne atmosfere plazme, hemijske interferencije prouzrokovane formiranjem termalno stabilnih jedinjenja ili radikala se ne javljaju kod ICP-a. Niža RF snaga može dovesti do pojave ovih interferencija, ali sa porastom snage plazme i manjom brzinom protoka nosećeg gasa (tj. pod robusnim uslovima plazme), hemijske interferencije i efekti matriksa se smanjuju.

#### *1.2.14.3 Ionizacione interferencije*

Kod ICP-a ove vrste interferencija ne predstavljaju značajan problem zbog velike gustine elektrona kod ovih izvora zbog čega mogu biti ionizovani i elementi visokih energija ionizacije. Međutim, lako ionizujući elementi, kao što su alkalni i zemnoalkalni metali, mogu dati pojavu intenzitet emisionih linija.

#### *1.2.14.4 Spektralne interferencije*

Spektralne interferencije se javljaju kod svakog emisionog izvora. Ove vrste interferencija su nazvana pojma ometanja kod ICP analiza, zato što emisione linije za koje se očekuje da budu slabe ili nevidljive kod ostalih izvora, kao što su plamen, električni luk, varnica, ovde bivaju jako intenzivne. Spektralne interferencije potiču od samog spektra argona i od emisionih linija atomskih i molekulskih vrsta prisutnih u plazmi. Spektralne interferencije se mogu podeliti u sledeće osnovne grupe:

- a) preklapanje spektralne linije analita sa linijom prisutnog drugog elementa bliske talasne dužine,
- b) preklapanje sa krilom proširene susedne linije,
- c) preklapanje sa kontinualnim zračenjem neke komponente osnove i
- d) preklapanje sa rasutim zračenjem u aparatu

a) Ova vrsta spektralnih interferencija nastaje kada spektrometar nije u stanju da odvoji liniju analita od linije koja potiče od nekog elementa u matriksu. Malo se šta može uiniti da se bi se ova vrsta interferencije izbegla na odabranoj talasnoj dužini. Jedino rešenje za ovaj problem je da se izvrši odvajanje analita iz interferencionog matriksa odgovarajućim metodom, kao što je ekstrakcija, jonska izmena itd. Sa instrumentima koji nude izbor velikog broja talasnih dužina analita, ovaj problem se može izbeći i tako što se jednostavno prepiše na drugu talasnu dužinu na kojoj se interferencija javlja.

b) Intenzivna, široka linija nekog elementa matriksa u blizini linije analita može dovesti do spektralnih interferencija preklapanjem sa linijom analita. Ova vrsta interferencija se može izbegnuti odabirom druge linije analita na kojoj nema interferencije; odgovarajućim metodom odvajanja ili korekcijom pozadine.

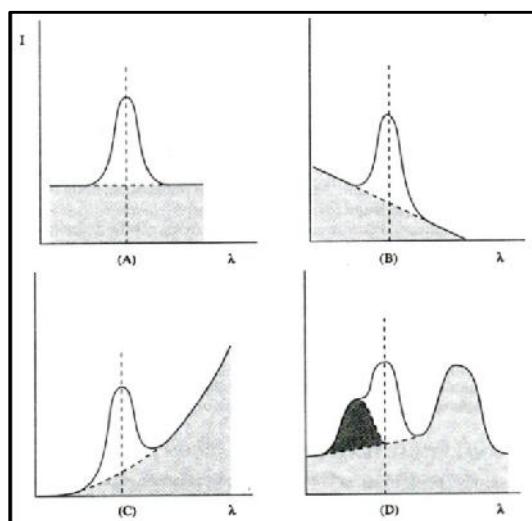
c) Osobina izvora plazme je pojava kontinualnog spektra. To je posledica uglavnom radijativne rekombinacije elektrona, uglavnom sa jonima argona a manje sa elementima matriksa. Povećanje RF snage ICP-a dovodi do porasta elektronske gustine što pojavaava pozadinsku emisiju. Kontinualni spektar koji potiče od neke komponente matriksa takođe može da interferira određivanje analita na odabranoj talasnoj dužini. Ova vrsta ometanja može se izbegnuti promenom linije analita, korekcijom pozadine ili nekom metodom hemijskog odvajanja.

d) Elementi matriksa koji su prisutni u visokim koncentracijama emituju intenzivno zračenje. Karakteristike optičkog sistema instrumenta mogu biti uzrok pojave da to intenzivno zračenje dovede do zasićenja detektora što povećava pozadinu a samim tim i šum prilikom merenja. Ovaj efekat se može smanjiti upotrebo visoko kvalitetnih optičkih komponenata [4].

#### 1.2.14.5 Korekcija pozadine

U nekim slučajevima interferencije dovode do pojave pozadinske spektralne linije koja se direktno poklapa sa određivanim analitom. Ovo ometanje se uz pomoć korekcije pozadine može izbegnuti.

Spektralna raspodela pozadinske emisije može se podeliti u četiri osnovne grupe: a) ravna pozadina, b) linearna pozadina, c) zakrivljena pozadina i d) strukturalna pozadina (Slika 17.).



Slika 17. Osnovni tipovi pozadine

## 1.3 Optimizacija i validacija ICP-OES metoda

### 1.3.1 Optimizacija

ICP predstavlja izvor u kome je mogu e istovremeno vršiti kako atomizaciju uzorka tako i eksitaciju i ionizaciju slobodnih atoma. Kako je ve re eno, visoka kineti ka temperatura plazme je od 6000 do 10000 K, i ona bi trebalo da bude dovoljna da izvrši potpunu atomizaciju uzorka koji se analizira. U cilju postizanja optimalnih karakteristika ICP-OES analiti kog instrumenta neophodno je izvršiti optimizaciju operativnih odnosno radnih parametara instrumenta. Parametri koji uti u na pravilan izbor talasne dužine elementa koji se odre uje su *RF* snaga generatora, brzina protoka gasa za raspršivanje, visina posmatranja plazme i brzina unošenja uzorka. Interakcija ovih parametara je kompleksna i da bi se dobili tzv. robusni uslovi plazme, kombinacija ovih parametara mora biti adekvatno odabrana. Od konstrukcije, odnosno tipa instrumenta zavisi koji od navedenih parametara se mogu menjati, odnosno podešavati. Literaturni podaci kazuju da je *RF* snaga generatora parametar koji najviše uti e na pravilan izbor radne talasne dužine [20].

#### 1.3.1.1 Klasifikacija talasnih dužina

Efekti gore pomenutih parametara instrumenta koji uti u na intenzitet emisione linije, prevashodno se odnose na poreklo emitovane talasne dužine a ne na element [21, 22]. Elementi se u plazmi nalaze u ravnoteži izme u svojih atomske i jonske vrste. Ovo omoguava da se talasne dužine grupišu po tome da li su atomske ili jonske porekla. Dalje se atomske linije mogu podeliti na *tvrde* (prvi ionizacioni potencijal  $> 8$  eV, a drugi ionizacioni potencijal  $> 15$  eV) i *meke* (prvi ionizacioni potencijal  $< 8$  eV, a drugi ionizacioni potencijal  $< 15$  eV).

- Tvrda atomska linija je ona koja ima visok prvi ionizacioni potencijal (npr. P I 177,495 nm; 10,49 eV).
- Tvrda jonska linija je ona koja ima visok drugi ionizacioni potencijal (npr. Al II 167,081 nm; 18,83 eV).
- Meka atomska linija je ona koja ima nizak prvi ionizacioni potencijal (npr. Na I 588,995 nm; 5,14 eV).
- Meka jonska linija je ona koja ima nizak drugi ionizacioni potencijal (npr. Ba II 455,404 nm; 10,00 eV).

Neophodno je da se talasne dužine klasifikuju jer efekti razli itih operativnih parametara zavise od njih. Zna a ovakvog grupisanja talasnih dužina je iz razloga što optimalni uslovi za tvrde talasne dužine (koje obično zahtevaju više energije eksitacije) mogu biti neodgovaraju e za meke jonske talasne dužine.

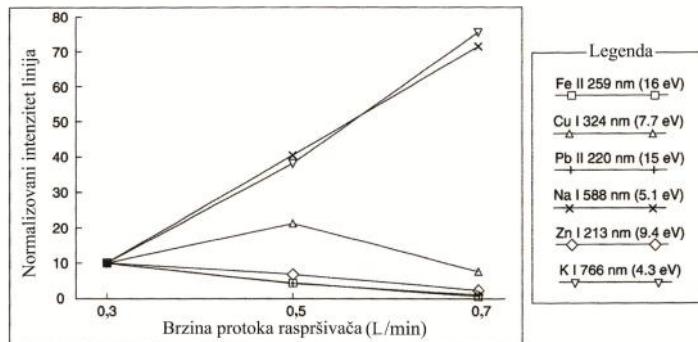
U cilju ispitivanja uticaja promene razli itih operativnih parametara na intenzitet emisije na razli itim talasnim dužinama, što e biti prikazano u daljem tekstu, birani su elementi tako da se pokrije širok spektar talasnih dužina i ionizacionih potencijala. Izabrane talasne dužine elemenata kao i njihovi ionizacioni potencijali dati su u Tabeli 5 [20].

Tabela 5. Izabrane talasne dužine elemenata i njihovi odgovarajući ionizacioni potencijali

Element	Talasna dužina (nm)	Jon. potencijal (eV)
Fe II	259,940	16,18
Pb II	220,353	15,03
Zn I	213,856	9,39
Cu I	324,754	7,73
Na I	588,995	5,14
K I	766,490	4,34

### 1.3.1.2 Uticaj brzine protoka gasa za raspršivanje

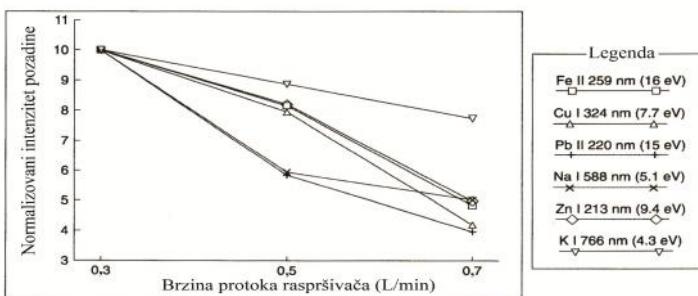
Na Slici 18 su prikazani intenziteti šest izabranih linija u funkciji od brzine gase za raspršivanje. Intenzitet tvrdih linija (Fe i Pb) raste sa smanjenjem brzine protoka. To je zato što brzina protoka direktno kontroliše vreme zadržavanja uzorka kroz plazmu, što pak utiče na nivo postignute atomizacije. Niže brzine protoka gase za raspršivanje povećavaju retenciju vremena analita u plazmi, tako da su oni duže dostupni delovanju energije koja dovodi do viših energetskih prelaza.



Slika 18. Normalizovani intenzitet linija analita kao funkcija brzine protoka gase za raspršivanje

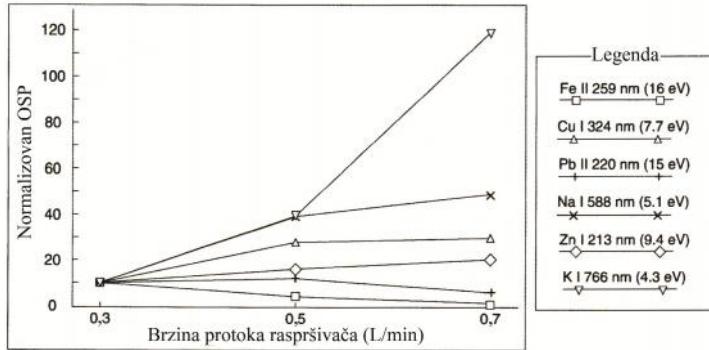
Sa druge strane, optimalni intenzitet mekih linija sa nižim ionizacionim potencijalima (Na i K) se postiže tek pri većoj brzini protoka. Ova brzina povećava protok uzorka kroz plazmu, što dovodi do nastanaka nižih energetskih stanja, usled smanjenja rezidualnog vremena analita u plazmi.

Na Slici 19 prikazana je zavisnost intenziteta pozadine na izabranim talasnima dužinama u funkciji od brzine gase za raspršivanje. Kod svih šest analitičkih linija ovi intenziteti opadaju sa povećanjem brzine protoka, usled niske energije plazme pri većim brzinama protoka.



Slika 19. Normalizovani intenzitet pozadine kao funkcija brzine protoka gase za raspršivanje

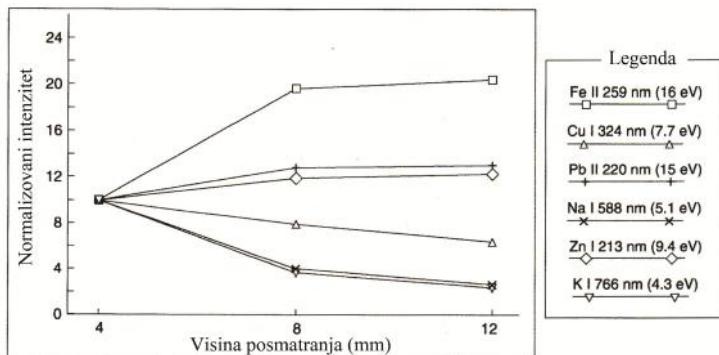
Na kraju, Slika 20 prikazuje efekte brzine protoka raspršiva kog gasa na odnos signal/pozadina (eng. *signal to background ratio*). Značaj pad ovog odnosa za tvrde linije (Fe i Pb) ukazuje da je najbolja osetljivost ovih linija kada je brzina protoka mala, i pored toga što su nivoi pozadine niski na višim brzinama protoka (Slika 19.). Sa druge strane, meke linije (Na i K) pokazuju veću osetljivost pri većim brzinama protoka.



Slika 20. Normalizovani odnos signal/pozadina (OSP) kao funkcija brzine protoka gasa za raspršivanje

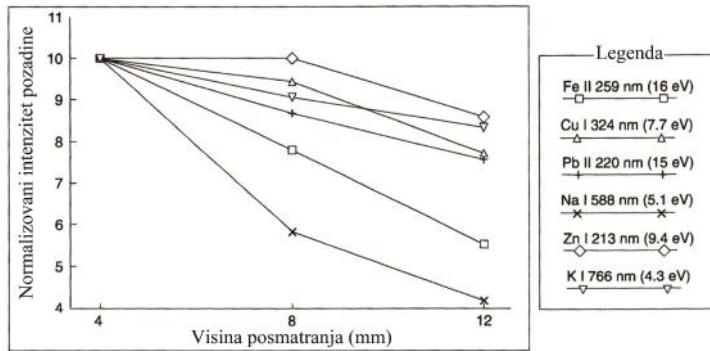
#### 1.3.1.3 Uticaj visine posmatranja plazme

U prethodnom poglavlju je pokazano da ponašanje tvrdih i mekih linija, koje su u funkciji brzine protoka gasa za raspršivanje, zavisi od energije same plazme. Kako sama plazma ima temperaturni gradijent, onda se očekuje slična zavisnost intenziteta ovih linija i u funkciji od visine posmatranja plazme.



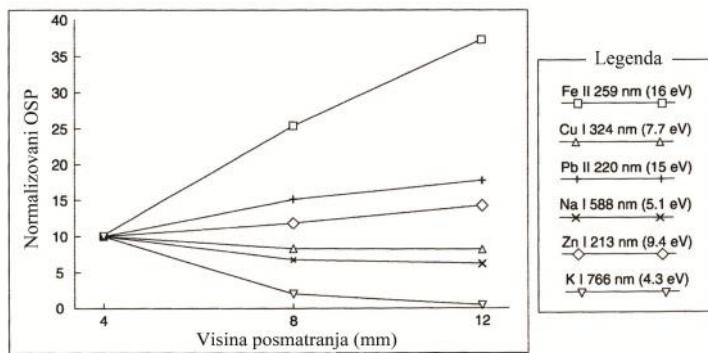
Slika 21. Normalizovani intenzitet linija analita kao funkcija visine posmatranja

Slika 21 prikazuje intenzitet različitih linija kao funkciju visine posmatranja. Maksimalni intenzitet mekih linija (Na i K) se javlja na manjim visinama, što odgovara energetski nižim delovima plazme. Maksimalni intenzitet tvrdih linija (Fe i Pb) se javlja na većim visinama posmatranja, što pak odgovara energetski višim delovima plazme. Na Slici 22 predstavljen je intenzitet pozadine posmatranih linija u funkciji visine posmatranja. Intenzitet pozadine na manjim visinama dovodi do pojave kontinualne emisije, koja opada sa povećanjem visine.



Slika 22. Normalizovani intenzitet pozadine kao funkcija visine posmatranja

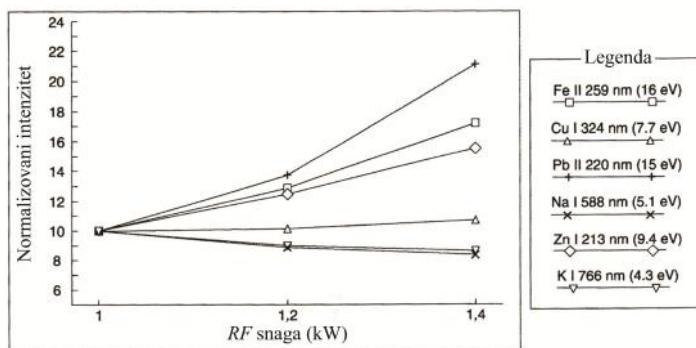
Odnos signal/pozadina u funkciji visine posmatranja prikazan je na Slici 23. Kako su nivoi pozadine veći na većim visinama, značajno povećanje u intenzitetu mekih linija (Na i K) na manjim visinama dovodi do najboljeg odnosa signal/pozadina u nižim delovima plazme.



Slika 23. Normalizovani OSP pozadine kao funkcija visine posmatranja

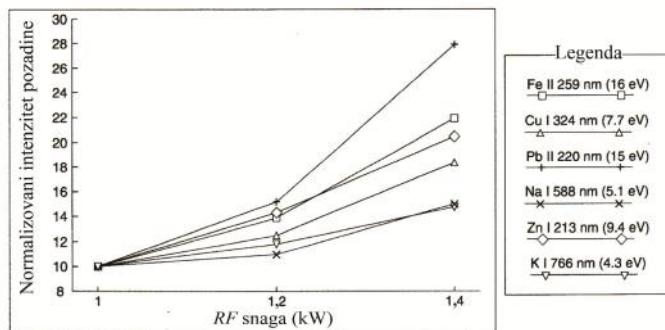
#### 1.3.1.4 Uticaj RF snage

Vrednost RF snage generatora je veoma značajan faktor kada je potrebno odrediti optimalne operativne uslove jedne ICP-OES metode. Veća snaga dovodi do stvaranja viših temperaturnih stanja plazme i tada bi povećanje snage trebalo da vodi i do povećanja intenziteta tvrdih linija (Fe i Pb). Pri nižim vrednostima RF snage, sa nižim energetskim uslovima, očekuje se da meke linije (Na i K) budu intenzivnije. Slika 24 prikazuje intenzitet odgovarajućih linija kao funkcija RF snage i može se videti da je prethodno izneta pretpostavka ispravna.



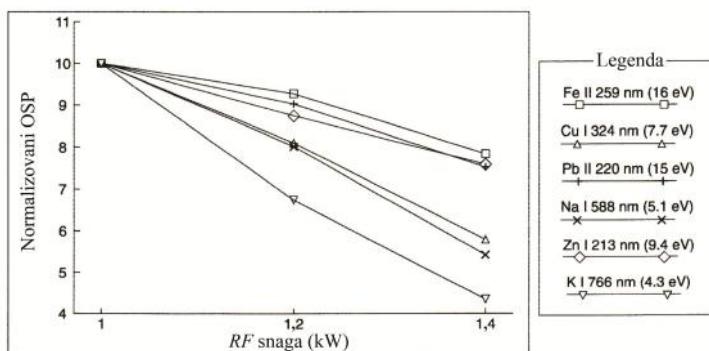
Slika 24. Normalizovani intenzitet linija analita kao funkcija RF snage

Merenje intenziteta pozadine u funkciji od *RF* snage predstavljeno je na Slici 25. Intenzitet pozadine raste sa povećanjem snage usled viših energija plazme koje se tada postižu. Ovaj porast ukazuje na značajnu povećanje intenziteta signala jer, u zavisnosti od linije, povećanje totalnog signala sa povećanjem snage može biti posledica pre poremećaja nivoa pozadine nego povećanja analita.



Slika 25. Normalizovani intenzitet pozadine kao funkcija *RF* snage

Slika 26 pokazuje da je efekat *RF* snage na odnos signal/pozadina isti i za meke i za tvrde linije što je posledica viših nivoa pozadine koji se javljuju usled većih vrednosti *RF* snage.



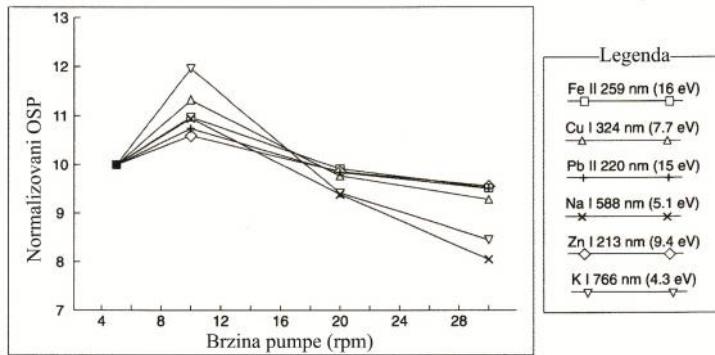
Slika 26. Normalizovani OSP kao funkcija *RF* snage

Kako sa porastom snage nivo pozadine raste više nego intenzitet analita, najbolji odnos signal/pozadina je na nižim vrednostima *RF* snage i to za sve posmatrane linije.

### 1.3.1.5 Uticaj brzine pumpe

Osetljivost i preciznost analize umnogome zavisi od efikasnosti raspršiva a. Brzina pumpe utiče na zapreminu aerosola i na efikasnost raspršivanja. Ako je brzina unosa uzorka isuviše velika, to može povesti do procesa formiranja krupnijih kapljica u komori za raspršivanje, što dovodi do poremećaja nivoa pozadine.

Slika 27 prikazuje ponašanje odnosa signal/pozadina za šest analitičkih linija u funkciji od brzine pumpe. Sa slike se može videti da je optimalna brzina pumpe zavisna od raspršiva a i matriksa uzorka a nezavisna od talasne dužine. Kada se jednom odredi optimalna brzina pumpe za određeni raspršiva a i matriksa uzorka, ne treba je menjati posebno za svaki element koji se određuje. Međutim, optimalna brzina pumpe treba se proveriti prilikom svake promene raspršiva a ili matriksa uzorka.



Slika 27. Normalizovani OSP kao funkcija brzine pumpe

Na osnovu svega gorenog navedenog može se zaključiti da je optimizacija samog intenziteta signala dovoljna kada je reč o visokim koncentracijama analita jer pri takvima vrednostima koncentracije signal pozadine je zanemarljiv naspram jakog signala analita. Sa druge strane, kada su koncentracije analita niže, signal pozadine značajno utiče na ukupni signal, tako da se u tom slučaju optimizacija mora bazirati na odnosu intenziteta signal/pozadina.

Nisko energetska plazma omogućava optimalne operativne uslove za meke linije. Podešavanjem velikih brzina protoka gasa za raspršivanje i merenjem niske emisije u plazmi pri malim RF snagama postižu se nisko energetska stanja koja su pogodna za meke linije [20].

### 1.3.2 Validacija

Da bi se jedna analitička metoda validirala, treba izvršiti vrednovanje svih njenih radnih karakteristika. Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentuje prihvatljivost analitičke metode za određenu namenu [23]. Validacija jedne metode podrazumeva:

1. procese kojima se utvrđuju karakteristike i limiti jedne metode, kao i identifikacija svih uticaja koji mogu dovesti do promena karakteristika primenjene metode;
2. procese potvrđivanja da primenjena metoda odgovara svojoj nameni tj. da je korisna u rešavanju praktičnog analitičkog problema.

Validacija metode je po svojim koracima dosta bliska sa postupcima razvoja metode, pa se može reći da je nekada esto teško odrediti granicu kada se završava razvoj metode a po inde validacija. Mnogi od parametara koji se primenjuju prilikom validacije jedne metode su u stvari procenjeni, makar i aproksimativno, kao deo postupaka za razvoj metode.

Validacije jedne metode vrši se:

- a) kada se postavlja nova metoda;
- b) kada postoji sumnja da je tokom vremena došlo do promena u postavljenoj metodi;
- c) kada se postavljena metoda koriguje ili se planira primena i u drugi svrhe.

Kada se vrši validacija jedne metode, potrebno je odrediti sve njene znajuće karakteristike. A to su:

- tačnost-mera usaglašenosti eksperimentalno dobijenih rezultata predloženom metodom sa pravim (stvarnim) vrednostima, odnosno ona ukazuje na ispravnost merenja. Procena tačnosti esto se naziva i Recovery eksperiment. Izražava se kao procenat prinosa (Recovery);

- *preciznost*-uklju uje dva pojma: ponovljivost rezultata koji su dobijeni istom metodom, istim uzorkom i pod istim uslovima od strane istog analiti a (repetabilnost) i reproduktivnost kada je re o istoj metodi i uzorku, ali su promenjeni uslovi primene metode, npr. mesto, vreme, analiti ar, instrument itd. Statisti ki se preciznost procenjuje standardnom devijacijom (SD) ili relativnom standardnom devijacijom (RSD);
- *linearost*-mogu nost da se unutar radnog podru ja dobije ta no proporcionalna zavisnost signala od koncentracije analita, što se odre uje postupcima kalibracije;
- *stabilnost analita i standardnih rastvora*-sposobnost dobijanja istih mernih rezultata u toku dužeg vremenskog perioda;
- *selektivnost*-odnosno specifi nost metode, pri emu se pod specifi noš u podrazumeva mogu nost nedvosmislenog odre ivanja analita u prisustvu drugih sastojaka uzorka, a pod selektivnoš u sposobnost odre ivanja grupe sli nih sastojaka uzorka. Pri instrumentalnom odre ivanju specifi na metoda daje signal koji odgovara samo odzivu analita, a selektivna je ona metoda kojom razli iti sastojci smeše daju posebne signale i me usobno ne uti u na rezultat odre ivanja;
- dejstvo *matriksa* uzorka, odnosno interferencija;
- *granica kvantitativnosti* (eng. *Limit of Quantification - LOQ*), tj. najmanja mogu a koncentracija analita koja se može odrediti uz dozvoljenu grešku;
- *granica dokazivanja ili detekcije* (eng. *Limit of Detection - LOD*), odnosno najmanja mogu a koncentracija analita koja se može detektovati ali ne i kvantitativno odrediti;
- *otpornost metode* na promenu radnih uslova;
- *radno podru je*, tj. interval unutar kojeg analiti ki postupak ima zadovoljavaju u preciznost, ta nost i linearost;
- *osetljivost*-svojstvo metode da razlikuje male koli ine analita, a karakteriše se nagibom kalibracione prave;
- *iskoristivost*, tj. svojstvo metode da odredi ukupnu koli inu analita.

U cilju dobro izvedene validacije, neophodno je:

- primeniti standardni radni postupak, uz specifi an i detaljan opis protokola odabrane metode;
- ispitati kako matriks i procesne varijable uti u na svaki korak primjenjenog analiti kog sistema, po evši od uzorkovanja pa do procene rezultata;
- nastojati da matriks bude isti pri validaciji i pri analizi realnog uzorka;
- definisati tip kalibracije koji e se koristiti pa na osnovu toga uzeti dovoljan broj standarda za odre ivanje kalibracione krive, pri emu dobijeni odnos mora biti linearan i reproduktivan;
- ta nost i preciznost odrediti barem za tri koncentracije analita, i to obi no najnižu, najvišu i srednju vrednost sa kalibracione prave;
- granicu kvantifikacije odrediti sa najmanje tri ponovljena merenja;
- sertifikovani referentni materijal po sastavu mora biti što sli niji matriksu, što se naziva prilago avanje standarda matriksu;

- kao mera preciznosti potrebno je koristiti relativno standardno odstupanje, i ja vrednost, npr. pri odre ivanju tragova analita, ne bi smela da bude viša od  $\pm 15\%$ , osim u blizini kvantifikacije, kada se dopušta da ona bude do  $\pm 20\%$ .

Od vrste analize odnosno samog analiti kog sistema zavisi koje e se karakteristike validacije neke metode odre ivati. Kada je re o kvalitativnoj analizi ili o indentifikaciji analita, neophodna je potvrda indentiteta tj. sigurnost da odziv instrumenta poti e od analita, a ne od neke komponente koja je fizi ki i hemijski sli na ispitivanom analitu. U tom cilju treba odrediti specifi nost, odnosno selektivnost izabrane metode. Odre uje se i granica odre ivanja do koje je specifi nost pouzdana, a koja se menja za razli ite reagense. Za kvantitativna odre ivanja pravila su nešto druga ija. Pri validaciji nove metode odre uje se obavezno ta nost, ponovljivost, reproduktivnost, selektivnost, granica kvantitativnosti i linearност. Za modifikovanu metodu dovoljno je odrediti ta nost i preciznost a ponekad i granicu kvantitativnosti. Pri odre ivanju makroelemenata potrebno je ispitati radno podru je i linearност, a za odre ivanje mikroelemenata najvažnije je odre ivanje granice detekcije i kvantitativnosti. Ako je analit prisutan u više hemijskih oblika, zahteva se potvrda indentiteta i iskoristivosti, a kada se sumnja na interferencije, treba odrediti specifi nost i selektivnost metode. Kod analiza kod kojih se zahteva velika ta nost i preciznost dobro je ispitati sve karakteristike, sa naglaskom na odre ivanju ta nosti, ponovljivosti, reproduktivnosti i iskoristivosti.

### 1.3.2.1 *Termini*

#### **Analit**

Komponenta ili grupa komponenti ije prisustvo/odsustvo ili pak njihovu masu /koncentraciju treba odrediti u ispitivanom uzorku.

#### **Analiza**

Metoda koja se koristi za detekciju, indentifikaciju i/ili odre ivanje analita u ispitivanom uzorku.

#### **Alikvot**

Ta no poznata zapremina ispitivanog rastvora koja se koristi direktno za odre ivanje prisustva/odsustva ili mase/koncentracije analita bez karakteristi ne greške uzorkovanja.

#### **Slepa proba**

Slepa proba je uzorak koji sadrži sve komponente kao i ispitivani uzorak izuzev analita.

#### **Detekcija**

Odre ivanje prisustva analita kao hemijskog entiteta.

#### **Odre ivanje (kvantifikacija)**

Odre ivanje apsolutnog sadržaja analita (mase, zapremine, koli ine) ili relativnog sadržaja analita (frakcije mase, masene koncentracije) u ispitivanom uzorku.

#### **Matriks**

Sve komponente ispitivanog uzorka izuzev analita.

### 1.3.2.2 Parametri

#### Kalibraciona prava

Grafi ka zavisnost izmerenog signala u funkciji koli i ne ispitivanog analita.

#### Standardna devijacija

Standardna devijacija ( $s$ ) je najbolje merilo preciznosti dobijenih rezultata, odnosno preciznosti metode. Ona se izra unava prema jedna ine:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (2.6)$$

gde je  $x_i$  - pojedina no merenje,  $\mu$  - ta na vrednost i  $n$  - broj merenja.

Ova jedna ina je primenljiva samo u slu aju ako se radi o beskona no velikom broju merenja iste veli ije srednja vrednost  $p$ . U praksi se me utim redovno vrši ograni en broj merenja, a srednja vrednost tog ograni enog broja merenja je  $\bar{x}$  i ne postoji garancija da je  $p$  i  $\bar{x}$  biti identi ni. Zato se, za razliku od  $s$  kod ograni enog broja eksperimentalnih merenja, za standardnu devijaciju takvog niza merenja uvodi drugi znak  $s$ , i izra unava se pomo u jedna ine:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.7)$$

gde je  $x_i$  - izmerena vrednost;  $\bar{x}$  - srednja vrednost ograni enog broja merenja;  $n-1$  - broj stepena slobode.

#### Relativna standardna devijacija

Relativna standardna devijacija (RSD) predstavlja odnos standardne devijacije i prave vrednosti merene veli ije, odnosno srednje vrednosti ve eg broja merenja:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (2.8)$$

Relativna standardna devijacija se esto obeležava i kao koeficijent varijacije (CV)

#### Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) predstavlja najmanju koncentraciju ispitivane supstance u uzorku koja, pod datim eksperimentalnim uslovima, može biti registrovana (detektovana), ali nije potrebno da bude ta no i odre ena pod datim eksperimentalnim uslovima. LOD se odre uje izra unanjem odnosa standardne devijacije dobijenih vrednosti (SD) i nagiba kalibracione krive (a) iz slede eg izraza:

$$LOD = \frac{3 \times SD}{a} \quad (2.9)$$

pri emu se SD može izra unati iz:

1. standardne devijacije vrednosti slepe probe;
2. standardne devijacije ostatka kalibracione prave i
3. standardne devijacije odse ka kalibracione prave.

### **Limit kvantifikacije**

Limit kvantifikacije (LOQ) predstavlja najmanju koncentraciju ispitivane supstance u uzorku koja, pod datim eksperimentalnim uslovima, može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i ta noš u. LOQ se određuje izračunavanjem odnosa standardne devijacije dobijenih vrednosti (SD) i nagiba kalibracione krive (a) iz sledećeg izraza:

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a} \quad (3.0)$$

pri čemu se SD može izračunati iz:

1. standardne devijacije vrednosti slepe probe;
2. standardne devijacije ostatka kalibracione prave i
3. standardne devijacije odseka kalibracione prave.

### **Linearost**

Definiše sposobnost metode u dobijanju rezultata odnosno signala koji su proporcionalni koncentraciji analita.

### **Tačnost**

Sposobnost mernog instrumenta i metode da daje rezultat koji je blizak pravoj odnosno tamoj vrednosti.

### **Preciznost**

Blizina niza nezavisnih rezultata merenja koji su dobijeni pod tamo definisanim uslovima.

### **Osetljivost**

Promena mernog signala pri promeni jedinice sadržaja analita. Ova promena je praktično jednaka nagibu kalibracione krive analita.

### **Selektivnost**

Sposobnost metode da pod tamo definisanim uslovima ispitivanja odredi tamo i specifično traženi analiti u prisustvu drugih komponenata koji formiraju matriks uzorka.

### **Ponovljivost**

Sposobnost mernog instrumenta da pri istim uslovima merenja prilikom ponovljene analize dobija približno iste ispitivane vrednosti.

### **Reproduktivnost**

Dobijanje rezultata istom metodom pod identičnim eksperimentalnim uslovima u drugim laboratorijama od strane drugih analitičara korišćenjem drugih instrumenata.

## **Robusnost**

Robusnost jedne analitičke metode je mera njene sposobnosti da se ne menja pod dejstvom male, ali prisutne varijacije parametara metode, time se potvrđuje i pouzdanost primenjene metode.

## **Referentni materijali (RM) i sertifikovani referentni materijali (SRM)**

Komitet za RM Meunarodne organizacije za standardizaciju definiše pojmove koji su vezani za referentne materijale:

- RM predstavlja materijal, dovoljno homogen i stabilan u odnosu na određene osobine, za koji je utvrđeno da može da se koristi za nameravanu upotrebu u procesu merenja ili u ispitivanju nazivnih osobina. RM se takođe definije i kao materijal, dovoljno homogen i postojan sa ustanovljenim jednim ili više specificiranim svojstava, koja su uspostavljena za određenu nameravanu upotrebu u procesima merenja.
- SRM (eng. *Certified reference materials* - CRM) je referentni materijal, pravđen uverenjem izdatim od nekog nadležnog tela, koji obezbeđuje jednu ili više određene vrednosti osobina sa pridruženom nesigurnošću i sledivost, koristeći određene procedure. Referentni materijal, koji su jedan ili više specificiranih svojstava opisani važećom metrološkom procedurom, pravđen uverenjem koje sadrži vrednosti specificiranih svojstava, sa pridruženom nesigurnošću, i izjavom o metrološkoj sledivosti.

Iz ovih definicija zaključuje se da referentni materijal može biti supstanca, jedinjenje, ili materijal u bilo kom agregatnom stanju, sa tačno određenim sastavom ili nekom drugom veličinom. SRM imaju pravđenje, kojim se navodi tačna vrednost veličine koju reprodukuju, sa naznačenom mernom nesigurnošću. Merna nesigurnost je opseg u okviru kojeg se nalazi dati rezultat merenja. Korišćenjem SRM rezultat merenja se dovodi u vezu sa osnovnim jedinicama SI sistema, odnosno obezbeđuje se sledivost merenja. Ako su ovi uslovi ispunjeni, rezultati merenja različitih laboratorijskih se mogu porebiti i time se može proveriti kvalitet njihovog rada.

### *1.3.2.3 Razlike karakteristike parametara metode*

#### **Potvrda identiteta i selektivnosti/osetljivosti**

Vrlo je važno da se prilikom jedne analize ustanovi da signal koji se dobije vodi poreklo isključivo od traženog analita, a ne od nekih drugih komponenti koje su u ispitivanom sistemu prisutne. To je proces potvrde identiteta.

Selektivnost i osetljivost su mere koje se pripisuju pouzdanosti merenja u prisustvu interferencija. Osetljivost se uglavnom smatra da je jednak stopostotnoj selektivnosti, mada to nije uvek slučaj. Tamo gde su faze merenja nespecifične, može se reći da pojedini analiti ne interferiraju, što se mora na poteku primene metode i proveriti. Mnogo je teže tvrditi da interferencija uopšte nema jer uvek postoji mogućnost da dođe do pojava nekih do tada nedefinisanih interferencija. Na analitičaru je da donese končnu odluku kada će prestati da pratiti uticaj interferencija.

Ukoliko su interferencije prisutne i ne mogu se odvojiti od analita, ili su u sistemu pak prisutne interferencije kojih analitičar nije svestan, onda one mogu da izazovu razlike vrste

efekata. U zavisnosti kako je identitet analita utvrđen, interferencije pre svega mogu dovesti do ometanja prilikom određivanja identiteta. One takođe mogu dovesti do efekta porasta koncentracije analita što će direktno uticati na signal samog analita. Interferencije uglavnom različito deluju na nagib kalibracione krive u odnosu na nagib koji potiče od analita, što utiče na linearnost krive. Ovaj efekat na nagib krive, može biti indikator mogućeg prisustva skrivenih interferencija.

Selektivnost metode se uglavnom ispituje određivanjem analita u uzorku u kojem su specifične interferencije namerno dodate. Ukoliko nije sigurno da li su ili nisu interferencije već prisutne, selektivnost metode može se ispitati upoređivanjem sa drugim nezavisnim metodama/tehnikama.

Kod pojedinih validacionih protokola može doći do zabune prilikom potvrde identiteta sa ponovljivošću. Utvrđivanje ponovljivosti zahteva da se merenje izvrši više puta jednom tehnikom, dok potvrđivanje identiteta zahteva da merenje bude izvršeno sa nekoliko, radije nezavisnih tehnika.

Na selektivnost se posedno mora обратити pažnja kada analit može postojati u uzorku u više različitih formi: vezan ili nevezan, neorganski ili organometalni; ili u različitim oksidacionim stanjima.

### **Limit detekcije**

Kada se određuje ivanje vršeći pri niskim sadržajima analita, npr. kod elemenata u tragovima, vrlo je važno znati koja je najniža koncentracija analita koja se može primjenom metodom sa dovoljnom pouzdanošću odrediti. Za validacione uslove obično je dovoljno da se ukaže na nivo na kom određivanje postaje problematično. U tu svrhu je pristup "slepa proba + 3s" uglavnom dovoljna. Kako postoje različiti pristupi prilikom definicije LOD, preporučuje se da se uvek navede definicija koja je korisna za limit detekcije.

Kako su i srednja vrednost i standardna devijacija slepe probe zavisne od matriksa slepe probe, takođe i LOD biti zavistane od matriksa.

Za kvalitativna određivanja, uvek je dobro da postoji granica ispod koje osetljivost postaje nepouzdana. Ta granica može da varira ukoliko se eksperiment ponovi nekog drugog dana sa različitim regensima, materijalom za spajkovanje itd.

### **Limit kvantifikacije**

LOQ predstavlja najnižu koncentraciju analita koja može biti određena sa prihvataljivim nivoom ponovljivosti, preciznosti i tačnosti. Prema različitim definicijama ona se predstavlja kao koncentracija analita koja odgovara vrednosti uzorka slepe probe uverljivo za određeni broj standardnih devijacija srednje vrednosti slepe probe.

### **Tačnost**

Tačnost predstavlja blizinu dobijenog rezultata pravoj vrednosti [24]. Prilikom validacije metode, u cilju kvantifikacije tačnosti rezultata, primenjuju se kako sistematski tako i proizvoljni uticaji na rezultate tako da se tačnost određuje primenom dve komponente, pouzdanosti i preciznosti. Termin pouzdanost metode izražava koliko je srednja vrednost serije rezultata (koji su primenom metode dobijeni) blizu pravoj vrednosti. Pouzdanost se obično izražava uz pomoć termina sistematska greška. Preciznost određuje koliko su dobijeni rezultati blizu jedan drugom, i obično se izražava merama kao što je standardna devijacija.

Praktična primena pouzdanosti se zasniva na upoređivanju srednje vrednosti dobijenih rezultata metode sa poznatim vrednostima, drugim rečima preciznost metode se ocenjuje naspram referentnih vrednosti (prave vrednosti ili dogovorom uzete prave vrednosti). Za ovaj proces koriste se dve osnovne tehnike: provera rezultata sa referentnim vrednostima odgovaraju ih materijala ili upoređivanjem sa rezultatima neke odgovarajuće metode. Referentne vrednosti se vrlo lako mogu proveriti i pratiti preko različitih vrsta internacionalnih standarda. Kao materijali ije se vrednosti mogu pratiti koriste se sertifikovani referentni materijali, pa se stoga referentna vrednost naziva sertifikovana vrednost-SRM. Prednost upotrebe SRM je njihova velika stabilnost i homogenost dok im je manja visoka cena koštanja i nemogućnost da se uvek dobro poklope sa tipom uzorka koji se određuje.

Da bi se proverila preciznost uz pomoć referentnog materijala, potrebno je odrediti srednju vrednost i standardnu devijaciju serije ponovljenih određivanja, i uporediti ih sa tačnom određenošću referentnog materijala.

Jedan od načina primene referentnih materijala za validaciju metode je spajkanje ispitivanog materijala sa istim sertifikovanim referentnim materijalom ili drugim materijalima koji imaju zadovoljavajuću istu stabilitet i stabilnost.

### Osetljivost

Osetljivost predstavlja efektivni gradjent odgovarajuće kalibracione krive tj. ona odgovara promeni odgovora instrumenta koji je u vezi sa promenom koncentracije analita. Tamo gde je odgovor instrumenta linearno zavisno od koncentracije, tj. sa linearnim opsegom metode, osetljivost je pogodan parametar za potrebne proračune (u formuli za kvantifikaciju).

### Robusnost

Mera efektivnosti jedne analitičke metode daje podatak o tome koliko su karakteristike metode blizu uslovima njene idealne primene. U svakoj metodi postoje faze u radu kod kojih, ukoliko im se ne pristupi dovoljno pažljivo, dolazi do pojave ozbiljnih uticaja na osobine metode koje u krajnjoj liniji mogu dovesti do toga da metoda ne bude primenljiva. Takve faze je neophodno identifikovati, što se radi kroz proces razvoja metode, i ukoliko je moguće, njihov uticaj na osobine metode je potrebno proceniti primenom testa robusnosti. To zahteva da se urade dobro isplanirane promene u metodi, i to tako da se ispitaju pojedinačni efekti koji deluju na osobine primenjene analitičke metode. Time je moguće otkriti varijable u metodi koje imaju najznačajniji efekat i tako obezbediti, prilikom primene metode, da one budu strogo kontrolisane. Ako je pak potrebno da se metoda još dodatno poboljša, ta poboljšanja svakako mogu biti ostvarena fokusiranjem na detektovane varijable koje mogu biti kritične u tom procesu poboljšanja analitičke metode. Robusnost se obično određuje za vreme razvoja metode, i to prvo u polaznoj laboratoriji pre nego što se uspotavi saradnja sa drugim laboratorijama.

#### 1.3.2.4 Sredstva validacije

*Slepa proba.* Postoje različiti tipovi slepih proba, a njihova uloga je da pokazuju u kojoj meri izmereni signal potiče od analita a koliko njemu doprinose ostali uticaji iz posmatranog sistema. Postoje različiti tipovi slepih proba kao što su:

1. *Slepa proba reagenasa.* Reagensi koji se koriste u analitičkom procesu se analiziraju samostalno u cilju da se utvrdi koliko uticaja na izmereni signal na osnovu tog se dobijeni analitički signal može adekvatno korigovati.

2. *Slepa proba uzorka.* Ona predstavlja matriks koji ne sadrže analit. Teško ih je dobiti ali takvi materijali su neophodni jer se uz pomoć njih utvrđuje realni uticaj interferencija koje se mogu javiti pri analizi ispitivanog uzorka.

*Materijali za spajkovanje.* Spajkovanje nije neophodno uvek vršiti samo na analit koji se određuje. U uzorak se može dodavati bilo koja komponenta koja dovodi do promene efekta ispitivanog sistema usled tog dodatka. Tako npr., uzorak može biti spajkovan sa različitim količinom određenih interferencija u cilju da se oceni koja koncentracija tih interferenata deluje negativno prilikom određivanja analita. Priroda materijala za spajkovanje mora biti jasno određena.

*Referentni materijali.* Referentni materijal može biti bilo koji materijal koji se koristi kao osnova za poređenje, pri čemu upotrebljeni laboratorijski reagenzije moraju biti tako poznate isto e. Zna se da osobine traženog analita moraju biti stabilne i homogene ali referentni materijal ne mora da ima visoki nivo karakterizacije.

*Sertifikovani referentni materijali.* Karakterizacija parametara koji se određuju kod sertifikovanih referentnih materijala je mnogo strože kontrolisana nego kod referentnih materijala. Karakterizacija ovih materijala se obično radi primenom nekoliko različitih metoda tako da se statističke greške prilikom karakterizacije znatno smanjuju ili se u potpunosti uključuju.

## 1.4 Metali

Broj elemenata u periodnom sistemu koji pripadaju grupi metala se kreće negde oko 80. Njihova tačna brojnost se ne zna sa sigurnošću, zato što je granica koja određuje razliku između metala i nemetala nejasno definisana. Poznato je da su svi elementi s, d i f bloka periodnog sistema metali, ali problem nastaje kod definisanja metalnih karakteristika elemenata p bloka. Obično se sedam od njih (Al, Ga, In, Th, Sn, Pb i Bi) smatraju metalima, ali granica koja ih odvaja od preostalih 23 elemenata p bloka u smislu metalnih osobina nije baš najjasnija.

Jedan od najjednostavnijih načina kako je moguće napraviti razliku između metala i nemetala je upoređivanje njihovih fizikalnih osobina. Metali su uglavnom u vrstom agregatnom stanju, sjajni su, lako se kuju, savitljivi su i provode električnu struju. Za razliku od njih nemetali mogu biti gasovite, tečne ili vruće supstance koje nisu provodnici.

Pored ove dve grupe elemenata, postoji i treća poznata kao *metaloidi* ili ako se koristi IUPAC-ova nomenklatura *polometali*. Ova grupa elemenata nema jasno izražena metalna tako ni nemetalna svojstva, već poseduje osobine obe ove grupe elemenata. Sa porastom broja valentnih elektrona metalne osobine polumetala opadaju a povećavaju se njihova nemetalna svojstva. Sa druge strane, sa porastom broja elektronskih orbitala ovim elementima raste metalni karakter. Može se dakle zaključiti da se osobine elemenata sa porastom broja valentnih elektrona tijekom i od leve ka desnoj strani periodnog sistema, menjaju od metalnih ka nemetalnim dok im se sa porastom broja atomskih orbitala u grupi, osobine menjaju od nemetalnih ka metalnim.

### 1.4.1 Hemijske osobine metala

Na metabolizam i ishranu ljudi mnogo veći i značajni uticaj imaju jedinjenja metala u odnosu na efekat metala u elementarnom obliku. To je iz razloga što su metali u svom

elementarnom stanju nerastvorni, pa samim tim i ne mogu biti upotrebljeni u biološkim sistemima tako da i sama živa materija nije u stanju da ih iskoristi u procesu prenošenja bioloških signala. U industriji se metali u svom elementarnom stanju koriste kao katalizatori u različitim hemijskim reakcijama, pri čemu je za to vrlo esto potrebna visoka temperatura. Žive elije su u stanju da koriste jedinjenja metala kao enzime u izuzetno sofisticiranom procesu katalize koji je razvijan tokom miliona godina evolucije [25].

Postoji veliki broj razlika između hemijskih osobina metala i nemetala. Tako su atomi nemetala uglavnom elektronegativni i svoje valentne orbitale popunjavaju deljenjem elektrona sa drugim atomima (kovalentna veza) ili potpunim primanjem elektrona (jonska veza). Za razliku od njih, tipični metali su elektropozitivni, sa pozitivnim oksidacionim stanjima i u hemijske reakcije ulaze jedino otpuštanjem svojih valentnih elektrona. Tako će postojeći druge znati očajne razlike između ove dve grupe elemenata, a one se pre svega odnose na redukciono/oksidacione potencijale, hemiju kiselina/baza i strukturne ili ligandno koordinacione osobine, koje znaju utiće na njihovu ulogu u biološkim procesima.

#### 1.4.2 Podela metala

Metali se prema svojoj elektronskoj strukturi mogu podeliti u dve osnovne grupe koje i određuju njihovu funkciju u biološkim sistemima. Metali kao što su natrijum i olovo, čiji se valentni elektroni nalaze u jednoj orbitali, nazivaju se *tipični metalima*, dok metali kao što su hrom ili bakar kod kojih su valentni elektroni smešteni u više od jedne orbitale, nazivaju se *prelaznim metalima*. Tipični metali koji poseduju jedan ili dva valentna elektrona imaju jedno oksidaciono stanje (npr. natrijum, +1; kalcijum, +2). Za razliku od njih, oni tipični metali koji imaju tri ili više valentnih elektrona poseduju dva oksidaciona stanja (npr. olovo, +2 i +4; bizmut, +3 i +5). Sa druge strane, prelazni metali mogu postojati u više različitih oksidacionih stanja. Tako npr. mangan, koji ima dva elektrona u spoljnoj s orbitali i 5 u sledećoj 3d orbitali, može da postoji u sledećim oksidacionim stanjima +1, +2, +3, +4, +6 i +7.

Postoji još jedna bitna razlika između prelaznih i tipičnih metala koja znaju utiće na njihovu biološku funkciju. Svaki element u periodi prelaznih metala u svojoj valentnoj orbitali ima jedan elektron više od prethodnog elementa, ali se oni po svojim osobinama duž perioda znaju utiće ne razlikuju. Upravo ovo njihovo svojstvo je razlog zašto neki prelazni elementi mogu zamjenjivati druge u pojedinim metaloenzimima. Sa druge strane, kako se elektronska struktura tipičnih metala razlikuje za po jedan elektron u spoljnoj orbitali, osobine svakog narednog tipičnog metala se u periodi znaju utiće razlikuju, pa samim tim oni ne poseduju biološku fleksibilnost koju prelazni metali imaju.

Analiza ljudskog tkiva je pokazala da se u njemu kao i kod drugih organizama, nalazi veliki broj različitih metala. Na osnovu sadržaja metala u ljudskom telu, ovi elementi se mogu podeliti u dve grupe. Metali, koji se javljaju u relativno visokim koncentracijama i koje dnevno treba unositi oko 100 mg i više, nazivaju se *makroelementi* ili *makrominerali*. U ovu grupu se ubraju kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum. Metali koji se javljaju u malim koncentracijama i koje dnevno dozna je oko par miligrama ili manje, nazivaju se *mikroelementi* ili *mikrominerali* odnosno *elementi u tragovima*. U ovu grupu metala ubraju se gvožđe, cink, bakar, mangan, selen, kobalt, nikl, hrom, bor i dr. Gvožđe se u znatnoj mjeri može naći u tkivu svih živih organizama, izuzev nekih tipova Lactobacilli bakterije. Tako je, u tkivu ali u nižim koncentracijama prisutni su cink, bakar, mangan, nikl, molibden, kobalt i još neki elementi.

Odstupanja u sadržaju metala u tkivima od o ekivanih, su najčešće posledica izloženosti organizama kontaminaciji od strane životne sredine ili pak usled sposobnosti da sam organizam u tkivu akumulira neke elemente koji se u njemu obično ne nalaze.

Nekada se termin „element u tragovima“ koristio za one elemente koji su bili prisutni u biološkim sistemima u nano i pikogramskim količinama, dok se danas ovaj termin odnosi na one elemente iji je nivo u biološkim sistemima manji od 10 mg/100 g.

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. *World Health Organization - WHO*) [26] elementi u tragovima se na osnovu hranljivog značaja koji imaju za ljudski organizam dele u tri grupe: 1) esencijalni elementi, 2) elementi koji su najverovatnije esencijalni i 3) potencijalno toksični elementi koji nemaju nikakvu esencijalnu funkciju.

U grupu elemenata koji najverovatnije mogu imati esencijalnu ulogu ubrajaju se i arsen, bor i vanadijum, dok se u grupu toksičnih metala pored ostalih ubrajaju i berilijum, kadmijum, olovo i živa [27, 28]. Aluminijum i kalaj spadaju se u grupu elemenata koji su neesencijalni i nisu toksični. Ova dva elementa se često nazivaju „metali za izradu pakovanja“ na osnovu toga što se upravo za to i najviše komercijalno i industrijski koriste.

Neka novija istraživanja su pokazala da metali kao što su Al, Cd i Pb, koji spadaju u grupu neesencijalnih i toksičnih elemenata, u veoma malim količinama poseduju svojstva koja se mogu smatrati esencijalnim za žive organizme. Međutim, takva biohemijska funkcija ovih elemenata još uvek nije u potpunosti potvrđena [29, 30]. Ovi elementi postoje u prirodi ali ne u velikim količinama, tako da je njihov povezan sadržaj u organizmu pre svega posledica zagađenje životne sredine.

#### 1.4.2.1 Esencijalni i neesencijalni metali

Više je razloga zašto se još uvek pouzdano ne zna tačan broj esencijalnih metala koji su kod ljudi identifikovani. Jedan od razloga su analitičke poteškoće prilikom određivanja niskih koncentracija, tačka nije samo niskih nivoa u kojima su ovi elementi obično prisutni. Tako je, na primjer, u njihove klasifikacije predstavlja problem prilikom određivanja broja esencijalnih elemenata.

Mnogi autori su predložili veliki broj različitih definicija o esencijalnosti elemenata. Jedna od najprostijih je ta da je esencijalni element „metaboliki ili funkcionalni nutrijent“ [31]. Jedna od složenijih definicija je ta da je esencijalni element onaj element koji je neophodan za održavanje života, i da njegov nedostatak može dovesti do narušavanja funkcija od optimalnih do suboptimalnih vrednosti [32]. Narušavanje funkcija može dovesti do pojave bolesti, metaboličkih anomalija ili do razvoja određenih poremećaja [25].

Da bi se smatrao esencijalnim jedan element mora:

1. da bude prisutan u zdravom tkivu,
2. da njegova koncentracija bude relativno konstantna kod različitih organizama,
3. da njegov nedostatak izaziva takođe određenu biohemijsku promenu,
4. da ta promena dovodi do sljedećih abnormalnosti kod različitih vrsta,
5. da njegov unos dovodi do korekcije izazvanih abnormalnosti [33].

Kada se govori o svojstvima i biološkoj ulozi esencijalnih elemenata u tragovima važno je reći da oni čine manje od 0,1% totalnog sastava ljudskog tela. Četiri nemetalna: vodonik, kiseonik, ugljenik i azot čine 99% sadržaja ne samo ljudskog nego i svih bioloških sistema.

Ostalih sedam elemenata, koji se nazivaju glavnim elementima: natrijum, kalijum, kalcijum, magnezijum, fosfor, sumpor i hlor ine preostalih 0,9% tako da esencijalni metali u tragovima dele tih preostalih 0,1% sa svim ostalim elementima, kako metalima tako i nemetalima [34].

### 1.4.3 Biološka funkcija metala

U živim organizmima metalni joni vrše regulaciju širokog spektra fizioloških mehanizama sa značajnom specifičnošću i to pre svega kao komponente enzima i drugih molekulskih kompleksa. Reaktivnost kompleksa zavisi kako od specifičnih osobina odgovarajućeg proteina tako i od fleksibilnosti osobina samog metala [35].

Metaloenzimi su primer na kome se može najbolje prikazati dobra povezanost koja se ostvaruje između makromolekula liganda i metalnih jona [36]. Oko 30% svih enzima ima metal koji je vezan za njihov aktivni centar. Metaloenzimi se nalaze u svih šest kategorija enzima koje je dao IUPAC. Biološke reakcije u kojima ova jedinjenja uzimaju učešće su kiselo-katalizovane hidrolize (hidrolaze), redoks reakcije (oksidaze) i preuređenje C-C veza (izomeraze i sintetaze). Specifičnost jednog metaloenzima određuje više faktora, kao što su priroda nemetalnog dela i metalnog jona, stereohemijske osobine i druge pojedinačne hemijske karakteristike svakog od konstituenata.

Aktivnost određenog metaloenzima zavisi od sposobnosti metalnog jona da deluje kao Luisova kiselina. To su jedinjenja koja primanjem elektronskog para od baza mogu formirati kovalentnu vezu. Upravo takva svojstva poseduju enzimi koji deluju prilikom kisele katalize.

#### 1.4.3.1 Biološka aktivnost pojedinih metala

*Natrijum* se u telu nalazi 50% u vanelijskoj tečnosti, 40% u solima kostiju i 10% u elijama. Na je tako deo bikarbonatnog buferskog sistema i kao uticaj na distribuciju vode preko osmoze, kao i na kiselinsko-baznu ravnotežu krvi. Ovaj element je neophodan za neuromišnu funkciju zato jer je esencijalan za transport glukoze i drugih nutrijenata. Apsorpcija unetog natrijuma je brza i gotovo kompletна. Hormon aldosteron reguliše metabolizam Na. Povećan sadržaj ovog metala u organizmu može dovesti do povišenog pritiska i endema. Nedostatak Na se retkojavlja ali može nastati kao rezultat, npr. obilnog povraćanja, dijareje ili znojenja. Simptomi nedostaka natrijuma su osećaj slabosti, apatija, mučnina kao i grčenje mišića ekstremiteta [37].

*Magnezijum* u mekim tkivima deluje kao kofaktor mnogih enzima koji su važni u procesu stvaranja energije, sintezi proteina, RNK i DNK sintezi kao i za održavanje električnog potencijala nervnog sistema i elijskih membrana. Oko 50 do 60% magnezijuma u telu nalazi se u kostima, gde ovaj element formira površinski mineralni konstituent hidroksiapatit (kalcijum fosfat). Svoju biološku aktivnost magnezijum pokazuje kod kontrakcije mišića, prilikom stabilizacije strukture nukleinskih kiselina kao i kod katalitičke aktivnosti ribozoma. Nedostatak magnezijuma može dovesti do anoreksije, mučnine, mišićne slabosti, letargije, drhtavice a ako se manjak unosa ovog elementa nastavi dolazi i do gubitka težine [37].

