

Razvoj spektrometrijskih analitičkih metoda za određivanje selenija u biljnim dodatcima prehrani

Benutić, Anica

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:217:567483>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anica Benutić

**RAZVOJ SPEKTROMETRIJSKIH
ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE
SELENIJA U BILJNIM DODATCIMA
PREHRANI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sanda Rončević

Zagreb, 2022. godina



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Anica Benutić

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL
SPECTROMETRY METHODS FOR
DETERMINATION OF SELENIUM IN
HERBAL DIETARY SUPPLEMENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. sc. Sanda Rončević, Full Professor

Zagreb, 2022

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. **Sandi Rončević** koja mi je ljubazno pružala neprocjenjive savjete, podršku i ohrabrenje tijekom mog istraživanja i tijekom pripreme ovog rada. Posebno sam zahvalna na njenom strpljenju, promišljenosti i praktičnom pristupu, kao i na njenom ohrabrenju koja su mi omogućila da prebrodim izazove na koje nailazim tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. **Ivi Juranović Cindrić** na sugestijam i konstruktivnoj recenziji.

Zahvaljujem dr. sc. **Dariji Kliničić** na uloženom trudu i vremenu te konstruktivnoj recenziji.

Posebna zahvalnost dr.sc. **Jasni Jurasović** koja mi je svoje dragocjeno vrijeme učinili dostupnim, nesebično pomagala tijekom mog istraživanja i tijekom pripreme ovog rada.

Zahvaljujem kolegi **Bernardu Marciušu**, mag. kemije na pomoći i promišljenosti. Njegove vještine u rješavanju problema i pomoći bila su neprocjenjive.

Zahvaljujem dr. sc. **Ivanu Nemetu** koji mi je svojom ljubaznošću i dobrotom pružao podršku i pomogao tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem na financijskoj potpori koju je Hrvatski zavod za javno zdravstvo uložio tijekom mog doktorskog studija. Izražavam zahvalnost Ravnatelju, doc. dr. sc. **Krunoslavu Capaku**, prim. dr. med. na podršci i korištenju laboratorijske opreme.

Želim izraziti posebnu zahvalnost mojoj najboljoj prijateljici iz Odsjeka za mikrobiologiju i POU, **Diani Brlek Gorski**, dr. med. spec. mikrobiolog, na moralnoj potpori, pomoći i strpljenju koje me potaknulo da dovršim studij.

Hvala mojim suradnicima i prijateljima iz Odjela za zdravstvenu ispravnost hrane, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo

Mojoj obitelji veliko hvala na ljubavi, ohrabrivanju i razumijevanju.

Sadržaj

| | |
|---|------------|
| SAŽETAK..... | VI |
| ABSTRACT | VII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 4 |
| 2.1. Selenij u hrani..... | 4 |
| 2.1.1. <i>Biološka uloga selenija u ljudskom tijelu.....</i> | <i>7</i> |
| 2.1.2. <i>Selenij u dodatcima prehrani.....</i> | <i>9</i> |
| 2.2. Kemijski oblici selenija..... | 11 |
| 2.3. Analitičke metode za određivanje selenija..... | 13 |
| 2.4. Multivarijatna statistička analiza mjernih rezultata..... | 21 |
| 2.4.1. <i>Metoda analize glavnih komponenti (PCA).....</i> | <i>21</i> |
| 2.4.2. <i>Hijerarhijska analiza klastera (HCA).....</i> | <i>21</i> |
| 2.4.3. <i>Diskriminantna analiza (DA).....</i> | <i>22</i> |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 23 |
| 3.1. Kemikalije, uređaji i pribor | 23 |
| 3.1.1. <i>Kemikalije i certificirani referentni materijal, CRM</i> | <i>23</i> |
| 3.1.2. <i>Uređaji i ostali pribor</i> | <i>24</i> |
| 3.2. Uzorci biljnih dodataka prehrani..... | 25 |
| 3.3. Instrumenti | 28 |
| 3.3.1. <i>Atomski apsorpcijski spektrometar s elektrotermičkom atomizacijom vezan na sustav generiranja hidrida (HG-ETAAS).....</i> | <i>28</i> |
| 3.3.2. <i>Spektrometar masa uz induktivno spregnutu plazmu, ICP-MS)</i> | <i>30</i> |
| 3.4. Postupak pripreme uzoraka za mjerenje selenija metodom HG-ETAAS | 33 |
| 3.4.1. <i>Homogenizacija uzoraka.....</i> | <i>33</i> |
| 3.4.2. <i>Razgradnja uzorka.....</i> | <i>33</i> |
| 3.4.3. <i>Redukcija Se(VI) u Se(IV).....</i> | <i>34</i> |
| 3.4.4. <i>Mjerni postupak za metodu HG-ETAAS</i> | <i>35</i> |
| 3.5. Postupak pripreme uzoraka za mjerenje elemenata metodom ICP-MS | 37 |
| 3.5.1. <i>Priprava uzoraka za metodu ICP-MS.....</i> | <i>37</i> |
| 3.5.2. <i>Mjerni postupak za metodu ICP-MS.....</i> | <i>37</i> |
| 3.6. Statistička obrada | 39 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 40 |

| | |
|--|-------------|
| 4.1. Rezultati određivanja selenija metodom HG-ETAAS..... | 40 |
| <i>4.1.1. Validacijski parametri metode.....</i> | <i>40</i> |
| 4.2. Rezultati elementne analize metodom ICP-MS..... | 47 |
| <i>4.2.1. Rezultati određivanja selenija metodom ICP-MS.....</i> | <i>52</i> |
| 4.3. Usporedba rezultata analize selenija metodom HG-ETAAS i ICP-MS..... | 53 |
| 4.4. Elementno profiliranje uzoraka multivarijantnim statističkim metodama..... | 56 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 64 |
| § 6. LITERATURNI IZVORI..... | 66 |
| § 7. DODATAK..... | VIII |
| § 8. ŽIVOTOPIS | IX |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAZVOJ SPEKTROMETRIJSKIH ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE SELENIJA U BILJNIM DODATCIMA PREHRANI

Anica Benutić

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Rockefellerova 7, Zagreb, Hrvatska

U ovom radu razvijen je postupak određivanja sadržaja selenija i odabranih elemenata u osamdeset i sedam različitih uzoraka biljnih dodataka prehrani koji su prikupljeni na hrvatskom tržištu u obliku kapsula, praha, džema ili tekućine. Metodom elektrotermičke atomske apsorpcije uz hvatanje *in situ* razvijenog hidrida na iridijem obloženoj grafitnoj kivetici (HG-ETAAS) izmjerene su koncentracije selenija. Primjenom spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) izmjereni su sadržaji dvadeset i četiri elementa (Se, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Sr, Tl, V, Zn) u svim uzorcima. Mjerne sposobnosti dvije metode nisu se značajno razlikovale i obje metode jednako ispunjavaju zahtjeve za određivanje sadržaja selenija u biljnim dodacima prehrani. Multivarijantnim statističkim alatima, analizom glavnih komponenata (PCA) i hijerarhijskom analizom klastera (HCA), klasificirani su dobiveni elementni profili i omogućena je vizualizacija i korelacija specifičnih elementnih profila ispitivanih uzoraka. Iz dobivenih elementnih profila potvrđeni su posebni utjecaji botaničkih, okolišnih i/ili proizvodnih uvjeta na elementni profil biljnih dodataka prehrani

