

Elementna analiza orašastih plodova atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu

Hlebec, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:497019>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Dora Hlebec

**ELEMENTNA ANALIZA ORAŠASTIH
PLODOVA METODOM ATOMSKE
SPEKTROMETRIJE UZ INDUKTIVNO
SPREGNUTU PLAZMU**

**INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA I
SREDNJOŠKOLSKA NASTAVA KEMIJE**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre edukacije biologije i kemije

Zagreb, 2017. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom
izv. prof. dr. sc. Ive Juranović Cindrić i izv. prof. dr. sc. Nenada Judaša.

Zahvale

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na iskazanoj pomoći, nezamjenjivim savjetima, susretljivosti, vremenu i trudu.

Iskreno hvala i mentoru metodičkog dijela diplomskog rada, izv. prof. dr. sc. Nenadu Judašu na svom znanju i savjetima, velikoj pomoći pri pisanju ovog rada, kao i tijekom studija.

Danijelu, na neumornoj pomoći i beskrajnoj ljubavi i podršci.

Filipu i Dajani, na ljubavi i riječima podrške.

Svim mojim najdražim kolegama, hvala na druženjima i prijateljstvu, posebno Zrinki, Ivi, Petri, Tei, Hrvoju i Markiću, bez kojih bi dani bili dulji i dosadniji.

Najveće hvala mojim roditeljima, na ohrabrenjima, razumijevanju, podršci i ljubavi. Ovaj diplomski rad posvećujem upravo njima.

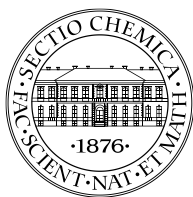
U Zagrebu, 2017. godine

Dora

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Orašasti plodovi.....	1
1.2. Svrha rada	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Orašasti plodovi.....	2
2.1.1. Kemijski sastav	2
2.2. Kemijski elementi u hrani	4
2.2.1. Makroelementi	6
2.2.2. Mikroelementi	7
2.2.3. Toksični elementi u orašastim plodovima.....	8
2.2.4. Preporučeni dnevni unos elemenata (RDA).....	9
2.3. Opis vrsta i stanište	10
2.3.1. Orah (<i>Juglans regia</i> L.).....	10
2.3.2. Badem (<i>Prunus amygdalus</i> Miller).....	11
2.3.3. Lješnjak (<i>Corylus avellana</i> L.)	12
2.3.4. Brazilski oraščić (<i>Bertholletia excelsa</i> Humboldt)	13
2.3.5. Indijski oraščić (<i>Anacardium occidentale</i> L.).....	14
2.4. Metode atomske spektrometrije	15
2.4.1. Metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu.....	16
2.4.2. Primjena metoda atomske spektrometrije za određivanje elemenata u orašastim plodovima	18
2.5. Mikrovalno potpomognuto razaranje uzorka	22
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Kemikalije.....	24
3.2. Opis instrumenata.....	24
3.3. Uzorci	26
3.4. Postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje orašastih plodova.....	26
3.5. Elementna analiza orašastih plodova	27
3.5.1. Priprava kalibracijske krivulje	27
3.5.2. Iskoristivost metode ICP – AES	27
3.5.3. Detekcijske granice metode ICP – AES.....	28
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	29

4.1. Validacija metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova	29
4.1.1. Određivanje detekcijskih granica metode ICP – AES	29
4.1.2. Određivanje točnosti metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova	31
4.1.3. Osjetljivost metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova	33
4.1.4. Preciznost metode ICP – AES za određivanje kemijskih elemenata u orašastim plodovima	33
4.2. Rezultati elementne analize orašastih plodova	33
4.2.1. Orah (<i>Juglans regia</i> L.)	34
4.2.2. Badem (<i>Prunus amygdalus</i> Miller)	35
4.2.3. Lješnjak (<i>Corylus avellana</i> L.)	37
4.2.4. Brazilski oraščić (<i>Bertholletia excelsa</i> Humboldt)	38
4.2.5. Indijski oraščić (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	40
4.2.6. Usporedba rezultata elementne analize orašastih plodova	41
§ 5. ZAKLJUČAK	44
§ 6. INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA I SREDNJOŠKOLSKA NASTAVA KEMIJE	47
6.1. Spektroskopske metode	47
6.2. Atomska spektrometrija	48
6.2.1. Povijest razvoja ICP – AES metode	49
6.3. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu	50
6.3.1. Plazma: što je, kako nastaje i kako djeluje?	51
6.3.2. Prednosti ICP – AES metode	52
6.3.3. Temperatura plazme	53
6.3.4. Elektromagnetska indukcija u induktivno spregnutoj plazmi	55
6.4. Implementacija induktivno spregnute plazme u nastavi kemije	56
6.4.1. Što učenicima znači znanje o induktivno spregnutoj plazmi?	56
6.5. Prijedlog nastavnog sata	57
6.5.1. Što nakon nastavnog sata?	58
6.5.2. Plazma kugla	58
6.5.3. Nastavna strategija za nastavni sat uz plazma kuglu	59
§ 7. DODATAK	61
7.1. Radni listić: „Od Sunca do plazme“	61
§ 8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	66
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXVII
§ 10. LITERATURNI IZVORI	LXIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ELEMENTNA ANALIZA ORAŠASTIH PLODOVA ATOMSKOM SPEKTROMETRIJOM UZ INDUKTIVNO SPREGNUTU PLAZMU

Dora Hlebec

Sadržaj esencijalnih i toksičnih elemenata u orašastim plodovima (orahu, bademu, lješnjaku, brazilskom i indijskom oraščiću) određen je metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu. Uzorci su razoreni u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje, a nakon optimizacije i validacije metode u uzorcima je određen udio Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, V i Zn. Udio K i Na određen je plamenom fotometrijom. Točnost metode određena je na temelju iskoristivosti metode koja iznosi: 95 – 131 % za orah, 94 – 104 % za badem, 69 – 120 % za lješnjak, 80 – 129 % za brazilski oraščić i 89 – 110 % za indijski oraščić. Od makroelemenata u orašastim su plodovima najveći udjeli dobiveni za K i Ca, a od mikroelemenata za Fe, Mg, Mn i Zn. Toksični elementi (Co, Ni, V i Pb) prisutni su ispod detekcijskih granica ($< 0,025 \mu\text{g L}^{-1}$). Rezultati elementne analize su uspoređeni s preporučenim dnevnim unosom elemenata u 100 i 20 g orašastih plodova.

U okviru metodičkog dijela rada prikazan je prijedlog nastavnog sata o plazmi kao fizikalnom fenomenu koji će omogućiti uključivanje ovakvih sadržaja u svakodnevnu nastavnu praksu.

(86 stranica, 22 slike, 9 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ICP – AES metoda, mikro- i makroelementi, orašasti plodovi, izvor plazme

Mentor: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš
3. izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Datum diplomskog ispita: 14. srpnja 2017.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF MICRO- AND MACROELEMENTS IN NUTS BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA ATOMIC SPECTROSCOPY

Dora Hlebec

The content of essential and toxic elements in nuts (walnut, almond, hazelnut, brazil nut, cashew) was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after thorough optimization and validation of the analytical procedure. The samples were digested in a microwave assisted digestion system, and the elements Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, V i Zn were quantified. The concentration of K and Na however, were determined with flame photometry. The accuracy of the ICP-AES method expressed by the recovery determined by spiking experiments for micro- and macroelements ranged from 95 – 131 % for walnut, from 94 – 104 % for almond, from 69 – 120 % for hazelnut, from 80 – 129 % for brazil nut and from 89 – 110 % for cashew. The highest concentration among macroelements have been found for K and Ca and among microelements Fe, Mg, Mn i Zn. The toxic elements (Co, Ni, V i Pb) were present in concentrations below LOD ($< 28 \mu\text{g g}^{-1}$). Based on the results obtained, the intake of essential elements consuming 100 and 20 gram of nuts per day was calculated and compared with their recommended daily intake. In the second part of this thesis one of the possible modern approaches in teaching chemistry for presenting plasma as physical phenomenon has been elaborated.

(86 pages, 22 figures, 9 tables, 89 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ICP – AES method, micro- and macroelements, nuts, plasma source

Mentor: dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
dr. sc. Nenad Judaš, Associate Professor

Reviewers:

1. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
 2. dr. sc. Nenad Judaš, Associate Professor
 3. dr. sc. Ines Radanović, Associate Professor
- Substitute: dr. sc. Jasna Lajtner, Associate Professor

Date of exam: 14 July 2017.

Dora Hlebec

Diplomski rad

§ 1. UVOD

1.1. Orašasti plodovi

Orašasti su plodovi zbog visokog sadržaja ulja cijenjeni još od povijesnih vremena. U prehrani su važan izvor nutrijenata i energije jer sadrže veliki udio proteina, vitamina, vlakana i minerala.¹ Sadrže i znatan udio nezasićenih masnih kiselina, pa stoga pozitivno utječu na regulaciju krvnog tlaka, metabolizam glukoze i sprječavaju agregaciju trombocita, te promjene eritrocita.^{2,3}

U manjem, ali ne i manje važnom udjelu, orašasti plodovi sadrže antioksidanse kojima stabiliziraju lipidne membrane, pomažu jačanju kože, kose i noktiju, te doprinose boljem pamćenju i koncentraciji.

Orašasti su plodovi važan izvor esencijalnih elemenata (B, Se, Cu, Zn, Fe i Mn).^{4,5}

Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi, orašasti se plodovi sve češće svakodnevno koriste kao dodatak hrani (osobito u mediteranskoj prehrani) ili kao grickalica. Da bi se kao takvi mogli koristiti u prehrani prije same uporabe moraju zadovoljiti niz kriterija kvalitete, pa se u tu svrhu provode istraživanja određivanja svojstava i sastava orašastih plodova.⁶

1.2. Svrha rada

Analiza elementnog sastava orašastih plodova kao hrane koristi se u svrhu određivanja nutritivnih vrijednosti, za toksikološku analizu (utvrđivanje kontaminacije teškim metalima uslijed rukovanja, pakiranja i transporta hrane), za ekološke studije (procjenu zagađenosti okoliša) i proučavanje autentičnosti podrijetla.^{3,7}

Za elementnu analizu orašastih plodova korištene su metode atomske spektrometrije. Metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP – AES) u ovom je radu određen sadržaj kemijskih elemenata: Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, V i Zn, a metodom plamene fotometrije K i Na. Prije same analize uzorci su razoreni u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje uz dodatak dušične kiseline i vodikovog peroksida. Dobiveni rezultati uspoređeni su s preporučenim dnevnim unosom pojedinih nutrijenata, te literaturnim podacima iz do sada provedenih istraživanja.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Orašasti plodovi

2.1.1. Kemijski sastav

Općenito je poznato da prehrana koja uključuje orašaste plodove zbog velikog udjela nezasićenih masnih kiselina, proteina, vitamina, minerala i prehrambenih vlakana pozitivno djeluje na zdravlje ljudi. Orašasti se plodovi smatraju važnom i korisnom hranom, a djelovanja i učinci se intenzivno proučavaju jer složeni kemijski sastav i svi mehanizmi djelovanja nisu još u potpunosti razjašnjeni. Kemijski sastav orašastih plodova uvelike se razlikuje od vrste do vrste ovisno o botaničkoj pripadnosti, genetskim obilježjima, sezoni žetve, podrijetlu, stupnju zrelosti, načinu i području uzgoja od kojih su najvažnije značajke klima i sastav tla.⁸

Za elementnu analizu u ovom su istraživanju korišteni uzorci orašastih plodova koji se najčešće konzumiraju: orah (*Juglans regia* L.), badem (*Prunus amygdalus* Miller), lješnjak (*Corylus avellana* L.), brazilski oraščić (*Bertholletia excelsa* Humboldt) i indijski oraščić (*Anacardium occidentale* L.) (slika 1), pa je u literaturnom pregledu dan sažetak dosadašnjih istraživanja njihovog elementnog sastava.





Slika 1. Orašasti plodovi na kojima je provedeno određivanje mikro- i makroelemenata (orah, badem, lješnjak, brazilski oraščić, indijski oraščić)⁹

Prema literaturnim podacima, najviše istraživanja kemijskog sastava orašastih plodova provedeno je na orahu (*Juglans regia* L.), kao najpoznatijem i najčešće korištenom orašastom plodu, po kojem je i cijela skupina plodova dobila ime. Primjerice, Lorgeter i suradnici navode da 100 g oraha ima energetska vrijednost 654 kcal i sadrži: masti (65,2 g), proteine (15,2 g), vlakna (6,7 g), fosfor (346 mg), kalij (441 mg), folat (98 µg) i vitamin E (2,9 mg).¹⁰

Uz orah, istraživanja kemijskog sastava provedena su i na drugim orašastim plodovima kao što su: badem (*Prunus amygdalus* Miller), lješnjak (*Corylus avellana* L.), pistacija (*Pistacia vera* L.), kesten (*Castanea sativa* Miller), ali i mnogim drugim vrstama koje prirodno ne rastu na našem podneblju poput brazilskog oraščića (*Bertholletia excelsa* Humboldt) i indijskog oraščića (*Anacardium occidentale* L.).

Većina analiza kemijskog sastava orašastih plodova uključuje određivanje sadržaja važnih organskih biomolekula, pri čemu se prije kvantifikacije molekule najčešće odvajaju kromatografskim metodama. Metodom plinske kromatografije dokazano je da orašasti plodovi sadrže veliki udio ulja (62,5 % – 70,3 %), proteina (13,6 % – 18,1 %), mononezasićenih masnih kiselina (uz najveći udio oleinske kiseline 15,9 % – 23,7 %) i polinezasićenih masnih kiselina (linolna kiselina 57,2 % – 65,1 % i linolenska kiselina 9,1 % – 13,6 %) kojih ima najviše od svih masnih kiselina s udjelom od 80 %.

Mononezasićene i polinezasićene masne kiseline smanjuju udio kolesterola što je potvrđeno rezultatima istraživanja kojeg su proveli Sabate i suradnici pri čemu dnevni unos od 67 g orašastih plodova smanjuje ukupni kolesterol za 5 %, LDL – kolesterol za 7 %, a udio triglicerida za 10 %.¹¹ Važan sastojak orašastih plodova su i biljna vlakna (4,2 % – 5,2 %), steroli (uz beta-sitosterol i kampesterol kao najzastupljenije)¹², vitamini E i B₂, riboflavin i esencijalni kemijski elementi.¹³

Antioksidansi vezanjem i reduciranjem štetnih slobodnih radikala sprječavaju pojavu oksidativnog stresa koji rezultira oštećenjem stanica i tkiva u organizmu.¹⁴ Važna antioksidativna svojstva tanina i srodnih polifenola izoliranih iz orašastih plodova dokazali su Fukuda i suradnici metodama tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i metodom nuklearne magnetske rezonancije (NMR).¹⁵ Od polifenolnih spojeva u najvećem udjelu su prisutni flavonoidi (54,8 % – 62,9 %)¹⁶, od kojih je najpoznatiji kvercetin čija je uloga zaštita DNA u limfocitima od kemijskog djelovanja i povećanje antioksidativnog kapaciteta krvne plazme.¹⁷

Pozitivni utjecaj orašastih plodova na srce i krvožilni sustav objašnjava se prisutnošću vitamina iz skupine tokoferola koji induciraju inhibiciju oksidacije LDL.¹⁸ Metodom HPLC određene su visoke koncentracije tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) i drugih fenolnih spojeva, pri čemu su dobivene izrazite razlike u sadržaju za pojedine vrste orašastih plodova. Primjerice, veliki udio tokoferola izmjeren je u lješnjakovom ulju (33,1 mg 100 g⁻¹), dok u makadamijskom oraščiću prisutnost tokoferola nije određena.¹⁹

Orašasti plodovi poboljšavaju osjetljivost na inzulin, čime se utječe na kontrolu koncentracije glukoze u krvi i sprječava nastanak dijabetesa, pa se konzumacija orašastih plodova preporuča osobama s rezistencijom na inzulin (oboljelima od šećerne bolesti tipa 2).^{20,21}

2.2. Kemijski elementi u hrani

Zajedno s vitaminima, masnim kiselinama i aminokiselinama pojedini kemijski elementi pripadaju skupini esencijalnih nutrijenata. Esencijalne tvari tijelo ne može samostalno sintetizirati, već je za fiziološke funkcije i održavanje zdravlja potreban njihov redovit i umjeren unos prehranom.

Osim vode, koja je prijeko potrebna za održavanje homeostaze, veliki broj kemijskih elemenata izravno sudjeluje u biokemijskim procesima, u strukturnim ili funkcionalnim ulogama poput uloge elektrolita, a također djeluju i na fiziološke funkcije tkiva i organa.²²

Ljudskom je organizmu za normalan rast i razvoj potrebno tridesetak različitih kemijskih elemenata, od čega ih je 16 esencijalnih. Kemijski elementi koji sudjeluju u izgradnji tijela i koji su ljudskom organizmu potrebni u količinama iznad 100 mg nazivaju se makroelementima. Elementi koji se nazivaju mikroelementima ili elementima u tragovima, u organizmu su potrebni u količinama manjim od 100 mg, a sudjeluju u brojnim metaboličkim procesima,²³ te strukturnoj i funkcionalnoj izgradnji najvažnijih proteina u stanicama.²⁴

Način djelovanja kemijskih elemenata povezan je s njihovom količinom u organizmu. Prema udjelu elementi se dijele na makro- i mikroelemente, pri čemu je potrebno napomenuti da iako su većina njih esencijalni elementi, u prekomjernoj količini i pri dugotrajnoj izloženosti mogu postati i toksični (tablica 1). Toksičnost elemenata također ovisi i o samom organizmu kao i njegovoj spremnosti da se obrani od štetnog utjecaja.

Tablica 1. Podjela elemenata na makroelemente i mikroelemente^{25,26}

Makroelementi	Mikroelementi		
Esencijalni	Esencijalni		Potencijalno toksični
Na	Fe	Mo	Pb
K	I	Co	Hg
Mg	Cu	Cr	Al
Ca	Zn	Ni	As
Cl	F	Si	Sn
P	Se	B	Cd
S	Mn		Li

Istraživanja su potvrdila kako se elementni sastav orašastih plodova razlikuje između pojedinih vrsta, ali i unutar iste vrste između različitih varijeteta.^{8,11,12} Također, sezona berbe, geografsko područje rasta i sastav tla jako utječu na kemijski sastav orašastih plodova.^{12,27}

Od makroelemenata u orašastim plodovima najveći udio imaju kalij, fosfor, magnezij, sumpor i kalcij (98,2 %), dok od mikroelemenata prevladavaju cink, bakar i željezo, mikroelementi koji su esencijalni i imaju važnu ulogu u metabolizmu.^{4,28}

2.2.1. Makroelementi

Kalij (K) je glavni nositelj pozitivnog naboja u unutarstaničnim prostorima. Utječe na stanični membranski potencijal važan za rad živčanog, mišićnog i srčanog tkiva, sudjeluje u radu natrij/kalij pumpe, te djeluje na izlučivanje i aktiviranje hormona. Također, važan je i pri održavanju kiselinsko-bazične ravnoteže, krvnog tlaka, u metabolizmu glukoze i inzulina, a bitnu ulogu ima i u ravnoteži tekućina i elektrolita. Preniska dugotrajna koncentracija kalija u plazmi, uzrokovana učestalim mokrenjem ili nepravilnom prehranom, može rezultirati prestankom rada srca, mišićnom slabošću, otkazivanjem bubrega²⁹ i razvojem plućnih ili neuroloških bolesti.³⁰

Udio kalija u indijskom orašiću iznosi $650 \pm 100 \mu\text{g g}^{-1}$, a u orahu 4627 mg kg^{-1} .^{4,31}

Natrij (Na) je važan za održavanje volumena izvanstanične tekućine, osmolarnosti, krvnog tlaka, kiselinsko-bazične ravnoteže, stvaranje transmembranskog elektrokemijskog gradijenta, prijenos živčanih impulsa i mišićnu kontrakciju. Hiponatrijemija je najčešća posljedica poremećaja u sastavu elektrolita u ljudskom organizmu, a obično nastaje zbog dehidracije ili metaboličke acidoze. Preveliki unos natrija izaziva hipernatrijemiju pri čemu dolazi do povećanja krvnog tlaka i oštećenja bubrega.³² Za razliku od ostalih makroelemenata natrij je prisutan u manjem udjelu u ukupnom elementnom sastavu oraha. Udio u orahu iznosi 45 mg kg^{-1} .³¹

Kalcij (Ca) je najzastupljeniji element u ljudskom tijelu (ima ga čak 1,5 – 2,0 % ukupne težine tijela). Najveći udio od 99 % kalcija nalazi se u kostima i zubima, a 1 % u izvanstaničnoj i unutarstaničnoj tekućini, te u staničnim membranama.³³ Važan je za regulaciju enzima i hormona, zgrušavanje krvi, prijenos živčanih impulsa, kontrakciju i opuštanje mišića, te izlučivanje žlijezda. Za apsorpciju kalcija potreban je vitamin D.³⁴ Udio kalcija u orahu iznosi 1109 mg kg^{-1} , što ga čini drugim najzastupljenijim elementom u orahu.³¹

Magnezij (Mg) je drugi po redu najzastupljeniji kation u unutarstaničnoj tekućini, a četvrti element u ljudskom tijelu. Sudjeluje u velikom broju katalitičkih reakcija s enzimima, te u metabolizmu ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Magnezija u orahu ima u podjednakom udjelu kao i kalcija (1090 mg kg^{-1}).³¹

2.2.2. Mikroelementi

Cink (Zn) sudjeluje u katalitičkim reakcijama preko 300 enzima, pri izgradnji proteina i membrana, u reakcijama hormona i receptora i u ekspresiji gena. Neophodan je za normalan rast i razvoj, sintezu DNA, aktivnost neurona, imunitet i osjetilne funkcije (osjet okusa i mirisa).^{35,36} U previsokim koncentracijama je toksičan i uzrokuje umor, te nedostatak koordinacije pri pokretanju mišića, dok kod nižih kralježnjaka može uzrokovati i smrt. U istraživanju provedenom 2009. godine 1 kg oraha sadržavao je 26,4 mg cinka.³¹