*Kalijum*, kao glavni katjon vanelijskih tečnosti, igra važnu ulogu u prenosu nervnih impulsa i mišićne kontrakcije. On je neophodan za dobru kardiovaskularnu funkciju zato jer vrši regulaciju krvnog pritiska i balansira vodu u organizmu. Postoje dokazi da ishrana bogata kalijumom može smanjiti rizik od povišenog krvnog pritiska i šloga. Telo zadržava visoku

koncentraciju  $K^+$  jona unutar elija i kada je van elijska koncentracija ovog jona niska. Suprotno je sa  $Na^+$  jonima. Da bi se obezbedilo da  $K^+$  joni ostanu u eliji a  $Na^+$  joni ne u u u nju, specijalni transpotni protein u elijskoj membrani konstantno pumpa  $K^+$  jone u elije a  $Na^+$  jone van njih. Povišeni sadržaji K obi no dovode do bubrežne insuficijencije, dehidratacije, miši ne slabosti i kardioloških problema. Nedostatak ovog elementa je redak ali može nastati usled povraanja ili dijareje, pri emu dolazi do miši ne slabosti, paralize, mu nine, tahikardije ili otkazivanja rada srca [37].

*Kalcijum* i njegove soli obezbe uju vrstinu kostima skeleta a kalcijumovi joni igraju važnu ulogu u mnogim ako ne i u svim metaboli kim procesima. Minerali kostiju predstavljaju glavni rezervoar kalcijuma koji kruži u van elijskoj te nosti. Kalcijum dospeva u van elijsku te nost iz gastrointestinalnog trakta preko apsorpcije ili razgradnjom kostiju, odakle se uz pomo gastrointestinalnog trakta, bubrega i kože ugra uje u kosti prilikom njihovog formiranja. Tako e, duž cele elijske membrane postoji stalan protok ovog elementa. Mnoge neuromiši ne i druge elijske funkcije zavise od održavanja koncentracije jona kalcijuma u van elijskoj te nosti. Nedostatak kalcijuma ili negativan balans ovog elementa u organizmu, svakako e pre ili kasnije dovesti do pojave osteoporoze, pri emu treba napomenuti da pojava ove bolesti nije uvek vezana za manjak kalcijuma u ljudskom organizmu [37].

*Hrom* spada u grupu esencijalnih elemenata, ali treba imati u vidu da samo jedinjenja u kojima je u obliku  $Cr^{+6}$  nisu toksi na za razliku od oblika  $Cr^{+3}$  koja su štetna po zdravlje ljudi. Razlikovanje ova dva oblika hroma je veoma važno prilikom vršenja procene kvaliteta hrane [38]. Ovaj mikroelement je važan za metabolizam ugljenih hidrata, masti i proteina. Zna ajan je faktor u procesu regulisanja nivoa glukoze u krvi, pove ava efikasnost insulina, uti e na snižavanje holesterola, kao i na smanjenje apetita i telesne težine. Aktivni oblik hroma predstavlja složeni organski kompleks - GTF (eng. *Glucose Tolerance Factor* - faktor tolerancije na glukozu) koga ine hrom, glutation i vitamin B3, kombinacija potrebna za održavanje normalne koncentracije glukoze u krvi i rad insulina. Usled nedostatka aktivnog oblika hroma u ljudskom organizmu, insulin gubi na efikasnosti, pa njegov nedostatak u ishrani esto dovodi do pojave dijabetesa i ateroskleroze kod starijih osoba. Hrom je postao izuzetno popularan u grupi mineralnih suplemenata, kao dodatak ishrani i to pre svega kod gubljenja težine ili u procesu razvoja miši a.

*Mangan* u estvuje u formiranju kostiju i metabolizmu amino kiselina, holesterola i ugljenih hidrata. Mn je komponenta nekoliko enzima, uklju uju i arginazu, glutamin sintetazu, heksokinazu i dr. Ovaj elemenat je tako e aktivator razli itih enzima, koji mogu biti aktivirani i od strane drugih metala, naro ito magnezijuma [39]. Kako je  $Mn^{2+}$  ion po veli ini veoma sli an  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  jonu, on može zamenjivati magnezijum u piruvat karboksilazi i cink u cink superoksid dismutazi [40]. Nedostatak mangana je ispitivan na velikom broju eksperimentalnih životinja. Manjak Mn u organizmu se odražava na razvoj i reprodukciju kao i na promene u metabolizmu masti i ugljenih hidrata. Tako e je zapažena pojava smanjenja tolerancije na glukozu i defekata prilikom razvoja skeleta [41]. Mali je broj podataka koji se odnose na posledice nedostatka Mn kod ljudi. Pove an sadržaj ovog metala u ljudskom organizmu nastaje npr. udisanjem veoma toksi ne pare Mn. Pove an sadržaj ovog metala u mozgu može da uti e na motorne i kognitivne funkcije, a dalja akumulacija mangana dovodi do razvoja razli itih neuroloških i psihijatrijskih bolesti [29], iji su simptomi sli ni Parkinsonovoj bolesti [42].

*Gvož* e ima nekoliko vitalnih funkcija za organizam. Ono prenosi kiseonik preko crvenih krvnih zrnaca hemoglobina iz plu a do tkiva. Tako e Fe služi i kao transportni medij za

elektrone u eliji i kao sastavni deo važnih sistemskih enzima u različitim tkivima. Najveći deo gvožđa u telu nalazi se u eritrocitima kao hemoglobin, koji predstavlja molekul od petiri osnovne jedinice, od kojih svaka sadrži jednu hem grupu i jedan proteinski lanac. Struktura hemoglobina je takva da omoguava da se u potpunosti veže kiseonik iz pluća, i da se on potom osloboди u tkivima. Citochromi su enzimi koji takođe sadrže hem grupu i jedan molekul globina. Ovi enzimi imaju ulogu prenosa elektrona u eliji, i njihova struktura ne omoguava rezervabilan proces uzimanja i otpuštanja kiseonika. Uloga im je da u oksidativnom metabolizmu prenose energiju u eliju i to narođeno u mitohondrijama. Gvožđe se reverzibilno skladišti u jetri kao feritin i hemosiderin odakle se dalje može transportovati do drugih delova tela uz pomoć proteina transferina. Smanjena količina gvožđa u ljudskom organizmu dovodi do pojave anemije. Deo ljudske populacije koji ima najveći rizik od nedostatka ovog metala su novorođeni, decaci, adolescenti i trudnice [43].

*Kobalt* je u prirodi malo zastupljen i u litosferi ga ima samo oko 0,001 %. Kod ljudi i životinja ovaj metal se nalazi u jako malim količinama, a dnevni unos Co je manji od 0,1 µg, međutim i pored toga kobalt se ubraja u esencijalne elemente. Co je sastavni deo vitamina B12 koga u telu nema više od 5 mg. Ako se pak u telu nađe manje od 5 mg vitamina B12, može doći do razvoja vrlo ozbiljnog oboljenja perniciozne anemije. Osnovna uloga, ako ne i jedina, kobalta je ona koju ima u vitaminu B12 [44].

*Nikl* je element koji je esencijalan za eksperimentalne i domaće životinje. Njegova važnost za ljude je i dalje predmet kontraverzi [45]. Još uvek nije jasno definisana njegova biohemijska funkcija kod ljudi iako postoje dokazi da Ni ima ulogu kao kofaktor ili strukturna komponenta u nekim metaloenzimima koji su slični nekim nikl enzimima koji su već identifikovani kod biljaka i mikroorganizama [46]. Oni uključuju ureazu, hidrogenazu i ugljen monoksid dehidrogenazu. I pored što su posledice nedostatka Ni prisutne kod nekih životinjskih vrsta, kod čoveka još nije registrovan ni jedan takav slučaj.

*Bakar* se najviše u telu nalazi vezan u nekoliko različitih metaloproteina, u kojima ima strukturalnu ulogu i deluje kao kofaktor katalitičke aktivnosti. Opisano je negde oko dvadesetak enzima koji sadrže bakar i oni imaju različitu elijsku i van elijsku aktivnost, koja uključuje učestvovanje u telesnim imunološkim reakcijama, neurofunkcijama, zdravlju kostiju, hemiji krvi, antioksidativnoj funkciji, proizvodnji energije i dr. Zdravstveni problemi usled nedostatka ovog elementa su veoma retki [47]. To je posledica toga što je bakar dosta zastupljen u hrani, tako da negativni efekti nedostatka bakra usled nađene ishrane nastaju samo u ekstremnim situacijama. Klinički, nedostatak bakra se može javiti kod prevremenog rođenja dece ili nedovoljno uhranjene dece. Bakar pored toga što je esencijalni element, može biti i toksičan. Akutno trovanje nastaje prilikom uzimanja većih količina ovog metala, dok hronično trovanje može nastati i prilikom uzimanja relativno malih količina bakra. Simptomi akutnog trovanja uključuju abdometralni bol, mučenje, povraćanje i dijareju, i u ekstremnim slučajevima može nastupiti i smrt. Hronično trovanje bakrom obično nastaje usled korištenja kontaminirane vode i hrane kao rezultat njihovog kontakta sa bakrom iz cevi ili pribora za kuhanje.

*Cink* je prisutan u svim telesnim tkivima i tehostima. Ovaj element je esencijalna komponenta za veliki broj (> 300) enzima koji učestvuju u sintezi i razgradnji ugljenih hidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina kao i u metabolizmu drugih mikronutrienata. Cink stabilizuje molekulsku strukturu elijskih komponenti i membrane i na taj način dovodi do održavanja celovitosti elija i organa. Takođe, Zn ima esencijalnu ulogu u polinukleotidnoj transkripciji. Njegova uloga u ovakvoj fundamentalnoj aktivnosti sigurno potvrđuje značaj ovog

elementa za sve žive organizme. Klinička slika nedostatka cinka kod ljudi je razvoj retardiranosti, odlaganje seksualnog i koštanog sazrevanja, rane na koži, dijareja, gubitak kose, gubitak apetita. Cink se ne ubraja u veoma toksi ne metale, ali treba reći da postoje dokazi o pojavi štetnih efekata po ljudsko zdravlje kada se on unosi u koli inama većim nego što je preporučeno. Akutno trovanje ovim metalom se manifestuje mučenjem, povraćanjem, dijarejom, groznicom i letargijom [43].

*Selen* koji se uneće u organizam biva apsorbovan od strane gastrointestinalnog trakta i odmah se ugrađuje u selenoproteine koji imaju veliki broj esencijalnih uloga u organizmu. Jedinstvena selena koja se unose u organizam su veoma reaktivna pa je zato važno da element bude u relativno nereaktivnom organskom obliku pre nego što se ugradi u katalitičke reaktivne selenoproteine [48]. Dva su enzima selena dosta važna, a to su glutation peroksidaze i tioredoksin reduktaze, koji u tkivima kontrolišu koncentraciju visoko reaktivnih metabolita kiseonika. Ovi metaboliti su pri nužnim koncentracijama esencijalni ali ako im se koncentracija poveća postaju jako toksični. Ovaj element vrši zaštitu ljudskog tkiva od oksidativnog stresa, infekcija i uticaja na njegov rast i razvoj. Kliničke manifestacije nedostatka selena su neuobičajene i nedovoljno dobro objašnjene. One mogu izazivati mišićnu slabost i mialgiju koje, u nekim slučajevima, mogu dovesti i do srčanog udara [43].

*Molibden* koji u telu učestvuje preko hrane biva apsorbovan od strane gastrointestinalnog trakta. Više od 80% ovog metala se apsorbuje gastrointestinalnom traktu. Molibden je esencijalna komponenta za mnoge enzime, uključujući i ksantin oksidazu i ksantin dehidrogenazu, koji su neophodni za sintezu uree. Struktura mnogih molibdoenzima nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da su oni neproteinski kompleksi malih dimenzija koji sadrže jezgro pterina. Taj "molibdenopterin faktor" vezuje se za molibdoproteine u elijama [49]. Nedostatak molibdena usled nadejne ishrane nije potvrđen kod ljudi. Molibden koji se unosi hranom je relativno netoksičan za ljude, ali postoje dokazi da povišeni unos ovog metala i to između 10 i 15 mg/d (mg dnevno) može dovesti do promena metabolizma nukleotida i do smanjenja apsorpcije bakra [50].

*Aluminijum* je element za koga se nekada smatralo da nema nikakvu metaboličku funkciju. Kod nekih organizama Al je uključen u reakcije između citohromaca i succinil dehidrogenaze, a takođe ima i ulogu kofaktora u aktivaciji vezivanja guanin nukleotida koji je neophodan u metabolizmu proteina. Sa druge strane, povećani sadržaj ovog elementa kod bubrežnih bolesnika može znatično ošteti skelet usled negativnog uticaja na proces formiranja kostiju, što dovodi do pojave osteomalacije.

Biološka uloga *bora* kod ljudi još uvek nije poznata, a njegovo esencijalno delovanje je u fazi ispitivanja. Takođe ne postoje studije koje potvrđuju toksičnost ovog elementa [50]. Ispitivanja na životinjama su pokazala da se B najbrže apsorbuje preko gastrointestinalnog trakta i to do preko 90% [51]. Najveća količina takođe unetog bora se hidrolizuje u obliku B(OH)<sub>3</sub> koji se putem pasivnih procesa dalje apsorbuje [25]. U krvi se bor nalazi u obliku slobodne borne kiseline. Kako nisu otkriveni enzimi koji sadrže B, smatra se da ovaj element ima regulacionu ulogu u pojedinim enzimima [52]. Mnoge kliničke studije su pokazale da usled nedostatka bora kod žena u klimaksu može doći do razvoja osteoporozе. Upotreba suplemenata bora je kod ovih pacijenata dovela je do smanjenja gubitka Ca, Mg i P [53]. Takođe, nedostatak ovog elementa može dovesti do poremećaja pažnje i kratkoročnog pamćenja kod ljudi [54].

*Arsen* je element koji je poznat po svojim toksi nim svojstvima, mada su se u novije vreme pojavile indicije da bi on u malim koli inama mogao da ima i korisnu ulogu po zdravlje ljudi [55]. Nakon apsorpcije, arsen se transportuje do plu a i drugih organa, a kasnije dospeva do kože, kose i noktiju, gde se vezuje za keratin. Nakon 24 sata, organi po inu da oslobo aju arsen koji se na kraju izbacuje iz tela preko urina. U koži, kosi i noktima arsen se deponuje i nivo ovog elementa se poveava ukoliko organizam biva dalje izlagan arsenu [56]. Arsen ima metaboli ku ulogu u elijama. Moguće je da deluje i kao aktivator nekih enzima i zamenjuje fosfat u nekim reakcijama i prilikom regulacije ekspresije gena [57]. Neorganska jedinjenja arsena su veoma toksi na i ona mogu da izazovu kako akutna tako i hroni na trovanja [58].

*Kadmijum* je element koji je poznat kao jedan od najopasnijih zagaiva a životne sredine. Negde oko 6% unetog Cd u organizam se apsorbuje preko gastrintestinalnog trakta. Nakon toga se kadmijum vezuje za albumin i dolazi do krvi. Preko krvi on dospeva u jetru gde dovodi do sinteze proteina metalotionina (MT). Kompleks Cd-MT dolazi do krvi pa i do bubrega u kojima ostaje sve dok se ne prekora i elijski kapacitet siteze MT i tada dolazi do osloboanja Cd. Tada on izaziva ireverzibilno ošte enje bubrega [59]. Ako dođe do trenutnog trovanja kadmijumom dolazi do pojave mu nine, povraanja i abdominalnog grada, a ako se pak ovaj element unosi u organizam duži vremenski period dolazi do ošte enja bubrega, anemije i gubitak koštanih minerala što dovodi do pojave krtosti kostiju [60].

*Olovo* je element koji nema nikakvu hranljivu vrednost i njegovo prisustvo u ljudskom organizmu može da izazove kako akutno tako i hroni no trovanje. Apsorbovano olovo se preko krvi prenosi do vitalnih organa kao što su jetra i bubrezi, u kojima se deponuje oko 5% unetog olova dok se ostalih 95% olova nalazi u kostima u vidu fosfata. Postoji sličnost u metabolizmu olova i kalcijuma pa se zato oba metala nalaze u kristalnoj strukturi kostiju. Vreme poluživota Pb u kostima je od 20 do 30 godina, ali se ono usled stresa može oslobođiti u krvi u bilo kom trenutku. Oko 90% olova koje unesu odrasle osobe se izbacuje preko fescesa. Simptomi akutnog trovanja olovom se lako prepoznaju za razliku od hroni nog trovanja ovim metalom koje se javlja usled akumulacije manjih količina Pb tokom dužeg vremenskog perioda. Olovo primarno ošteuje etiri organska sistema: hematopoezni, nervni, gastrointestinalni i renalni. Olovo vrši inhibiciju pojedinih enzima tako što ima afinitet prema njihovim -SH grupama. Enzimi koji učestvuju u sintezi hema su osetljivi na inhibiciju olovom i to pre svega delta amino levilunat dehidrataza ALAD i hem sintetaza HS. Biohemijski efekti delovanja olova su uočljivi i pri manjem izlaganju ovom toksinom metalu dok se klinička slika anemije javlja tek pri znaku ajnijem delovanju olova. Tako je, kao indikacija da je pacijent bio izložen dejstvu olova, dovoljan podatak da je došlo do inhibicije ALAD-a ili se u urinu pojavio amino levilunat. Nervni sistem je takođe jako podložan štetnom dejstvu olova o to je naročito izraženo kod odojadi i male dece kod kojih je ovaj sistem još uvek u razvoju [61].

#### **1.4.4 Putevi dospevanja metala u hranu**

Sadržaj različitih metala u ljudskom telu zavisi od sastava hrane koju konzumiramo dok je, sa druge strane, neorganski sastav hrane u direktnoj zavisnosti od uticaja životne sredine (voda, vazduh i zemljište). Korišćenjem modernih instrumenata za multielementnu analizu moguće je detektovati prisustvo većine, ako ne i svih metala koji se nalaze u uzorcima hrane koja se najčešće konzumira.

Glavni izvor metala u hrani je zemljište na kome se hranljivi proizvodi uzgajaju, pa tako postoji jasna veza između sastava zemljišta i metala koji se hranom unose u ljudski organizam.

Zemljište se sastoji od različitih komponenti u vrstom, te nom i gasovitom agregatnom stanju. Neorganska jedinjenja sa injavaju i do 90% prisutne vrste materije zemljišta. Kod uobičajenog zemljišta koje se redovno ubri, vrsta komponenta (koju ima 45% minerala i 5% organske supstance) predstavlja 50% njegove ukupne zapremine, dok ostatak ima vazduh i voda čiji je sadržaj približno isti i kreće se od 20-30% [62].

Metali sa najvećim sadržajem u zemljištu su aluminijum, gvožđe, kalcijum, natrijum, kalijum i magnezijum. Većina ostalih metala i metaloida se u zemljištu nalazi u znatno nižim sadržajima. Sadržaj metala u zemljištu (mg/kg zemljišta) dat je u Tabeli 6. Sastav određenog zemljišta prvenstveno zavisi od hemijskog sastava osnovnog materijala od koga se ono formiralo. Osnovni sastav zemljišta može se promeniti navodnjavanjem, kopanjem rude, delovanjem industrijske i poljoprivredne proizvodnje, ili se sastav menja usled prirodnih biogeohemijskih procesa [63].

Tabela 6. Koncentracija metala u zemljištu [62]

Metal	Opseg koncentracije (mg/kg)	Srednja vrednost (mg/kg)
Aluminijum	7-10000	72000
Arsen	<0,1-97	7,2
Bakar	<1-700	25
Barijum	<20-5000	580
Berilijum	<1-15	0,92
Bor	<20-300	33
Cink	<5-2900	60
Gvožđe	100->100000	26000
Hrom	1-20000	54
Kadmijum	0,01-2	0,35
Kalaj	<0,1-10	1,3
Kalijum	50-63000	15000
Kalcijum	100-320000	24000
Kobalt	<3-70	9,1
Litijum	<5-140	24
Magnezijum	50->100000	9000
Mangan	<2-7000	550
Molibden	<3-15	0,97
Natrijum	<500-100000	12000
Olovo	<10-700	19
Selen	<0,1-4,3	0,39

Na ubrena zemljišta su u stanju da snabdevaju biljke sa svim hranljivim metalima u tragovima koji su neophodni za njihov rast i razvoj. To su bor, kobalt, bakar, gvožđe, mangan, molibden i nikl. Mnogi drugi elementi koji su prisutni u zemljištu (Tabela 6.) takođe se mogu naći u biljkama. Neki od njih kao što su selen i hrom, nisu neophodni biljci, ali su od hranljivog značaja za životinje i ljude koji te biljne vrste konzumiraju. Teški toksični metali, kao što su kadmijum i olovo, takođe u biljku dospevaju preko zemljišta.

Količina metala koje biljke mogu da uzmu iz zemljišta ne zavisi samo od njihovog ukupnog sadržaja u zemljištu nego i od dostupnosti ovih elemenata samoj biljci. Upravo je ta

njihova dostupnost za uzimanje, odnosno mobilnost, kao i akumulacija od strane biljaka glavni faktor koji određuje da li će ili neće ena biljna vrsta značajno doprineti da hrana bude izvor pojedinih vrsta metala neophodnih u ishrani. Dostupnost metala biljci je određena njihovim osobinama kao što su: hemijski oblik metala, rastvorljivost i sposobnost da se kompleksiraju sa organskom materijom i da tako budu apsorbovani od strane drugih konstituenata zemljišta. Biljka sama sebi može povećati sposobnost ka uzimanju metala tako što će promeniti hemiju zemljišta na kome se uzgaja, otpuštanjem vodonikovih jona i organskih helatnih agenasa.

Kada dospeju u biljku, neki od apsorbovanih metala će ostati u korenu, a neki dospevaju do liličnika, ploda, semenja gde mogu da se akumuliraju.

Biljke su za ljude primarni izvor transporta neorganskih hranljivih materija iz zemljišta dok su proizvodi od životinja (meso, mleko, jaja) drugi izvor ovih elemenata. Kombinacija ova dva puta kojima metali dospevaju u ljudski organizam može biti izuzetno korisna po ljudsko zdravlje. Tako npr. gvožđe se u biljkama nalazi u vrlo niskim sadržajima i to u obliku koji nije pogodan za apsorpciju, pa se zato ljudski organizam ovim elementom prvenstveno snabdeva preko mesa životinja u kome se Fe nalazi u visokim koncentracijama i to pre svega u unutrašnjim organima i mišićima. Ovaj metal se u telu životinja, prevodi u organsku formu koja je znatno lakša za apsorpciju u digestivnom traktu ljudi. Tako će je životinsko meso mnogo bolji izvor cinka nego što su to biljni proizvodi.

Zemljište je glavni izvor metala u ishrani ljudi koji u ljudsko telo dospevaju preko biljaka i životinja koje se biljkama hrane. Međutim postoje i drugi brojni putevi kojima metali mogu da dospeju u hrani. Industrijska proizvodnja koja dovodi do zagađenja životne okoline glavni je izvor toksičnih metala, kao što su kadmijum i olovo. Sa druge strane tehnološki proces može dovesti i do povećanja pojedinih hranljivih metala u hrani. Tako npr. upotreba posuća od gvožđa dovodi do povećanja sadržaja ovog metala u ishrani na sasvim zadovoljavajući nivo [64]. Tako će postojeći dokazi koji potvrđuju da značajna količina nikla i hroma dolazi u hrani usled oslobađanja ovih metala od strane nerđajućeg elika koji se koristi za izradu kuhinjskog pribora i posuda za skladištenje hrane [65]. Bakar, slično kao nikl i hrom, se može osloboditi iz posuća koje je izrađeno od neke od legura ovog metala. Iako su bakar, nikl i hrom esencijalni metali, povišeni sadržaji ovih elemenata u hrani koja se priprema u posudama od njihovih legura može dovesti do oštete enja jetre i to narođeno kod dece [66].

#### 1.4.5 Biodostupnost metala u hrani

Metali se u hrani nalaze u različitim hemijskim oblicima, bilo u neorganskim ili organskim kompleksima u kombinaciji sa različitim organskim jedinjenjima kao što su amino kiseline ili proteini. To je, kako je i više puta bilo rečeno, od velike važnosti za njihovu biodostupnost. Tako npr. ako je metal prisutan u hrani samo u svom nerastvornom obliku on najverovatnije neće biti apsorbovan u nekoj većoj količini od strane gastrointestinalnog trakta i zato će ostati neapsorbovan i bez dalje koristi za organizam. Ovo naravno može imati kako dobru tako i lošu stranu po ljudsko zdravlje. Nešto manje od 1% aluminijuma se prirodno nalazi u hrani i to najčešće u obliku nerastvornog hidroksida ili fosfata, i na taj način je njegova potencijalna toksičnost sprečena prilikom apsorpcije od strane gastrointestinalnog trakta. Sa druge strane, gvožđe koje se u biljkama najčešće nalazi u vidu veoma nerastvornog  $Fe^{3+}$  jona slično kao i aluminijum, je vrlo malo apsorbovan od strane gastrointestinalnog sistema, što može dovesti do neželjenih efekata po ljudsko zdravlje.

#### **1.4.6 Dnevne potrebe za esencijalnim metalima**

Procena zdravstvenog značaja određene hranljive komponente za ljude koji je konzumiraju se izvodi na osnovu podataka o njenoj hranjivoj vrednosti a ne na osnovu u estalosti njenog korištenja. Zato su zdravstvene organizacije širom sveta u prethodnih pola veka po ele da propisuju i preporučuju količine unetih hranljivih i drugih komponenata hrane.

Svetske institucije koje propisuju najrelevantnije podatke o hranjivoj vrednosti pojedinih komponenata hrane su Ekspertska grupa za vitamine i minerale (eng. *Expert Group on Vitamins and Minerals* - EVM) iz Engleske, Odbor za hranu i ishranu: Medicinski institut (eng. *Food and Nutrition Board: Institute of Medicine* - FNB) iz USA, Organizacija za poljoprivredu i hranu (eng. *Food and Agriculture Organization* - FAO) i Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization* - WHO).

Preporučen dnevni unos (eng. *Recommended daily allowances* - RDA) esencijalnih minerala predstavlja standarde u ishrani koje je postavila Nacionalna akademija nauke U.S. i izražava se u miligramima po jedinki. RDA definiše nivo esencijalnih nutrijenata koji su neophodni kako bi se dostigle hranljive potrebe za jednu normalnu, zdravu osobu.

Dnevni unos (eng. *Daily Intake* - DI) dosta zavisi kako od spoljnih tako i od unutrašnjih faktora kao što su hemijski oblik minerala, njihovo prisustvo i nivo u konzumiranoj hrani, procenat apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, ali i navike u toku ishrane, težina, godine, pol i ekonomski status pojedinca. Može se reći da DI predstavlja onu količinu nutrijenta koja je potrebna da bi se izbegao njihov deficit i obezbedili neophodni metabolički procesi u ljudskom organizmu.

Potrebe za određenim nutrijentom su najmanje količine koje su neophodne da pojedinac sa uva dobro zdravlje. Razlikuju se među pojedincima, a i među osobama istog uzrasta, pola, veličine tela i nivoa fizičke aktivnosti. RDA nekog nutrijenta je nivo za koji se smatra da je dovoljan da zadovolji potrebe skoro svih ljudi u grupi sa sličnim karakteristikama (kao što je uzrast, pol, veličina tela i nivo fizičke aktivnosti). RDA je definisan za vitamine, većinu minerala i proteine i zadovoljava najviše nivo populacije.

U Tabeli 7 je dat dnevni unos (DI) nekih makro i mikroelemenata, njihov procenat apsorpcije (PA) u gastrointestinalnom traktu kao i preporučen dnevni unos (RDA) ovih elemenata koji je neophodan da bi se ostvarili optimalni pozitivni efekti po zdravlje odraslih jedinki. Rezultati u Tabeli 7 predstavljaju sumirane podatke tri relevantne svetske organizacije iz ove oblasti i to EVM, FNB, FAO/WHO (61-63).

U Republici Srbiji su na bazi internacionalnih naučnih saznanja, kao i na bazi sprovedenih ispitivanja o nacionalnoj ishrani i nacionalnih nutritivnih preporuka definisane preporučene dnevne doze pojedinih nutrijenata u cilju preventive i što bolje zdravstvene zaštite ljudi (Tabela 8.). Podaci o pojedinim makro i mikronutrijentima regulisani su Pravilnikom o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica [67] kojim su propisane RDA vrednosti za vitamine i mineralne materije koje su usklađene sa evropskim vrednostima, bez oznake na koju populacionu grupu se odnose, dok su Pravilnikom o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti dijetetskih proizvoda koji se mogu stavljati u promet [68] maksimalno dozvoljene količine vitamina i minerala koje se mogu naći u suplementima definisane u posebnom prilogu, kao i hemijski oblici jedinjenja koja se mogu koristiti.

Tabela 7. DI, PA u gastrointestinalnom traktu i RDA makro i mikro metala izraženih u miligramima za odrasle osobe

Element	Makroelementi						
	Kalcijum	Natrijum	Kalijum	Magnezijum			
DI <sup>a</sup>	960-1220	3000-7000	3300	145-358			
PA <sup>b</sup>	10-50	>40	>40	20-60			
RDA <sup>c</sup>	800-1200	500	2000	280-350			
Element	Mikroelementi						
	Gvožđe	Cink	Mangan	Bakar	Molibden	Hrom	Nikl
DI	15	12-18	5,6-8	2,4	>0,15	<0,15	0,16-0,20
PA	10-40	30-70	40	25-60	70-90	10-25	30-50
RDA	10-15	12-15	2-3	1,5-3	0,075-0,250	0,05-0,20	0,05-0,3
Element	Kobalt	Vanadijum	Selen	Silicijum	Bor	Litijum	
	0,003-0,012	0,012-0,030	0,06-0,22	21-200	1-3	<0,001-0,99	
PA	30-50	<1	~70	3-40	>40	60-100	
RDA	0,002 <sup>d</sup>	0,01-0,025	0,055-0,07	21-46	1-2	-	

<sup>a</sup>Dnevni unos; <sup>b</sup> Procenat apsorpcije; <sup>c</sup> Preporučeni dnevni unos; <sup>d</sup> 0,002 mg kobalta iz vitamina B12

Tabela 8. Preporučeni dnevni unos pojedinih metala u RS za odrasle osobe

Element	RDA <sup>a</sup>
Kalijum	2000 mg
Kalcijum	800 mg
Magnezijum	375 mg
Gvožđe	14 mg
Cink	10 mg
Bakar	1 mg
Mangan	2 mg
Selen	55 µg
Hrom	40 µg
Molibden	50 µg

<sup>a</sup> Preporučeni dnevni unos

U Tabeli 9 predstavljeni su putevi unosa pojedinih metala preko hrane kao i bolesti koje mogu nastati kod ljudi, usled deficita ovih nutrijenata.

Tabela 9. Putevi unosa metala preko hrane i bolesti izazvane nedostatkom pojedinih metala u ljudskoj ishrani [34]

Metal	Putevi unosa preko hrane	Bolesti izazvane usled nedostatka
Ca	Mleko, sir, riba, povrće, žitarice	Osteoporiza, neurološki poremećaji, rahitis
Fe	Jaja, iznutrice, meso, riba, krompir, orasi	Anemija
Mg	Žitarice, mahunarke	Miši na slabost
Na	So, meso, povrće, sir	Glavobolja, gubitak apetita, slabost, dijareja, mučnina
K	Krompir, zeleno povrće, orasi	Miši na slabost, neurološki poremećaji
Zn	Meso, žitatrice, mahunarke	Gubitak kose, rane na koži, smanjena otpornost na infekcije
Cu	Zeleno povrće, morski plodovi, žitarice	Anemija, srčana aritmija
Se	Brazilski orah, riba, žitarice, jaja	Rak, bolesti srca, smanjena otpornost na mikrobiološke i virusne infekcije

Raznovrsna ishrana je jedan od načina da se spreči i potencijalni štetni efekat koji pojedini metali ili njihova jedinjenja mogu imati po zdravlje ljudi. Ljudsko telo je tolerantno prema veoma maloj količini mnogih toksičnih supstanci ali velika količina samo jednog toksičnog elementa može ozbiljno narušiti ljudsko zdravlje. Gotovo svaka supstanca koja se koristi u velikoj količini može imati i štetan efekat. To se naročito odnosi za elemente u tragovima i makroelemente. Zato je važno da se napravi razlika između toksičnosti sa jedne strane i potencijalne opasnosti pojedinih elemenata po ljudsko zdravlje sa druge. Hrana sadrži pojedine toksične komponente, ali one neće predstavljati opasnost ako se konzumiraju u preporučenim količinama.

U Tabeli 10 su date vrednosti DI, PA za toksične metale kao i njihov uslovno prihvatljiv nedeljni unos (eng. *Provisional Tolerable Weekly Intake - PTWI*) za odrasle osobe.

Tabela 10. DI, PA i PTWI za toksične metale po preporuci FAO/WHO [69, 70]

	Toksični metal				
	Aluminijum	Arsen	Kadmijum	Olovo	Živa
DI <sup>a</sup>	9-36	0-0,29	<0,01-0,1	<0,1-0,2	<0,02-0,1
PA	<1-7	>90	3-10	5-10	90
PTWI <sup>b</sup>	0-7	0,015	0,007	0,025	0,005

\* Dnevni unos; • Uslovno prihvatljiv nedeljni unos; <sup>a</sup> mg/odrasla osoba; <sup>b</sup> mg/kg odrasle osobe

U RS postoje regulative koje se odnose na sadržaje ovih kontaminanata u razliitim vrstama prehrabrenih proizvoda [71], ali ne reguliše unos ovih kontaminanata u ljudski organizam.

Zbog štetnog dejstva toksičnih metala po zdravlje ljudi neophodno je da se vrši stalno pravilno ravnanje kako hrane tako i podzemnih i površinskih voda. Ukoliko koncentracije ovih polutanata prelaze propisane granice postoji realna opasnost po ljudsko

zdravlje. Putevi unosa i koncentracije teških metala u pojedinim vrstama hrane kao i tkiva i organi u kojima se ovi metali deponuju, predstavljeni su u Tabeli 11.

Tabela 11. Glavni izvori toksičnih i potencijalno toksičnih metala i organi u kojima se deponuju [34]

Metal	Putevi unosa preko hrane i koncentracija (mg/kg)	Tkiva i organi u kojima se deponuju
As	Morski plodovi: 3-37; vino: 0,02-0,11	Jetra, bubrezi, koža, kosa, nokti
Cd	Meso, riba, voće: 0,005-0,01; kikiriki, spana: 0,06; svinjske iznutrice: 0,18-1	Jetra, bubrezi, kosti
Cr	Koštunjavovoće: 0,14; žumance: 0,2; sir: 0,13	Kosti
Hg	Riba i ribljji proizvodi: 0,09-1,2	Bubrezi, kosti, paratiroidna žlezda, mozak
Ni	Proizvodi od kakaa: do 9,8; koštunjavovoće: do 5,1	Bubrezi, kosti
Pb	Mlečni proizvodi: 0,003-0,083; povrće: 0,005-0,65; meso, riba, živilina: 0,002-0,16; žitarice, sir: 0,03	Jetra, bubrezi, kosti, mozak, aorta

#### 1.4.7 Metali u hrani – analitički pristup

Analiza hrane na prisustvo metala je prilično otežana zbog komplikovane prirode matriksa. Mineralne komponente se u ispitivanom matriksu nalaze u veoma niskim koncentracijama koje vrlo esto sadrže i organske komponente. Mnogi biološki uzorci su nehomogeni i zahtevaju dodane korake za pripremu. Uzorak koji je uzet za analizu mora biti reprezentativan tako da njegov sastav odgovara prosečnom sastavu analiziranog sistema i taj sastav ne bi trebalo da se menja tokom njegovog transporta ili skladištenja. Najvažnije od svega je to da uzorak ne sme da se kontaminira za vreme sakupljanja, tretiranja i analiziranja. Takođe se mora voditi računa o isto i reagenasa i vode koji se koriste prilikom tretmana i analize kao i o isto i same opreme koja se koristi u ispitivanju. Uglavnom, posude od politetrafluoroetilena ili perfluoroalkosida se preporučuju za upotrebu pre nego uobičajene posude od borsilikatnog stakla.

Adekvatan pristup uzorkovanju materijala pre svega zavisi od matriksa ispitivanog sistema. Heterogeni uzorci moraju da se homogenizuju se enjem, mešanjem, rezanjem, mlevenjem i to upotrebom ručne ili mehaničke opreme [72]. Ovi postupci nisu potrebni samo da bi se dobio što reprezentativniji uzorak nego i da bi se omogućilo njegovo bolje rastvaranje i digestija. Prilikom upotrebe reagenasa, posuda ili druge opreme u toku analize, mora se voditi računa da se ne unese ili apsorbuje/adsorbuje jedinjenje ili elementi koji se analiziraju. Zato je neophodno da se koriste ahatne brusilice, porcelanski ili stakleni avani kao i sečiva od titanijuma [73]. Svaka analiza uzorka hrane bi trebalo da se izvrši u što kraćem vremenskom roku a to pogotovo važi za uzorce koji mogu da se pokvare, istrunu ili da se raspadnu (meso, povrće, voće, riba itd.) Ako je ispitivanje uzorka nemoguće izvršiti u što kraćem roku onda ih je potrebno sačuvati pod adekvatnim uslovima odgovarajuće temperature, vlage, svetla, kontakta sa

kiseonikom itd. Najjednostavniji način za to je da se uzorak stavi u sterilnu i suvu posudu i ostavi da se zamrzne.

Samo prilikom pojedinih procedura određivanja mineralnog sastava, kao što je neutronska aktivaciona analiza, pretretman ispitivanih uzorka nije neophodan. U svim ostalim slučajevima, korak mineralizacije uzorka je nezaobilazan. On se može izvesti na dva načina i to suvom i mokrom digestijom.

Suva digestija je jeftina, jednostavna i brza metoda digestije koja se najčešće primenjuje za elementnu analizu organskih i neorganskih uzorka. Izvodi se tako što se vrši zagrevanje uzorka u atmosferi (stati na) ili u struji (dinamička) vazduha ili kiseonika u peć za žarenje ili kvarcnim cevima na temperaturu do 500°C, koja omogućava da se sva organska jedinjenja prisutna u uzorku razore. Ovaj proces prevodi veliku koliju biološkog uzorka (hranu) u malu koliju pepela koga sa inaktiviraju neorganska jedinjenja (uglavnom oksidi). Žarenje uzorka se vrši do postizanja belog pepela. U slučaju da se samim žarenjem ne dobije beli pepeo, neophodno je uzorak tretirati određenom zapreminom 65%  $\text{HNO}_3$ , i to u cilju potpune oksidacije zaostalih organskih jedinjenja. Mineralizovani uzorci se nakon prevođenja u pepeo rastvaraju u razblaženim neorganskim kiselinama.

Mokra digestija sa kiselinama je trenutno najčešće primenjivana tehnika za dekompoziciju organske materije, i to narođito hrane. Jake mineralne kiseline ili njihova odgovarajuća kombinacija su najbolji način da se razori najveći broj uzorka hrane. Odmereni uzorak kome su dodate kiseline zagreva se u odgovarajućem sudu uz pomoć plamenika ili rešoa. Azotna kiselina ili njena smeša sa perhlornom ili sumpornom kiselom se najčešće koristi za razaranje uzorka, usled njene jakе oksidacione moći i zato što stvara rastvorne nitrate sa metalima. Neki put je u cilju potpunog razaranja organskog matriksa neophodno da se doda i jako oksidaciono sredstvo, kao što je vodonik peroksid. Perhlorna kiselina u kombinaciji sa metalima može da formira jedinjenja koja su spontano eksplozivne prirode i mogu reagovati burno sa prisutnim nerazorenim mastima i uljima posle isparenja azotne kiseline tako da se mora posebno biti pažljiv prilikom rada sa ovom kiselom. Isparljivi hloridi i fluoridi (sa As, Se, Sn, Hg) se mogu formirati u toku digestije što utiče na gubitak analita. Sumporna kiselina koja se najčešće koristi u kombinaciji sa azotnom kiselom, ne može se primeniti za određivanje nekih elemenata (Ca, Pb i Sr) koji formiraju slabo rastvorne u vodi sulfatne ili kada isparavanje nekih elemenata može da nastane tokom digestije [74]. Na osnovu svega navedenog može se reći da izbor kiselinske smeše za digestiju isključivo zavisi od vrste matriksa i elemenata koji trebaju biti određeni.

U Tabeli 12 su prikazane prednosti i nedostaci mokre tehnike digestije u pogledu gubitka analita, probleme kontaminacije, vremena i stepena digestije.

Tabela 12. Prednosti i nedostaci metode mokre digestije [75]

Tehnika digestije	Na in gubitka analita	Vreme digestije	Stepen digestije
<i>Otvoren sistem</i>			
Konvencijalno zagrevanje	Isparavanje	Nekoliko sati	Nekompletna
Mikrotalasno zagrevanje	Isparavanje	< 1 h	Nekompletna
UV digestija	Nema	Nekoliko sati	Visoka
<i>Zatvoren sistem</i>			
Konvencijalno zagrevanje	-	Nekoliko sati	Visoka
Mikrotalasno zagrevanje	-	< 1 h	Visoka

Poslednji korak kod određivanja neorganskih komponenti u uzorcima hrane je primena spektrofotometrijskih metoda kao što je atomska apsorpcija (AAS) i atomska emisija (AES) koristeći enjem plamena, induktivno kuplovane plazme ili elektronskog uređaja za atomizaciju [72, 76, 77]. Ove instrumentalne metode se baziraju na specifičnom emitovanom zračenju koga emituju pojedinci atomi i joni ili apsorbovanom zračenju od strane atoma. Spektrofotometrijske metode su od svih analitičkih metoda najspecifičnije i njihova primena može da traje samo par minuta. Njima se više od 70 elemenata uključuju i alkalne, zemnoalkalne, prelazne i teške metale, može odrediti u različitim vrstama uzorka, sa osetljivošću od  $\mu\text{g/g}$  do  $\text{ng/g}$ .

U Tabeli 13 su prikazani neki određeni metali u različitim uzorcima hrane, primenom multielementnih tehnik ICP-OES i ICP-MS.

Tabela 13. Literaturni pregled određivanja pojedinih metala u različitim uzorcima hrane primenom ICP-OES i ICP-MS metoda

<b>Metali</b>	<b>Vrsta hrane</b>	<b>Referenca/Metoda</b>
Al, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, K, Na, Sr, Sn, V, Zn	Sok od pomorandže, ekstrakt kore od narandže	[78]/ICP-OES i ICP-MS
As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg	Morski plodovi	[79]/ICP-OES
Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Cr, Al, Se, Mo	Meso, riba, piletina, žitarice	[80]/ICP-OES
Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Zn, Ag, Al, As, Ba, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, U, V	Mleko	[81]/ICP-OES
Pb	Vino	[82]/ICP-MS
As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, V, Zn	Med	[83]/ICP-MS
B	Lešnici	[84]/ICP-OES
Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Cr, Al, Se, Mo, Ba, Pb, Cd, Sn, As, Ni, Si	Koštunjavovoće	[85]/ICP-MS
Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr, Zn, Si	Koštunjavovoće	[86]/ICP-OES
Cr, Rb, Mn, Zn, Cu, Co, Pb	Crvena vina i sokovi od jabuke	[87]/ICP-MS
Fe, Zn, Mn, Cu, Ca, Mg, K	Zrno pšenice	[88]/ICP-OES
Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Se, Sn, Sr, V, Zn	Paradajz	[89]/ICP-OES i ICP/MS
Al, As, Cd, Co Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, Sr, Zn	Riba	[90]/ICP-OES
Cu, Mn, Ni, Fe, Ag, Ca, Cr, Zn, Mg, Sr, K, Pb, Na, Al	Bistri sokovi od jabuke	[91]/ICP-OES
Ba, Cu	Kafa	[92]/ICP-OES
Se, Pb, Cd, Mn, Co, Zn, Cu, Sr, Mo, V, Mg, Hg, Al, As, Cr, Ni	Različiti uzorci hrane	[93]/ICP-MS
Ba, Pb, Cd, Mn, Cr, Co, Ni, Cu, Mn, Zn, Sr, Fe	Suvovće	[94]/ICP-OES
Na, K, Ca, Mg, P, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Instant supe i zamrznuto povrće	[95]/ICP-OES
Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Se, Zn	Sirevi	[96]/ICP-OES
Ca, Cd, Cu, Co, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Zn	Zaslavivači	[97]/ICP-OES
Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Se, Mo, Cr, Mn	okoladni napici	[98]/ICP-OES
Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Zn, Co, Cr, Na, Ni	Kikiriki	[99]/ICP-OES i ICP/MS
Ca, Zn, Fe, Mg, Cu, Na, K, Se	Hrana za odojad	[100]/ICP-OES i ICP/MS

#### 1.4.7.1 Jezgrasto voće

Jezgrasto voće predstavlja plodove pojedinih biljaka sa tvrdom ljuskom unutar koje se nalazi semenka. Kod ove vrste voće a plod se ne otvara da bi se semenka oslobodila. Za razliku od ostalog voća, odlikuje se veoma niskim procentom vode (3-8%) dok je s drži suve supstance takođe visok. Uz hrušku i tjesteninu ovaj voće ima visoku energetsku vrednost, naročito količina ugljenih hidrata. Pored velike biološke vrednosti jezgarstvo ne sadrži ostatke pesticida, jer je zaštiteno ljuskom.

U ulju jezgrastog voća preovlađuju se simeone sline kiseline, dok je zasićeni sličnim kiselinama tenu u njemu. Međutim jezgrastog voća su prirodno emulgatori, te se u količini uvećano i iskoristljivost je visoka. Jezgrasto voće ima visoku vrednost bioaktivnih proteinova. Zbog svog sastava, tj. ulja, bogatog liposolubilnim vitaminima. Ovi proizvodi sadrže i veću količinu vitamina E, B-kompleksa, i to u nizu slike vitamina B6, i folnu kiselinsku. Tako je treba napomenuti da su jezgrasti plodovi značajni izvor minerala i to pre svega cinka, selen, bakra i magnezija. Jezgrasto voće je znatno hranljivije u sirovom obliku. Razlog tome je što se gotovo 15% korisnih masti koje se prirodno nalaze u ovim proizvodima može izgubiti prilikom njihovog pečenja.

*Badem* (Amygdalus communis L.) sadrži (na 100 g): 18,3 g protein; 54,1 g masti; 4,3 g ugljenih hidrata; 12 g biljnih vlakna; 248 mg kalcijuma, 4 mg gvoždica; 275 mg magnezijuma; 474 mg fosfora; 728 mg kalijuma; 1 mg natrijuma; 3,36 mg cinka; 1,11 mg bakra, 2,53 mg mangana, 4,40 mg seleni; 0,24 mg tiamina; 0,81 mg riboflamina; 3,93 nijacina; 0,35 mg pantotenske kiseline; 0,13 mg vitamina B6; 29 µg folne kiseline; 2,5 mg vitamina A, vitamina E i fitosterola.

*Lešnik* (Corylus avellana) ima 566 kalorija u 100 g. Sadrži: 13,9 g proteina; 54 g masti; 6 g ugljenih hidrata; 10 g biljnih vlakana; 8 g linolne kiseline; 114 mg kalcijuma, 5 mg gvoždica; 163 mg magnezijuma; 290 mg fosfora; 680 mg kalijuma; 2,45 mg cinka; 1,73 mg bakra; 6,18 mg mangana; 4 µg seleni; 6,3 mg vitamina C; 0,64 mg tiamina; 0,11 mg riboflavin; 1,8 mg nijacina; 0,92 mg pantotenske kiseline; 0,56 mg vitamina B6; 113 µg folne kiseline; 10 mg vitamina A.

*Orah* (Juglans regia L.) je veoma hranljiv - 100 g jestivog dela ima 677 kalorija. Sadrži: hranljive materije (4,8 g vode; 14,6 g proteina; 62,7 g masti; 13,5 g ugljenih hidrata; 6,38 g linolne kiseline; 9,8 g linoleinske kiseline; 2,7 g biljnih vlakana), mineralne soli: 72 mg kalcijuma, 2,7 mg gvoždica; 158 mg magnezijuma; 429 mg fosfora; 575 mg kalijuma; 4 mg natrijuma; 3,09 mg cinka; 1,59 mg bakra; 3,41 mg mangana; 4,60 µg seleni) i vitamine (15 mg vitamina C; 0,34 mg tiamina; 0,15 mg riboflavin; 1,09 mg nijacina; 0,57 pantotenske kiseline; 0,54 mg vitamina B6; 98 µg folne kiseline; 0,06 mg karotina, vitamina E i 72 mg fitosterola).

*Brazilski orah* (Bertholletia excelsa) je poreklom iz Brazila (Amazonska džungla). 100 g ima 656 kalorija. Sadrži: 14 g proteina; 66 g masti; 16 g zasićene masti; 23 g mononezasiene masti; 24 g polinezasiene masti; 24 g linolne kiseline; 13 g ugljenih hidrata; 5 g biljnih vlakana. Bogat je mineralima (176 mg kalcijuma; 3 mg gvoždica; 225 mg magnezijuma; 600 mg fosfora; 600 mg kalijuma; 2 mg natrijuma; 4,6 mg cinka; 1,7 mg bakra; 0,77 mg mangana) i vitaminima (0,7 mg vitamina C; 1 mg tiamina; 0,12 mg riboflavin; 1,62 mg nijacina; 0,23 mg pantotenske kiseline; 0,25 mg vitamina B6 i vitamina E).

*Indijski orah* (Anacardium occidentale) vodi poreklo iz severoistočnog Brazila. Jezgrastog ploda ima oblik polumeseca. 100 g ima 574 kalorije. Sadrži: 15 g proteina; 46 g masti; 9 g zasićene masti; 27 g mononezasiene masti; 7 g polinezasiene masti; 8,1 g linolne kiseline; 17 g

ugljenih hidrata; 10 g biljnih vlakana; 114 mg kalijuma; 5 mg gvož a; 163 mg magnezijuma; 290 mg fosfora; 680 mg kalijuma; 2,5 mg cinka; 1,7 mg bakra; 6,2 mg mangana; 4 mg selena; 6,3 mg vitamina C; 0,64 mg tiamina; 0,11 mg riboflavina; 1,8 mg nijacina; 0,92 mg pantotenske kiseline; 0,56 mg vitamina B6; 113 mg folne kiseline, vitamina A, E i 96 mg fitosterola.

*Kikiriki* (Arachis hypogaea) u 100 g ima 567 kalorija a sadrži 49,2% masti; 25,8% proteina i 16,1% ugljenih hidrata. Sadrži dosta raznovrsnih minerala: 1,1 mg bakra; 1,9 mg mangana; 168 mg magnezijuma; 705 mg kalijuma; 3,3 mg cinka; 4,6 mg gvož a; 7,2 mg selena; 92 mg kalcijuma. Od vitamina kikiriki sadrži 0,64 mg tiamina; 0,135 mg riboflavina; 12 mg nijacina, 0,35 mg vitamina B6; 144 mg folne kiseline i 8,3 mg vitamina E.

#### 1.4.7.2 Žitarice

Žitarice su glavni snabdeva i ugljenim hidratima u ljudskoj ishrani (većinom u obliku skroba koga u zrnu ima oko 60-79%) i proteinima (između 7-16%). Nezasićene masne kiseline se nalaze u hranljivom tkivu, a ulje žitarica ima preko 7% zrna. Minerali se prvenstveno nalaze u spoljnem sloju omota i zrna (kalijum, kalcijum, magnezijum, gvožde, cink, silicijum). Vitamini se nalaze uglavnom u spoljnem omota u zrna (najvažniji su vitmini B grupe: B1, B2, B3, B5, B9 i vitamin E). Spoljni omota daje preko 12% dijetalnih vlakana zrna. Žitarice u ishrani bi trebalo da imaju oko 30% dnevног energetskog unosa.

##### Delovi i opšti sastav zrna žitarica

- Perikarp (mekinja ili spoljna opna zrna)-sadrži kao glavne sastojke: celulozu i fitinsku kiselinu koja značajno umanjuje apsorpciju minerala cinka, kalcijuma, magnezijuma i gvožde; pri preradi se odbacuje jer nema značaj u ishrani;
- Aleuronski sloj-vrlo tanak; nalazi se odmah ispod perikarpa, obmotava endosperm, daje boju zrnima. Sadrži: biološki vredne proteine, nikotinsku kiselinu, razne mineralne soli i većinu vitamina grupe B;
- Endosperm-osnovni sloj koji ima 85% zrna. Središnji deo endosperma je izvor skroba i proteinova. Spoljašnji deo endosperma još sadrži gvožde i nikotinsku kiselinu;
- Klica-ima 3% zrna, sadrži ulje bogato esencijalnim aminokiselinama u kojem su koncentrisani rastvorljivi vitmani: B, E, D i K, gvožde i nikotinska kiselina, kao i drugi minerali u veoma malim količinama;
- Skutelum-sloj koji umotava klicu i odvaja je od endosperma. Sadrži više od 60% vitamina tiamina od celokupne količine prisutnog tiamina u zrnu.

##### Pojedine vrste žitarica

*Pšenica* je danas u svetu najvažnija od svih žitarica, jer se najviše koristi za proizvodnju hleba, peciva i ostalih proizvoda od brašna. Ono što pšenicu stavlja u prvi plan jesu njena biološka i pekarska svojstva. Iako su neke od žitarica po svojoj nutritivnoj vrednosti ispred pšenice, ona prevladava upravo zbog svojih prednosti koje pokazuje prilikom mešanja hleba i peciva.

Celo zrno pšenice sadrži 70,7% ugljenih hidrata; 10,2% belančevina; oko 2% masti; 1,7% minerala; vitamine B, E, D, K i provitamin A, koji se od svih žitarica nalazi jedino u pšenici. Od minerala najviše sadrži fosfor (50%) i kalijum (20-30%), zatim gvožde, magnezijum i kalcijum. Posebnu vrednost imaju pšenični skrob i pšenične klice.

Pšenica ja a imunitet, pospešuje rast i razvoj organizma, smanjuje iscrpljenost i neraspoloženje, reguliše probavu, le i osip, upalu kože, dobra je i protiv sranih oboljenja i preranog starenja.

Raž je žitarica koja je vekovima bila konkurent pšenici u proizvodnji hleba, iako nije ni približno rasprostranjena i korišćena kao pšenica. Međutim, raž je po svojim botaničkim i pekarskim karakteristikama najslanija pšenica (zrno, klas, stabljika, belan evine koje sadrže gluten). Raž je pored pšenice i kukuruza, jedina žitarica koja nema omotač oko zrna (pleva) i može se koristiti u ishrani u prirodnom obliku, bez dodatne tehnološke obrade.

Sadržaj ugljenih hidrata u raži je 74%; belan evina 9,3%; masti 1,8%; minerala 1,8% (među kojima najviše sadrži kalijum, fosfor, magnezijum, gvožđe, kalcijum, natrijum, sumpor i mangan), vitamine, posebno iz grupe B vitamina. Raž je nešto kalorijenija od pšenice - 100 g raži sadrži 349 kalorija.

Raž se koristi protiv šeerne bolesti, anemije, bazetove bolesti, tegoba u klimaksu, migrene, zatvora, za poboljšanje stanja krvi i nervnog sistema.

Je am je po biološkim vrednostima zdraviji od pšenice, jer ima izuzetna lekovita svojstva. Savremena nauka je utvrdila da je am ima ak 35% nezasićenih masnih kiselina, koje smanjuju cholesterol u krvi. Prirodni je meni slad izvanredan je zasla iva i odlična zamena za šeher. Je am se takođe dosta koristi u proizvodnji piva.

Sadržaj ugljenih hidrata u je mu je veći nego kod pšenice i iznosi 73,4%; belan evina 11%; masti 1,8% a veoma je bogat i mineralima (kalijum, fosfor, magnezijum, kalcijum, natrijum, sumpor, gvožđe, bakar, cink, jod) i vitaminima, posebno vitamin B12 i vitamin E, kojih ima više nego u ostalim žitaricama, kao i vitamin A i D.

Je am smanjuje cholesterol, jača organizam, deluje protiv starenja, avitaminoze, gojaznosti, neurastenije, bolesti krvnih sudova, grčeva u nogama, reume, išijasa, bolesti želuca i grla.

Ovas i ako spada u jednu od najlekovitijih žitarica, više služi za što nu nego za ljudsku ishranu. Poslednjih godina u ljudskoj ishrani su popularne zobene pahuljice, koje su izuzetno hranljive, jer su u njima sačuvani svi prirodni sastojci zrna. U ovoj žitarici je prisutan visok sadržaj minerala, posebno kalcijuma, fosfora, joda, kalijuma, gvožđa, cinka, bakra, mangana, magnezijuma, natrijuma, sumpora, fluora; vitamina grupe B, K, H, E i karotina (provitamin A) i aminokiselina. Poznat je po visokom sadržaju lako svarljivih belan evina- ak 95% od ukupnih belan evina i preko 20 esencijalnih aminokiselina, iji je sastav daleko najpovoljniji u odnosu na ostale žitarice. Takođe sadrži 7% masti bez cholesterol-a.

Ovas prošava krv, leči šehernu bolest, žuču, jetru, leukemiju, gangrenu, bubrege, mokraću, mehur i kanale, razne upale, slezinu, jajnike, matericu. Kašom od zobenih pahuljica uspešno se leče i karijes, a i aj od zobi le i želuda ne probleme i probleme unutrašnjih organa.

Kukuruz je jedina biljka kojoj do danas nije pronađen prirodni, divlji oblik. Nekada je bio jedna od osnovnih žitarica u ljudskoj ishrani, da bi se danas uglavnom koristio za što nu hranu. U ljudskoj ishrani kukuruz se koristi kao instant brašno, pahuljice, klice, zrno u limenkama. Zrno kukuruza je bogato ugljenim hidratima, skrobom, šeherom i belan evinama. Ulje od kukuruza je bogato linolenskom kiselinom, fitosterinom i vitaminom E. Od kukuruznog skroba dobija se grožđani šeher. Kukuruzna svila sadrži hlorofil, fosfornu kiselinu, vitamin K, tanin, eteri na ulja,

še er, enzime, salicilnu kiselinu, kalijumovu i kalcijumovu soli i veoma je cenjena u narodnoj medicini.

Kukuruz snižava krvni pritisak, pomaže kod oboljenja krvnih sudova, za le enje dijabetisa, sr anih oboljenja, odstranjuje kamenac iz bubrega, le i bolesti mokra nih puteva, kašalj, rahitis, bolove u ki mi, arteriosklerozu, katarakt plu a, razne upale.

*Heljda* se i pored izuzetno visoke hranljivosti vrlo malo koristi u ishrani. Bogata je ugljenim hidratima 72,9%; belan evinama 11,7%; bilnjim uljem 2,4%; mineralima, posebno kalijumom, fosforom i kalcijumom, a ima i gvož a, natrijuma i magnezijuma. Spada u lako svarljive namirnice i pored visoke energetske sadržine. Tako e ima skoro sve vitamine B grupe i zna ajne koli ine nijacina. Veoma je kalori na - 100 g jestivog dela zrna sadrži 335 kalorija.

Heljda ja a otpornost kapilara i uti e na snižavanje visokog krvnog pritiska, spre ava krvarenje, pomaže kod bolesti želuca, parazitskih oboljenja, bolesti kože i proliva.