(99 stranica, 16 slika, 12 tablica, 116 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biljni dodaci prehrani/ elektrotermička atomska apsorpcija s tehnikom generiranja hidrida/ elementni profili/multivarijantna statistička analiza /selenij/ spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu

Mentor: prof. dr. sc. Sanda Rončević, KO, PMF

Rad prihvaćen: 2. rujna 2022.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, PMF
2. dr. sc. Darija Klinčić, viši znanstveni suradnik, IMI
3. dr. sc. Jasna Jurasović, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, IMI



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL SPECTROMETRY METHODS FOR DETERMINATION OF SELENIUM IN HERBAL DIETARY SUPPLEMENTS

Anica Benutić

Croatian Institute of Public Health, Rockefellerova 7, Zagreb, Croatia

In this work, the determination of selenium and selected elements in eighty-seven different herbal dietary supplements present at Croatian market in the forms of capsules, powder, tablets, jams, and liquors were analyzed. Electrothermal atomic absorption was applied with *in situ* trapping of generated hydride on iridium coated graphite cuvette (HG-ETAAS) for the determination of selenium. By inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), the twenty-four elements (Se, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Sr, Tl, V, Zn) were determined in all samples. Measurement capabilities of both methods were not significantly different and both methods are applicable for selenium analysis in herbal dietary supplements. By using multivariate statistical tools, principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), elemental profiles of samples were classified. This allowed visualization and correlation of specific elemental profiles of examined samples. Distinctive features of herbal dietary supplements with peculiar influences of botanical, environmental and/or production conditions on their elemental profile were highlighted.

(99 pages, 16 figures, 12 tables, 116 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Electrothermal atomic absorption with hydride generation technique / Elemental profiling/ Herbal dietary supplements/ Inductively coupled plasma mass spectrometry/ Multivariate statistical analysis/ Selenium

Supervisor: Dr. sc. Sanda Rončević, Full Professor

Thesis accepted: 2nd September 2022.

Reviewers (upisuju se tek nakon sjednice Vijeća PMF na kojoj se imenuje Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada, molimo ostaviti prazno tijekom postupka ocjenjivanja):

Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor, PMF
Dr. Darija Klinčić, Senior Scientific Associate, IMI
Dr. Jasna Jurasović, Scientific Advisor, IMI

§ 1. UVOD

Potrošačima se danas nudi veliki izbor dodataka prehrani različitog porijekla. Označeni su kao hrana čija je svrha dopuna normalnoj prehrani i koncentrirani su izvor vitamina i minerala.¹ Općenito, proizvode se od prirodnih biljnih ili životinjskih sirovina, kao što su biljke, gljive, alge, lišajevi, tkiva ribe itd. Takvi proizvodi podržavaju nutritivne ili druge fiziološke učinke. Iako se obično stavljaju na tržište u oblicima doziranja poput lijekova, ova vrsta proizvoda nije namijenjena liječenju ili prevenciji određenih bolesti.² Njihovi tipični oblici su kapsule, tablete, dražeje, ampule s tekućinom, boce s kapaljkom i drugi slični oblici tekućina i prašaka namijenjeni za konzumaciju u malim, mjernim jedinicama i količinama.^{2,3}

S obzirom na važnost osiguranja sigurnosti hrane, različitim zakonskim zahtjevima kojih se prehrambena industrija mora pridržavati, države diljem svijeta pružaju temelj za osiguranje zaštite ljudi i interesa potrošača u vezi s hranom, uključujući dodatke prehrani. Međutim, kvaliteta nekih dodataka prehrani, za čiju sigurnost glavnu odgovornost snose subjekti u poslovanju s hranom koji stavljaju proizvod na tržište, zabrinjava je identitet njihovih sastojaka često nedovoljno poznat.⁴

Kako bi se objasnila važnost procjene kvalitete i pristupa testiranju toksičnosti, na europskoj razini postoje različite smjernice. Smjernice se odnose na označavanje i oglašavanje ovih proizvoda, ali proizvođači ostaju relativno slobodni u proizvodnji dodataka prehrani.⁴ Dodatci prehrani moraju biti u skladu s općim Zakonom o hrani, ali još uvijek ne postoji centralizirana zakonska procedura odobravanja na nivou europske zajednice za korištenje različitih biljaka u hrani.^{4,5} Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) je tijelo EU koje daje znanstvene savjete i procijene rizika kemikalija u hrani za ljudsko zdravlje te informira o postojećim i novim rizicima povezanim s prehrambenim lancem. Kako bi dala neke usklađene informacije i pomogla u procesu procjene rizika, EFSA je stvorila bazu podataka o botaničkim sastojcima koji se mogu koristiti u hrani.^{6,7} Ova baza nije sveobuhvatna i nema pravnu snagu, ali je korisna u razlučivanju biljaka ili spojeva od mogućeg značaja za zdravlje ljudi. Prema smjernicama za ocjenu sigurnosti botaničkih proizvoda, (engl. *Safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements*) prijeko su potrebni podaci o kemijskom sastavu botaničkog sastojka i postupku pripreme biljnih dodataka prehrani.^{4,6} Biljni dodatci prehrani koji se mogu

proizvoditi u obliku kapsula, pilula u prahu, tekućine i ulja, sadrže složenu matricu s različitim dijelovima biljaka od cijele biljke do plodova, korijena, rizoma, cvjetova, sjemenki, kora, stabljika i lišća, te dodanih sastojaka poput, aminokiselina, ugljikohidrata, polisaharida i soli. U cjelokupnom dijelu koji se odnosi na kemijski otisak sastojaka, elementno profiliranje ima vodeću ulogu u karakterizaciji, odnosno identifikaciji i kvantificiranju glavnih i elemenata u tragovima.^{8,9,10}

Za elementnu analizu dodataka prehrani s različitim popratnim tvarima u matrici uzorka mogu se koristiti različite spektrometrijske tehnike.⁸ Izbor analitičke tehnike najviše ovisi o osjetljivosti metode i o prirodi uzorka. Tehnike atomske apsorpcijske spektrometrije s plamenom ili grafitnom peći u pravilu imaju mogućnost istovremenog određivanja samo jednog elementa, dok spektrometrijske emisijske tehnike temeljene na plazmi s optičkom ili masenom detekcijom omogućuju istovremeno određivanje višestrukog broja elemenata (do 89 elemenata) u različitim matricama uzoraka.¹¹⁻¹⁴ Navedene spektrometrijske tehnike su sposobne prikupiti velike skupove podataka o elementnom sastavu što omogućuje izgradnju velike baze podataka za profiliranje uzoraka.