Bakar (Cu) je potreban za rast organizma, rad imunološkog sustava, čvrste kosti, sazrijevanje crvenih i bijelih krvnih stanica, transport željeza i razvoj mozga, a u mitohondriju je dio citokrom c oksidaze, proteina koji sudjeluje u procesu oksidativne fosforilacije.³⁷ Udio bakra u orahu iznosio je ($3,8 \text{ mg kg}^{-1}$),³¹ a u brazilskom orašiću $22 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Željezo (Fe) sudjeluje u transportu kisika (izgrađuje hemoglobin i mioglobin), oksidativnoj fosforilaciji, metabolizmu neurotransmitera i sintezi DNA.³⁸ Osnovni pokazatelj nedostatka željeza je anemija, a pri nakupljanju željeza, u tijelu nastaje stanje hemokromatoze tijekom koje dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji uništavaju stanice i tkiva.³⁷ Udio željeza u orahu iznosi ($32,4 \text{ mg kg}^{-1}$),³¹ a u indijskom orašiću $66 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Mangan (Mn) je kofaktor za veliki broj enzima različitih funkcija (oksidoreduktaza, transferaza, izomeraza, ligaza i sl.). Važnu ulogu ima u sintezi proteina i genetskog materijala, regulaciji iskorištavanja šećera za dobivanje energije, u održavanju normalnog rada živčanog sustava, djelovanju hormona, te pomaže pri zgrušavanju krvi. U istraživanju kojeg su proveli Rodushkin i suradnici najveći udio mangana je u lješnjaku $58 \mu\text{g g}^{-1}$, a najmanji u brazilskom orašiću $13 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Krom (Cr) ima važnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata i masti, pojačava djelovanje inzulina, čime pridonosi očuvanju stabilne koncentracije glukoze. Snižava udio kolesterola (LDL) čime se smanjuje rizik od nastanka bolesti krvožilnog sustava i srca, a bolje iskorištavanje kroma u tijelu omogućava djelovanje vitamina C. Najveći udio kroma imaju brazilski oraščić (16 ng g⁻¹) i indijski oraščić (12 ng g⁻¹), dok su orasi (1,3 ng g⁻¹) najsiromašniji kromom.⁴ Cabrera i suradnici najveći su udio kroma zabilježili u bademu (0,39 μg g⁻¹), dok je najmanji udio određen u indijskom oraščiću (0,25 μg g⁻¹).²⁸

2.2.3. Toksični elementi u orašastim plodovima

Toksični elementi u ljudskom organizmu mogu uzrokovati kronično trovanje, a u iznimnim slučajevima i smrt. Do kontaminacije hrane toksičnim elementima može doći na različite načine, primjerice tijekom rukovanja hranom, prilikom transporta i pakiranja, ili pak uzgojem na onečišćenom tlu ili zraku, te u dodiru s zagađenom vodom. Radi zaštite zdravlja postoji potreba za sve češćom kontrolom kvalitete hrane i određivanjem koncentracije toksičnih elemenata kao što su olovo, kadmij i živa, te prema potrebi arsen, srebro i aluminij.⁴

Olovo je neurotoksin koji se nakuplja u mekim tkivima i kostima, pri čemu oštećuje živčani sustav i uzrokuje poremećaje u radu mozga. Olovo razgrađuje mijelinsku ovojnica neurona, smanjuje njihov broj i usporava njihov rast.³⁹ U istraživanju kojeg su proveli Cabrera i suradnici najveći udio olova sadrži lješnjak (0,30 μg g⁻¹), a najmanji indijski oraščić (0,20 μg g⁻¹)²⁸, dok je Rodushkin sa suradnicima najveći udio olova odredio kod lješnjaka (7,3 ng g⁻¹), a najmanji kod oraha (0,25 ng g⁻¹).⁴

Kadmij (Cd) je jedan od najotrovnijih kemijskih elemenata za čovjeka jer remeti sintezu nukleinskih kiselina, proces oksidativne fosforilacije i inhibira brojne enzime.⁴⁰ Dugotrajno se zadržava u ljudskom organizmu, a glavna oštećenja uzrokuje na bubregu gdje se najviše nakuplja.⁴¹ Kadmij je u najvećem udjelu prisutan u lješnjaku (10 ng g⁻¹), dok u brazilskom oraščiću udio iznosi 0,52 ng g⁻¹.⁴ Najveći udio kadmija u istraživanju Cabrere i suradnika određen je također u lješnjaku (0,004 μg g⁻¹), dok je u ostalim orašastim plodovima udio bio ispod granice detekcije.²⁸

2.2.4. Preporučeni dnevni unos elemenata (RDA)

Zbog sve češće potrebe za kontrolom kvalitete, praćenja koncentracije toksičnih elemenata, esencijalnih mikro- i makroelemenata i vitamina, te otkrivanja utjecaja istih na organizam, brojne institucije daju preporuke za količinu dnevnog unosa pojedinog kemijskog elementa. Preporučeni dnevni unos kemijskih elemenata predložile su Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *The World Health Organization, WHO*) i Američka agencija za hranu (engl. *The US Food and Drug Administration*). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je na temelju brojnih znanstvenih istraživanja uz preporuke opisala i utjecaj kemijskih elemenata na zdravlje.²³

Američka agencija za hranu u Sjedinjenim Američkim Državama od 1941. propisuje preporučeni dnevni unos (engl. *Recommended Dietary Allowances, RDA*), čija vrijednost predstavlja prosječni dnevni unos nekog vitamina ili kemijskog elementa koji je potreban za zadovoljavanje količine tog nutrijenta kod gotovo svih (97 % – 98 %) zdravih ljudi određene dobi i spola. Preporučeni dnevni unosi pojedinih kemijskih elemenata navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Preporučeni dnevni unos (RDA) pojedinih kemijskih elemenata⁴³

Element	RDA / mg	Element	RDA / mg
Ca	1000	Mg	420
Cl	2300	Se	0,055
Cr	0,035	Na	1500
Cu	0,9	Mo	0,045
Fe	13	Zn	10
K	4700	Mn	2,3
P	700		

Kada za preporuku RDA vrijednosti nema dovoljno poznatih rezultata, utvrđuje se adekvatan unos (engl. *Adequate Intake, AI*) koji je mjerilo adekvatnosti prehrane. Također, definiran je i maksimalni dnevni unos koji najvjerojatnije nema štetnih učinaka na zdravlje (engl. *Tolerable Upper Intake Level, UL*).

Danas se osim RDA vrijednosti koristi i DRI vrijednost (engl. *Daily Reference Intakes, DRI*) koja se definira pomoću adekvatnog unosa (AI), procjene prosječne potrebe (EAR), preporučenog dnevnog unosa (RDA) i maksimalnog dnevnog unosa (UL).^{42,43}

Sve se vrijednosti periodično mijenjaju u skladu s rezultatima najnovijih istraživanja, a količina unosa se izražava u internacionalnim jedinicama (i.j.) ili u miligramima (mg) odnosno za mikroelemente u mikrogramima (μg).²³ Od 1994. godine (NN 46/1994) RDA vrijednosti primjenjuju se i u Hrvatskoj.

2.3. Opis vrsta i stanište

2.3.1. Orah (*Juglans regia* L.)

Obični je orah (*Juglans regia* L.) listopadno stablo iz istoimene porodice oraha Juglandaceae, roda *Juglans* koji obuhvaća 21 vrstu. Prirodno raste na području središnje i Male Azije, te je poznat pod nazivom perzijski orah. U Europi se uzgaja kao jestiva biljka ili rjeđe ukrasna vrsta u parkovima. Orah cvate u travnju i svibnju, a oprašivanje se vrši pomoću vjetra. Izuzetno je osjetljiv na niske temperature i mraz. Poznat je po alelopatskom djelovanju i kemijskoj tvari juglon (5-hidroksi-1,4-naftalendion), kojom lučeći je u tlo odbija druge biljke i na taj način smanjuje kompeticiju za životni prostor i hranjive tvari u tlu.^{44,45}

Plod je okruglasta koštunica veličine 3-5 cm koja dozrijeva u rujnu. (slika 2.)



Slika 2. Plod oraha (*Juglans regia* L.)^{46,47}

Sazrijevanjem koštunica postaje smeđa i puca, a u unutrašnjosti sadržava jezgru koja je najčešće podijeljena na dvije polutke. Jezgra oraha na površini sadržava smeđkasti ovoj koji sadrži antioksidanse i štiti sjemenke bogate uljima od reakcije s atmosferskim kisikom.⁴⁴

Jezgra oraha sadržava 3 % vode, 15 % proteina, 65 % masti, 14 % ugljikohidrata, uključujući 7 % vlakana. 100 g oraha ima nutritivnu vrijednost od 576 kcal, te u najvećoj mjeri zadovoljava preporučeni dnevni unos mangana (163 %) i vitamina B₆ (41 %). Plinskom kromatografijom određeni su udjeli viših masnih kiselina: palmitinska (6,4 %), oleinska (13,4 %), linolna (55,3 %) i linolenska kiselina (8,7 %).³¹

Kako su orasi bogati mastima njihovom se uporabom utječe na lipide u krvi, smanjenje kolesterola i lipoproteina. Takvo djelovanje ima pozitivan utjecaj na smanjenje učestalosti pojave bolesti krvožilnog sustava i srca, te upala.^{31,12} Veliko nutritivno bogatstvo oraha čini prisutstvo kinona, ulja i tanina, te značajan udio kalija, fosfora, magnezija i željeza.¹² Osim plodova iskorištavaju se i listovi ubrani u proljeće, bogati treslovinama i juglonom, te se iz tog razloga koriste protiv gljivica i parazita, te kod infekcija probavnog sustava.⁴⁴

2.3.2. Badem (*Prunus amygdalus* Miller)

Badem je drvenasta biljka iz porodice ruža (Rosaceae), koja doseže visinu do 9 metara. Potječe s područja Bliskog Istoka gdje se uzgajao još u starom vijeku. U Hrvatskoj se pretežno uzgaja u primorskom području, dok se u kontinentalnim predjelima mogu pronaći kasno cvjetajuće sorte. Vanjski ovoj (egzokarp) ploda je kožasta kapsula, unutar koje se nalazi tvrda ljuska (endokarp). Unutar endokarpa se nalazi jestivi plod (slika 3).⁴⁸



Slika 3. Plod slatkog badema (*Amygdalus prunus*)^{49,50}

Obje osnovne podvrste gorki badem (*Amygdalus amarus*) i slatki badem (*Amygdalus prunus*) imaju vrlo široko primjenu. Sjeme gorkog badema (kraće je i šire) sadrži heterozid amigdalozid, te manje šećera i ulja od sjemena slatkog badema. Njegovim se žvakanjem osjeća miris cijanovodične kiseline i benzaldehida. Kako gorki bademi mogu dati 4 – 9 mg vodikovog cijanida po bademu nužno je da se cijanid ukloni iz ekstrakta prije same uporabe, u protivnom ima toksično djelovanje.⁵¹ Koristi se za smirivanje bolova živaca, dok se protiv groznice, bolesti želuca i crijeva koristi „mlijeko“ gorkog badema.

Slatki se badem danas sve više konzumira kao grickalica ili dodatak prehrani zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina (51 g u 100 g), bjelančevina (16 g), vlakana, riboflavina, fitosterola, polifenola, kalija, kalcija, fosfora, cinka, željeza i vitamina E, B₁, i B₂.⁴⁸ 100 g badema ima energetska vrijednost od 576 kcal.

Sa svojim biokomponentama različitog kemijskog sastava, badem pozitivno djeluje na organizam, posebice na smanjenje razine kolesterola u krvi, no unatoč tome može izazvati alergijsku reakciju s gastrointestinalnim i respiratornim simptomima, pa je potreban oprez kod prve konzumacije.⁵²

2.3.3. Lješnjak (*Corylus avellana* L.)

Za razliku od mnogih vrsta koje cvatu u proljeće lijeska (lješnjak) cvate od prosinca do ožujka. Sredozemna je i izrazito heliofitna biljka. Divlje vrste lijeske rastu u kontinentalnom dijelu Hrvatske, uglavnom na rubovima šuma i blago povišenim terenima, te siromašnim tlima. Sorte lijeske koje se uzgajaju zbog dobrih karakteristika plodova stvaraju ih samo na pogodnim tlima (umjereno vlažno tlo, osrednje duboko, humozno, sa pH vrijednošću 5,0 – 8,0).

Plodovi su zreli kada promjene boju i kada lako ispadaju iz čvrstog omotača, što je obično krajem kolovoza i rujna (slika 4).

Prilikom berbe plodovi imaju oko 30 – 35 % vode, pa slijedi sušenje kojim se udio vode smanjuje na uobičajenih 10 %.⁵³

Slika 4. Plod lijeske (lješnjak)^{54,55}

100 g lješnjaka sadržava 628 kcal, a bogat su izvor proteina (15 g), vlakana (9,7 g), vitamina E (15 mg) i B₁ (0,643 mg), fosfora, mangana i magnezija od čega svi navedeni nutrijenti zadovoljavaju barem 30 % preporučenog dnevnog unosa. Od viših masnih kiselina prevladava oleinska kiselina (75 %), linolenska kiselina (13 %), dok palmitinska i stearinska kiselina zajedno čine 7 % masenog udjela.^{56,57}

Lješnjaci smanjenjem koncentracije LDL kolesterola, utječu na povećanje HDL kolesterola čime se smanjuje mogućnost upala u organizmu, rizik od dijabetesa,⁵⁸ dok vitamin E ima važnu ulogu u prevenciji i liječenju od Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.^{59,60}

2.3.4. *Brazilski oraščić (Bertholletia excelsa Humboldt)*

Prirodno stanište brazilskog oraščića je Južna Amerika, a pripada u porodicu Lecythidaceae. Visoko je listopadno stablo koje doseže visinu od 50 metara, promjera 1 do 2 metra, što ga čini jednim od najvećih stabala amazonske kišne šume. Za rast i sazrijevanje ploda potrebno je 14 mjeseci od oprašivanja. Sam plod je velika kapsula promjera 10 – 15 cm i težine do 2 kilograma. Ima tvrdnu, drvenu ljusku koja sadrži 8 – 24 trokutastih sjemenki dužine 4 – 5 cm. Kapsula sadrži malu rupu na jednom kraju, koja glodavcima koji žive na tom staništu omogućava razbijanje (slika 5).⁶¹



Slika 5. Plod brazilskog oraščića^{62,63}

100 g brazilskog oraščića sadržava 14 % proteina, 12 % ugljikohidrata i 656 kcal čemu ponajviše doprinosi udio masnih kiselina od 66 % (23 % zasićenih, 38 % mononezasićenih i 32 % polinezasićenih masnih kiselina). Također, brazilski je oraščić bogat vitaminom B₁ (54 % RDA), vitaminom E (38 % RDA), magnezijem i fosforom (preko 100 % RDA), a smatra se i najbogatijim izvorom selena u ljudskoj prehrani (unosom 2 brazilska oraščića u organizam se unosi više od 100 % RDA selena).⁶⁴ Selen ima pozitivne utjecaje na ljudsko tijelo, od poboljšavanja raspoloženja⁶⁵ do sprječavanja upala zbog visokog udjela elagične kiseline koja posebice štiti živčani sustav.⁶⁶ Također, pogoduje zdravlju kostiju i regulaciji razine tiroidnog hormona u organizmu.⁶⁷

2.3.5. Indijski oraščić (*Anacardium occidentale* L.)

Indijski je oraščić tropsko zimzeleno stablo, čije je prirodno stanište područje sjeverno od Brazila, a kasnije su mu staništa postala područja jugoistočne Azije i Afrike. Plod se sastoji od oraščića, koji se konzumira samostalno ili se prerađuje u sir ili maslac, ovoja oraščića koji se koristi kao mazivo, u proizvodnji boja i oružja, te mesnate „jabuke“ čija se pulpa može preraditi u voćno piće (slika 6). Ovoj oraščića sadrži uljne spojeve (fenolne lipide i anakardinsku kiselinu) koji mogu uzrokovati dermatitis, pa se indijski oraščići potrošačima prodaju bez ovoja.⁶⁸



Slika 6. Plod indijskog oraščića (*Anacardium occidentale*)^{69,70}

Alergijska reakcija na indijske oraščiće zabilježena je kod 5 % svjetskog stanovništva, a zbog prisutnih topljivih oksalata umjereno konzumiranje preporuča se osobama sklonim nastajanju bubrežnih kamenaca.⁷¹

100 g indijskih oraščića sadrži 553 kalorije, a prema preporučenim dnevnim unosima 67 % masti, 36 % proteina, 13 % vlakana i 11 % ugljikohidrata. Bogat su izvor kemijskih elemenata, posebice bakra, mangana, fosfora i magnezija, te vitamina B₁, B₆ i K. U značajnom udjelu prisutni su i željezo, kalij, cink i selen. Sa svim prisutnim sastojcima indijski oraščić pogoduje normalnom radu srca i mozga, potiče probavu i apsorpciju hranjivih tvari, sprječava nastajanje dijabetesa i žučnih kamenaca, te pomaže pri mršavljenju.⁷²

2.4. Metode atomske spektrometrije

Za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 kemijskih elemenata (makro i mikroelemenata, toksičnih metala i radioaktivnih elemenata) u realnim biološkim uzorcima koriste se metode atomske spektrometrije. Primjenjuju se u području agronomije i kontrole hrane, pri analizi bioloških, kliničkih i geoloških uzoraka, okolišnih studija, pri kontroli vode i zraka, u petrokemijskoj industriji (analiza benzina i mazivih ulja) te pri proučavanju i kontroli materijala.

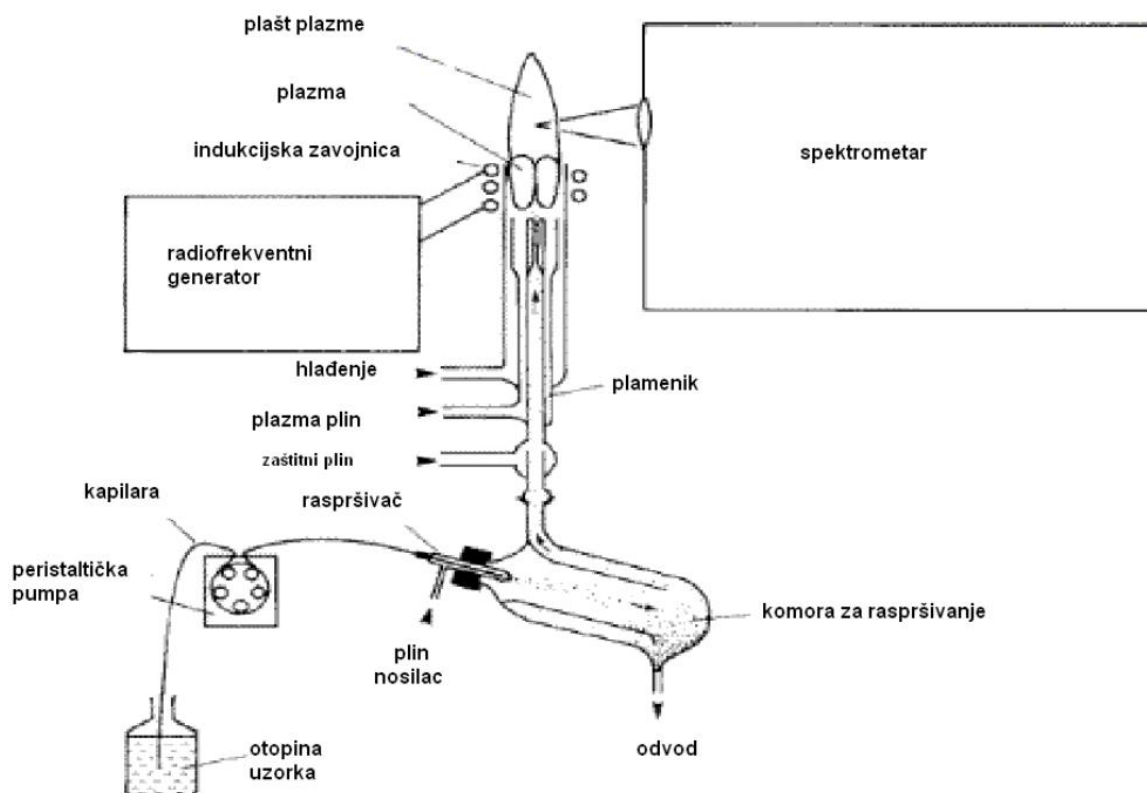
Za multielementnu analizu najčešće se koriste atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP – AES) i metoda spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP – MS). Osim navedenih metoda, za elementnu analizu koriste se metode atomske apsorpcijske spektrometrije s plamenom kao izvorom (engl. *Flame atomic absorption spectroscopy*, FAAS) ili grafitna tehnika atomske apsorpcijske spektrometrije (engl. *Graphite furnace atomic absorption spectroscopy*, GFAAS).

2.4.1. Metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu

U okviru ovog diplomskog rada korištena je metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP – AES) pa je u nastavku Literaturnog pregleda detaljnije opisana sama metoda i njena primjena za orašaste plodove. Metoda ICP – AES je jedna od najvažnijih instrumentnih metoda za kvantitativno simultano određivanje elemenata u različitim realnim uzorcima.

Osnovno načelo atomske emisijske spektrometrije je atomiziranje uzorka tijekom kojeg nastaju pobuđeni atomi nakon čega slijedi mjerenje emisije zračenja točno određene valne duljine (u rasponu od 160 – 900 nm). Osjetljivost takvih metoda je izrazito velika (ppm i ppb), a najvažnije prednosti su brzina, prikladnost i visoka selektivnost.