#### 1.4.7.3 Brašno

Brašno je najvažniji sastojak u prakti no svim pekarskim proizvodima. Brašno je ono što odre uje reološke karakteristike testa. Razli ite vrste pekarskih proizvoda zahtevaju brašna razli itih karakteristika. Na primer, brašno koje je dobro za pekarsku proizvodnju ne mora biti zadovoljavaju e za proizvodnju kola a. Komercijalna vrednost pšeni nog brašna zavisi od ve eg broja faktora. Kvantitet i kvalitet proteina, sadržaj pepela (minerala), boja, sadržaj vlage, i nivo enzimske aktivnosti su najvažniji faktori. Brašna za proizvodnju kvascem zakišljenih proizvoda (hleba, kifli, itd) imaju relativno visok sadržaj proteina (>10,5%), visoku apsorpciju vode, i umerene nivoe enzimske aktivnosti. Brašno bi trebalo da daje testo koje je dobro izbalansirano po elasti nosti i viskoznim svojstvima. Za proizvodnju hemijski zakišljenih proizvoda (kola a, torti, krekeri, itd.) više se koristi pšeni no brašno sa malo minerala, relativno niskog proteinskog sadržaja (8-10%), i sa malim sadržajem skroba.

Sadržaj osnovnih sastojaka brašna: skroba, proteina, masti, minerala prvenstveno zavisi od vrste žitarica od kojih se dobija. Skrob je najzastupljenija komponenta brašna. Nivo mu varira, ali u proseku ini 70% osnove suve materije. Kod svih cerealija, višak biljne energije je uskladišten u skrobu. Skrob se javlja samo u endospermu semena u vidu mikroskopskih estica ili granula. Sadržaj proteina žitarica varira u prili no širokom opsegu (6 do 18%), u zavisnosti od okruženja i od genetskih faktora. Generalno, kako se pove ava sadržaj proteina, sadržaj skroba opada. Proteini zrna žitarica se mogu klasifikovati u etiri grupe, na osnovu njihove ekstrakcije i rastvorljivosti u seriji rastvara a: vodi (albumini), vodenom rastvoru soli (globulini), mešavini alkohol-voda (prolamini), i rastvorenim kiselinama ili alkalijama (glutelini). Sve žitarice sadrže malu koli inu masti ili lipidnih materija (oko 2%). Lipidi nisu uniformno distribuirani kroz seme. Klica sadrži najve i nivo lipida (oko 28%), a endosperm najniži (oko 1,5%). Lipidi se javljaju u endospermu u malim lipidnim telima. Lipidi brašna su komplikovana mešavina jedinjenja. Od 1,5% lipida prona enih u brašnu jedna polovina su lipidi sa nepolarizovanim membranama (triacil gliceridi, masne kiseline, steroli i njegovi estri), a druga polovina su lipidi ije su membrane veoma polarizovane (fosfolipidi i glikozidi). Lipidi sa polarizovanom membranom imaju jake površinske karakteristike, i igraju zna ajnu ulogu u proizvodnji pekarskih proizvoda. Tipi no zrno žitarice ima sadržaj minerala koji se kre e u opsegu od 1,5 do 2%. Me utim, minerali u zrnu žitarica nisu uniformno raspore eni. Endosperm ima relativno mali sadržaj

minerala (0,3%), dok mekinje imaju veći sadržaj minerala i mogu ih sadržati do 7%. Na osnovu sadržaja minerala u brašnu, može se videti koliko je prisustvo mekinja u ovom proizovdu a pošto je utvrđivanje prisustva minerala relativno jednostavno lako se može i ponoviti. U zavisnosti od "tvrdosti" žita, postoje meka (za hleb pre svega) i tvrda brašna (za kola).

U zavisnosti od veličine rupa na situ, brašna su više bela ili tamnija. Belje brašno je od jezgra žita tj. u njemu nema spoljne košuljice od zrna. To su brašna Tip-400 ili Tip-500. Ova brašna nemaju vitamine i minerale kao crna brašna Tip-800 ili Tip-1100. Zato je crni hleb zdraviji. Tip brašna se ustanavljava spaljivanjem istog u kalorimetru i procentom pepela koji ostaje pri sagorevanju. Tip-400 ima npr 0,4 % pepela a Tip-500 0,5 % pepela.

#### 1.4.7.4 Hleb

Na tržištu su zastupljene različite vrste hleba. Sve vrste hleba imaju dva zajednička sastojka: žitarice i vodu, a u zavisnosti od načina prerade žitarica iz kojih se dobija brašno za proizvodnju hleba, mogu se izdvojiti dve osnovne vrste hleba: integralni (popularno zvani „crni“) i rafinirani (popularno zvani „beli“) hleb. Integralni hleb se proizvodi od brašna dobijenog iz celih, neprerađenih žitarica, dok su rafinirani proizvodi od belog brašna koje se dobija iz prerađenih žitarica. Cela, neprerađena žitarica predstavlja žitaricu, sa svim svojim delovima, što uključuje ljusku (spoljni sloj), endosperm (srednji sloj) i klic (unutrašnji deo). Ljuska sadrži prehrabrena vlakna, vitamine B grupe, minerale, proteine i fitohemikalije; endosperm je bogat ugljenim hidratima, proteinima, sadrži i male količine B vitamina, a klica je bogata vitaminom E, vitaminima B grupe, mineralima u tragovima i nekim fitohemikalijama. Za proizvodnju beloga brašna, žitaricama se uklanja ljuska i klica, što, s obzirom da su upravo to nutritivno najvredniji sastojci žitarice, znači da je i beli hleb nutritivno manje vredan od integralnog.

Hleb od celog zrna sadrži, pored skroba i rastvorljivih šećera, delove omotača zrna žita. To su celuloza, hemiceluloza i lignin (nesvarljivi ugljenihidrati), poznatiji pod nazivom – vlaknaste materije.

Vlakna nisu snabdeva organizmu energijom, ali poseduju određene pozitivne nutritivne efekte:

- povećavaju intenzitet žvakanja (pljuva ka pomaže razgradnju hrane),
- prodlagaju osećaj sitosti,
- imaju smirujuće efekat na želuda i kiselinu,
- povećavaju aktivnost creva,
- utiču na funkciju digestivnih organa,
- absorbiraju toksične materije u crevima,
- povećavaju aktivnost rada creva,
- skraćuju vreme prolaska hrane kroz digestivni sistem.

Brašno sa višim udelom vlakana takođe sadrži i viši udeo vrednih komponenata spoljašnjih slojeva žita, kao što su:

- proteini zrna više vrednosti (sa vitalnim aminokiselinama),
- veći udeo vitamina (posebno kompleks vitamina B),
- veći udeo mineralnih materija.

Proces pripreme samog hleba jednak je bilo da se radi o integralnom ili belom. Mlevenim žitaricama dodaje se voda, u većini slučaja i pekarski kvasac, formira se testo koje se potom peče. Dodatkom soli, jaja, semenki, meda, luka, cimeta i sličnih sastojaka, „manipuiliše“ se sa ukusom i teksturom hleba i razvijaju se nove vrste.

Tradicionalno se hleb još uvek najviše priprema od pšenice nog brašna, ali hleb od raži, ovase i ječma sve se još i javlja u ponudi. Princip pripreme je uglavnom isti, razlika je samo u vrsti žitarica iz kojih se dobija brašno.

#### 1.4.7.5 Voćni sokovi

Voćni sok predstavlja proizvod koji se dobija mehaničkim prerađenjem jedne ili više vrsta tehnološki zrelog, svežeg, ohlađenog ili zamrznutog voća, koje nije fermentisalo ali može da fermentiše, i njegov ukus, boja i aroma moraju da budu karakteristični za vrstu voća od koga je voćni sok proizveden. Prema sadržaju vode voćni sokovi se mogu podeliti na koncentrisani voćni sok, voćni sok u prahu i voćni nektar. Koncentrisani voćni sok je vrsta voćnog soka koji se dobija tako što mu se ponovo dodaje ona količina vode koja je izdvojena prilikom njegovog koncentrisanja (rekonstituisanje). Voćni sok u prahu je proizvod koji se dobija od voćnog soka jedne ili više vrsta voća, fizikalnim izdvajanjem gotovo celokupnog sadržaja vode, konzervisan isključivo fizikalnim postupcima. Voćni nektar je proizvod koji se dobija dodavanjem vode i šećera ili meda u voćni sok, koncentrisan voćni sok, voćni sok u prahu ili u mešavinu ovih proizvoda, koji nije fermentisao ali može da fermentiše. Pri proizvodnji voćnih nektara bez šećera ili voćnih nektara sa niskom energetskom vrednošću, šećer mogu u potpunosti ili delimično da se zamene zaslačivačima [101].

Voćni sok, koncentrisani voćni sok i voćni nektar, u zavisnosti od sadržaja nerastvorljivih sastojaka voća (suspenzoida), može se proizvoditi kao bistri, mutni ili kašasti. Bistri voćni sok se dobija bistrenjem i filtriranjem voćnog soka koji sadrži sok iz voćnih elija sa rastvorljivim sastojcima. Mutni voćni sok se dobija delimičnim bistrenjem voćnog soka, koji pored soka iz voćnih elija sa rastvorljivim sastojcima sadrži fino dispergovane koloidne estice. I na kraju kašasti voćni sok pored soka iz voćnih elija sa rastvorljivim sastojcima sadrži nerastvorljive sastojke voća koji mogu delimično da se talože.

Voćni sokovi su važni u ljudskoj ishrani jer sadrže različite hranljive sastojke, pre svega vitamine, minerale i ugljene hidrate. U sokovima se proteini, kalcijum, gvožđe, vitamin A, vitamin B1, riboflavin (vitamin B2) i askrobinska kiseleina (vitamin C) nalaze u većim koncentracijama nego u ostalim hranljivim namirnicama. Postoje eksperimentalni dokazi koji su potvrđivali da je prirodna askrobinska kiselina koja se nalazi u voćnim sokovima zdravila od sintetisane. To se objašnjava prisustvom određenih jedinjenja flavonoida u voćnom soku koji utiču na cirkulaciju krvi, imajući se povećavačnu propustljivost i elastičnost kapilara. Ova pojava je poznata kao aktivnost vitamina P, ali i flavonoidi koji pokazuju ove osobine se ne ubrajaju u grupu vitamina, zato što njihov nedostatak u organizmu ne dovodi do pojave bolesti. Postoje dokazi da ovi flavonoidi imaju zaštitnu ulogu kod nekih respiratornih bolesti, ali treba reći da se oni vrlo brzo raspadaju u telu tako da je vrlo teško da se održi njihova efektivna koncentracija u krvi. Pored visokog sadržaja natrijuma, u voćnim sokovima se nalaze i druge supstance koje imaju korisnu farmakološku aktivnost. Tako npr. citrusno voće ima ulogu u inhibiciji pojedinih vrsta raka. Sorbitol, koji se nalazi u mnogim voćnim sokovima ima laksativni efekat. Tako se

u ovim proizvodima nalaze i mnoge komponente koje poseduju antioksidativnu aktivnost. To su askorbinska kiselina, vitamin E, beta karoten i flavonoidi [102].

#### 1.4.7.6 Vo na vina

Pod vo nim vinom se podrazumeva proizvod dobijen alkoholnim vrenjem vo nog soka tj. vo ne šire (izmuljano vo e), po postupku koji se primenjuje u tehnologiji za dobijanje vina od groža. Mere nege i uvanja vo nih vina u osnovi su iste kao one koje se primenjuju za vina od groža. Vina od vo a mogu se pripremati raznim postupcima u odnosu na koje se svrstavaju u: stona (suva), desertna, gazirana, šampanjska i specijalna.

Hemski sastav vo ne šire nije stalan i pojedini sastojci znatno variraju u zavisnosti od sorte, klimatskih uslova, primenjene agrotehnike, starosti zasada, vremena berbe i skladištenja plodova itd. Koli ina še era i kiselina u vo noj širi od velikog je značaj za kvalitet vo nog vina. Od še era najviše su zastupljeni glukoza i fruktoza, a ima i nešto saharoze. Od kiselina, u najvećoj meri su prisutne jabuka i limunska. Od koli ina še era zavisi koli ina alkohola koju je dobijeno vino imati, dok je sadržaj kiselina značajan za formiranje ukusa, a zajedno sa alkoholom doprinosi boljem uvanju vina. Vo na vina sa više alkohola i kiselina lakše se uvanju. Tako je značajan visok sadržaj mineralnih materija, naročito organskog fosfora, koji je karakterističan za vo ne šire i vina. Vo ne šire i vina sadrže veoma važne vitamine (A i C kao i vitamine B grupe).

Vo na vina se prave od jabuka, krušaka, bresaka, višanja, kupina, maline, jagode, ribizli, borovnica, šipka i drugog vo a pojedinačno ili kao koktel vino od više vo nih vrsta. Za razliku od groža koje skoro uvek ima optimalnu količinu še era za pripremanje vina, razne vrste vo a imaju veoma širok raspon sadržaja še era i kiselina.

Vino je vrlo kompleksno piće koje u svom sastavu ima preko 600 hemskih jedinjenja koja su odnedavno detektovana i kvantifikovana. Većina od ovih komponenata u vinu se nalazi u vrlo malim količinama, ali imaju važnu ulogu u ukusu, mirisu i aromi vina.

Poznato je da alkohol unet u organizam brzo difunduje kroz zidove želuca i creva, dolazi do jetre i ulazi u krvotok. Iz krvi alkohol ispisuje se za 12 sati ili iz tkiva za 16 sati. Ako se vino konzumira zajedno sa hranom količina alkohola je manja nego kad se vino konzumira samo. Alkohol iz организма izbacuje se putem pluća (0,5 - 1% od unete količine ako je ovek miruje i 5 - 10% ako je aktivan), preko bubrega (20 - 30%) i biohemskih transformacija u jetri. Male količine alkohola unete u organizam ovakav aktiviraju pljuva ne žlezde i želuda ne sokove pa deluje kao aperitiv. Većina alkohola uneta u organizam negativno deluje na zid želuca, povećavaju krvni pritisak, izazivaju ubrzani rad srca i povećanje periferne temperature. Tako je pokazano da alkohol u vinu ima daleko manju toksičnost nego ista količina alkohola u jakim alkoholnim pićima. Tako je nastala hipoteza da vino sadrži supstance koje ublažavaju dejstvo alkohola. To svojstvo pripisano je fenolnim materijama u vinu. Sigurno je da, kad govorimo o zdravstvenom aspektu vina, onda mislimo na umerenu konzumaciju.

Vino u svom sastavu sadrži mineralne materije, kiseline, vitamin A, a naročito su važne fenolne supstance (proantocijanidi) kojima se pripisuju izuzetno pozitivno dejstvo. Od 1991. godine govoriti se o tzv. francuskom paradoksu u njegovoj osnovi leži u toj što Francuzi konzumiraju puno masno i životinjskog porekla a doživljavaju u mnogo manjem broju infarkt miokarda u odnosu na Amerikance i narode Zapadne Evrope.

Supstance koje poseduju antioksidativno dejstvo kao što su proantocijanidi, kvercetin i reservartol (fenolna jedinjenja) imaju ulogu koronarnih zaštitnika. Ova jedinjenja spre avaju oksidaciju LDL a sa druge strane uti u na porast lipoproteina visoke gustine - HDL u krvi koji se smatraju pozitivnim regulatorima masnoće u krvi. Vino ima važnu ulogu u spre avanju pojave arteroskleroze, infarkta miokarda, deluje antiinflamatorno i antivirusno, pri čemu njegovi fiziološki aktivni sastojci predstavljaju značajne hvatače slobodnih radikala koji su odgovorni za štetne procese starenja organizma.

U vinu je način oko 60 mg/l salicilne kiseline što predstavlja duplu količinu od dnevne doze aspirina koju lekari preporučuju kao preventivu za oboljenja kardiovaskularne prirode. Osim ovih osobina vino ima izražena antibakterična svojstva koja su poznata od davnina. Bakterično dejstvo vina pripisivano je mnogim jedinjenjima - kiselinama, alkoholu, fenolnim materijama. Vino sprečava pojavu gripa, bronhitisa i olakšava stanje kod astmatičara a takođe pomaže kod prehlade, regulisanja pritiska, snažan je diuretik, dobro je za varenje i za anje organizma, za zarastanje rana.

#### 1.4.7.7 Med

Med je slatka, viskozna supstanca, koju proizvode pčele iz nektara cvetova različitih biljaka. Zbog svoje slatke boje i ukusa često se koristi kao zamena za šećer. Spada u visokoenergetsku hranu, poseduje vredne hranljive sastojke i deluje profilaktički. Hemijski sastav meda varira u zavisnosti od biljnog i geografskog porekla. Glavni sastojci meda su šećeri koji čine preko 80% njegove mase. Najznačajniji i najčešći šećeri su glukoza, fruktoza i u manjoj meri saharoza, dok na maltozu i druge disaharide otpada samo oko 7%, a na više šećere oko 1,5%. Vode u medu ima do jedne petine, a kiselina oko 0,75%, od kojih su najčešće glukonska, mravlja, sir etna, jabuka, limunska, ilibarna i mlečna. U sastav meda ulaze i metali, kao što su kalijum, kalcijum, natrijum, magnezijum, gvožđe, cink, bakar, mangan, aluminijum, silicijum i drugi. Oni su zastupljeni u vrlo malim količinama, ali svaki od njih ima znacajni uticaj za poneke od vitalnih funkcija u ljudskom organizmu. Poznato je da se od 24 mikroelemenata koji su u krvi zastupljeni njih 22 nalaze u pčelinjim proizvodima, pa su zbog toga od izuzetnog značaja u ishrani čoveka. Med sadrži i male ali merljive količine vitamina, od kojih su pronađeni tiamin, riboflavin, askorbinska kiselina, pirodiksin, pantotenska i nikotinska kiselina u malim i veoma varirajućim količinama, što se pripisuje cvetnim izvorima i polenu sadržanom u medu. Ispitivanja su pokazala da su tamni medovi bogatiji mineralima, dok su svetli medovi bogatiji vitaminima.

Med se prema broju biljaka od kojih se dobija može podeliti na monoflorni i poliflorni. *Monoflorni* se dobija od jedne vrste biljaka, kao što je bagremov, lipov, kestenov, lavandin med itd. za razliku od *poliflornog* koji se dobija sakupljanjem nektara sa više različitih biljaka, kao što je šumski med ili livadski.

Boja meda može biti različita i varira od bezbojne do tamno smeđe, dok mu konzistencija može biti tečna, gusta ili kristalisana. UKUS i miris meda su različiti, tj. takođe zavise od biljne vrste koja prevladava. Bagremov med je belo zelenkaste boje, ima blag i prijatan ukus i vrlo sporo kristalizuje. Lipov med je bistar, gotovo proziran, ugodnog mirisa i vrlo slatkog ukusa. Med od lavande potiče iz Dalmacije i zlatno žute je boje. Kestenov med je crveno-tamne boje i gorkog ukusa, ali je vrlo cenjen zbog prisustva polena i mineralnih materija u dosta velikim količinama. Livadski med, koji je uglavnom crvenkaste boje, potiče od raznih livadskih trava i to

naj eš e detelina i u prodaji je pored bagremovog najzastupljeniji. Šumski med je tamne boje i vrlo oporog ukusa ali je zbog visokog sadržaja mineralnih materija tako e vrlo cenjen.

Skoro sve vrste meda pokazuju antibakterijsku aktivnost, što je dokazano dejstvom meda na otvorenim inficiranim ranama [103]. Uo eno je da je jedan od glavnih razloga lekovitog svojstva meda njegova higroskopnost. On sa rane apsorbuje vlagu a sa njom i bakterije iz tkiva. Osim svoje higroskopnosti, med generiše i malu koli inu vodonik peroksida, koji je blagi prirodni antiseptik. Utvr eno je da se antibakterijsko svojstvo odre enih vrsta monoflornog meda ne može objasniti samo na osnovu ovih osobina. Takav primer je manuka med, koji poti e iz nektara manuka žbuna (*Leptospermum scoparium*), koji raste u divljini Novog Zelanda. Manuka med uništava mnoge mikroorganizme kao što su *Stafylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Escherchia coli*. Manuka med je bio cilj mnogih istraživanja zbog svojih izuzetnih osobina.

## **2 EKSPERIMENTALNI DEO**

## 2.1 Program eksperimentalnog rada

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imala su za cilj optimizaciju, validaciju i primenu optičke emisione spektrometrije sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-OES) za određivanje sadržaja metala u različitim prehrabbenim namirnicama, kroz sledeće aktivnosti:

- ispitivanje tzv. *robustnosti plazme* pri različitim vrednostima radiofrekventne snage generatora kao jednog od parametara instrumenta (ostali parametri konstantni) u cilju nalaženja optimalnih parametara instrumenta a pri kojima je najmanja devijacija analitičkog signala prouzrokovana matriksom uzorka. Ispitivanje se sastojalo od pravljenja odnosa relativnog intenziteta emisionog signala za Mg(II) i Mg(I) (jonska i atomska linija Mg). Za optimalnu vrednost RF snage bira se ona pri kojoj je odnos intenziteta emisionih linija najveći;
- konstruisanje *kalibracione prave* pri odabranim parametrima instrumenta korištenjem rastvora multistandarda;
- ispitivanje *uticaja matriksa* na osjetljivost i selektivnost metode poređenjem odnosa nagiba dve kalibracione prave za svaki element na svakoj zadatoj talasnoj dužini i za svaku vrstu uzorka. Jedna kalibraciona prava dobijena je iz multistandarda a druga tzv. „spajkovanjem” rastvora standarda rastvorom uzorka. Talasna dužina pri kojoj se ti nagibi najmanje razlikuju (odnos ~1,00) je talasna dužina sa najmanje uticaja matriksa. Nakon tog postupka a pri određivanju sadržaja metala vrši se manuelna tzv. „background korekcija” (najveći odnos signal/pozadina – „signal to background ratio”);
- *validacija* metode kroz sledeće parametre: talasna dužina analitičke emisione linije ( $\lambda$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), relativna standardna devijacija (RSD) kao repetabilnost merenja rastvora za kalibraciju;
- ispitivanje *takosti i preciznosti* metode korištenjem rastvora multistandarda određene koncentracije i poređenjem sa deklarisanim koncentracijama;
- *primena razvijenih metoda* na različitim realnim uzorcima, odnosno određivanje sadržaja metala u uzorcima jezgrastog voća (brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah i pista i dr.); u uzorcima žitarica, brašna i hleba (pšenica, ovas, raž, ječam, kukuruz i heljda); u uzorcima, domaćim i komercijalnim, voćnim sokovima (višnja, kupina, crno grožđe, borovnica, jabuka, breskva, kajsija, jagoda i multivitamin) i voćnim vina (kupina, višnja, borovnica i malina); u uzorcima meda, domaćim i komercijalnim (livadski, bagremov, šumski, cvetni, manuka, biomed 6, planinski).
- statistička obrada dobijenih rezultata u cilju izvođenja korelacije između sadržaja i vrste uzorka. Dobijeni rezultati su obrađivani primenom statističkih testova ANOVA, post-hoc Tukey HSD testa i t-testa. Primenjeni statistički testovi su imali za cilj da utvrde postojanje statističkih razlike ili ne u sadržaju detektovanih elemenata kako po vrstama uzorka u svakoj od grupa ispitivanih namirница, tako i u okviru svakog tipa uzorka a koji se razlikuju ili po lokalitetu ili po proizvodu a u odnosu na uzorak nabavljan.

## 2.2 Aparati

- ICP-Opti ki emisioni spektrometar serije iCAP 6000, Thermo scientific, Cambridge, United Kingdom;
- Pe za žarenje - VIMS ELECTRIC Loznica;
- Analiti ka vaga - Shimadzu AX20;
- Dejonizator - TKA MicroMed (Wasseraufbereitungssysteme GmbH);
- Automatske varijabilne pipete.

### 2.2.1 Karakteristike ICP spektrometra serije iCAP 6000

- *Opti ki sistem*
  - ešteletna rešetka; prizme; sferna ogledala za odli nu opti ku rezoluciju
  - sistem je konstantno u atmosferi argona ili azota
  - opseg talasne dužine od 166,250 nm (što omogu ava odre ivanje Al na 167,120 nm što je i njegova najosetljivija linija) do 847,000 nm (što omogu ava odre ivanje K na 766,490 nm i Na na 818,326 nm);
- *Detektor*
  - CID detektor sa obezbe enim hla enjem kamere na  $-45^{\circ}\text{C}$ ;
- *Posmatranje plazme*
  - aksijalno za primene koje zahtevaju niže LOD-ove ili radijalno u cilju minimiziranja efekta matriksa;
- *Izvor plazme*
  - induktivno kuplovana plazma obezbe ena upotrebom *RF* generatora sa iskoriš enjem snage  $>78\%$ ; frekfencije 27,12 MHz;
- *Unošenje uzorka*
  - stakleni koncentri ni nebulajzer kao standardna oprema; opciono: ultrasoni ni, HF otporan; sa V-urezom
  - staklena komora za raspršivanje kao standardna oprema; opciono: staklena sa pregradama; HF otporna;
- *Pumpa*
  - brzina pumpe u opsegu od 0-125 rpm. Standby mode spre ava ošte enje pumpe kada se plazma ugasi;
- *Plazmeni plamenik*
  - kvarcne cevi razli itog pre nika; HF otporne;
- *Kontrola gasa za raspršivanje*
  - protok gasa za raspršivanje reguliše se ru no u intervalu od 0 do 0,4 MPa;
- *Operativni sistem*
  - Microsoft Windows<sup>TM</sup> 2000 ili XP;
- *Softver*
  - iTEVA operativni softver za seriju iCAP 6000 omogu uje kontrolu svih funkcija instrumenta.

## 2.3 Reagensi

- $\text{HNO}_3$ , 65%, p.a., Merck, Darmstadt, Germany;
- Rastvor  $\text{MgCl}_2$ , 5 mg/l, p.a., Merck, Darmstadt, Germany;
- Multistandard-Ultra Scientific Analytical Solutions, USA (koncentracije  $20,00 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$  za Al, Sb, As, Ba, Be, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, Se, Na, Sr, Tl, Sn, V, Zn;  $100,0 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$  za P, K i Si i  $5,000 \pm 0,025 \mu\text{g/ml}$  za Ag). Sadržaj elemenata je verifikovan u skladu sa ULTRA's ISO 9001 registrovanim sistemom pore enjem sa standardima za kalibraciju nezavisno pripremljenim koriš enjem NIST SRM-ova ("Certified Reference Material from the National Institute of Standards and Technology") a primenom ICP-MS-a. Matriks multistandarda je 2%  $\text{HNO}_3$  sa tragovima vinske kiseline u dejonizovanoj vodi ( $\mu=0,055 \mu\text{S/cm}$ ) niske vrednosti TOC-a (ukupni organski ugljenik)  $<50 \text{ ppb}$ ;
- Argon 5,0 ( isto e 99,999%);
- $\text{HCl}$ , teh. (1:1), Zorka, Šabac;
- Dejonizovana voda ( $\mu=0,05 \mu\text{S/cm}$ ).

Svo posu e je prvo isprano vodom, zatim rastvorom tehn ke  $\text{HCl}$  (1:1) i na kraju dejonizovanom vodom. Pripremljeni uzorci su uvani u PVC posudama.

## 2.4 Priprema uzorka za analizu

### 2.4.1 Jezgrasto vo e

Sadržaj metala je odre ivan u slede im uzorcima jezgrastog vo a:

1. Brazilski orah,
2. Indijski orah,
3. Kikiriki,
4. Badem,
5. Lešnik,
6. Orasi,
7. Pista i.

Uzorci jezgrastog vo a, su prvo bili potopljeni na 3 minuta u 50 ml dejonizovane vode u cilju uklanjanja eventualno prisutnih soli. Nakon toga su uzorci sušeni u sušnici na temperaturi od  $100 \pm 5 ^\circ\text{C}$ . Potom su homogenizovani i samleveni u odgovaraju em mikseru u cilju dobijanja estica maksimalne veli ine od 30 mm. Izmerena je oko 3 g sa ta noš u na etiri decimalne svakog ispitivanog uzorka, i preba eno u porcelanski lon i za žarenje. Uzorci su potom žareni u pe i za žarenje na temperaturi od 450-500 °C u vremenu od 48h. U cilju potpune mineralizacije uzorka dodavana je 65%  $\text{HNO}_3$  a zatim su uzorci uparavani do suva i nakon toga vra eni u pe za žarenje do nastanka belog pepela. Dobijeni pepeo je rastvaran u 65%  $\text{HNO}_3$ , filtriran kroz filter Whatman No 541 traku, filter papir ispiran dejonizovanom vodom i normalni sud dopunjeno do 50 ml.

## 2.4.2 Žitarice, brašno i hleb

U ovom radu su se kao uzorci koristile sledeće vrste žitarica, brašna i hleba:

### Žitarice

1. Pšenica,
2. Ovas,
3. Raž,
4. Je am,
5. Kukuruz,
6. Heljda.

### Brašno

1. Pšenično tip 400,
2. Pšenično tip 500,
3. Pšenično celo zrno,
4. Kukuruzno,
5. Heljdino.

### Hleb

1. Beli pšenični,
2. Raženi,
3. Crni pšenični,
4. Polubeli pšenični,
5. Kukuruzni,
6. Mešani-pšenični, ovseni, raženi.

Ispitivani uzorci su birani tako da predstavljaju proizvode koji se najčešće upotrebljavaju u izradi proizvoda od žitarica (zrno žitarice) i u ishrani (brašno i hleb) stanovništva na području grada Niša. Uzorci žitarica su poticali sa dva različita lokaliteta (Babušnica i Toponica), dok su uzorci brašna i hleba nabavljeni od po dva različita proizvođača.

Za multielementnu analizu žitarica korišteno je celo zrno žitarice, koje je za analizu pripremljeno metodom suve digestije [104]. Odmereno je oko 3 g zrna ispitivanih žitarica, sa tačnošću na četiri decimalne, i preneseno u lonac za žarenje. Uzorci su žareni na temperaturi od 450-500 °C u periodu od 48h. U cilju potpune oksidacije uzorcima je dodavana HNO<sub>3</sub> (1:3) nakon čega su uzorci uparavani do suva i ponovo vrateći ih u peć za žarenje do nastanka belog pepela. Na kraju je dobijeni pepeo rastvaran u 65% HNO<sub>3</sub>, filtriran kroz Whatman No 541 traku, filter papir ispiran deionizovanom vodom i normalni sud dopunjeno do 50 ml.

Uzorci brašna su u cilju određivanja vlage prvo sušeni u sušnici na temperaturi od 105 °C do konstatne mase. Potom je sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima brašna određen preko formule % vlage =  $\frac{a \times 100}{p}$  gde je  $a$  razlika u masi vegeglasa sa uzorkom pre i posle sušenja dok je  $p$  odmerena količina uzorka u gramima. Nakon toga su uzorci brašna u cilju određivanja njihovog mineralnog sastava, mineralizovani metodom suve digestije po postupku kao za žitarice.

Ispitivani uzorci hleba su pripremani tako što je hleb sezen na kriške nožem od titanijuma, koje su potom sušene na sobnoj temperaturi u vazduhu u vremenu od 48h. Nakon tog perioda

uzorci hleba su homogenizovani u mlinu sa titanijumskim se ivom. Tako pripremljeni uzorci hleba su spremani za multielementnu analizu po postupku kao za žitarice.

#### **2.4.3 Vo ni sokovi i vo na vina**

U ovom radu analizirani su bistri i gusti vo ni sokovi. Kod bistih vo nih sokova svaki od analiziranih uzoraka je nabavljan od tri različita proizvoda, dok je kod gustih, za svaki od ispitivanih uzoraka izabrano po dva različita proizvoda.

Uzorci bistrih vo nih sokova:

1. Višnja,
2. Kupina,
3. Crno grožđe,
4. Borovnica.

Uzorci gustih vo nih sokova:

1. Breskva i jabuka,
2. Jagoda i jabuka,
3. Breskva,
4. Jagoda,
5. Kajsija i jabuka,
6. Multivitamin.

Odmereno je po 20 g sa tačnošću na etiri decimalne svakog uzorka soka u lonacima za žarenje koji su u peći, na temperaturi od 450-500 °C. Izareni uzorci su, nakon hlađenja, tretirani sa po 3 ml HNO<sub>3</sub> koncentracije 0,1M, a zatim uparavani na pečanom kupatilu. Lonaci su uparenim uzorcima su ponovo žareni u peći. Dobijeni suvi ostatak je rastvaran sa 1 ml 0,1M HNO<sub>3</sub>, a onda i sa 1 ml koncentrovane HCl zbog prisustva teže rastvornog pepela. Svi ovi rastvorovi su pročišćeni kroz filter papir Whatman No 541 traku, filter papir ispiran deionizovanom vodom i normalni sud od 50 ml dopunjeno do crte.

Kao materijal za analizu nutritivne vrednosti, korišćena su domaća i komercijalna vo na vina od višnje, kupine, maline i borovnice. Uzorci vina od višnje i kupine uzimani su kako iz domaćeg radionica tako i iz marketa i to od po dva različita proizvoda, dok su vina od borovnice i maline nabavljana od dva različita proizvoda koji se mogu nabaviti u marketima na području grada Niša.

Uzorci su profiltrirani kroz filter hartiju i zatim je vršena direktna analiza uzoraka.

#### **2.4.4 Med**

U ovom radu analizirani su sledeći uzorci meda domaće proizvodnje nabavljeni sa po tri različita lokaliteta:

1. Livadski med:
  - a) Niška Banja,
  - b) Vladičin Han,

- c) Prokuplje
- 2. Bagremov med:
  - a) Niška Banja,
  - b) Šid,
  - c) Valjevo.
- 3. Šumski med:
  - a) Niška Banja,
  - b) Vladičin Han,
  - c) Zaplanje.
- 4. Cvetni med:
  - a) Niška Banja,
  - b) Prokuplje,
  - c) Vlasina.

kao i uzorci meda nabavljeni u marketima na području grada Niša:

1. Manuka
2. Biomed 6
3. Livadski
4. Bagremov
5. Šumski
6. Cvetni
7. Planinski

Odmerene su porcije meda od oko 2 g sa tačnošću na četiri decimale i smeštene u puculanske lončine. Uzorci su najpre sušeni na pečanom kupatilu (10h), a zatim su žareni u peću na temperaturi od 450–500 °C (12h), do suvog ostatka. Nakon hlačenja, svakom uzorku dodato je po 2 ml HNO<sub>3</sub> koncentracije 0,1 mol/l. Uzorci su zatim sušeni na pečanom kupatilu i ponovo žareni u peću za žarenje (5h). Ohlađeni uzorci su rastvoreni sa po 5 ml iste kiseline, profiltrirani i zatim kvantitativno prebačeni u normalne sudove gde su razblaženi deionizovanom vodom do 50 ml.

## 2.5 Statistička obrada podataka

### 2.5.1 Jednosmerna analiza varijanse – ANOVA

Analiza varijanse (eng. *ANalysis Of VAriance* - ANOVA) je analitički model za testiranje značajnosti razlike i koristi se kada se ima više od dve grupe ispitivanih uzoraka. Prednost ove metode se ogleda u tome što u model ulaze u obzir svi varijabiliteti, kao i njihov međusobni uticaj, što je nemoguće proceniti na drugačiji način.

Prema broju faktora koji deluju na rezultatu e obeležje, analiza varijanse može biti:

1. jednofaktorska (jednosmerna)
2. dvofaktorska (dvosmerna) i
3. višefaktorska.

U statističkim testovima esto se sreće pojam *nulta hipoteza* ( $H_0$ ). To je hipoteza koja se testira datim testom. U slučaju ANOVA nulta hipoteza glasi: *svi uzorci koji se porede potiču iz*

*iste populacije sa srednjom vrednošću  $\mu$  i standardnom devijacijom*. Uočene razlike potiču u samo od slučajne prirode uzorka.

Polazna hipoteza se proverava izvođenjem F testa. Izrađena F-vrednost upoređuje se sa kritičnom vrednošću  $F_{izr}$ ; ukoliko je  $F_{izr} > F_{krit}$  nulta hipoteza se odbacuje sa nivoom rizika manjim od 5% ( $p<0,05$ ), tj. svi uzorci ne potiču u iz iste populacije; ukoliko je  $F_{izr} < F_{krit}$  nulta hipoteza se zadržava sa nivoom rizika većim od 5% ( $p>0,05$ ), tj. uzorci potiču u iz iste populacije. Pošto je izrađena vrednost parametra F veća od kritične, nulta hipoteza se odbacuje, tj. srednje vrednosti uzorka se značajno razlikuju. Utvrđivanje seta rezultata koji uslovljava odstupanja vrši se tako što se srednje vrednosti poređaju u rastu i niz i upoređuju razlike susednih vrednosti sa najmanjom značajnom razlikom [105].

### 2.5.2 Studentov t-test

Najčešći upotrebljavani parametrijski test značajnosti za testiranje nulte hipoteze je Studentov t-test. Koristi se za testiranje značajnosti razlika između dve aritmetičke sredine.

Uslovi za primenu t testa:

- Obe varijable koje se testiraju moraju biti numeričke;
- Ukoliko je veličina uzorka manja od 30 jedinica, raspored treba biti normalan ili barem simetričan.

Za njegovo realizovanje potrebno je poznavati parametre statističkog skupa: veličinu uzorka ( $n$ ), standardnu devijaciju (SD), i aritmetičku sredinu ( $\bar{x}$ ).

Ako je izrađena vrednost statističkog testa ( $t$  ili F vrednost) manja od granične vrednosti za odgovarajući broj stepena slobode i prag značajnosti, nulta hipoteza se prihvata kao tačna, a odbacuje alternativna hipoteza [105].

Tako na primer:

- $t_{izr} < t_{(krit \ i \ 0,05)}$  nulta hipoteza  $H_0$  se ne odbacuje jer je rizik veći od 5% ( $p>0,05$ )

Obrnuto, ako je izrađena t-vrednost jednak ili veća od granične vrednosti, za odgovarajući broj stepena slobode i prag značajnosti, nulta hipoteza se odbacuje kao netočna, a prihvata se alternativna hipoteza:

- $t_{izr} > t_{(krit \ i \ 0,05)}$ , odbacuje se nulta hipoteza za nivo rizika  $p=0,05$ , odnosno za nivo sigurnosti  $P=0,95$  (95%)
- $t_{izr} > t_{(krit \ i \ 0,01)}$ , odbacuje se  $H_0$  i za nivo rizika  $p=0,01$ , odnosno za nivo sigurnosti  $P=0,99$  (99%).

U cilju ispitivanja postojanja statističkih značajki u sadržaju detektovanih makro i mikro elemenata u ispitivanim uzorcima, na dobijene vrednosti sadržaja primenjeni su statistički testovi ANOVA i Studentov t-test. ANOVA test je primenjen kada je bilo više od dve grupe ispitivanih varijabli, dok je t-test primenjen u slučaju ispitivanja dve grupe nezavisnih varijabli. Primjenjeni testovi su pratili statistički značajku razlike u sadržaju detektovanih elemenata između svih grupa odabranih uzorka. Tako da, ovim testovima je pravlen i kakav uticaj na sadržaj detektovanih makro i mikro elemenata ima lokalitet sa kojeg su uzorci poticali ili proizvedeni od kojeg su uzorci nabavljeni. Kada ANOVA test pokazuje postojanje statističkih

zna ajne razlike u okviru ispitivane grupe uzoraka, po nekom od kriterijuma, vrši se naknadno poređenje primenom Tukey HSD testa, koji daje podatak o tome između kojih tačno vrsta uzoraka u okviru ispitivane grupe, postoji, odnosno ne postoji statistički značajna razlika. Na ovaj način se dobijaju informacije koje ukazuju da li se uzorci, statistički značajno razlikuju ili ne u sadržaju makro i mikro elemenata. Statistički paket kojim su analizirane dobijene vrednosti sadržaja detektovanih elemenata u ispitivanim realnim uzorcima je SPSS 20 [106].

### **3 REZULTATI I DISKUSIJA**

### **3.1 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima jezgrastog voća**

#### **3.1.1 ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme**

*RF* snaga generatora je jedan od operativnih uslova instrumenta koji ima najveći uticaj na analitičke karakteristike generisane ICP plazme [107]. Odabirom odgovarajućih vrednosti *RF* snage moguće je uspešno smanjiti devijacije analitičkih signala koje mogu biti uzrokovane uticajem matriksa uzorka.

U postupku ispitivanja robusnosti plazme korišteni su operativni uslovi instrumenta dati u Tabeli 14.

Tabela 14. Operativni uslovi za instrument iCAP 6000 ICP-OES

Brzina pumpe za ispiranje	100 rpm
Brzina pumpe za analizu	50 rpm
Protok gasa za raspršivanje	0,7 l/min
Protok gasa za hlađenje	12 l/min
Protok pomognog gasa	0,5 l/min
Pravac posmatranja plazme	aksijalni/radijalni
Vreme ispiranja	30 s

Za proveru uticaja *RF* snage generatora na generisani plazmu korišten je postupak ispitivanja odnosa intenziteta emisionih linija Mg(II) 280,270 nm i Mg(I) 285,213 nm pri koncentraciji Mg od 5 mg/l. Plazma koja se dobija pod tim tzv. robusnim uslovima naziva se *robustna plazma* [108]. Vrednost *RF* snage je menjana od 750 do 1350 W, dok su ostali operativni uslovi plazme bili konstantni (Tabela 15.). Najveći odnos intenziteta emisionih linija Mg(II) i Mg(I) je za vrednost *RF* snage od 1150 W što je u saglasnosti i sa ispitivanjem i proračunima Mermeta po kojima je taj odnos za robustnu plazmu veći od 8 [109]. Ova vrednost *RF* snage korištena je u daljem postupku validacije metoda. Ono što se tako zapaža je da je i relativna standardna devijacija merenja veća pri manje robusnim uslovima plazme odnosno da je plazma nestabilna, ima varijacije koje se mogu odraziti na tačnost i reproduktivnost određivanja sadržaja metala u uzorcima.

Tabela 15. Uticaj *RF* snage generatora na odnos intenziteta emisionih linija Mg(II) i Mg(I)

<i>RF</i> snaga (W)	Relativni intenzitet $\pm$ SD Mg(II) 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet $\pm$ SD Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta
750	23680 $\pm$ 2842	12,00	10570 $\pm$ 850	8,042	2,240
950	83410 $\pm$ 3002	3,599	23010 $\pm$ 855	3,716	3,625
1150	141900 $\pm$ 1755	1,237	33220 $\pm$ 763	2,297	4,272
1350	165300 $\pm$ 1995	1,207	42850 $\pm$ 804	1,876	3,858

#### **3.1.2 Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih**

Osnovni parametri kalibracionih pravih za svaki ispitivani element određeni su korištenjem deionizovane vode za koncentraciju nula i standardnih rastvora koncentracija 2,00 i 5,00 ppm dobijenih razblaživanjem osnovnog referentnog multielementnog standarda. Parametri

kalibracionih pravih kao što su talasna dužina emisione linije ( ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odse ak (b), nagib (m) i prose na RSD (%) za repetabilnost merenja standarda prikazani su u Tabeli 16. Kako primjenjeni ICP-OES instrument, odnosno softverski paket kojim raspolaže, sa velikom bazom talasnih dužina emisionih linija, daje mogu nost da se element posmatra na više razli itih talasnih dužina, za svaki analit su zadane etiri najosetljivije talasne dužine. Na ovaj na in je mogu e da se za svaki element odabere ona talasna dužina na kojoj su spektralne interferencije i efekat matriksa najmanji. Iz tog razloga su konstruisane kalibracione prave koriš enjem pomenutih standarda kao i kalibracione prave dobijene tzv. „spajkovanjem” standarda rastvorom uzorka i upore ivan odnos nagiba tako dobijenih kalibracionih pravih. U Tabeli 16 je pored osnovnih parametara kalibracionih pravih dat i odnos nagiba kalibracione prave, tzv. eksterne kalibracione prave, dobijene iz standarda ( $m_{kal}$ ) i kalibracione prave dobijene „spajkovanjem” standarda uzorkom ( $m_{uzorak}$ ). Od etiri talasne dužine izabrana je ona kod koje je odnos ovih nagiba bio bliži vrednosti 1,00 odnosno ona kod koje je najmanje promenjen nagib kalibracione prave usled efekta matriksa uzorka. Nakon odabira najpogodnije talasne dužine, a u postupku odre ivanja sadržaja metala u uzorcima, korekcija pozadine za svaku od odabranih linija je izvršena manuelno sa ciljem dobijanja što ve eg odnosa signal/pozadina.

Tabela 16. Parametri analiti kih kalibracionih pravih: analiti ka talasna dužina ( ), limit detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odse ak (b), nagib (m), prose na RSD za repetabilnost merenja rastvora za kalibraciju i odnos  $m_{kal}/m_{uzorak}$

Element	(nm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	$R^2$	b	m	RSD* (%)	Odnos $m_{kal}/m_{uzorak}$
Al	396,152	0,0565	0,1882	0,999975	5,35	1335	0,19	1,10
As	228,812	0,0828	0,2759	0,999946	0,76	1906	4,07	0,95
B	208,959	0,5947	1,982	0,997202	4,07	1577	2,42	0,90
Ca	317,933	0,1925	0,6416	0,999706	73,89	2155	10,7	1,12
Cd	228,802	0,0828	0,2759	0,999946	0,76	1906	4,07	1,18
Co	228,616	0,1279	0,4262	0,999870	-0,05	1077	3,55	0,94
Cr	267,716	0,0588	0,1960	0,999973	1,96	2282	3,46	0,94
Cu	324,754	0,1181	0,3936	0,999889	46,67	6072	8,22	1,08
Fe	259,940	0,3089	1,030	0,999243	4,66	1476	7,20	1,28
K	404,721	0,0203	0,0677	0,999999	20,45	10300	0,04	1,06
Mg	202,582	0,1349	0,4487	0,999855	240,22	158400	0,25	0,98
Mn	257,610	0,0362	0,1206	0,999990	1,01	12048	5,20	0,94
Mo	202,030	0,0016	0,0055	1,000000	-0,32	1220	0,10	1,14
Na	589,592	0,0566	0,1886	0,999862	27,08	5596	6,22	1,18
Ni	341,476	0,1807	0,3024	0,999741	-2,27	2696	3,03	1,22
Pb	220,353	0,2191	0,7304	0,999619	0,09	153	0,87	0,90
Se	203,985	0,0308	0,1026	0,999992	0,97	280	0,01	0,94
Si	221,667	0,9202	3,067	0,998657	58,74	3220	1,20	1,18
Zn	202,548	0,0779	0,2598	0,999952	5,33	9825	1,98	1,08

\*srednja vrednost tri merenja

Iz rezultata datih u tabeli može se zaklju iti da je najosetljivija analiti ka linija odnosno linija sa najve im nagibom kod Mg na 202,582 nm a najmanje ostetljive analiti ke linije za Pb na 220,353 nm i Se na 203,985 nm. Limit detekcije se kre e od 0,0016 ppm za Mo do 0,9202 za Si a RSD od 0,01 do 8,22 %. Odnos nagiba dobijenih kalibracionih pravih se kre e od 0,90 za Pb

i B do 1,28 za Fe. Manja ili veća promena nagiba kalibracionih pravih je posledica manjeg ili većeg efekta matriksa na intenzitet emisione linije odnosno efekat elemenata sa većim sadržajem u uzorku na bliske analitičke linije elemenata sa manjim sadržajem.

### 3.1.3 Evaluacija tačnosti i preciznosti

Tačnost i preciznost metoda ispitana je određivanjem sadržaja svakog ispitivanog elementa u rastvoru multielementnog standarda koncentracije 3,00 ppm za sve elemente osim za K i Si za koje je deklarisana koncentracija iznosila 15,00 ppm, na odabranoj talasnoj dužini, a pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Dobijene vrednosti su upoređivane sa deklarisanom koncentracijom od strane proizvođača i korišćenog multielementnog standarda a koji je sadržaj određen korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala-CRM odnosno različitih NIST CRM-ova. Rezultati dobijeni prilikom ispitivanja tačnosti i preciznosti metoda prikazani su u Tabeli 17.

Tabela 17. Tačnost i preciznost određivanja ispitivanih elemenata predloženim metodama

Element	Nađena vrednost $\bar{x} \pm SD$ (ppm)	Tačnost <sup>a</sup> Recovery (%)	Preciznost <sup>b</sup> RSD (%)
Al	3,212±0,046	107,1	1,4
As	2,898±0,044	96,6	1,5
B	3,098±0,008	103,3	0,3
Ca	3,120±0,066	104,0	2,1
Cd	2,880±0,033	96,0	1,1
Co	2,902±0,036	96,7	1,2
Cr	3,122±0,056	104,1	1,8
Cu	3,224±0,068	107,5	2,1
Fe	3,208±0,055	106,9	1,7
K	14,68±0,44	97,9	3,0
Mg	2,912±0,082	97,1	2,8
Mn	3,162±0,094	105,4	3,0
Mo	3,200±0,202	106,7	6,3
Na	3,088±0,102	102,9	3,3
Ni	2,944±0,144	98,1	4,9
Pb	3,098±0,202	103,3	6,5
Se	2,926±0,098	97,5	3,3
Si	15,46±0,18	103,1	1,2
Zn	3,102±0,062	103,4	2,0

$$^a \text{Recovery} = \frac{\bar{x}}{\bar{x}_0} \cdot 100; \quad ^b RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$

Tačnost metoda se kreće od 96,0% za Cd do 107,5% za Cu a preciznost od 0,3% za B do 6,5 % za Pb.

### 3.1.4 Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u različitim uzorcima jezgrastog voća

U cilju ispitivanja hranljive vrednosti jezgrastog voća koje se najčešće koristi u ishrani ljudi na području grada Niša, sadržaj makro i mikro elemenata (njih 19) određen je u 7 različitih vrsta uzoraka ovog voća. Svaki od uzoraka je nabavljen u lokalnim marketima od po dva različita proizvoda a odnosno dobavlja se. Sadržaj ispitivanih metala (izražen kao  $\mu\text{g}$  metala po g uzorka) određen je kao srednja vrednost tri merenja i sa pripadajućom standardnom devijacijom prikazan u Tabelama 18-20. Elementi prisutni u većim koncentracijama su određeni posmatranjem plazme radikalno.

U Tabeli 21 je dat literaturni pregled sadržaja ispitivanih metala u uzorcima jezgrastog voća različitog porekla od strane različitih istraživača u cilju diskusije i poređenja rezultata dobijenih u ovom radu.

Tabela 18. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm\text{SD}$  ( $\mu\text{g/g}$ ) za dva različita proizvoda a u različitim vrstama jezgrastog voća

	Uzorak	Ca <sup>a</sup>	K	Mg <sup>a</sup>	Na <sup>a</sup>
Brazilski orah	1	1338 $\pm$ 51	63,71 $\pm$ 0,62	2957 $\pm$ 23	5324 $\pm$ 78
	2	1461 $\pm$ 43	64,04 $\pm$ 0,73	2869 $\pm$ 19	5500 $\pm$ 54
Indijski orah	1	706,4 $\pm$ 24,6	43,62 $\pm$ 1,60	2444 $\pm$ 33	6848 $\pm$ 23
	2	700,2 $\pm$ 14,5	40,57 $\pm$ 2,38	2297 $\pm$ 26	5908 $\pm$ 32
Kikiriki	1	632,5 $\pm$ 7,8	37,52 $\pm$ 1,44	2036 $\pm$ 23	5829 $\pm$ 22
	2	639,8 $\pm$ 9,3	39,85 $\pm$ 2,16	2079 $\pm$ 37	5654 $\pm$ 18
Badem	1	1506 $\pm$ 23	69,99 $\pm$ 1,75	2554 $\pm$ 27	6117 $\pm$ 37
	2	1491 $\pm$ 41	72,51 $\pm$ 2,03	2477 $\pm$ 41	5998 $\pm$ 42
Lešnik	1	1483 $\pm$ 6	60,44 $\pm$ 1,16	1524 $\pm$ 12	6610 $\pm$ 32
	2	1466 $\pm$ 19	61,12 $\pm$ 2,07	1497 $\pm$ 23	6456 $\pm$ 42
Orah	1	1146 $\pm$ 23	46,39 $\pm$ 0,36	1592 $\pm$ 7	5659 $\pm$ 36
	2	1121 $\pm$ 12	44,28 $\pm$ 0,97	1557 $\pm$ 31	5788 $\pm$ 24
Pistaci	1	1279 $\pm$ 12	57,33 $\pm$ 0,68	1893 $\pm$ 19	2856 $\pm$ 15
	2	1301 $\pm$ 29	55,17 $\pm$ 1,03	1757 $\pm$ 29	2973 $\pm$ 19

<sup>a</sup> radikalno posmatranje plazme

Sadržaji određivanih makro elemenata se, na osnovu dobijenih rezultata, mogu rasporediti u sledećem opadajućem nizu: Na>Mg>Ca>K. Najviše natrijuma detektovano je u uzorcima indijskog oraha (6848 µg/g) a najmanje u pistačiju (2856 µg/g). Kada se dobijeni sadržaji za Na u ovom radu uporede sa vrednostima koje su dobili drugi autori u istom tipu uzorka (Tabela 21.), može se zapaziti da je u uzorcima jezgrastog oraha a koje se kod nas koristi u ishrani, sadržaj natrijuma bio viši. Razlika koja postoji u sadržaju natrijuma između uzoraka u ovom radu i u radovima drugih autora pokazivala je negde veća negde manje varijacije, što može biti posledica različitog geografskog porekla ispitivanih uzoraka ili učinkovite da je nepotpuno uklonjena prisutna kuhinjska so. Magnezijum je element koji ima važnu ulogu u enzimskim sistemima i po literaturnim podacima ova vrsta voća je od makroelemenata najbogatija magnezijumom. U ispitivanim uzorcima jezgrastog voća najveći sadržaj Mg je određen u uzorcima brazilskog oraha. Kalcijum je element koji je neophodan prilikom formiranja kostiju i za razvoj jakih zuba, i u ispitivanim uzorcima načinu su znatično količine ovog nutrijenta. Sadržaj Ca se u uzorcima badema, lešnika i brazilskog oraha malo razlikuje i kreće se od 1338 do 1506 µg/g. Brazilski orah je voće koje ima visok sadržaj Ca i Mg [110], što je u ovom radu i potvrđeno. U svim ispitivanim uzorcima jezgrastog voća sadržaj Mg je bio veći od sadržaja Ca, izuzev lešnika gde je sadržaj ova dva elementa bio približno isti. Preporučena dnevna doza makro elemenata po pravilniku RS (Tabela 8.) je za Mg 375 mg, Ca 800 mg i za K 2000 mg, tako da na osnovu određenih sadržaja, jezgrasto voće koje je u ovom radu ispitivano, može biti dobar dodatni izvor makro elemenata u ishrani ljudi. Pregledom radova u kojima su određivani makro elementi u uzorcima jezgrastog voća može se videti da se sadržaj Ca i Mg u uzorcima badema, lešnika, oraha i kikirika iz Italije kretao u rasponu od 650 µg/g (kikiriki) do 2620 µg/g (badem) za Ca i od 1600 µg/g (kikiriki) do 2400 µg/g za Mg, što je u skladu sa sadržajima koji su u ovom radu određeni. Sadržaji ova dva elementa u uzorcima oraha iz U.S. i lešnika iz Turske su bili niži nego u ovom radu i kretali su se od 432 do 1050 µg/g za Ca i od 1740 do 2380 za Mg (U.S.) i od 788 do 925 µg/g za Ca i od 1180 do 1440 µg/g (Turska). Za razliku od Ca i Mg određen sadržaj kalijuma u ovom radu je znatno niži u odnosu na sadržaje koje su detektovali drugi autori u istom tipu uzorka. Ovakve razlike koje postoji u sadržajima makro elemenata kod istog tipa jezgrastog voća, su najveće im delom posledica geografskog porekla ispitivanih uzoraka obzirom na učinkovitu da su makroelementi, pored Fe i Al, najzastupljeniji metali u zemljjištu.