Kemometrijska obrada tako velikih skupova podataka korištenjem univarijatnih i multivarijatnih statističkih alata daje vrijedne informacije u klasifikaciji biljaka i dobivenih biljnih dodataka.¹⁵⁻¹⁸ Metode multivarijatne statistika kao što su analiza glavnih komponenti (PCA), parcijalna diskriminantna analiza najmanjih kvadrata (PLS-DA) i hijerarhijsko grupiranje (HCA), alati su istraživačke analize podataka (engl. *exploratory data analysis*, EDA) koji omogućuju razumijevanje razlika između uzoraka sa sličnim karakteristikama.¹⁹ Razlikovanje i razvrstavanje velike grupe uzoraka u klastere grupira uzorke sa sličnim karakteristikama kao što su elementni profil ili specifični marker elementi. Ovo je osobito važno za kontrolu kvalitete, kao i za taksonomske svrhe i provjeru autentičnosti podrijetla proizvoda.

U ovom radu razvijena je jednostavna i brza analitička metoda za određivanje sadržaja selenija u biljnim dodacima prehrani primjenom elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije na principu *in situ* hvatanja razvijenog hidrida u grafitnoj kivetki obloženoj iridijem (HG-ETAAS). Postupak pripreme uzoraka različitih formulacija biljnih dodataka prehrani uključivao je mikrovalno potpomognuta razgradnja. Razvijeni su postupci prethodne redukcije selenijevih spojeva i ispitan njihov utjecaj na učinkovitost određivanja tj. selektivnost i osjetljivost.

Za određivanje dvadeset i četiri elementa (Se, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Sr, Tl, V, Zn) optimizirana je metoda primjenom spektrometra masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) nakon mikrovalno potpomognute razgradnje uzoraka. Dobiveni rezultati mjerenog sadržaja selenija uspoređivani s kvantitativnim podacima dobivenim metodom elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije na principu *in situ* hvatanja razvijenog hidrida u grafitnoj kiveti obloženoj iridijem, HG-ETAAS. Učinkovitosti obje metode za određivanje selenija procijenjene je i uspoređena korištenjem istog skupa uzoraka.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sastavne odnose između velikog skupa analiziranih uzoraka. Stoga je elementni profil uzoraka podvrgnut kemometrijskoj analizi koja se temelji na statističkim alatima PCA, PLS-DA i HCA. U literaturi nedostaju takve sveobuhvatne analize i usporedbe različitih dodataka prehrani biljnog podrijetla. Većina objavljenih radova bavi se ili manjim brojem elemenata u biljnim dodacima prehrani ili su fokusirani na ograničeni broj predstavnika botanike.¹⁷⁻²¹ U ovom radu prikazano je elementno profiliranje reprezentativnih biljnih dodataka prehrani koji su nabavljeni na hrvatskom tržištu (Zagreb) u obliku kapsula, praha, džema ili tekućine i prvo je izvješće o elementnom profiliranju opsežnog skupa različitih biljnih dodataka prehrani dostupnih na hrvatskom tržištu. Primijenjene metode multivarijatne analize grupirale su analizirane uzorke isticanjem njihovih sličnih karakteristika, koji proizilaze iz zajedničkih elementnih profila, a definirani su također i oni elementi (elementi markeri) koji najviše doprinose razlikovanju uzoraka. Neki biljni dodatci prehrani s iznimnim svojstvima koji su proizašli iz određenih botaničkih, okolišnih i proizvodnih značajki postali su jasno uočljivi.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Selenij u hrani

Selenij putem biljaka ulazi u hranidbeni lanac. Sadržaj selenija u biljnim vrstama razlikuje se ovisni o dostupnoj koncentraciji u tlu, svojstvima tla (pH tla, redoks potencijalu, sadržaju vode i drugim tvarima) te o kemijskom obliku selenija.²²⁻²⁵

Iako biljke nemaju poznate fiziološke potrebe za selenijem, neke biljne vrste imaju sposobnost da asimiliraju i akumuliraju velike količine selenija iz tla i vode. Takve biljke koje su hiperakumulatori selenija ($> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe tvari), poput livadnog kozlinaca (*Astragalus cicer* L.) i vrste *Xylorhiza*, uspješno rastu na tlima izuzetno bogatim selenijem. Brazilski orašasti plodovi, kao i vrste kupusa (smeđa gorušica, uljana repica, suncokret, brokula i kupus) i luka (češnjak, luk, poriluk i divlji poriluk) su sekundarni akumulatori koji učinkovito akumuliraju selenij u rasponu od 100 do 1000 mg kg^{-1} suhe tvari i bogati su izvori selenija u hrani čovjeka. Ne-akumulatori su biljne vrste koje pohranjuju selenij u koncentracijama $< 100 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe tvari i ne mogu preživjeti ili su slabijeg rasta ako rastu na tlima bogatim selenijem kao npr. trave i žitarice (pšenica, zob, raž i ječam).^{22,24-28}

Biljke mogu asimilirati selenij u obliku selenata, selenita ili njegovih organskih spojeva kao što su SeCys i SeMet, ali ne mogu primiti koloidno vezani elementarni Se ili metalne selenide.^{24,26,29} Anorganski oblici selenija (selenat i selenit) se primarno apsorbiraju i transformiraju kao dva dominantna bioraspoloživa oblika u prirodnom okruženju. Unošenje selenata i selenita u biljke posredovano je aktivnim transportnim mehanizmima. Biljke uglavnom koriste fosfat kao nosač za ugradnju selenita, dok selenat koristi aktivnosti transportera sulfata.²² Organske spojeve selenija (selenometionina i selenocisteina) biljke ugrađuju pomoću enzima, transportirajuća ATP fosfohidrolaza (adenozin trifosfat, ATP).^{24,27} Sposobnost nekih biljaka kao što su češnjak, luk i brokula da akumuliraju i transformiraju anorganske oblike selenija u bioaktivne organske spojeve važno za ljudsku prehranu i zdravlje.^{26,27} Selenometionin je glavni organski oblik selenija u žitaricama, mahunarkama i soji, te u kvascu koji se koristi u dodacima prehrani.^{22,25}

Smatra se da je prosječna koncentracija selenija u tlima diljem svijeta oko $0,4 \text{ mg g}^{-1}$, dok tla bogata selenijem sadrže > 2 do 5000 mg g^{-1} .²⁴ Područja s tako neuobičajeno visokim

koncentracijama selenija u tlu su dijelovi Wyominga, Sjeverne i Južne Dakote u SAD-u, Punjab u Indiji, okrug Enshi i Hubei u Kini i dijelovi Irske, Kolumbija i Venezuela. To se također odražava na visoke koncentracije selenija u tjelesnim tekućinama stanovnika (koncentracija selenija u krvi $> 1000 \mu\text{g L}^{-1}$) i kliničkim znakovima selenoze tj. trovanja selenijem u stanovnika tih područja.^{23,24,28} Više vrijednosti unosa selenija zabilježene su i u stanovnika Japana, Kanada, Švicarska i Finske dijelom zbog tretiranja tla gnojivom obogaćenim selenijem. S druge strane, velike površine tla koje su siromašne selenijem rasprostru se u sjeveroistočnoj Australiji, južnoj i središnjoj Kini, Novom Zelandu, Istočnom Sibiru, Sjevernoj Koreji, Nepal, Tibetu, Saudijskoj Arabiji, Egiptu, Brazilu, Indiji, Burundiju i Novoj Gvineji i dijelovima Europe (dijelovi Švedske, Škotske, Velike Britanije, Francuske, Belgije, Srbije, Slovenije, Španjolske, Portugala, Turske, Poljske, Njemačke, Danske, Slovačke, Austrije, Irske, Grčke, Nizozemske, Italije, Češke i Hrvatske).^{3,22,24} Podatci za većinu dijelova Afrike, Južne Azije i Južne Amerike su rijetki ili ih uopće nema, pretpostavlja se da je unos selenija u tim područjima uglavnom nizak.²³⁻²⁵