Eksitacijski izvor u metodi ICP – AES je plazma, visoko ionizirani inertan plin koji sadrži znatnu količinu elektrona i kationa. Argon se najčešće koristi za dobivanje plazme jer njegovi ioni mogu apsorbirati dovoljno energije iz vanjskog izvora za održavanje potrebne temperature. Plazma se često naziva „četvrtim agregacijskim stanjem“, čini 99 % materije u svemiru, a temperatura joj iznosi 6000 – 10000 K.⁷³ Glavni dijelovi izvora plazme su plazma plamenik (sastoji se od 3 koncentrične kvarcne cijevi s različitim brzinama protoka argona), indukcijska zavojnica (2 – 5 namotaja bakrene cijevi), sustav za regulaciju protoka argona i radiofrekventni generator. (slika 7)

Slika 7. Shematski prikaz ICP spektrometra⁷⁴

Osim izvora plazme dijelovi instrumenta ICP – AES su sustav za uvođenje uzorka pomoću peristaltičke pumpe, sustav za sagorijevanje i spektrometar.

Metoda ICP – AES omogućava odabir jedne ili manjeg broja specifičnih valnih duljina za pojedini kemijski element, a intenzitet emitirane energije proporcionalan je koncentraciji određivanog kemijskog elementa u uzorku. Na temelju odabira valnih duljina analiziranog elementa i vrijednosti intenziteta dobiva se kvantitativni i kvalitativni elementni sastav uzorka.

Prednosti metode ICP – AES su brza i simultana kvantitativna analiza kemijskih elemenata u tragovima, mala količina uzorka (obično 2 – 5 mL vodene otopine koja se uvodi u instrument kao aerosol), velika osjetljivost, niske detekcijske granice, zanemariv utjecaj matrice, te dobra preciznost i točnost. Nedostaci metode su velika ovisnost signala o parametrima plazme, te nemogućnost analize izrazito malih volumena otopine.

2.4.2. Primjena metoda atomske spektrometrije za određivanje elemenata u orašastim plodovima

Prema literaturnim podacima provedena su brojna istraživanja kemijskog sastava orašastih plodova u svrhu pojašnjenja pozitivnog djelovanja njihovih sastojaka na organizam.

Elementna analiza provodi se zbog provjere autentičnosti i ispravnosti proizvoda koji su potrošačima dostupni tijekom svakodnevne konzumacije. Toksikološke analize pojedinih vrsta orašastih plodova sa različitih staništa provedene su s ciljem utvrđivanja prisutnosti toksičnih metala zbog onečišćenja i kontaminacije.

Za elementnu analizu orašastih plodova koriste se različite metode atomske spektrometrije. Osim primjene metode ICP – AES,^{4,31} Cosmolescu i suradnici su u orašastim plodovima metodom FAAS odredili udio K,¹² a Cabrera i suradnici elektrotermalnom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (ETAAS) udio Cu, Cr, Fe, Zn, Al, Ni, Pb i Cd.²⁸ Se je kvantitativno određen plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa kao detektorom (engl. *Gas chromatography–mass spectrometry*, GC – MS), dok je P određen kolorimetrijskom metodom.⁸

Prema literaturnim podacima najviše je rezultata za određivanje udjela mikro- i makroelemenata metodama atomske spektrometrije dobiveno za orah (*Juglans regia* L).

Özcan je metodom ICP – AES odredio elementni sastav oraaha s područja Turske, a plinskom kromatografijom udio masnih kiselina. Od makroelemenata prisutni su u najvećem udjelu K (4627 mg kg⁻¹), P (3621 mg kg⁻¹), Ca (1108 mg kg⁻¹) i Mg (1089 mg g⁻¹). U značajnom udjelu prisutni su u orahu i mikroelementi B (58,8 mg kg⁻¹), Fe (32,4 mg kg⁻¹), Mn (46,3 mg kg⁻¹) i Zn (26,4 mg kg⁻¹). Udio toksičnog Pb je ispod detekcijskih granica, a udio Al je 5,8 mg kg⁻¹ i Ni 2,4 mg kg⁻¹. Rezultati su prikazani u tablici 3.³¹

Tablica 3. Srednje vrijednosti elementne analize oraha (*Juglans regia*)

Literatura	Özcan (2009) ³¹	Ossai (2015) ⁷⁵
Elementi	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
Na	44,7	75,12
K	4627,6	3110,3
Ca	1108,6	910,25
Mg	1089,9	1164,4
Zn	26,4	19,36
Pb	-	< LOD
Cr	8,9	< LOD
Se	15,7	< LOD
Mn	46,3	< LOD
Fe	32,4	30,24
B	58,8	-
P	3621,9	-
Al	5,8	-
Ba	5,9	-
Co	0,24	-
Cu	3,8	-
Li	0,68	-
Ni	2,4	-
Sr	2,4	-

Ossai je osim u orahu odredio udio K, Na, Ca, Fe, Zn, Pb, Cd i Se i u kikirikiju, kokosu, muškatnom oraščiću i afričkom muškatnom oraščiću. Uzorci su razoreni smjesom kiselina (dušična, perklorina i sumporna), a udio elemenata je izmjeren metodom plamene atomske apsorpcijske spektrometrije. U tablici 3 dani su Ossaijevi rezultati elementne analize oraha koji su nešto manjih vrijednosti u usporedbi s vrijednostima dobivenim u istraživanju Özcana.⁷⁵

Cosmolescu i suradnici su proveli određivanje sadržaja Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Se, Al, Cr, Zn, Sr i Rb u orasima metodom spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom, a za određivanje sadržaja K korištena je plamena atomska apsorpcijska spektrometrija. Istraženi su uzorci različitih kultivara oraha (*Mihaela, Roxana, Velnita, Geoagiu 65, Jupanesti, Valcor, Valmit, Valrex, Argesan*), prethodno razoreni u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje. Udio Na je od 0,134 – 2,387 mg 100 g⁻¹, K od 357,1 – 499,6 mg 100 g⁻¹, Ca od 37,00 – 90,84 mg 100 g⁻¹, Mg od 189,2 – 278,1 mg 100 g⁻¹, Fe od 3,815 – 5,927 mg 100 g⁻¹, Mn od 3,134 – 18,37 mg 100 g⁻¹, Cu od 1,41 – 3,223 mg 100 g⁻¹, Se od 0,001 – 0,005 mg 100 g⁻¹, Al od 0,102 – 0,525 mg 100 g⁻¹, Cr

od 0,255 – 0,692 mg 100 g⁻¹, Zn od 1,948 – 3,529 mg 100 g⁻¹, Sr od 0,16 – 0,537 mg 100 g⁻¹, V od 0,001 – 0,002 mg 100 g⁻¹ i Rb od 0,356 – 2,607 mg 100 g⁻¹. Odnos udjela kemijskih elemenata u 100 g uzorka kod svih je kultivara je slijedeći: K > Mg > Ca > Mn > Fe > Cu > Zn > Na > Cr > Al > Rb > Sr. Mn i Zn kemijski su elementi koji pokazuju najveće razlike u udjelima u pojedinim kultivarima.¹²

Lavedrine i suradnici su za određivanje elemenata u kultivarima oraha iz Francuske i Kalifornije koristili različite metode atomske spektrometrije. Plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom odredili su većinu kemijskih elemenata, dok je Se određen plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa kao detektorom (GC-MS), a P kolorimetrijskom metodom. Rezultati istraživanja pokazali su veći udio K, a manji Na u kultivarima s područja Francuske, te veći udio Mg i Zn u kultivaru *Franquette*. Rezultati su prikazani u tablici 4.⁸

Tablica 4. Elementna analiza kultivara oraha⁸






Elementi/ mg 100 g ⁻¹ * μg 100 g ⁻¹	Franquette (Francuska)	Hartley (Francuska)	Franquette (Kalifornija)	Hartley (Kalifornija)
Ca	91 ± 1,8	63 ± 2,4	67 ± 3,8	58 ± 2,4
Cu	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Fe	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4	2,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1
K	487 ± 12	466 ± 23	358 ± 12	372 ± 9
Mg	191 ± 19	129 ± 3	202 ± 17	134 ± 2
Mn	4,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	1,1 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Na	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	6,7 ± 0,7
P	385 ± 5	308 ± 12	363 ± 3	353 ± 11
Se*	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Zn	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,3

U kultivarima badema (*Butte, Carmel, Fritz, Mission, Monterey, Nonpareil i Sonora*) Yada i suradnici odredili su udio mikro- i makroelemenata. Ca je u rasponu od 198 – 373 mg 100 g⁻¹, Fe od 2,58 – 4,47 mg 100 g⁻¹, Mg od 224 – 303 mg 100 g⁻¹, P od 364 – 548 mg 100 g⁻¹, K od

543 – 902 mg 100 g⁻¹, Zn od 2,02 – 4,03 mg 100 g⁻¹, Cu od 0,46 – 1,57 mg 100 g⁻¹ i Mn od 1,31 – 3,98 mg 100 g⁻¹.¹³

Elementnu analizu velikog broja uzoraka orašastih plodova proveli su Cabrera²⁸ i Rodushkin.⁴ U istraživanju Cabrere i suradnika određeni su udjeli Cu, Cr, Fe, Zn, te toksičnih metala Al, Ni, Pb i Cd u 56 uzoraka različitih orašastih plodova (u bademu, indijskom oraščiću, lješnjaku, pistaciji, orahu i kestenu), te u sjemenkama suncokreta i bora, te zrnima kukuruza. Nakon razaranja uzoraka pomoću dušične kiseline i vanadijevog(V) oksida za određivanje udjela elemenata korištena je metoda elektrotermalne atomske apsorpcijske spektrometrije (ETAAS). U tablici 5 dio je rezultata elementne analize koju su proveli Cabrera i Rodushkin.^{4,28}

Tablica 5. Rezultati određivanja elemenata Cabrere i Rodushkina^{4,28}

	Literatura	Badem	Indijski oraščić	Lješnjak	Orah	Brazilski oraščić
Elementi μg g ⁻¹	Cabrera (2003) ²⁸					
Cu		10,5 – 12,6	6,60 – 8,50	14,0 – 17,2	20,1 – 25,6	-
Cr		0,39 – 0,49	0,25 – 0,31	0,36 – 0,38	0,30 – 0,38	-
Fe		40,3 – 48,7	10,3 – 15,6	13,3 – 19,9	20,0 – 24,4	-
Zn		27,9- 50,0	37,5 – 49,6	38,0 – 45,6	25,6 – 39,7	-
Al		4,40 – 20,1	5,0 – 7,3	5,0 – 12,2	2,7 – 5,4	-
Ni		0,19 – 0,51	0,16 – 0,18	0,26 – 0,46	0,18 – 0,20	-
Pb		0,26 – 0,37	0,20 – 0,29	0,3 – 0,39	0,20 – 0,26	-
Cd		< 0,012	< LOD	< 0,009	< 0,009	-
Elementi μg g ⁻¹	Rodushkin (2008) ⁴					
K		920	650	900	510	550
P		710	630	460	450	750
Mg		290	280	200	210	480
S		150	230	200	160	390
Ca		250	45	140	120	240
Zn		42	49	28	33	53
Fe		38	66	42	41	37
Mn		14	29	58	34	13
Cu		11	20	18	16	22
Na		31	54	2,6	1,8	2,1
Ba		2,8	0,12	14	3,1	380

Rodushkin i suradnici odredili su metodom ICP – AES udjele 70 kemijskih elemenata u orašastim plodovima (lješnjaci, orasi, bademi, pekan orasi, indijski oraščići, kikiriki, brazilski oraščići, pistacije), te kokosu, sjemenkama bora, bundevi i suncokretu. Uzorci su prije elementne analize razoreni u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje uz dodatak dušične i fluorovodične kiseline.

Od makroelemenata u orašastim plodovima prisutni su u najvećem udjelu K ($510 - 920 \text{ mg kg}^{-1}$), P ($450 - 710 \text{ mg kg}^{-1}$), Ca ($45 - 250 \text{ mg kg}^{-1}$), S ($150 - 390 \text{ mg kg}^{-1}$) i Mg ($200 - 480 \text{ mg g}^{-1}$). U značajnom udjelu prisutni su u orahu i mikroelementi Fe ($37 - 66 \text{ mg kg}^{-1}$), Mn ($13 - 58 \text{ mg kg}^{-1}$) i Zn ($28 - 53 \text{ mg kg}^{-1}$). Udio toksičnog Ni ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) i Pb je vrlo mali ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$), a udio Al je oko 5 mg kg^{-1} . Navedeni rezultati elementne analize koju su proveli Cabrera²⁸ i Rodushkin⁴ podjednaki su rezultatima Özcana.³¹

2.5. Mikrovalno potpomognuto razaranje uzorka

Za multielementnu analizu metodom ICP-AES realnih uzoraka kao što su orašasti plodovi potrebno je povećati brzinu termičke razgradnje organskih spojeva, osloboditi atome kemijskih elemenata iz matrice uzorka i povećati njihovu topljivost u otopini. Za pripremu uzorka najčešće se koriste zatvoreni sustavi za mikrovalno potpomognuto razaranje čime se ujedno smanjuju interferencije pri elementnoj analizi metodom ICP – AES. Na slici 8. nalazi se uređaj za mikrovalno potpomognuto razaranje korišten u okviru ovog Diplomskog rada.



Slika 8. Uređaj za mikrovalno potpomognuto razaranje (MWS-2 *Microwave System Speedwave BERGHOF*)

Prednost priprave realnih uzorka u zatvorenom uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje pred ostalim metodama za pripravu je kraće vrijeme razaranja, manja mogućnost kontaminacije i onečišćenja uzorka, manja količina reagensa i uzorka bez gubitka hlapljivih analita. Za razaranje se koriste posude od politetrafluoretilena (PFTE), a odabir reagensa uvjetuje što bolje razaranje uzorka bez utjecaja na stabilnost kemijskih elemenata u otopini. Najčešći reagens je dušična kiselina koja je jako oksidacijsko sredstvo za složene ugljikovodike koje učinkovito razara, a s kemijskim elementima daje topljive soli prilikom čega ne dolazi do gubitka analita.

Ako su u uzorku prisutni silikati za učinkovito razaranje uzorka uz dušičnu kiselinu dodaje se i sumporna ili perklorna kiselina i vodikov peroksid koji smanjuje nastajanje dušikovog(II) oksida i tlak u posudama.

Za razaranje uzoraka orašastih plodova koriste se različite kiseline ili smjese kiselina. Za razaranje oraha korištena je smjesa H_2SO_4 ($w = 95\%$) i HNO_3 ($w = 65\%$),⁸ čista HNO_3 ($w = 65\%$),^{12,31} te smjesa HNO_3 , HClO_4 i H_2SO_4 u volumnom omjeru 2 : 1 : 2.⁷⁵ Isto tako, za razaranje različitih vrsta orašastih plodova korištene su smjesa HNO_3 ($w = 65\%$) i HF ,⁴ te smjesa HNO_3 ($w = 65\%$) i V_2O_5 .²⁸

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Za pripremu uzoraka i izvedbu mjerenja korišteni su:

Dušična kiselina, HNO_3 , *p.a.*, Kemika ($w = 65\%$)

Klorovodična kiselina, HCl , *p.a.*, ($w = 36\%$)

Vodikov peroksid, H_2O_2 , *p.a.*, Kemika ($w = 30\%$)

Standardna multielementna otopina spektralne čistoće za ICP izvore, 1000 mg L^{-1} , Merck

Deionizirana voda visoke čistoće, specifičnog otpora $\geq 18\text{ M } \Omega\text{ cm}^{-1}$

Laboratorijsko posuđe prethodno je očišćeno dušičnom kiselinom ($10\% v/v$).

3.2. Opis instrumenata

Za određivanje udjela elemenata u uzorcima orašastih plodova korišten je spektrometar s induktivno spregnutom plazmom (*Prodigy High Dispersive ICP* spektrometar) (slika 9).



Slika 9. *Prodigy High Dispersive ICP* spektrometar

Optimalni uvjeti rada instrumenta navedeni su u tablici 6.

Tablica 6. Optimalni uvjeti za analizu uzorka spektrometrom *Prodigy High Dispersive ICP*

Instrument	<i>Prodigy High Dispersive ICP</i>
Spektrometar	Ešelatnog tipa
RF – Generator	„free-running” 40 MHz
Protok plina nosioca (Ar)	vanjski: 18 L min ⁻¹ pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ za raspršivanje: 1 L min ⁻¹
Plamenik	Fasselov tip, DUAL – VIEW
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska

Za određivanje velikog udjela K i Na u orašastim plodovima korišten je plameni fotometar Buck / Jenway PFP7 (slika 10).



Slika 10. Plameni fotometar Buck / Jenway PFP7

Za mikrovalno potpomognuto razaranje korišten je uređaj *MWS-2 Microwave System Speedwave BERGHOF* (slika 8) s reakcijskim posudama od politetrafluoretilena za volumene otopine 10 mL i s nosačem za 10 uzoraka. Razaranje svih uzoraka orašastih plodova je provedeno prema programu prikazanom u tablici 7.

Tablica 7. Postavke programa za mikrovalno potpomognuto razaranje uzoraka orašastih plodova

	<i>t</i> / min	<i>P</i> / W	<i>T</i> / °C
1	20	60 %	110
2	20	75 %	170
3	20	50 %	120

t – vrijeme, *P* – snaga mikrovalnog zračenja, *T* – zadana temperatura

3.3. Uzorci

Uzorci orašastih plodova (orah, badem, lješnjak, brazilski oraščić i indijski oraščić) komercijalno su dostupni u pakiranju od 100 g. Kupljeni uzorci bez ljusaka spremljeni su u papirnate vrećice, a prije razaranja uz mikrovalove usitnjeni u tarioniku i spremljeni na suho, hladno i tamno mjesto.

3.4. Postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje orašastih plodova

Prije svakog razaranja uzorka teflonska reakcijska posuda je radi sprječavanja kontaminacije očišćena dušičnom kiselinom (10 % *v/v*). Za mikrovalno potpomognuto razaranje izvagano je oko 200 mg usitnjenog orašastog ploda i dodana je smjesa reagensa: 6 mL HNO₃ (50:50 *v/v*) i 2 mL H₂O₂.

Nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorci su kvantitativno preneseni u tikvicu od 10 mL i nadopunjeni ultračistom vodom do oznake, a nakon toga prebačeni u plastične posudice. Postupak je za isti uzorak ponavljen najmanje 3 puta za uzorke badema, lješnjaka, indijskog oraščića i brazilskog oraščića i 12 puta za uzorak oraha.

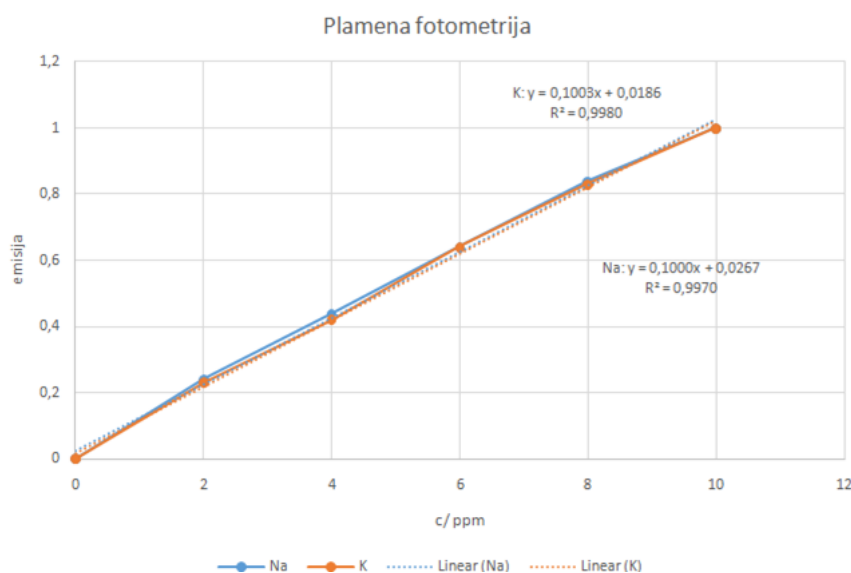
Slijepi su uzorci pripremljeni u svakoj seriji (u jednoj seriji razoreno je po devet uzoraka orašastih plodova + slijepi uzorak), te su za analizu pripremljeni istovremeno i na jednak način kao i uzorci orašastih plodova.

3.5. Elementna analiza orašastih plodova

3.5.1. Priprava kalibracijske krivulje

Otopine radnih standarda pripravljene su neposredno prije mjerenja metodom ICP – AES razrjeđenjem osnovne standardne multielementne otopine (1000 mg L^{-1}) s HNO_3 (2 % v/v) za postizanje koncentracija: 0,10; 0,50; 1,00; 2,00 i 5 mg L^{-1} te izradu kalibracijske krivulje prilikom svake analize. Raspon koncentracija izabran je prema očekivanim koncentracijama kemijskih elemenata u uzorcima.

Baždarni dijagram za određivanje Na i K metodom plamene fotometrije pripremljen je sa standardnim otopinama koncentracija: 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 10 ppm, a prikazan je na slici 11.



Slika 11. Baždarna krivulja za određivanje kalija i natrija plamenom fotometrijom

3.5.2. Iskoristivost metode ICP – AES

Uz pomoć udjela izmjenjenog analita prema njegovoj stvarnoj količini u uzorku ispitane su iskoristivost (engl. *Recovery*) i točnost metode. Iskoristivost metode ICP – AES za određivanje udjela mikro- i makroelemenata u orašastim plodovima određena je dodatkom standardne otopine poznate koncentracije ($2,0$ i $10,0 \text{ mg L}^{-1}$) prije i nakon mikrovalno potpomognutog razaranja.