Tabela 19. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) za dva različita proizvoda u različitim vrstama jezgrastog voća

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Brazilski orah	1	11,17 $\pm$ 0,08	1,074 $\pm$ 0,013*	0,7277 $\pm$ 0,0046*	18,72 $\pm$ 0,09	67,96 $\pm$ 0,39	7,766 $\pm$ 0,032	0,0352 $\pm$ 0,0042	5,590 $\pm$ 0,054	0,7635 $\pm$ 0,0668	9,010 $\pm$ 0,143	36,71 $\pm$ 0,16
	2	13,43 $\pm$ 0,12	0,8251 $\pm$ 0,0081*	0,6731 $\pm$ 0,0052*	19,32 $\pm$ 0,14	64,29 $\pm$ 0,67	7,923 $\pm$ 0,019	0,0237 $\pm$ 0,0022	5,371 $\pm$ 0,028	0,8061 $\pm$ 0,0537	8,216 $\pm$ 0,209	35,22 $\pm$ 0,35
Indijski orah	1	16,41 $\pm$ 0,23	0,1476 $\pm$ 0,0073*	0,8034 $\pm$ 0,0061*	24,87 $\pm$ 0,40	84,40 $\pm$ 0,58	27,87 $\pm$ 0,57	0,0702 $\pm$ 0,0088	7,751 $\pm$ 0,144	0,9220 $\pm$ 0,0886	14,07 $\pm$ 0,34	58,29 $\pm$ 0,44
	2	17,67 $\pm$ 0,19	0,1307 $\pm$ 0,0054*	0,9261 $\pm$ 0,0102*	28,57 $\pm$ 0,83	87,03 $\pm$ 0,74	25,39 $\pm$ 0,79	0,0627 $\pm$ 0,0091	7,329 $\pm$ 0,275	0,9372 $\pm$ 0,0621	12,61 $\pm$ 0,27	59,33 $\pm$ 0,72
Kikiriki	1	41,77 $\pm$ 0,17	0,0964 $\pm$ 0,0121*	0,2642 $\pm$ 0,0109*	10,34 $\pm$ 0,01	32,70 $\pm$ 0,18	18,31 $\pm$ 0,08	1,056 $\pm$ 0,016	4,613 $\pm$ 0,038	0,7387 $\pm$ 0,0892	18,14 $\pm$ 0,28	43,63 $\pm$ 0,22
	2	40,96 $\pm$ 0,36	0,0911 $\pm$ 0,0099*	0,2910 $\pm$ 0,0213*	11,52 $\pm$ 0,22	30,99 $\pm$ 0,27	19,47 $\pm$ 0,17	0,9232 $\pm$ 0,0511	4,367 $\pm$ 0,052	0,7122 $\pm$ 0,0732	19,25 $\pm$ 0,49	41,02 $\pm$ 0,67
Badem	1	40,65 $\pm$ 0,20	0,0738 $\pm$ 0,0063*	0,4700 $\pm$ 0,0187*	17,16 $\pm$ 0,05	49,73 $\pm$ 0,08	15,62 $\pm$ 0,11	0,4325 $\pm$ 0,0102	0,9438 $\pm$ 0,0775*	0,7651 $\pm$ 0,0863	8,660 $\pm$ 0,210	45,38 $\pm$ 0,08
	2	38,17 $\pm$ 0,74	0,0696 $\pm$ 0,0081*	0,5002 $\pm$ 0,0227*	17,94 $\pm$ 0,12	47,39 $\pm$ 0,46	16,22 $\pm$ 0,72	0,5947 $\pm$ 0,0161	1,242 $\pm$ 0,0821*	0,7967 $\pm$ 0,0913	9,072 $\pm$ 0,441	46,71 $\pm$ 0,12
Lešnik	1	50,53 $\pm$ 0,25	0,1298 $\pm$ 0,0062*	0,3108 $\pm$ 0,0137*	8,392 $\pm$ 0,207	34,25 $\pm$ 0,46	13,82 $\pm$ 0,14	0,3943 $\pm$ 0,0225	2,696 $\pm$ 0,061	0,7426 $\pm$ 0,0901	187,1 $\pm$ 0,2	34,43 $\pm$ 0,10
	2	48,36 $\pm$ 1,87	0,1251 $\pm$ 0,0811*	0,2936 $\pm$ 0,0185*	9,021 $\pm$ 0,415	33,02 $\pm$ 0,74	14,02 $\pm$ 0,49	0,4121 $\pm$ 0,0622	2,802 $\pm$ 0,094	0,7233 $\pm$ 0,0521	201,7 $\pm$ 2,1	36,01 $\pm$ 0,61
Orah	1	17,40 $\pm$ 0,08	0,0634 $\pm$ 0,0078*	0,1423 $\pm$ 0,0078*	16,14 $\pm$ 0,36	35,95 $\pm$ 0,78	13,28 $\pm$ 0,39	0,2335 $\pm$ 0,0124	0,9697 $\pm$ 0,0522*	0,9791 $\pm$ 0,0922	5,449 $\pm$ 0,179	34,91 $\pm$ 0,11
	2	18,93 $\pm$ 0,19	0,0702 $\pm$ 0,0107*	0,1577 $\pm$ 0,0931*	14,27 $\pm$ 0,67	37,04 $\pm$ 0,22	12,73 $\pm$ 0,41	0,2784 $\pm$ 0,0122	1,023 $\pm$ 0,045*	0,8923 $\pm$ 0,0731	5,907 $\pm$ 0,231	36,27 $\pm$ 0,76
Pistaci	1	10,72 $\pm$ 0,04	0,0182 $\pm$ 0,0082*	0,4087 $\pm$ 0,0161*	12,32 $\pm$ 0,22	69,57 $\pm$ 0,91	12,54 $\pm$ 0,22	0,1728 $\pm$ 0,0071	0,1525 $\pm$ 0,0667*	0,6583 $\pm$ 0,0852	4,841 $\pm$ 0,214	34,61 $\pm$ 0,12
	2	11,41 $\pm$ 0,73	0,0207 $\pm$ 0,0004*	0,4261 $\pm$ 0,0237*	11,64 $\pm$ 0,37	67,66 $\pm$ 1,52	12,09 $\pm$ 0,34	0,1687 $\pm$ 0,0280	0,1362 $\pm$ 0,0741*	0,7524 $\pm$ 0,0731	4,627 $\pm$ 0,304	33,99 $\pm$ 0,67

\* < LOD metode

Iz grupe mikro elemenata najve i sadržaj u svim ispitivanim uzorcima detektovan je za gvož e i kre e se od 30,99 µg/g do 87,03 µg/g. Najve e koncentracije ovog metala odre ene su u uzorcima indijskog oraha, brazilskog oraha, pista ija i badema dok sadržaj Fe u uzorcima kikirikija, lešnika i oraha ne varira mnogo odnosno približno je isti i kre e se od 30,99 do 37,04 µg/g. Sadržaj Fe u uzorcima badema iz Španije se kre e od 40,3 do 48,7 µg/g što je u skladu sa rezultatima koji su dobijeni za sadržaj gvož a u uzorcima badema u ovom radu. Kod uzoraka badema iz Italije sadržaj Fe je ve i za oko 3 puta u odnosu na sadržaje ovog metala koji su detektovani u uzorcima badema u našoj studiji. Sadržaj *hroma* u testiranim uzorcima varira i kre e se od 0,1423 µg/g u orahu do 0,9261 µg/g u indijskom orahu. Koli ine Fe i Cr u ispitivanim uzorcima su dovoljne da doprinesu dnevnoj potrebi ljudi prema ovim mikronutrijentima (Tabela 8.) a da ne izazovu bilo kakvu opasnost od trovanja ovim elementima a obzirom na injenicu da mogu, iako esencijalni, da budu i potencijalno toksi ni. Koncentracija *bakra* kre e se od 8,392 (lešnik) do 28,57 µg/g (indijski orah). Sadržaj Cu u uzorcima kikirikija i badema iz Italije je 10 µg/g odnosno 20 µg/g što je u skladu sa sadržajima detektovanim kod iste vrste uzorka u ovom radu. Koncentracija bakra u uzorcima lešnika poreklom iz Turske je od 1 do 9 µg/g a u lešnicima iz Španije od 14 do 17 µg/g. U odnosu na lešnike iz ovih zemalja, uzorci lešnika nabavljeni na podru ju grada Niša imaju oko 8 µg/g Cu, što su sadržaji koji su niži u odnosu na one koji su detektovani u lešnicima iz Španije.

Sadržaj *cinka* u uzorcima lešnika, oraha, pista ija i brazilskog oraha je gotovo isti i kre e se od 33,99 do 36,71 µg/g. Najve a koli ina Zn detektovana je u indijskom orahu i iznosi 59,33 µg/g. Na osnovu sadržaja ovog elementa u uzorcima jezgrastog vo a može se zaklju iti da su ovi proizvodi dobar izvor Zn, ali treba re i da na povišeni sadržaj ovog elementa u jezgrastom vo u, mogu uticati kako zemljiste koje je bogato cinkom tako i ubriva na bazi Zn koja se koriste prilikom užgajanja ovih biljnih vrsta [111]. *Selen* je mikronutrijent koji je izuzetno zna ajan za zdravlje ljudi usled svoje antioksidativne uloge u ljudskom organizmu i injenice da nije zna ajno zastupljen u namirnicama. U svim ispitivanim uzorcima jezgrastog vo a detektovan je Se, pri emu je najve i sadržaj ovog elementa odre en u orahu (0,9791 µg/g) i indijskom orahu (0,9372 µg/g), dok je kod ostalih vrsta jezgrastog vo a koli ina Se bila niža i ujedna ena. Koncentracija Se u radu Moodley-a i sar. [112] je 36,1 µg/g dok je u studiji Perkh-a i saradnika sadržaj Se u brazilskom orahu 3,6 µg/g [113], što je za oko 50 odnosno 5 puta više nego u uzorcima analiziranim u ovom radu. Ovakva odstupanja u sadržaju selena u uzorcima Brazilskog oraha su najverovatnije posledica sastava zemljišta, jer, po istraživanjima Yang-a, sadržaj Se u Brazilskom orahu direktno zavisi od koli ine selena koja se nalazi u zemljištu na kome se ova biljna vrsta gaji [110]. Ovu konstataciju potvr uju sadržaji Se u uzorcima brazilskog oraha koji vode poreklo iz razli itih zemalja Južne Amerike (Brazil, Bolivija i Peru). Sadržaj selena u uzorcima brazilskog oraha je varirao od države do države (Tabela 21.). Iako su koli ine Se u ispitivanim uzorcima jezgrastog vo a u ovom radu male, a s obzirom na injenicu da je selen element koji se ina e retko nalazi u hranljivim namirnicama, ova vrsta vo a i pored toga, može predstavljati dobar izvor selena u ishrani ljudi. Preporu ena dnevna doza Se po pravilniku RS (Tabela 8.) je 55 µg što samo potvr uje zna aj upotrebe pojedinih vrsta jezgrastog vo a u ljudskoj ishrani.

Najviši sadržaj *bora* detektovan je u uzorcima lešnika i kre e se od 48,36 do 50,53 µg/g, dok je najmanje ovog elementa bilo u uzorcima pista ija (od 10,72 do 11,41 µg/g). Odre eni sadržaj B u uzorcima lešnika u ovom radu je viši oko 2 puta u odnosu na one sadržaje koje su drugi autori detektovali u lešniku poreklom iz Turske (Tabela 21.). Sadržaji *kobalta* u ispitivanim uzorcima su niski i ispod LOD-a primenjene metode. Najviše *mangana* odre eno je u

uzorcima indijskog oraha a najmanje u brazilskom orahu. Sadržaj ovog elementa u uzorcima badema i lešnika poreklom iz Južne Afrike je oko 8 puta (badem) odnosno 2 puta (lešnik) viši u odnosu na sadržaje koji su za ove uzorke detektovani u ovom radu. Sadržaj *nikla* koji je detektovan u uzorcima pista ija u ovoj studiji je približno isti sa sadržajima koji su detektovani u uzorcima ove vrste jezgrastog vo a iz Španije, dok su u ostalim ispitivanim uzorcima sadržaji ovog elemena bili viši u odnosu na koli neke koje su određene u istim tipovima uzoraka ali različitog geografskog porekla (Tabela 21.).

Tabela 20. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) za dva različita proizvoda a u različitim vrstama jezgrastog vo a

	Uzorak	Al <sup>a</sup>	As	Cd	Pb
Brazilski orah	1	206,9 $\pm$ 1,0	nd	nd	0,3286 $\pm$ 0,0354*
	2	209,2 $\pm$ 2,3	nd	nd	0,2937 $\pm$ 0,0287*
Indijski orah	1	265,5 $\pm$ 1,5	nd	nd	0,5336 $\pm$ 0,0218*
	2	269,7 $\pm$ 2,2	nd	nd	0,5096 $\pm$ 0,0487*
Kikiriki	1	642,0 $\pm$ 6,3	0,2872 $\pm$ 0,0071*	0,1231 $\pm$ 0,0047*	0,3721 $\pm$ 0,0497*
	2	650,9 $\pm$ 8,6	0,1008 $\pm$ 0,0023*	0,0937 $\pm$ 0,0031*	0,3617 $\pm$ 0,0671*
Badem	1	230,5 $\pm$ 0,5	0,0325 $\pm$ 0,0011*	0,0478 $\pm$ 0,0011*	0,2163 $\pm$ 0,0063*
	2	234,9 $\pm$ 1,7	0,0554 $\pm$ 0,0013*	0,0672 $\pm$ 0,0016*	0,2372 $\pm$ 0,0057*
Lešnik	1	1516 $\pm$ 9	nd	nd	0,4493 $\pm$ 0,0049*
	2	1378 $\pm$ 14	nd	nd	0,4157 $\pm$ 0,0104*
Orah	1	216,9 $\pm$ 2,3	nd	nd	0,1390 $\pm$ 0,0334*
	2	212,5 $\pm$ 9,6	nd	nd	0,1501 $\pm$ 0,0572*
Pista ija	1	3,883 $\pm$ 0,081	nd	nd	0,1278 $\pm$ 0,0051*
	2	3,622 $\pm$ 0,121	nd	nd	0,1321 $\pm$ 0,0141*

<sup>a</sup> radijalno posmatranje plazme; \* < LOD metode; nd – nije detektovan

U ispitivanim uzorcima jezgrastog vo a sadržaj *aluminijuma* se kreće od 3,622 µg/g u pista iju do 1516 µg/g u lešniku. U ostalim uzorcima sadržaj Al je približno isti i kreće se oko 200 µg/g. Razlika u sadržaju ovog elementa između pista ija i ostalih uzoraka, može biti posledica injenice da je pista i, koji je analiziran, bio u ljudskoj koja ga je verovatno zaštitila od dodatne kontaminacije aluminijumom u toku proizvodnje, transporta i pakovanja. Za razliku od njega ostali uzorci nisu bili zaštićeni svojom ljudskom, što je verovatno i dovelo do povećanja sadržaja ovog metala u toku procesa prerade i proizvodnje. Tako je se uzorci jezgrastog vo a mogu pakovati i u ambalažnom materijalu od aluminijumske folije i tako pojaviti u prodaji. Usled kontakta gotovog proizvoda sa ambalažom, a shodno vremenu kojem je proizvod u aluminijumskoj foliji, mogu se stvoriti uslovi za kontaminaciju jezgrastog vo a aluminijumom. Najviše je aluminijumom kontaminiran uzorak lešnika i to u količini koja nije zanemarljiva, a imajući u vidu da je po nekim autorima gornja granica Al koja se sme uneti u organizam a da ne bude toksičan po ljudima 6 mg/dan [114], može se zaključiti da uzorci lešnika testirani u ovom radu, u smislu količine aluminijuma, mogu biti štetni po ljudsko zdravlje.

Sadržaj toksičnih elemenata *kadmijuma* i *arsena* u uzorcima brazilskog oraha, indijskog oraha, lešnika, oraha i pista nije detektovan, dok je u uzorcima kikirikija i badema sadržaj ova dva elementa ispod LOD-a primenjene metode (Tabela 20.). Za razliku od ova dva elementa *olovo* je detektovano u svim ispitivanim uzorcima jezgrastog vo a pri tome je njegov sadržaj ispod LOD-a primenjene metode. Prisustvo Pb u svim ispitivanim uzorcima samo je potvrdilo injenicu da je ovaj teški metal, jedan od najzastupljenijih i najrasprostranjenijih kontaminanata životne sredine. Kako toksični metali kadmijum, arsen i olovo ili nisu detektovani u ispitivanim uzorcima ili su im sadržaji bili veoma niski, može se zaključiti da svi ispitivani uzorci jezgrastog vo a nisu štetni i da su bezbedni za ljudsku ishranu.

Tabela 21. Literarni pregled sadržaja određivanih makro i mikro elemenata u uzorcima jezgrastog voća izražen u µg/g

Makroelementi									
Uzorak	Poreklo	Ca	K	Mg	Na	Lit.			
Badem	Italija	2620±40	-	2400±4	-	[115]			
Badem	Južna Afrika	5392,4±57,2	-	5424,1±51,7	-	[112]			
Lešnik	Turska	788-925	5270-8950	1180-1440	610-860	[116]			
Lešnik	Italija	1310±20	-	1700±2	-	[115]			
Lešnik	Južna Afrika	2880,2±35,9	-	4833±56,2	-	[112]			
Orah	U.K.	1050	5780	2380	2830	[117]			
Orah	U.S.	432-1050	5780-6900	1740-2380	2830-4720	[117]			
Orah	Italija	760±5	-	1600±30	-	[115]			
Kikiriki	Italija	650±10	-	1600±50	-	[115]			
Brazilski orah	Južna Afrika	7432,8±10,2	-	9678,5±68,5	-	[112]			
Mikroelementi									
Uzorak		Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Se	Zn	Lit.
Badem	Španija	0,4-0,5	10,5-12,6	40,3-48,7	-	0,2-0,5	-	27,9-50	[118]
Badem	Italija	-	20±0,0	14±1	-	-	-	60±3	[115]
Badem	Južna Afrika	0,94±0,14	23,74±0,04	71,54±0,36	25,86±0,48	-	0,0039±0,0007	49,72±0,09	[112]
Lešnik	Španija	0,4-0,45	14-17,2	13,3-19,9	-	0,3-0,5	-	38-45,6	[118]
Lešnik	Južna Afrika	1,74±0,12	59,14±0,06	71,58±1,13	128,04±1,56	-	n.d.	54,26±0,22	[112]
Lešnik	Turska	-	1-9	20,5-25,6	17,7-158	-	-	17,1-24,4	[116]
Kikiriki	Italija	-	1±0,1	60±1	-	-	-	40±2	[115]
Pista i	Španija	0,4	5,6-10,3	70-75,6	-	0,1-0,3	-	30,2-36,7	[118]
Orah	Italija	-	20±0,2	70±3	-	-	-	40±4	[115]
Brazilski orah	Brazil	-	-	-	-	-	3,6±0,4	-	[113]
Brazilski orah	Bolivija	-	-	-	-	-	1,6±0,1	-	[113]
Brazilski orah	Peru	-	-	-	-	-	6,5±0,5	-	[113]
Brazilski orah	Južna Amerika	-	-	-	-	-	20,2±1,4	-	[113]
Brazilski orah	Južna Afrika	1,34±0,19	59,44±0,51	74,26±0,46	3,40±0,21	-	36,1±0,4	110,31±1,25	[112]
Mikroelementi									
Uzorak		Al	As	B	Sn	Lit.			
Lešnik	Turska	-	-	13,9-21,4	-	[119]			
Lešnik	Južna Afrika	-	0,024±0,002	-	-	[112]			
Badem	Južna Afrika	-	0,013±0,004	-	-	[112]			
Orah	U.K.	11	0,01	14	0,03	[117]			
Orah	U.S.	-	<0,05	-	-	[117]			
Brazilski orah	Južna Afrika	-	0,017±0,002	-	-	[112]			

Upore ivanjem rezultata dobijenih za sadržaj detektovanih elemenata u ovom radu sa rezultatima iz literaturnog pregleda jasno se može uoiti da postoje odreene varijacije u sadržajima svih odreeneih elemenata. Posledica toga može biti različito geografsko poreklo ispitivanih uzoraka, primjenjeni tretmani u postupku gajenja biljaka, različite sposobnosti biljaka ka usvajanju pojedinih elemenata kao i različiti postupci prilikom prerade, pakovanja i transporta finalnog proizvoda.

### **3.1.5 Statistička obrada dobijenih rezultata odreivanja sadržaja metala u uzorcima jezgrastog voća**

Jednofaktorskom analizom varijanse ispitana je uticaj vrste jezgrastog voća na sadržaj detektovanih makro i mikro elemenata. Utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p<0,05$  u sadržajima odreeneih elemenata u svim ispitivanim uzorcima jezgrastog voća (Tabela I Prilog II). Naknadna poređenja pomoći Tukey-ovog HSD testa ukazuju da između u uzoraka indijskog oraha i badema u sadržaju magnezijuma ne postoji statistički značajna razlika ( $p=0,107$ ) kao ni kod uzoraka lešnika i oraha ( $p=0,160$ ). Takođe, sadržaj olova kod uzoraka pista i oraha se značajno ne razlikuje ( $p=0,689$ ). Određeni sadržaj selena se statistički značajno ne razlikuje kod uzoraka brazilskog oraha i kikirikija ( $p=0,683$ ), brazilskog oraha i badema ( $p=0,536$ ), brazilskog oraha i lešnika ( $p=0,109$ ) kao i kod uzoraka kikirikija i lešnika ( $p=0,813$ ). Značajna razlika u sadržaju cinka ne postoji kod uzoraka lešnika i oraha ( $p=0,615$ ), lešnika i pista i oraha ( $p=0,921$ ) kako ni kod uzoraka pista i oraha ( $p=0,994$ ) (Tabela II Prilog II).

Kako u sadržaju gore navedenih elemenata nije uočena statistički značajna razlika, a na osnovu primjenjenih statističkih testova, može se zaključiti da pojedine vrste jezgrastog voća imaju približno isti sadržaj pojedinih elemenata (Mg, Pb, Se i Zn). To bi značilo, da bi u smislu dnevne nadokandice Mg, Pb, Se ili Zn, bilo svejedno koju voćnu vrstu gore pomenutog jezgrastog voća koristiti. Sa druge strane, kako za ostale elemente u ispitivanim uzorcima jezgrastog voća postoji statistička značajna razlika u njihovim sadržajima, može se zaključiti da je svaka vrsta voća imati drugačiji uticaj na nadoknadu dnevnih potreba prema pojedinim nutrijentima.

Primenjenim t-testom ispitana je uticaj različitih proizvoda i okvira iste vrste jezgrastog voća na sadržaj detektovanih mikro i makro elemenata. Rezultati primjenjenog t-testa su pokazali da kod uzoraka brazilskog oraha, samo u sadržaju između Cu, K, Mg i Pb ne postoji statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) (Tabela III Prilog II). To znači da se uzorci brazilskog oraha nabavljeni od dva različita proizvoda i statistički ne razlikuju u sadržaju ova tri elemenata. Kod uzoraka indijskog oraha, od dva različita proizvoda i, jedino statistički značajna razlika ne postoji u sadržaju selena ( $p=0,112$ ). Značajna razlika ne postoji za Mg, Pb i Se kod uzoraka kikirikija ( $p>0,05$ ), dok kod uzoraka badema jedino kod Cu ne postoji statistički značajna razlika ( $p=0,046$ ). Kod uzoraka lešnika značajna razlika nije nađena kod Ca ( $p=0,604$ ) i Se ( $p=0,341$ ) (Tabela VII Prilog II). Sadržaji Ca ( $p=0,709$ ), Mg ( $p=0,162$ ) i Pb ( $p=0,374$ ) nisu se statistički značajno razlikovali kod uzoraka oraha, a kod pista i oraha značajna razlika nije bila nađena jedino za Pb ( $p=0,067$ ) (Tabela III Prilog II).

Na osnovu dobijenih rezultata t-testa za sadržaj detektovanih elemenata u okviru iste grupe uzorka ali od različitog proizvoda i okvira, može se zaključiti da generalno postoji statistički značajna razlika u sadržaju većine odreeneih elemenata. T-test je pokazao da postoji uticaj proizvoda i okvira iste grupe uzorka jezgrastog voća, na sadržaj detektovanih makro i mikro nutrijenata.

## 3.2 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima žitarica, brašna i hleba

### 3.2.1 ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme

Pri utvrđivanju robusnih uslova plazme za razvoj metoda kvantitativnog određivanja metala u uzorcima žitarica, brašna i hleba, radni parametri instrumenta koji su održavani konstantnim su dati u Tabeli 22, a intenziteti analitičkih linija za jonsku i atomsku traku Mg (Mg(II) i Mg(I)) sa pripadaju im standardnim devijacijama i relativnim standardnim devijacijama kao i odnos tih intenziteta u Tabeli 23.

Tabela 22. Operativni uslovi za instrument iCAP 6000 ICP-OES

Brzina pumpe za ispiranje	100 rpm
Brzina pumpe za analizu	50 rpm
Protok gasa za raspršivanje	0,7 l/min
Protok gasa za hlađenje	12 l/min
Protok pompe noge gase	0,5 l/min
Pravac posmatranja plazme	aksijalni/radijalni
Vreme ispiranja	30 s

Tabela 23. Uticaj RF snage generatora na odnos intenziteta emisionih linija Mg(II) i Mg(I)

RF snaga (W)	Relativni intenzitet $\pm$ SD Mg(II) 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet $\pm$ SD Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta
750	20280 $\pm$ 2444	12,05	10070 $\pm$ 750	7,448	2,014
950	90216 $\pm$ 3046	3,376	22966 $\pm$ 890	3,875	3,928
1150	151866 $\pm$ 1666	1,097	34660 $\pm$ 758	2,187	4,382
1350	168864 $\pm$ 2095	1,241	42708 $\pm$ 844	1,976	3,954

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je, kao i kod metode određivanja sadržaja metala u jezgrastom voću, najveći odnos intenziteta ispitivanih emisionih linija pri RF snazi generatora od 1150 W, što je i preporuka za razblažene vodene rastvore srednje kiselosti. Tako je, rezultati pokazuju da plazma manje robusnosti pokazuje i slabiju ponovljivost, odnosno manju preciznost merenja kroz u vrednosti RSD-a do 12%.

### 3.2.2 Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih

Parametri kalibracionih pravih: talasna dužina emisione linije (λ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odnosno (b), nagib (m) i RSD (%) prikazani u Tabeli 24 određeni su korišćenjem multielementnih standardnih rastvora koncentracija 2,00 i 5,00 ppm. Za svaki određeni element su iz tzv. biblioteke talasnih dužina selektovane etiri najosetljivije. Optimalna talasna dužina odnosno talasna dužina sa najmanje spektralnih interferencija i najmanje efekata matriksa uzorka izabrana je poređenjem odnosa nagiba dve kalibracione prave, jedne iz standardnih rastvora i druge dobijene spajkovanjem standarda rastvorom uzorka. U Tabeli 24 je dat takođe i odnos tih nagiba. Od etirih talasnih

dužine izabrana je ona kod koje je odnos ovih nagiba najmanje odstupao od 1,00. Nakon izbora najpogodnije talasne dužine, a u postupku kvantitativnog određivanja, izvršena je manuelna korekcija pozadine za svaku od odabranih linija u cilju postizanja što većeg odnosa intenziteta signala koji potiče od analita i signala pozadine.

Tabela 24. Parametri analitičkih kalibracionih pravih: analitička talasna dužina ( $\lambda$ ), limit detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odsekak (b), nagib (m), prosečne na RSD za repetabilnost merenja rastvora za kalibraciju i odnos  $m_{kal}/m_{uzorak}$

Element	(nm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	$R^2$	b	m	RSD* (%)	Odnos $m_{kal}/m_{uzorak}$
Al	396,152	0,4209	1,403	0,998595	2,24	2010	0,24	0,94
As	228,812	0,0908	0,3024	0,997882	0,88	1232	3,22	1,28
B	249,773	0,2734	0,9112	0,999407	64,20	11080	1,44	1,14
Ca	393,366	0,6269	2,089	0,996892	24,18	7886	9,72	0,96
Cd	228,802	0,0936	0,3118	0,999857	8,86	4560	2,77	0,90
Co	230,786	0,1468	0,4888	0,999983	-1,20	1208	3,68	1,22
Cr	357,869	0,1348	0,4495	0,999856	14,64	3122	3,55	0,91
Cu	324,754	0,2648	0,8827	0,999443	32,24	4508	6,24	1,11
Fe	259,940	0,1252	0,4172	0,999876	1,88	2014	8,02	1,08
K	766,490	0,9613	3,204	0,998535	88,98	12840	0,14	1,06
Mg	279,553	0,1963	0,6543	0,999694	120,22	445876	0,45	0,98
Mn	259,373	0,6165	2,055	0,996993	-0,80	886	3,26	0,94
Mo	202,030	0,0188	0,0628	0,999946	1,64	1350	0,44	1,26
Na	588,995	0,4374	1,456	0,998484	-1,20	5084	4,18	0,96
Ni	341,476	0,2047	0,6816	0,998363	16,20	4004	4,04	0,90
Pb	220,353	0,1822	0,6069	0,999998	1,08	244	1,87	0,91
Se	196,090	0,0192	0,0641	0,999990	0,66	506	0,28	1,30
Si	241,611	0,1577	0,5257	0,999960	48,24	5422	1,14	1,10
Zn	213,856	0,2138	0,7127	0,999673	8,98	9434	1,08	1,08

\*srednja vrednost tri merenja

Osigledno je najosetljivija analitička linija za Mg na 279,553 nm a najmanje osetljiva za Pb, Se i Mn. Limit detekcije se kreće od 0,0188 ppm za Mo do 0,9613 ppm za K a RSD od 0,14% do 9,72%. Rezultati u tabeli pokazuju da je odnos nagiba dve kalibracione prave između 0,90 za Ni i Cd do 1,30 za Se odnosno da je najveći uticaj matriksa kod elemenata kojih ima i ima najmanje u uzorcima (As, Cd, Cr, Mo, Ni, Pb i Se) ili su to emisione linije bliske emisionim linijama drugih elemenata kojih ima znatno u uzorcima.

### 3.2.3 Evaluacija tačnosti i preciznosti

Tačnost i preciznost predloženih metoda ispitana je određivanjem sadržaja svakog analiziranog elementa pri prethodno definisanim optimalnim uslovima i upoređivanjem te vrednosti sa deklarisanom koncentracijom od strane proizvođača a koristi enog standarda. Za ovaj deo validacije metode određivanje sadržaja svakog ispitivanog elementa koristi se enjem rastvora multielementnog standarda koncentracije 3,00 ppm za sve elemente osim za K i Si za koje je deklarisana koncentracija iznosila 15,00 ppm. Rezultati su prikazani u Tabeli 25.

Tabela 25. Tačnost i preciznost određivanja ispitivanih elemenata predloženim metodama

Element	Nadena vrednost $\bar{x} \pm SD$ (ppm)	Tačnost <sup>a</sup> Recovery (%)	Preciznost <sup>b</sup> RSD (%)
Al	3,098±0,068	103,3	2,2
As	2,802±0,088	93,4	3,1
B	3,088±0,022	102,9	0,7
Ca	2,894±0,046	96,5	1,6
Cd	2,878±0,083	95,9	2,9
Co	2,882±0,038	104,1	1,3
Cr	2,888±0,066	96,3	2,3
Cu	3,114±0,088	103,8	2,8
Fe	3,118±0,058	103,9	1,9
K	14,55±0,38	97,0	2,6
Mg	2,921±0,072	97,4	2,5
Mn	3,248±0,088	108,3	2,7
Mo	3,222±0,104	107,4	3,2
Na	2,898±0,098	96,6	3,4
Ni	2,898±0,102	96,6	3,5
Pb	3,100±0,102	103,3	3,3
Se	2,844±0,068	94,8	2,4
Si	15,68±0,28	104,5	1,8
Zn	3,142±0,022	104,7	0,7

$$^a \text{Recovery} = \frac{\bar{x}}{\sim} \cdot 100; ^b RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$

Tačnost određivanja ispitivanih elemenata predloženim metodama se kreće od 93,4% za As do 108,3% za Mn a preciznost od 0,7% za B i Zn do 3,5% za Ni.

### 3.2.4 Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u razliitim uzorcima zrna žitarica, brašna i hleba

Žitarice, brašno i hleb predstavljaju, direktno ili indirektno, jednu od osnovnih komponenti ljudske ishrane, pa je i njihov uticaj na zdravlje ljudi veliki. Zbog značaja koje ove namirnice imaju u ljudskoj ishrani, potrebno je znati njihov mineralni sastav koji je i direktni indikator hranljive vrednosti ovih proizvoda kao i eventualnog zagađenja ovih proizvoda kao posledica zagađenja životne sredine ili posledica primenjenih agrotehničkih mera.

Danas je na tržištu zastupljen veliki broj različitih vrsta žitarica, brašna i hleba, pa je cilj ispitivanja pojedinih vrsta ovih proizvoda bio procena njihove hranljive vrednosti u smislu sadržaja makro i mikro elemenata. Tako je i upoređivanje sadržaja određenih elemenata u žitaricama kao osnovnom, i brašnu i hlebu kao finalnim proizvodima od žitarica, da bi se video da li postoje korelacije u sadržajima detektovanih elemenata između ovih tipova uzoraka. U cilju provere uticaja lokaliteta na kome se žitarice uzgajaju a na sadržaj makro i mikro elemenata, uzorci zrna žitarica su nabavljeni sa dva različita lokaliteta. Jedan lokalitet je predstavljaljao manje gazdinstvo u ruralnom području u okolini Babušnice, gde se žitarice gaje u manjim količinama za sopstvene potrebe, a drugi, veće gazdinstvo, u okolini Toponice, na kome se vrši industrijsko gajenje žitarica i taj lokalitet je u blizini industrijske zone i većih saobraćajnica. Lokaliteti su birani tako da bi se utvrdilo da li blizina industrijske zone i većih saobraćajnica kao i primenjene

agrotehni ke mere, uti u na sadržaje pojedinih detektovanih elemenata u uzorcima ispitivanih vrsta žitarica.

U ovom radu je analizirano 6 različitih vrsta žitarica (zrno), 5 vrsta brašna i 6 vrsta hleba. Uzorci brašna i hleba su nabavljeni od po dva različita proizvoda a prisutnih na niškom tržištu.

Primenom robusnih i optimalnih uslova plazme razvijene metode su primenjene za određivanje sadržaja 19 elemenata u uzorcima žitarica, brašna i hleba. U Tabelama od 26 do 34 je, za svaki od uzorka, prikazana srednja vrednost sadržaja elemenata od tri uzastopna merenja ± standardna devijacija (SD) za dva lokaliteta (žitarice) i od dva različita proizvoda (brašno i hleb) a u Tabelama od 36 do 38 pregled literaturnih podataka.

Tabela 26. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata ±SD ( $\mu\text{g/g}$ ) sa dva različita lokaliteta u uzorcima pojedinih vrsta žitarica

	Uzorak	Ca <sup>a</sup>	K <sup>a</sup>	Mg <sup>a</sup>	Na <sup>a</sup>
Pšenica	Babušnica	159,1±0,8	1749±5	316,7±4,6	257,2±3,1
	Toponica	171,2±1,3	1626±7	337,2±6,3	240,9±6,4
Ovas	Babušnica	240,1±0,4	2121±12	332,4±2,1	342,9±1,7
	Toponica	227,3±4,1	1994±10	353,7±8,1	322,7±3,3
Raž	Babušnica	172,3±1,5	2554±15	314,7±2,9	226,9±6,6
	Toponica	187,2±4,6	2361±17	296,3±6,8	238,7±4,7
Ječam	Babušnica	116,6±0,4	2095±17	387,8±4,9	277,7±2,3
	Toponica	124,1±4,1	2120±24	365,3±2,5	252,8±3,5
Kukuruz	Babušnica	191,6±1,2	1913±23	261,9±2,8	239,3±0,8
	Toponica	179,4±4,6	1839±18	284,7±3,3	261,9±4,7
Hlebida	Babušnica	113,1±0,3	2628±16	409,6±2,2	189,8±1,9
	Toponica	126,2±0,4	2455±19	390,8±1,8	194,4±2,1

<sup>a</sup> radikalno posmatranje plazme

Iz Tabela 26, 29 i 30 se može videti da, kada se uporede detektovani sadržaji makro i mikro elemenata u istom tipu žitarica ali sa različitim lokalitetom, postoji razlika u koncentraciji pojedinih grupa elemenata.

U grupi određivanih makro elemenata (*natrijum, kalijum, kalcijum i magnezijum*) u ispitivnim žitaricama, može se videti da postoji izvesna varijacija u njihovim sadržajima u zavisnosti od lokaliteta uzorka, ali to odstupanje ne pokazuje pravilnost prema lokalitetu (Tabela 26.). U nekim uzorcima detektovani sadržaj makro elemenata bio je veći na lokalitetu Babušnice za jedan tip žitarica dok je za drugi tip žitarica sadržaj tih istih makro elemenata bio veći na lokalitetu Toponice. Zbog takve nejednake raspodele, može se zaključiti da lokalitet na kome se uzgajaju žitarice kao i primjenjene agrotehničke mere mogu uticati na razlike u sadržaju Ca, K, Mg i Na u meri u kojoj tih metala ima u zemljištu a prema sposobnosti biljke da ih apsorbuje. Naime, razlike u sadržaju različitih vrsta brašna od dva različita proizvoda a a

Tabela 27. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima različitih vrsta brašna od dva različita proizvoda a a

Uzorak		Ca <sup>a</sup>	K <sup>a</sup>	Mg <sup>a</sup>	Na <sup>a</sup>
Belo tip 400	1	118,4 $\pm$ 0,4	804,3 $\pm$ 14,6	137,0 $\pm$ 1,8	127,1 $\pm$ 2,2
	2	107,2 $\pm$ 0,4	812,7 $\pm$ 23,1	124,9 $\pm$ 2,1	113,7 $\pm$ 1,8
Belo tip 500	1	131,9 $\pm$ 0,1	937,4 $\pm$ 4,8	167,3 $\pm$ 1,1	137,2 $\pm$ 4,1
	2	140,2 $\pm$ 0,1	950,3 $\pm$ 5,4	179,6 $\pm$ 1,4	141,3 $\pm$ 3,6
Celo zrno pšenice	1	166,2 $\pm$ 0,4	1730 $\pm$ 13	322,7 $\pm$ 3,9	163,7 $\pm$ 2,1
	2	172,6 $\pm$ 0,4	1679 $\pm$ 15	330,6 $\pm$ 2,4	176,4 $\pm$ 3,2
Kukuruzno Heljdino	1	163,9 $\pm$ 0,5	1555 $\pm$ 11	289,7 $\pm$ 2,9	127,2 $\pm$ 1,1
	2	166,3 $\pm$ 0,3	1509 $\pm$ 8	273,6 $\pm$ 1,3	134,1 $\pm$ 3,1
Heljdino	1	219,8 $\pm$ 0,3	2558 $\pm$ 14	508,6 $\pm$ 2,5	140,0 $\pm$ 3,2
	2	222,6 $\pm$ 0,7	2476 $\pm$ 27	486,3 $\pm$ 3,2	143,0 $\pm$ 2,4

<sup>a</sup> radikalno posmatranje plazme

Najveći sadržaj iz grupe makro elemenata u uzorcima zrna žitarica određen je za *kalijum* i kreće se od 1626  $\mu\text{g/g}$  kod pšenice do 2628  $\mu\text{g/g}$  kod uzorka heljde. Sadržaj *magnezijuma* se kreće od 261,9  $\mu\text{g/g}$  (kukuruz) do 409,6  $\mu\text{g/g}$  (heljda). Najniži sadržaj od svih detektovanih makro elemenata u uzorcima zrna žitarica je određen za *kalcijum* i kreće se od 113,1  $\mu\text{g/g}$

(heljda) do 240,1 µg/g (ovas). Najve i sadržaj K a najmanji Ca u ovom tipu namirnica potvr uju i literaturni podaci dati u Teorijskom delu. Kod uzorka brašna može se zapaziti da je sadržaj svih makro elemenata znatno niži u odnosu na koncentracije ovih elemenata koje su odreene u zrnu ispitivanih žitarica, što može biti posledica toga što se u procesu proizvodnje brašna ne koriste svi delovi zrna žitarice, što ima direktni uticaj i na sadržaj makro elemenata u brašnu [122]. Ova razlika u sadržajima se najbolje može uočiti ako se uporede koncentracije makro elemenata u uzorcima različitog tipa pšenične noge brašna. Iz Tabele 27 se može videti da je najviše ovih elemenata detektovano u brašnu od celog zrna pšenice u odnosu na belo brašno tip 500 i tip 400. Tako su sadržaji ovih elemenata u zrnu pšenice bili približno isti sa onima koji su detektovani u brašnu od celog zrna pšenice.

Tabela 28. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata ±SD (µg/g)  
u uzorcima različitih vrsta hleba od dva različita proizvoda

	Uzorak	Ca <sup>a</sup>	K <sup>a</sup>	Mg <sup>a</sup>	Na <sup>a</sup>
Beli	1	142,8±0,4	808,9±4,1	164,5±3,2	6556±50
	2	136,5±0,4	814,3±12,3	171,1±6,4	6288±112
Raženi	1	165,2±0,8	899,7±6,7	309,1±6,2	8598±143
	2	157,2±0,2	874,3±5,4	316,4±4,1	8652±110
Crni	1	123,1±0,8	752,5±7,4	177,6±2,1	6617±122
	2	129,4±0,4	771,9±9,1	181,3±9,3	6803±134
Polubeli	1	119,1±0,6	724,9±4,4	164,3±2,4	7198±83
	2	121,6±0,4	732,3±5,4	166,3±8,1	7067±74
Kukuruzni	1	171,3±1,5	933,1±5,9	139,0±1,4	8467±98
	2	167,4±3,7	959,4±6,3	142,6±3,8	8252±101
Pšenični, ovsani i raženi	1	163,0±0,6	914,5±6,1	331,4±2,9	9432±162
	2	159,6±2,5	901,9±7,2	327,6±3,5	9289±129

<sup>a</sup> radikalno posmatranje plazme

U uzorcima brašna sadržaj makro elemenata prati raspored sadržaja koji ovi elementi imaju u zrnu žitarica pa tako najviše ima kalijuma pa magnezijuma, potom natrijuma i na kraju

*kalcijuma.* U uzorcima hleba sadržaji K, Mg i Ca su slični sadržajima koje ovi elementi imaju u uzorcima brašna od kojih je određena vrsta hleba napravljena, sa izuzetkom Na, koji su sadržaji u hlebu znatno povišeni u odnosu na sadržaje ovog elementa koji su detektovani kako u zrnu žitarice tako i u brašnu. Sadržaj ovog makro elementa kreće se od 6288 µg/g u belom hlebu do 9432 µg/g u hlebu od mešavine pšenice, raži i ovasa. Ovo može biti posledica dodavanja soli kao integralnog sastojaka prilikom proizvodnje hleba, što direktno utiče i na povišeni nivo detektovanog Na u uzorcima hleba u odnosu na brašno i zrno žitarica [122]. Pored soli prilikom proizvodnje hleba, testu se dodaju sredstva za nadolaženje kao što su natrijum-bikarbonat i kalcijum-karbonat, a u cilju konzervisanja mogu se dodavati natrijumove, kalijumove i kalcijumove soli sir etne, propionske i sorbinske kiseline [123]. Upotreboom navedenih aditiva i konzervanasa u procesu proizvodnje hleba, može se povećati sadržaj kako Na tako i ostalih makro elemenata.

Na osnovu određenog sadržaja makro elemenata u ispitivanim uzorcima u ovom radu, a imajući u vidu potrebne dnevne količine ovih makronutrijenata (Tabela 8.), može se zaključiti da žitarice, brašno i hleb sadrže makro elemente u koncentracijama, koje su dovoljne da se redovnom upotreboom brašna i hleba kao finalnih proizvoda od žitarica u organizam može unositi deo neophodnih količina ovih nutrijenata.

**Tabela 29. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
sa dva različita lokaliteta u uzorcima pojedinih vrsta žitarica**

	Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn
Pšenica	Babušnica	1,002 $\pm$ 0,001*	0,0545 $\pm$ 0,0009*	0,0322 $\pm$ 0,0009*	3,452 $\pm$ 0,041	20,15 $\pm$ 0,03	19,98 $\pm$ 0,12	0,4521 $\pm$ 0,0022	0,5171 $\pm$ 0,0015*	0,0728 $\pm$ 0,0015*	23,18 $\pm$ 0,49	14,00 $\pm$ 0,02
	Toponica	0,1222 $\pm$ 0,0161*	0,0341 $\pm$ 0,0011*	0,1251 $\pm$ 0,0015*	6,581 $\pm$ 0,017	35,32 $\pm$ 0,48	22,31 $\pm$ 0,92	0,5872 $\pm$ 0,0013	0,6223 $\pm$ 0,0011*	nd	19,56 $\pm$ 1,33	36,21 $\pm$ 9,78
Ovas	Babušnica	0,3231 $\pm$ 0,0013*	0,0192 $\pm$ 0,0014*	0,0753 $\pm$ 0,0007*	4,292 $\pm$ 0,012	22,53 $\pm$ 0,52	34,96 $\pm$ 0,20	0,3744 $\pm$ 0,0018	5,782 $\pm$ 0,005	0,0412 $\pm$ 0,0014*	11,76 $\pm$ 0,17	23,40 $\pm$ 0,08
	Toponica	0,2828 $\pm$ 0,0017*	0,0268 $\pm$ 0,0013*	0,4854 $\pm$ 0,0121*	7,581 $\pm$ 0,152	28,71 $\pm$ 1,14	29,51 $\pm$ 0,86	0,4267 $\pm$ 0,0011	5,201 $\pm$ 0,004	0,0385 $\pm$ 0,0009*	13,25 $\pm$ 0,61	42,67 $\pm$ 2,53
Raž	Babušnica	0,5812 $\pm$ 0,0014*	0,0296 $\pm$ 0,0014*	0,0824 $\pm$ 0,0011*	3,282 $\pm$ 0,013	12,18 $\pm$ 0,19	9,142 $\pm$ 0,012	0,4909 $\pm$ 0,0043	0,4874 $\pm$ 0,0014*	0,0602 $\pm$ 0,0016*	7,572 $\pm$ 0,191	14,74 $\pm$ 0,06
	Toponica	0,5511 $\pm$ 0,0191*	0,0357 $\pm$ 0,0012*	0,2612 $\pm$ 0,0012*	6,734 $\pm$ 0,271	20,02 $\pm$ 0,51	11,63 $\pm$ 0,13	0,3873 $\pm$ 0,0026	0,5263 $\pm$ 0,0017*	0,0373 $\pm$ 0,0011*	5,224 $\pm$ 0,172	29,17 $\pm$ 1,18
Je am	Babušnica	0,9962 $\pm$ 0,0012*	0,0159 $\pm$ 0,0008*	0,0831 $\pm$ 0,0013*	3,992 $\pm$ 0,012	18,69 $\pm$ 0,08	7,251 $\pm$ 0,013*	0,2924 $\pm$ 0,0021	0,4591 $\pm$ 0,0021*	0,0418 $\pm$ 0,0014*	5,083 $\pm$ 0,081	11,96 $\pm$ 0,09
	Toponica	1,561 $\pm$ 0,015*	0,0136 $\pm$ 0,0004*	0,7636 $\pm$ 0,0181*	7,061 $\pm$ 0,111	24,38 $\pm$ 0,54	6,712 $\pm$ 0,272*	0,3817 $\pm$ 0,0014	0,6271 $\pm$ 0,0016*	nd	6,122 $\pm$ 0,211	30,02 $\pm$ 1,14
Kukuruz	Babušnica	1,343 $\pm$ 0,013*	0,0331 $\pm$ 0,0016*	0,1152 $\pm$ 0,0012*	3,452 $\pm$ 0,013	21,32 $\pm$ 0,41	8,931 $\pm$ 0,017	0,1805 $\pm$ 0,0040*	0,4239 $\pm$ 0,0024*	nd	10,64 $\pm$ 0,40	18,42 $\pm$ 0,12
	Toponica	1,781 $\pm$ 0,017*	0,0487 $\pm$ 0,0013*	0,6643 $\pm$ 0,0131*	6,124 $\pm$ 0,271	25,63 $\pm$ 1,32	7,223 $\pm$ 0,532*	0,1653 $\pm$ 0,0021*	0,3758 $\pm$ 0,0017*	nd	8,411 $\pm$ 0,323	43,51 $\pm$ 2,74
Hejda	Babušnica	2,692 $\pm$ 0,011*	0,0482 $\pm$ 0,0008*	0,0861 $\pm$ 0,0012*	5,492 $\pm$ 0,012	18,23 $\pm$ 0,12	8,554 $\pm$ 0,052*	0,2709 $\pm$ 0,0036*	4,077 $\pm$ 0,004	nd	6,752 $\pm$ 0,261	13,90 $\pm$ 0,06
	Toponica	2,912 $\pm$ 0,120*	0,0364 $\pm$ 0,0017*	0,1831 $\pm$ 0,0015*	8,412 $\pm$ 0,363	22,76 $\pm$ 0,34	9,132 $\pm$ 0,661	0,2551 $\pm$ 0,0025*	4,229 $\pm$ 0,002	nd	8,613 $\pm$ 0,441	31,76 $\pm$ 3,58

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Za razliku od makro elemenata, pravilnost u odstupanju u sadržaju detektovanih mikro elemenata u ispitivanim žitaricama a prema lokalitetu, zabeležena je za sledeće metale: Fe, Zn, Cu, Pb i Cd. Sadržaj gvožđa se na području Toponice, za sve ispitivane vrste žitarica, kreće od 20,02 do 35,32 µg/g što je oko 20 do 50 % više, prema vrsti žitarica, u odnosu na sadržaje ovog elemenata koji su detektovani na području Babušnice. Razlika u sadržaju detektovanog gvožđa na istom lokalitetu Toponice, a u drugom tipu žitarica može biti posledica različite sposobnosti ovih biljnih vrsta ka usvajanju ovog metala. Tako je najveći i sadržaj željeza na području Toponice detektovan kod zrna pšenice a najniži u zrnu raži (Tabela 29.). Sadržaj cinka na lokalitetu Toponice se u uzorcima žitarica kreće od 29,17 do 43,51 µg/g a bakra od 6,124 do 8,412 µg/g. U radu Škrbić i Onija [124] sadržaj ova dva elementa u uzorcima zrna pšenice se kretao od 26,6 do 44,3 µg/g za Zn odnosno od 3,61 do 7,64 µg/g za Cu, što je u skladu sa vrednostima koji su u ovom radu i detektovani u zrnu pšenice. Povišeni sadržaji ova dva elementa (Zn i Cu) u svim ispitivanim vrstama žitarica na lokalitetu Toponice u odnosu na lokalitet Babušnice mogu biti posledica korištenja agrotehničnih mera (ubriva i pesticidi) koji su na bazi jedinjenja cinka i bakra, jer oblast Toponice predstavlja gazdinstvo na kome se vrši industrijska proizvodnja žitarica pa je i upotreba ovih mera na ovom lokalitetu u estaliji nego u oblasti Babušnice. Najčešći se kao neorganska ubriva koriste cink-oksid, cink-sulfat i helatni kompleksi cinka, bakar(II)-hlorid i bakar(II)-sulfat dok se kao pesticidi koriste cink-hlorid i cink-acetat, bakar-amonijum-karbonat i bakar-hidroksid [125, 126].

Tabela 30. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$  SD ( $\mu\text{g/g}$ ) sa dva različita lokaliteta u uzorcima pojedinih vrsta žitarica

	Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Pšenica	Babušnica	57,42 $\pm$ 0,06	nd	0,0408 $\pm$ 0,0009*	nd
	Toponica	68,52 $\pm$ 0,24	nd	0,2381 $\pm$ 0,0012*	0,3581 $\pm$ 0,0012*
Ovas	Babušnica	103,1 $\pm$ 0,9	nd	0,0265 $\pm$ 0,0008*	nd
	Toponica	98,24 $\pm$ 3,36	nd	0,1781 $\pm$ 0,0011*	0,2342 $\pm$ 0,0008*
Raž	Babušnica	38,60 $\pm$ 0,63	nd	0,0329 $\pm$ 0,0008*	nd
	Toponica	42,26 $\pm$ 2,15	nd	0,1987 $\pm$ 0,0003*	0,6223 $\pm$ 0,0012*
Ječam	Babušnica	70,94 $\pm$ 0,13	nd	0,0195 $\pm$ 0,0014*	nd
	Toponica	65,72 $\pm$ 0,67	nd	0,0995 $\pm$ 0,0017*	0,5732 $\pm$ 0,0006*
Kukuruz	Babušnica	76,71 $\pm$ 0,32	nd	0,0378 $\pm$ 0,0016*	nd
	Toponica	69,22 $\pm$ 3,47	nd	0,2167 $\pm$ 0,0015*	nd
Heljda	Babušnica	43,53 $\pm$ 0,37	nd	0,0198 $\pm$ 0,0008*	nd
	Toponica	57,61 $\pm$ 0,23	nd	0,1264 $\pm$ 0,0012*	nd

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

U svim ispitivanim uzorcima zrna žitarica, na oba lokaliteta, detektovano je prisustvo teškog metala *kadmijuma* u količinama koje su bile ispod LOD-a primenjene metode. Može se iz Tabele 30 videti da su koncentracije Cd u uzorcima koji potiču sa lokaliteta Toponice za oko 10 puta veće nego one koje su određene u uzorcima zrna žitarica sa lokaliteta Babušnice. Ovakva razlika u sadržaju detektovanog kadmijuma u istoj vrsti žitarice a sa različitim lokalitetima, potvrđuje da izduvni gasovi iz industrijskih postrojenja i motornih vozila mogu dovesti do povećanja sadržaja ovog kontaminanta u žitaricama. Škrbić i Onija su takođe pokazali da količina kadmijuma koju su detektivali u uzorcima zrna pšenice zavisi od lokaliteta na kome se ova biljna vrsta uzgaja [124]. Za razliku od kadmijuma, olovo nije detektovano u uzorcima kukuruza i heljde, dok je u ostalim žitaricama ovaj metal detektovan jedino na lokalitetu Toponice i to u količinama ispod LOD-a primenjene metode. Sadržaj olova bio je veći u poređenju sa sadržajem kadmijuma u istom tipu žitarice i na istom lokalitetu, što je u skladu sa rezultatima Škrbić i Onije [124]. Sadržaji olova i kadmijuma u ispitivanim uzorcima žitarica jesu niski i ispod propisanih količina u Pravilnikom RS [71], ali imaju i u vidu toksičnosti i kumulativnog efekta koji ovi metali mogu imati u ljudskom organizmu, neophodno je stalno pravljene i određivanje sadržaja ovih metala u žitaricama.

Tabela 31. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima različitih vrsta brašna od dva različita proizvoda a a

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Belo tip 400	1	0,2931 $\pm$ 0,0011*	0,1061 $\pm$ 0,0016*	0,0312 $\pm$ 0,0051*	1,563 $\pm$ 0,024*	7,901 $\pm$ 0,162	3,092 $\pm$ 0,061*	0,4511 $\pm$ 0,0038	0,2006 $\pm$ 0,0016*	nd	5,242 $\pm$ 0,112	2,931 $\pm$ 0,111
	2	0,2682 $\pm$ 0,0581*	0,0929 $\pm$ 0,0009*	0,0593 $\pm$ 0,0023*	1,281 $\pm$ 0,013*	8,262 $\pm$ 0,353	2,773 $\pm$ 0,262*	0,2000 $\pm$ 0,0024*	0,3201 $\pm$ 0,0015*	nd	6,032 $\pm$ 0,181	2,583 $\pm$ 0,212
Belo tip 500	1	0,2713 $\pm$ 0,0012*	0,1100 $\pm$ 0,0016*	0,0702 $\pm$ 0,0017*	2,247 $\pm$ 0,113*	10,30 $\pm$ 0,41	5,584 $\pm$ 0,015*	0,3817 $\pm$ 0,0032	0,6832 $\pm$ 0,0024*	nd	5,133 $\pm$ 0,028	5,921 $\pm$ 0,742
	2	0,7912 $\pm$ 0,0121*	0,1239 $\pm$ 0,0009*	0,0862 $\pm$ 0,0039*	2,633 $\pm$ 0,017*	9,171 $\pm$ 0,233	6,122 $\pm$ 0,019*	0,4254 $\pm$ 0,0024	0,3599 $\pm$ 0,0025*	0,1549 $\pm$ 0,0016*	4,744 $\pm$ 0,016	6,051 $\pm$ 0,264
Celo zrnopšenice	1	0,6483 $\pm$ 0,0011*	0,1354 $\pm$ 0,0073*	0,0331 $\pm$ 0,0013*	2,964 $\pm$ 0,019*	15,06 $\pm$ 0,77	13,66 $\pm$ 0,42	0,2346 $\pm$ 0,0039*	0,9018 $\pm$ 0,0032*	0,0806 $\pm$ 0,0015*	5,341 $\pm$ 0,122	10,35 $\pm$ 0,32
	2	1,829 $\pm$ 0,015*	0,1526 $\pm$ 0,0025*	0,0432 $\pm$ 0,0015*	3,121 $\pm$ 0,131*	16,12 $\pm$ 0,61	12,54 $\pm$ 0,27	0,2126 $\pm$ 0,0028*	0,7235 $\pm$ 0,0018*	0,0732 $\pm$ 0,0012*	6,221 $\pm$ 0,472	11,27 $\pm$ 0,43
Kukuruzno	1	0,5645 $\pm$ 0,0027*	0,1202 $\pm$ 0,0015*	0,0574 $\pm$ 0,0016*	2,652 $\pm$ 0,101*	14,51 $\pm$ 0,33	5,023 $\pm$ 0,014*	0,2159 $\pm$ 0,0022*	0,9837 $\pm$ 0,0022*	nd	7,145 $\pm$ 0,232	13,08 $\pm$ 0,97
	2	1,751 $\pm$ 0,033*	0,1285 $\pm$ 0,0007*	0,0312 $\pm$ 0,0012*	2,147 $\pm$ 0,029*	15,37 $\pm$ 0,59	4,723 $\pm$ 0,122*	0,1936 $\pm$ 0,0018*	0,8842 $\pm$ 0,0017*	nd	6,712 $\pm$ 0,161	12,68 $\pm$ 0,64
Hlejdro	1	1,636 $\pm$ 0,002*	0,0597 $\pm$ 0,0014*	0,0774 $\pm$ 0,0011*	4,552 $\pm$ 0,012	27,76 $\pm$ 0,52	12,01 $\pm$ 0,17	0,3333 $\pm$ 0,0043	3,621 $\pm$ 0,011	nd	7,794 $\pm$ 0,113	10,58 $\pm$ 0,63
	2	1,326 $\pm$ 0,001*	0,0721 $\pm$ 0,0011*	0,0683 $\pm$ 0,0027*	4,284 $\pm$ 0,015	26,12 $\pm$ 0,67	11,67 $\pm$ 0,22	0,3572 $\pm$ 0,0036	3,884 $\pm$ 0,015	nd	6,821 $\pm$ 0,481	11,29 $\pm$ 0,76

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 32. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima različitih vrsta hleba od dva različita proizvoda a a

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Beli	1	0,2151 $\pm$ 0,0013*	0,0834 $\pm$ 0,0012*	0,0371 $\pm$ 0,0012*	1,351 $\pm$ 0,012	5,893 $\pm$ 0,231	2,241 $\pm$ 0,019*	0,3023 $\pm$ 0,0024	0,2039 $\pm$ 0,0018*	0,6523 $\pm$ 0,0023	9,301 $\pm$ 0,161	3,052 $\pm$ 0,141
	2	0,3812 $\pm$ 0,0016*	0,0883 $\pm$ 0,0015*	0,0862 $\pm$ 0,0015*	1,272 $\pm$ 0,015	5,662 $\pm$ 0,322	2,762 $\pm$ 0,121*	0,2845 $\pm$ 0,0017	0,2174 $\pm$ 0,0028*	0,6773 $\pm$ 0,0017	8,892 $\pm$ 0,231	3,171 $\pm$ 0,019
Raženi	1	0,2012 $\pm$ 0,0012*	0,2534 $\pm$ 0,004*	0,0353 $\pm$ 0,0011*	2,241 $\pm$ 0,013	14,92 $\pm$ 0,17	6,753 $\pm$ 0,026*	nd	0,6189 $\pm$ 0,0012*	0,6224 $\pm$ 0,0022	47,38 $\pm$ 1,65	6,941 $\pm$ 0,373
	2	0,1733 $\pm$ 0,0011*	0,2218 $\pm$ 0,006*	0,0541 $\pm$ 0,0014*	2,174 $\pm$ 0,012	15,62 $\pm$ 0,31	5,274 $\pm$ 0,013*	nd	0,6304 $\pm$ 0,0009*	0,5923 $\pm$ 0,0016	45,17 $\pm$ 2,32	7,032 $\pm$ 0,611
Crm	1	0,1384 $\pm$ 0,0024*	0,0350 $\pm$ 0,0012*	0,0421 $\pm$ 0,0013*	1,551 $\pm$ 0,012	8,654 $\pm$ 0,112	3,661 $\pm$ 0,012*	0,4001 $\pm$ 0,0018	0,5384 $\pm$ 0,0013*	nd	18,81 $\pm$ 1,01	5,784 $\pm$ 0,221
	2	0,6141 $\pm$ 0,0019*	0,0283 $\pm$ 0,0007*	0,0276 $\pm$ 0,0021*	1,292 $\pm$ 0,011	9,271 $\pm$ 0,341	3,023 $\pm$ 0,017*	0,3743 $\pm$ 0,0021	0,5172 $\pm$ 0,0005*	nd	19,17 $\pm$ 1,67	5,512 $\pm$ 0,421
Polubeli	1	0,0442 $\pm$ 0,0021*	0,1671 $\pm$ 0,0022*	0,0823 $\pm$ 0,0012*	1,604 $\pm$ 0,014	7,701 $\pm$ 0,042	3,335 $\pm$ 0,012*	nd	0,4320 $\pm$ 0,0022*	nd	5,322 $\pm$ 0,213	5,813 $\pm$ 0,761
	2	0,1034 $\pm$ 0,0015*	0,1458 $\pm$ 0,0013*	0,1092 $\pm$ 0,0111*	1,473 $\pm$ 0,012	6,961 $\pm$ 0,073	3,871 $\pm$ 0,016*	nd	0,4783 $\pm$ 0,0018*	nd	5,061 $\pm$ 0,321	6,031 $\pm$ 0,441
Kukuruzni	1	0,1783 $\pm$ 0,0012*	nd	0,0801 $\pm$ 0,0012*	1,942 $\pm$ 0,011	6,365 $\pm$ 0,321	1,973 $\pm$ 0,011*	nd	0,5558 $\pm$ 0,0035*	nd	10,72 $\pm$ 0,22	3,804 $\pm$ 0,091
	2	0,2644 $\pm$ 0,0018*	nd	0,0734 $\pm$ 0,0012*	1,741 $\pm$ 0,014	5,731 $\pm$ 0,412	2,234 $\pm$ 0,012*	nd	0,5621 $\pm$ 0,0027*	nd	9,944 $\pm$ 0,673	3,451 $\pm$ 0,122
Pšenični, ovsani i raženi	1	1,551 $\pm$ 0,004*	nd	0,0981 $\pm$ 0,0014*	2,527 $\pm$ 0,018	13,43 $\pm$ 0,79	5,071 $\pm$ 0,143*	nd	0,6595 $\pm$ 0,0026*	nd	42,16 $\pm$ 2,12	7,772 $\pm$ 0,541
	2	1,262 $\pm$ 0,007*	nd	0,1431 $\pm$ 0,0012*	3,081 $\pm$ 0,192	11,57 $\pm$ 0,92	4,851 $\pm$ 0,111*	nd	0,6247 $\pm$ 0,0012*	nd	39,54 $\pm$ 6,12	7,311 $\pm$ 0,321

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Iz Tabele 29 se može videti da je sadržaj *bakra*, na podruju Babušnice, u zrnu pšenice, raži i kukuruza približno isti i kreće se od 3,282 µg/g do 3,452 µg/g. Količina ovog elementa je u zrnu ovasa i heljde veća i kreće se od 4,292 µg/g do 5,492 µg/g. Irina i saradnici [127] su u uzorcima zrna pšenice detektovali 6,53 µg/g odnosno 4,99 µg/g Cu u zrnu raži, što je negde oko 1,5 puta više nego u ovom radu, dok su rezultati ovog rada u sadržaju Cu približno isti sa koncentracijom ovog metala određenog u radu Škrbić i Onije [124] gde se kretao oko 3,61 µg/g. Sadržaj Cu u uzorcima različitih tipova brašna je ispod LOD-a metode osim kod brašna od heljde gde je detektovano oko 4,552 µg/g ovog metala. U uzorcima hleba sadržaj Cu se kreće od 1,272 µg/g (beli hleb) do 3,081 µg/g (mešavina pšenice, raži i ovasa). Demirouz i saradnici [128] su u svom radu detektovali oko 1,3 µg/g Cu u belom hlebu što je u skladu sa našim rezultatima. Bakar spada u grupu esencijalnih elemenata, ali ako se unosi hranom u koncentracijama koje su veće od preporučenih (1 mg), njegovo dejstvo može biti i štetno. Zato je važno da se prati sadržaj ovog metala u uzorcima žitarica, brašna i hleba.