Sadržaj selenija u hrani i u stanovnika različitih država svijeta može također biti povezan s faktorima kao što su poljoprivredna praksa, žetva, nacionalna poljoprivredna i trgovinska politika države te vrstom prehrane, dobi, fiziološkim stanjem pa čak i financijskim mogućnostima pojedinca. Sukladno tome, unos selenija hranom može se značajno razlikovati ovisno o regijama. Općenito u svijetu unos selenija je od 3 do 7000 $\mu\text{g Se}$ u danu po kg tjelesne mase, u mnogim dijelovima svijeta na donjoj granici.²⁸ Uslijed nedostatka selenija u tlu prehrambeni proizvodi imaju vrlo nisku razinu što je izazvalo sve veće zanimanje za razvoj prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani obogaćenih selenijem. Agronomskom biofortifikacijom (gnojidba) ili genetičkom biofortifikacijom (genetičko poboljšanje usjeva) povećava se biološki raspoloživa koncentracija selenija u jestivim dijelovima kultiviranih biljaka.^{23,24,27,29} Fortifikacija tla gnojivima obogaćenim selenijem može znatno povećati udio selenija u usjevima koji rastu na tlima s niskom udjelom selenija. Primjerice, sadržaj selenija u riži povećan je trostruko s $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ na $1,12 \mu\text{g g}^{-1}$ do $3,16 \mu\text{g g}^{-1}$ primjenom gnojiva obogaćenog selenijem u obliku natrijevog selenita i natrijevog selenata.³⁰ Maseni udjeli selenija u žitaricama uzgojenim na tlima tretiranim sa Se-dopiranim gnojivom bili su od $0,128 \mu\text{g g}^{-1}$ do $1,05 \mu\text{g g}^{-1}$ u odnosu na $< 0,100 \mu\text{g g}^{-1}$ u nedopiranim žitaricama i linearno su ovisili o koncentraciji selenija u primijenjenom folijarnom gnojivu.³¹

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) namirnice osobito bogate selenijem su: jetra i bubrež (od $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ do $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$), hrana iz mora (od $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$), žitarice ($< 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$), mliječni proizvodi ($< 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), te voće i povrće ($< 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$).³² Slične podatke o sadržaju selenija navode i drugi autori: u žitaricama $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ i $0,55 \mu\text{g g}^{-1}$, u mišićnom mesu goveda $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$, u mlijeku i mliječnim proizvodima $0,001 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,17 \mu\text{g g}^{-1}$ te niži selenij u voću ($0,06 - 0,13 \mu\text{g}$ u naranči i $0,07 \mu\text{g}$ u jabuci na 100 g svježe mase) u usporedbi s povrćem ($0,03 \mu\text{g}$ u rajčici do $3,1 \mu\text{g}$ u kupusu na 100 g svježe mase).^{24,32-35}

Usporedive sa tim razinama bile su i količine selenija u nekim prehrambenih proizvoda iz ruralnog područja istočne Hrvatske uz rijeku Dravu i Savu: $0,687 \mu\text{g g}^{-1}$ do $1,18 \mu\text{g g}^{-1}$ u mesu, $0,571 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,859 \mu\text{g g}^{-1}$ u ribama, $0,177 \mu\text{g g}^{-1}$ u jajima te najniže količine u voću $0,008 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,046 \mu\text{g g}^{-1}$ i povrću $0,006 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,0661 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶ U tkivima smeđeg medvjeda ulovljenih u Hrvatskoj masene koncentracije selenija bile su najviše u korteksu bubrega ($1,75 \mu\text{g g}^{-1}$), potom u tkivu jetre ($0,409 \mu\text{g g}^{-1}$) i najniže u mišićju ($0,139 \mu\text{g g}^{-1}$).³⁷

U Europi se prosječni unos selenija razlikuje po državama, u Švedskoj je procijenjen na $38 \mu\text{g}$ u danu, u Nizozemskoj na $67 \mu\text{g}$ u danu te Švicarskoj na $70 \mu\text{g}$ u danu. U Finskoj je porast sa $30 \mu\text{g}$ u danu na $113 \mu\text{g}$ u danu zbog nacionalnog programa suplementacije.²² U stanovnika SAD-a procijenjeni dnevni unos selenija $71 \mu\text{g}$ u danu i $152 \mu\text{g}$ u danu, dok je u Kanadi nešto veći s rasponom od $98 \mu\text{g}$ u danu do $224 \mu\text{g}$ u danu. *Keshan* i *Kashin Beck* su teške bolesti nedostatka selenija zabilježene u Kini i srednjoj Srbiji zbog niskog unosa selenija od $7 \mu\text{g}$ do $11 \mu\text{g}$ u danu.^{24,33}

Za veliki dio populacije putem redovite prehrane nije zadovoljen preporučeni dnevni unos (engl. *Recommended Dietary Allowance*, RDA) koji za odrasle osobe iznosi $55 \mu\text{g}$ u danu (prema Nacionalnoj akademiji znanosti SAD-a).³⁸ Na temelju epidemioloških studija, Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Environmental Protection Agency*, U. S. EPA) utvrđuje oralnu referentnu dozu (*Oral Reference Dose*, RfD) za selenij od $5 \mu\text{g}$ po kg tjelesne mase u danu.³⁹ Stručnjaci s američkog Instituta za medicinu utvrdili su dopuštenu gornju granicu (engl. *Tolerable Upper Intake Levels*, UL) na $400 \mu\text{g}$ u danu i razinu bez uočenih štetnih učinaka (engl. *No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) od $850 \mu\text{g}$ u danu na temelju simptoma kliničke selenoze u opsežnoj studiji provedenoj u stanovnika Kine.^{33,38,39} Za Europu, EFSA preporuča nešto veći i specifičniji unos (engl. *Adequate Intake*, AI) od $70 \mu\text{g}$ u danu za odrasle i $85 \mu\text{g}$ u danu za dojilje (dodatni unos selenija od $15 \mu\text{g}$ u danu

pokriva količinu selenija izlučenog u majčinom mlijeku). Za djecu i adolescente, unos selenija je proširen iz unosa za odrasle izometrijskim skaliranjem i primjenom faktora rasta te iznosi od 15 µg u danu za djecu < 1 godine do 3 godine, 20 µg u danu za djecu od 4 godine do 6 godina, 35 µg u danu za djecu od 7 godina do 10 godina i 55 µg u danu za adolescente od 11 godina do 14 godina. Gornja granica unosa (UL) je 300 µg u danu.⁴⁰⁻⁴²