Iskoristivost metode (%) izračunata je prema izrazu: $\frac{\text{izmjerena količina analita}}{\text{stvarna količina analita}} \times 100 \%$

3.5.3. Detekcijske granice metode ICP – AES

Detekcijska je granica (engl. *Limit of Detection*, LOD) najmanja količina analita koja se u ispitivanom uzorku može izmjeriti. Detekcijske granice za sve elemente u uzorcima orašastih plodova nakon razaranja određene su Baumansovom metodom (LOD, 3σ). Standardni uzorci izmjereni su tri puta, a slijepa proba deset puta. Standardno odstupanje izračunato je za svaki kemijski element u svakoj vrsti orašastog ploda.

Detekcijska granica metode izračunata je po izrazu: $\mu = \gamma + 3 \times \sigma$

μ – detekcijska granica izražena u $\mu\text{g L}^{-1}$, LOD

γ – srednja vrijednost masene koncentracije u $\mu\text{g L}^{-1}$ deset slijepih proba

σ – standardno odstupanje

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA






Orašasti se plodovi često svakodnevno koriste u prehrani pa je stoga njihov kemijski sastav od velike važnosti i za prehrambenu industriju i za toksikološke analize. U okviru ovog rada određen je sastav mikro- i makroelemenata u orahu, bademu, lješnjaku, te brazilskom i indijskom oraščiću, kao najčešće korištenim orašastim plodovima. Prikazani su rezultati elementne analize orašastih plodova metodom ICP – AES, nakon njihovog mikrovalno potpomognutog razaranja. Određena je točnost, preciznost i detekcijske granice, a rezultati elementne analize orašastih plodova metodom ICP – AES uspoređeni su s dostupnim literaturnim podacima. Poteškoće pri određivanju bile su izražene za Na i K iz čijih se negativnih vrijednosti nije mogla izračunati iskoristivost metode ili udio u uzorcima orašastih plodova pa su stoga daljnja mjerenja provedena metodom plamene fotometrije.

4.1. Validacija metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova

4.1.1. Određivanje detekcijskih granica metode ICP – AES

Detekcijske granice izračunate su za svaki kemijski element prema Baumansovoj metodi opisanoj u poglavlju 3.5.3, a u tablici 8 prikazane su vrijednosti detekcijskih granica i valne duljine određivanja elemenata metodom ICP – AES za uzorke orašastih plodova nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uz HNO_3 i H_2O_2 .

Tablica 8. Detekcijske granice ICP – AES metode (LOD) i valne duljine određivanja elemenata u orašastim plodovima

Element	Valna duljina / nm	LOD / mg kg ⁻¹				
		Badem	Indijski oraščić	Lješnjak	Orah	Brazilski oraščić
Al	394,401					
B	249,677	0,022	0,56	0,065	0,097	0,56
	208,956	0,014	0,22	0,023	0,010	0,22
Ba	493,409	0,048	0,36	0,038	0,0059	0,36
	455,403	0,0043	0,058	0,0057	0,00067	0,058
Ca	422,673	0,0091	0,0061	0,0022	0,0042	0,0061
	317,933	-	2,8	0,39	0,024	2,8
Cd	228,802	-	2,3	0,13	0,012	2,3
	214,441	0,0074	0,16	0,017	0,0061	0,16
Co	228,615	0,0018	0,069	0,0070	0,010	0,069
	236,379	0,0018	0,075	0,0078	0,0061	0,075
Cr	205,552	0,0118	0,31	0,032	0,026	0,31
	267,716	0,0078	0,13	0,014	0,0064	0,13
Cu	224,700	0,0051	0,025	0,0026	0,0035	0,025
	324,754	0,0054	0,31	0,031	0,013	0,30
Fe	238,204	0,0035	0,051	0,0054	0,0058	0,051
	259,940	0,011	0,10	0,011	0,017	0,10
Li	670,784	0,014	0,12	0,013	0,011	0,12
	285,213	0,013	0,65	0,067	0,025	0,65
Mg	279,553	-	0,57	0,054	0,0055	0,57
	257,610	-	-	0,39	0,0059	-
Mn	257,610	0,00028	0,012	0,0012	0,0016	0,012
Ni	221,648	0,018	0,16	0,019	0,012	0,16
Pb	220,353	0,033	0,28	0,029	0,053	0,28
Sr	407,771	0,00059	0,0029	0,00028	0,00021	0,0029
V	292,401	0,0079	0,070	0,048	0,0045	0,070
Zn	202,548	0,0091	0,20	0,014	0,0070	0,20

U tablici su izostavljene vrijednosti detekcijskih granica za one elemente i uzorke čije su detekcijske granice bile negativne kod svih izmjerenih valnih duljina.

Za uzorke orašastih plodova nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50, v/v) i H_2O_2 dobivene su detekcijske granice: $< 0,65 \mu\text{g g}^{-1}$ za Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, V i Zn, te za Ca gdje su detekcijske granice nešto više od $2 \mu\text{g g}^{-1}$. Na temelju rezultata prikazanih u tablici 8 može se zaključiti da su detekcijske granice zadovoljavajuće za određivanje većine kemijskih elemenata metodom ICP – AES u uzorcima orašastih plodova. Samo su pri određivanju LOD za Ca u bademu dobivene vrlo velike vrijednosti ($2 \mu\text{g g}^{-1}$), a LOD za Mg u bademu, indijskom i brazilskom oraščiću nije bilo moguće izračunati, pa je za analitičku primjenu potrebno bolje optimirati analitički postupak.


4.1.2. *Određivanje točnosti metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova*

Točnost metode ICP – AES za elementnu analizu određena je na temelju iskoristivosti metode, iskazane u obliku postotnog udjela (3.5.2.). Iskoristivost metode daje podatak o točnosti određivanja metodom ICP – AES i mogućoj pogrešci tijekom eksperimenta. U tablici 9 dane su vrijednosti iskoristivosti metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova na temelju kojih se može odrediti točnost metode.

Najbolja iskoristivost metode ICP – AES dobivena je za uzorke badema (92 % – 113 %), a najmanja za uzorke lješnjaka (50 % – 120 %). Vrijednosti za točnost na temelju iskoristivosti metode za indijski i brazilski oraščić međusobno su jednake zbog sličnog sastava i matrice uzorka. Na temelju prikazanih rezultata u tablici 9 može se zaključiti da je točnost metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova unutar statistički prihvatljivih granica za većinu određivanih kemijskih elemenata.

Iz tablice su izostavljene negativne vrijednosti za Ca i Mg u pojedinim uzorcima za koje nije bilo moguće izračunati iskoristivost metode što ukazuje na slabu točnost metode ICP – AES. Također za analizu uzorka lješnjaka postoje velike razlike u vrijednostima za točnost pri određivanju Ca i Mg, sa srednjom vrijednošću 74,3 %.

Tablica 9. Iskoristivost metode ICP – AES za mikrovalno potpomognuto razorene uzorke orašastih plodova

Element	Valna duljina / nm	Iskoristivost metode ICP – AES / %				
		Badem	Indijski oraščić	Lješnjak	Orah	Brazilski oraščić
						
Al	394.401	93	96	64	99	96
B	249.677	99	94	69	113	94
	208.956	92	85	62	103	85
Ba	493.409	101	101	-	124	101
	455.403	-	80	-	124	80
Ca	422.673	-	89	50	-	89
	317.933	-	129	-	124	-
Cd	228.802	95	88	64	103	88
	214.441	113	108	81	131	108
Co	228.615	101	96	71	114	96
	236.379	102	97	72	114	97
Cr	205.552	104	102	76	119	102
	267.716	111	109	81	128	109
Cu	224.700	98	91	67	108	91
	324.754	91	92	66	104	92
Fe	238.204	102	116	86	124	116
	259.940	95	104	79	116	104
Li	670.784	93	91	67	103	91
Mg	285.213	-	-	120	-	-
	279.553	-	-	-	95	-
Mn	257.610	99	106	78	122	106
Ni	221.648	102	110	72	115	110
Pb	220.353	103	95	70	114	95
Sr	407.771	98	105	85	121	105
V	292.401	94	92	73	108	92
Zn	202.548	95	93	83	104	93
Najmanja vrijednost		92	80	50	95	80
Najveća vrijednost		111	129	120	131	129
Srednja vrijednost		94,8	94,7	74,3	113,75	94,7

4.1.3. Osjetljivost metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova

Osjetljivost metode ICP – AES za elementnu analizu orašastih plodova izražena je kao nagib kalibracijske krivulje, a predstavlja sposobnost metode za određivanje male količine kemijskog elementa prisutnog u uzorku. Kada je baždarna krivulja linearna osjetljivost ima konstantnu vrijednost. Na dobru osjetljivost metode nakon mikrovalno potpomognutog razaranja ukazuje korelacijski faktor koji je za sve kalibracijske krivulje i pri svim valnim duljinama određivanja elemenata veći od 0,9995.

4.1.4. Preciznost metode ICP – AES za određivanje kemijskih elemenata u orašastim plodovima

Preciznost metode iskazana je kao relativno standardno odstupanje (RSO/ %) tijekom mjerenja tri paralelna uzorka, a ukazuje na podudaranje mjernih vrijednosti, odnosno raspršenost rezultata pojedinih mjerenja oko njihove aritmetičke sredine. Kod svih je uzoraka i kemijskih elemenata RSO < 15 %, a s obzirom da se radi o realnim uzorcima takve vrijednosti su očekivane. Za većinu je kemijskih elemenata RSO < 10 %, pa se može zaključiti da su svi parametri optimiranja uvjeta mjerenja metodom ICP – AES bili dobro postavljeni.

4.2. Rezultati elementne analize orašastih plodova

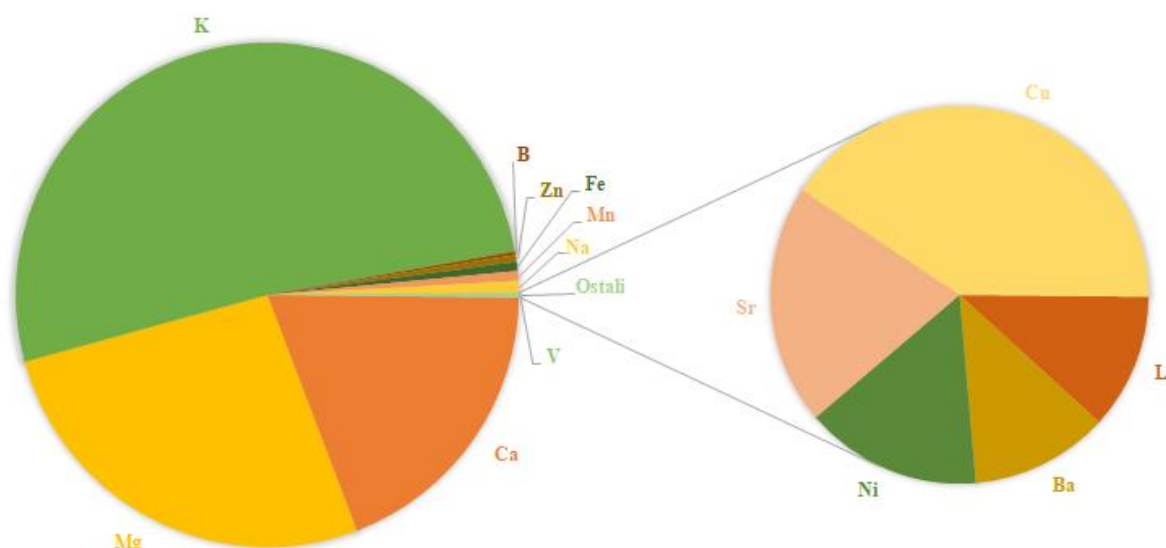
Iz vrijednosti za Na i K dobivenih metodom ICP – AES koje su ukazivale na slabu točnost metode ICP – AES, te značajne razlike s velikim RSO za vrijednosti njihovog udjela izmjerenih u orašastim plodovima metodom ICP – AES korištena je metoda plamene fotometrije. Za određivanje udjela svih ostalih elemenata korištena je metoda ICP – AES, a odabrane su one valne duljine određivanja pri kojima je postignuta najbolja točnost metode ICP – AES i najniže detekcijske granice.

4.2.1. Orah (*Juglans regia* L.)

Od esencijalnih makroelemenata u orahu su određeni Ca, K, Mg i Na, od čega najveće udjele među makroelementima imaju K ($2771 \mu\text{g g}^{-1}$), Mg ($1428 \mu\text{g g}^{-1}$) i Ca ($1025 \mu\text{g g}^{-1}$). Udio Na iznosi $39,4 \mu\text{g g}^{-1}$, a od mikroelemenata najveće udjele imaju Mn ($33,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Fe ($31,6 \mu\text{g g}^{-1}$) i Zn ($23,4 \mu\text{g g}^{-1}$). Ostali su elementi prisutni u udjelima: B ($12,00 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($7,13 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($3,58 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($2,65 \mu\text{g g}^{-1}$), Ba ($2,08 \mu\text{g g}^{-1}$), Li ($2,02 \mu\text{g g}^{-1}$) i V ($0,196 \mu\text{g g}^{-1}$).

U svim je uzorcima oraha udio Cd, Co, Cr i Pb ispod detekcijskih granica: Cd ($0,006 \mu\text{g g}^{-1}$), Co ($0,017 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($0,003 \mu\text{g g}^{-1}$) i Pb ($0,05 \mu\text{g g}^{-1}$).

Udjeli mikro- i makroelemenata određeni metodom ICP – AES, te Na i K plamenom fotometrijom u orahu prikazani su na slici 12.



Slika 12. Udio mikro- i makroelemenata u orahu ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Roduhskin je sa suradnicima odredio sadržaj velikog broja kemijskih elemenata u orahu ($\mu\text{g g}^{-1}$).⁴ Usporedbom rezultata s izmjerenim vrijednostima dobivenim u okviru ovog rada podjednake vrijednosti dobivene su za B ($15 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$), Ba ($3,1 \pm 2,8 \mu\text{g g}^{-1}$), Fe ($41 \pm 11 \mu\text{g g}^{-1}$), Mn ($34 \pm 15 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($1,6 \pm 1,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($6,5 \pm 3,2 \mu\text{g g}^{-1}$) i Zn ($33 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$), dok je udio Cu ($16 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$) i Li ($5,6 \pm 1,9 \mu\text{g g}^{-1}$) bio veći, a udio Na znatno manji ($1,8 \pm 0,8 \mu\text{g g}^{-1}$).

U istraživanju Özcana i suradnika udio Ba, Ca, Cu, Fe, Ni, Zn i Na je približno jednak dobivenim vrijednostima, dok su vrijednosti za udio B ($58,8 \pm 16,2 \mu\text{g g}^{-1}$), K ($4627,6 \mu\text{g g}^{-1}$) i Mn ($46,3 \pm 6,5 \mu\text{g g}^{-1}$) veće, a za Li ($0,68 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($2,4 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$) i Mg ($1089 \mu\text{g g}^{-1}$) manje.³¹

U literaturnom pregledu navedeni su rezultati udjela elemenata Ca ($279 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), Cu ($5,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), Fe ($9,3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), Zn ($6,5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) i Na ($8 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$)⁸ istraživanja Lavedrina i suradnika na kultivarima oraha (2.4.3.) koji su veći od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju za Ca ($102,5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), za Cu ($0,713 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), za Fe ($3,16 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), Zn ($2,34 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) i za Na ($3,94 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

S rezultatima istraživanja Cabrere i suradnika uočeno je vrlo dobro poklapanje u rezultatima za Cu ($0,10 - 25,60 \mu\text{g g}^{-1}$) i Zn ($5,60 - 39,70 \mu\text{g g}^{-1}$), a razlike su u većim udjelima za Ni ($0,18 - 0,20 \mu\text{g g}^{-1}$) i Fe ($20,00 - 24,40 \mu\text{g g}^{-1}$).²⁸

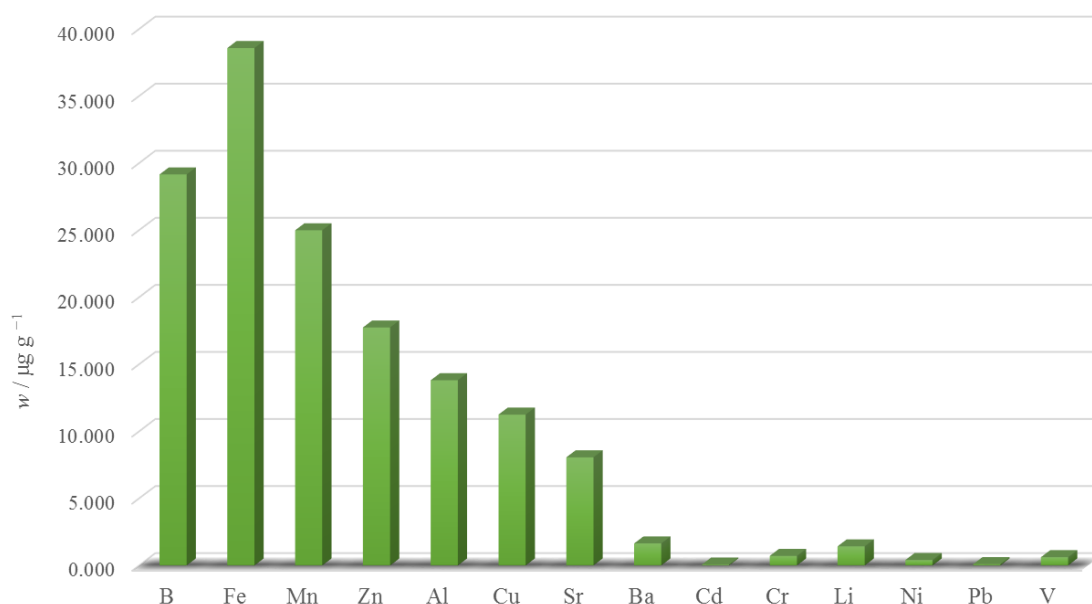
Usporede li se dobivene vrijednosti udjela za mikro- i makroelemente u orahu s preporučenim dnevnim unosom pojedinog elementa može se zaključiti da konzumacija 100 g oraha zadovoljava slijedeće RDA kemijskih elemenata: 10 % Ca, 79 % Cu, 24 % Fe, 5 % K, 33 % Mg, 0,26 % Na, 23 % Zn i 145 % Mn.

4.2.2. Badem (*Prunus amygdalus* Miller)

U uzorcima badema od esencijalnih makroelemenata najviše je K ($4160,9 \mu\text{g g}^{-1}$), a Na je prisutan u manjem udjelu ($106,42 \mu\text{g g}^{-1}$). Udjeli Ca i Mg u bademu nisu određeni zbog nedovoljne točnosti metode ICP – AES bez obzira na izbor valne duljine snimanja pa je za određivanje udjela navedenih elemenata potrebno dodatno optimirati analitički postupak. Metodom ICP – AES određeni su nešto veći udjeli Fe, B i Mn u usporedbi s ostalim ispitivanim mikroelementima.

Vrijednost udjela K nešto je niža od vrijednosti raspona udjela kojeg su odredili Yada i suradnici ($5430 - 9020 \mu\text{g g}^{-1}$)¹³, no znatno je viša od vrijednosti Rodushkina i suradnika ($920 \pm 17 \mu\text{g g}^{-1}$).⁴ Izmjereni udio Na ($106,42 \mu\text{g g}^{-1}$) u bademu je znatno veći od literaturno dostupnog podatka ($31 \pm 16 \mu\text{g g}^{-1}$).⁴

Od mikroelemenata u bademu su određeni Al, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Sr, Ba, Cd, Cr, Li, Ni, Pb, V i Co, a prikaz njihovih udjela nalazi se na slici 13.



Slika 13. Udjeli mikroelemenata u bademu

Al je u bademu $13,8 \mu\text{g g}^{-1}$, što je znatno veća vrijednost od istraživanja Rodushkina ($0,68 \pm 0,91 \mu\text{g g}^{-1}$)⁴, ali unutar raspona vrijednosti udjela koje su odredili Cabrera i suradnici ($4,40 - 20,10 \mu\text{g g}^{-1}$).²⁸

Dobiveni udjeli B ($29,1 \mu\text{g g}^{-1}$) i Fe ($38,6 \mu\text{g g}^{-1}$) podjednaki su rezultatima u literaturi za B ($28 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$),⁴ i Fe ($38 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$),⁴ ($40,30 - 48,70 \mu\text{g g}^{-1}$),²⁸ i ($25,8 - 44,7 \mu\text{g g}^{-1}$).¹³

Udio Mn ($24,9 \mu\text{g g}^{-1}$) je manji u usporedbi s literaturnim podacima $14 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ u istraživanju Rodushkina⁴ i $13,1 - 39,8 \mu\text{g g}^{-1}$ u istraživanju Yade.¹³ Zn je prisutan u manjem udjelu ($17,7 \mu\text{g g}^{-1}$), u usporedbi s literaturnim podacima ($42 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$),⁴ ($27,90 - 50,00 \mu\text{g g}^{-1}$),²⁸ i ($20,2 - 40,3 \mu\text{g g}^{-1}$).¹³

Elementnom analizom badema dobiveni su udjeli za Cu ($11,24 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($8,06 \mu\text{g g}^{-1}$) i Ba ($1,64 \mu\text{g g}^{-1}$) u skladu s literaturnim podacima za Cu $11 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$,⁴ $10,50 - 12,60 \mu\text{g g}^{-1}$,²⁸ $4,6 - 45,7 \mu\text{g g}^{-1}$,¹³ za Sr $14 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$, te za Ba $2,8 \pm 2,4 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

U usporedbi s literaturnim podacima ($0,00069 \pm 0,00045 \mu\text{g g}^{-1}$ i $< 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$)^{4,28} u bademu je veći udio Cd ($0,006 \mu\text{g g}^{-1}$). Također, Cr ($0,706 \mu\text{g g}^{-1}$) ima veći udio od rezultata Rodushkina ($0,0056 \pm 0,0087 \mu\text{g g}^{-1}$)⁴ i Cabrere ($0,39 - 0,49 \mu\text{g g}^{-1}$).²⁸ Udio Li ($1,420 \mu\text{g g}^{-1}$) veći je od literaturnog podatka $0,028 \pm 0,020 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Elementnom analizom određeni su udjeli Ni ($0,399 \mu\text{g g}^{-1}$) i Pb ($0,0094 \mu\text{g g}^{-1}$), a vrijednosti su podjednake podacima u literaturi. Za Ni ($1,1 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$)⁴ i ($0,19 - 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$)²⁸, te za Pb $0,00064 \pm 0,00047 \mu\text{g g}^{-1}$ i $0,26 - 0,37 \mu\text{g g}^{-1}$.^{4,28}

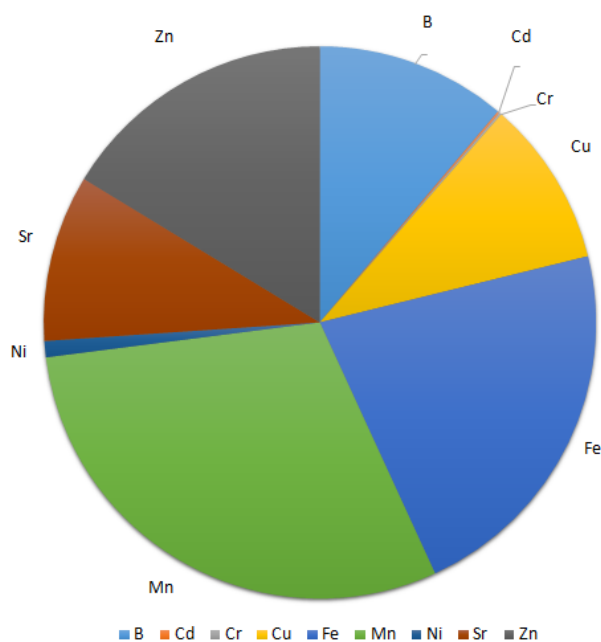
Udio V u bademu je nešto veći ($0,612 \mu\text{g g}^{-1}$), od vrijednosti koju su odredili Rodushkin i suradnici.⁴ Udio Co u istraživanom uzorku badema manji je od detekcijskih granica ($0,001 \mu\text{g g}^{-1}$), dok je u istraživanju Rodushkina udio Co $0,055 \pm 0,022 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Usporede li se dobiveni udjeli kemijskih elemenata s preporučenim dnevnim unosom mikro- i makroelemenata dobiva se da 20 g badema zadovoljava 24,8 % RDA Cu, 5,8 % Fe, 1,8 % K, 0,14 % Na, 3,4 % Zn i 21,6 % Mn.