Sadržaj Fe je u ispitivanim uzorcima zrna žitarica dosta ujednačen i kreće se negde oko 20 µg/g, jedino je kod raži taj sadržaj 12,18 µg/g. Škrbić i Onija [124] su detektovali od 53,1 do 165 µg/g Fe, dok su Irina i saradnici [127] detektovali 53,61 µg/g ovog elementa u uzorcima pšenice, što je oko 2 puta više nego u ovom radu. Najveći sadržaj gvožđa u uzorcima brašna detektovan je kod brašna od heljde i iznosi 27,76 µg/g, dok je najmanji sadržaj Fe u ovoj grupi uzoraka detektovan kod belog brašna tipa 400 i iznosi 7,901 µg/g. Najveći sadržaj Fe je određen u uzorcima hleba od raži i mešavine pšenice, raži i ovasa a najmanji u uzorku belog hleba. Kako je sadržaj ovog, u ishrani ljudi važnog metala, najmanji u hlebu u poređenju sa žitaricama i brašnom, može se preporučiti da se prilikom prozvodnje hleba vrši njegovo obogaćivanje gvožđem korišćenjem celih zrna žitarica ili nekim prirodnim proizvodima koji su bogati ovim nutrijentom. Od biljaka koje su bogate gvožđem posebno se izdvajaju kopriva (*Urtica dioica L.*) i Šarplaninski žitnjak (*Sideritis scardica Griseb.*). Ove biljne vrste kao i njihovi ekstrakti mogu se dodavati hlebu ili brašnu u cilju obogaćivanja ovih proizvoda od žitarica, gvožđem. Na ovaj način se sadržaj Fe u hlebu može povećati i time zadovoljiti dnevne potrebe organizma za ovim elementom, a takođe se može izvršiti prevencija pojave pojedinih bolesti, koje mogu nastati usled nedostatka Fe u ljudskom organizmu, kao što je anemija. Radi boljeg usvajanja Fe, brašnu se može dodavati i šipurak (*Cynosbati fructus*), bilo u sirovom stanju ili kao ekstrakt. Proizvodi od žitarica bi na ovaj način postali funkcionalna hrana, koji bi pored svoje hranljive vrednosti imali i pozitivno dejstvo na zdravlje ljudi [129].

U analiziranim uzorcima zrna pšenice, raži i heljde sadržaj Zn je približno isti i kreće se od 13,90 µg/g do 14,74 µg/g, dok je najveći sadržaj ovog elementa detektovan u ovatu i iznosi 23,40 µg/g. Irina i saradnici [127] su uzorcima zrna pšenice detektovali 4 puta više a u uzorcima zrna raži 3 puta više cinka što može biti posledica lokaliteta na kome su uzgajani ispitivani uzorci. Prisustvo ovog metala u žitaricama može biti posledica sposobnosti da biljke akumuliraju cink kako iz zemljišta tako i preko upotrebljenih agrotehničkih mera (ubrivo i pesticidi) koje sadrže jedinjenje ovog elementa [130]. Najmanje Zn u uzorcima brašna detektovano je kod belog brašna tip 400 (2,583 µg/g) dok je najviše cinka određeno kod brašna od kukuruza (13,08 µg/g). Kod uzoraka hleba, najviše cinka određeno je kod hleba od pšenice, raži i ovasa pri čemu je sadržaj ovog metala 7,772 µg/g.

Sadržaj *bora*, *kobalta* i *nikla* je u ispitivanim uzorcima žitarica, brašna i hleba ispod LOD-a primenjene metode, dok je sadržaj Mn veći u žitaricama u poređenju sa uzorcima brašna i hleba. Prilikom tretmana žitarica tako se koriste pesticidi na bazi manganovih jedinjenja (mangan-

sulfat i mangan-oksid) [126], što ima za posledicu pojavu povišenih sadržaja ovog metala u žitaricama. *Selen* je element koji je u ispitivanim uzorcima žitarica i njihovih proizvoda određen ili u niskim koncentracijama ili nije detektovan.

Tabela 33. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$  SD( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima različitih vrsta brašna od dva različita proizvođača

	Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Belo tip 400	1	35,34 $\pm$ 0,12	nd	nd	nd
	2	38,22 $\pm$ 0,17	nd	nd	nd
Belo tip 500	1	42,59 $\pm$ 0,17	nd	0,0364 $\pm$ 0,0009*	nd
	2	41,37 $\pm$ 0,26	nd	0,0296 $\pm$ 0,0016*	nd
Celo zrno pšenice	1	49,88 $\pm$ 0,11	nd	nd	nd
	2	52,61 $\pm$ 0,43	nd	nd	nd
Kukuruzno Heljokino	1	58,79 $\pm$ 0,20	nd	0,0151 $\pm$ 0,0008*	nd
	2	56,22 $\pm$ 0,37	nd	0,0142 $\pm$ 0,0011*	nd
	1	19,37 $\pm$ 0,34	nd	0,0247 $\pm$ 0,0014*	nd
	2	21,04 $\pm$ 0,34	nd	0,0215 $\pm$ 0,0005*	nd

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 34. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima različitih vrsta hleba od dva različita proizvoda

	Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Beli	1	17,91 $\pm$ 0,10	nd	0,0427 $\pm$ 0,0007*	nd
	2	22,25 $\pm$ 0,17	nd	0,0306 $\pm$ 0,0011*	nd
Raženi	1	26,08 $\pm$ 0,12	nd	0,0527 $\pm$ 0,0013*	nd
	2	25,71 $\pm$ 0,43	nd	0,0483 $\pm$ 0,0009*	nd
Crni	1	26,45 $\pm$ 0,33	nd	0,0570 $\pm$ 0,0021*	nd
	2	28,27 $\pm$ 0,61	nd	0,0483 $\pm$ 0,0012*	nd
Polubeli	1	21,58 $\pm$ 0,19	nd	0,0636 $\pm$ 0,0072*	nd
	2	19,75 $\pm$ 0,43	nd	0,0581 $\pm$ 0,0051*	nd
Kukuruzni	1	26,73 $\pm$ 0,62	nd	0,0699 $\pm$ 0,0013*	nd
	2	28,66 $\pm$ 0,43	nd	0,0610 $\pm$ 0,0009*	nd
Pšenični, ovsani i raženi	1	35,21 $\pm$ 0,48	nd	0,0815 $\pm$ 0,0007*	nd
	2	37,34 $\pm$ 0,62	nd	0,0753 $\pm$ 0,0005*	nd

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

*Aluminijum* je metal koji spada u grupu neesencijalnih elemenata. U uzorcima žitarica sadržaj Al se kreće u rasponu od 38,60  $\mu\text{g/g}$  (raž) do 103,1  $\mu\text{g/g}$  (ovas). Irina i saradnici [127] su prilikom određivanja metala u različitim delovima pšenice, odredili sadržaj Al u zrnu pšenice od 17,9  $\mu\text{g/g}$  što je negde oko 3 puta niži sadržaj nego u našem radu. U ispitivanim uzorcima brašna najniži sadržaj aluminijuma određen je u brašnu od heljde i to 19,37  $\mu\text{g/g}$ , dok je najviši sadržaj ovog metala detektovan u brašnu od kukuruza - 58,79  $\mu\text{g/g}$  (Tabela 33.). Sadržaj Al u uzorcima hleba kreće se od 17,91  $\mu\text{g/g}$  u belom hlebu do 37,34  $\mu\text{g/g}$  u hlebu od mešavine pšenice, raži i ovase. Kada se uporede detektovani sadržaji aluminijuma prema grupi ispitivanih uzoraka može se videti da sadržaj ovog metala opada od zrna žitarica preko brašna do hleba. Aluminijum koji je detektovan u brašnu i hlebu pored toga vodi poreklo od žitarica koje predstavljaju njihovu osnovu, tako da može biti i posledica procesa proizvodnje i pakovanja ovih hranljivih proizvoda.

Toksični elementi *arsen* i *olovo* u svim ispitivanim uzorcima brašna i hleba nisu detektovani, dok je sadržaj *kadmijuma* detektovan u pojedinim uzorcima ispod LOD-a metode.

Upore ivanjem sadržaja svih detektovanih elemenata u uzorcima belog brašna od pšenice sa uzorcima brašna od celog zrna pšenice može se videti da je sadržaj znatno niži u obe vrste belog brašna. Iz tog razloga se, u smislu hranljive vrednosti, preporu uje upotreba tzv. integralnog brašna u odnosu na razli ite tipove belog brašna.

### 3.2.5 Sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima brašna

U uzorcima brašna pored sadržaja makro i mikro elemenata odre en je i sadržaj vlage. Odre ivanje procenta vlage u brašnu je važno, ne samo zbog procene njegove komercijalne vrednosti, nego i zbog injenice da ako nivo vlage prekora i propisane limite, pove ava se aktivnost enzima, što može dovesti do neželjenih procesa u samom brašnu koji ubrzavaju razvoj mikroorganizama i gljivica što može dovesti do toga da brašno ne e više biti dobro za upotrebu [122]. Procenat vlage u ispitivanim uzorcima brašna dat je u Tabeli 35.

Tabela 35. Procenat vlage u ispitivanim uzorcima brašna

Brašno	Vlaga (%)
Belo tip 400	11,19
Belo tip 500	11,06
Celo zrno pšenice	10,67
Kukuruzno	10,16
Heljdino	11,03

Procenat vlage u uzorcima brašna se kre e od 10,16 do 11,19 što je u skladu sa pravilnikom RS koji propisuje maksimalnu vrednost vlage do 15 % [123].

Tabela 36. Literarni pregled odredjivanih sadržaja makro i mikro elemenata u uzorcima žitarica izražen u µg/g

Makroelementi										
Uzorak	Poreklo	Ca	K	Mg	Na	Lit.				
Kukuruz	U.S.	28	900	85	1010	[117]				
Ovas	Finska	500±4	3970±1	1540±1	-	[131]				
Pšenica		363±0,4	-	1270±1,2	-	[44]				
Pšenica	Poljska	331-610	3320-4100	1120-1400	69,8-436	[132]				
Pšenica	Norveška	714±301	2230±706	2020±390	60,5±14,6	[127]				
Pšenica	Kina	978	13029	5320	-	[133]				
Raž	Norveška	530±45	2510±260	1310±146	127±6	[127]				
Mikroelementi										
Uzorak		Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Lit.	
Heljda	Slovenija	0,1±0,00002	0,1±0,0002	-	80,2±0,08	-	1,7±0,03	0,04±0,001	26,7±0,03	[134]
Ovas	Švedska	-	-	-	75±1,0	55±1,9	-	-	46±0,2	[135]
Pšenica	Australija	<0,01-0,03	<0,035-0,03	12,4±0,20	134±2,12	111±1,68	0,6±0,05	-	82,3±1,42	[136]
Pšenica	Kina	-	-	22,0	100,5	109,8	-	-	86,3	[133]
Pšenica	Srbija	-	-	3,61-7,64	53,1-165	37,0-88,4	-	-	26,6-44,3	[124]
Raž	Poljska	-	-	3,0±0,003	-	25,2±0,03	-	0,2±0,001	20,9±0,03	[137]
Kukuruz	Australija	-	-	2,6±0,08	25,4±0,07	7,8±0,02	-	-	24,5±0,07	[136]
Mikroelementi										
Uzorak		Al	As	B	Sn	Lit.				
Heljda	Slovenija	-	-	-	<0,001	[134]				
Pšenica	Australija	0,3±0,01	-	-	-	[136]				
Pšenica	Norveška	17,9±7,5	0,005±0,003	1,11±0,44	-	[127]				
Pšenica	Srbija	-	<0,05-0,162	-	-	[124]				
Kukuruz	Australija	1,6±0,03	-	-	-	[136]				
Raž	Norveška	17,2±3,0	0,007±0,002	1,53±0,16	-	[127]				

Tabela 37. Literaturni pregled odredjivanih sadržaja makro i mikro elemenata u uzorcima brašna izražen u  $\mu\text{g/g}$

Makroelementi											
Uzorak	Poreklo	Ca	Mg	Lit.							
Kukuruz		10,8 $\pm$ 0,03	2480 $\pm$ 2,0	[44]							
Rafinisano ovsono		143 $\pm$ 0,2	330 $\pm$ 6,5	[44]							
Brašno ovas celo zrno		512 $\pm$ 2,3	1530 $\pm$ 0,9	[44]							
Belo brašno		192 $\pm$ 0,3	308 $\pm$ 1,5	[44]							
Belo brašno	Bugarska	230	270	[138]							
Mikroelementi											
Uzorak		Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Zn	Lit.
Belo brašno	Bugarska	-	-	-	16,3	-	-	-	-	9,5	[138]
Belo brašno	Švedska	<0,003-0,005	<0,01-0,01	1,5 $\pm$ 0,04	10,3 $\pm$ 0,24	5,3 $\pm$ 0,32	-	0-0,2	-	6,5 $\pm$ 0,27	[135]
Heljda	Slovenija	0,1 $\pm$ 0,0002	0,1 $\pm$ 0,001	-	71,0 $\pm$ 0,07	-	-	0,9 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,0005	17,3 $\pm$ 0,02	[134]
Rafinisano ovsono	Australija	-	-	3,2 $\pm$ 0,003	12,9 $\pm$ 0,01	27,6 $\pm$ 0,03	-	-	-	14,6 $\pm$ 0,01	[136]
Brašno ovas celo zrno	Australija	-	-	3,7 $\pm$ 0,002	53,3 $\pm$ 0,07	54,8 $\pm$ 0,09	-	-	-	27,9 $\pm$ 0,01	[136]
Kukuruz	Španija	-	0,03	-	-	-	-	0,2 $\pm$ 0,001	-	-	[139]
Kukuruz	česka	0,0025 $\pm$ 0,0003	-	0,76 $\pm$ 0,06	9,89 $\pm$ 1,23	2,81 $\pm$ 0,25	0,107 $\pm$ 0,007	0,064 $\pm$ 0,009	-	9,44 $\pm$ 0,75	(127)
Raž	česka	0,0030 $\pm$ 0,0005	-	3,02 $\pm$ 0,20	21,0 $\pm$ 1,5	23,5 $\pm$ 1,6	0,59 $\pm$ 0,04	0,058 $\pm$ 0,008	-	24,1 $\pm$ 1,6	(127)
Mikroelementi											
Uzorak		Al	As	Sn	Lit.						
Belo brašno	Španija	-	0,02 $\pm$ 0,0002	-	[140]						
Belo brašno	Mađarska	-	0,02 $\pm$ 0,0002	-	[141]						
Heljda	Slovenija	-	-	<0,01	[134]						
Rafinisano ovsono	Australija	0,4 $\pm$ 0,02	-	-	[136]						
Brašno ovas celo zrno	Australija	3,3 $\pm$ 0,014	-	-	[136]						
Kukuruz	Australija	0,3 $\pm$ 0,01	-	-	[136]						

Tabela 38. Literaturni pregled određivanih sadržaja makro i mikro elemenata u uzorcima hleba izražen u µg/g

Makroelementi								
Uzorak	Poreklo	Ca	K	Mg	Na	Lit.		
Beli hleb	U.K.	1460	-	-	-	[45]		
Beli hleb <sup>1</sup>	U.S.	915±14,4	1630±39,1	398±22,3	5190±65,3	[117]		
Beli hleb <sup>2</sup>	U.S.	1030	1210	223	5180	[117]		
Beli hleb	Poljska	1380	-	192,4	-	[142]		
Kukuruzni hleb	U.S.	1080	1360	186	4410	[117]		
Raženi hleb	U.S.	718	1640	364	6220	[117]		
Hleb integralni	Poljska	20,6	-	382	-	[142]		

Mikroelementi								
Uzorak		Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni
Beli hleb	U.K.	0,02	0,1	1,6	21	8	0,2	0,1
Beli hleb <sup>1</sup>	U.S.	-	-	1,9±0,04	26,6±0,65	8,5±0,64	-	0,02±0,003
Beli hleb <sup>2</sup>	U.S.	-	-	<2,3	28,3	18,2	-	0,2
Beli hleb	Poljska	-	-	1,0-2,1	14-30	8,2-23	-	-
Beli hleb	Poljska	-	-	3,1	6,1	1,6	-	-
Beli hleb	Turska	-	-	1,3-9,6	10,2-59,6	-	-	-
Hleb integralni	Poljska	-	-	12,2	12,5	8,6	-	-

Mikroelementi						
Uzorak		Al	As	B	Sn	Lit.
Beli hleb	U.K.	3,7	0,01	0,5	0,03	[45]
Beli hleb <sup>1</sup>	U.S.	-	<0,04	-	-	[117]
Beli hleb <sup>2</sup>	U.S.	-	<0,04	-	-	[117]
Kukuruzni hleb	U.S.	-	<0,04	-	-	[117]
Raženi hleb	U.S.	-	<0,04	-	-	[117]

<sup>1</sup> i <sup>2</sup> različite vrste belog hleba

### **3.2.6 Statistička obrada dobijenih rezultata određivanja sadržaja metala u uzorcima žitarica, brašna i hleba**

Kako je sadržaj Fe, Zn i Cu pokazao pravilnost u odstupanju obzirom na lokalitet sa kojeg su poticale žitarice, primenom t-testa ispitani je uticaj lokaliteta sa kojeg su poticale žitarice, na sadržaj ova tri elementa. Rezultati primjenjenog t-testa su pokazali da postoji značajna statistička razlika ( $p<0,05$ ) u sadržaju Fe, Zn i Cu u odnosu na lokalite na kojima su žitarice uzgajane (Tabele IV Prilog II). Time je i potvrđeno da lokalitet na kome se uzgajaju žitarice kao i primenjene agrotehničke mere u toku njihovog razvoja utiču na razlike u sadržaju pojedinih metala.

Za ANOVA analizu u cilju ispitivanja uticaja vrste žitarice, brašna i hleba na sadržaj detektovanih makro i mikro elemenata, uzeta je srednja vrednost rezultata dobijenih od dva lokaliteta (pšenica) odnosno od dva proizvoda (brašno, hleb) za svaki od ispitivanih uzoraka. Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p<0,05$  u sadržajima detektovanih elemenata u svim ispitivanim uzorcima žitarica i njihovih proizvoda (Tabele V-VII Prilog II). Naknadna poređenja pomoću Tukey-ovog HSD testa ukazuju da u sadržaju *bakra* u uzorcima zrna pšenice, raži, je ma i kukuruza ne postoji statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ). Kod raži, je ma i heljde ne postoji značajna razlika u sadržaju *hroma*. Sadržaj *kalijuma* u uzorcima ovaca i je ma ne pokazuje statistički značajnu razliku, kao ni *magnezijum* u uzorcima pšenice i raži. Detektovani sadržaj *cinka* kod uzorka pšenice i heljde značajno se ne razlikuje (Tabela VIII Prilog II). Sadržaj Cr se statistički značajno ne razlikuje kod brašna tip 400 i brašna od celog zrna pšenice; kod uzorka brašna tip 500 i kukuruznog ne postoji značajna razlika u sadržaju Mn dok kod brašna tipa 400 i kukuruznog sadržaj Na se statistički značajno ne razlikuje (Tabela IX Prilog II). U Tabeli X (Prilog II) mogu se videti rezultati naknadnog poređenja uz pomoć Tukey HSD testa za pojedine detektovane elemente u ispitivanim uzorcima hleba.

Rezultati primenjenih statističkih testova su pokazali da postoji uticaj vrste žitarice, brašna i hleba na sadržaj detektovanih makro i mikronutrijenata paže samim tim ispitivane vrste uzoraka različito doprinose nadoknadi ovih elemenata u ljudskoj ishrani.

T-test primjenjen je u cilju pređenja uticaja proizvoda a na okviru iste grupe uzorka brašna i hleba, na sadržaj detektovanih elemenata. Rezultati t-testa su pokazali da kod uzorka pšenice nog brašna tip 400 ne postoji statistički značajna razlika jedino u sadržaju *kalijuma* ( $p=0,395$ ). U sadržaju *gvožđa* i *kalcijuma* kod kukuruznog brašna ne postoji značajna razlika kao ni u sadržaju *natrijuma* u uzorcima brašna od heljde (Tabele XI Prilog II). Kod uzorka raženog hleba nema statistički značajne razlike u sadržaju Al, Na, Mg i Zn, dok Na i Mg nisu pokazali značajnu razliku kod uzorka crnog hleba. Uzorci polubelog hleba nemaju statistički značajnu razliku u sadržaju Cu, Fe, K, Mg, Na i Zn a u uzorcima hleba od pšenice, raži i ovaca nema statistički značajne razlike kod Mg i Na (Tabele XII Prilog II).

Na osnovu rezultata t-testa može se videti da je kod uzorka brašna uticaj proizvoda a na sadržaj detektovanih elemenata veći u odnosu na uzorke hleba. Kod uzorka hleba primjenjeni statistički test je pokazao da jedino uzorci belog i kukuruznog hleba imaju statistički značajnu razliku u sadržaju određenih elemenata, dok kod ostalih uzorka hleba veći broj elemenata nije pokazivao značajnu razliku u sadržajima. Na osnovu ovoga može se zaključiti da uzorci hleba ispitivani u ovom radu ne pokazuju razliku u sadržaju detektovanih elemenata u odnosu na

proizvođača, za razliku od uzorka brašna gde sadržaj određenih makro i mikronutrijenata zavisi od proizvođača.

### **3.3 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima voćnih sokova i voćnih vina**

#### **3.3.1 ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme**

U postupku optimizacije plazme pri konstantnim operativnim uslovima instrumenta (Tabela 39.) pravilen je odnos intenziteta jonske i atomske linije magnezijuma. Dobijeni intenziteti sa pripadaju im standardnim devijacijama i relativnim standardnim devijacijama kao i odnos intenziteta dati su u Tabeli 40.

Tabela 39. Operativni uslovi za instrument iCAP 6000 ICP-OES

Brzina pumpe za ispiranje	100 rpm
Brzina pumpe za analizu	50 rpm
Protok gasa za raspršivanje	0,7 l/min
Protok gasa za hlađenje	12 l/min
Protok pomognog gasa	0,5 l/min
Pravac posmatranja plazme	aksijalni/radijalni
Vreme ispiranja	30 s

Tabela 40. Uticaj RF snage generatora na odnos intenziteta emisionih linija Mg(II) i Mg(I)

RF snaga (W)	Relativni intenzitet±SD Mg(II) 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet±SD Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta
750	22084±2622	11,87	10990±750	6,824	2,009
950	85020±3882	4,566	22920±870	3,796	3,709
1150	149920±1806	1,205	32440±663	2,044	4,621
1350	162204±2095	1,292	44008±944	2,145	3,686

Najveći odnos intenziteta je pri RF snazi generatora od 1150 W što je u daljem postupku optimizacije i validacije metoda, održavano konstantnim.

#### **3.3.2 Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih**

Osnovni parametari kalibracionih pravih određeni su korištenjem multielementnih standardnih rastvora sledećih koncentracija 0, 2,00 i 5,00 ppm. Parametri kalibracione krive kao što su talasna dužina emisione linije ( $\lambda$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odnos akcije (b), nagib (m) i RSD prikazani su u Tabeli 41. Kako primjenjeni ICP-OES instrument daje mogunost da se element posmatra na razliitim talasnim dužinama, svi analiti su određeni na etiri talasne dužine. Na ovaj način je moguće da se za svaki element odabere ona talasna dužina na kojoj su spektralne interferencije i interference matriksa smanjeni na minimum. Zato je u Tabeli 41 pored osnovnih parametara kalibracionih pravih dat i odnos nagiba kalibracione prave standarda ( $m_{kal}$ ) i nagiba koji je dobijen kada je standardu dodata određena količina ispitivanog uzorka ( $m_{uzorak}$ ). Od etiri talasne dužine izabrana

je ona kod koje je odnos ovih nagiba bio bliži vrednosti 1,00. Nakon odabira najpogodnije talasne dužine, korekcija pozadine za svaku od odbranih linija je izvršena u postupku određivanja sadržaja ispitivanih elemenata.

Tabela 41. Parametri analitičkih kalibracionih pravih: analitička talasna dužina  $\lambda$ , limit detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odsečak (b), nagib (m), prosečna RSD za repetabilnost merenja rastvora za kalibraciju i odnos  $m_{kal}/m_{uzorak}$

Element	LOD (nm)	LOQ (ppm)	$R^2$	b	m	RSD (%)	Odnos $m_{kal}/m_{uzorak}$	
Al	396,152	0,1059	0,999911	1,51	1097	1,21	1,12	
As	228,812	0,0928	0,999004	1,02	1108	2,24	0,88	
B	208,959	0,3391	1,130	0,999088	3,78	7,55	1,10	
Ca	396,847	0,7700	2,566	0,995322	-2,85	42394	5,88	1,08
Cd	228,802	0,3285	1,095	0,999144	11,92	6799	0,88	0,92
Co	230,786	0,0826	0,2755	0,999731	0,77	1244	0,41	1,24
Cr	357,869	0,2335	0,7784	0,999567	27,88	3084	6,09	1,26
Cu	324,754	0,1007	0,3355	0,999920	90,78	3050	1,65	0,92
Fe	238,204	0,5588	1,863	0,997528	0,59	9662	0,66	1,10
K	766,490	0,2625	0,8751	0,999891	163,22	13084	3,56	1,08
Mg	280,270	0,6499	2,166	0,996661	-0,31	2114	6,54	0,94
Mn	260,569	0,5236	1,745	0,997829	0,06	654	3,08	1,26
Mo	284,823	0,0122	0,0406	0,999375	1,05	1150	0,35	1,22
Na	588,995	0,0556	0,1852	0,999975	-1,83	4650	4,88	1,14
Ni	341,476	0,0801	0,2671	0,999949	21, 23	3946	0,13	0,86
Pb	216,999	0,0998	0,3323	0,998238	1,20	1090	0,86	1,20
Se	196,090	0,0290	0,0966	0,995365	1,02	450	1,44	0,92
Si	288,158	0,9287	3,096	0,998632	46,24	4050	1,28	1,10
Zn	213,856	0,3891	1,297	0,998799	10,12	10200	0,35	1,12

\* srednja vrednost tri merenja

Iz tabele se zapaža da su najosetljivije analitičke linije za Ca, K i Zn a najmanje osjetljive za Mn i Se. Limit detekcije se kreće od 0,0122 ppm za Mo do 0,9287 ppm za Si. RSD se kreće od 0,13 do 7,55% a odnos nagiba od 0,86 kod Ni do 1,26 kod Cr.

### 3.3.3 Evaluacija tačnosti i preciznosti

Tačnost i preciznost predloženih metoda ispitana je određivanjem sadržaja svakog analiziranog elementa pri prethodno definisanim optimalnim uslovima i upoređivanjem te vrednosti sa deklarisanom koncentracijom od strane proizvođača a koristi enog standarda. Za ovaj deo validacije metode određivanje je sadržaj svakog ispitivanog elementa koristi enjem rastvora multielementnog standarda koncentracije 3,00 ppm za sve elemente osim za K i Si za koje je deklarisana koncentracija iznosila 15,00 ppm. Rezultati su prikazani u Tabeli 42.

Tabela 42. Tačnost i preciznost određivanja ispitivanih elemenata predloženim metodama

Element	Načina vrednost $\bar{x} \pm SD$ (ppm)	Tačnost <sup>a</sup> Recovery (%)	Preciznost <sup>b</sup> RSD (%)
Al	3,198±0,088	106,6	2,8
As	2,842±0,068	94,7	2,4
B	3,122±0,022	104,1	0,7
Ca	3,094±0,066	103,1	2,1
Cd	2,898±0,062	96,6	2,1
Co	3,200±0,058	106,7	1,8
Cr	2,868±0,072	95,6	2,5
Cu	3,128±0,098	104,3	3,1
Fe	3,100±0,052	103,3	1,7
K	14,40±0,32	96,0	2,2
Mg	2,888±0,076	96,3	2,6
Mn	3,140±0,080	104,7	2,5
Mo	3,246±0,098	108,2	3,0
Na	2,866±0,088	95,5	3,1
Ni	2,840±0,102	94,7	3,6
Pb	3,108±0,112	103,6	3,6
Se	2,868±0,088	95,6	3,1
Si	15,66±0,20	104,4	1,3
Zn	3,042±0,044	101,4	1,4

$$^a \text{Recovery} = \frac{\bar{x}}{\sim} \cdot 100; ^b RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$

Tačnost određivanja se kreće od 94,7% za Ni i As do 106,6% za Al a preciznost od 0,7 do 3,6%.

### 3.3.4 Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u razliitim uzorcima vonih sokova i vonih vina

U cilju procene nutritivne vrednosti vonih sokova i vonih vina, u izabranim uzorcima ovih proizvoda koji su zastupljeni na području grada Niša, određen je sadržaj 19 makro i mikro elemenata.

Ispitivani su uzorci bistrih i gustih vonih sokova od 10 različitih proizvoda a ovih napitaka (ukupno 24 uzorka sokova). Sadržaj detektovanih elemenata je upoređivan i između samih proizvoda a u okviru iste vrste soka, da bi se videlo kako primenjena tehnologija proizvodnje, pakovanja i transporta utiče na sadržaj makro i mikro elemenata u ovim napicima.

Vo na vina od kupine i višnje su nabavlјana od po dva individualna proizvoda a a ali i od po dva proizvoda a koji su zastupljeni u marketima na području grada Niša. Sa jedne strane ovakav odabir uzorka imao je za cilj upoređivanje sadržaja detektovanih elemenata između dve grupe proizvoda a (različiti tehnološki procesi) iste vrste vojnog vina, a sa druge, da se proveri kako izbor osnovnih vonih sirovina utiče na sadržaje detektovanih elemenata. Vo na vina od borovnice i maline nabavlјana su od po dva različita proizvoda a koji su bili dostupni u marketima.

U Tabelama 43-48 je, za svaki od uzoraka, prikazana srednja vrednost sadržaja elemenata od tri uzastopna merenja  $\pm$  standardna devijacija (SD) za po tri (bistri sokovi) odnosno za po dva (gusti sokovi i vo na vina) različita proizvoda.

Tabela 43. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm$  SDv ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima bistrih vo nih sokova od tri različita proizvoda

	Uzorak	Ca	K <sup>a</sup>	Mg	Na
Višnja	1	42,83 $\pm$ 0,45	157,2 $\pm$ 1,5	39,88 $\pm$ 0,15	75,80 $\pm$ 0,30
	2	48,63 $\pm$ 0,45	175,7 $\pm$ 3,3	34,43 $\pm$ 0,02	53,33 $\pm$ 0,45
	3	50,45 $\pm$ 0,43	187,0 $\pm$ 0,8	55,25 $\pm$ 0,05	106,1 $\pm$ 0,9
Kupina	1	42,78 $\pm$ 1,02	181,5 $\pm$ 1,3	36,83 $\pm$ 0,27	81,43 $\pm$ 0,57
	2	46,17 $\pm$ 0,52	192,4 $\pm$ 1,5	33,17 $\pm$ 0,31	66,27 $\pm$ 0,71
	3	44,69 $\pm$ 0,94	189,9 $\pm$ 0,9	49,42 $\pm$ 0,51	99,46 $\pm$ 0,61
Crno grožđe	1	44,58 $\pm$ 0,60	132,0 $\pm$ 1,3	30,95 $\pm$ 0,15	70,53 $\pm$ 0,65
	2	49,36 $\pm$ 0,82	144,2 $\pm$ 1,8	32,17 $\pm$ 0,24	88,21 $\pm$ 0,74
	3	55,84 $\pm$ 1,02	156,8 $\pm$ 1,2	57,24 $\pm$ 0,22	75,16 $\pm$ 0,88
Borovnica	1	44,20 $\pm$ 0,90	85,35 $\pm$ 0,90	51,58 $\pm$ 0,50	107,6 $\pm$ 0,4
	2	45,57 $\pm$ 0,21	92,17 $\pm$ 1,42	49,98 $\pm$ 0,27	124,9 $\pm$ 0,9
	3	39,12 $\pm$ 0,13	101,9 $\pm$ 1,7	55,41 $\pm$ 0,74	113,2 $\pm$ 0,7

<sup>a</sup> radikalno posmatranje plazme

Tabela 44. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima gustih nih sokova od dva različita proizvoda

	Uzorak	Ca	K <sup>a</sup>	Mg	Na
Breskva i jabuka	1	74,90 $\pm$ 0,46	194,4 $\pm$ 0,6	25,37 $\pm$ 0,54	73,19 $\pm$ 0,43
	2	35,84 $\pm$ 0,43	90,55 $\pm$ 0,98	27,07 $\pm$ 0,52	51,34 $\pm$ 0,72
Jagoda i jabuka	1	73,89 $\pm$ 1,05	178,9 $\pm$ 0,4	31,83 $\pm$ 0,31	65,24 $\pm$ 0,32
	2	45,53 $\pm$ 0,32	72,20 $\pm$ 0,46	28,20 $\pm$ 0,31	50,16 $\pm$ 3,20
Breskva	1	38,59 $\pm$ 0,94	185,3 $\pm$ 0,4	24,64 $\pm$ 0,46	50,58 $\pm$ 0,11
	2	42,29 $\pm$ 0,52	164,1 $\pm$ 0,1	29,14 $\pm$ 0,51	55,32 $\pm$ 0,30
Jagoda	1	44,58 $\pm$ 0,11	54,40 $\pm$ 0,27	23,99 $\pm$ 0,19	35,31 $\pm$ 0,29
	2	39,27 $\pm$ 0,18	79,28 $\pm$ 0,52	25,17 $\pm$ 0,20	42,77 $\pm$ 0,22
Kajsija i jabuka	1	38,66 $\pm$ 0,46	82,35 $\pm$ 0,49	23,32 $\pm$ 0,44	45,48 $\pm$ 0,20
	2	44,15 $\pm$ 0,27	102,4 $\pm$ 1,1	27,42 $\pm$ 0,71	53,71 $\pm$ 0,33
Multivitamin	1	47,79 $\pm$ 0,03	214,9 $\pm$ 1,1	68,01 $\pm$ 0,76	68,46 $\pm$ 0,42
	2	66,17 $\pm$ 0,51	230,2 $\pm$ 1,2	75,12 $\pm$ 0,91	77,38 $\pm$ 0,61

<sup>a</sup> radijalno posmatranje plazme

Iz Tabele 43 se može videti da je u bistrim vo nim sokovima, sadržaj *kalijuma* bio najveći u poređenju sa ostalim detektovanim makro elementima (Ca, Mg i Na). U bistrom vo nom soku od kupine određena je najveća koncentracija K i ona se kreće od 181,5  $\mu\text{g/g}$  do 192,4  $\mu\text{g/g}$ , dok je najniži sadržaj ovog elementa nađen u uzorcima sokova od borovnice i kreće se od 85,35  $\mu\text{g/g}$  do 101,9  $\mu\text{g/g}$ . A. Koni-Ristić i saradnici su u svom radu takođe pokazali da je u uzorcima sokova od različitog sastava, sadržaj kalijuma veći u odnosu na ostale makro elemente [144]. Kalijum se prirodno nalazi u samom soku i to u vidu kalijumove soli tartarne kiseline [145]. U toku proizvodnje vo nih sokova mnoga jedinjenja kalijuma se dodaju kao zaslađivači (acesulfam K) ili konzervansi (kalijum-benzoat-E212, kalijum-sorbit-E201, kalijum-bisulfat-E228), čime dolazi do povećanja sadržaja ovog makro elementa u vo nim sokovima iznad nivoa koji potiče od samog sokova [145]. Kalijum je najzastupljeniji unutar elastičkih ćelija, i veoma je bitan za membranski transport, metabolizam energije i za normalno funkcionisanje ćelije. Preporuka ena dnevna doza, po Pravilniku RS, za kalijum je 2000 mg, pa se tako na osnovu sadržaja koji su detektovani u uzorcima ispitivanih bistrova u nih sokova preporučuje njihovo upotrebu u ishrani,

u cilju nadoknade dela dnevnih potreba ka ovom nutrijentu. U grupi ostalih makro elemenata posle K, najviše je Na dok je sadržaj Ca i Mg približno isti u ispitivanim uzorcima bistrih vo nih sokova. Vo ni sokovi sadrže *natrijum* iz vode i dodatih natrijumovih soli kao što su benzoati, saharini ili citrati, dok *kalcijum* i *magnezijum* poti u iz vode i samog vo a. Oboga ivanje sokova ovim mineralima je vrlo jednostavno, jer su njihova jedinjenja (soli) vrlo lako rastvorna ali sa druge strane, preterano dodavanje ovih supstanci može dovesti do slanog ili oporog ukusa soka, kao i do laksativnog efekta [145].

U uzorcima gustih sokova sadržaj kalijuma je tako e ve i u odnosu na ostale detektovane makro elemente (Tabela 44.). Najviše kalijuma je odre eno u uzorcima multivitamina gde se sadržaj K kre e od 214,9 do 230,2  $\mu\text{g/g}$  dok je najmanje kalijuma odre eno u soku od jagode (od 54,40  $\mu\text{g/g}$  do 79,28  $\mu\text{g/g}$ ). Kod uzoraka gustih vo nih sokova može se zapaziti da izme u dva razli ita prizvo a a iste vrste soka postoji razlika u sadržaju kalijuma. Ova razlika naro ito dolazi do izražaja kod uzoraka soka od breskve i jabuke, i jagode i jabuke gde se sadržaj detektovanog K razlikuje za negde oko 100  $\mu\text{g/g}$  izme u dva proizvo a a. Ovakva razlika u sadržaju, može biti posledica koriš enja vo a razli itog kvaliteta, u smislu sadržaja K, kao i ve e upotrebe zaslana iva a i konzervanasa koji sadrže ovaj element. Naravno, razlike u sadržaju poti u i od razli ite tehnologije u smislu koli ine vo a odnosno vode u finalnom proizvodu. Kada se na kraju uporede bistri i gusti vo ni sokovi po sadržaju makro elemenata može se zaklju iti da uzorci gustih vo nih sokova imaju nešto ve e sadržaje makro elemenata i da je ova grupa sokova pokazala ve e varijacije u sadržaju ovih elemenata u odnosu na proizvo a a.

Upore ivanjem sadržaja esencijalnih elemenata (Cu, Fe, Ni and Zn) u uzorcima bistrih vo nih sokova može se videti da je najve i sadržaj detektovan za Fe (Tabela 45.). Najve a koli ina ovog metala odre ena je u uzorcima bistrih sokova od crnog grož a i kre e se od 4,983  $\mu\text{g/g}$  do 5,911  $\mu\text{g/g}$ . Najniži sadržaj gvož a detektovan je u bistrom soku od borovnice i kre e se od 2,237  $\mu\text{g/g}$  do 4,181  $\mu\text{g/g}$ . Koli ine ostalih metala su pratile slede i opadaju i niz Cu>Zn>Ni. Rezultati u ovom radu su u skladu sa sadržajima koje su detektovali Jablani i saradnici [146] u sokovima koji su zastupljeni u Pakistanu i gde je tako e više bilo gvož a u odnosu na *bakar* i *cink*. Kada se uporede sadržaji detektovanih esencijalnih elemenata u bistrim vo nim sokovima po proizvo a ima iste vrste soka, može se zapaziti da ne postoje ve a odstupanja u njihovim sadržajima.

U Tabeli 46 se može videti da je u uzorcima gustih vo nih sokova sadržaj gvož a tako e bio ve i u odnosu na Cu, Ni i Zn i da, kao i kod bistrih vo nih sokova, sadržaj ova tri elementa prati opadaju i niz Cu>Zn>Ni. Najviše Fe detektovano je u uzorcima gustog soka od jagode i jabuke i kretao se od 7,152  $\mu\text{g/g}$  do 10,05  $\mu\text{g/g}$ . Kada se uporede uzorci bistrih i gustih vo nih sokova po sadržaju Fe može se zaklju iti da su gusti vo ni sokovi bogatiji ovim nutrijentom. Poznato je da se oko 10 % gvož a, koje je prisutno u telu, koristi za aktivnost odre enih enzima koji stavaraju energiju. Nedostatak gvož a dovodo do mikrocitne i hipohromne anemije. Simptomi su mu nina, slabost, bledilo, otežano disanje i lupanje srca [147]. Na osnovu detektovanih sadržaja esencijalnih elemenata ispitivani uzorci vo nih sokova mogu biti dobar dodatni izvor pre svega Fe i Cu, jer su sadržaji Ni i Zn niski i uglavnom ispod LOD-a primenjene metode.

U ispitivanim uzorcima obe grupe vo nih sokova As i Se nisu detektovani, dok su sadržaji Co i Mo bili ispod LOD-a primenjene metode. Kod uzoraka bistrih vo nih sokova sadržaj Mn, Ni i Zn u pojedini vrstama uzoraka sokova je ispod LOD-a metode.

Tabela 45. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima bistrih vo nih sokova od tri različita proizvoda

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Višnja	1	2,845 $\pm$ 0,023	0,0290 $\pm$ 0,0012*	0,2462 $\pm$ 0,0062	0,2841 $\pm$ 0,0032	5,145 $\pm$ 0,013	0,2715 $\pm$ 0,0051*	0,3556 $\pm$ 0,0023	0,0142 $\pm$ 0,0002*	nd	87,65 $\pm$ 0,20	0,1582 $\pm$ 0,0031*
	2	2,545 $\pm$ 0,023	0,0182 $\pm$ 0,0009*	0,1877 $\pm$ 0,0059	0,4654 $\pm$ 0,0062	4,325 $\pm$ 0,095	0,2673 $\pm$ 0,0043*	0,4462 $\pm$ 0,0016	0,0438 $\pm$ 0,0003*	nd	71,98 $\pm$ 0,20	0,3201 $\pm$ 0,0042*
	3	3,583 $\pm$ 0,022	0,0534 $\pm$ 0,0006*	0,3615 $\pm$ 0,0041	0,6683 $\pm$ 0,0071	3,745 $\pm$ 0,032	0,5938 $\pm$ 0,0059*	0,5548 $\pm$ 0,0034	0,0332 $\pm$ 0,0001*	nd	83,75 $\pm$ 0,40	0,3822 $\pm$ 0,0051*
Kupina	1	5,263 $\pm$ 0,015	0,0262 $\pm$ 0,0024*	0,2379 $\pm$ 0,0045	0,5292 $\pm$ 0,0032	5,515 $\pm$ 0,045	0,4087 $\pm$ 0,0031*	0,4204 $\pm$ 0,0011	0,0375 $\pm$ 0,0001*	nd	88,53 $\pm$ 0,22	0,3842 $\pm$ 0,0023*
	2	4,171 $\pm$ 0,021	0,0124 $\pm$ 0,0012*	0,1712 $\pm$ 0,0071	0,3185 $\pm$ 0,0026	4,782 $\pm$ 0,017	0,3253 $\pm$ 0,0026*	0,3924 $\pm$ 0,0014	0,0293 $\pm$ 0,0009*	nd	92,14 $\pm$ 0,33	0,3923 $\pm$ 0,0051*
	3	4,781 $\pm$ 0,019	0,0329 $\pm$ 0,0009*	0,1983 $\pm$ 0,0023	0,7441 $\pm$ 0,0062	5,223 $\pm$ 0,024	0,5143 $\pm$ 0,0057*	0,0467 $\pm$ 0,0011	0,0402 $\pm$ 0,0002*	nd	79,49 $\pm$ 0,41	0,4212 $\pm$ 0,0063*
Cmogrožje	1	3,370 $\pm$ 0,018	0,0205 $\pm$ 0,0011*	0,2791 $\pm$ 0,0012	0,2407 $\pm$ 0,0092	4,983 $\pm$ 0,078	0,3645 $\pm$ 0,0023*	0,2824 $\pm$ 0,0009	0,0365 $\pm$ 0,0006*	nd	95,75 $\pm$ 0,52	0,2294 $\pm$ 0,0062*
	2	4,238 $\pm$ 0,021	0,0415 $\pm$ 0,0022*	0,3296 $\pm$ 0,0019	0,3211 $\pm$ 0,0081	5,299 $\pm$ 0,044	0,2349 $\pm$ 0,0019	0,2649 $\pm$ 0,0013	0,0413 $\pm$ 0,0001*	nd	101,4 $\pm$ 0,9	0,3221 $\pm$ 0,0072*
	3	5,174 $\pm$ 0,048	0,0341 $\pm$ 0,0013*	0,1967 $\pm$ 0,0037	0,5847 $\pm$ 0,0122	5,911 $\pm$ 0,058	0,3112 $\pm$ 0,0037	0,3614 $\pm$ 0,0021	0,0506 $\pm$ 0,0005*	nd	114,7 $\pm$ 1,9	0,2552 $\pm$ 0,0071*
Borovnica	1	17,27 $\pm$ 0,09	0,0442 $\pm$ 0,0006*	0,1064 $\pm$ 0,0046	0,7221 $\pm$ 0,0012	2,237 $\pm$ 0,028	2,247 $\pm$ 0,028	0,5565 $\pm$ 0,0013	0,2193 $\pm$ 0,0102*	nd	122,6 $\pm$ 0,7	0,4144 $\pm$ 0,0104*
	2	13,18 $\pm$ 0,12	0,0552 $\pm$ 0,0007*	0,0935 $\pm$ 0,0064	0,6646 $\pm$ 0,0023	4,181 $\pm$ 0,051	1,744 $\pm$ 0,032	0,4886 $\pm$ 0,0017	0,3275 $\pm$ 0,0121*	nd	139,4 $\pm$ 0,9	0,5222 $\pm$ 0,0112*
	3	15,10 $\pm$ 0,09	0,0387 $\pm$ 0,0012*	0,0798 $\pm$ 0,0012	0,8475 $\pm$ 0,0044	3,275 $\pm$ 0,032	1,483 $\pm$ 0,044	0,5008 $\pm$ 0,0024	0,2562 $\pm$ 0,0091*	nd	110,6 $\pm$ 0,8	0,4783 $\pm$ 0,0251*

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 46. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima gustih vo nih sokova od dva različita proizvoda

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Breskva i jabuka	1	1,145 $\pm$ 0,061	0,1043 $\pm$ 0,0013*	0,1360 $\pm$ 0,0053*	0,6120 $\pm$ 0,0046	6,237 $\pm$ 0,285	0,4174 $\pm$ 0,0022*	0,4030 $\pm$ 0,0015*	0,3603 $\pm$ 0,0018*	nd	133,6 $\pm$ 1,5	0,8380 $\pm$ 0,0014
	2	1,232 $\pm$ 0,012	0,0262 $\pm$ 0,0016*	0,1419 $\pm$ 0,0049*	0,2282 $\pm$ 0,0062	6,223 $\pm$ 0,311	0,1691 $\pm$ 0,0088*	0,5109 $\pm$ 0,0021*	0,1537 $\pm$ 0,0034*	nd	25,49 $\pm$ 1,04	0,3108 $\pm$ 0,0020*
Jagoda i jabuka	1	1,103 $\pm$ 0,029	0,0501 $\pm$ 0,0009*	0,1355 $\pm$ 0,0035*	0,7753 $\pm$ 0,0147	10,05 $\pm$ 0,21	0,7851 $\pm$ 0,0018*	0,3294 $\pm$ 0,0026*	0,1946 $\pm$ 0,0022*	nd	124,3 $\pm$ 1,6	0,2604 $\pm$ 0,0018*
	2	1,021 $\pm$ 0,023	0,0096 $\pm$ 0,0002*	0,1406 $\pm$ 0,0057*	0,2079 $\pm$ 0,0392	7,152 $\pm$ 0,167	0,5529 $\pm$ 0,0018*	0,4304 $\pm$ 0,0017*	0,1757 $\pm$ 0,0032*	nd	37,02 $\pm$ 0,21	0,2177 $\pm$ 0,0032*
Breskva	1	0,7928 $\pm$ 0,0173	0,0758 $\pm$ 0,0003*	0,3765 $\pm$ 0,0032*	1,363 $\pm$ 0,014	7,372 $\pm$ 0,328	0,3462 $\pm$ 0,0044*	0,2697 $\pm$ 0,0012*	0,3305 $\pm$ 0,0016*	nd	19,05 $\pm$ 0,24	0,5359 $\pm$ 0,0016*
	2	0,6231 $\pm$ 0,0072	0,0571 $\pm$ 0,0005*	0,2214 $\pm$ 0,0219*	0,9276 $\pm$ 0,0221	8,963 $\pm$ 0,428	0,3875 $\pm$ 0,0021*	0,3219 $\pm$ 0,0017*	0,2684 $\pm$ 0,0011*	nd	44,17 $\pm$ 0,12	0,4816 $\pm$ 0,0028*
Jagoda	1	0,6360 $\pm$ 0,0435	0,0290 $\pm$ 0,0001*	0,0974 $\pm$ 0,0050*	0,1553 $\pm$ 0,0074	3,555 $\pm$ 0,092	0,4916 $\pm$ 0,0049*	0,3205 $\pm$ 0,0024*	0,1675 $\pm$ 0,0030*	nd	12,23 $\pm$ 0,21	0,1474 $\pm$ 0,0014*
	2	0,5978 $\pm$ 0,0281	0,0342 $\pm$ 0,0003*	0,0825 $\pm$ 0,0048*	0,5214 $\pm$ 0,0092	4,228 $\pm$ 0,078	0,3751 $\pm$ 0,0017*	0,3864 $\pm$ 0,0017*	0,1601 $\pm$ 0,0022*	nd	25,32 $\pm$ 1,02	0,2427 $\pm$ 0,0048*
Kajsija i jabuka	1	0,6989 $\pm$ 0,0274	0,0215 $\pm$ 0,0004*	0,1431 $\pm$ 0,0033*	0,2533 $\pm$ 0,0065	6,380 $\pm$ 0,091	0,0918 $\pm$ 0,0014*	0,2758 $\pm$ 0,0023*	0,1712 $\pm$ 0,0028*	nd	33,38 $\pm$ 0,42	0,2808 $\pm$ 0,0012*
	2	0,5712 $\pm$ 0,0328	0,0293 $\pm$ 0,0006*	0,2218 $\pm$ 0,0017*	0,2938 $\pm$ 0,0055	5,914 $\pm$ 0,078	0,1216 $\pm$ 0,0072*	0,2372 $\pm$ 0,0013*	0,2123 $\pm$ 0,0017*	nd	47,15 $\pm$ 0,31	0,3115 $\pm$ 0,0033*
Multivitamin	1	0,9509 $\pm$ 0,0175	0,0134 $\pm$ 0,0001*	0,0447 $\pm$ 0,0025*	0,4064 $\pm$ 0,0198	5,251 $\pm$ 0,096	1,970 $\pm$ 0,070*	0,5034 $\pm$ 0,0023*	0,1791 $\pm$ 0,0024*	nd	63,07 $\pm$ 0,29	0,4960 $\pm$ 0,0016*
	2	1,221 $\pm$ 0,019	0,0173 $\pm$ 0,0002*	0,0217 $\pm$ 0,0019*	0,6177 $\pm$ 0,0211	8,257 $\pm$ 0,099	2,215 $\pm$ 0,052*	0,4321 $\pm$ 0,0016*	0,1511 $\pm$ 0,0015*	nd	72,44 $\pm$ 0,31	0,6177 $\pm$ 0,0022

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 47. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima bistrih vo nih sokova od tri različita proizvoda a a

Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Višnja	1 55,15 $\pm$ 0,15	nd	0,0571 $\pm$ 0,0017	0,1236 $\pm$ 0,0027*
	2 38,83 $\pm$ 0,05	nd	0,0884 $\pm$ 0,0052	0,1387 $\pm$ 0,0031*
	3 44,83 $\pm$ 0,20	nd	0,0661 $\pm$ 0,0017	0,1145 $\pm$ 0,0012*
Kupina	1 57,38 $\pm$ 0,05	nd	0,0621 $\pm$ 0,0036	0,0997 $\pm$ 0,0011*
	2 39,12 $\pm$ 0,14	nd	0,1212 $\pm$ 0,0018	0,1056 $\pm$ 0,0013*
	3 46,17 $\pm$ 0,22	nd	0,0761 $\pm$ 0,0030	0,0957 $\pm$ 0,0026*
Crno grožđe	1 93,20 $\pm$ 0,25	nd	0,0895 $\pm$ 0,0092	0,1421 $\pm$ 0,0012*
	2 86,12 $\pm$ 0,41	nd	0,0722 $\pm$ 0,0019	0,1364 $\pm$ 0,0076*
	3 91,01 $\pm$ 0,13	nd	0,0935 $\pm$ 0,0057	0,1455 $\pm$ 0,0022*
Borovnica	1 79,30 $\pm$ 0,35	nd	0,0327 $\pm$ 0,0014	0,1075 $\pm$ 0,0009*
	2 88,76 $\pm$ 0,74	nd	0,0458 $\pm$ 0,0012	0,0961 $\pm$ 0,0013*
	3 76,13 $\pm$ 0,22	nd	0,0662 $\pm$ 0,0066	0,0876 $\pm$ 0,0012*

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 48. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksi nih elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima gustih vo nih sokova od dva razli ita proizvo a a

	Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Breskvi jabuka	1	38,52 $\pm$ 0,25	nd	0,0624 $\pm$ 0,0012*	0,2145 $\pm$ 0,0015*
	2	16,08 $\pm$ 0,27	nd	0,0782 $\pm$ 0,0032*	0,1729 $\pm$ 0,0011*
Jagoda i jabuka	1	47,32 $\pm$ 0,07	nd	0,0798 $\pm$ 0,0022*	0,1522 $\pm$ 0,0012*
	2	16,87 $\pm$ 0,09	nd	0,0803 $\pm$ 0,0028*	0,1388 $\pm$ 0,0024*
Breskva	1	14,55 $\pm$ 0,05	nd	0,0471 $\pm$ 0,0087*	0,0847 $\pm$ 0,0011*
	2	22,38 $\pm$ 0,29	nd	0,0281 $\pm$ 0,0017*	0,1126 $\pm$ 0,0027*
Jagoda	1	6,215 $\pm$ 0,027	nd	0,0271 $\pm$ 0,0014*	0,1837 $\pm$ 0,0032*
	2	5,328 $\pm$ 0,013	nd	0,0228 $\pm$ 0,0011*	0,1657 $\pm$ 0,0027*
Kajsija i jabuka	1	10,19 $\pm$ 0,14	nd	0,0593 $\pm$ 0,0014*	0,1996 $\pm$ 0,0025*
	2	12,24 $\pm$ 0,17	nd	0,0471 $\pm$ 0,0012	0,2348 $\pm$ 0,0018*
Multivitamin	1	40,89 $\pm$ 0,09	nd	0,0137 $\pm$ 0,0020*	0,0765 $\pm$ 0,0009*
	2	52,14 $\pm$ 0,12	nd	0,0102 $\pm$ 0,0011*	0,0623 $\pm$ 0,0012*

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Toksi ni elementi *ollovo i kadmijum* su detektovani u svim ispitivanim uzorcima sokova, pri emu su sadržaji olova bili ispod LOD-a primenjene metode. Sadržaj olova je generalno bio viši u uzorcima gustih sokova u odnosu na bistre sokove, sa izuzetkom multivitaminskog gustog soka gde je detektovan najniži sadržaj ovog elementa u odnosu na sve ispitivane uzorce, kako bistrih tako i gustih vo nih sokova. Acar je [148] u svom radu u uzorcima bistrih vo nih sokova detektovao olovo od 0,13 do 0,20  $\mu\text{g/g}$  dok su u istom radu uzorci gustih sokova pokazivali nešto ve e sadržaje za ovaj težak metal, i kretali su se od 0,20 do 0,27  $\mu\text{g/g}$ , što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Za razliku od olova sadržaj kadmijuma bio je viši u bistrim sokovima i kretao se od oko 0,0458  $\mu\text{g/g}$  (borovnica) do oko 0,0935  $\mu\text{g/g}$  (crno grož e). Prisustvo olova i kadmijuma u sokovima može biti posledica razli itih faktora kao što su voda koja se koristi za njihovo dobijanje, proces proizvodnje i tretiranje finalnog proizvoda. FAO/WHO je odredila tzv. prihvatljivi dnevni unos teških metala koji za Pb iznosi 25  $\mu\text{g}$  po kg odrasle osobe odnosno 7

$\mu\text{g}/\text{kg}$  za Cd (Tabela 10.). Detektovani sadržaj ova dva metala, varira u ispitivanim uzorcima vo nih sokova, što može biti posledica mnogih faktora koji mogu dovesti do kontaminacije sokova olovom i kadmijumom. Neki od glavnih razloga, koji su doveli do varijacije u sadržaju ova dva metala u ispitivanim uzorcima obe grupe vo nih sokova, može biti samo vo e koje je ve sadržavalo odre enu koli inu ovih metala ili proces prozvodnje tokom kojeg se finalni proizvod kontaminirao olovom i kadmijumom. Detektovani sadržaji olova i kadmijuma u ovom radu su veoma niski u odnosu na ostale odre ene elemente i ispod su dozvoljenih granica. Me utim imaju i u vidu sposobnost ovih metala da se deponuju u kostima, jetri i bubrežima, pri emu funkcije ovih organa mogu biti ošte ene [149], neophodno je pratiti i kontrolisati sadržaj ovih kontaminata u vo nim sokovima.