Antropogene aktivnosti mijenjaju prirodnu dinamiku metala povećavajući njihovu dostupnost. Rudarstvo, intenzivna poljoprivreda, šumarstvo i krčenje šuma spadaju u one aktivnosti koje pogoduju povećanju koncentracije metala, uključujući živu, arsen i selenij u okolišu.²⁴ Kemijski je dobro poznato da selenij ima značajan afinitet za živu i potencijal neutralizirati toksično djelovanje MeHg kada je molarni omjer Se:Hg veći od jedan.⁴³⁻⁴⁵

2.1.1. *Biološka uloga selenija u ljudskom tijelu*

Selenij je element u tragovima koji ima važne fiziološke funkcije u organizmu. Sudjeluje u mnogim procesima, ponajprije u antioksidativnoj obrani i modulaciji imunološkog odgovora.⁴⁶ Na bioraspoloživost selenija utječe njegov kemijski oblik (značajno je veća za organske oblike selenija) te značajke organizma kao što su stanje uhranjenosti, dob i spol.^{26,28,46} Iako je selenij esencijalni nutrijent za ljude, raspon koncentracija između nedostatka i toksičnosti vrlo je uzak i ovisi o kemijskom obliku selenija. Nedostatak selenija moguć je pri unosu < 20 µg u danu, a toksičnost kod > 850 µg u danu.^{33,47} Nedovoljan unos može rezultirati zastojem u rastu, poremećajem u metabolizmu kostiju i abnormalnostima u funkciji štitnjače.^{24,25,45,46,48} Simptomi toksičnosti selenija uključuju umor, poremećaje u vezivnom tkivu kao i u kardiovaskularnom, gastrointestinalnom, živčanom i respiratornom sustavu.^{3,33,45}

S obzirom na esencijalnost selenija, provedena su brojna istraživanja o primjeni i učincima njegovih različitih organskih i anorganskih spojeva na zdravlje ljudi. Biološka funkcija selenija povezana je s njegovom ugradnjom putem aminokiseline selenocisteina (SeCys) u mnoge druge proteine važne za metabolizam.⁴⁹⁻⁵⁴ Istraživanja su pokazala da se u organizmima sisavaca nalazi oko stotinjak selenoproteina, a najvažniji su antioksidativni enzimi glutation peroksidaza i tiorodoksin reduktaza te selenoproteini (SelP, SelS, SelW) odgovorni za skladištenje i transport selenija.^{46,51,52} Selenij je u prirodi prisutan u organskim oblicima, ponajprije u aminokiselinama SeCys i SeMet te u anorganskim oblicima koji su glavni izvor selenija hranom i uključuju selenate, selenite, selenide i elementarni Se. Spomenuti

organski i anorganski spojevi, kao i sintetski diselenidi ili nanočestice selenija, rabe se u obogaćenju prirodnih proizvoda, poput probiotika, kvasca i zelenog čaja.^{46,48,49,51}

Podatci o metabolizmu selenija tj. njegovih (anorganskih i organskih oblika) ovisno o izvoru iz različitih namirnica i dodataka prehrani ukazuju na razlike u apsorpciji kod ljudi. Apsorpcijski putovi još nisu u potpunosti istraženi.^{45,46} Većina oblika selenija se učinkovito apsorbira, ali se selenati i seleniti slabije zadržavaju u tijelu u odnosu na organske oblike SeMet i SeCys. Metabolizam apsorbiranog selenija u organizmu ovisi o obliku u kojem je prisutan u plazmi. Selenat, selenit, SeMet i SeCys ulaze u „bazen“ selenida iz kojeg se selenij koristi za sintezu selenoproteina ili se izlučuje urinom kao selenošćecer. Međutim, SeMet može također biti izravno i nespecifično ugrađen u proteine kroz zamjenu metionina. Odvojeni put ugradnje slijedi organski spoj, *c*-glutamil metilselenocistein, koji se nalazi u kupusnjačama, pri čemu se prvo pretvara u Se-metilselenocistein, a zatim se transformira β -liazom u metilselenol, koji se izlučuje uglavnom izdisanjem i urinom.^{26,45,53}

Korišteno je nekoliko pristupa za mjerenje biorasploživosti selenija u raznim vrstama hrane što uključuje mjerenje promjene koncentracije selenija u plazmi, mjerenje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze (GPx) i studije apsorpcije/retencije. Razvijene su tehnike s upotrebom stabilnih izotopa selenija za označavanje endogenih oblika selenija u hrani. Općenito, selenij se apsorbira učinkovito, ali nije moguće dodijeliti specifične brojke za zadržavanje i biorasploživost pojedinim oblicima selenija zbog složenih matrica hrane. Pod pretpostavkom da je SeMet glavni oblik u mesu, većina selenija iz te namirnice se apsorbira i nešto više od polovice zadržava u tijelu tj. ne izlučuje se urinom. Selenij u brazilskim oraščićima iskoristiviji je od SeMet u smislu odgovora koncentracije selenija u plazmi i GPx aktivnosti u eritrocitima. Promjene u statusu selenija koje odražavaju promjene u unosu događaju se u razdoblju od nekoliko tjedana ili mjeseci. Nekoliko selenoproteina uključujući selenoproteine P i W te GPx široko su korišteni kao biomarkeri selenija. Funkcionalni biomarkeri su korisni samo ako se mogu lako izmjeriti u dostupnim tkivima, poput krvi. Najčešći biomarker je selenoprotein P za koji se čini da doseže maksimum nakon 2 do 4 tjedna suplementacije i dobro korelira sa koncentracijama selenija u plazmi. Selenoprotein P čini približno polovicu selenija u plazmi i općenito je osjetljiviji biomarker od drugih selenoproteina, uključujući GPx.^{51,52,54}

Dokazano je da selenij svojim svojstvima sudjeluje u zaštiti ljudskog organizam od štetnih čimbenika, kako kemijskih, kao što su lijekovi koji imaju ozbiljne nuspojave, teških metala, mikotoksina i pesticida, tako i fizičkih, kao što je toplinski stres ili magnetska polja.⁴⁶

2.1.2. Selenij u dodatcima prehrani

U svrhu nadoknađivanja smanjenog preherambenog unosa selenija (<40 µg u danu) ili u terapijske svrhe (od 200 µg u danu do 300 µg u danu) konzumiraju se različiti dodatci prehrani.²⁵ Na tržištu se potrošačima nudi veliki izbor dodataka prehrani različitog podrijetla, uglavnom multimineralni i multivitaminski dodatci, posebno kvasac obogaćenim selenijem kao samostalni dodatak te biljni dodatci prehrani. Navedene vrste proizvoda nisu namijenjene za liječenje ili sprječavanje bolesti iako među potrošačima razvijenih zemalja postaje uobičajena praksa uzimanje istih u svrhu „sprječavanja“ određenih karcinoma i učinaka starenja. Uski raspon između terapijskih i toksičnih doza selenija, kao i ovisnost učinka selenija o primijenjenom obliku, dozi i načinu liječenja, čini izbor najučinkovitijeg dodatka vrlo složenim.^{3,45,55-57}