4.2.3. Lješnjak (*Corylus avellana* L.)

Od makroelemenata u lješnjaku najviše ima Mg, K i Na. Pri određivanju Ca točnost metode ICP – AES iznosila je < 70 % pri svim odabranim valnim duljinama, pa je udio Ca samo procijenjen ($1140 \mu\text{g g}^{-1}$). Najzastupljeniji makroelement je K ($44,71 \text{ mg g}^{-1}$), čija se vrijednost znatno razlikuje od one u literaturi ($900 \pm 180 \mu\text{g g}^{-1}$).⁴ Odstupanja su uočena i u vrijednostima za Mg ($1496 \mu\text{g g}^{-1}$) i Na ($127,4 \mu\text{g g}^{-1}$) koje u istraživanju Rodushkina iznose Mg ($200 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$) i Na ($2,6 \pm 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$).⁴

Određeni su i udjeli mikroelemenata: B, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Pb, V i Zn, a njihova raspodjela prikazana je na slici 14.



Slika 14. Udjeli mikroelemenata u lješnjaku

Pb i V u analiziranom uzorku lješnjaka su ispod detekcijske granice ($0,029 \mu\text{g g}^{-1}$ za Pb i $0,048 \mu\text{g g}^{-1}$ za V), a vrijednosti su za te elemente u literaturi vrlo niske i iznose $(0,0073 \pm 0,0082 \mu\text{g g}^{-1})^4$ i $(0,30 - 0,39 \mu\text{g g}^{-1})^{28}$ za Pb, te $0,0016 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ za V.⁴

Udio B u uzorku lješnjaka iznosi $16,43 \mu\text{g g}^{-1}$, što je manje od vrijednosti određene u istraživanju Rodushkina ($27 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$),⁴ dok je udio Cd ($0,18 \mu\text{g g}^{-1}$) veći od vrijednosti u literaturi ($0,010 \pm 0,0061 \mu\text{g g}^{-1}$)⁴ i $0,004 - 0,009 \mu\text{g g}^{-1}$.²⁸

Udio Cr u lješnjaku je $0,19 \mu\text{g g}^{-1}$, a Cu $14,33 \mu\text{g g}^{-1}$. Vrijednost udjela Cu podjednaka je rezultatima u literaturi: $18 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$ u istraživanju Rodushkina⁴ i $14,00 - 17,20 \mu\text{g g}^{-1}$ u istraživanju Cabrere.²⁸

Udio Fe je $32,40 \mu\text{g g}^{-1}$, što je djelomično u skladu s podacima dostupnim u literaturi: $13,30 - 19,90 \mu\text{g g}^{-1}$ i $42 \pm 12 \mu\text{g g}^{-1}$.^{28,4}

Udjeli Mn ($43,90 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($1,39 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($14,39 \mu\text{g g}^{-1}$) i Zn ($23,99 \mu\text{g g}^{-1}$) slažu se s podacima Rodushkina: Mn ($58 \pm 35 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($1,3 \pm 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($13 \pm 7 \mu\text{g g}^{-1}$) i Zn ($28 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$), dok su kod Cabrere zabilježene niže vrijednosti za Ni ($0,26 - 0,46 \mu\text{g g}^{-1}$) i više za Zn ($38,00 - 45,60 \mu\text{g g}^{-1}$).^{4,28}

S obzirom na visoke udjele pojedinih kemijskih elemenata Cu, K i Mn s 20 g lješnjaka ostvaruje se preporučeni dnevni unos 31,8 % Cu, 4,8 % Fe, 18,6 % K, 7 % Mg, 0,17 % Na, 4,8 % Zn i 38 % Mn.

4.2.4. Brazilski oraščić (*Bertholletia excelsa* Humboldt)

U brazilskom su oraščiću plamenom fotometrijom određeni udjeli Na i K kao makroelemenata: $3950 \mu\text{g g}^{-1}$ za K i $114 \mu\text{g g}^{-1}$ za Na. Te vrijednosti odstupaju od literaturnih podataka $550 \pm 90 \mu\text{g g}^{-1}$ za K i $2,1 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ za Na.⁴ Udio Ca je $1317 \mu\text{g g}^{-1}$, a vrijednosti u literaturi su različite $240 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$ i $1630 \pm 15 \mu\text{g g}^{-1}$.^{4,76}

Od mikroelemenata u brazilskom su oraščiću određeni: B, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, V i Zn. Vrijednosti za Al, Co i Pb su manje od detekcijskih granica ($0,56 \mu\text{g g}^{-1}$ za Al, $0,075 \mu\text{g g}^{-1}$ za Co i $0,28 \mu\text{g g}^{-1}$ za Pb). Vrijednosti za te elemente u literaturi su vrlo niske: $0,25 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ i $5,33 \pm 1,11 \mu\text{g g}^{-1}$ za Al,^{4,76} i $0,9 \pm 0,042 \mu\text{g g}^{-1}$ za Pb,⁴ te nešto veće za Co $53 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$ i $43,0 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$.^{4,76}

Udjeli za preostale mikroelemente u brazilskom oraščiću su: 7,52 $\mu\text{g g}^{-1}$ B, 15,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ Ba, 0,18 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd, 0,27 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cr, 16,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cu, 36,97 $\mu\text{g g}^{-1}$ Fe, 11,69 $\mu\text{g g}^{-1}$ Mn, 2,58 $\mu\text{g g}^{-1}$ Ni, 102,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ Sr, 0,14 $\mu\text{g g}^{-1}$ V i 26,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ Zn.

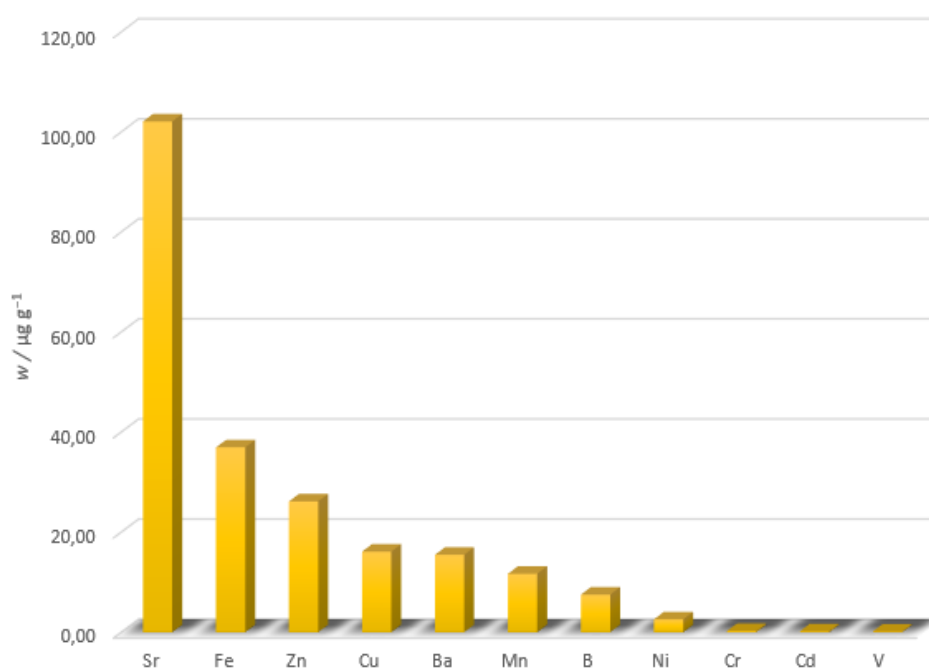
Udjeli B i Ba manji su od onih u literaturi: $9,3 \pm 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ za B⁴ i $380 \pm 60 \mu\text{g g}^{-1}$, te $66,2 \pm 12,3 \mu\text{g g}^{-1}$ za Ba.^{4,76} Također, udjeli Cr (0,27 $\mu\text{g g}^{-1}$) i Cu (16,12 $\mu\text{g g}^{-1}$) manji su od vrijednosti u literaturi koje iznose za Cr ($7,89 \pm 1,06 \mu\text{g g}^{-1}$),⁸⁵ te za Cu $22 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ i $19,6 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$.^{4,76} Udio Cd (0,18 $\mu\text{g g}^{-1}$) je veći od literaturnih podataka: $0,00052 \pm 0,00025 \mu\text{g g}^{-1}$ i $< 0,005$.^{4,76}

Rodushkin i suradnici su u brazilskom oraščiću odredili udio Fe $37 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$, a Welna $55,8 \pm 8,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Dobivena vrijednost za Fe u ovom istraživanju podjednaka je vrijednostima u literaturi i iznosi 36,97 $\mu\text{g g}^{-1}$. Vrijednost za udio Mn (11,69 $\mu\text{g g}^{-1}$) gotovo je identična vrijednostima u literaturi $13 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ i $10,1 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$.^{4,76}

Dobiveni udio Ni manji je od literaturnih podataka $4,6 \pm 1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ i $8,82 \pm 0,82 \mu\text{g g}^{-1}$,^{4,76} a Sr znatno veći od vrijednosti Rodushkina $0,0017 \pm 0,00097 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Welna i suradnici su odredili udio V u brazilskom oraščiću $115 \pm 12 \mu\text{g g}^{-1}$, a Rodushkin $160 \pm 20 \mu\text{g g}^{-1}$, što je znatno više od vrijednosti izmjerene u ovom radu. Udio Zn (26 $\mu\text{g g}^{-1}$) veći je od jedinog dostupnog literaturnog podatka za brazilski oraščić $0,00036 \pm 0,00012 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Udjeli svih analiziranih mikroelemenata prikazani je na slici 15.



Slika 15. Udjeli mikroelemenata u brazilskom oraščiću

Dovoljno je pojesti 20 g brazilskih oraščića da se zadovolji dnevni unos od 35,8 % Cu, 2,6 % Ca, 5,6 % Fe, 1,6 % K, 0,14 % Na, 5,2 % Zn i 10 % Mn.

4.2.5. Indijski oraščić (*Anacardium occidentale* L.)

U uzorku indijskog oraščića udjeli Al, Pb i Cd su ispod detekcijskih granica (za Al $0,5614 \mu\text{g g}^{-1}$, za Pb $0,2751 \mu\text{g g}^{-1}$ i za Cd $0,0686 \mu\text{g g}^{-1}$). Za te su elemente u literaturi dane vrlo male vrijednosti: za Al $0,89 \pm 0,30 \mu\text{g g}^{-1}$ i $5,00 - 7,30 \mu\text{g g}^{-1}$,^{4,28} za Pb $0,0024 \pm 0,00140 \mu\text{g g}^{-1}$ i $0,20 - 0,29 \mu\text{g g}^{-1}$,^{4,28} te za Cd $0,0008 \pm 0,00097 \mu\text{g g}^{-1}$ i $< \text{LOD}$.^{4,28}

Od makroelemenata u indijskom oraščiću metodom ICP – AES određen je Ca, a K i Na plamenom fotometrijom. Udjeli Ca ($294 \mu\text{g g}^{-1}$) i K ($2690 \mu\text{g g}^{-1}$) veći su od vrijednosti u literaturi koje iznose $45 \pm 12 \mu\text{g g}^{-1}$ za Ca i $650 \pm 100 \mu\text{g g}^{-1}$ za K.⁴

Izmjereni udio Na ($118,15 \mu\text{g g}^{-1}$) nešto je veći od rezultata u literaturi ($54 \pm 17 \mu\text{g g}^{-1}$).⁴ Također, veći udjeli od literaturnih $0,0048 \pm 0,042 \mu\text{g g}^{-1}$ za Co,⁴ $0,012 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ i $0,25 - 0,31 \mu\text{g g}^{-1}$ za Cr,^{4,28} te $20 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$ i $6,60 - 8,50 \mu\text{g g}^{-1}$ za Cu^{4,28} dobiveni su za Co ($0,3010 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($0,3837 \mu\text{g g}^{-1}$) i Cu ($23,95 \mu\text{g g}^{-1}$).

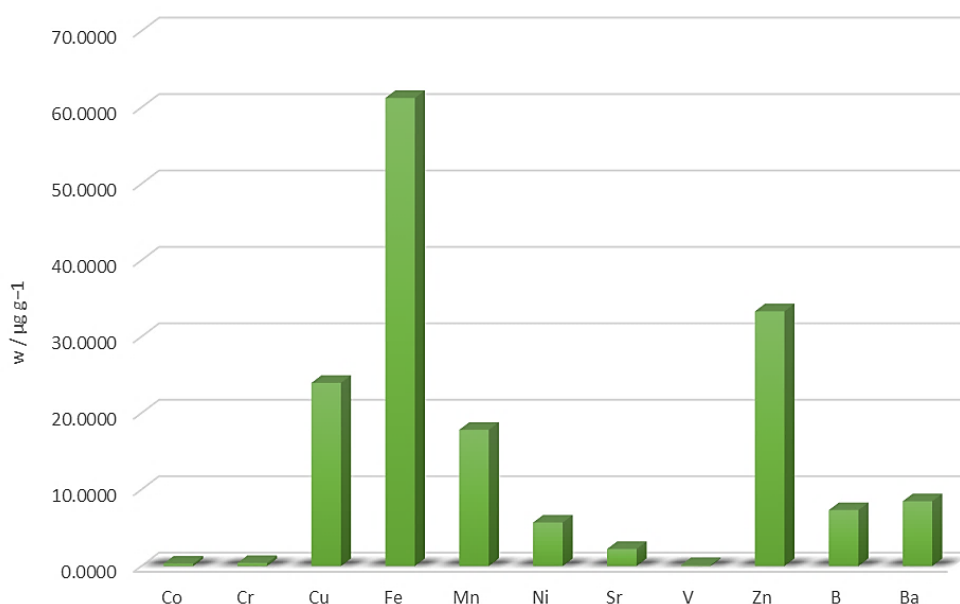
U indijskom je oraščiću prisutan veliki udio Fe ($61,24 \mu\text{g g}^{-1}$), što je podjednako literaturnom podatku $66 \pm 25 \mu\text{g g}^{-1}$,⁴ ali veće vrijednosti od one u istraživanju Cabrere i suradnika ($10,30 - 15,60 \mu\text{g g}^{-1}$).²⁸

Udio Mn ($17,81 \mu\text{g g}^{-1}$) u skladu je s izmjerenom vrijednosti u istraživanju Rodushkina i suradnika ($29 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$), jednako kao i udio Ni ($5,68 \mu\text{g g}^{-1}$) i B ($7,31 \mu\text{g g}^{-1}$) čije su vrijednosti podjednake literaturnim koje za Ni iznose $6,7 \pm 2,1 \mu\text{g g}^{-1}$, a za B $9,4 \pm 1,8 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Udjeli Sr, V i Ba veći su od vrijednosti dostupnih u literaturi. Za Sr udio iznosi $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$, dok je u literaturi ta vrijednost $0,60 \pm 0,65 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴ V je u udjelu $0,112 \mu\text{g g}^{-1}$ što je više od vrijednosti u literaturi $0,0018 \pm 0,0006 \mu\text{g g}^{-1}$, dok se udio Ba $8,47 \mu\text{g g}^{-1}$ razlikuje od literaturnog podatka $0,12 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$.⁴

Izmjereni udio Zn nešto je manji od vrijednosti u literaturi i iznosi $33,3 \mu\text{g g}^{-1}$. Rodushkin i suradnici odredili su udio Zn $49 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$, a podjednako i Cabrera $37,50 - 49,60 \mu\text{g g}^{-1}$.

Izmjereni udjeli mikroelemenata i njihov odnos prikazani su na slici 16.



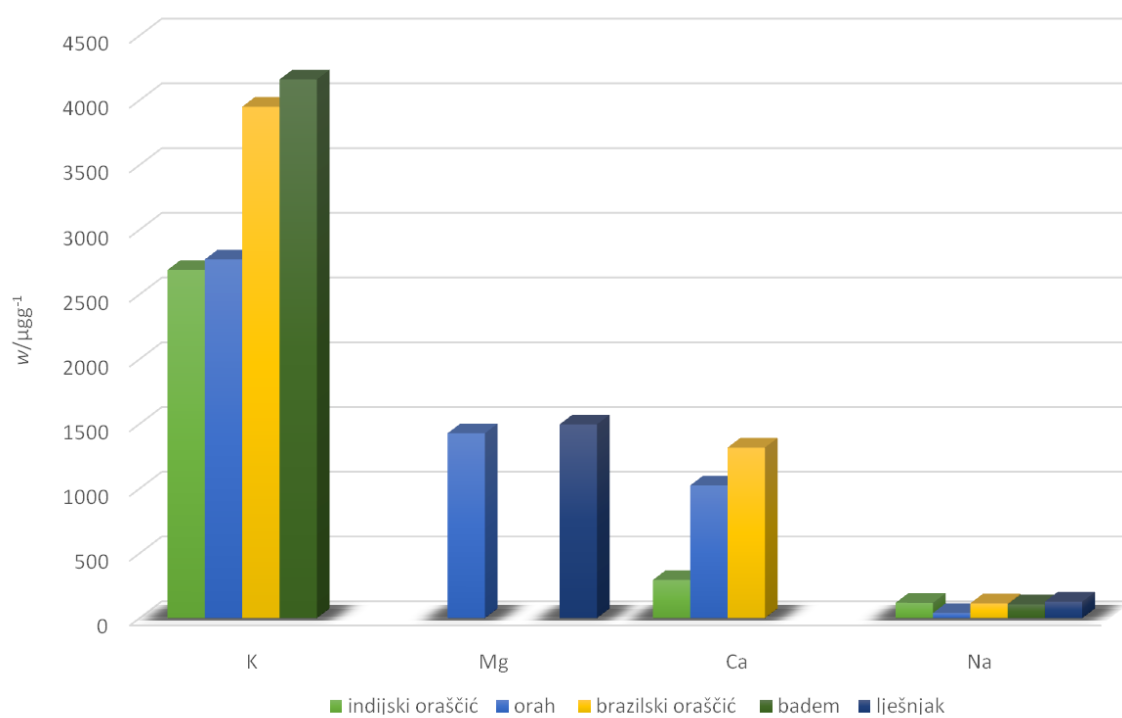
Slika 16. Udjeli mikroelemenata u indijskom oraščiću

Konzumacijom 20 g indijskih oraščića dnevno dobiva se 53,2 % RDA Cu, 21,8 % Cr, 0,588 % Ca, 1,144 % K, 0,156 % Na, 9,4 % Fe, 15,4 % Mn i 6,6 % Zn.