*Aluminijum* je metal koji je detektovan u najve em sadržaju od svih ostalih prisutnih mikro elemenata kako u uzorcima bistrih tako i u uzorcima gustih vo nih sokova (Tabele 47 i 48). Kod uzoraka bistrih vo nih sokova sadržaj ovog metala je ve i za oko 2 do 5 puta u odnosu na gусте vo ne sokove i kre e se od  $38,83 \mu\text{g}/\text{g}$  do  $93,20 \mu\text{g}/\text{g}$  kod bistrih sokova i od  $5,328 \mu\text{g}/\text{g}$  do  $47,32 \mu\text{g}/\text{g}$  kod gustih sokova. Kada se uzorci sokova porede u odnosu na tip vo a od kojih su napravljeni, može se videti da je najve i sadržaj aluminijuma detektovan kod soka od crnog grož a. Zedeh i Sadeghi [150] su u svojoj studiji pokazali da je sadržaj Al u uzorcima soka od grož a u pore enju sa ostalim uzorcima vo nih sokova bio najviši, što je u skladu sa našim istraživanjem. Na ukupan sadržaj aluminijuma u vo nim sokovima (bistri i gusi) uti e više razli itih faktora. Pre svega aluminijum je prisutan prirodno u vodi koja se koristi u proizvodnji sokova i pored makroelemenata zemljiste je najbogatije aluminijumom. Mnogi aditivi i boje koji se upotrebljavaju u procesu proizvodnje sadrže jedinjenja aluminijuma a tako e ovaj metal u sokove može da dospe i preko ambalažnog materijala [114, 151]. Sve vrste ispitivanih vo nih sokova su bile upakovane u tipi ne kockaste kartonske kutije tj. u tzv. tetrapak pakovanja. Ova vrsta ambalažnog materijala na injena je od slojeva papira, plastike (polietilen) i aluminijumske folije. Aluminijumska folija predstavlja vrstu materiju sa malim pritiskom pare, tako da aluminijum ne može sam od sebe da izvrši migraciju kroz polimer. Aluminijumska folija može se oštetiti kada do e u kontakt sa slanim, kiselim pa ak i sa neutralnim vodenim rastvorima [152]. Ako vo ni sok koji je upakovan u tetrapak ambalaži, preko plastike i papira uspe da do e do Al folije, stvaraju se uslovi za njenu koroziju. Usled ovog korozivnog efekta aluminijum može migrirati iz folije u vo ni sok, i da na taj na in do e do povišenog sadržaja ovog elementa u soku. Rodushkin i Magnusson su u svom radu pokazali da su neke komponente u soku od pomorandže uspele da prodru do Al folije preko polimera [153]. Aluminijum je metal koji nema nutritivnu vrednost u ljudskoj ishrani, tako da njegovi povišeni sadržaji nisu poželjni. Prisutni Al u ispitivanim uzorcima vo nih sokova može biti posledica kako procesa proizvodnje tako i pakovanja u ijoj izradu se ovaj metal najviše i koristi [145].

Tabela 49. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm$ SD (ppm) u uzorcima vo nih vina od po dva različita proizvoda a a

	Uzorak	Ca	K	Mg	Na
Kupina	Domača proizvodnja	1 16,38 $\pm$ 0,03	38,79 $\pm$ 0,08	36,41 $\pm$ 0,16	38,54 $\pm$ 0,12
	Market	2 16,74 $\pm$ 0,08	45,29 $\pm$ 0,18	35,99 $\pm$ 0,17	10,07 $\pm$ 0,21
	Domača proizvodnja	1 16,63 $\pm$ 0,03	47,71 $\pm$ 1,16	35,76 $\pm$ 0,09	32,05 $\pm$ 0,50
	Market	2 16,65 $\pm$ 0,14	68,72 $\pm$ 0,94	24,23 $\pm$ 0,29	35,60 $\pm$ 0,21
Višnja	Domača proizvodnja	1 18,21 $\pm$ 0,11	20,93 $\pm$ 0,42	39,43 $\pm$ 0,14	50,71 $\pm$ 0,24
	Market	2 16,19 $\pm$ 0,10	40,80 $\pm$ 0,37	40,83 $\pm$ 0,39	39,17 $\pm$ 0,07
	Domača proizvodnja	1 14,55 $\pm$ 0,07	64,46 $\pm$ 0,65	19,25 $\pm$ 0,72	15,58 $\pm$ 1,28
	Market	2 16,55 $\pm$ 0,07	32,73 $\pm$ 0,34	31,34 $\pm$ 0,87	10,02 $\pm$ 0,16
Borovnica	Market	1 13,08 $\pm$ 0,17	68,78 $\pm$ 0,95	20,54 $\pm$ 0,58	17,77 $\pm$ 0,17
	Market	2 15,49 $\pm$ 0,08	56,73 $\pm$ 0,08	28,70 $\pm$ 0,38	16,25 $\pm$ 0,20
Malina	Market	1 13,93 $\pm$ 0,05	62,17 $\pm$ 0,30	19,92 $\pm$ 0,28	26,58 $\pm$ 0,20
	Market	2 16,35 $\pm$ 0,04	63,21 $\pm$ 0,19	25,75 $\pm$ 0,85	35,81 $\pm$ 0,13

Sadržaji detektovanih makro elemenata (Ca, K, Mg i Na) u svim ispitivanim uzorcima vo nih vina dosta variraju, kako u okviru iste vrste vo nog vina tako i od proizvoda a a do proizvoda a a (Tabela 49.). Najmanje varijacije u sadržaju pokazao je *kalcijum* ija se koncentracija kreće od 13,08 do 18,21 ppm.

Sadržaj *kalijuma* je u svim ispitivanim uzorcima vo nih vina oko 2 do 3 puta veći u odnosu na sadržaj kalcijuma. Najviši sadržaj K detektovan je kod vo nog vina od borovnice (68,78 ppm) koje je nabavljeno u marketu, dok je najmanji sadržaj ovog elementa određen u uzorku vina od višnje (20,93 ppm) domaće proizvodnje. Rupasinghe i Clegg su u svom radu takođe potvrdili da je u pojedinim vrstama vo nih vina sadržaj kalijuma bio najviši u odnosu na druge detektovane makro elemente, i da je njegova koncentracija varirala u zavisnosti od vrste vo nog vina [154].

Najmanje *magnezijuma* je detektovano u vinu od višnje iz marketa a najviše u uzorku vina od višnje domaće proizvodnje (Tabela 49.). Od svih detektovanih makro elemenata najveća varijacija u sadržaju je pokazao Na i koncentracija ovog elementa se kreće od 10,02 ppm u vinu od višnje iz marketa do 50,71 ppm u domaćem vinu od višnje.

Kada se detektovani sadržaji makro elemenata porede po tipu proizvođača u okviru iste vrste voća može se videti da kod domaćeg vina od višnje ima znatno više. Na nego u uzorcima ovog vina koji su nabavljeni u marketu. Iz Tabele 49 se može zaključiti da domaća vina generalno imaju nešto veće sadržaje makro elemenata u odnosu na ona koja su nabavljena u marketima. Detektovani sadržaji makro elemenata u svim ispitivanim uzorcima vina su pokazali da koncentracije ovih nutrijenata dosta variraju kako od tipa osnovne voće ne komponente tako i od načina proizvodnje.

Prilikom uzgajanja biljaka od kojih se dobiva vina proizvode a u cilju zaštite biljnih vrsta i boljeg prinosa vrlo često se koriste ubriva i pesticidi na bazi Cu, Mn i Zn. Ta tri elementa mogu iz zemljišta preko korena, kao i preko lišća, da dospeju u plod biljke i da tako dovedu po povećanju sadržaja ovih elemenata kako u plodu tako i u finalnom proizvodu-vinu [126]. Kada se uporede sadržaji ova tri elementa u ispitivanim uzorcima voćnih vina može se zapaziti da su u pojedinim uzorcima oni ispod LOD-a primenjene metode. Najviše bakra je detektovano u domaćem vinu od višnje (0,5540 ppm); sadržaj mangana je najveći u vinu od kupine iz marketa a cinka u uzorku domaćeg vina od višnje. Ova tri elementa se nalaze u grupi esencijalnih elemenata, ali ako dobro povećanje sadržaja ovih metala iznad propisanih, oni mogu delovati štetno po ljudsko zdravlje.

Gvožđe je u ispitivanim uzorcima voćnih vina, uglavnom ispod LOD-a metode. Najviše želje detektovano je u vinu od maline iz marketa i to 1,631 ppm. Rezultati sadržaja Fe su potvrđili da je ispitivana voćna vina nisu dobar izvor gvožđa, koji je jedan od važnijih nutrijenata u ljudskoj ishrani.

Koncentracije kadmijuma, hroma, molibdena, nikla i olova u svim ispitivanim uzorcima voćnih vina su bile niske ili ispod LOD-a metode. Ovi elementi mogu biti izuzetno opasni po ljudsko zdravlje ako se u akumuliraju u većim koncentracijama u biološkim sistemima, pa je sasvim normalno da se prati njihov sadržaj.

Kada se uporede sadržaji svih elemenata koji su detektovani u ispitivanim vrstama voćnih sokova i voćnih vina može se zaključiti da su voćni sokovi bogatiji makro i mikro elementima pa se stoga oni predaju svega preporučuju u kontekstu nadoknade dela potreba prema ovim nutrijentima.

Literaturnim pregledom (Tabela 52.) nije nađeno mnogo radova koji su se bavili određivanjem sadržaja makro i mikro nutrijenata u voćnim vinima, što samo potvrđuje značajnost ovog rada u domenu proučavanje ove vrste napitaka.

Tabela 50. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD (ppm)  
u uzorcima vo nih vina od dva različita proizvoda a a

Uzorak		B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Kupina	Domaća proizvodnja	1	1,155 $\pm$ 0,021	0,0302 $\pm$ 0,0011*	0,0034 $\pm$ 0,0006*	0,2747 $\pm$ 0,0034	0,2223 $\pm$ 0,0019*	0,3324 $\pm$ 0,0054*	0,2075 $\pm$ 0,0023	0,0627 $\pm$ 0,0054*	nd	1,647 $\pm$ 0,077	0,4418 $\pm$ 0,0078
		2	1,252 $\pm$ 0,087	0,0264 $\pm$ 0,0009	0,0142 $\pm$ 0,0015*	0,0300 $\pm$ 0,0016	0,2642 $\pm$ 0,0213*	1,870 $\pm$ 0,017	0,2672 $\pm$ 0,0015	0,2961 $\pm$ 0,0223	nd	0,5821 $\pm$ 0,0473*	0,2107 $\pm$ 0,0214*
	Market	1	0,7887 $\pm$ 0,0620	0,0171 $\pm$ 0,0001*	0,0230 $\pm$ 0,0027*	0,1673 $\pm$ 0,0078	0,2485 $\pm$ 0,0114*	2,710 $\pm$ 0,030	0,1361 $\pm$ 0,0012	0,2743 $\pm$ 0,0078	nd	2,286 $\pm$ 0,051	0,2625 $\pm$ 0,0037
		2	0,8977 $\pm$ 0,0770	0,0243 $\pm$ 0,0002	0,0117 $\pm$ 0,0004*	0,0792 $\pm$ 0,0014	0,9790 $\pm$ 0,0541	0,0932 $\pm$ 0,0054*	0,2317 $\pm$ 0,0032	0,0384 $\pm$ 0,0047*	nd	4,302 $\pm$ 0,099	0,3403 $\pm$ 0,0168
Višnja	Domaća proizvodnja	1	4,451 $\pm$ 0,044	0,0277 $\pm$ 0,0005*	0,0025 $\pm$ 0,0004*	0,5540 $\pm$ 0,0581	1,132 $\pm$ 0,035	0,2928 $\pm$ 0,0101*	0,2355 $\pm$ 0,0019	0,0977 $\pm$ 0,0033*	nd	1,371 $\pm$ 0,129	0,8845 $\pm$ 0,1193
		2	1,162 $\pm$ 0,065	0,0111 $\pm$ 0,0003*	0,0127 $\pm$ 0,0006*	0,1789 $\pm$ 0,0033	0,1404 $\pm$ 0,0188*	0,9531 $\pm$ 0,0121	0,2048 $\pm$ 0,0014	0,2231 $\pm$ 0,0155	nd	0,3663 $\pm$ 0,0408*	0,1065 $\pm$ 0,0076*
	Market	1	1,301 $\pm$ 0,083	0,0159 $\pm$ 0,0004*	0,0062 $\pm$ 0,0010*	0,0799 $\pm$ 0,0054	0,4382 $\pm$ 0,0227	0,1852 $\pm$ 0,0029*	0,1265 $\pm$ 0,0016	0,0413 $\pm$ 0,0066*	nd	4,261 $\pm$ 0,267	0,1145 $\pm$ 0,0120*
		2	6,675 $\pm$ 0,042	0,0272 $\pm$ 0,0001*	0,0082 $\pm$ 0,0015*	0,0265 $\pm$ 0,0009	1,305 $\pm$ 0,028	0,3338 $\pm$ 0,0157*	0,1690 $\pm$ 0,0023	0,0390 $\pm$ 0,0011*	nd	3,919 $\pm$ 0,027	0,2921 $\pm$ 0,0043
Borovnica	Market	1	0,1974 $\pm$ 0,0041*	0,0125 $\pm$ 0,0002*	0,0122 $\pm$ 0,0015*	0,0984 $\pm$ 0,0039	0,5046 $\pm$ 0,0385	1,381 $\pm$ 0,011	0,1862 $\pm$ 0,0037	0,0659 $\pm$ 0,0088*	nd	6,263 $\pm$ 0,710	0,2158 $\pm$ 0,0030*
		2	0,9668 $\pm$ 0,0289	0,0105 $\pm$ 0,0002*	0,0076 $\pm$ 0,0004*	0,1233 $\pm$ 0,0060	0,1397 $\pm$ 0,0046*	0,9704 $\pm$ 0,0086	0,1028 $\pm$ 0,0021	0,1291 $\pm$ 0,0045*	nd	4,749 $\pm$ 0,158	0,0386 $\pm$ 0,0029*
Malina	Market	1	0,8638 $\pm$ 0,0492	0,0069 $\pm$ 0,0001*	0,0111 $\pm$ 0,0002*	0,0703 $\pm$ 0,0014	1,631 $\pm$ 0,044	0,4839 $\pm$ 0,0045	0,0892 $\pm$ 0,0018	0,0806 $\pm$ 0,0019*	nd	4,586 $\pm$ 0,173	0,1543 $\pm$ 0,0077*
		2	0,5051 $\pm$ 0,0222	0,0153 $\pm$ 0,0003*	0,0101 $\pm$ 0,0010*	0,0651 $\pm$ 0,0006	0,2649 $\pm$ 0,0258*	0,6334 $\pm$ 0,0081	0,1365 $\pm$ 0,0013	0,5259 $\pm$ 0,0197	nd	3,623 $\pm$ 0,013	0,2097 $\pm$ 0,0054*

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 51. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$ SD (ppm) u uzorcima voćnih vina od dva različita proizvoda a a

	Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Kupina	Domača proizvodnja	1 0,5590 $\pm$ 0,0074	nd	0,0940 $\pm$ 0,0086*	nd
		2 0,1500 $\pm$ 0,0092*	nd	0,1271 $\pm$ 0,0021*	nd
	Market	1 1,176 $\pm$ 0,056	nd	0,0474 $\pm$ 0,0032*	0,0024 $\pm$ 0,0001*
		2 0,5476 $\pm$ 0,0029	nd	0,0512 $\pm$ 0,0031*	nd
Višja	Domača proizvodnja	1 0,3824 $\pm$ 0,0076	nd	0,1181 $\pm$ 0,0079*	nd
		2 0,0682 $\pm$ 0,0012*	nd	0,0884 $\pm$ 0,0043*	nd
	Market	1 0,9827 $\pm$ 0,0693	nd	0,0524 $\pm$ 0,0052*	0,0088 $\pm$ 0,0001*
		2 0,8742 $\pm$ 0,0218	nd	0,1044 $\pm$ 0,0005*	0,0102 $\pm$ 0,0002*
Borovnica	Market	1 0,5045 $\pm$ 0,0084	nd	0,0416 $\pm$ 0,0026*	nd
		2 0,5204 $\pm$ 0,0054	nd	0,0573 $\pm$ 0,0055*	0,0034 $\pm$ 0,0002*
	Malina	1 1,429 $\pm$ 0,015	nd	0,0435 $\pm$ 0,0052*	0,0028 $\pm$ 0,0001*
		2 2,892 $\pm$ 0,010	nd	0,0404 $\pm$ 0,0064*	nd

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 52. Literaturni pregled određivanih sadržaja makro i mikro elemenata u uzorcima različitih vrsta sokova izražen u µg/g

Makroelementi									
Uzorak	Poreklo	Ca	K	Mg	Na	Lit.			
Grejfurt	Australija	57,2	1370	86,6	11,8	[78]			
Limun	Australija	116	1450	114	18,2	[78]			
Mandarina	Australija	79,3	2290	122	10	[78]			
Pomorandža	Brazil	36-135	1980-2570	102-208	0,5-1,3	[155]			
Ananas	Španija	96,4-185	402-1320	69,6-173	15,2-96,6	[156]			
Jabuka <sup>a</sup>	Evropa	14,2-121,5	101,3-185,2	11,8-68,9	3-114	[157]			
Mikroelementi									
Uzorak		Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Zn	Lit.
Grejfurt	Australija	0,001	0,4	0,7	0,2	0,01	0,02	0,5	[78]
Limun	Australija	<0,001	0,2	1,0	0,2	<0,001	0,01	0,5	[78]
Mandarina	Australija	<0,001	1,4	1	0,1	<0,001	0,1	0,5	[78]
Pomorandža	Australija	<0,001-0,02	0,04-1	0,02-1,8	0,1-0,5	<0,001-0,03	<0,001-0,2	0,1-0,7	[78]
Ananas	Španija	-	0,3-0,6	1,3-3,2	2,9-12,6	-	-	0,4-1,1	[156]
Breskva	Turska	-	5,21-6,39	2,21-2,61	-	-	-	0,30-0,60	[148]
Višnja	Turska	-	0,44-0,72	2,12-2,36	-	-	-	0,61-0,93	[148]
Jabuka <sup>b</sup>	Saudi Arabija	8,39	330,50	338,36	24,42	-	6,46	544,96	[158]
Jagoda <sup>b</sup>	Brazil	-	-	187	42	-	79	-	[159]
Grožđe <sup>b</sup>	Brazil	-	26	231	168	-	95	90	[159]
Mikroelementi									
Uzorak		Al	B	Sn	Lit.				
Grejfurt	Australija	0,02	0,7	<0,001	[78]				
Limun	Australija	0,01	1,7	<0,001	[78]				
Mandarina	Australija	0,4	0,3	<0,001	[78]				
Pomorandža	Australija	0,001-1	0,6-2,9	<0,001-0,1	[78]				

<sup>a</sup> Sadržaji detektovanih elemenata su izraženi u mg/l; <sup>b</sup> Sadržaji detektovanih elemenata su izraženi u µg/l

### **3.3.5 Statisti ka obrada dobijenih rezultata određivanja sadržaja metala u uzorcima vo nih sokova i vo nih vina**

ANOVA test je primjenjen u cilju ispitivanja uticaja vrste bistrih i gustih vo nih sokova na sadržaj detektovanih makro i mikro elemenata, i za primenu ovog testa uzeta je srednja vrednost rezultata dobijenih od tri (bistri) odnosno dva proizvođača (gusti) za svaki od ispitivanih uzoraka. Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistika ki zna ajna razlika na nivou  $p<0,05$  u sadržajima detektovanih elemenata u svim ispitivanim uzorcima bistrih vo nih sokova (Tabela XIII Prilog II). Naknadna poređenja pomoću Tukey-ovog HSD testa su pokazala da u grupi ispitivanih bistrih vo nih sokova jedino ne postoji statistika ki zna ajna razlika u sadržaju Ca i Cr kod višnje i kupine ( $p=1,000$ ;  $p=0,345$ ), u sadržaju Na kod višnje i crnog grožđa ( $p=0,104$ ) kao ni u sadržaju Pb kod kupine i borvnice ( $p=0,074$ ) (Tabela XIV Prilog II). Primjenjeni ANOVA test na grupu gustih vo nih sokova, pokazao je da u sadržaju svih ispitivanih elemenata, izuzev kod kadmijuma ( $p=0,337$ ), postoji statistika ki zna ajna razlika na nivou  $p<0,05$  (Tabela XV Prilog II). Rezultati naknadog poređenja pomoću Tukey-ovog HSD testa za guste voće ne sokove dati su u Tabeli XVI u Prilogu II. Ovakvi rezultati primjenjenog ANOVA testa su potvrdili uticaj vrste kako bistrog tako i gustog voće nog soka na sadržaj mikro i makro nutrijenata. Time e svaka od ispitivanih vrsta bistrih i gustih vo nih sokova različito uticati na efikasnu nadoknadu ovih nutrijenata u ljudskoj ishrani.

ANOVA testom pravljeno je uticaj proizvođača, za svaku od različitih vrsta bistrih vo nih sokova, na sadržaj detektovanih elemenata. Jednofaktorska analiza varijanse pokazala je statistiku ki zna ajnu razliku na nivou  $p<0,05$  u sadržaju detektovanih makro i mikro elemenata, prema proizvođaču (Tabele XVII Prilog II). ANOVA test je pokazao da jedino u sadržaju olova u bistrom soku od kupine nije postojala statistika ki zna ajna razlika ( $p=0,091$ ) u odnosu na proizvođača.

Jednofaktorskom analizom varijanse ispitana je uticaj vrste voće vođe vina na sadržaj detektovanih makro elemenata. Utvrđena je statistika ki zna ajna razliku na nivou  $p<0,05$  u sadržajima Ca, Mg, K i Na u ispitivanim uzorcima vo nih vina (Tabela XVIII Prilog II).

ANOVA testom ispitana je uticaj vrste proizvođača i okviru iste grupe vo nih vina, na sadržaj detektovanih makro elemenata. Utvrđena je statistika ki zna ajna razliku na nivou  $p<0,05$  u sadržajima detektovanih elemenata u svim ispitivanim uzorcima vo nih vina (Tabela XIX). Naknadna poređenja pomoću Tukey-ovog HSD testa pokazuju da između uzoraka vina od kupine doma i proizvodnje (2) i iz marketa (1) u sadržaju kalcijuma ne postoji statistika ki zna ajna razliku ( $p=0,997$ ). U ispitivanoj grupi vina od kupine, kod uzoraka doma i proizvodnje 1 i 2 nije bilo znatne razlike u sadržaju magnezijuma ( $p=0,736$ ) kao ni između vina od kupine 1 i iz marketa 1 ( $p=0,939$ ) (Tabela XX Prilog II).

Rezultati statistike analize su potvrdili da sadržaj makro elemenata u voćnim vini zavisi od načina proizvodnje.

## 3.4 Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u uzorcima meda

### 3.4.1 ICP-OES optimizacija-evaluacija robusnosti induktivno kuplovane plazme

U cilju postizanja tzv. robusnih uslova plazme, pri konstantnim operativnim uslovima instrumenta (Tabela 53.), ispitana je uticaj *RF* snage generatora na plazmu. Menjanjem snage generatora, tražena je ona koja vodi najvećem odnosu intenziteta emisionih linija Mg(II) 280,270 nm i Mg(I) 285,213 nm. Relativni intenziteti emisionih linija sa pripadaju im standardnim devijacijama i relativnim standardnim devijacijama, kao i odnos intenziteta dati su Tabeli 54.

Tabela 53. Operativni uslovi za instrument iCAP 6000 ICP-OES

Brzina pumpe za ispiranje	100 rpm
Brzina pumpe za analizu	50 rpm
Protok gasa za raspršivanje	0,7 l/min
Protok gasa za hlađenje	12 l/min
Protok pomočnog gasa	0,5 l/min
Pravac posmatranja plazme	aksijalno/radijalno
Vreme ispiranja	30 s

Tabela 54. Uticaj *RF* snage generatora na odnos intenziteta emisionih linija Mg(II) i Mg(I)

<i>RF</i> snaga (W)	Relativni intenzitet±SD Mg(II) 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet±SD Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta
750	23004±2744	11,93	11966±790	6,602	1,922
950	83820±3772	4,500	23990±920	3,835	3,494
1150	156928±1796	1,144	33002±743	2,251	4,755
1350	174206±2105	1,208	45126±958	2,123	3,860

Kao i pri optimizaciji prethodnih ICP-OES metoda i ovde se postiže robusna plazma pri *RF* snazi generatora od 1150 W što je operativni parametar korišten u daljem postupku optimizacije i validacije metoda. Oigledan je porast RSD-a sa udaljavanjem od robusnih uslova plazme.

### 3.4.2 Izbor emisionih linija-parametri kalibracionih pravih

Kao i u prethodnim postupcima izbora najbolje talasne dužine, za svaki od ispitivanih elemenata je izabrano po četiri talasne dužine iz softverske baze podataka a optimalna je izabrana metodom odnosa nagiba dveju kalibracionih pravih, jedne iz standarda a druge iz "spajkovanih" standarda uzorkom. Dobijeni rezultati su dati u Tabeli 55. Iz prikazanih rezultata može se videti da je najveća tzv. analitička osetljivost za emisionu liniju Mg a najmanja za Pb i Se. Tako je se, iz vrednosti dobijenih nagiba, zapaža da je najveći efekat matriksa kod Cr, As i Mo a najmanja kod B, Co, Fe, Mg i Zn. Relativna standardna devijacija se kreće od 0,03% do 9,06%.

Tabela 55. Parametri analitičkih kalibracionih pravih: analitička talasna dužina (λ), limit detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odsečak (b), nagib (m), prosečna RSD za repetabilnost merenja rastvora za kalibraciju i odnos  $m_{kal}/m_{uzorak}$

Element	LOD (nm)	LOQ (ppm)	$R^2$	b	m	RSD (%)	Odnos $m_{kal}/m_{uzorak}$	
Al	396,152	0,4502	1,499	0,999488	4,31	5240	3,63	1,18
As	228,812	0,9334	3,108	0,998846	3,25	1186	3,44	1,26
B	249,773	0,1962	0,6533	0,999903	94,96	13686	0,69	1,08
Ca	422,673	0,4889	1,628	0,934665	419,59	86579	6,72	1,10
Cd	214,438	0,0134	0,0446	1,000000	3,13	26928	0,09	0,86
Co	228,616	0,0352	0,1172	0,999997	0,19	8443	0,08	0,94
Cr	284,325	0,1149	0,3826	0,996683	326,21	7781	2,31	1,28
Cu	324,754	0,9122	3,037	0,997905	21,95	3848	9,06	1,15
Fe	238,204	0,0368	0,1225	0,999997	5,49	10009	0,09	0,94
K	769,896	0,2266	0,8858	0,994138	120,20	7171	8,54	1,10
Mg	279,553	0,1304	0,4342	0,999957	270,82	597388	6,84	1,05
Mn	257,61	0,0144	0,0479	0,999999	5,25	11439	0,42	0,88
Mo	202,03	0,0128	0,0426	0,999998	1,66	1450	0,88	1,24
Na	330,237	0,6502	2,165	0,998934	-1,17	1920	0,03	1,18
Ni	231,604	0,1224	0,4076	0,999962	-0,04	5761	0,18	1,20
Pb	220,353	0,0878	0,2924	0,999981	-0,51	158	0,04	0,88
Se	196,090	0,2970	0,9890	0,999300	0,88	312	1,55	0,86
Si	251,611	0,3226	1,074	0,999948	57,25	6964	1,29	1,12
Zn	202,548	0,7934	2,642	0,998414	28,17	16680	3,41	1,08

\* srednja vrednost tri merenja

### 3.4.3 Evaluacija tačnosti i preciznosti

Tačnost i preciznost određivanja sadržaja metala predloženim metodama ispitana je upoređivanjem sadržaja svakog ispitivanog elementa u rastvoru multielementnog standarda koncentracije 15,00 ppm za K i Si, odnosno 3,00 ppm za ostale elemente sa deklarisanom koncentracijom od strane proizvođača korištenog standarda. Rezultati koji su dobijeni prilikom ispitivanja tačnosti i preciznosti metoda prikazani su u Tabeli 56.

Tabela 56. Tačnost i preciznost određivanja ispitivanih elemenata predloženim metodama

Element	Načina vrednost $\bar{x} \pm SD$ (ppm)	Tačnost <sup>a</sup> Recovery (%)	Preciznost <sup>b</sup> RSD (%)
Al	3,166±0,068	105,5	2,1
As	2,854±0,078	95,1	2,7
B	3,108±0,044	104,1	0,7
Ca	3,088±0,062	103,6	2,0
Cd	2,888±0,068	96,3	2,4
Co	2,899±0,046	96,6	1,6
Cr	2,882±0,068	96,1	2,4
Cu	3,166±0,058	105,5	1,8
Fe	3,114±0,072	103,8	2,3
K	14,52±0,48	96,8	3,3
Mg	2,892±0,072	96,4	2,5
Mn	3,162±0,084	105,4	2,7
Mo	3,200±0,090	106,7	2,8
Na	2,886±0,084	96,2	2,9
Ni	2,868±0,092	95,6	3,2
Pb	3,110±0,104	103,7	3,3
Se	2,848±0,082	94,9	2,9
Si	15,86±0,28	105,7	1,8
Zn	3,142±0,064	104,7	2,0

$$^a \text{Recovery} = \frac{\bar{x}}{\sim} \cdot 100; ^b RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$

Tačnost određivanja ispitivanih metala se kreće od 94,9% za Se do 106,7 % za Mo a preciznost od 0,7% kod B do 3,3% kod K i Pb.

#### 3.4.4 Sadržaj ispitivanih makro i mikro elemenata u različitim uzorcima meda

Med predstavlja prirodni proizvod koji pored hranljive ima i tarapeutsku vrednost. U cilju određivanja mineralnog sastava meda uzeti su uzorci etiri vrste meda od samostalnih proizvoda a sa šest različitih geografskih područja Republike Srbije, kao i sedam vrsta tzv. industrijskog meda, koje se mogu naći u prodaji na području grada Niša. Ovakav izbor uzoraka je imao za cilj da se vidi da li postoji razlika u sadržaju određivanih elemenata u medu samostalnih proizvoda a u poređenju sa tzv. industrijskim medom, tj. da li i kako način proizvodnje i tretiranja finalnog proizvoda utiče na količinu makro i mikro elemenata u medu. Tako je, izabrano je više vrsta meda (livadski, bagremov, šumski, cvetni, planinski) sa ciljem postavljanja mogućih korelacija prema biljnog poreklu meda. Uzorci domaćih vrsta meda su uzimani sa tri različita lokaliteta, u cilju provere uticaja područja sa kojeg je med, na sadržaj detektovanih makro i mikronutrijenata.

Primenom optimalnih i robustnih uslova metoda, u ispitivanim uzorcima meda je određen sadržaj 19 elemenata. U Tabelama od 57 do 62 je, za svaki od uzoraka, prikazana srednja vrednost sadržaja elemenata od tri uzastopna merenja ± standardna devijacija SD ( $\mu\text{g/g}$  meda).

Tabela 57. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima domaćih vrsta meda sa tri različita geografska područja

	Uzorak	Ca	K	Mg	Na
Livadski	Niška Banja	52,82 $\pm$ 0,64	72,46 $\pm$ 0,98	28,68 $\pm$ 0,66	80,48 $\pm$ 1,22
	Vladičin Han	50,44 $\pm$ 0,24	70,22 $\pm$ 1,88	20,46 $\pm$ 0,42	88,46 $\pm$ 1,64
	Prokuplje	68,92 $\pm$ 0,23	81,75 $\pm$ 1,58	27,77 $\pm$ 0,23	103,2 $\pm$ 2,3
Bagremov	Niška Banja	51,44 $\pm$ 0,78	66,86 $\pm$ 2,36	24,64 $\pm$ 0,15	79,88 $\pm$ 1,51
	Šid	60,66 $\pm$ 0,81	76,22 $\pm$ 3,18	32,66 $\pm$ 0,72	99,88 $\pm$ 3,62
	Valjevo	70,44 $\pm$ 0,55	91,66 $\pm$ 1,32	40,46 $\pm$ 0,55	70,88 $\pm$ 1,84
Šumski	Niška Banja	55,68 $\pm$ 0,96	58,44 $\pm$ 1,68	30,66 $\pm$ 0,83	82,88 $\pm$ 2,63
	Vladičin Han	60,24 $\pm$ 0,22	70,66 $\pm$ 2,31	28,88 $\pm$ 0,71	78,66 $\pm$ 1,31
	Zaplanje	58,86 $\pm$ 0,92	64,24 $\pm$ 1,22	26,66 $\pm$ 0,61	91,22 $\pm$ 1,57
Cvetni	Niška Banja	58,24 $\pm$ 0,53	62,84 $\pm$ 2,36	28,88 $\pm$ 0,32	90,22 $\pm$ 2,73
	Prokuplje	63,44 $\pm$ 0,74	82,44 $\pm$ 1,79	20,86 $\pm$ 0,43	78,98 $\pm$ 1,49
	Vlasina	50,34 $\pm$ 0,39	58,88 $\pm$ 1,33	32,46 $\pm$ 0,54	83,34 $\pm$ 2,12

Tabela 58. Srednja vrednost sadržaja makro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima različitih vrsta industrijskog meda

	Uzorak	Ca	K	Mg	Na
	Manuka	102,8 $\pm$ 1,0	79,58 $\pm$ 0,73	38,70 $\pm$ 0,13	166,9 $\pm$ 0,8
	Biomed 6	52,42 $\pm$ 0,88	10,66 $\pm$ 0,88	14,88 $\pm$ 0,24	66,28 $\pm$ 0,98
	Livadski	60,66 $\pm$ 0,22	12,42 $\pm$ 0,66	18,34 $\pm$ 0,22	42,86 $\pm$ 0,64
	Bagremov	81,97 $\pm$ 0,93	3,785 $\pm$ 0,033	16,22 $\pm$ 0,04	30,47 $\pm$ 0,53
	Šumski	73,07 $\pm$ 2,05	13,80 $\pm$ 0,09	19,49 $\pm$ 0,10	62,72 $\pm$ 0,34
	Cvetni	41,62 $\pm$ 0,25	3,993 $\pm$ 0,040	12,45 $\pm$ 0,02	21,73 $\pm$ 0,05
	Planinski	58,60 $\pm$ 0,44	10,88 $\pm$ 0,08	20,66 $\pm$ 0,42	46,86 $\pm$ 0,32

Sadržaj određivanih makroelemenata (*natrijum*, *kalijum*, *kalcijum* i *magnezijum*) u ispitivanim uzorcima domaćeg meda opada u sledećem nizu Na>K>Ca>Mg. Kada se uporede srednje vrednosti sadržaja natrijuma, dobijene po vrsti meda za svaki od tri različita lokaliteta, može se videti da je najviše natrijuma detektovano u livadskom medu (90,65 µg/g) dok je količina ovog elementa u ostalim vrstama meda bila približno ista i kretala se oko 80 µg/g.

Za razliku od domaćeg meda, sadržaj makro elemenata u uzorcima industrijskog meda opada u sledećem nizu Na>Ca>Mg>K. U poređenju sa uzorcima domaćeg meda može se videti da je kod industrijskog meda sadržaj svih detektovanih makro elemenata generalno niži, izuzev meda Manuka koji je geografsko poreklo sa Novog Zelanda. Kod ove vrste meda na prvo je skoro dva puta više Na i Ca, odnosno 1,5 puta više Mg u odnosu na sve uzorce domaćeg meda, dok im je sadržaj K približno isti. Kada se sadržaji detektovanih makro elemenata u medu Manuka uporede sa drugim vrstama industrijskog meda može se videti da je razlika u sadržajima veća nego u slučaju poređenja sa domaćim vrstama meda. Veća količina Na, Ca, Mg i K u medu Manuka mogu biti direktna posledica porekla biljaka kojima su polen i polen podeljeno koristile, jer koncentracija različitih metala u medu zavisi od mineralnog sastava cvetnih biljaka, što je dalje posledica njihovog botaničkog i geografskog porekla [160].

**Tabela 59. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima domaćih vrsta meda sa tri različita geografska područja**

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn	
Livadski	Niška Banja	3,040 $\pm$ 0,046	0,0982 $\pm$ 0,0024	0,3084 $\pm$ 0,0124*	1,224 $\pm$ 0,054*	4,988 $\pm$ 0,064	0,4464 $\pm$ 0,0024	0,4664 $\pm$ 0,0012	0,0384 $\pm$ 0,0022*	nd	40,66 $\pm$ 0,24	12,46 $\pm$ 0,14
	Vladičin Han	2,982 $\pm$ 0,088	0,1204 $\pm$ 0,0044	0,3466 $\pm$ 0,0144*	1,088 $\pm$ 0,046*	5,668 $\pm$ 0,088	0,3888 $\pm$ 0,0046	0,6404 $\pm$ 0,0052	0,0442 $\pm$ 0,0022*	nd	38,22 $\pm$ 0,16	14,48 $\pm$ 0,08
	Prokuplje	3,342 $\pm$ 0,023	0,1050 $\pm$ 0,0052	0,2856 $\pm$ 0,0182*	1,990 $\pm$ 0,015*	6,667 $\pm$ 0,038	0,4774 $\pm$ 0,0032	0,5668 $\pm$ 0,0026	0,0474 $\pm$ 0,0034*	nd	47,17 $\pm$ 0,18	19,59 $\pm$ 0,08
Bagermov	Niška Banja	1,922 $\pm$ 0,015	0,0988 $\pm$ 0,0041	0,3044 $\pm$ 0,0261*	1,444 $\pm$ 0,017*	5,242 $\pm$ 0,073	0,2988 $\pm$ 0,0091	0,6668 $\pm$ 0,0057	0,0502 $\pm$ 0,0061*	nd	28,46 $\pm$ 0,25	15,44 $\pm$ 0,12
	Šid	2,088 $\pm$ 0,054	0,1664 $\pm$ 0,0052	0,2664 $\pm$ 0,0192*	2,004 $\pm$ 0,042*	4,808 $\pm$ 0,051	0,5452 $\pm$ 0,0051	0,5244 $\pm$ 0,0013	0,0660 $\pm$ 0,0073*	nd	31,46 $\pm$ 0,63	11,22 $\pm$ 0,15
	Valjevo	2,122 $\pm$ 0,073	0,1442 $\pm$ 0,0021	0,2224 $\pm$ 0,0351*	2,566 $\pm$ 0,063	6,224 $\pm$ 0,022	0,6202 $\pm$ 0,0011	0,7664 $\pm$ 0,0071	0,0456 $\pm$ 0,0026*	nd	32,88 $\pm$ 0,45	10,24 $\pm$ 0,03
Šumski	Niška Banja	3,088 $\pm$ 0,044	0,1220 $\pm$ 0,0054	0,3022 $\pm$ 0,0521*	1,006 $\pm$ 0,017*	4,244 $\pm$ 0,036	0,4426 $\pm$ 0,0012	0,2448 $\pm$ 0,0016	0,0224 $\pm$ 0,0061*	nd	52,22 $\pm$ 0,83	16,24 $\pm$ 0,07
	Vladičin Han	1,044 $\pm$ 0,057	0,0988 $\pm$ 0,0072	0,1988 $\pm$ 0,0362*	2,100 $\pm$ 0,039*	3,242 $\pm$ 0,075	0,5442 $\pm$ 0,0053	0,3442 $\pm$ 0,0024	0,0324 $\pm$ 0,0067*	nd	44,62 $\pm$ 0,99	10,22 $\pm$ 0,23
	Zaplanje	2,866 $\pm$ 0,036	0,2002 $\pm$ 0,0041	0,2242 $\pm$ 0,0421*	1,884 $\pm$ 0,082*	3,222 $\pm$ 0,053	0,5546 $\pm$ 0,0038	0,2242 $\pm$ 0,0015	0,0444 $\pm$ 0,0038*	nd	32,86 $\pm$ 0,44	11,46 $\pm$ 0,13
Cvetni	Niška Banja	2,928 $\pm$ 0,061	0,0998 $\pm$ 0,0062	0,2642 $\pm$ 0,0394*	2,088 $\pm$ 0,0361*	4,086 $\pm$ 0,027	0,3488 $\pm$ 0,0085	0,8442 $\pm$ 0,0053	0,0702 $\pm$ 0,0055*	nd	44,66 $\pm$ 0,56	12,66 $\pm$ 0,28
	Prokuplje	1,886 $\pm$ 0,089	0,2202 $\pm$ 0,0013	0,3002 $\pm$ 0,0673*	1,006 $\pm$ 0,0239*	2,988 $\pm$ 0,086	0,5680 $\pm$ 0,0022	0,7664 $\pm$ 0,0028	0,0664 $\pm$ 0,0015*	nd	35,88 $\pm$ 0,33	10,66 $\pm$ 0,16
	Vlasina	3,446 $\pm$ 0,052	0,1002 $\pm$ 0,0265	0,2022 $\pm$ 0,0397*	2,444 $\pm$ 0,025	5,446 $\pm$ 0,018	0,6020 $\pm$ 0,0015	0,7746 $\pm$ 0,0021	0,0556 $\pm$ 0,0018*	nd	32,56 $\pm$ 0,63	10,88 $\pm$ 0,22

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 60. Srednja vrednost sadržaja mikro elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )  
u uzorcima različitih vrsta industrijskog meda

Uzorak	B	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Si	Zn
Manuka	2,480 $\pm$ 0,015	0,0532 $\pm$ 0,0052*	0,2284 $\pm$ 0,0102*	1,775 $\pm$ 0,005*	6,023 $\pm$ 0,035	1,522 $\pm$ 0,005	0,4434 $\pm$ 0,0023	0,087 $\pm$ 0,005*	nd	57,67 $\pm$ 0,23	3,507 $\pm$ 0,025
Biomed 6	1,022 $\pm$ 0,044	0,1202 $\pm$ 0,0084	0,2240 $\pm$ 0,0202*	0,8884 $\pm$ 0,0040*	3,082 $\pm$ 0,044	0,2466 $\pm$ 0,0082	0,2246 $\pm$ 0,0015	0,0424 $\pm$ 0,0052*	nd	12,86 $\pm$ 0,86	0,6664 $\pm$ 0,0084*
Livadski	1,888 $\pm$ 0,046	0,0882 $\pm$ 0,0062*	0,2084 $\pm$ 0,0104*	0,5444 $\pm$ 0,0442*	3,088 $\pm$ 0,011	0,2024 $\pm$ 0,0080	0,3488 $\pm$ 0,0061	0,0444 $\pm$ 0,0018*	nd	15,08 $\pm$ 0,05	0,8280 $\pm$ 0,0062*
Bagremov	1,370 $\pm$ 0,001	0,1270 $\pm$ 0,0032	0,6824 $\pm$ 0,0032*	0,5026 $\pm$ 0,0030*	3,342 $\pm$ 0,013	0,2172 $\pm$ 0,0012	0,5666 $\pm$ 0,0053	0,0454 $\pm$ 0,0036*	nd	13,32 $\pm$ 0,08	1,140 $\pm$ 0,0003*
Šumski	1,535 $\pm$ 0,013	0,1922 $\pm$ 0,0282	0,2404 $\pm$ 0,0202*	0,8788 $\pm$ 0,0054*	2,300 $\pm$ 0,020	0,2052 $\pm$ 0,0008	0,4888 $\pm$ 0,0041	0,0322 $\pm$ 0,0050*	nd	8,280 $\pm$ 0,005	0,7372 $\pm$ 0,0054*
Cvetni	2,205 $\pm$ 0,010	0,0900 $\pm$ 0,0032	0,3876 $\pm$ 0,0180*	0,5454 $\pm$ 0,0032*	2,457 $\pm$ 0,028	0,112 $\pm$ 0,0022	0,3224 $\pm$ 0,0017	0,0252 $\pm$ 0,0052*	nd	14,97 $\pm$ 0,06	0,7756 $\pm$ 0,0032*
Planinski	2,260 $\pm$ 0,020	0,2024 $\pm$ 0,0044	0,2240 $\pm$ 0,0226*	0,6662 $\pm$ 0,0040*	3,880 $\pm$ 0,018	0,1884 $\pm$ 0,0020	0,5060 $\pm$ 0,0019	0,0344 $\pm$ 0,0052*	nd	24,88 $\pm$ 0,08	2,066 $\pm$ 0,034

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Sadržaj *bakra* u ispitivanim uzorcima doma eg meda uglavom je ispod LOD-a primenjene metode. Jedino su u uzorcima bagremovog meda sa podru ja Valjeva i cvetnog meda sa Vlasine detektovani sadržaji iznad LOD-a metode-2,566 µg/g za bagremov odnosno 2,444 µg/g za cvetni med. Kada se sadržaji ovog metala uporede sa sadržajima do kojih su u svojim studijama došli drugi autori može se videti da su koli ine bakra u ovom radu bile ve e u pore enju sa koncentracijom bakra koja je detektovana u medu nabavljanog sa razli itih podru ja u Italiji (0,163-0,182; 0,310; 0,890 i 0,647 µg/g) [161-163] kao i u uzorcima meda u Španiji gde se sadržaj Cu kretao od 0,10 do 1,73 µg/g u zavisnosti od geografskog porekla meda [164]. Sadržaj bakra u uzorcima meda iz Slovenije (od 1,4 do 2,7 µg/g ) [165] je u skladu sa rezultatima u ovom radu.

Koli ina Cu u uzorcima industrijskog meda je ispod LOD-a metode u svim ispitivanim uzorcima. Kada se ovi sadržaji uporede sa koli inom bakra koja je detektovana u doma im vrstama meda može se zapaziti da je sadržaj ovog elementa bio znatno niži u odnosu na doma e vrste meda. Najve i sadržaj bakra detektovan je u uzorku meda Manuka (1,775 µg/g), dok je u uzorcima livadskog, bagremovog i cvetnog meda koncentracija Cu bila najniža i kretala se od 0,5026 do 0,5454 µg/g. Povišeno prisustvo bakra u medu može biti posledica zaga enja životne sredine kao i upotrebe fungicida, baktericida i herbicida za zaštitu biljaka od razli itih vrsta šteto ina što potvr uje potrebu pra enja i poznavanja sadržaja istog [166]. Po pravilniku RS [71] maksimalno dozvoljena koli ina bakra u medu je 1 µg/g, pa se tako može zaklju iti da sve industrijske vrste meda zadovoljavaju standard o koli ini Cu, izuzev meda Manuka. Sa druge strane kod uzoraka doma ih vrsta meda zabeleženi su sadržaji Cu koji su iznad onih koje propisuje Pravilnik RS. Povišeni sadržaj ovog metala u uzorcima doma eg meda može biti posledica upotrebe posu a na bazi legura bakra, koja se naj e i upotrebljavaju u doma instvima [167]. Usled dugogodišnje upotrebe posu a za obradu i skladištenje meda, posu e se može može oštetiti i na taj na in se stvaraju uslovi za migraciju bakra iz metalne legure u med. U cilju smanjenja koli ina Cu u uzorcima doma eg meda potrebno je voditi ra una o redovnoj zameni posuda u kojima se med sakuplja, obra uje i skladišti.

Sadržaj *gvož a* u ispitivanim uzorcima doma eg meda prati slede i opadaju i niz livadski>bagremov>cvetni>šumski. Kada se sadržaj ovog metala poredi po geografskom poreklu iste vrste meda, može se videti da dolazi do varijacije u sadržaju Fe u zavisnosti od lokaliteta. Najviše gvož a je detektovano u livadskom medu sa podru ja Prokuplja (6,667 µg/g). U odnosu na sadržaje gvož a u doma im vrstama meda, u uzorcima industrijskog meda, sadržaj ovog metala je generalno bio niži, izuzev meda Manuke gde je zabeležena i najve a koncentracija ovog metala u grupi uzoraka industrijskog meda. Najniži sadržaj Fe odre en je u uzorku šumskog meda (2,300 µg/g).

Kada se uporedi sadržaj *cinka* u doma em medu sa sadržajem ovog metala u industrijskom medu, može se videti da doma i med ima znatno ve e koncentracije *cinka*, i to za oko 10 do 20 puta, u zavisnosti od vrste meda. Najviše cinka odre eno je u doma em livadskom medu sa podru ja Prokuplja (19,59 µg/g) a najniže u šumskom medu sa podru ja Vladimirovina (10,22 µg/g). U grupi industrijskog meda Manuka i planinski med imaju najviše detektovanog cinka i to 3,507 µg/g odnosno 2,066 µg/g, dok su sadržaji Zn u ostalim uzorcima ove grupe meda znatno niži i ispod LOD-a primenjene metode.

Po pravilniku RS [71] maksimalno dozvoljene koli ine Fe i Zn u medu su 20 µg/g za Fe i 10 µg/g za Zn. Na osnovu sadržaja Fe i Zn koji su detektovani u ispitivanim uzorcima meda može se zaklju iti da su sve vrste meda bezbedne za koriš enje u smislu sadržaja Fe ali u

pogledu sadržaja Zn doma e vrste meda ne zadovoljavaju propisane standarde i o tome se mora voditi ra una s obzirom da povišeni sadržaji cinka mogu štetno delovati na zdravlje ljudi.

Uzorci ispitivanih vrsta meda mogu tokom procesa proizvodnje biti kontaminirani pojedim metalima. Izvori ove kontaminacije mogu biti p elari preko opreme i alatki koje se koriste u toku dobijanja meda, ali i samo radno okruženje može doprineti ovoj kontaminaciji. Usled kontaktan sa medom neki metali (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Ni i Zn) mogu migrirati iz materijala (ner aju i elik, galvanizirani metal i aluminijum) od kojeg su izra ene posude za sakupljanje, proizvodnju i odlaganje meda. Vrednost pH meda je 3,5-4,8 pa zbog svoje kiselosti može imati korozivni efekat na površinu primenjenih alatki i posuda i tako omogu iti metalima da dospeju u med. Tako e gvož e i neki drugi metalni kontaminanti (Cd, Co, K, Mg, Mn i Pb) mogu da dospeju u med preko supstanci kojima se p ele prehranjuju (še erne poga e i sirupi) [167].

*Selen* je jedini metala iz grupe elemenata u tragovima, koji nije detektovana kako u uzorcima doma eg tako i u uzorcima industrijskog meda. Sadržaj *nikla* je ispod LOD-a primenjene metode u svim ispitivanim uzorcima meda. *Bor* je detektovan u približno istim koli inama u doma im i industrijskim vrstama meda i njegov sadržaj se kre e od 1,022 do 3,446  $\mu\text{g/g}$ . Sadržaj *kobalta* u ispitivanim uzorcima meda je varirao u odnosu na geografsko poreklo uzorka, dok je koli ina *molibdena* koja je detektovana u ispitivanim vrstama doma eg meda ve a u odnosu na industrijske vrste meda. Detektovani sadržaj *silicijuma* je u doma em medu oko 2 do 3 puta ve i u odnosu na uzorce industrijskog meda (Tabele 59 i 60.).

Tabela 61. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima domaćih vrsta meda sa tri različite geografske područja

	Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Livadiški	Niška Banja	44,28 $\pm$ 0,44	nd	0,0224 $\pm$ 0,0008*	0,0888 $\pm$ 0,0122*
	Vladičin Han	38,22 $\pm$ 0,22	nd	0,0202 $\pm$ 0,0011*	0,1044 $\pm$ 0,0442*
	Prokuplje	54,20 $\pm$ 0,35	nd	0,0172 $\pm$ 0,0062*	0,9372 $\pm$ 0,0232
Bogremov	Niška Banja	28,22 $\pm$ 0,28	nd	0,0188 $\pm$ 0,0021*	0,0988 $\pm$ 0,0422*
	Šid	34,46 $\pm$ 0,61	nd	0,0222 $\pm$ 0,0034*	0,1222 $\pm$ 0,0513*
	Valjevo	62,44 $\pm$ 0,79	nd	0,0344 $\pm$ 0,0011	0,0988 $\pm$ 0,0325*
Šumski	Niška Banja	34,66 $\pm$ 0,83	nd	0,0444 $\pm$ 0,0031	0,0682 $\pm$ 0,0165*
	Vladičin Han	44,26 $\pm$ 0,34	nd	0,0220 $\pm$ 0,0012*	0,0862 $\pm$ 0,0237*
	Zaplanje	38,46 $\pm$ 0,59	nd	0,0102 $\pm$ 0,0031*	0,1088 $\pm$ 0,0614*
Cvetni	Niška Banja	30,46 $\pm$ 0,48	nd	0,0088 $\pm$ 0,0042*	0,1002 $\pm$ 0,0384*
	Prokuplje	29,88 $\pm$ 0,62	nd	0,0320 $\pm$ 0,0063*	0,1222 $\pm$ 0,0812*
	Vlasina	26,88 $\pm$ 0,56	nd	0,0098 $\pm$ 0,0003*	0,0788 $\pm$ 0,0325*

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Tabela 62. Srednja vrednost sadržaja neesencijalnih i toksičnih elemenata  $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima različitih vrsta industrijskog meda

Uzorak	Al	As	Cd	Pb
Manuka	38,90 $\pm$ 0,20	nd	nd	0,4124 $\pm$ 0,0252
Biomed 6	12,08 $\pm$ 0,12	nd	nd	0,0980 $\pm$ 0,0440*
Livadski	9,066 $\pm$ 0,024	nd	nd	0,1224 $\pm$ 0,0252*
Bagremov	8,775 $\pm$ 0,038	nd	0,0222 $\pm$ 0,0001*	0,0804 $\pm$ 0,0883*
Šumski	13,03 $\pm$ 0,03	nd	0,0154 $\pm$ 0,0032*	0,2804 $\pm$ 0,0152
Cvetni	13,14 $\pm$ 0,13	nd	nd	0,1522 $\pm$ 0,0050*
Planinski	8,662 $\pm$ 0,222	nd	nd	0,2440 $\pm$ 0,0062

\* < LOD metode; nd – nije detektovan

Toksičan metal *olovo* je detektovan u svim ispitivanim uzorcima domaćeg tako i industrijskog meda u sadržajima koji su bili ispod LOD-a primenjene metode što potvrđuje injenicu da je Pb jedan od najrasprostranjenijih kontaminanata životne sredine. Sadržaj ovog metala u uzorcima domaćih vrsta meda bio je generalno niži u poređenju sa ispitivanim vrstama industrijskog meda izuzev livadskog meda sa područja Prokuplja, gde je zabeležena i najveća koncentracija olova od 0,9372  $\mu\text{g/g}$ , što ukazuje na uticaj geografske životne sredine tog područja. U grupi industrijskog meda, Manuka ima najveći sadržaj ovog metala (0,4124  $\mu\text{g/g}$ ), dok je najmanje Pb zabeleženo kod bagremovog meda (0,0804  $\mu\text{g/g}$ ). Kada se poredi sadržaj *olova* u zavisnosti od geografskog porekla domaćeg meda, može se videti da postoje određene varijacije u ovim sadržajima, tj. da sadržaj zavisi od regionalnih faktora.

Visoko toksičan metal *kadmijum* je detektovan u svim uzorcima domaćeg meda u koncentraciji koja je bila uglavnom ispod LOD-a primenjene metode. U ovoj grupi uzorka koncentracija kadmijuma je varirala s obzirom na lokalitet sa kojeg med potiče, pri čemu je najviše ovog metala određeno u šumskom medu iz Niške banje (0,0444  $\mu\text{g/g}$ ) i bagremovom medu iz Valjeva (0,0344  $\mu\text{g/g}$ ). Kod uzorka industrijskog meda ovaj element je detektovan jedino u uzorcima meda od bagrema i šumskog meda i to u sadržajima koji su bili ispod LOD-a primenjene metode.

Metali koji su detektovani u medu mogu voditi poreklo od geografskih i botaničkih izvora. Pored toga, prisutni teški metali u medu mogu biti rezultat dejstva antropogenih faktora [168]. Oblast koju potiče, prilikom sakupljanja nektara pokrivaju je negde oko 7  $\text{km}^2$ . Tako veliki radijus kretanja ih nužno vodi do različitih područja, različitih biljaka i drugih izvora hrane. Pri tome potiče dolaze u kontakt sa biljkama, vazduhom, vodom i zemljишtem. Ako dospeju u životnu oblast i one same se kontaminiraju i nose zagađivače iz okoline ili ih uzimaju preko sirovog materijala kojeg sakupljaju [161]. Na ovaj način kontaminanti dospevaju u med i

menjaju njegov sastav i kvalitet. Zato je neophodno pratiti i kontrolisati sadržaj teških metala u medu iji sadržaj može ukazivati na zaga enje oblasti sa koje med vodi poreklo.

Pravilnik RS o koli inama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemoterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama [71] propisuje dozvoljenu koli inu olova u medu od  $0,5 \mu\text{g/g}$  odnosno kadmijuma od  $0,05 \mu\text{g/g}$ . Na osnovu ovih vrednosti, može se zaklju iti da svi ispitivani uzorci meda u ovom radu imaju niže sadržaje ova dva teška metala u odnosu na one koje propisuje Pravilnik RS, izuzev doma eg meda sa podru ja Prokuplja gde je detektovano više olova nego što se Pravilnikom dopušta. Iako su detektovani sadržaji olova i kadmijuma u ispitivanim uzorcima meda bili niski i uglavnom ispod LOD-a primenjene metode a imaju i u vidu toksi no i kumulativno dejstvo koje ovi metali imaju na ljude, neophodno je da se stalno prati sadržaj ovih kontaminanata u medu.

*Arsen* je m tal koji iz grupe toksi nih metala jedini nije detektovan kako u doma im tako i u industrijskim uzorcima meda.

Kada se uporede sadržaji detektovanih makro i mikro elemenata kod bagremovog, šumskog, cvetnog i livadskog meda izme u dve grupe ispitivanih uzoraka (doma i i industrijski) može se zapaziti da se svi detektovani elementi izuzev kalcijuma, nalaze u ve im sadržajima u ove etiri vrste meda koji je doma eg porekla što zna i da se upotreboom navednih doma ih vrsta meda mogu efikasnije nadoknaditi dnevne potrebe ka ovim makronutrijentima u odnosu na iste vrste ali industrijskog meda.

Na osnovu razultata ovog rada kao i literaturinim pregledom radova (Tabela 63.) u kojima su odre ivani sadržaji pojedinih makro i mikro elemenata može se zapaziti da u sadržajima detektovanih elemenata postoji dosta varijacije i da ne postoji pravilnost u promeni odre enih sadržaja. Takva odstupanja u detektovanim sadržajima u uzorcima razli itih vrsta meda razli itog geografskog porekla, su samo potvrđila rezultate i zaklju ke do kojih se u ovom radu došlo, a to je da geografsko poreklo meda ima veoma važan uticaj na njegov kona an mineralni sastav. Zato se na osnovu detektovanih sadržaja makro i mikronutrijenata može izvršiti klasifikaciju meda po njegovom botani kom i geografskom poreklu.