Različitim analitičkim pristupima postignut je napredak u poznavanju kemijskih oblika selenija u biljkama.²⁶ Osobita pažnja posvećena je istraživanjima kemijskih oblika selenija u u češnjaku, gljivama i različitim vrstama orašastih plodova poznatih po visokom sadržaju selenija i blagotvornom djelovanju na zdravlje. Češnjak i gljive su i čest satojak dodataka prehrani. Spoj SeMet je identificiran postupakom ekstrakcije iz proteina pomoću proteolitičke razgradnje. Također su identificirani i specifični metaboliti: γ -glutamil-Se-metilselenocistein i γ -glutamil-Se-metilselenometionin u češnjaku, Se-metilselenocistein u češnjaku i luku, SeMet u japanskoj ljutoj rotkvi obogaćenoj selenijem, te SeCys i njegovi γ -glutamil derivati u orašastim plodovima.⁵³ Biljne dodatke prehrani koristi oko 70 do 80% svjetske populacije. Koncentracije selenija u biljnim dodatcima prehrani su u rasponu od 25,0 ug g⁻¹ do 42,5 ug g⁻¹, što odgovara 45 % do 76 % ukupne preporučene količine selenija za odrasle.⁵⁶

U obogaćenom kvascu ili algama uzgojenim na obogaćenom mediju, selenij iz anorganskih soli prelazi u organske oblike selenija koji imaju bolju biodostupnost.⁴⁵ Spoj SeMet se može metabolizirati nespecifično poput metionina i vezan je na različitim mjestima u proteinima dok se SeCys slaže u dimere s di-selenidnom vezom ili Se-S vezom, koja utječe na funkcionalnost enzima.⁵² Selenocistein ima visoku reaktivnost i zato je uglavnom prisutan u obliku derivata kao što su dimerizirani oblik selenocitina (SeCys₂) ili metilirani oblik metil-

seleno-cistein (MeSeCys) koji je čest sastojak dodataka prehrani.⁴⁵ Potonji nije upisan na pozitivnu listu mineralnih tvari koje se mogu koristiti u proizvodnji dodataka prehrani.^{2,25,53} Prema regulativi, organski spojevi mogu biti prisutni u dodacima prehrani samo iz obogaćenog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.^{58,59} Kvasac je najpopularniji oblik uzgojen u prisutnosti selenita ili selenata, koji može akumulirati selenij do masenog udjela od 3000 mg kg⁻¹.^{59,60} Atraktivan je izvor selenija zahvaljujući svojoj relativno niskoj cijeni i visokom sadržaju selenometionina koji djeluje kao prekursor za sintezu selenoproteina. Selenizirani kvasac se često koristi u dodacima prehrani kao bioaktivni oblik selenija. Većina selenija prisutna u seleniziranim uzorcima kvasca (oko 70%) je u obliku SeMet.^{26,59} Analitički zahtjev industrije odnosi se na provjeru minimalnog sadržaja SeMet (obično > 60 %) u kvascu bogatom selenijem i dokaz odsutnosti (< 2 %) selenita i selenata. Kvasac bogat selenijem može se karakterizirati metaboličkim profilom Se (selenometabolom), koji je karakterističan za soj kvasca i parametre fermentacije i može biti dragocjen otisak podrijetla pripravaka dostupnih na tržištu i ponovljivosti proizvodnje. Frakcija metabolita selenija topljiva u vodi čini od 15 % do 30 % ukupnog selenija i sadrži više od 50 spojeva koji se mogu detektirati.^{54,59}

Osim opisanih oblika selenija, selenita, selenata, SeMet ili biofortificirani selenizirani kvasac ili alge, pojavljuje se sljedeća generacija dodataka selenija s manjim rizikom od prekomjerne suplementacije, koji se temelje na oblicima selenija s nižom toksičnošću, većom bioraspoloživošću i kontroliranim otpuštanjem, kao što su neutralne nanočestice selenija (SeNP) i selenizirani polisaharidi (SP).^{3,60}

2.2. Kemijski oblici selenija

Selenij ima relativnu atomsku masu 78,96 a.j.m. i atomski broj 34. Pripada grupi halkogenih elemenata (16/VIA), kemijskih svojstava sličnih svojstvima sumporu i teluriju. Njegov položaj u periodnom sustavu i elektronička konfiguracija svrstavaju selenij u važnu skupinu polumetala ili metaloida kao i sumpor, reagira i s metalima i nemetalima, pri čemu nastaju spojevi koji sadrže selenidni ion, Se^{2-} (H_2Se , Al_3Se_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ i Na_2Se).³² Pojavljuje se u šest oksidacijskih stanja: Se(-II) (selenidi, Se^{2-}), Se(0) (elementarni stabilan i netopljiv), Se(IV) (selenit, SeO_3^{2-}) i Se(VI) (selenat, SeO_4^{2-}). Oksidacijsko stanje Se(II) ne postoji u prirodi. Selenij se pojavljuje u tlu uglavnom u obliku selenata koji su stabilni u kiselom i u lužnatom mediju i mogu se reducirati u elementarni selenij koji je nedostupan biljkama. Selenij tvori halogenide izravnom kombinacijom s fluorom, klorom i bromom, ali ne i s jodom. Također formira oksihalide. Primjer, oksiklorid (SeOCl_2) je snažno klorirajuće sredstvo i oksidans te je sposoban eksplozivno reagirati s drugim tvarima. Prirodno stabilni izotopi selenija su: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se i ^{82}Se , a najzastupljenija su dva izotopa, ^{80}Se (49,8 %) i ^{78}Se (23,5 %). Veća zastupljenost ovih izotopa u odnosu na preostale omogućila je istraživačima značajan napredak u razumijevanju bioloških svojstava selenija i njegove bioraspodjelivosti.^{25,32,38}

Anorganski oblici selenija, seleniti i selenati prisutan u vodi i tlu, biljke i gljive mogu lako pretvoriti u hlapljive spojeve. Selenati su stabilni u kiselom i u lužnatom mediju i mogu se reducirati u elementarni selenij koji je nedostupan biljkama. U organskim spojevima selenij je kovalentno vezan, C-Se: aminokiselinama (SeMet, SeCys, metilselenocistein, metilselenometionin, selenoholin, selenobetain i selenoglutation), metiliranim oblicima [metilselenol (MeSeH), dimetilselenid (Me_2Se), dimetildiselenid (Me_2Se_2), trimetilselenonij kation (Me_3Se^+), dimetilselenonil (Me_2SeO_2), dimetilseleninil (Me_2SeO), dimetilselenosulfid (MeSSeMe), selenourea ($\text{Se}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$] te drugim spojevima Se (selenopeptidi, selenoproteini, selenoenzimi, selenošćeri).^{26,32} Organski spojevi selenija su manje stabilni pri izlaganju svjetlosti ili toplini i lakše se oksidiraju od njihovih sumpornih analoga. Neki hlapljivi organski spojevi selenija, poput dimetil selenida (DMSe) i dimetil diselenida (DMDS) produkt su biometilacije anorganskog selenija od strane mikroorganizama.⁵¹ Složenije selenoamino kiseline (npr. SeMet i SeCys) mogu se naći u biološkim tkivima kao posljedica bioloških

putova pomoću kojih se selenij ugrađuje u proteine. Proteini koje sintetiziraju biljke i životinje sadrže SeMet kao glavni oblik selenija.