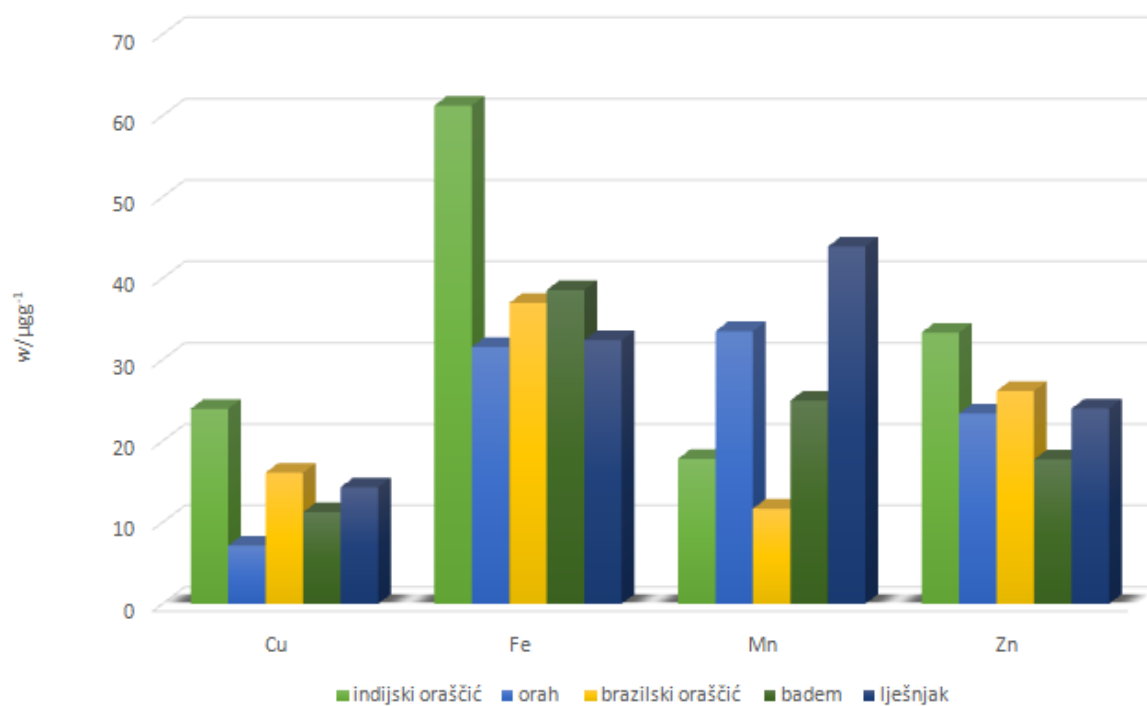
4.2.6. Usporedba rezultata elementne analize orašastih plodova

Iz rezultata elementne analize svih orašastih plodova (orah, badem, lješnjak, brazilski i indijski oraščić) napravljene su slike 17 i 18 koje prikazuju udjele najzastupljenijih mikro- i makroelemenata ovisno o vrsti orašastog ploda. Na slici 17 međusobno su uspoređeni udjeli makroelemenata (K, Ca, Mg i Na), a na slikama 18a i 18b udjeli mikroelemenata. Slike 18a i 18b su podijeljene radi jasnijeg prikaza, pa tako slika 18a prikazuje odnose četiri mikroelementa najvećih udjela u orašastim plodovima, dok 18b prikazuje preostale mikroelemente čije su izmjerene vrijednosti udjela znatno manje.

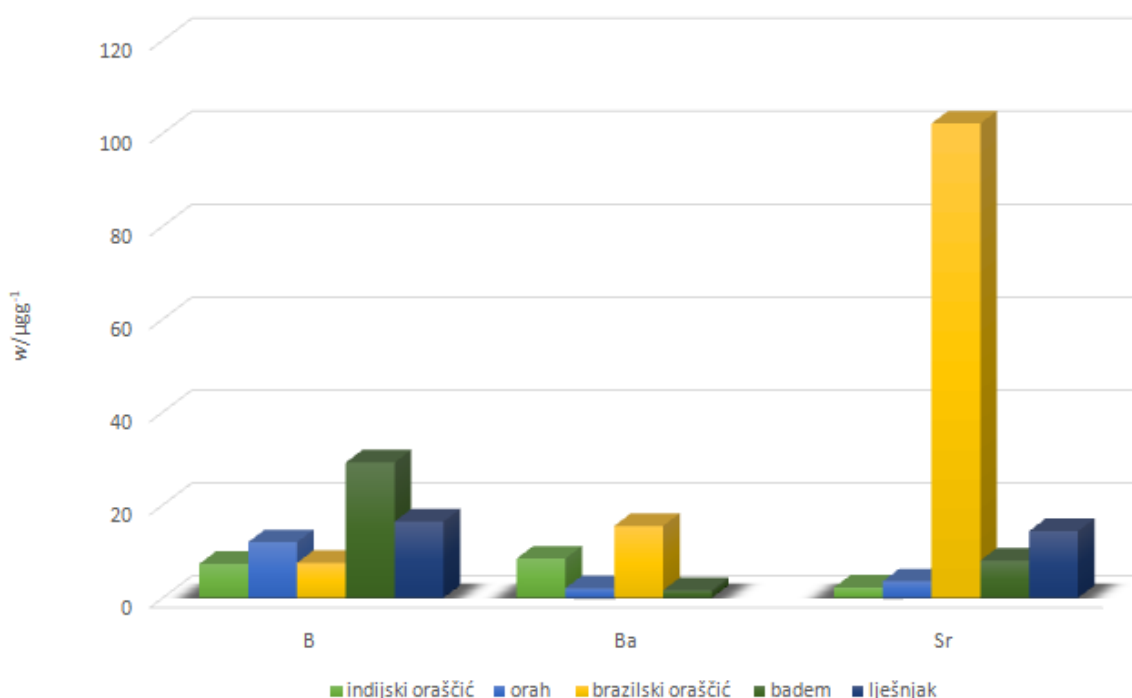
Zbog izrazito velikog udjela K u lješnjaku (44 mg g^{-1}), koji se znatno razlikuje od vrijednost udjela u ostalim orašastim plodovima, ta je vrijednost izostavljena sa slike 17.



Slika 17. Udio K, Mg, Ca i Na u orašastim plodovima



Slika 18a. Udio Cu, Fe, Mn i Zn u orašastim plodovima



Slika 18b. Udio B, Ba i Sr u orašastim plodovima

Toksični elementi (V, Co, Pb, Ni) koji mogu imati štetno djelovanje na ljudski organizam u svim su uzorcima orašastih plodova prisutni u vrlo niskim udjelima ili ispod detekcijskih granica, stoga ne postoji mogućnost trovanja konzumacijom.

Analiza orašastih plodova pokazala je da je najzastupljeniji makroelement K, a najmanje ima Na.

Od mikroelemenata najviše je Cu, Fe, Mn i Zn. Udio Cu u indijskom je oraščiću gotovo dvostruko veći od njegova udjela u orahu i bademu. Udio Fe podjednak je kod gotovo svih orašastih plodova, osim kod indijskog oraščića gdje je dvostruko veći. Najviše Mn imaju lješnjak i orah, dok je udio u indijskom oraščiću niži dvostruko, a u brazilskom trostruko. Izuzev nešto višeg udjela Zn u indijskom oraščiću, u svim orašastim plodovima udio Zn je podjednak.

Preostali istraživani mikroelementi prisutni su u vrlo malim i podjednakim udjelima, a znatnije je odstupanje primijećeno za nešto veći udio stroncija u brazilskom oraščiću.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog Diplomskog rada provedena je elementna analiza orašastih plodova. Za većinu elemenata korištena je metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP – AES), a K i Na određeni su plamenom fotometrijom.

Uzorci su prethodno razoreni u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje uz dodatak razrijeđene dušične kiseline i vodikovog peroksida.

Određene su točnost, preciznost, osjetljivost, te detekcijske granice metode ICP – AES. Točnost metode određena je na temelju iskoristivosti, a osjetljivost iz nagiba kalibracijske krivulje. Preciznost metode je za gotovo sve elemente i sve uzorke do 15 %.

Rezultati provedene elementne analize uspoređeni su s podacima dostupnima u literaturi pri čemu za većinu vrijednosti postoji dobro poklapanje.

Od makroelemenata važnih za ljudsko zdravlje, u orašastim plodovima najzastupljeniji je K (od 44 mg g⁻¹ u lješnjaku, do 4160 μg g⁻¹ u bademu), dok je Na najmanje (od 127,4 μg g⁻¹ u lješnjaku do 39,4 μg g⁻¹ u orahu).

Od mikroelemenata najviše je Cu, Fe, Mn i Zn. Udio Cu (24 μg g⁻¹) u indijskom je orašiću trostruko veći od njegova udjela u orahu (7 μg g⁻¹) i dvostruko u bademu (11 μg g⁻¹). Udio Fe podjednak je kod gotovo svih orašastih plodova (35 μg g⁻¹), osim kod indijskog orašića gdje je gotovo dvostruko veći (61,2 μg g⁻¹). Najviše Mn (33,5 μg g⁻¹ i 44 μg g⁻¹) imaju orah i lješnjak, dok je udio u indijskom orašiću dvostruko niži, a u brazilskom orašiću trostruko niži. Izuzev nešto većeg udjela Zn u indijskom orašiću (33,3 μg g⁻¹), u svim orašastim plodovima udio Zn je podjednak (23 μg g⁻¹). Preostali istraživani mikroelementi (B, Ba i Sr) prisutni su u malim i podjednakim udjelima u većini vrsta orašastih plodova, a znatnije je odstupanje primijećeno za nešto veći udio u Sr (102 μg g⁻¹) u brazilskom orašiću i B u bademu (29 μg g⁻¹).

Toksični elementi (V, Co, Pb, Ni) koji mogu imati štetno djelovanje na ljudski organizam u svim su uzorcima orašastih plodova prisutni u vrlo niskim udjelima ili ispod detekcijskih granica (< 0,025 μg L⁻¹), stoga ne postoji mogućnost trovanja njihovom konzumacijom.

Svakodnevna konzumacija orašastih plodova znatno doprinosi preporučenom dnevnom unosu za pojedine elemente pa je dovoljno pojesti 20 g indijskog oraščića da se zadovolji potreban dnevni unos 53,2 % Cu i 21,8 % Cr. S 20 g lješnjaka ostvaruje se preporučeni dnevni unos 18,6 % K i 38 % Mn, a sa 100 g oraha 24 % Fe, 33 % Mg, 10 % Ca i 23 % Zn.

Dobivene vrijednosti za udjele elemenata potvrdile su da su orašasti plodovi izuzetno važni za zdravlje, jer sadrže važne esencijalne kemijske elemente neophodne za zdravlje ljudi.

**INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA I
SREDNJOŠKOLSKA NASTAVA KEMIJE**

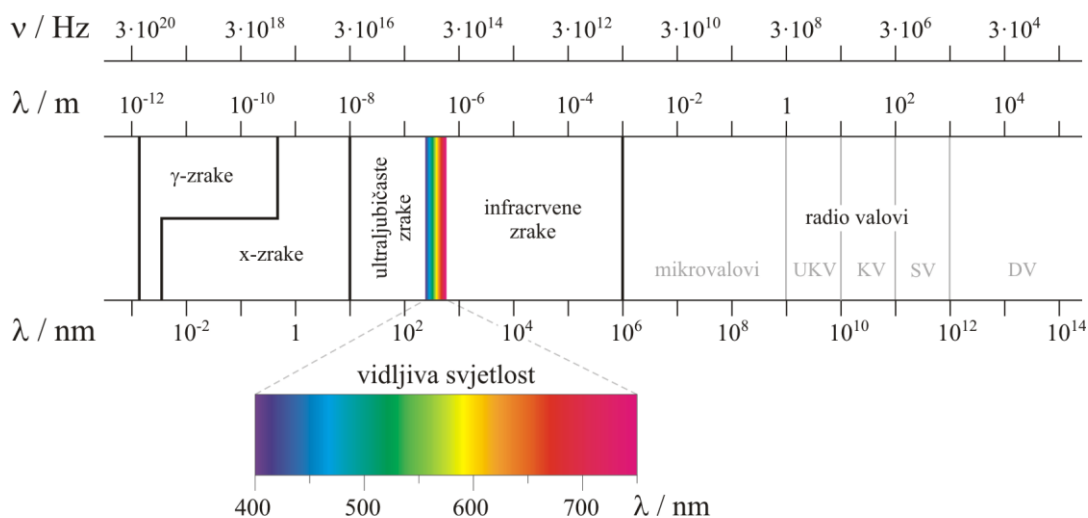
Metodički dio diplomskog rada

§ 6. INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA I SREDNJOŠKOLSKA NASTAVA KEMIJE

6.1. Spektroskopske metode

Spektroskopske metode temelje se na interakciji tvari i elektromagnetskog zračenja prilikom koje dolazi do energijskih promjena, a područja primjene su kvalitativno, kvantitativno i strukturno određivanje tvari.

Elektromagnetsko zračenje predstavlja oblik energije čije ponašanje opisuju valna i čestična svojstva, a čija je priroda razjašnjena razvojem kvantne mehanike početkom 20. stoljeća. Svojstva kojima se elektromagnetsko zračenje opisuje kao val su amplituda, valna duljina i frekvencija. Međusobno okomito električno i magnetsko oscilirajuće polje šire se linearno kroz prostor konstantnom brzinom svjetlosti. Prema kvantnoj teoriji elektromagnetsko se zračenje sastoji od snopa čestica (fotona). Energija fotona obrnuto je proporcionalna valnoj duljini, a proporcionalna frekvenciji. Tvar može apsorbirati foton zračenja pri čemu se energija tvari mijenja, no apsorpcija se odvija samo ako energija zračenja odgovara razlici energije između osnovnog i pobuđenog stanja. U protivnom, rezultat je raspršenje zračenja. Frekvencije i valne duljine elektromagnetskog zračenja mogu poprimiti vrijednosti nekoliko redova veličina, a spektar se dijeli na više područja ovisno o vrsti energijskih prijelaza pri apsorpciji ili emisiji zračenja atoma i molekula. Granice spektralnih područja nisu čvrsto definirane i prikazane su na slici 19.



Slika 19. Spektralna područja elektromagnetskog zračenja⁷⁷

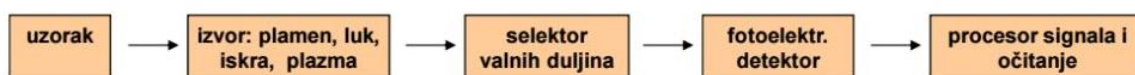
Moguća posljedica apsorpcije zračenja je emisija svjetlosti kada atom, odnosno molekula u pobuđenom stanju emitira foton određene frekvencije i prelazi iz stanja više energije u stanje niže energije. Broj frekvencija ovisi o broju dozvoljenih prijelaza elektrona i o uvjetima ekscitacije (temperatura, elektronska gustoća). Skup svih frekvencija čini atomski spektar.

6.2. Atomska spektrometrija

Metode atomske spektrometrije sastoje se od kvantitativne razgradnje uzoraka za analizu i atomizacije uzorka. U nastalim atomima, u plinovitoj fazi, dolazi do energijskih prijelaza elektrona. Svaki je energijski prijelaz visoko selektivan, karakteriziran uskom linijom u spektru i proporcionalan brojnosti atoma pojedine vrste kemijskog elementa u uzorku. Mjerena svojstva su valna duljina i intenzitet elektromagnetskog zračenja.

Zbog sve češće primjene atomske emisijske spektrometrije (u toksikologiji, geologiji, forenzici, nanotehnologiji, znanosti o materijalima, kontroli industrijske proizvodnje i kontroli hrane) važno je opisati i razvoj i usavršavanje metode. Atomska spektrometrija općenito pripada u skupinu modernih metoda čije se djelovanje pretežno temelji na fizikalnim procesima, a uključuje atomsku emisijsku spektrometriju (AES), atomsku apsorpcijsku spektrometriju (AAS), atomsku fluorescencijsku spektrometriju (AFS) i rentgensku fluorescencijsku ili emisijsku spektrometriju (XRF i XRE).

Atomska emisijska spektrometrija prva je metoda korištena za kvalitativnu i kvantitativnu elementnu analizu, a u istu se svrhu uz modernizaciju instrumenata, obrade podataka i metodologije, koristi i danas. Nakon stvaranja ideje o novoj analitičkoj metodi, objavljuje se opis uspješne demonstracije s instrumentom dobrih svojstava (detekcijske granice, preciznost, točnost, utjecaj interferencija i slično). Shematski prikaz procesa emisijske spektroskopije prikazan je na slici 20.



Slika 20. Shematski prikaz postupka emisijske spektroskopije

Najviše je usavršavanja instrumenata za specifične primjene u atomskoj emisijskoj spektrometriji postignuto promjenama u načinu atomizacije, tj. pobuđivanja. Najčešće korišteni izvori energije za atomizaciju su: plamen, peč, električni izboj, luk, lučna plazma, induktivno spregnuta plazma i mikrovalno inducirana plazma.

Plamena emisijska spektrometrija (FES) najstarija je atomska emisijska metoda određivanja kemijskih elemenata uz pomoć njihova karakteristična spektra. Počeci nastanka sežu u 1752. godinu kada je Thomas Melville primijetio da morska sol i drugi kemijski spojevi mijenjaju boju plamena alkohola. 1826. godine se za promatranje promjena boje plamena počeo koristiti spektroskop, a teorijske i eksperimentalne temelje metodi plamene emisijske spektrometrije postavili su Robert Wilhelm Bunsen i Gustav Kirchhoff 1860. godine.

Bunsenov plamenik izumljen je samo nekoliko godina kasnije, a njegov plamen postaje transparentan medij u kojem emisijske linije atoma kemijskih elemenata mogu biti jasnije promatrane. U isto je vrijeme Kirchhoff uočio da se ranije opisane apsorpcijske linije podudaraju s emisijskim linijama. Također, spektralne emisijske linije atoma (iona) metala na određenim valnim duljinama neovisne su o vrsti vezanih aniona.

Kao i u plamenoj emisijskoj spektrometriji, i iskra visokog napona bila je poznata mnogo ranije od njezinog korištenja u elementnoj analizi. 1873. godine Joseph Norman Lockyer je primijetio da iskra visokog napona djeluje na kemijske spojeve različitih prostornih rasporeda atoma. Osim toga, uočeno je da su snimljeni emisijski spektri unutar iskre, funkcije koncentracija kemijskih elemenata. George Harrison je 1939. godine sastavio detaljnu tablicu s valnim duljinama i time pridonio lakšoj identifikaciji spektralnih linija. Ubrzo nakon toga, emisijska spektrometrija uz iskru visokog napona postala je prihvaćena širom svijeta, osobito u metalurškoj industriji, zbog velike brzine i manjeg utjecaja matrice.

Mikrovalno inducirana plazma, za razliku od ranije navedenih izvora predstavlja novije dostignuće, pa modifikacije za poboljšanje nisu rijetke ni danas u laboratorijima širom svijeta.

Osim u usavršavanju izvora energije za atomizaciju, modifikacije su u instrumentima za emisijsku spektrometriju provedene i u sistemima disperzije, te detektorima, a osim toga daljnja poboljšanja moguća su i budućnosti.⁷⁸

6.2.1. Povijest razvoja ICP – AES metode

William Thomson je svojim eksperimentom prvi puta uočio pojavu inducirano spregnute plazme koja je dobivena pražnjenjem Leydenove boce (najstariji oblik električnog kondenzatora) kroz uzemljenu zavojnicu u zasebnoj cijevi pod niskim tlakom. Tu je pojavu također iskorištavao za pobuđivanje različitih plinova čije je spektre proučavao.

George Babat je 1942. godine eksperimentom proizveo induktivno spregnutu plazmu pri atmosferskom tlaku. Također, razlikovao je i opisao dva tipa plazme, plazmu nastalu djelovanjem električnog polja i drugu, vrtložnu (poput prstena) nastalu pomoću naizmjeničnog magnetskog polja. Prvi radovi s induktivno spregnutom plazmom u argonu nastali su radom znanstvenika Thomasa Reeda, a za dobivanje induktivno spregnute plazme odabran je argon zbog lakoće kojom se ionizira. Otvorena cijev s mjedenim ventilom imala je ulaz plina umetnut unutar namotaja generatora, a unosom grafitnog štapa formirana je preteča plazme. Na taj je način potaknuta inicijalna ionizacija argona, koji postaje provodljiv i u konačnici formira plazmu.

1964. godine Stanley Greenfield konstruirao je prvi uređaj za dobivanje induktivno spregnute plazme, a William Jones i Christopher Thomas Berry otkrili su mogućnost uporabe prstenaste induktivno spregnute plazme kao spektroskopskog izvora. Osim prstenaste, otkrivena je i čvrsta plazma, no istraživanjima su uočene važne prednosti prstenaste plazme. Većina je energije rasuta u vanjskim slojevima plazme, pa se električni konduktivitet ne mijenja s prisutnošću atoma uzorka. Jezgra plazme je duga, sužena i oštro ograničena, pa je emisija po jedinici površine visoka, a osjetljivost dobra.⁷⁹ 1973. godine tim znanstvenika na Sveučilištu u Iowi je pod vodstvom Velmera Fassela izradio prvi komercijalni instrument i poboljšao svojstva ICP – AES metode.

6.3. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

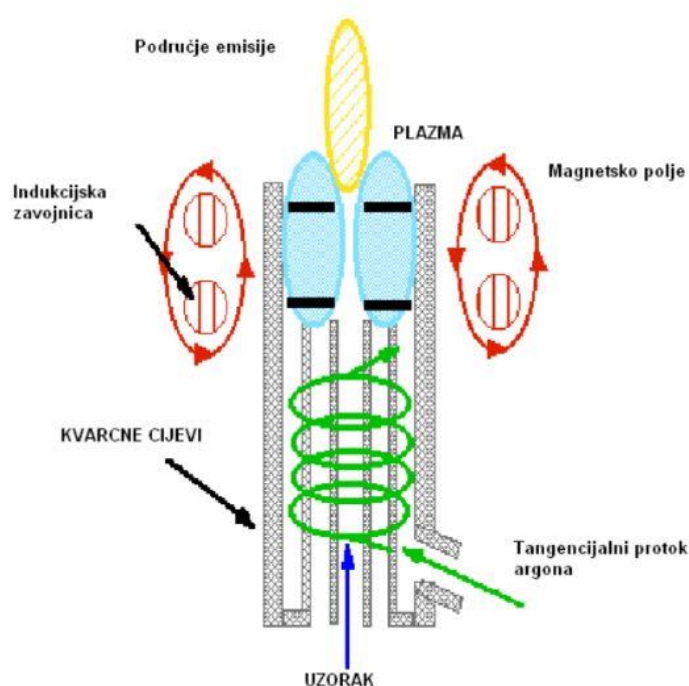
Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu, te u manjoj mjeri masena spektrometrija, sve više zamjenjuju ostale metode u analizi tragova metala. ICP – AES metoda pogodna je za simultano određivanje koncentracija velikog broja kemijskih elemenata u vrlo različitim uzorcima, što je suprotnost atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji tijekom koje se određuju koncentracije jednog ili dva kemijska elementa.⁸⁰

6.3.1. Plazma: što je, kako nastaje i kako djeluje?

ICP spektrometar je uobičajeno kvarcna cijev kojom prolazi argon, s vanjskim indukcijskim namotajem bakrene cijevi (pozlaćene ili posrebrene) na vrhu. Taj namotaj uzrokuje stvaranje elektromagnetskog polja unutar plamenika čime se formira plazma temperature 5000 K.⁸¹ Plazma u svim svojim dijelovima nema jednaku temperaturu već se razlikuju točno definirana temperaturna područja, pa temperatura poprima vrijednosti od 5000 – 10000 K.