Detektovani sadržaji makro i mikronutrijenata u ovom radu su pokazali da ispitivane vrste meda mogu biti veoma važan izvor metala u ljudskoj ishrani. Me utim, koli ina metala koja se upotreboom meda unosi u ljudski organizam je niska, jer se med u ishrani koristi u malim koli inama. Dnevna upotreba meda može nadoknaditi samo nekoliko procenata, pa ak i niže (od 0,005-0,5%) preporu enih dnevnih potreba ka ovim nutrijentima.

Tabela 63. Literaturni pregled odredjivanih sadržaja makro i mikro elemenata u uzorcima meda izražen u  $\mu\text{g/g}$

Poreklo	Makroelementi				Lit.
	Ca	K	Mg	Na	
Turska	51±4,26	296±15,3	33±1,43	118±5,44	[169]
U.S.	45	292	13	<30	[117]
Francuska	54,1	-	192	-	[170]
Italija	47-132	-	16-173	-	[171]
U.S.	-	91-230	-	201-256	[172]
Indija	33,7-84,6	490-933	-	97,9-247	[173]
Španija	20,7-193	214-3166	7,25-165	9,42-258	[164]
Slovenija	3,4-12,9	183-779	-	-	[165]
Mikroelementi					
	Co	Cr	Cu	Fe	Mn
Turska	1±0,06	-	1,8±0,17	6,6±0,32	1±0,07
U.S.	-	-	-	0,42	<1
Italija	-	0,003±0,00003	0,1±0,001	2,3±0,02	-
Francuska	0, 1-0, 2	0, 1-0, 4	0,1-0,17	0,6-86,8	0, 1-42,8
Italija	-	-	-	-	-
Indija	<0, 3-0, 3	-	1,2-0,20	3,6-28,4	-
U.S.	<0,05-0,2	0,04-0,1	-	<4-15,9	-
Španija	-	-	0,10-1,73	0,40-52,51	-
Slovenija	-	0,78-3,55	-	1,98-3,93	0,30-2,30
Mikroelementi					
	Al	As	Sn		Lit.
Italija	-	0,004±0,0003	0,01±0,001		[161]
Francuska	0, 2-9, 7	-	-		[170]
U.S.	-	0, 3	-		[172]
Arabija	0,05-0,2	-	-		[174]

### **3.4.5 Statisti ka obrada dobijenih rezultata odre ivanja sadržaja metala u uzorcima meda**

Jednofaktorskom analizom varijanse ispitana je uticaj vrste meda, kako doma ih tako i industrijskih, na sadržaj detektovanih makro i mikro elemenata. Utvrđena je statistika ki zna da nema razlike na nivou  $p<0,05$  u sadržajima određivanih elemenata u svim ispitivanim uzorcima ove dve vrste meda (Tabele XXI i XXII Prilog II). Naknadna poređenja pomoću Tukey-ovog HSD testa ukazuju da u grupi doma ih vrsta meda između u uzoraka šumskog i cvetnog meda ne postoji statistika ki zna da nema razlike u sadržaju *kadmijuma* ( $p=0,773$ ); sadržaj *hroma* se zna da nije razlikovan između u uzoraka livadskog i bagremovog meda ( $p=0,273$ ), dok makro element *magnezijum* u uzorcima livadskog, šumskog i cvetnog meda ne pokazuje statistiku ki zna da nema razliku. (Tabela XXIII Prilog II). Rezultati Tukey post hoc testa za uzorce industrijskog meda dati su u tabeli XXIV u Prilogu II.

Rezultati primenjenih statistika kih testova su pokazali da postoji uticaj vrste meda (doma i i industrijski) na sadržaj gotovo svih detektovanih makro i mikronutrijenata. To zna i da svaku ispitivanu vrstu meda karakteriše različit sadržaj ispitivanih elemenata i da je na osnovu tih sadržaja, svaka ispitivana vrsta meda različito uticati na nadoknadu dnevnih potreba prema ovim nutrijentima u ljudskoj ishrani.

Jednofaktorskom analizom varijanse ispitana je uticaj lokaliteta u okviru iste vrste domaćeg meda (livadski, bagremov, šumski i cvetni), na sadržaj detektovanih makro i mikro elemenata. Utvrđena je statistika ki zna da nema razlike na nivou  $p<0,05$  u sadržajima određenih elemenata u svim ispitivanim uzorcima u odnosu na poreklo meda (Tabele XXV Prilog II). ANOVA test je pokazao da jedino kod uzoraka šumskog meda ne postoji statistika ki zna da nema razliku u sadržaju *olova* ( $p=0,354$ ), odnosno kod cvetnog meda ne postoji statistika ki zna da nema razliku u sadržaju *kadmijuma* ( $p=0,141$ ).

Rezultati primenjenog ANOVA testa su pokazali da postoji uticaj lokaliteta sa kojeg potiče u iste vrste domaćeg meda na sadržaj detektovanih mikro i makro elemenata. Tako se na osnovu određenih sadržaja makro i mikronutrijenata može izvršiti klasifikacija meda po njegovom botanikom i geografskom poreklu.

## **4 IZVOD**

U okviru doktorske disertacije razvijene su i primenjene emisione spektrometrijske metode na bazi induktivno kuplovane plazme (ICP-OES) kroz sledeće korake:

- u procesu optimizacije parametara instrumenta izvršena je provera robusnosti plazme ispitivanjem uticaja *RF* snage generatora na postizanje tzv. robusne plazme odnosno plazme sa najmanje uticaja na devijaciju analitičkog signala, što je uslov koji obezbeđuje najmanji efekat matriksa na određivanje sadržaja elemenata u uzorcima. Tako postignuta plazma u stanju tzv. lokalne termodinamičke ravnoteže (LTE) je plazma koja se po svojim karakteristikama najviše približava teorijski izrađenoj termodinamici kojih ravnoteži (TE). U tu svrhu pravilen je odnos relativnih intenziteta jonske i atomske linije magnezijuma ( $Mg(II)$  280,270 nm i  $Mg(I)$  285,213 nm) pri koncentraciji Mg od 5 mg/l pri promeni *RF* snage generatora od 750 do 1350 W, dok su ostali operativni uslovi instrumenta bili konstantni (brzina pumpa za ispiranje, brzina pumpa za analizu, protok gase za raspršivanje, protok gase za hlađenje, protok pomora gase, pravac posmatranja plazme, vreme ispiranja). U delu Rezultati i diskusija dati su relativni intenziteti ispitivanih emisionih linija, standardne devijacije i relativne standardne devijacije kao i odnos intenziteta pri različitim *RF* snagama generatora. Najveći odnos intenziteta ispitivanih emisionih linija je za vrednost *RF* snage od 1150 W što je kroz literaturu i preporukama snaga. Taj operativni parametar instrumenta je u daljem postupku razvoja metoda održavan konstantnim. Tako je zapaženo da, što plazma više odstupa od robusnih uslova, relativna standardna devijacija merenja je veća;

- kalibracione prave za određivanje sadržaja svakog od ispitivanih metala (njih 19) u ispitivanim uzorcima hrane konstruisane su korištenjem dva rastvora multielementnog standarda koncentracije 2,00 i 5,00 ppm i deionizovane vode za nullu koncentraciju. Za svaki element su iz biblioteke talasnih dužina, kojima raspolaže iTefa softver za rukovanje instrumentom i obradu podataka, selektovane etiri najosetljivije. Optimalna talasna dužina za svaki element u svakom tipu uzorka, kao talasna dužina sa što manje spektralnih interferencija i što manje efekata matriksa, birana je postupkom prerađenja odnosa nagiba kalibracione prave dobijene iz standarda i kalibracione prave dobijene tzv. spajkovanjem standarda rastvorom uzorka. Za radnu, analitičku emisionu liniju birana je ona pri kojoj se ova dva nagiba najmanje razlikuju, odnosno kod koje je odnos dva nagiba najbliži vrednosti 1,00, što ukazuje na najmanji efekat matriksa. Manja ili veća promena nagiba kalibracionih pravih je posledica manjeg ili većeg efekta matriksa na intenzitet emisione linije, odnosno efekat elemenata sa većim sadržajem u uzorku na bliske analitičke linije elemenata sa manjim sadržajem. Parametri dobijenih kalibracionih pravih: talasna dužina emisione linije (nm), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), korelacioni koeficijent ( $R^2$ ), odsekak (b), nagib (m) i prose na RSD (%) za repetibilnost merenja standarda prikazani su u delu Rezultati i diskusija za sve ispitivane elemente u svim analiziranim uzorcima;

- u cilju evaluacije tačnosti i preciznosti metoda određen je sadržaj svakog ispitivanog elementa u rastvoru multielementnog standarda koncentracije 3,00 ppm za sve elemente osim za K i Si za koje je deklarisana koncentracija iznosila 15,00 ppm, na odabranim, optimalnim talasnim dužinama, a pri prethodno definisanim optimalnim uslovima za sve elemente u svim uzorcima. Dobijene vrednosti su upoređivane sa deklarisanoj koncentracijom od strane proizvođača korištenog multielementnog standarda a koji je sadržaj proveren korištenjem sertifikovanog referentnog materijala-CRM odnosno različitih NIST CRM-ova. Tačnost

odre ivanja svakog ispitivanog elementa iskazana kao Recovery =  $\frac{\bar{x}}{x} \cdot 100$  i preciznost data kao

$$RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$
 prikazani su u odgovaraju im tabelama u delu Rezultati i diskusija;

- u postupku odre ivanja sadržaja metala u ispitivanim uzorcima hrane razvijenim ICP-OES metodama izvršena je manuelna korekcija pozadine u cilju dobijanja što ve eg odnosa signal/pozadina. Odre eni sadržaji 19 ispitivanih metala u uzorcima košutnjavog vo a (brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah i pista i); u uzorcima žitarica (pšenica, ovas, raž, je am, kukuruz i heljda), brašna (belo tip 400, belo tip 500, celo zrno pšenice, kukuruzno i heljino) i hleba (beli, raženi, crni, polubeli, kukuruzni i mešavina pšeni nog, ovsanog i reženog); u uzorcima bistrih (višnja, kupina, crno grožje i borovnica) i gustih (breskva, jabuka, jagoda, kajsija i multivitamin) vo nih sokova i vo nih vina (kupina, višnja, borovnica i malina); u uzorcima meda, doma im (livadski, bagremov, šumske i cvetne) i komercijalnim (manuka, biomed 6, livadski, bagremov, šumske, cvetne i planinski) prikazani su tabelarno podeljeni po jednoj od klasifikacija metala na makroelemente, mikroelemente (esencijalne i potencijalno toksi ne) i neesencijalne i toksi ne. Sadržaji su dati kao srednja vrednosti tri uzastopna merenja sa pripadaju om standardnom devijacijom u  $\mu\text{g}$  metala po g odnosno ml uzorka. Iz razloga slikovitog a preglednijeg prikaza, na histogramima u Prilogu I, dobijeni sadržaji odre ivanih elemenata su dati kao prose ne vrednosti u ispitivanim uzorcima.

- dobijeni sadržaji su diskutovani u kontekstu pore enja sa literaturnim podacima dobijenih od strane drugih istraživa a na istim tipovima uzoraka; prema dnevnim potrebama organizma ka istim odnosno preporu enim dozama od strane evropskih i svetskih organizacija; sa aspekta toksi nosti pojedinih metala;

- tako e, dobijeni sadržaji su pore eni pre svega prema tipu uzorka u okviru jedne grupe ispitivanih uzoraka, zatim prema vrsti proizvo a a ako ih je bilo više, prema lokalitetu odakle poti u. Diskusije i stavovi izneti u delu Rezultati i diskusija potvr uju literaturne navode da na sadržaj metala uti e više faktora kao što su: geografsko poreklo odnosno sastav zemljišta, klimatski uslovi, stanje životne sredine, odnosno uslovi u kojima je gajeno ispitivano jezgrasto vo e, žitarice, vo e kao osnovna sirovina vo nih sokova i vo nih vina, odnosno biljke iji nektar su p ele skupljale; u okviru geografskog porekla razmatran je uticaj blizine industrijske zone i ve ih saobra ajnica kao na primeru sadržaja metala, pogotovo toksi nih i potencijalno toksi nih u uzorcima žitarica; primenjene agrotehni ke mere u postupku gajenja istih a u smislu koriš enja ubriva i pesticida; primenjeni tehnološki postupci u procesu prerade osnovnih sirovina (dodatak aditiva, boja, konzervanasa, zasla iva a i dr.) kao i ambalaža, pribor i posu e u kojima su finalni proizvodi uvani, skladiš eni i pakovani za prodaju;

- potvrda manjeg ili ve eg uticaja lokaliteta kao i proizvo a a na sadržaj metala data je kroz statisti ku obradu podataka a primenom ANOVA i t-testa, primenom statisti kog paketa SPSS 20. Tako e statisti ki su diskutovani rezultati sa aspekta postojanja ili ne statisti ki zna ajne razlike u sadržaju elemenata po vrsti svakog od analiziranih uzoraka. Dobijeni rezultati dati su u delu Rezultati i diskusija i Prilog II, a kroz vrednosti p sa sigurnoš u od 0,05.

- dobijeni rezultati su svakako korisni u smislu preporuke koriš enja pojedinih namirnica kao izvora nutrijenata u svakodnevnoj ljudskoj ishrani. U tom pogledu prednja e makroelementi, najve i po sadržaju u svim ispitivanim uzorcima kao i esencijalni element selen koga ina e ima malo u namirnicama pa ispitivano jezgrasto vo e može da bude odli an izvor ovog

mikronutrijenta. Tako e od zna aja je i preporuka koriš enja brašna i proizvoda od brašna dobijenog koriš enjem celog zrna žitarica tzv. inetegralno brašno odnosno integralni proizvodi kao i preporuka koriš enja proizvoda od vo a i vrste meda sa ve im sadržajem metala kao neorganskih nutrijenata.

## **5 SUMMARY**

As a part of this doctoral thesis, emission spectrometric methods were developed and applied based on inductively coupled plasma (ICP-OES), following these specific steps:

- in the process of the instrument parameters optimization a plasma robustness assessment was performed by examining the impact of *RF* power generator on achieving the so-called robust plasma, or rather plasma with the minimum impact on the deviation of the analytical signal, which is the precondition that ensures the minimum matrix effect on determining the elements within the samples. Thus obtained plasma, which is in a state of a so-called local thermodynamic equilibrium (LTE), is, according to its characteristics, the plasma that is the closest to the theoretically calculated thermodynamic equilibrium (TE). For this purpose, we followed the ratio of relative intensities of ionic and atomic magnesium lines at the Mg concentration of 5mg/l at the 750 W to 1350 W *RF* power generator shift, while all the other operating conditions of this instrument remained constant (flush pump rate, analysis pump rate, nebulizer gas flow, coolant gas flow, auxiliary gas flow, plasma view, flushing time). In the Results and Discussion section we gave the relative intensities of the tested emission lines, the standard deviations and the relative standard deviations as well as the ratio of intensities at different *RF* power generators. The highest intensity ratio of the tested emission lines is for the value of 1150 W of the *RF* power, which is, according to the literature, the recommended power. This operating parameter of the instrument had been kept constant throughout the later stages of the method development. It was also observed that the more the plasma deviates from the robust conditions, the greater the relative standard deviation of the measurement is;

- calibration curves for determining the contents of each of the studied metals (19 of them) in the tested food samples were constructed using two multi-element solutions at the standard concentration of 2.00 and 5.00 ppm, and deionized water at zero concentration. For each element we selected the four most sensitive wavelengths from the wavelengths library, which is available to the iTEVA instrument operation and data processing software. The optimum wavelength for each of the elements within each sample type, as the wavelength with minimum spectral interference and minimum matrix effects, was chosen by monitoring the ratio of the slopes of the calibration curve obtained from standard and the calibration curve obtained by so-called spiked standard solutions of the sample. For a working, analytical emission line we selected the one at which the two slopes differentiate the least, that is the one at which the ratio of the two slopes is the closest to the value of 1.00, indicating the minimum matrix effect. The smaller or larger changes in the slope of the calibration lines is a direct result of the smaller or larger matrix effect on the intensity of the emission line, as well as the effect of the elements with a higher content in the sample on the close analytical lines of the elements with a lower content. The parameters obtained by calibration lines: the wavelength of emission lines (λ), the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), the correlation coefficient ( $R^2$ ), intercept (b), the slope (m) and the average RSD (%) for repeatability of measurement standards are shown in the Results and Discussion section for all the examined elements in all of the analyzed samples;

- to evaluate the accuracy and precision of the method we determined the content of each examined element in the multi-element solution standard at the concentration of 3.00 ppm for all the elements except for K and Si for which the declared concentration was 15.00 ppm, at chosen optimal wavelengths, and at the previously defined optimal conditions for all the elements in all of the samples. The obtained values were compared to the declared concentration by the manufacturer of the used multi-element standard, the content of which was checked using the

certified reference material – CRM, i.e. the various NIST CRMs. The accuracy of each of the examined elements carried as Recovery =  $\frac{\bar{x}}{\sim} \cdot 100$  and the data precision as  $RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$  are shown in the respective tables in the Results and Discussion section;

- In determining the contents of metals in the examined food samples by developed ICP-OES methods we performed a manual background correction in order to obtain a higher signal/background ratio. The determined content of 19 metals examined in various nut samples (Brazil nuts, cashews, peanuts, almonds, hazelnuts, walnuts and pistachios), grain samples (wheat, oats, rye, barley, corn, and buckwheat), flour samples (white flour type 400, white flour type 500, whole grain wheat flour, corn and buckwheat flour) and bread samples (white, rye, black, semi-white, corn and a mixture of wheat, oats and rye), samples of clear fruit juices (cherry, blackberry, grapes and blueberries) and cloudy fruit juices (peach, apple, strawberry, apricot and a multivitamin), fruit wines (blackberry, cherry, blueberry and raspberry), honey samples: the domestic (meadow, acacia, forest and floral) and commercial (Manuka, Biomed 6, meadow, acacia, forest, floral and mountain), are presented in tables and divided by a metal classification on macro elements and trace elements (essential and potentially toxic) and non-essential and toxic. The contents were given in mean values of three consecutive measurements with the corresponding standard deviation in  $\mu\text{g}$  of metal per g or ml of sample. In order for clearly presentation, on histograms in section Appendix I, obtained content of detected metals are shown as average values in tested samples.

- the obtained contents were discussed in the context of comparison with data from the literature obtained by other researchers for the same types of samples, according to the daily requirements of the organism for the same or the dosages recommended by the European and International organizations, and regarding the toxicity of certain metals;

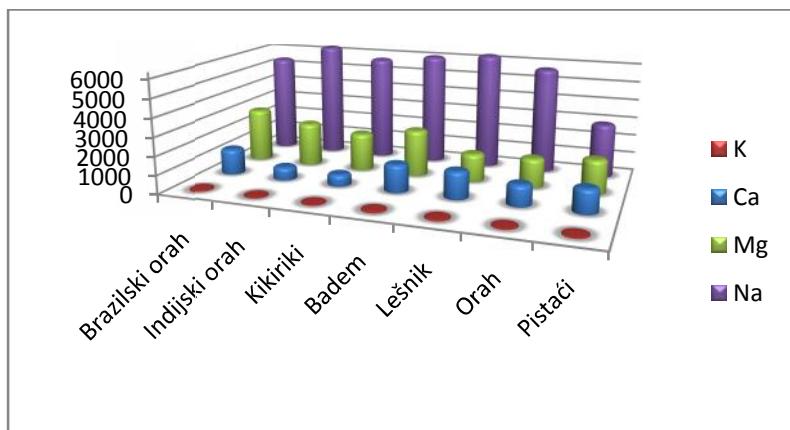
- also, the obtained contents were compared primarily according to the type of the sample within a group of tested samples, followed by the type of manufacturer if there were more of them, and then by the site of origin. Discussions and opinions presented in the Results and Discussion section confirm the literature suggestions that the metal content is influenced by several factors such as geographic origin or the composition of the soil, climate, the environment and the conditions in which the tested plants were cultivated - nuts, grains, fruit as the main raw material of fruit juices and fruit wines, and plants whose nectar the bees collected; concerning the geographical origin we examined the impact of the proximity to the industrial areas and major roads, as in the example of the metal content, particularly toxic and potentially toxic, in grain samples; cultivation measures applied in the process of growing these crops in terms of the usage of fertilizers and pesticides; the applied technological practices in the processing raw materials (additives, colors, preservatives, sweeteners etc.) and packaging, accessories and dishes in which the final product is kept, stored, and packaged for sale;

- the confirmation of a smaller or a greater impact of the locality as well as the manufacturer on the content of the metal is given through a statistical data processing, using ANOVA and t-test with the SPSS Statistics 20 software. Also, the results were discussed statistically with regard to the existence or nonexistence of statistically significant differences in the contents of the elements according to the type of each of the analyzed samples. The obtained results are given in the Appendix II section and the Results and Discussion segment, with the value p, at the 0.05 certainty.

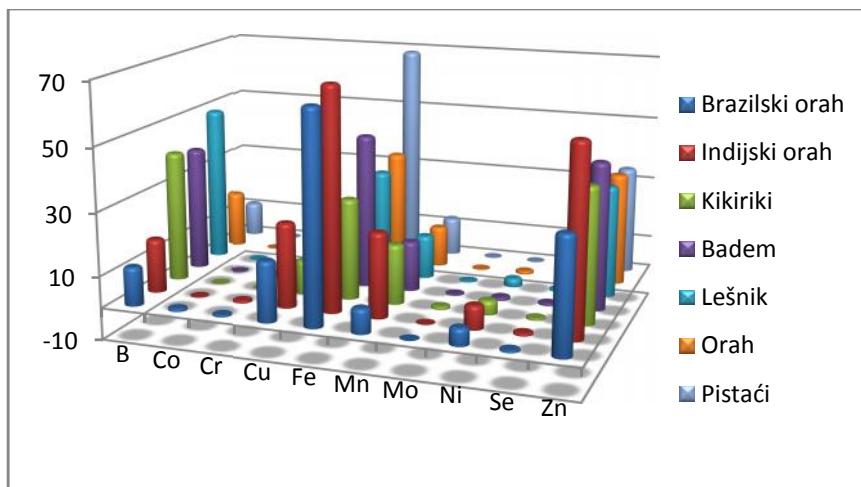
- the obtained results are certainly useful in terms of recommendations for the use of certain food items as sources of nutrients in the daily human diet. In this respect, macro elements take the lead, as they were the most frequent in terms of content in all the analyzed samples, and the essential element selenium, which can otherwise be found only in traces in food items, so the tested nuts can be a great source of this micronutrient. Of great importance is also the recommendation to use flour and flour products obtained using the whole-grain cereals, or the so-called integral flour or integral products, as well as the recommendation to use fruit products and types of honey with higher content of metal which serve as inorganic nutrients.

## **6 PRILOG I**

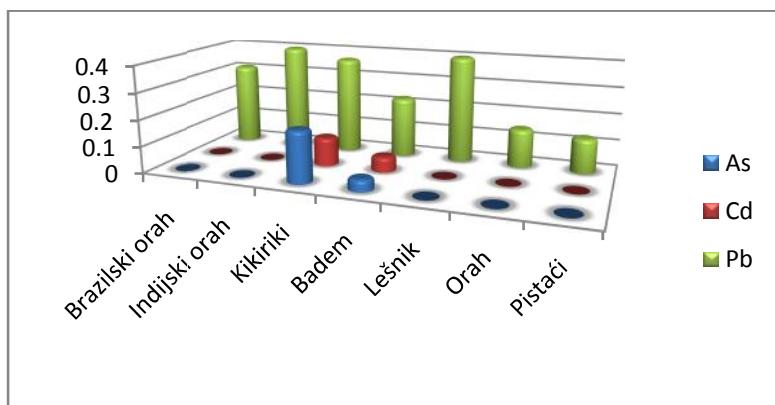
Na histogramima su prikazane prose na vrednosti sadržaja detektovanih makro, mikro i toksičnih elemenata u svim ispitivanim uzorcima.



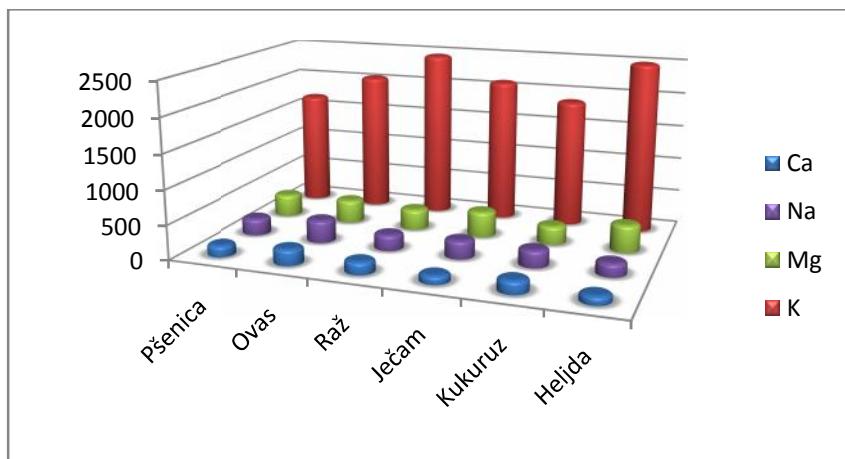
Histogram 1. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima jezgrastog voća  
(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of nuts)



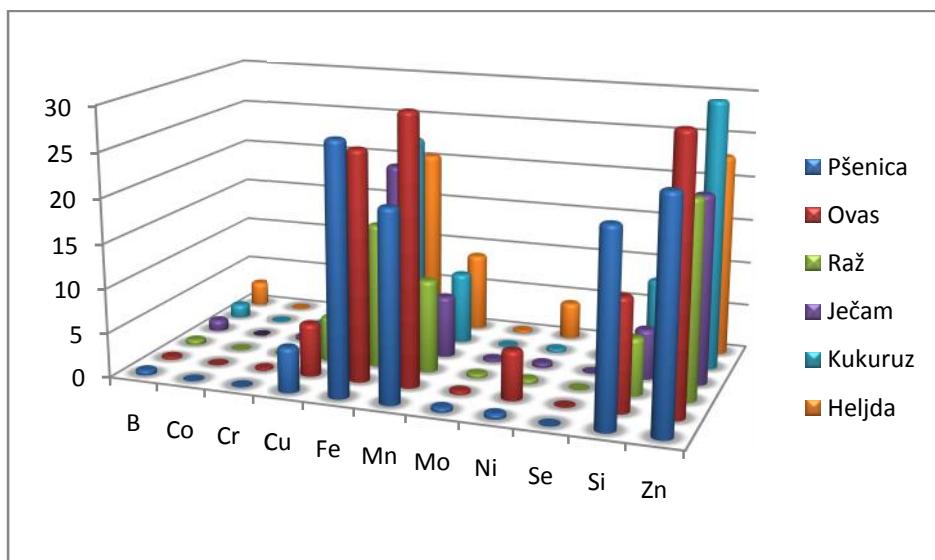
Histogram 2. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima jezgrastog voća  
(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of nuts)



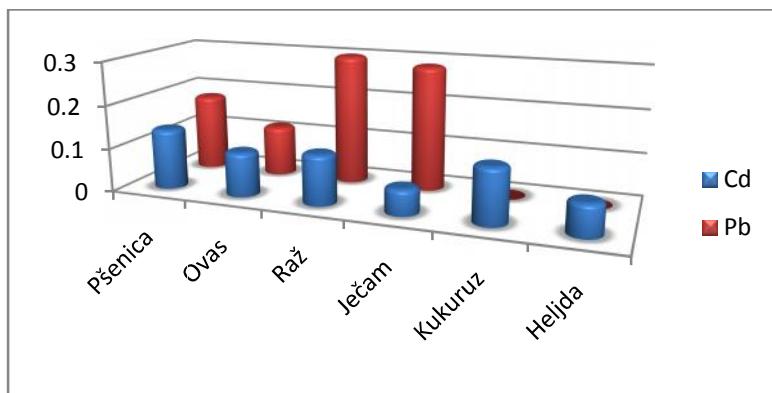
Histogram 3. Prose na vrednost sadržaja toksičnih elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima jezgrastog voća  
(The average content of toxic elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of nuts)



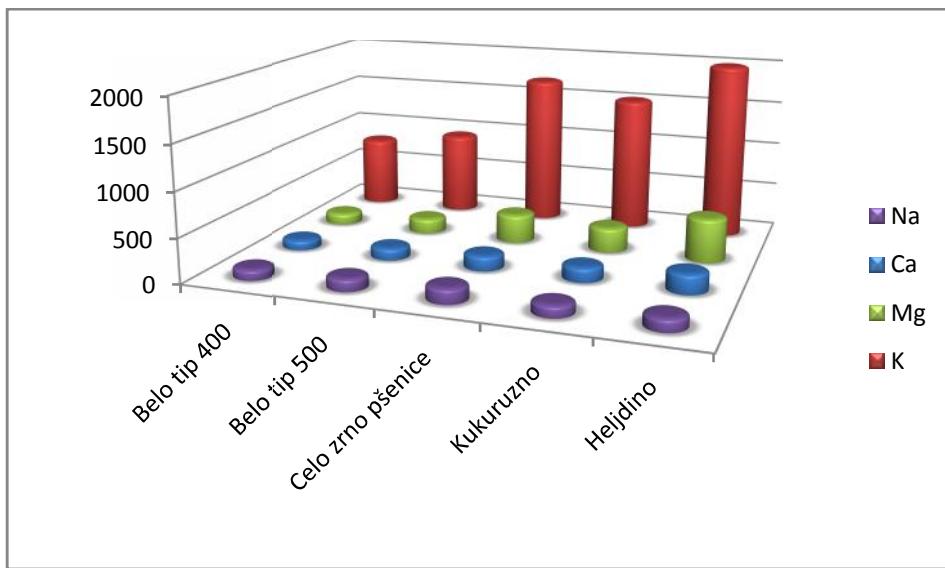
Histogram 4. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima zrna žitarica  
*(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of grains)*



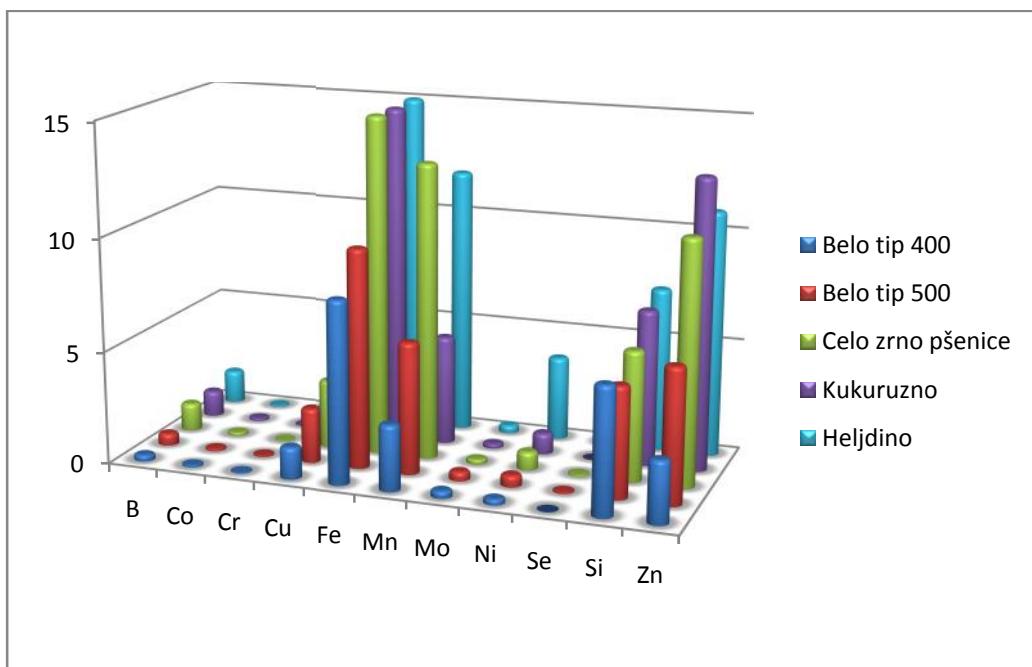
Histogram 5. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima zrna žitarica  
*(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of grains)*



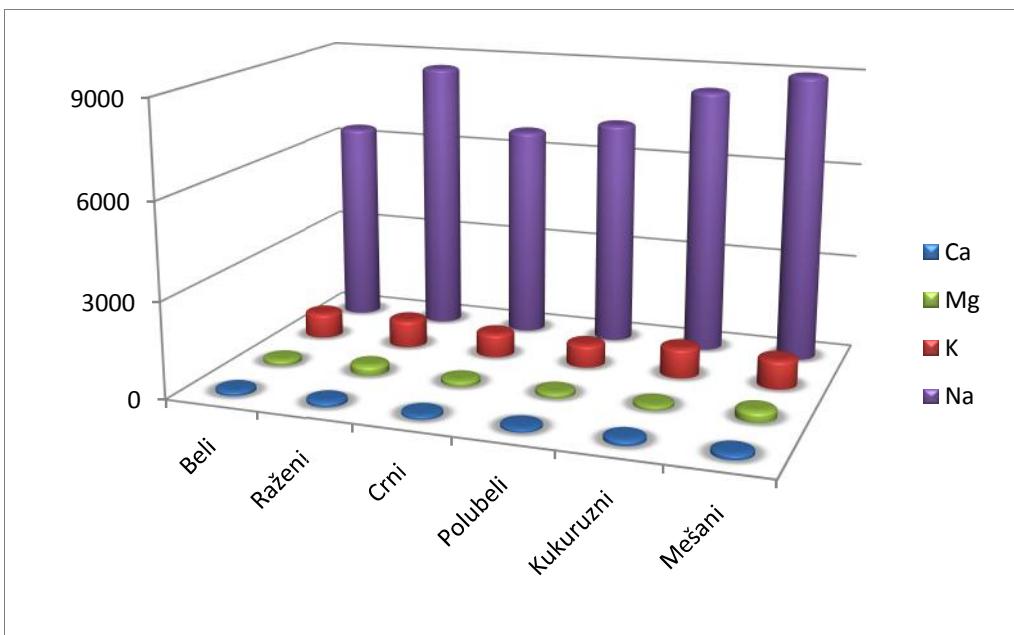
Histogram 6. Prose na vrednost sadržaja toksi nih elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima zrna žitarica  
*(The average content of toxic elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of grains)*



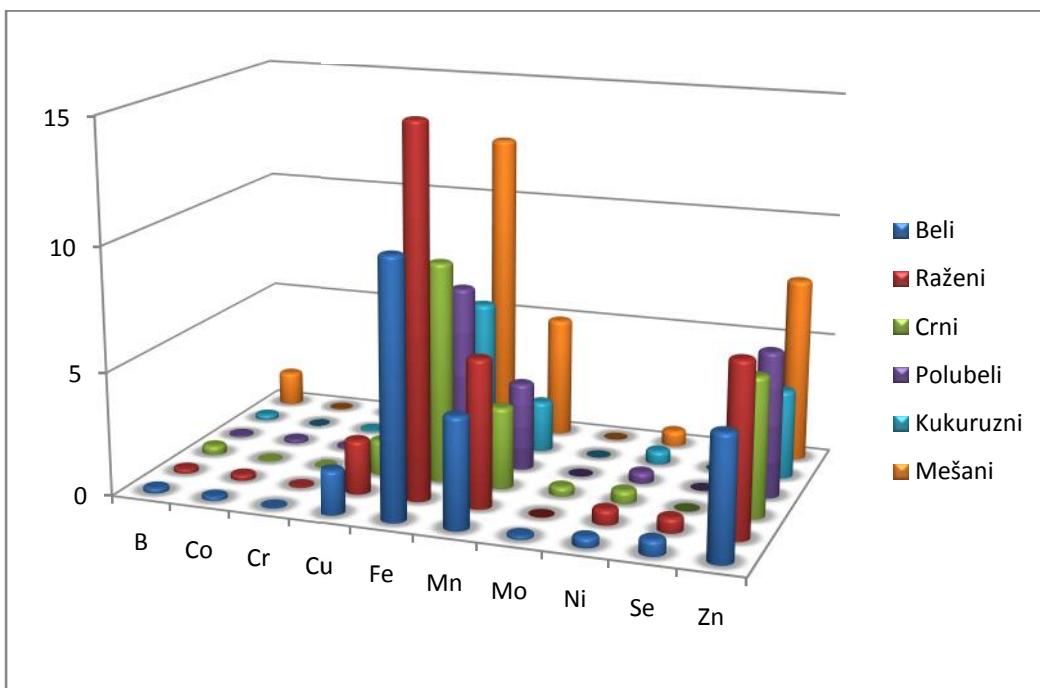
Histogram 7. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima brašna  
*(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of flour)*



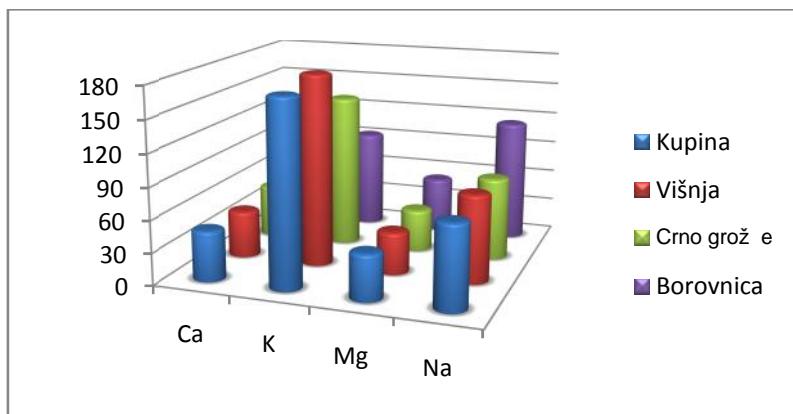
Histogram 8. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima brašna  
*(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of flour)*



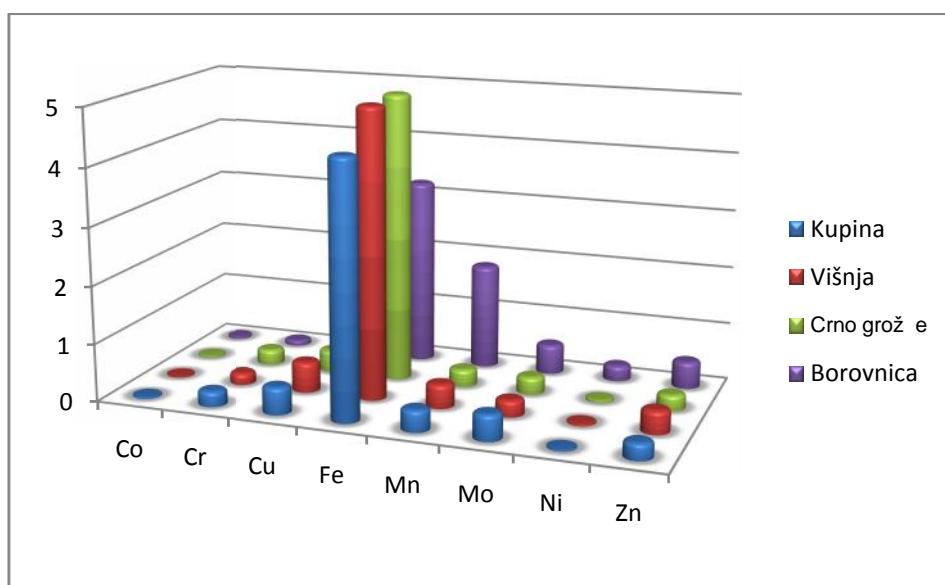
Histogram 9. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima hleba  
*(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of bread)*



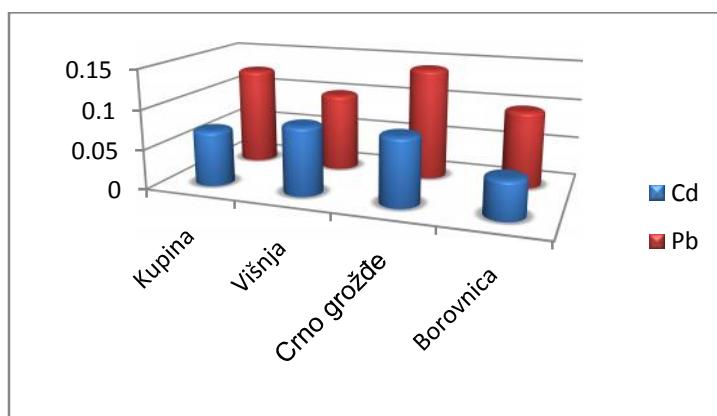
Histogram 10. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima hleba  
*(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of bread)*



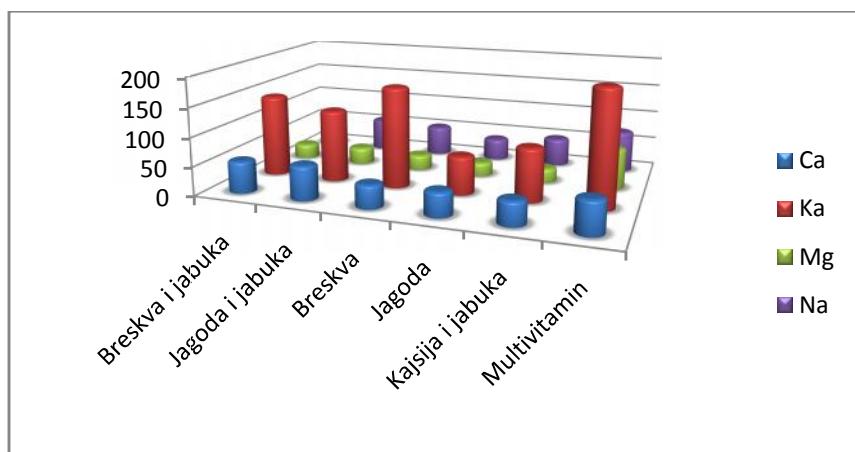
Histogram 11. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima bistrih sokova  
*(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of clear fruit juices)*



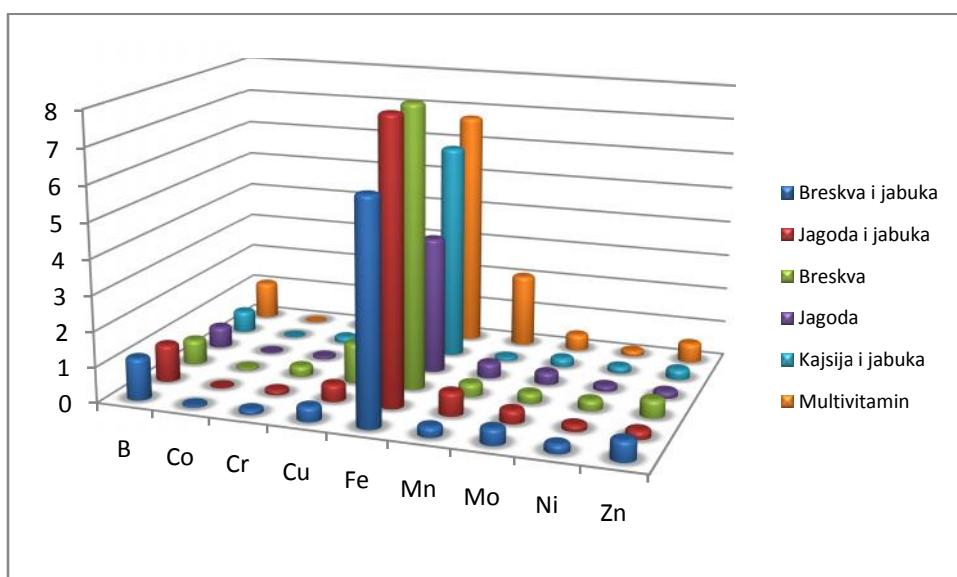
Histogram 12. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima bistrih sokova  
*(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of clear fruit juices)*



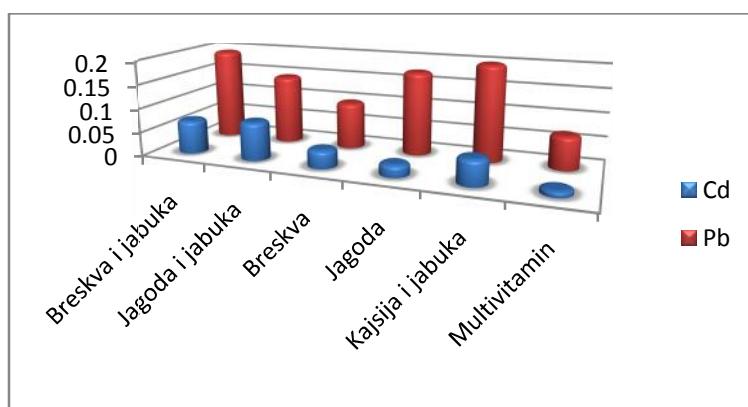
Histogram 13. Prose na vrednost sadržaja toksičnih elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima bistrih sokova  
*(The average content of toxic elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of clear fruit juices)*



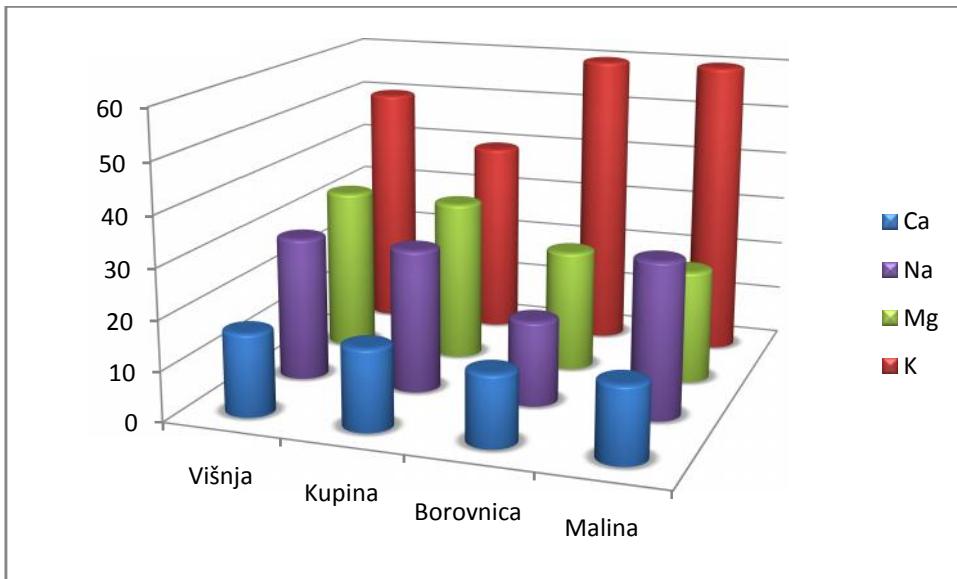
Histogram 14. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima gustih sokova  
(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of cloudy fruit juices)



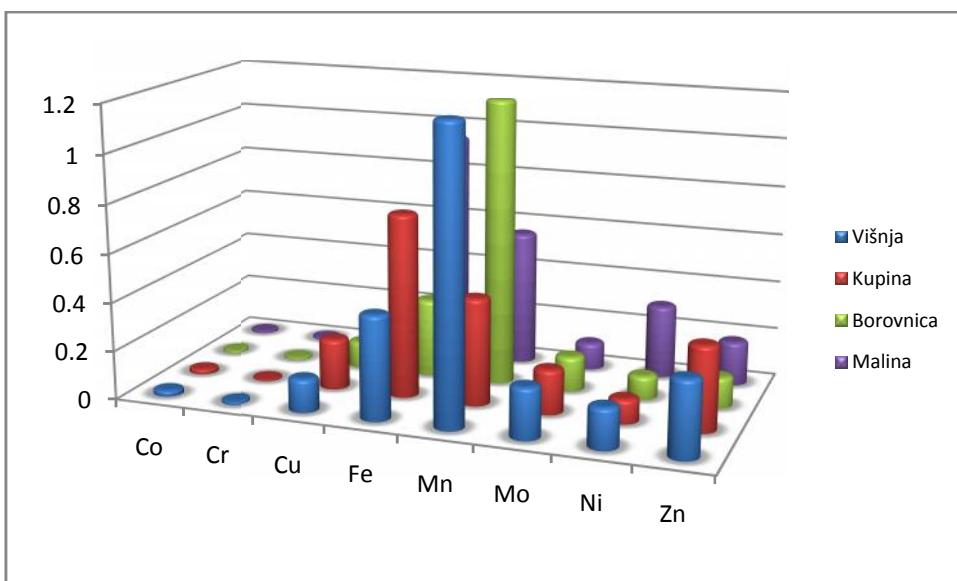
Histogram 15. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima gustih sokova  
(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of cloudy fruit juices)



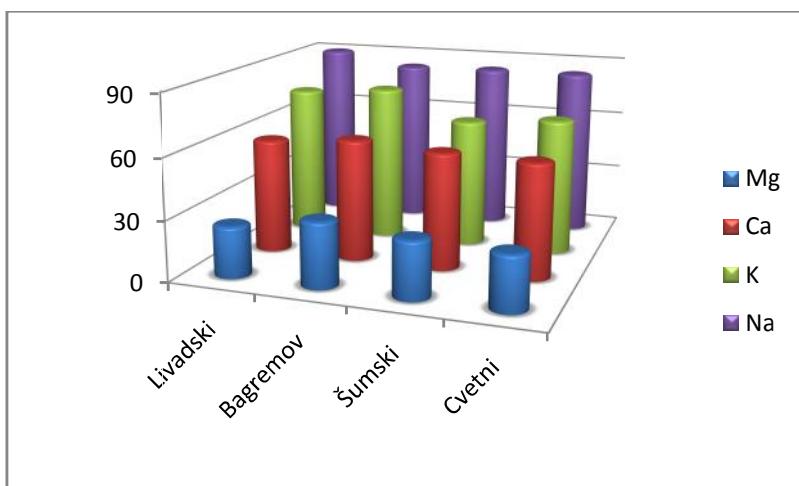
Histogram 16. Prose na vrednost sadržaja toksičnih elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima gustih sokova  
(The average content of toxic elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of cloudy fruit juices)



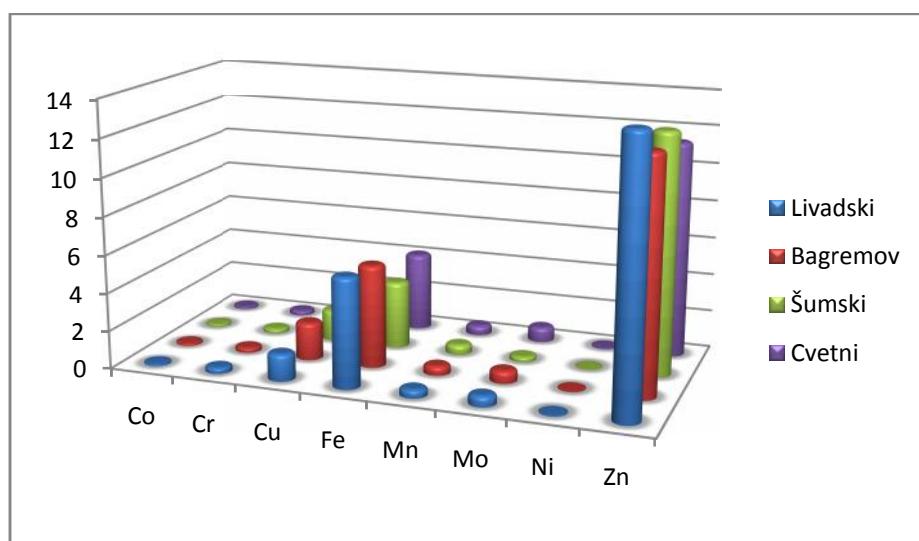
Histogram 17. Prosječna vrednost sadržaja makro elemenata (ppm) u uzorcima voćnih vina  
*(The average content of macro elements (ppm) in samples of fruit wines)*



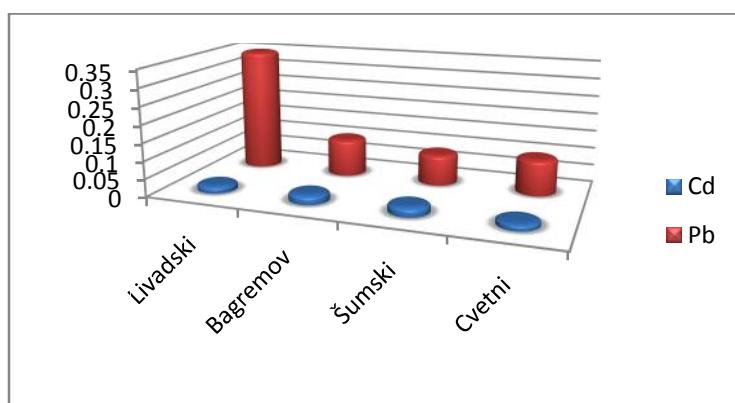
Histogram 18. Prosječna vrednost sadržaja makro elemenata (ppm) u uzorcima voćnih vina  
*(The average content of micro elements (ppm) in samples of fruit wines)*



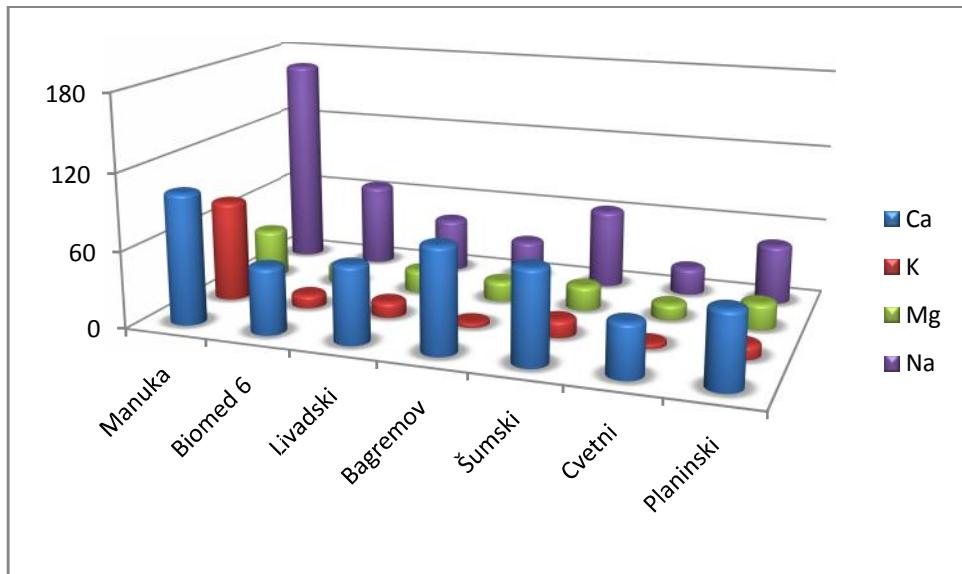
Histogram 19. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) u uzorcima domaćeg meda  
(The average content of macro elements ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) in samples of domestic honey)



Histogram 20. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) u uzorcima domaćeg meda  
(The average content of micro elements ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) in samples of domestic honey)

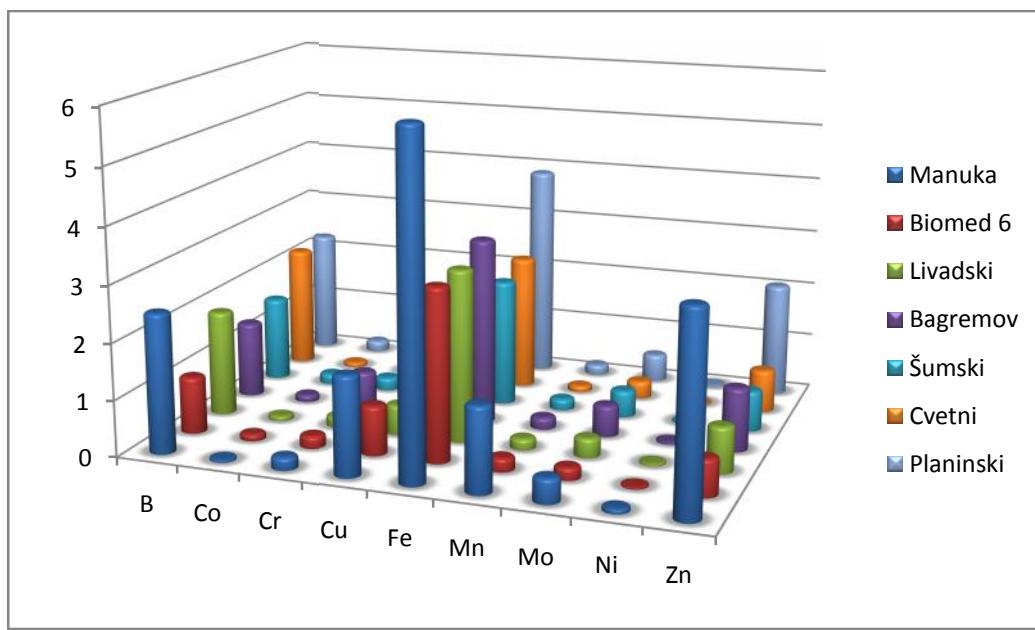


Histogram 21. Prose na vrednost sadržaja toksičnih elemenata ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) u uzorcima domaćeg meda  
(The average content of toxic elements ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) in samples of domestic honey)



Histogram 22. Prose na vrednost sadržaja makro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima industrijskog meda

(The average content of macro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of commercial honey)



Histogram 23. Prose na vrednost sadržaja mikro elemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima industrijskog meda

(The average content of micro elements ( $\mu\text{g/g}$ ) in samples of commercial honey)

## **7 PRILOG II**

Tabela I. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke jezgrastog vo a

Element	Al	B	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Se	Si	Zn
Zna ajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela II. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke jezgrastog vo a

Zavisna varijabla			Zna ajnost (p)
Mg	Brazilski orah	indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah, pista i brazilski orah, kikiriki, lešnik, orah, pista i badem	0,000 0,000 0,107
	Kikiriki	brazilski orah, indijski orah, badem, lešnik, orah, pista i indijski orah	0,000 0,107
	Badem	brazilski orah, kikiriki, lešnik, orah, pista i indijski orah	0,000 0,000
	Lešnik	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, pista i arah	0,000 0,160
	Orah	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, pista i lešnik	0,000 0,160
	Pista i	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah	0,000
Pb	Brazilski orah	indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah, pista i	0,000
	Indijski orah	brazilski orah, kikiriki, badem lešnik, orah, pista i	0,000
	Kikiriki	brazilski orah, indijski orah, badem, lešnik, orah, pista i	0,000
	Badem	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, lešnik, orah, pista i	0,000
	Lešnik	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, orah, pista i pista i	0,000 0,689
Se	Orah	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik arah	0,000 0,689
	Pista i	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik indijski orah, orah, pista i	0,000 0,000
	Brazilski orah	kikiriki badem lešnik	0,683 0,536 0,109
	Indijski orah	brazilski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah, pista i brazilski orah	0,000 0,683
	Kikiriki	badem lešnik arah, pista i	0,046 0,813 0,000
	Badem	indijski orah, orah, pista i brazilski orah kikiriki lešnik brazilski orah	0,000 0,536 0,046 0,004 0,109
	Lešnik	kikiriki badem indijski orah, orah, pista i	0,813 0,004 0,000
	Orah	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, pista i	0,000
	Pista i	brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah	0,000