Sadržaj selenija u hrani te njegovi molekularni i biokemijski procesi u ljudskom organizmu povezani su sa sadržajem i međuodnosom selenijem u tlu i biljkama.⁵² Spoznaje o kemijskim oblicima selenija mogu osigurati razumijevanje kemijskih i biokemijskih reakcija, pružajući tako informacije o toksičnosti. Toksičnost spojeva selenija opada u nizu: seleniti > selenati > organoselenij > selenoaminokiseline.⁶¹

2.3. Analitičke metode za određivanje selenija

Tijekom posljednjeg desetljeća sve je veći interes različitih institucija i međunarodnih regulatornih tijela za razvoj metodologije za istraživanja selenija i njegovih kemijskih oblika u hrani i dodatcima prehrani. Prema literaturnim podacima, korištene su različite analitičke metode za određivanje ukupnog selenija i njegovih anorganskih i organskih oblika u različitim matricama hrane. Ovisno o rabljenoj tehnici i njenim zahtjevima, sadržaju selenija u uzorku, sastavu matrice i kemijskom obliku selenija korištene su različite tehnike pripreme uzoraka: suho spaljivanje, ekstrakcija i mikrovalno potpomognuta razgradnja s dušičnom kiselinom ili smjesom perklorne, dušične i sumporne kiseline uz vodikov peroksid.^{14,62-66} Većina tih metoda ima ograničenja bilo u smislu iskorištenja ili osjetljivosti što je zahtijevalo kontinuirani razvoj novih, brzih i pouzdanih ili poboljšanje postojećih analitičkih tehnika. To je omogućila moderna analitička oprema, poboljšani laboratorijski postupci, pažljiva kontrola kvalitete, te dostupnost certificiranih referentnih materijala (engl. *Certified Reference Material*, CRM). Danas su metode za određivanje ukupnog selenija relativno dobro razrađene, a najčešće su korištene atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS) i spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu ICP-MS.^{3,8,10,13,14,67-75}

Za većinu spektrometrijskih metoda, osim analize neutronsom aktivacijom (engl. *Instrumental Neutron Activation Analysis*, INAA) i analize rentgenskom fluorescencijom (*X-ray Fluorescence*, XRF), uzorak se mora podvrgnuti određenim preliminarnim koracima koji obično uključuju neki oblik oksidacije za uklanjanje organske tvari i dovođenje elementa u mineralizirano stanje.^{8,68-72} Postupkom suhog spaljivanja uzorak se spaljuje na visokoj temperaturi u peći ili u nekoj drugoj vrsti uređaja za grijanje u prisutnosti zraka ili kisika do dva dana. Postupak se smatra prikladnim i često se rabi unatoč riziku od gubitka selenija. Prednost ovog načina pripreme uzoraka je što omogućuje korištenje relativno velikih količina uzorka. Opisani su postupci korištenja programiranih električnih peći u kojima se uzorci spaljuju automatskim ugađanjem temperature i vremena za svaki korak mineralizacije.⁷¹

Mokro spaljivanje je način pripreme primjenjiv za većinu matrica. Obično se koristi mala količina uzorka. Ovisno o prirodi uzorka koji se analizira najčešće se koristi dušična kiselina ili smjesa dušične i perklorne kiseline koja uvelike pospješuje proces oksidacije.^{72,73} Posljednjih godina je uveliko prihvaćena mikrovalno potpomognuta razgradnja. Korištenje zatvorenog sustava omogućuje smanjenje vremena potrebnog za razgradnju, a također i

vjerojatnost kontaminacije iz vanjskih izvora. Sustavi su prilagodljivi, relativno se lako automatiziraju, a budući da se radi o zatvorenom sustavu, minimizirani su i gubici. Međutim, količina uzorka je ograničena i nije prikladna za određivanje elementa prisutnih u hrani koji su na ili blizu granice detekcije. Metoda se pokazala posebno učinkovitom za pripremu uzoraka hrane za analizu hlapljivih elemenata uključujući selenij i rutinski se koristi u mnogim analitičkim laboratorijima. Dokazano je da korištenje dušične kiseline i vodikovog peroksida potpuno mineralizira organske spojeve selenija, izbjegavajući korištenje više opasnih reagensa, kao što su sumporna ili perklorna kiselina.^{3,13, 67-72}

Takozvana tehnika „*slurry*“, koja se odnosi na suspenziju uzorka u otopini smjese HNO₃/Triton X-100, pokazala se učinkovitom za određivanje niskih koncentracija selenija u riži i riži obogaćenom selenijem te uzorcima kvasca obogaćenim selenijem.³⁰

Za analizu kemijskih oblika selenija u uzorcima hrane izbor ekstrakcijskih postupaka je širok: od jednostavne ekstrakcije s vodom do ekstrakcije kemijskim otapalima ili kompleksnijih metoda kao što su enzimске hidrolize, destilacije, ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima, ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE), izluživanje, mikro ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME).⁷⁵⁻⁷⁷ Pri izboru tehnike ekstrakcije i prikladnog ekstrakcijskog otapala treba uzeti u obzir kemijski oblik selenija, svojstva matrice i mogućnosti primijenjene tehnike. Obično je potreban kompromis između djelotvornosti postupka ekstrakcije tj. analitičkog povrata i očuvanja analita. Usporedba različitih postupaka ekstrakcije najbolji je način dobivanja pouzdanih informacija. Spoj SeMet je glavni oblik identificiran u proteinima enzimskom ili kiselinskom razgradnjom.⁵⁷ Dobar analitički povrat postiže se složenim postupkom koji obuhvaća 16-satni refluks s metansulfonskom kiselinom (CH₃SO₃H) ili trostrukom razgradnjom s proteazom.⁵⁹ U kompleksnim matricama je teško istovremeno zadovoljiti kriterije robusnosti i osjetljivosti. Pregledom literature o analizi selenija istaknuti su problemi vezani za analizu ovog elementa uglavnom zbog relativno niskog sadržaja selenija u hrani. Kemijski oblici selenija u hrani su kovalentno vezani sa drugim komponentama, posebice proteinima. Dodatci prehrani su po svom sastavu kompleksne matrice što ukazuje na važnost odabira tehnike razgradnje uzoraka za analizu i tehnike mjerenja.