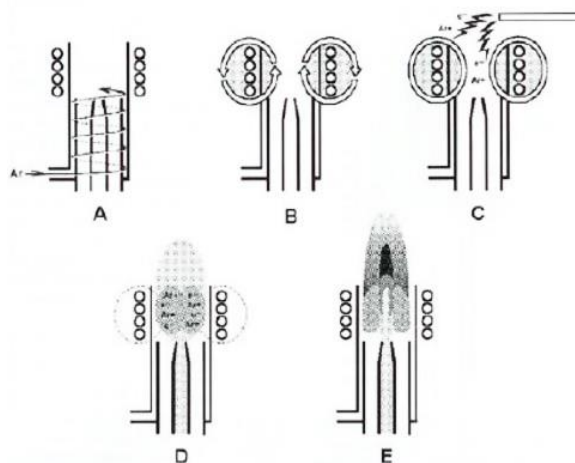
Plazma se ubraja u termičke izvore energije, koji uz monokromatore, detektore i pretvornike signala čine temeljne komponente spektroskopskih instrumenata. Plazma je visokoionizirani (najčešće inertni) plin, a razmatra se kao posebno stanje materije. Sastoji se od smjese neutralnih, pozitivno nabijenih čestica i elektrona. Potvrdu postojanja drugačijeg stanja materije dao je William Crookes 1879. godine. Naziv „plazma” uveden je 1928. godine radom Irvinga Langmuira.

Glavni dijelovi izvora (induktivno spregnute plazme) prikazani su na slici 21, a oni su redom: plazma plamenik kojeg čine tri koncentrične kvarcne cijevi kroz koje argon protječe različitim brzinama, indukcijska zavojnica na vrhu plamenika koja se sastoji od 2 – 5 namotaja bakrene žice i hlađena je vodom ili zrakom, sustav za regulaciju protoka argona i radiofrekventni generator koji može biti različitih snaga (800 – 1800 W).⁸²



Slika 21. Glavni dijelovi izvora (induktivno spregnute plazme)⁸²

Nastajanje plazme shematski je prikazano na slici 22. Prolaskom argona kroz plamenik (A), zavojnica pri vrhu plamenika se priključuje na generator uz nastajanje izmjeničnog elektromagnetskog polja (B). Iskrenjem se potiče nastajanje slobodnih elektrona u argonu (C). Magnetsko polje ubrzava slobodne elektrone te se tako potiče daljnja ionizacija argona čime se oblikuje plazma (D). Aerosol koji nosi uzorak prodire u plazmu i stvara kanal kroz središte izvora (E).⁹¹



Slika 22. Shematski prikaz nastajanja plazme⁸²

6.3.2. Prednosti ICP – AES metode

Najčešće korištena spektroskopska metoda je atomska emisijska spektrometrija koja se osim u znanstvenim institucijama primjenjuje i u 43 % obrazovnih institucija s programom učenja kemije u Sjedinjenim Američkim Državama. Sve veći broj laboratorija za svakodnevnu elementnu analizu koristi ICP – AES metodu koja, ponajviše zbog više temperature izvora (plazme), ima mnogobrojne prednosti pred plamenom atomskom emisijskom fotometrijom.

U klasičnoj plamenoj atomskoj emisijskoj fotometriji plamen razdvaja molekule na atome, pobuđuje valentne elektrone koji prelaskom iz višeg u niže energijsko stanje emitiraju zračenje. Previše energije može uzrokovati izbijanje elektrona, a ne njihovo pobuđivanje. Također, moguća je pojava pobuđivanja jednog od preostalih elektrona u atomu (ionu) što ponovno rezultira emisijom zračenja, no tada je energija emitiranog fotona manja od energije zračenja koje je pobudilo elektron. Vraćanje atoma i iona u niže energijsko stanje međusobno su kompetitivni procesi, pa ukoliko su u uzorku prisutne obje vrste čestica, utoliko će mjereni signal biti manjeg intenziteta.

Tijekom ionizacije argona kojom se stvara plazma također se oslobađaju elektroni, a u samom središtu plazme nastaje izrazito gusta struja elektrona koja smanjuje učestalost ionizacije analita. S povećanjem udaljenosti od induksijske zavojnice prema plaštu plazme gustoća nakupine elektrona se smanjuje. Uz to, smanjuje se i temperatura, no ona je još uvijek dovoljno visoka da potakne ionizaciju. Takav gradijent stvara regiju plazme u kojoj dominiraju nabijene vrste, a učestalost nenabijenih vrsta je znatno manja.⁸³

Primjenom ICP – AES metode istovremeno se i u kratkom vremenu kvalitativno i kvantitativno određuje veliki broj kemijskih elemenata (do čak 70), granice detekcije su niže od vrijednosti u drugim metodama (metoda plamene atomske apsorpcijske ili plamene emisijske spektroskopije ili UV- VIS apsorpcijske spektroskopije) za veliki broj metala (ispod ppb), a preciznost velika ($RSD < 1 \%$). Osim toga ICP – AES metodom u uzorcima se mogu odrediti i kemijski elementi nemetalnog karaktera (poput broma, fosfora i sumpora),⁸⁸ te je za analizu dovoljna mala količina uzorka (1 mL otopine koja se u instrument uvodi kao aerosol).⁸⁴ Također, metoda omogućava jednostavnu elementnu analizu, bez prevelikih troškova.⁸⁵ Osim visoke osjetljivosti i smanjenja utjecaja matrice uporabom ove metode uklanjaju se interferencije fosfora i aluminijska s emisijom kalcija.⁸⁷

6.3.3. Temperatura plazme

Temperatura plazme izravno utječe na stvaranje pobuđenih stanja i atomizaciju analita, a samim time i na djelotvornost metode uz induktivno spregnutu plazmu. Postoji nekoliko definicija i metoda za određivanje temperature plazme.

Najčešća je definicija temperaturnog pobuđenja opisana Boltzmannovom jednačbom koja se odnosi na čestice u različitim kvantnim razinama u istom ionizacijskom stanju analita, a izraz koji ju opisuje je:

$$\ln [(I \lambda / (g_k A))] = \ln C + (-E_k / k T) \quad (1)$$

pri čemu je I intenzitet, λ valna duljina emisije, g_k statistička vrijednost za prijelaz iz višeg energijskog stanja u niže tijekom emisije, A Einsteinov koeficijent za spontanu apsorpciju, C konstanta, E_k energija višeg energijskog stanja, k Boltzmannova konstanta i T temperatura.⁹⁰

Rješavanje izraza 1 za nekoliko dobro definiranih prijelaza omogućava izračunavanje temperature pobuđenja. Boltzmannova, a isto tako i Saha-ova metoda koriste intenzitete emisije željeza zbog velikog broja spektroskopskih parametara dostupnih u literaturi o prijelazima pobuđenih Fe atoma i Fe⁺ iona. Obje metode uključuju pretpostavku da u plazmi postoji lokalna termodinamička ravnoteža, što podrazumijeva da se energija mijenja pretežno zbog sudara, uz mali doprinos zračenja.

Boltzmannova aproksimacija također može opisati raspodjelu atoma (ili iona) u različitim elektronskim stanjima, a opisana je izrazom:

$$n(p) = n \left(\frac{g_p}{Q(T)} \right) \exp \left(\frac{-E_p}{kT} \right) \quad (2)$$

gdje su $n(p)$ množina atoma (ili iona) u pobuđenoj razini p , n ukupna množina atoma (ili iona), g_p statistički značaj razine p , E_p energija koja atom (ili ion) može potaknuti na prijelaz u stanje p , k Boltzmannova konstanta i $Q(T)$ elektronska funkcija temperature T .⁸⁶

Intenzitet I_{pq} emisije od višeg energijskog stanja (p) do nižeg energijskog stanja (q) u odnosu je s $n(p)$ izrazom:

$$I_{pq} = \frac{n(p) A_{pq} h c L}{4 \pi \lambda_{pq}} \quad (3)$$

U izrazu 3 L je duljina zraka iz izvora, A_{pq} vjerojatnost prijelaza u spontanoj emisiji, λ_{pq} valna duljina emisije, h Planckova konstanta, a c brzina svjetlosti.

Kombinacijom izraza 2 i 3 i pretvorbom u logaritamski oblik dobiva se:

$$\ln \left(\frac{I_{pq} \lambda_{pq}}{g_p A_{pq}} \right) = \frac{-E_p}{kT} + \ln \left(\frac{n L h c}{4 \pi Q(T)} \right) \quad (4)$$

Kako je logaritamska vrijednost na desnoj strani konstantna za sve atome (ili ione) željeza u plazmi $\ln \left(\frac{I_{pq} \lambda_{pq}}{g_p A_{pq}} \right)$ linearno ovisi o E_p , a nagib je jednak $\frac{-1}{kT}$. Većina rezultata dobivena ovakvim načinom određivanja pokazuje da temperatura plazme iznosi $4,56 \pm 0,33 \cdot 10^3$ K.

Pomoću Saha-ovog izraza definira se odnos između množine iona n_i i množine atoma n_a :

$$\frac{n_e n_i}{n_a} = \left(\frac{2 \pi m_e k T}{h^2} \right)^{3/2} \left(\frac{2 Q_i}{Q_a} \right) \exp \left(\frac{-E_i}{k T} \right) \quad (5)$$

gdje su Q_i i Q_a odgovarajuće funkcije iona, odnosno atoma, n_e je broj elektrona, m_e masa elektrona, a E_i energija ionizacije atoma.

Kombinacijom izraza 2,3 i 5 dobiva se

$$n_e = \left(\frac{I_{pq} \lambda_{pq} A_{kl}^+}{I_{kl}^+ \lambda_{kl}^+ A_{pq}} \right) \left(\frac{2 g_k}{g_p} \right) \left(\frac{2 \pi m_e k}{h^2} \right)^{3/2} T^{3/2} \exp \left(\frac{-E_i - E_k^+ + E_p}{k T} \right) \quad (6)$$

Izraz 6 sadrži dva mjerljiva parametra (odnos I_{pq}/I_{kl}^+) i dva nepoznata (n_e i T). Koristeći vrijednost temperature određene Boltzmannovom metodom može se odrediti vrijednost gustoće elektrona.⁹³

6.3.4. Elektromagnetska indukcija u induktivno spregnutoj plazmi

Za objašnjavanje rada ICP spektrometra važno je opisati fenomen elektromagnetske indukcije koji omogućava dovoljnu količinu energije potrebnu za održavanje visoke temperature. Djelovanje elektromagnetske indukcije može se opisati i prikazati jednostavnom demonstracijom za koju je potrebno: radio (generator radio frekvencija), baterija, magnetsko postolje s antenom i fluorescencijska lampa. Uključivanje radija i držanje fluorescencijske lampe odmah do navoja na anteni, dovodi do nastajanja zvuka. Indukcija se može objasniti kao nastajanje elektromotorne sile promjenom magnetskog toka na konduktoru. Ulogu konduktora u ovoj demonstraciji imaju atomi žive unutar fluorescencijske lampe, a promjenjivo magnetsko polje nastaje na anteni emitiranjem zračenja frekvencije 27 MHz. Uz takvo induksijsko djelovanje nastaje elektromotorna sila koja uzrokuje međusobno sudaranje atoma žive od kojih neki prelaze u pobuđeno energijsko stanje. Kada pobuđeni atomi prelaze u osnovno stanje oslobađa se energija u obliku UV zračenja. Namotaji u fluorescencijskoj lampi apsorbiraju UV-zračenje i emitiraju zračenje vidljivih valnih duljina. Ovom je demonstracijom također jasno opisan prijenos energije do atomskih vrsta pojavom indukcije.⁸⁹

6.4. Implementacija induktivno spregnute plazme u nastavi kemije

U nastavi kemije induktivno spregnuta plazma nije uvrštena u nastavni program ni za osnovnu, ni za srednju školu. Za razinu osnovnoškolskog obrazovanja, ovakva situacija ne iznenađuje.

Problemi koji nastupaju tijekom srednjoškolskog obrazovanja su složenost sadržaja, široki niz prethodno stečenih znanja i vještina koje su potrebne za razumijevanje fenomena induktivno spregnute plazme, a zacijelo će kao veliki problem brojni nastavnici navesti nedostatak vremena uz neprepoznavanje svakodnevne primjene. Predmetni kurikulum kemije u okviru nacionalnog kurikuluma u okviru nastavne teme „Svjetlost i tvari” za 4. razred gimnazijskog usmjerenja predlaže odgojno-obrazovni ishod „analiza interakcije tvari s elektromagnetskim zračenjem”.⁸⁷ Osim toga, učenje o spektrima i elektromagnetskom zračenju zastupljeno je u 1. razredu gimnazijskog usmjerenja kao dodatni sadržaj u nastavnoj temi „Građa atoma” s primjerom spektra atoma vodika, te u 3. razredu pri učenju nastavne teme „Alkalijski i zemnoalkalijski metali” kada se pokusima bojenja plamena povezuju promjene energijskih stanja elektrona u atomima s spektrima.

Promjene u nacionalnom kurikulumu i prihvaćanje istih, nastavnicima kemije bi omogućile slobodu u kreiranju tijeka nastavnog sata te uvrštavanje izbornih tema u nastavu kemije. Prema tome, fenomen induktivno spregnute plazme mogao bi se uvrstiti u nastavnu cjelinu „Svjetlost i tvari” u 4. razredu gimnazijskog usmjerenja, te u 1. razredu tijekom nastavne teme „Tvari” kao primjer metode odjeljivanja, tj. kvalitativne i kvantitativne analize.⁸⁸

6.4.1. Što učenicima znači znanje o induktivno spregnutoj plazmi?

Život u svijetu prepunom promjena, inovacija i otkrića, osobito u području prirodoslovnih znanosti i tehnologije, zahtjeva rad i usavršavanje u postojećem znanju i vještinama. Od 1964. godine kada je konstruiran prvi uređaj za dobivanje induktivno spregnute plazme do danas kada su osmišljena brojna unaprjeđenja u instrumentu i metodi, primjena induktivno spregnute plazme kao izvora u spektroskopskim mjerenjima sve je češća. Ono što je važno jest da su znanja o plazmi kao fenomenu uvrštena u mnoge nastavne programe kemije i fizike zemalja čiji obrazovni sustavi slove kao najbolji u svijetu.

Danas je atomska emisijska spektrometrija, koja kao izvor koristi plazmu, najraširenija metoda za elementnu analizu različitih uzoraka, a posebno se primjenjuje u području kemije, biologije, te u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Opće znanje o suvremenim znanstvenim metodama i istraživanjima kod učenika razvija kritičko mišljenje i znatno doprinosi razvoju znanstvene pismenosti, bez koje čovjek danas ne može biti aktivan član društva.

Nastavni program kemije svakako bi na kraju 4. razreda gimnazijskog usmjerenja trebao sadržavati temeljna znanja o najvažnijim spektroskopskim metodama, pa tako i o fenomenu induktivno spregnute plazme. Razumijevanje navedenog fenomena zahtjeva brojna prethodno stečena znanja i vještine, kako iz kemije, tako i iz fizike i matematike, pa nakon ostvarenja izlaznih obrazovnih ishoda učenici dobivaju potreban uvid u svakodnevnu primjenu kemije i smislen kraj učenja prirodoslovlja.

6.5. Prijedlog nastavnog sata

Predloženi nastavni sat moguće je primijeniti u IV. razredu gimnazijskog usmjerenja, u nastavnoj cjelini: *Svjetlost i tvari*, nastavnoj temi: *Atomska emisijska spektrometrija uz fenomen plazme*.

Oblik rada: demonstracija, grupni

Prethodno potrebna znanja, vještine i sposobnosti:

- **opisati** spektar elektromagnetskog zračenja
- prema izrazima $v = \frac{c}{\lambda}$, $\nu = \frac{1}{\lambda}$ i $E = \frac{h \times c}{\lambda}$ **izračunati** frekvencije, valne brojeve i energije za pojedine linije određenih valnih duljina
- **navesti** vrijednosti konstantnih veličina (c , h)
- **usporediti** energije spektralnih linija različitih valnih duljina
- **objasniti** pojmove apsorpcije i emisije
- na temelju shematskog prikaza postupka apsorpcijske spektroskopije **dopuniti** shemu postupka emisijske spektrometrije
- **razlikovati** pojam osnovnog od pojma pobuđenog elektronskog stanja
- **razlikovati** kvantitativno i kvalitativno određivanje
- **opisati** učestalost primjene atomske emisijske spektroskopije

- opisati građu plazma-kugle i način rada
- objasniti vodljivost ljudskog tijela i novčića na temelju provedenih pokusa s plazma-kuglom
- objasniti pojam izolatora

6.5.1. Što nakon nastavnog sata?

Nastavna cjelina *Svjetlost i tvari* među posljednjim je cjelinama koje se obrađuju na kraju 4. razreda. Nakon provedenog nastavnog sata uslijedilo bi učenje o nekoj od preostalih spektroskopskih metoda, poput spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije za koju je, s obzirom na kompleksnost i učestalost svakodnevne primjene, potrebno utrošiti više nastavnih sati. Znanje stečeno o spektroskopskim metodama od velike je važnosti za budući svakodnevni život učenika, a također, nekima od njih ta će znanja olakšati studije prirodoslovnih predmeta.

6.5.2. Plazma-kugla

Otkriće plazma-kugle, nakon provedenih pokusa s visokofrekventnim strujama u vakuumskoj staklenoj cijevi tijekom proučavanja svojstava visokog napona, pripisuje se znanstveniku bez čijeg rada svijet danas ne bi bio takav kakav jest. Naravno, riječ je o Nikoli Tesli.

Plazma-kugla uobičajeno je okruglog oblika, napunjena smjesom plinova (He i Ne ili rjeđe Xe i Kr) pri gotovo atmosferskom zraku, kroz koju prolazi visokofrekventna izmjenična struja stvorena visokonaponskim transformatorom koji se nalazi u postolju i povećava napon i frekvenciju struje. Manja kugla unutar veće osnovne plazma-kugle služi kao elektroda, od koje se niti plazme šire do vanjskog stakla. Plazma nastaje kao rezultat ionizacije plinova u samoj kugli, a posljedica je djelovanja izuzetno visokog napona. Jasno vidljiva karakteristika većine plazmi je sjaj. Električno polje u početku usmjerava gibanje zrakâ plazme, a kasnije se njihov smjer mijenja zbog miješanja plina unutar kugle.⁸⁹

Stavljanjem ruke na staklo mijenja se visokofrekventno polje, uzrokujući seobu jedne zrake s unutrašnje kugle do točke dodira na staklu. Ljudsko tijelo se polarizira, a dio električne struje prolazi kroz tijelo do uzemljenja. Kako se radi o struji male jakosti sam je postupak bezopasan, pa tako i primjenjiv u školi.

6.5.3. Nastavna strategija za nastavni sat uz plazma-kuglu

Nastavnu temu atomske emisijske spektrometrije uz demonstraciju pojave plazme pomoću plazma-kugle kao jednog od najčešćih izvora, potrebno je obraditi tijekom jednog 90-minutnog nastavnog sata.

Učenici su podijeljeni u pet grupa u razredu, a na početku nastavnog sata učenicima su zadani zadaci za primjenu prethodno stečenih znanja o elektromagnetskom zračenju, apsorpciji, emisiji, te spektroskopskim metodama.

U središnjem dijelu nastavnog sata učenici rješavanjem zadataka, razgovorom i raspravom uočavaju učestalost primjene atomske emisijske spektrometrije u svakodnevnom životu, te raspravljaju o važnosti primjene atomske emisijske spektrometrije u pojedinim područjima s konkretnim primjerima. Najveći dio predloženog nastavnog sata vezan je uz demonstraciju fenomena plazme pomoću plazma-kugle. Učenici prate demonstracijske pokuse s plazma-kuglom i rezultate bilježe na radnom listiću. Razgovorom se opisuju nastanak plazme unutar ICP spektrometra koji se koristi u analitičke svrhe.

Radni listić (vidi Dodatak, str. 61) daje uvid u strukturu nastavnog sata. Prvi zadatak učenicima omogućava vježbanje matematičkih izračuna frekvencije i valnog broja D-linije pri određenoj valnoj duljini. U pitanju 1 učenici prema izrazima: $\nu = \frac{c}{\lambda}$, $\nu = \frac{1}{\lambda}$ i $E = \frac{h \times c}{\lambda}$ izračunavaju energiju fotona. Prema izrazu za izračunavanje energije i slici kontinuiranog spektra Sunčevog zračenja učenici u pitanju 2. međusobno uspoređuju energije različitih linija. U zadatku 2 učenici pojmovima o elektromagnetskom zračenju, apsorpciji i emisiji dopunjavaju rečenice. Shematski prikaz u zadatku 3 učenicima pomaže u objašnjavanju apsorpcije i emisije, te osnovnog i pobuđenog stanja (pitanje 3). Poznavajući shematski prikaz apsorpcijske spektroskopije, učenici samostalno mogu objasniti postupak emisijske spektroskopije (zadatak 4). Učenici u grupama raspravljaju o načinima i učestalosti kvalitativnog i kvantitativnog određivanja kemijskih elemenata u realnim uzorcima (pitanja 4, 5, 6). Učenici se upoznaju s načinom rada i građom plazma-kugle, a izvođenjem pokusa dobivaju uvid u njezin način rada.