Zn	Brazilski orah	indijski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah, pista i	0,000
	Indijski orah	brazilski orah, kikiriki, badem, lešnik, orah, pista i	0,000
	Kikiriki	badem	0,003
		brazilski orah, indijski orah, lešnik, orah, pista i	0,000
	Badem	kikiriki	0,003
		brazilski orah, indijski orah, lešnik, orah, pista i	0,000
		brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem	0,000
	Lešnik	orah	0,615
		pista i	0,921
		lešnik	0,615
	Orah	pista i	0,994
		brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem	0,000
		orah	0,994
	Pista i	lešnik	0,921
		brazilski orah, indijski orah, kikiriki, badem	0,000

Tabela III. p-vrednosti dobijene primenom t-test-a za uzorke jezgrastog vo a u odnosu na proizvo a a

	Al	B	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Se	Si	Zn
Brazilski orah	0,010	0,001	0,008	0,000	0,026	0,141	0,048	0,089	0,058	0,000	0,000	0,000	0,000	0,148	0,001	0,000	0,014
Indijski orah	0,006	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,006	0,000	0,004	0,000	0,000	0,018	0,112	0,000	0,003
Kikiriki	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,002	0,810	0,007	0,000	0,000	0,000	0,529	0,245	0,003	0,002
Badem	0,000	0,002	0,304	0,001	0,004	0,046	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,004	0,001	0,001
Lešnik	0,000	0,000	0,604	0,000	0,024	0,000	0,000	0,001	0,027	0,001	0,003	0,000	0,000	0,001	0,341	0,000	0,000
Orah	0,000	0,005	0,709	0,000	0,034	0,001	0,000	0,000	0,162	0,000	0,001	0,000	0,003	0,374	0,002	0,001	0,000
Pista i	0,011	0,009	0,015	0,011	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,001

Tabela IV. p-vrednosti dobijene primenom t-test na sadržaj Cu, Fe i Zn za uzorke zrna žitarica u odnosu na lokalitet

	Cu	Fe	Zn
Pšenica	0,000	0,000	0,000
Ovas	0,000	0,000	0,000
Raž	0,000	0,000	0,000
Je am	0,000	0,000	0,000
Kukuruz	0,000	0,000	0,000
Heljda	0,000	0,000	0,000

Tabela V. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke zrna žitarica

Element	Al	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Se	Si	Zn
Zna ajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Tabela VI. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke brašna

Element	Al	B	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Si	Zn
Zna ajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela VII. Rezultati ANOVA za ispitivane uzorke hleba

Element	Al	B	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Si	Zn
Zna ajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela VIII. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke zrna žitarica za neke od detektovanih elemenata

Zavisna varijabla			Zna ajnost (p)
Cr	Pšenica	ovas, raž, je am, kukuruz, heljda	0,000
		pšenica, raž, je am, kukuruz, heljda	0,000
		pšenica, ovas, kukuruz	0,000
	Raž	je am	0,487
		heljda	0,008
		pšenica, ovas, kukuruz	0,000
	Je am	raž	0,487
		heljda	0,160
		pšenica, ovas, kukuruz	0,000
	Kukuruz	raž	0,008
		je am	0,160
		ovas	0,010
Cu	Heljda	raž	0,943
		je am	0,008
		ovas	0,010
	Pšenica	raž	0,160
		je am	0,010
		kukuruz	0,000
	Ovas	heljda	0,010
		pšenica	0,000
		raž	0,002
	Raž	je am	0,647
		kukuruz	0,010
		heljda	0,000

		pšenica	0,126
		ovas	0,647
	Je am	raž	0,029
		kukuruz	0,134
		heljda	0,000
		pšenica	1,000
		ovas	0,010
	Kukuruz	raž	0,932
		je am	0,134
		heljda	0,000
K	Heljda	pšenica, ovas, raž, je am, kukuruz	0,000
	Pšenica	ovas, raž, je am, kukuruz, heljda	0,000
	Ovas	pšenica, raž, kukuruz, heljda	0,000
	Raž	je am	0,371
		pšenica, ovas, je am, kukuruz	0,000
		heljda	0,001
	Je am	pšenica, raž, kukuruz, heljda	0,000
		ovas	0,371
	Kukuruz	pšenica, ovas, raž, je am, heljda	0,000
	Heljda	pšenica, ovas, je am, kukuruz	0,000
Mg		raž	0,001
	Pšenica	ovas	0,001
		raž	0,975
		je am, kukuruz, heljda	0,000
	Ovas	pšenica	0,001
		raž, je am, kukuruz, heljda	0,000
	Raž	pšenica	0,975
		ovas, je am, kukuruz, heljda	0,000
	Je am	pšenica, ovas, raž, kukuruz, heljda	0,000
	Kukuruz	pšenica, ovas, raž, je am, heljda	0,000
	Heljda	pšenica, ovas, raž, je am, kukuruz	0,000
Zn	Pšenica	ovas, raž, je am, kukuruz	0,000
		heljda	0,732
	Ovas	pšenica, raž, je am, kukuruz, heljda	0,000
	Raž	pšenica, ovas, je am, kukuruz, heljda	0,000
	Je am	pšenica, ovas, raž, kukuruz, heljda	0,000
	Kukuruz	pšenica, ovas, raž, je am, heljda	0,000
	Heljda	pšenica	0,732
		ovas, raž, je am, kukuruz	0,000

Tabela IX. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke brašna za neke od detektovanih elemenata

Zavisna varijabla			Značajnost (p)
Cr	Belo tip 400	belo tip 500, kukuruzno, heljdino celo zrno pšenice	0,000 1,000
	Belo tip 500	celo zrno pšenice, kukuruzno heljdino	0,000 0,006
	Celo zrno pšenice	celo tip 400	1,000

			belo tip 500, kukuruzno, heljdino	0,000
	Kukuruzno		belo tip 400, belo tip 500, celo zrno pšenice, heljdino	0,000
	Heljdino		belo tip 400, celo zrno pšenice, kukuruzno	0,000
Mn	Belo tip 400		belo tip 500, celo zrno pšenice, kukuruzno, heljdino	0,000
	Belo tip 500		belo tip 400, celo zrno pšenice, heljdino kukuruzno	0,000 0,359
	Celo zrno pšenice		belo tip 400, belo tip 500, kukuruzno, heljdino	0,000
	Kukuruzno		belo tip 400, celo zrno pšenice, heljdino	0,000
	Heljdino		belo tip 500	0,359
Na	Belo tip 400		belo tip 400, belo tip 500, celo zrno pšenice, kukuruzno belo tip 500, celo zrno pšenice	0,000 0,000
	Belo tip 500		kukuruzno heljdino	1,000 0,001
	Celo zrno pšenice		belo tip 400, kukuruzno, heljdino celo zrno pšenice	0,000 0,011
	Kukuruzno		belo tip 400, celo zrno pšenice heljdino	0,000 0,001
	Heljdino		belo tip 400 belo tip 500, celo zrno pšenice	0,001 0,000

Tabela X. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke hleba za neke od detektovanih elemenata

Zavisna varijabla			Značajnost (p)
Al	Beli	raženi, crni, polubeli, kukuruzni, mešani beli, polubeli, mešani	0,000 0,000
	Raženi	crni kukuruzni	0,001 0,641
	Crni	beli, polubeli, mešani raženi kukuruzni	0,000 0,001 0,012
	Polubeli	beli, raženi, crni, kukuruzni, mešani beli, crni, polubeli, mešani	0,000 0,000
	Kukuruzni	raženi crni	0,641 0,012
Ca	Mešani	beli, raženi, crni, polubeli, kukuruzni	0,000
	Beli	raženi, crni, polubeli, kukuruzni, mešani	0,000
	Raženi	beli, crni, polubeli, kukuruzni mešani	0,000 0,073
	Crni	beli, raženi, kukuruzni, mešani polubeli	0,000 0,001
	Polubeli	beli, raženi, kukuruzni, mešani crni	0,000 0,001
	Kukuruzni	beli, raženi, crni, polubeli, mešani	0,000

		Mešani	beli, crni, polubeli, kukuruzni raženi	0,000 0,073
Cr	Kukuruzni	Beli	raženi, crni, polubeli, kukuruzni, mešani	0,000
		Raženi	beli, polubeli, kukuruzni, mešani crni	0,000 0,009
		Crni	beli, polubeli, kukuruzni, mešani raženi	0,000 0,009
		Polubeli	beli, raženi, crni, mešani kukuruzni	0,000 1,000
		Mešani	beli, raženi, crni, mešani	0,000
		Polubeli	Polubeli	1,000
Cu	Kukuruzni	Beli	beli, raženi, crni, polubeli, kukuruzni raženi, kukuruzni, mešani	0,000 0,000
		Raženi	crni polubeli	0,241 0,412
		Crni	beli, crni, polubeli, kukuruzni mešani beli	0,038 0,241
		Polubeli	raženi, kukuruzni, mešani polubeli beli	0,000 0,010 0,412
		Kukuruzni	raženi, mešani crni kukuruzni	0,000 0,010 0,009
		Mešani	beli, raženi, crni, mešani polubeli	0,000 0,009
		Mn	beli, crni, polubeli, kukuruzni raženi	0,000 0,038
		Beli	raženi, mešani crni polubeli kukuruzni	0,000 0,080 0,225 0,108
		Raženi	beli, crni, polubeli, kukuruzni, mešani beli raženi	0,000 0,080 0,000
		Crni	polubeli kukuruzni mešani beli raženi	0,983 0,001 0,005 0,225 0,000
Mn	Kukuruzni	Polubeli	crni kukuruzni mešani beli	0,983 0,002 0,002 0,108
		Kukuruzni	raženi, mešani crni polubeli beli, raženi, kukuruzni	0,000 0,001 0,002 0,000
		Mešani	crni polubeli	0,005 0,002

Na	Beli	raženi, kukuruzni, mešani	0,000
	Crni	crni	0,991
	polubeli	polubeli	0,001
	Raženi	beli, crni, polubeli, mešani	0,000
		kukuruzni	0,812
		beli	0,991
	Crni	raženi, kukuruzni, mešani	0,000
		polubeli	0,001
		beli	0,001
	Polubeli	raženi, kukuruzni, mešani	0,000
Zn		crni	0,001
		beli	0,000
	Kukuruzni	raženi	0,812
		crni, polubeli, mešani	0,000
	Mešani	beli, raženi, crni, polubeli, kukuruzni	0,000
	Beli	raženi, crni, polubeli, mešani	0,000
		Kukuruzni	0,032
	Raženi	beli, crni, polubeli, kukuruzni	0,000
	Mešani	Mešani	0,436
	Crni	beli, raženi, kukuruzni, mešani	0,000
Kukuruzni	Polubeli	polubeli	0,017
		beli, raženi, kukuruzni, mešani	0,000
		crni	0,017
		beli	0,032
	Mešani	raženi, crni, polubeli, mešani	0,000
Raženi		beli, crni, polubeli, kukuruzni	0,000
		Raženi	0,436

Tabela XI. p-vrednosti dobijene primenom t-test za uzorke brašna u odnosu na proizvo a a

	Al	B	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Si	Zn
Belo tip 400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,020	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
Belo tip 500	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,020	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
Celo zrno pšenice	0,003	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,006	0,004	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
Kukuruzno	0,001	0,000	0,543	0,000	0,000	0,000	0,053	0,012	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
Heljda	0,005	0,001	0,004	0,000	0,000	0,000	0,009	0,001	0,001	0,000	0,000	0,680	0,000	0,000	0,000

Tabela XII. p-vrednosti dobijene primenom t-test za uzorke hleba u odnosu na proizvo a a

	Al	B	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Si	Zn
Beli	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,017	0,000	0,039	0,000	0,000	0,000
Raženi	0,108	0,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,021	0,000	0,153	0,002	0,478	0,000	0,000	0,276
Crni	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,021	0,058	0,000	0,055	0,000	0,000	0,001

Polubeli	0,001	0,000	0,020	0,000	0,415	0,000	0,680	0,176	0,263	0,000	0,080	0,000	0,000	0,050
Kukuruzni	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,020	0,000	0,015	0,000	0,002	0,000
Mešani	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,050	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000

Tabela XIII. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke bistrih vo nih sokova

Element	Al	B	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Na	Pb	Si	Zn
Zna ajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela XIV. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke bistrih vo nih sokova za neke od detektovanih elemenata

Zavisna varijabla			Zna ajnost (p)
Ca	Višnja	kupina	1,000
		crno grož e, borovnica	0,000
	Kupina	višnja	1,000
		crno grož e, borovnica	0,000
	Crno grož e	višnja, kupina	0,000
		borovnica	0,085
	Borovnica	višnja, kupina	0,000
		crno grož e	0,085
	Cr	kupina	0,345
		crno grož e, borovnica	0,001
Na	Višnja	višnja	0,345
		crno grož e, borovnica	0,000
	Kupina	višnja	0,345
		crno grož e, borovnica	0,000
	Crno grož e	višnja	0,001
Pb		kupina, borovnica	0,000
	Višnja	kupina, borovnica	0,000
		crno grož e	0,003
	Crno grož e	višnja, crno grož e	0,000
		borovnica	0,074
Borovnica	Višnja	višnja	0,003
		kupina, borovnica	0,000
	Crno grož e	višnja, crno grož e	0,000
		kupina	0,074

Tabela XV. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke gustih vo nih sokova

Element	Al	B	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Pb	Si	Zn
Zna ajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,337	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela XVI. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke gustih vo nih sokova za neke od detektovanih elementa

		Zavisna varijabla	Značajnost (p)
Ca	Breskva	bresvka i jabuka, jagoda i jabuka, jagoda, multivitamin kajsija i jabuka	0,000 0,853
	Kajsija i jabuka	bresvka i jabuka, jagoda i jabuka, jagoda, multivitamin bresvka	0,000 0,853
Cd		jagoda i jabuka	0,631
		bresvka	0,469
Cd	Breskva i jabuka	jagoda kajsija i jabuka multivitamin bresvka i jabuka	0,370 0,530 0,314 0,631
	Jagoda i jabuka	bresvka, kajsija i jabuka jagoda multivitamin bresvka i jabuka	1,000 0,996 0,988 0,469
Cd	Breskva	jagoda i jabuka, jagoda, kajsija i jabuka multivitamin	1,000 0,999
	Jagoda	bresvka i jabuka jagoda i jabuka bresvka, kajsija i jabuka, multivitamin bresvka i jabuka	0,370 0,996 1,000 0,530
Cd	Kajsija i jabuka	jagoda i jabuka, breskva, jagoda multivitamin breska i jabuka jagoda i jabuka	1,000 0,998 0,314 0,988
	Multivitamin	breskva jagoda kajsija i jabuka jagoda i jabuka	0,999 1,000 0,998 0,712
Cr	Breskva i jabuka	bresvka, jagoda, multivitamin kajsija jabuka breska i jabuka	0,000 0,106 0,712
	Jagoda i jabuka	bresvka, jagoda, multivitamin kajsija jabuka breska i jabuka	0,000 0,683 0,106
Cr	Kajsija i jabuka	jagoda i jabuka bresvka, jagoda, multivitamin	0,683 0,000
	Mg	jagoda i jabuka, kajsija i jabuka, multivitamin bresvka jagoda bresvka i jabuka	0,000 0,019 0,001 0,019
Mg	Breskva	jagoda i jabuka, multivitamin jagoda bresvka i jabuka	0,000 0,348 0,011
	Jagoda	kajsija i jabuka bresvka i jabuka	0,001

		jagoda i jabuka, multivitamin	0,000
		breskva	0,348
		kajsija i jabuka	0,319
	Kajsija i jabuka	breskva i jabuka, jagoda i jabuka, multivitamin	0,000
		breskva	0,011
		jagoda	0,319
Pb	Breskva i jabuka	jagoda i jabuka, breskva, multivitamin	0,000
		jagoda	0,001
		kajsija i jabuka	0,076
	Breskva	breskva i jabuka, jagoda i jabuka, jagoda, kajsija i jabuka	0,000
		multivitamin	0,281
		breskva i jabuka	0,001
	Jagoda	jagoda i jabuka, breskva, multivitamin	0,000
		kajsija i jabuka	0,199
		breskva i jabuka	0,076
	Kajsija i jabuka	jagoda i jabuka, breskva, multivitamin	0,000
		jagoda	0,199
	Multivitamin	breskva i jabuka, jagoda i jabuka, jagoda, multivitamin	0,000
		breskva	0,281

Tabela XVII. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke bistrih vo nih sokova od višnje u odnosu na proizvod a a

	Al	B	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Na	Pb	Si	Zn
Višnja	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Kupina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000
Crno grožđe	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
Borovnica	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000

Tabela XVIII. Rezultati ANOVA testa na sadržaj makro elemenata za ispitivane uzorke vo nih vina

Element	Ca	K	Mg	Na
Značajnost (p)	0,000	0,001	0,003	0,006

Tabela XIX. Rezultati ANOVA testa na sadržaj makro elemenata za ispitivane uzorke vo nih vina u odnosu na proizvod a a

	Ca	K	Mg	Na
Kupina	0,000	0,000	0,000	0,000
Višnja	0,000	0,000	0,000	0,000
Borovnica	0,000	0,000	0,000	0,000
Malina	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela XX. Rezultati Tukey HSD testa na sadržaj pojedinih makro elemenata za ispitivane uzorke vo nog vina od kupine u odnosu na proizvod a a

Zavisna varijabla		Značajnost (p)
Ca	Dom.2	0,000
	Dom.1	Mar.1 0,000
		Mar.2 0,000
		Dom.1 0,000
	Dom.2	Mar.1 0,997
		Mar.2 0,011
		Dom.1 0,000
	Mar.1	Dom.2 0,997
		Mar.2 0,009
		Dom.1 0,000
Mg	Mar.2	Dom.2 0,011
		Mar.1 0,009
		Dom.2 0,736
	Dom.1	Mar.1 0,939
		Mar.2 0,000
		Dom.1 0,736
	Dom.2	Mar.1 0,429
		Mar.2 0,000
		Dom.1 0,939
	Mar.1	Dom.2 0,429
		Mar.2 0,000
		Dom.1 0,000
Mar.2	Dom.2	0,000
		Mar.1 0,000

Tabela XXI. Rezultati ANOVA za ispitivane uzorke domaćeg meda

Element	Al	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Si	Zn
Značajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	

Tabela XXII. Rezultati ANOVA za ispitivane uzorke industrijskog meda

Element	Al	B	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Si	Zn
Značajnost (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela XXIII. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke doma ih vrsta meda

		Zavisna varijabla	Značajnost (p)
Cd	Livadski	bagemov	0,005
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
	Bagemov	livadski	0,005
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
	Šumski	livadski	0,000
		bagemov	0,000
		cvetni	0,773
Cr	Livadski	livadski	0,000
		bagemov	0,000
		šumski	0,773
	Bagemov	livadski	0,273
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
	Cvetni	livadski	0,273
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
Fe	Livadski	bagemov	0,042
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
	Bagemov	livadski	0,042
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
	Mg	bagemov	0,000
		šumski	0,981
		cvetni	0,899
Na	Livadski	livadski	0,981
		bagemov	0,000
		cvetni	0,723
	Cvetni	livadski	0,899
		bagemov	0,000
		šumski	0,723
	Bagemov	bagemov	0,027
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
Pb	Šumski	livadski	0,000
		bagemov	0,000
		cvetni	0,414
	Cvetni	livadski	0,000
		bagemov	0,000
		šumski	0,414
	Livadski	bagemov	0,065

		šumski	0,981
		cvetni	0,012
	Bagemov	livadski	0,065
		šumski	0,109
		cvetni	0,622
	Šumski	livadski	0,981
		bagemov	0,109
		cvetni	0,019
	Cvetni	livadski	0,012
		bagemov	0,622
		šumski	0,019
	Bagemov	livadski	0,000
		šumski	0,090
		cvetni	0,790
	Šumski	livadski	0,000
Zn		bagemov	0,090
		cvetni	0,024
	Cvetni	livadski	0,000
		bagemov	0,790
		šumski	0,024

Tabela XXIV. Rezultati Tukey HSD testa za ispitivane uzorke industrijskih vrsta meda

		Zavisna varijabla	Značajnost (p)
Al	Biomed		
Livadski	manuka	0,000	
	livadski	0,000	
	bagremov	0,000	
	šumski	0,417	
	cvetni	0,618	
	planinski	0,000	
	manuka	0,000	
	biomed	0,000	
	bagremov	0,989	
	šumski	0,000	
Bagremov	cvetni	0,000	
	planinski	0,856	
	manuka	0,000	
	biomed	0,000	
	livadski	0,989	
	šumski	0,000	
	cvetni	0,000	
Šumski	planinski	0,997	
	manuka	0,000	
	biomed	0,417	
	livadski	0,000	
	bagremov	0,000	
	cvetni	1,000	
	planinski	0,000	

	Cvetni	manuka	0,000
		biomed	0,618
		livadski	0,000
		bagremov	0,000
		šumski	1,000
		planinski	0,000
Cd	Planinski	manuka	0,000
		biomed	0,000
		livadski	0,856
		bagremov	0,997
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
		planinski	1,000
Cd	Biomed	manuka	0,000
		livadski	1,000
		bagremov	0,000
		šumski	0,000
		cvetni	1,000
		planinski	1,000
		manuka	0,000
Cd	Livadski	biomed	1,000
		bagremov	0,000
		šumski	0,000
		cvetni	1,000
		planinski	1,000
		manuka	0,000
		biomed	1,000
Cd	Cvetni	livadski	1,000
		bagremov	0,000
		šumski	0,000
		cvetni	1,000
		planinski	1,000
		manuka	0,000
		biomed	1,000
Cd	Planinski	livadski	1,000
		bagremov	0,000
		šumski	0,000
		cvetni	1,000
		planinski	1,000
		manuka	,000
		biomed	1,000
Cr	Manuka	livadski	1,000
		bagremov	0,000
		šumski	1,000
		cvetni	0,000
		planinski	0,238
		manuka	0,353
		livadski	0,001
Cr	Biomed	bagremov	0,000
		šumski	0,244
		cvetni	0,000
		planinski	1,000
		manuka	0,001
		livadski	0,040
		bagremov	0,000
Cr	Livadski	šumski	0,244
		cvetni	0,000
		planinski	1,000
		manuka	0,001

		biomed	0,040
		bagremov	0,000
		šumski	0,001
		cvetni	0,000
		planinski	0,066
	Šumski	manuka	1,000
		biomed	0,244
		livadski	0,001
		bagremov	0,000
		cvetni	0,000
		planinski	0,158
	Cvetni	manuka	0,000
		biomed	0,000
		livadski	0,000
		bagremov	0,000
		šumski	0,000
		planinski	0,000
	Planinski	manuka	0,238
		biomed	1,000
		livadski	0,066
		bagremov	0,000
		šumski	0,158
		cvetni	0,000
Cu	Biomed	manuka	0,000
		livadski	0,000
		bagremov	0,000
		šumski	0,964
		cvetni	0,000
		planinski	0,000
	Livadski	manuka	0,000
		biomed	0,000
		bagremov	0,007
		šumski	0,000
		cvetni	0,996
		planinski	0,000
	Bagremov	manuka	0,000
		biomed	0,000
		livadski	0,007
		šumski	0,000
		cvetni	0,022
	Šumski	planinski	0,000
		manuka	0,000
		biomed	0,964
		livadski	0,000
		bagremov	0,000
		cvetni	0,000
		planinski	0,000
	Cvetni	manuka	0,000
		biomed	0,000

		livadski	0,996
		bagremov	0,022
		šumski	0,000
		planinski	0,000
		manuka	0,000
		livadski	0,746
		bagremov	1,000
		šumski	0,000
		cvetni	0,001
		planinski	0,072
		manuka	0,000
		biomed	0,746
		bagremov	0,830
		šumski	0,002
		cvetni	0,009
		planinski	0,005
		manuka	0,000
		biomed	1,000
		livadski	0,830
		šumski	0,000
		cvetni	0,001
		planinski	0,054
		manuka	0,000
		biomed	0,000
		livadski	0,002
		bagremov	0,000
		cvetni	0,983
		planinski	0,000
		manuka	0,000
		biomed	0,001
		livadski	0,009
		bagremov	0,001
		šumski	0,983
		planinski	0,000
		manuka	0,000
		biomed	0,072
		livadski	0,005
		bagremov	0,054
		šumski	0,000
		cvetni	0,000
Zn	Biomed	manuka	0,000
		livadski	0,008
		bagremov	0,000
		šumski	0,356
		cvetni	0,066
		planinski	0,000
		manuka	0,000
		biomed	0,008
		bagremov	0,000
		šumski	0,332

	cvetni	0,888
Šumski	planinski	0,000
	manuka	0,000
	biomed	0,356
	livadski	0,332
	bagremov	0,000
	cvetni	0,930
Cvetni	planinski	0,000
	manuka	0,000
	biomed	0,066
	livadski	0,888
	bagremov	0,000
	šumski	0,930
	planinski	0,000

Tabela XXV. Rezultati ANOVA testa za ispitivane uzorke domaćih vrsta meda sa tri različita lokaliteta

	Al	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Si	Zn
Livadski	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Bagremov	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Šumski	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,354	0,000	0,000	
Cvetni	0,000	0,000	0,000	0,141	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

## **8 LITERATURA**

1. Lajunen LH, Peramaki P. Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission: Royal Society of Chemistry; 2004.
2. Hill SJ. Inductively coupled plasma spectrometry and its applications: Wiley-Blackwell; 2008.
3. Goldwasser A, Mermet J. Contribution of the charge-transfer process to the excitation mechanisms in inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1986;41(7):725-739.
4. Dean JR. Practical inductively coupled plasma spectroscopy: Wiley; 2005.
5. Mermet JM, Poussel E. ICP emission spectrometers: 1995 analytical figures of merit. *Applied Spectroscopy* 1995;49(10):12A-18A.
6. Capelle B, Mermet J, Robin J. Influence of the generator frequency on the spectral characteristics of inductively coupled plasma. *Applied Spectroscopy* 1982;36(2):102-106.
7. Boumans P. Detection limits for lines widely differing in "hardness" and intensity ratios of ionic to atomic lines measured in 50 and 100 MHz inductively coupled plasmas. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1989;44(12):1285-1296.
8. Mermet J. Ionic to atomic line intensity ratio and residence time in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1989;44(11):1109-1116.
9. Bates LC, Olesik JW. Effect of sample aerosol transport rate on inductively coupled plasma atomic emission and fluorescence. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1990;5(3):239-247.
10. Novotny I, Farinas J, Jia-liang W, Poussel E, Mermet JM. Effect of power and carrier gas flow rate on the tolerance to water loading in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1996;51(12):1517-1526.
11. Olesik JW, Den SJ. Effect of central gas flow rate and water on an argon inductively coupled plasma: spatially resolved emission, ion-atom intensity ratios and electron number densities. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1990;45(7):731-752.
12. Brenner I, Vats S, Zander A. A new CCD axially viewed ICP atomic emission spectrometer for simultaneous multi-element geoanalysis. Determination of major and minor elements in silicate rocks. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1999;14(8):1231-1237.
13. Dennaud J, Howes A, Poussel E, Mermet JM. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2001;56(1):101-112.
14. Romero X, Poussel E, Mermet J. The effect of sodium on analyte ionic line intensities in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: influence of the operating conditions. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1997;52(4):495-502.
15. Boorn AW, Browner RF. Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry* 1982;54(8):1402-1410.
16. Hu Z, Hu S, Gao S, Liu Y, Lin S. Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2004;59(9):1463-1470.
17. Ebdon L, Foulkes ME, Hill S. Fundamental and comparative studies of aerosol sample introduction for solutions and slurries in atomic spectrometry. *Microchemical journal* 1989;40(1):30-64.

18. Mermet J. Is it still possible, necessary and beneficial to perform research in ICP-atomic emission spectrometry?, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2004;20(1):11-16.
19. Silva FV, Trevizan LC, Silva CS, Nogueira ARA, Nobrega JA. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2002;57(12):1905-1913.
20. [http://www.gbcscientific.com/appnotes/icp\\_oes\\_app\\_note\\_002.pdf](http://www.gbcscientific.com/appnotes/icp_oes_app_note_002.pdf).
21. Montaser A, Golightly D. Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry: VCH Publishers, New York, NY; 1987.
22. Boumans PWJM. Inductively coupled plasma emission spectroscopy. Part II: applications and fundamentals. Volume 2: John Wiley and Sons, New York, NY; 1987.
23. ISO 8402:1994. Quality management and quality assurance - Vocabulary.
24. ISO 3534-1:2006. Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability.
25. Da Silva JF, Williams RJP. The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life: Oxford University Press, USA; 2001.
26. WHO. Trace Elements in Human Nutrition and Health. Geneva 1996.
27. WHO. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 30th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Cambridge 1986.
28. WHO. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 33rd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Cambridge 1989.
29. O'Dell BL, Sunde RA. Handbook of nutritionally essential mineral elements: CRC; 1997.
30. Nielsen FH. Ultratrace elements in nutrition: current knowledge and speculation. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1998;11(2):251.
31. Nicholas DJD. Minor mineral nutrients. *Annual Review of Plant Physiology* 1961;12(1):63-86.
32. Mertz W. The essential trace elements. *Science* 1981; 213:1332-1338.
33. Cotzias GC. Importance of trace substances in environmental health, as exemplified by manganese. In: Trace Substances in Environmental Health. Hemphill DH, editor: University of Missouri Press, Columbia, MO; 1967.
34. Szefer P, Nriagu JO. Mineral components in foods: CRC; 2006.
35. Lippard SJ. Bioinorganic chemistry: a maturing frontier. *Science (New York, NY)* 1993;261(5122):699.
36. Shriver D.F. APW. Inorganic Chemistry, 3rd ed: Oxford University Press, Oxford; 1999.
37. Gibney MJ, Lanham-New SA, Cassidy A, Vorster HH. Introduction to human nutrition: Wiley-Blackwell; 2009.
38. Darrie G. The importance of chromium in occupational health, in Trace Element Speciation for Environment, Food and Health. Ebdon Lea, editor: Royal Society of Chemistry, Cambridge, MA; 2001.
39. Nielsen FH. Ultratrace elements. In: Modern Nutrition in Health and Disease. M.E. Shils JAO, M. Shike, editor: Lea & Febiger, Philadelphia; 1994.
40. Stillman MJ, Presta A. Characterizing metal ion interactions with biological molecules - the spectroscopy of metallothionein. In: Molecular Biology and Toxicology of Metals. Taylor & Francis, London; 2000.
41. Keen C, Ensunsa J, Watson M, Baly D, Donovan S, Monaco M, Clegg M. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):213.

42. Takeda A. Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews* 2003;41(1):79-87.
43. Mertz W. Trace elements in human and animal nutrition. Volume 1: Academic Press, Inc.; 1987.
44. Reilly C. Metal contamination of food: its significance for food quality and human health: Wiley-Blackwell; 2008.
45. Ysart G, Miller P, Crews H, Robb P, Baxter M, L'Argy CD, Lofthouse S, Sargent C, Harrison N. Dietary exposure estimates of 30 elements from the UK Total Diet Study. *Food Additives & Contaminants* 1999;16(9):391-403.
46. Przybyla AE, Robbins J, Menon N, Peck HD. Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiology Letters* 1992;88(2):109-135.
47. Danks D. Copper deficiency in humans. *Annual review of nutrition* 1988;8(1):235-257.
48. Arthur JR. Selenium supplementation: does soil supplementation help and why?, *Proceedings of the Nutrition Society* 2003;62(02):393-397.
49. O'Dell BL, Sunde RA. Molybdenum. In: Handbook of nutritionally essential mineral elements: CRC; 1997.
50. Department of Health. Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients in the United Kingdom: HMSO, London; 1991.
51. Murray FJ. A human health risk assessment of boron (boric acid and borax) in drinking water. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 1995;22(3):221.
52. Hunt CD. Regulation of enzymatic activity. *Biological trace element research* 1998;66(1):205-225.
53. Beattie JH, Peace HS. The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition* 1993;69(03):871-884.
54. Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological trace element research* 1998;66(1):299-317.
55. Brown ML. Present knowledge in nutrition: International Life Sciences Institute Press; 1990.
56. Herber R, Stoeppler M. Arsenic. In: Trace element analysis in biological specimens: Elsevier Science; 1994.
57. Uthus E, Poellot R. Effect of dietary pyridoxine on arsenic deprivation in rats. *Trace elements* 1991;10:339-347.
58. Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate medical journal* 2003;79(933):391-396.
59. Hammer DI, Finklea JF, Creason JP. Cadmium exposure and human health effects, in Trace Substances in Environmental Health: University of Missouri Press, Columbia, MO; 1971.
60. Carruthers M, Smith B. Evidence of cadmium toxicity in a population living in a zinc-mining area: pilot survey of Shiphim residents. *The Lancet* 1979;313(8121):845-847.
61. Hodgson E, Levi PE. A textbook of modern toxicology: Wiley Online Library; 2004.
62. Sparks DL. Environmental soil chemistry: Academic Press; 2003.
63. McBride MB. Environmental chemistry of soils: Oxford university press; 1994.
64. Borigato EV, Martinez FE. Iron nutritional status is improved in Brazilian preterm infants fed food cooked in iron pots. *The Journal of nutrition* 1998;128(5):855-859.

65. Smart G, Sherlock J. Chromium in foods and the diet. *Food Additives & Contaminants* 1985;2(2):139-147.
66. Tanner M, Kantarjian A, Bhave S, Pandit A. Early introduction of copper-contaminated animal milk feeds as a possible cause of Indian childhood cirrhosis. *Lancet* 1983;2(8357):992.
67. Pravilnik o deklarisanju i ozna avanju upakovanih namirnica. Sl. list SCG (br. 4/2004, 2/2004 i 48/2004).
68. Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti dijetetskih namirnica koje se mogu stavljati u promet. "Sl. list SFRJ", br. 4/85, 70/86 i 69/91, "Sl. list SCG", br. 56/2003 - dr. pravilnik i "Sl. glasnik RS", br. 35/2008.
69. WHO. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 30th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Cambridge, U.K.; 1986.
70. WHO. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 33rd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Cambridge, U.K.; 1989.
71. Pravilnik o koli inama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama. "Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/2002 i "Sl. glasnik RS", br. 25/2010 - dr. pravilnik i 28/2011 - dr. pravilnik.
72. Haswell SJ. Atomic absorption spectrometry: Elsevier; 1991.
73. Otles S. Methods of analysis of food components and additives: CRC Press; 2011.
74. Gilman LB, Engelhart WG. Recent advances in microwave sample preparation. *Spectroscopy* 1989;4(8):14-21.
75. Namiesnik J, Chrzanowski W, Zmijewska P. New horizons and challenges in environmental analysis and monitoring. *Centre of Excellence in Environmental Analysis and Monitoring (CEEAM), Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland* 2003.
76. Taylor L, Papp RB, Pollard BD. Instrumental methods for determining elements: VCH; 1994.
77. Willard HH, Merritt LL, Dean JA, Settle FA. Instrumental Methods for Analysis, Wadsworth Pub. Company 1993.
78. Simpkins WA, Louie H, Wu M, Harrison M, Goldberg D. Trace elements in Australian orange juice and other products. *Food Chemistry* 2000;71(4):423-433.
79. Munilla M, Gomez-Pinilla I, Rodenas S, Larrea M. Determination of metals in seaweeds used as food by inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry. *Analisis* 1995;23(9):463-466.
80. Sawaya WN, Al-Awadhi F, Aziz A, Al-Rashdan A, Mahjoub B, Al-Amiri H. Nutritional profile of Kuwaiti composite dishes: minerals and vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis* 1998;11(1):70-88.
81. Ikem A, Nwankwoala A, Odueyungbo S, Nyavor K, Egbebor N. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chemistry* 2002;77(4):439-447.
82. Fernandez P, Pablos F, Martin M, Gonzalez A. Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chemistry* 2002;76(4):483-489.

83. Caroli S, Forte G, Alessandrelli M, Cresti R, Spagnoli M, D'Ilio S, Pauwels J, Kramer GN. A pilot study for the production of a certified reference material for trace elements in honey. *Microchemical journal* 2000;67(1):227-233.
84. Simsek A, Korkmaz D, VELIOZLU YS, Ataman OY. Determination of boron in hazelnut (*Corylus avellana L.*) varieties by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and spectrophotometry. *Food Chemistry* 2003;83(2):293-296.
85. Rodushkin I, Engstrom E, Sorlin D, Baxter D. Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market. *Science of the total environment* 2008;392(2):290-304.
86. Naozuka J, Carvalho Vieira E, Nascimento AN, Oliveira PV. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. *Food Chemistry* 2011;124(4):1667-1672.
87. Hague T, Petroczi A, Andrews PL, Barker J, Naughton DP. Determination of metal ion content of beverages and estimation of target hazard quotients: a comparative study. *Chemistry Central Journal* 2008;2(1):13.
88. Zhang Y, Song Q, Yan J, Tang J, Zhao R, Zhang Y, He Z, Zou C, Ortiz-Monasterio I. Mineral element concentrations in grains of Chinese wheat cultivars. *Euphytica* 2010;174(3):303-313.
89. Bressy FC, Brito GB, Barbosa IS, Teixeira LS, Korn MGA. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. *Microchemical journal* 2013;109:145-149.
90. Meche A, Martins MC, Lofrano BE, Hardaway CJ, Merchant M, Verdade L. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. *Microchemical journal* 2010;94(2):171-174.
91. Cindri IJ, Zeiner M, Kroppl M, Stingereder G. Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices. *Microchemical journal* 2011;99(2):364-369.
92. Castro JT, Santos EC, Santos WP, Costa LM, Korn M, Nobrega JA, Korn MGAA. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 2009;78(4):1378-1382.
93. Nardi EP, Evangelista FbS, Tormen L, Curtius AJ, Souza SSd, Barbosa F. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry* 2009;112(3):727-732.
94. Altundag H, Tuzen M. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49(11):2800-2807.
95. Krejcova A, Cernohorski T, Meixner D. Elemental analysis of instant soups and seasoning mixtures by ICP-OES. *Food Chemistry* 2007;105(1):242-247.
96. Bakircioglu D, Kurtulus YB, Ucar G. Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49(1):202-207.
97. Sousa RA, Baccan N, Cadore S. Determination of elemental content in solid sweeteners by slurry sampling and ICP OES. *Food Chemistry* 2011;124(3):1264-1267.

98. Pedro NA, De Oliveira E, Cadore S. Study of the mineral content of chocolate flavoured beverages. *Food Chemistry* 2006;95(1):94-100.
99. Kim-Yen Phan-Thien, Graeme C. Wright, Lee NA. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and -optical emission spectroscopy (ICP-OES) for determination of essential minerals in closed acid digestates of peanuts (*Arachis hypogaea L.*). *Food Chemistry* 2012;134(1):453-460.
100. Zand N, Chowdhry BZ, Zotor FB, Wray DS, Amuna P, Pullen FS. Essential and trace elements content of commercial infant foods in the UK. *Food Chemistry* 2011;128(1):123-128.
101. Pravilnik o kvalitetu vo nih sokova, koncentrisanih vo nih sokova, vo nih sokova u prahu, vo nih nektara i srodnih proizvoda. Sl. glasnik RS, br. 27/2010 od 28/04/2010.
102. Ashurst PR. Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices: Wiley Online Library; 2005.
103. Postmes T, Van Den Bogaard A, Hazen M. Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation. *Lancet* 1993;341(8847):256-257.
104. Mitra S. Sample preparation techniques in analytical chemistry: Wiley-Interscience; 2004.
105. Davis CS. Statistical methods for the analysis of repeated measurements: Springer; 2002.
106. <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>.
107. Blades M, Horlick G. The vertical spatial characteristics of analyte emission in the inductively coupled plasma. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1981;36(9):861-880.
108. Mermet JM, Poussel E. ICP emission spectrometers: 1995 Analytical figures of merit. *Applied Spectroscopy* 1995;49(10):12A-18A.
109. Mermet J. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. *Analytica chimica acta* 1991;250:85-94.
110. Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT-Food Science and Technology* 2009;42(10):1573-1580.
111. Shils ME. Modern nutrition in health and disease: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
112. Moodley R, Kindness A, Jonnalagadda SB. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 2007;42(5):585-591.
113. Parekh P, Khan A, Torres M, Kitto M. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008;21(4):332-335.
114. Massey R, Taylor D. Aluminium in food and the environment: the proceedings of a symposium organised by the Environment and Food Chemistry Groups of the Industrial Division of the Royal Society of Chemistry, London, 17th May 1988: Royal Society of Chemistry; 1989.
115. Plessi M, Bertelli D, Monzani A, Simonetti MS, Neri A, Damiani P. Dietary fiber and some elements in nuts and wheat brans. *Journal of Food Composition and Analysis* 1999;12(2):91-96.
116. Ackur F, Ozdemir M, Biringen G, Loker M. Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana L.*) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry* 1999;65(3):309-313.

117. Capar SG, Cunningham WC. Element and Radionuclide Concentrations in Food: FDA Total Diet Study 19911996. *Journal of AOAC International* 2000;83(1):157-177.
118. Cabrera C, Lloris F, Gimanez R, Olalla M, Lopez MC. Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. *Science of the total environment* 2003;308(1):1-14.
119. Simsek A, Korkmaz D, Velioglu YS, Ataman OY. Determination of boron in hazelnut (*Corylus avellana L.*) varieties by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and spectrophotometry. *Food Chemistry* 2003;83(2):293-296.
120. Malik RN, Husain SZ, Nazir I. Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 2010;42(1):291-301.
121. Mingorance M, Valdes B, Oliva SR. Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions. *Environment International* 2007;33(4):514-520.
122. Corke H, De Leyn I, Nip WK, Cross NA, Hui Y. Bakery products: science and technology: Wiley-Blackwell; 2008.
123. Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa. Sl. list SRJ”, br. 52/95 i “Sl. list SCG”, br. 56/2003 - dr. pravilnik i 4/2004 - dr. pravilnik.
124. Škrbić B, Onjia A. Multivariate analyses of microelement contents in wheat cultivated in Serbia (2002). *Food Control* 2007;18(4):338-345.
125. Faithfull NT. Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook: Cabi; 2002.
126. Krieger R. Handbook of pesticide toxicology: Academic Press; 2001.
127. Shtangeeva I, Steinnes E, Lierhagen S. Macronutrients and trace elements in rye and wheat: Similarities and differences in uptake and relationships between elements. *Environmental and Experimental Botany* 2011;70(2):259-265.
128. Demirouzu B, Saldamli I, Gursel B, Ucak A, Cetinyokus F, Yuzbasi N. Determination of some metals which are important for food quality control in bread. *Journal of Cereal Science* 2003;37(2):171-177.
129. Nikolić R, Kaličanin B, Velimirović D, Krstić N, Arsić I, Tadić V, Savić D. Medicinal plants as a source of iron in functional foods. 6th Central European Congress on Food; Novi Sad 2012.
130. Santa-Maria GE, Cagliari DH. The regulation of zinc uptake in wheat plants. *Plant Science* 1998;137(1):1-12.
131. Ekholm Pi, Virkki L, Ylinen M, Johansson L, Varo P. Effects of natural chelating agents on the solubility of some physiologically important mineral elements in oat bran and oat flakes. *Cereal chemistry* 2000;77(5):562-566.
132. Debski B, Gralak M. Komosa ryżowa-charakterystyka i wartości dietetyczne. *Zywienie Człowieka i Metabolizm* 2001;28(4):360-369.
133. Tang J, Zou C, He Z, Shi R, Ortiz-Monasterio I, Qu Y, Zhang Y. Mineral element distributions in milling fractions of Chinese wheats. *Journal of Cereal Science* 2008;48(3):821-828.
134. Bonafaccia G, Gambelli L, Fabjan N, Kreft I. Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry* 2003;83(1):1-5.
135. Jorhem L, Sundstrom B, Engman J. Cadmium and Other Metals in Swedish Wheat and Rye Flours: Longitudinal Study, 19831997. *Journal of AOAC International* 2001;84(6):1984-1992.

136. Booth CK, Reilly C, Farmakalidis E. Mineral composition of Australian ready-to-eat breakfast cereals. *Journal of Food Composition and Analysis* 1996;9(2):135-147.
137. Zielinski H, Kozlowska H, Lewczuk B. Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2001;2(3):159-169.
138. Isserliyska D, Karadjov G, Angelov A. Mineral composition of Bulgarian wheat bread. *European Food Research and Technology* 2001;213(3):244-245.
139. Gonzalez M, Gallego M, Valcarcel M. Determination of nickel, chromium and cobalt in wheat flour using slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 1999;48(5):1051-1060.
140. Alam M, Snow E, Tanaka A. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *Science of the total environment* 2003;308(1):83-96.
141. Gonzalez M, Gallego M, Valcarcel M. Determination of arsenic in wheat flour by electrothermal atomic absorption spectrometry using a continuous precipitation-dissolution flow system. *Talanta* 2001;55(1):135-142.
142. Skibniewska K, Fieko M, Fornal A, Smoczyński S. Influence of starter culture and complex dough improver on in vitro digestibility of some minerals from bread. *Current Trends In Commodity Science Akademia Ekonomiczna Poznan (ISBN 83-88760-83-1)* 2002;2:635-639.
143. Grembecka MG, Kusiuk A, Szefer P. Zawartosc magnezu, fosforu, cynku i zelaza w roznych gatunkach pieczywa. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2007;40(4):319.
144. Koni-Risti A, Šavikin K, Zduni G, Jankovi T, Juranic Z, Menkovi N, Stankovi I. Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chemistry* 2011;125(4):1412-1417.
145. Ashurst PR. Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices: Wiley-Blackwell; 2008.
146. Jalbani N, Ahmed F, Rashid U, Munshi AB, Kandhro A. Determination of essential elements (Cu, Fe and Zn) in juices of commercially available in Pakistan. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48(10):2737-2740.
147. Velimirovi D, Miti S, Tosi S, Pavlovi A, Stojkovi M. Determination of the Content of Some Trace Elements in Particular Samples of Grains, Flours and Breads by ICP-OES. *Oxidation Communications* 2013;35(1):160.
148. Acar O. Determination of Lead, Copper, Iron and Zinc Levels in Fruit Jams, Nectars, Juices and Beverages by Electrothermal and Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* 2011;6(2):114-128.
149. Kali anin B, Velimirovi D. Potentiometric stripping analysis of zinc, cadmium and lead in tobacco leaves (*Nicotiana Tabacum L.*) and soil samples. *International Journal of Electrochemical Science* 2012;7:313-323.
150. Abdolmohammad-Zadeh H, Sadeghi G. Combination of ionic liquid-based dispersive liquid-liquid micro-extraction with stopped-flow spectrofluorometry for the pre-concentration and determination of aluminum in natural waters, fruit juice and food samples. *Talanta* 2010;81(3):778-785.
151. Gitelman HJ. Aluminum and health: A critical review: CRC Press; 1989.
152. Gramicci L, Ingrao G, Milana M, Santaroni P, Tomassi G. Aluminium levels in Italian diets and in selected foods from aluminium utensils. *Food Additives & Contaminants* 1996;13(7):767-774.

153. Rodushkin I, Magnusson A. Aluminium migration to orange juice in laminated paperboard packages. *Journal of Food Composition and Analysis* 2005;18(5):365-374.
154. Rupasinghe H, Clegg S. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis* 2007;20(2):133-137.
155. Fili SP, Oliveira E, Oliveira PV. On-line digestion in a focused microwave-assisted oven for elements determination in orange juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2003;14(3):435-441.
156. Carnara M, Diez C, Torija E. Chemical characterization of pineapple juices and nectars. Principal components analysis. *Food Chemistry* 1995;54(1):93-100.
157. Cindri IJ, Zeiner M, Kroppl M, Stingeder G. Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices. *Microchemical journal* 2011;99(2):364-369.
158. Farid S, Enani M. Levels of trace elements in commercial fruit juices in Jeddah, Saudi Arabia. *Medicine Journal Islamic World Academy Science* 2010;18(1):31-38.
159. Froes RES, Neto WB, Naveira RLP, Nascentes CSC, da Silva JBB. Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2009;64(6):619-622.
160. Pisani A, Protano G, Riccobono F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry* 2008;107(4):1553-1560.
161. Caroli S, Forte G, Iamiceli A, Galloppi B. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. *Talanta* 1999;50(2):327-336.
162. Buldini PL, Cavalli S, Mevoli A, Sharma JL. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. *Food Chemistry* 2001;73(4):487-495.
163. Conti ME. Lazio region (central Italy) honeys: a survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control* 2000;11(6):459-463.
164. Hernandez O, Fraga J, Jimanez A, Jimenez F, Arias J. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry* 2005;93(3):449-458.
165. Golob T, Doberšek Uk, Kump P, Ne emer M. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* 2005;91(4):593-600.
166. Provenzano MR, El Bilali H, Simeone V, Baser N, Mondelli D, Cesari G. Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry* 2010;122(4):1338-1343.
167. Pohl P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2009;28(1):117-128.
168. Bogdanov S. Contaminants of bee products1. *Apidologie* 2006;37:1-18.
169. Rashed M, Soltan M. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004;17(6):725-735.

170. Devillers J, Dore J, Marenco M, Poirier-Duchene F, Galand N, Viel C. Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(21):5998-6007.
171. Lopez-Garcia I, Vinas P, Blanco C, Hernandez-Cordoba M. Fast determination of calcium, magnesium and zinc in honey using continuous flow flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 1999;49(3):597-602.
172. Iskander F. Trace and minor elements in four commercial honey brands. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1995;201(5):401-408.
173. Nanda V, Sarkar B, Sharma H, Bawa A. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis* 2003;16(5):613-619.
174. Al-Khalifa A, Al-Arify I. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry* 1999;67(1):21-25.

## **9 BIBLIOGRAFIJA SA BIOGRAFIJOM**

Rođen sam 08.03.1976. godine u Nišu. Osnovnu školu i gimnaziju završio sam u rodnom gradu sa odličnim uspehom.

Studije na Filozofskom fakultetu - odsek Hemija u Nišu upisao sam školske 1996/97. godine i diplomirao 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,38.

Školske 2006/07. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu upisao sam doktorske studije na smeru Hemija, oblast Analitička hemija.

Oktobra 2005. godine zasnovao sam radni odnos na Medicinskom fakultetu u Nišu, kada sam izabran u zvanje asistent pripravnik za užu nauku oblast Hemija na predmetu Analitička hemija. U zvanje asistent, na istom fakultetu, izabran sam 01.09.2009. godine. Decembra 2012. godine reizabran sam u zvanje asistenta za užu nauku oblast Hemija na predmetu Analitička hemija.

## **Učešće na projektima**

„Razvoj i primena metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine“ (finansiran od strane Republike Srbije u periodu od 2006. do 2010. godine).

„Mogunosti korišćenja potencijala geotermalnih voda u jablaničkom i piinjskom okrugu“ (finansiran od strane Republike Srbije u periodu od 2011. do 2014. godine).

## **Istraživanja u okviru ove disertacije su deo istraživanja u okviru projekata:**

„Razvoj i primena metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine“ (finansiran od strane Republike Srbije u periodu od 2006. do 2010. godine).

## **Publikacije**

B. Kaličanin, D. Velimirović. *Praktikum iz analitičke hemije za studente farmacije*, Medicinski fakultet, Niš, Grafocolor, 2007.

### **A) Radovi objavljeni u naučnim asopisima međunarodnog značaja**

#### **Rad u istaknutom međunarodnom asopisu (M22)**

1. Biljana Kaličanin, Dragan Velimirović. *Potentiometric Stripping Analysis of Zinc, Cadmium and Lead in Tobacco Leaves (*Nicotiana Tabacum L.*) and Soil Samples*. International journal of Electrochemical Science, 7 (2012) 313-323.

#### **Rad u međunarodnom asopisu (M23)**

1. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Dragan S. Velimirović. *Development and Evaluation of Kinetic-spectrophotometric Method for Determination of Arginine*. Journal of the Chinese Chemical Society, 54 (2007) 47-54.

2. Snežana S. Miti , Snežana B. Toši , Aleksandra N. Pavlovi , Slavica M. Sunari , Dragan S. Velimirovi , *Quantitative Analysis of The Seasonal Changes of Traces of Copper(II) in Mineral Water*. Asian Journal of Chemistry, 22 (2010) 1183-1191.
3. D. S. Velimirovi , S. S. Miti , S. B. Toši , A. N. Pavlovi , M. D. Stojkovi , *Determination of the content of some trace elements in particular samples of grains, flours and breads by ICP-OES*. Oxidation Communications, 35(1) (2012) 160–171. - *Rad iz doktorske disertacije*
4. S.S. Miti , G.Z. Miletic , A.N. Pavlovi , E.T. Pecev, D.S. Velimirovi . *Quantitative Estimation of Dimenhydrinate in Pharmaceuticals and Human Control Serum Using Ligand-Exchange Reaction*. Oxidation Communications, 35(4) (2012) 856-868.
5. Biljana Kali anin, Dragan Velimirovi . *The content of lead in herbal drugs and tea samples*. Central European Journal of Biology, February 2013, Volume 8, Issue 2, pp 178-185.
6. Mirjana Apostolovi , Biljana Kali anin, Marija Igi , Olivera Tri kovi -Janji , Dušan Šurdilovi , Ljiljana Kostadinovi , Branislava Stojkovi , Dragan Velimirovi . *Migration of fluoride ions from the permanent teeth into saliva in children with glass ionomer cement restorations: an in vitro study*. Vojnosanit Pregl 2013; 70(3): 279–283.
7. Dragan S Velimirovi , Snežana S Miti , Snežana B Toši , Biljana M Kali anin, Aleksandra N Pavlovi , Milan N Miti . *Levels of major and minor elements in some commercial fruit juices available in Serbia*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research October 2013. - *Rad iz doktorske disertacije*

#### **Rad u asopisu nacionalnog značaja (M52)**

1. Biljana Kali anin, D. Velimirovi , *Teški metali u razliitim biljnim vrstama kao posledica zagađenja životne sredine*, Ecologica, 15 (2008) 93-100.

#### **Rad u naučnom asopisu (M53)**

2. Biljana Kali anin, D. Velimirovi , Z. Ajdukovi , *Ispitivanje uticaja Cd i Pb na efikasnost regeneracije kostiju pacova sa implantiranim CP/PLGA kompozitom*, Tehnika, Novi materijali 17 (2008) 3-8.

### **B) Radovi objavljeni u zbornicima međunarodnih naučnih skupova**

#### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)**

1. Biljana Kali anin, D. Velimirovi , S. Naumovi . *The influence of packaging material on the content of toxic metals in the beverage of tea fungus kombucha*. XX International Scientific and Professional Meeting „Ecological Truth“ ECO-IST'12, Zaječar (2012) 582-588.

### **Saopštenje sa meunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)**

1. M. Obradović, S. Tošić, D. Velimirović. *Iron(III)-monosulphonated hydroquinone complex MGCM-3 analytical application.* 5<sup>th</sup> International Conference of the South-East European Chemical Societies and XIX Congres of the Chemists and Technologists of Macedonia, September 10-14. 2006. Ohrid.
2. B. Kaličanin, D. Velimirović, *Application of potentiometric stripping analysis for determination of toxic heavy metals in natural waters,* 1st Symposium of Chemistry and Environment, Budva, PS1340, 2007.
3. M. Irić, S. Najman, V. Bojanić, Z. Bojanić, T. Cvetković, B. Kaličanin, S. Čekić, M. Nešić, S. Branković, D. Velimirović, N. Puškaš, *The Influence of Simv Astatin on Calcium and Magnesium Level in Tibia of Rats Neonataly Treated with Monosodium Glutamate,* Second Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation, September 17-20. 2009. Kragujevac.
4. B. Kaličanin, D. Velimirović, Z. Ajduković, *Conducting Chemical Stability of Pharmaceutical Packing Materials on Influence of Acid Media,* I meunarodni Kongres "Inženjerstvo, materijali i menadžment u procesnoj industriji", October 14-16. 2009. Jahorina, Republic of Srpska.
5. B. Kaličanin, D. Velimirović, B. Živković, V. Miletić, K. Milinić. *Erosive potential os some pharmaceutical preparations on acrylatic dentures,* YUCOMAT, September 6-10. 2010. Herceg Novi, P.S.E. 9
6. J. Mladenović, B. Kaličanin, D. Velimirović. *Potentiometric stripping analysis of lead and zinc in some cosmetic preparations.* XXI Congress of the Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation)-September 23-26. 2010. Ohrid.
7. D. Velimirović, B. Kaličanin. *Monitoring toxic effects of lead and cadmium in the kidneys and liver of rats.* XXI Congress of the Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation)-September 23-26. 2010. Ohrid.
8. B. Kaličanin, I. Arsić, D. Velimirović, S. Naumović. *Determination of total lead content in herbal drugs grown on different locations.* 5<sup>th</sup> Congress of Pharmacy of Macedonia (with international participation)-September 21-25. 2011. Ohrid.
9. B. Kaličanin, D. Velimirović, S. Naumović. *The determination of the lead content in different types of commercial teas.* 9th Symposium „Novel technologies and economic development“-October 21-22.2011. Lesovac.

10. B. Kali anin, D. Velimirovi . *The content of highly toxic metal cadmium comparasion in the leaves of tobacco (Nicotaiana tabacum L.) and in siol.* 9th Symposium „Novel technologies and economic development“-October 21-22.2011. Lesovac.
11. Ružica Nikoli , Biljana Kali anin, Dragan Velimirovi , Nenad Krsti , Ivana Arsi , Vanja Tadi , Sofija Djordjevi . *Medicinal plants as a source of iron in functional foods.* 6th Central European Congress on Food – May 23rd-26th 2012 Novi Sad.
12. Biljana Kali anin, Dragan Velimirovi , Jelena Mladenovi . *Lead content determination in some decorative cosmetic products.* XXII Congress of the Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation)-September 05-09. 2012. Ohrid.
13. Biljana Kali anin, Dragan Velimirovi , Sonja Naumovi . *Determination of lead and cadmium in infusion solutions and solutions for Hemodialysis.* XXII Congress of the Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation)-September 05-09. 2012. Ohrid.
14. B. Kali anin and Dragan Velimirovi . *Determination of heavy metals in some textile materials by potentiometric stripping analysis.* 7<sup>th</sup> Central European Conference, Fiber-Grade Polymers, Chemical Fibres and Special Textiles, Portorose, Slovenia, 2012.
15. Iri M, Najman S, Bojani V, Kali anin B, Puškaš N, Velimirovi D, Ceki S, Neši M, Bojani Z, Cvetkovi T, Sokolovi D, Petrovi S. *Mineralization effect of simvastatin on tibia in neonatal treated rats with monosodium glutamate.* 32<sup>nd</sup> Balkan Medical Week, 2012, Niš.

### C) Radovi objavljeni u zbornicima nacionalnih nau nih skupova

#### Saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u izvodu (M64)

1. D. Velimirovi , B. Kali anin, Z. Ajdukovi , D. Petrovi , *Pra enje uticaja kiselog medijuma na postojanost akrilatnih zubnih proteza,* Sedma konferencija mladih istraživa a – Nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, V/2, 2008.
2. B. Živkovi , B. Kali anin, D. Velimirovi , Z. Ajdukovi , V. Mileti , K. Milini , *Erozivni potencijal kiselog medijuma na vešta ke zube i njegov uticaj na zdravlje ljudi.* Osma konferencija mladih istraživa a – Nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, V/24, 2009.
3. B. Kali anin, R. Nikoli , D. Velimirovi , D. Sojanovi . Promene na zubima pod uticajem osvežavaju ih napitaka i hrane kiselog ukusa. 43 dani preventivne medicine, XLIII internacionalni nau ni skup, septembar 22-25, 2009. Niš.