Izlazni obrazovni ishodi nastavnog sata *Atomska emisijska spektrometrija uz fenomen plazme*:

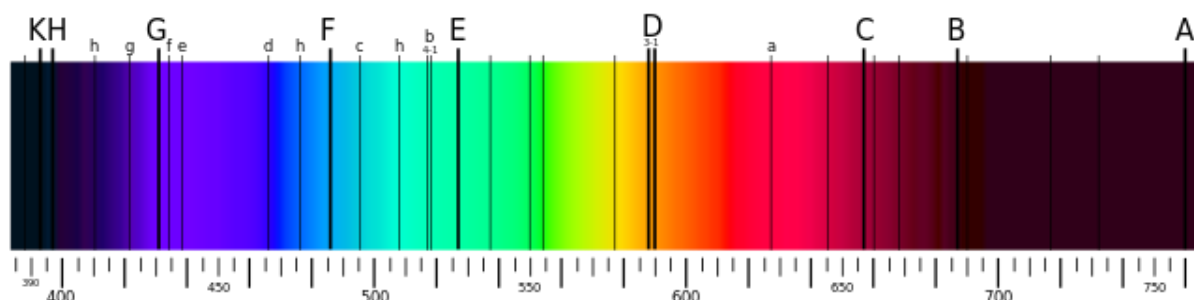
- shematski prikazati postupak atomske emisijske spektrometrije
- navesti načine primjene atomske emisijske spektrometrije u svakodnevnom životu
- objasniti fenomen nastanka plazme unutar plazma-kugle
- opisati promjene vidljive unutar plazma-kugle nakon provedenih pokusa

Izlazni obrazovni ishodi nakon nastavnog sata rezultirat će boljim razumijevanjem postupka atomske emisijske spektrometrije i plazme kao izvora, te biti uvod u daljnje poučavanje spektroskopskih metoda.

§ 7. DODATAK

7.1. Radni listić: „Od Sunca do plazme”

Zadatak 1 Godine 1817. Josef Fraunhofer je u kontinuiranom spektru Sunčevog zračenja uočio brojne crne linije pri određenim valnim duljinama i označio ih slovima kako je prikazano u slici 1.



Slika 1. Kontinuirani spektar Sunčeva zračenja s Fraunhoferovim oznakama

1859. godine Gustav Kirchhoff je utvrdio da su u Sunčevom spektru vidljive tzv. D-linije koje su posljedica apsorpcije zračenja natrijevih atoma. Valna duljina natrijeve D-linije iznosi 589 nm. Izračunaj frekvenciju i valni broj promatrane linije.

$$v = \frac{c}{\lambda} = \frac{3 \times 10^8 \text{ m/s}}{589 \times 10^{-9} \text{ m}} = 5,09 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$$

$$v = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{589 \times 10^{-9} \text{ m}} = 1,70 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$$

Pitanje 1 Koja je energija fotona natrijeve D-linije pri 589 nm?

$$E = \frac{h \times c}{\lambda} = \frac{(6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}) \times (3 \times 10^8 \text{ m/s})}{589 \times 10^{-9} \text{ m}} = 3,37 \times 10^{-19} \text{ J}$$

Pitanje 2 Pomoću gornje slike kontinuiranog spektra Sunčevog zračenja usporedi energije zadanih linija s energijom natrijeve D-linije.

Linija E ima **veću/manju** energiju od natrijeve D-linije.

Linija F ima **veću/manju** energiju od natrijeve D-linije.

Obje linije imaju veću energiju od energije natrijeve D-linije. Određene su pri nižim valnim duljinama, a kako je energija obrnuto proporcionalna valnoj duljini, ona ima veću vrijednost za linije E i F.

Zadatak 2 Tekst dopuni potrebnim pojmovima.

Interakcijom _____ zračenja i molekula tvari, dolazi do _____ fotona,

elektromagnetskog

apsorpcije

ako energija fotona odgovara razlici _____ među pojedinim energijskim stanjima

energija

elektrona u atomu. U protivnom dolazi do _____ zračenja. Molekule ili atomi mogu

raspršenja

prijeći u _____ stanje, a iz tog se stanja spontano vraćaju u _____ stanje

pobuđeno

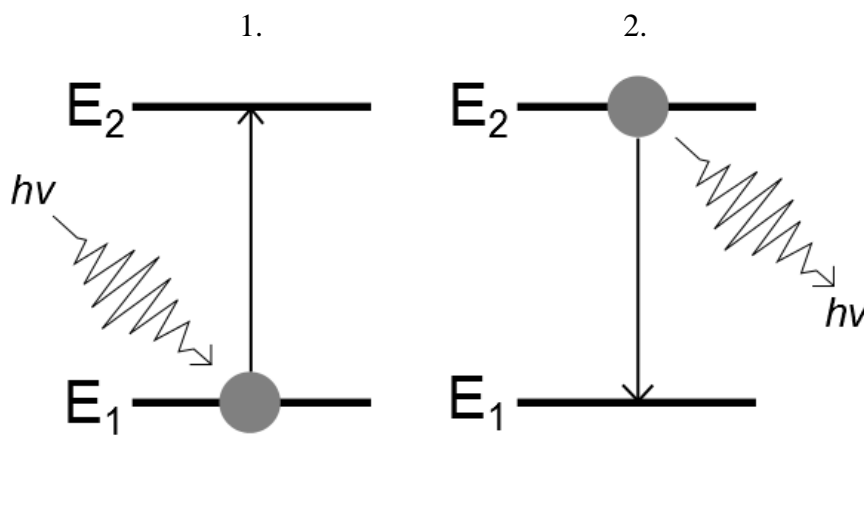
osnovno

emisijom _____.

fotona, energije

Zadatak 3 Na slici 2 prikazane su dvije moguće posljedice interakcije zračenja i jedinki tvari.

Na crtu ispod svake skice upiši naziv procesa, te svakog od njih obrazloži.



Slika 2. Moguće posljedice interakcije zračenja i jedinki tvari

Zadatak 5 Na stolu se nalazi plazma-kugla. Uz pomoć nje i slike opiši od čega je izrađena i predloži način rada.



Plazma-kugla je okruglog oblika, s vidljivim sjajem, napunjena mješavinom plinova kroz koju prolazi izmjenična struja nastala radom transformatora (u postolju). Od manje kugle koja se nalazi unutar veće osnovne plazma-kugle šire se niti plazme.

POKUS 1. „Postani i ti Tesla!”

Pribor: plazma-kugla, novčić, žarulja

KORAK 1 Prstom dotakni neku točku (po volji) na plazma-kugli. **Zabilježi opažanja.**

Gotovo sve su se niti spojile u jednu veliku, izraženu nit plazme koja se usmjerila točno u mjesto dodira na staklenoj kugli.

Pitanje 7 Objasni opažanje iz **KORAKA 1.**

Ljudsko tijelo se polarizira, a dio električne struje prolazi kroz tijelo do uzemljenja. Električna struja nastaje unutar svakog vodljivog objekta blizu kugle (što je i ljudsko tijelo), jer staklo ne sprječava širenje elektromagnetskog polja, koju stvara električna struja koja teče kroz plazmu. Na taj način tijelo privlači veću količinu slobodnog naboja.

KORAK 2 Novčićem dotakni neku točku (po volji) na plazma-kugli. **Zabilježi opažanja.**

Kao i u prethodnom koraku 1 vidljiva je jedna izražena nit plazme usmjerena prema novčiću.

Pitanje 8 Objasni opažanja iz **KORAKA 2.**

Novčić se kao dobar vodič polarizira pod utjecajem električnog polja, te privlači znatno veću količinu slobodnog naboja.

KORAK 3 Plazma-kugli primakni žarulju. Zabilježi opažanja.

Žarulja zasvijetli, ali samo ako je dovoljno blizu plazma-kugli.

Pitanje 9 Zbog čega žarulja ne svijetli na bilo kojoj udaljenosti od plazma-kugle?

Da bi žarulja zasvijetlila potrebna je dovoljna jakost električnog polja koja može potaknuti ionizaciju živinih para unutar žarulje. Na prevelikoj je udaljenosti električno polje preslabo.

Pitanje 10 Kako nazivamo tvari koje djeluju poput stakla? Kako one djeluju i kakva im je provodnost u odnosu na primjerice, tvoje tijelo?

Nazivamo ih izolatorima. Kako u takvim materijalima nema slobodnih nositelja električnog naboja, vrlo slabo provode struju. Provodnost im je manja od ljudskog tijela.

§ 8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*) tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

NMR (engl. *Nuclear magnetic resonance*) nuklearna magnetska rezonancija

ICP – AES (engl. *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

ICP – MS (engl. *Mass spectroscopy inductively coupled plasma*) spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom

FAAS (engl. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) plamena atomska apsorpcijska spektrometrija

GFAAS (engl. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) atomska apsorpcijska spektrometrija tehnike grafitne peći

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Dora Hlebec

Datum rođenja: 29.03.1994.

Mjesto rođenja: Čakovec

Obrazovanje

2000.-2008. Osnovna škola Nedelišće

2008.-2012. Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec

2012.-2017. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2017. Nagrada Biološkog odsjeka za izniman uspjeh tijekom studija

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012.-2016. Sudjelovanje u organizaciji *Noći biologije*

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

- **predavanje:**

1. **D. Hlebec**, I. Juranović Cindrić, „Determination of micro- and macroelements in walnuts (*Juglans regia* L.)”, *SymBioSE 2016*, Vila Real, Portugal, 2016
2. **D. Hlebec**, I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, G. Stingeder, „Determination of micro- and macroelements in cashew (*Anacardium occidentale*) by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)”, *13. ASAC Junganalytiker Innen-Forum*, Beč, Austrija, 2017.

- **sudjelovanja:**

3. Simpozij studenata bioloških usmjerenja, Zagreb, Hrvatska, 2016.
4. 20. Europski kongres lepidopterologije, Podgora, Hrvatska, 2017.

Publikacije

1. I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, **D. Hlebec**, G. Stinger, „Mineral Composition of Walnuts and Walnut Oils”- u pripremi za objavljivanje

§ 10. LITERATURNI IZVORI

1. D. Hyson, B. Schneeman, P. Davis, *Journal of Nutrition* **132** (4) (2002) 703–707.
2. J. S. Amaral, S. Casal, J. A. Pereira, R. M. Seabra, B. P. P. Oliveira, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 7698–7702.
3. H. Iso, S. Sato, U. Umemura, M. Kudo, K. Koike, A. Kitamura, H. Imano, T. Okamura, Y. Naito, T. Shimamoto, *Stroke* **33** (2002) 2086–2093.
4. I. Rodushkin, E. Engström, D. Sörlin, D. Baxter, *Sci. Total Environ.* **392** (2008) 290–304.
5. L. Jorhem, B. Sundström, *J. Food Comp. Anal.* **6** (1993) 223–241.
6. M. Plessi, D. Bertelli, A. Albasini, *Food Chem.* **100** (2007) 419–427.
7. G. Lombardi-Bocca, A. Aguzzi, M. Cappelloni, G. Di Lullo, M. Lucarini, *Br. J. Nutr.* **90** (2003) 1117–1121.
8. F. Lavedrine, A. Ravel, A. Poupard, J. Alary, *Food Chem.* **58** (1-2) (1997) 135–140.
9. <http://www.rosannadavisonnutrition.com/nuts-seeds-and-nut-butters/>, (datum pristupa 20.5.2017.)
10. M. Lorgeril, P. Salen, F. Laporte, F. Boucher, J. De Leiris, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases Journal* **11** (6) (2001) 362–371.
11. J. Sabaté, K. Oda, E. Ros, *Arch Intern Med.* **170** (9) (2010) 821–827.
12. S. Cosmulescu, A. Baci, G. Achim, M. Botu, I. Trandafir, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* **37** (2) (2009) 156–160.
13. S. Yada, G. Huang, K. Lapsley, *J. Food Comp. Anal.* **30** (2013) 80–85.
14. A. M. Pawlowska, F. Camangi, A. Braca, *Food Chem.* **119** (2010) 1257–1261.
15. T. Fukuda, I. Hideyuki, Y. Takashi, *Phytochemistry* **63** (2003) 795–801.
16. J. A. Pereira, I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentao, P. B. Andrade, I. C. F. R. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra, L. Estevinho, *Food Chem. Toxicol.* **45** (2007) 2287–2295.
17. L.C. Wilms, P. C. Hollman, A. W. Boots, J. C. Kleinjans, *Mutat. Res.* **582** (2005) 155–162.
18. I. Elmadfa, K. H. Wagner, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**(2) (2003) 89–94.
19. M. Kornsteiner, K.- H. Wagner, I. Elmadfa, *Food Chem.* **98** (2006) 381–387.

-
20. S. Rajaram, J. Sabaté, *Br. J. Nutr.* **96** (2) (2006) 79–86
 21. A. R. Josse, C. W. Kendall, L. S. Augustin, P. R. Ellis, D. J. Jenkins, *Metabolism* **56** (3) (2007) 400–404.
 22. J. X. Chipponi, J. C. Bleier, M. T. Santi, D. Rudman, *Am. J. Clin. Nutr.* **35** (5) (1982) 1112–1116.
 23. P. Akhler, M. Akram, S. D. Orfi, N. Ahmed, *Nutr.* **18** (2002) 274–278.
 24. T. M. Ansari, N. Ikram, M. Najam-Ul-Haq, O. Fayyaz, I. Ghafoor, N. Khalid, *J. Boil. Sci.* **4** (2004) 95–99.
 25. WHO/FAO/IAEA. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: World Health Organization, 1996.
 26. WHO, International Programme of Chemical Safety, *Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information, 2nd ed. Vol. 2*, Geneva: World Health Organization, 1996.
 27. Patras A., Dorobantu P., *Lucrari Stiintifice* **53** (2) (2010) 57–60.
 28. C. Cabrera, F. Lloris, R. Giménez, M. Olalla, M. C. López, *Sci. Total Environ.* **308** (2003) 1–14.
 29. A. Smyth, D. Dunkler, P. Gao, K. K. Teo, S. Yusuf, M. J. O' Donnell, J. F. E. Mann, C. M. Clase, *Kidney Int.* **86** (2014) 1205–1212
 30. B. D. Rose, D. Post, B. Rose, R. Narins, *Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders*, McGraw-Hill Companies, New York, 2000.
 31. M. M. Özcan, *Iran J. Chem. Chem. Eng.* **28** (1) (2009) 57–62.
 32. M. H. Stipanuk, M. Caudill, *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*, WB Saunders, Philadelphia, 2000, str. 686–710.
 33. C. D. Arnaud, S. D. Sanchez, *Present knowledge in nutrition*, International Life Science Institute – Nutrition Foundation, Washington, D.C., 1990, str. 212–223.
 34. Z. Kroner, *Vitamins and minerals*, ABC-CLIO, LLC, California, 2011.
 35. L. Plum, L. Rink, H. Haase, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**(4) (2010) 1342–1365.
 36. A. Prakash, K. Bharti, A. B. Majeed, *Fundam. Clin. Pharmacol.* **29** (2) (2015) 131–149.
 37. M. Olivares, R. Uauy, *Am. J. Clin. Nutr.* **63** (5) (1996) 791–796.

38. T. H. Bothwell, R. W. Charlton, J. D. Cook, C. A. Finch, *Iron Metabolism in Man*, Blackweel Scientific, Oxford, 1979
39. G. Schoeters, E. Den Hond, W. Dhooze, N. Van Larebeke, M. Leijts, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **102** (2) (2008) 168–175.
40. B. L. Vallee, D. D. Ulmer, *Annu. Rev. Biochem.* **41** (10) (1972) 91–128.
41. A. Bernard, *Indian J. Med. Res.* **128** (4) (2008) 557–564.
42. https://ods.od.nih.gov/Health_Information/Dietary_Reference_Intakes.aspx, (datum pristupa 27.5.2017.)
43. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, *Human Vitamin and Mineral Requirements*, Bangkok, 2001.
44. <http://www.plantea.com.hr/orah/>, (datum pristupa 25.5.2017.)
45. J. C. Soderquist, *J. Chem. Educ.* **50** (11) (1973) 782–783.
46. <https://www.fast-growing-trees.com/images/D/Black-Walnut-3-450w.jpg> (datum pristupa 25.5.2017.)
47. <http://www.greenmedinfo.com/sites/default/files/ckeditor/Sayer%20Ji/images/walnut.jpg> (datum pristupa 25.5.2017)
48. *Hrvatska enciklopedija*, Broj 1 (A-Bd), Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb, 2000, str. 356
49. <http://rmcurtis.co.uk/wp/wp-content/uploads/2013/05/Almond-tree-2.jpg> (datum pristupa 25.5.2017.)
50. <http://dreamicus.com/data/almond/almond-03.jpg> (datum pristupa 25.5.2017.)
51. C.W. C. Kendall, A. R. Josse, A. Esfahani, D. J. A. Jenkins, *Br. J. Nutr.* **104** (2010) 465–473.
52. C. E. Berryman, A. G. Preston, W. Karmally, R. J. Deckelbaum, P.M. Kris-Etherton, *Nutr. Rev.* **69** (4) (2011) 171–185.
53. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/lijeska-13/> (datum pristupa 25.5.2017.)
54. <http://www.nuthealth.org/assets/Uploads/walnutfacts.jpg> (datum pristupa 25.5.2017.)
55. http://www.haselnuss24.de/images/stories/Haselnuesse/Fotolia_27066820_XS_03.png (datum pristupa 25.5.2017.)

-
56. USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, (datum pristupa 25.5.2017.)
57. S. L. Tey, C. Delahunty, A. Gray, A. Chisholm, R. C. Brown, *Eur. J. Nutr.* **54** (3) (2015) 483–487.
58. S. H. Lee, H. A. Jouihan, R. C. Cooksey, D. Jones, H. J. Kim, D. R. Winge, D. A. McClain, *Endocrinology* **154** (3) (2013) 1029–1038.
59. S. C. Larsson, A. Wolk, *J. Intern. Med.* **262** (2) (2007) 208–214.
60. Takeda A., *Brain Res. Rev.* **41** (1) (2003) 79–87.
61. Bruno Taitson, *Harvesting nuts, improving lives in Brazil*, World Wildlife Fund, 2008
62. <https://media1.britannica.com/eb-media/79/190779-004-D0AC91D4.jpg> (datum pristupa 26.5.2017.)
63. <https://www.organicfacts.net/wp-content/uploads/2013/08/Brazilnuts.jpg> (datum pristupa 26.5.2017.)
64. J. C. Chang, W. H. Gutenmann, C. M. Reid, D. J. Lisk, *Chemosphere* **30** (4) (1995) 801–802.
65. D. Benton, R. Cook, *Biol. Psychiatry* **29** (11) (1991) 1092–1098.
66. M. R. de Oliveira, *Neurochem Res.* **41** (6) (2016) 1219–1228.
67. M. B. Stockler – Pinto, J. J. Carrero, L. de Carvalho Cardoso Weide, S. M. Franciscato Cozzolino, D. Mafra, *Nutr. Hosp.* **32** (4) (2015) 1808–1812.
68. T. Rosen, D. B. Fordice, *South Med. J.* **87** (4) (1994) 543–546.
69. http://balconygardenweb.com/wp-content/uploads/2015/10/cashew-nut-growing_mini.jpg, (datum pristupa 27.5.2017.)
70. <http://www.gyarkofarms.com/wp-content/uploads/2015/12/1-1.jpg>, (datum pristupa 27.5.2017.)
71. V. McWilliam, J. Koplín, C. Lodge, M. Tang, S. Dharmage, K. Allen, *Curr. Allergy Asthma Rep.* **15** (9) (2015) 555.
72. P. Pribis, B. Shukitt – Hale, *Am. J. Clin. Nutr.* **100** (1) (2014) 347–352.
73. T. J. Manning, W. R. Grow, *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*, Vol.2, No1 Springer – Verlag, New York, 1997.

-
74. J. D. Ingle, S. R. Crouch, *Spectrochemical Analysis*, Prentice-Hall International Inc, Englewood Cliffs, 1988.
75. E. K. Ossai, *Pak. J. Nutr.* **14** (2) (2015) 84–87.
76. M. Welna, M. Klimpel., W. Zyrnicki, *Food Chemistry* **111** (2008) 1012–1015.
77. http://www.periodni.com/gallery/spektar_elektromagnetskog_zracenja.png, (datum pristupa 15.6.2017.)
78. G. M. Hieftje, *J. Chem. Educ.* **77** (5) (2000) 577–583.
79. S. Greenfield, *J. Chem. Educ.* **77** (5) (2000) 584–591.
80. W. Wang, B. J. Finlayson – Pitts, *J. Chem. Educ.* **80** (1) (2003) 83–85.
81. J. C. Yu, G. F. Wollaston, *J. Chem. Educ.* **75** (3) (1998) 316.
82. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th Ed., Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA, 2007.
83. A. S. Kooser, J. L. Jenkins, L. E. Welch, *J. Chem. Educ.* **80** (1) (2003) 86–88.
84. V. J. Porter, P. M. Sanft, J. C. Dempich, D. D. Dettmer, A. E. Erickson, N. A. Dubauskie, S. T. Myster, E. H. Matts, E. T. Smith, *J. Chem. Educ.* **79** (9) (2002) 1114–1116.
85. S. W. Brittle, J. D. Baker, K. M. Dorney, J. M. Dagher, T. Ebrahimian, S.R. Higgins, I. E. P. Sizemore, *J. Chem. Educ.* **92** (2015) 1061–1065.
86. M. A. Page, B. W. Smith, K. R. Williams, *J. Chem. Educ.* **79** (3) (2002) 364–365.
87. http://mzos.hr/datoteke/11-Predmetni_kurikulum-Kemija.pdf (datum pristupa 20.6.2017.)
88. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/gimnazije/obvezni/kemija.pdf (datum pristupa 20.6.2017.)
89. http://www.pbs.org/tesla/res/res_art05.html (datum pristupa 20.6.2017.)