2.3.1. Značajke analitičkih metoda atomske spektrometrije u analizi hrane

Metode atomske spektrometrije koje se obično koriste za određivanje ukupnog selenija u hrani su: elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS), atomska apsorpcijska spektrometrija generiranja hidrida (HG-AAS), atomska fluorescencijska spektroskopija (AFS-AAS), a u manjoj mjeri atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES) te spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS).⁷⁸⁻⁹⁵ Kontinuirani izvor zračenja visoke razlučivosti (HR-CS) u kombinaciji s ETAAS još je jedna alternativna tehnika za određivanje selenija.^{55,95}

Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (FAAS) je jedna od tehnika koja se najčešće koristila za određivanje elemenata u hrani. Ova analitička tehnika je izvanredna po svojoj selektivnosti, brzini i niskim troškovima rada.¹⁰ Međutim, potrebna je veća količina uzoraka, i karakterizira ju lošija osjetljivost i niže granice detekcije, (*limit of detection, LOD*) za selenij je LOD $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ u usporedbi sa tehnikom HG-AAS ($LOD = 2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) ili ETAAS ($LOD = 4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).^{10,56,96}

Neke od navedenih metoda mogu biti i obično jesu povezane s hidridnom tehnikom (HG), poznate kao HG-AAS, HG-AFS, HG-ETAAS i HG-ICP-OES. Svaka od ovih tehnika ima prednosti i nedostatke, primjena strogo ovisi o obliku prisutnog selenija u uzorku.^{71,74,83,84,86,88,97-99}

Elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS)

Metoda ETAAS je vrlo prikladna za rutinsku analizu elemenata u tragovima u uzorcima hrane.^{56,64,78-81} Relativno je jeftina, jednostavna i zahtijeva mali volumen mjerne otopine uzorka (od $5 \text{ } \mu\text{L}$ do $20 \text{ } \mu\text{L}$).¹⁰ Vrlo je osjetljiva te se njome postižu vrlo niske granice detekcije, između $0,1$ i $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.^{66,67,76,86} Interferencije matrice uvelike se eliminiraju tehnikom Zeemanove korekcije i /ili modifikatorima matrice. No, pogreške u kvantifikaciji i dalje su moguće i tijekom sušenja mjerne otopine i nestanka analita prije atomizacije uslijed njegove hlapljivosti.²² Potrebno je precizno kontrolirati temperaturu prije i za vrijeme uklanjanja matrice i temperaturu atomizacije.³⁰ Prisutnost matrice izaziva kemijske interferencije i povećava osnovnu apsorpciju (engl. *background*).⁶⁴ Tehnike za kompenzaciju efekta zaostale matrice su optimiranje temperaturnog programa za točno određenu matricu, uporaba kemijski aktivnog pogodnog plina u vrijeme zagrijavanja, primjerice kisika za uklanjanje matrice od anorganskih tvari,

vodika za vrijeme atomizacije, jer stvara redukcijsku atmosferu i modifikatora matrice koji utječu na hlapljivost matrice ili određenog analita (npr. Ni za lako hlapljivi Se).^{62,99} Zbog niske granice detekcije, selektivnosti i osjetljivosti moguće je analizirati organske i anorganske oblike selenija u različitim matricama hrane, ako se pri tome koriste odgovarajući modifikatori matrice. Učinkovitost modifikatora u količinama od samo nekoliko mikrograma pripisuje se činjenici da tijekom faze pirolize (od 400 °C do 800 °C), vjerojatno stvaraju stabilnu intermetalnu čvrstu vezu s analitom. Najčešće korišteni kemijski modifikatori matrice su: paladijev nitrat, magnezijev nitrat, amonijev fosfat, nikal nitrat, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) i askorbinska kiselina.^{67,83,97-101} Modifikatori su proučavani za određivanje različitih elemenata u različitim matricama hrane. Selenij je element koji ima vrlo nisku valnu duljinu za apsorpciju te različite matrice izazivaju kemijske interferencije i povećavaju osnovnu apsorpciju. Stoga je iznimno važno koristiti modifikator pri određivanju selenija. Upotreba obložene platforme L'vovljeve kivete s W-Rh oblogom pokazala se učinkovitijim od amonijeva fosfata, magnezijeva nitrata i paladija koji se najčešće koriste se kao kemijski modifikatori.⁸³ Za određivanje selenija u biljkama se ipak najbolje pokazalo korištenje modifikatora Pd(NO₃)₂ i Ir.^{3,67} Oblaganje grafitne kivete paladijem nije bilo moguće formirati stalni paladijev premaz te je za analizu selenija potrebno je dodati i nikal što je omogućilo stvaranje kompleksa "niklovog selenida" koji je dovoljno stabilan da ostane na površini grafita do faze atomizacije i otpuštanja selenijevih atoma.¹⁰¹ Prema klasifikaciji modifikatora iridij pripada skupini elemenata (rutenij, paladij, rodij, iridij) koji se mogu reducirati u elementarno stanje tijekom pirolize.^{100,101} U suvremenim pristupima poboljšanja osjetljivosti određivanja istaknula se tehnika uporabe iridijem obložene grafitne kivete, kojom je moguće postići ukoncentriravanje analita u samom procesu mjerenja. Iridijem obložena grafitna kiveta, za određivanje selenija omogućuje temperaturu pirolize od 800, 1200 i 1400 °C. Ista kiveta se može koristiti za 700 temperaturnih ciklusa.^{67,101} Prednost pred obrade površine kivete s modifikatorom je ta da se može očistiti prije analize, čime se smanjuje signal slijepe probe. Primjerice, ukupni i rezidualni sadržaj selenija u ljekovitom bilju koji se koristi za liječenje raka i različitih bolesti ekstrahiran je mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom i klasičnom ekstrakcijom u vodenom mediju te analiziran. Nadalje, uporabom iridijem obložene kivete određen je sadržaj selenija u vodenom ekstraktu u rasponu od 1,09 µg g⁻¹ do 2,23 µg g⁻¹ što odgovara 21 % do 33 % ukupnog sadržaja selenija.⁶²

Atomska apsorpcijska spektrometrija visokog razlučivanja s kontinuiranim izvorom zračenja (HR-CS-AAS) je proširila mogućnosti konvencionalnih AAS metoda. Uporaba ksenonove lučne lampe kao kontinuiranog izvora zračenja visokog intenziteta i poluvodičkog detektora (engl. *charge coupled device*, CCD) s 588 piksela, omogućuje automatiziranu korekciju pozadine poboljšavajući granicu detekcije. Tehnika HR-CS-AAS je korištena za kvantificiranje ukupnog sadržaja selenija u dodatcima prehrani sa primjenom različitih kemijskih modifikatora (paladijev nitrat i magnezijev nitrat). Optimizacijom temperature pirolize (1050 °C) i temperature atomizacije (2000 °C) postignute su granice detekcije (*Limit of Detection, LOD*) i granice kvantifikacije (*Limit of Quantification, LOQ*) 0,10 µg g⁻¹ odnosno 0,34 µg g⁻¹.^{3,95} Primjenom HR-CS-AAS metode određivan je selenij u uzorcima hrane (kukuruzno, rižino, zobeno i heljdino brašno, češnjak, brusnice, goji bobice i grožđice).

Atomska apsorpcijska spektrometrija generiranja hidrida (HG-AAS)

Tehnika generiranja hidrida (HG) daje niz prednosti za analizu, uključujući visoku učinkovitost transporta analita u atomski spektroskopski detektor i učinkovito odvajanje matrice, što često dovodi do smanjenja smetnji i poboljšanja granica detekcije. Ima široku primjenu za određivanje selenija u uzorcima vode, tla, hrane i biljaka.^{63,71-83,99} Jedna je od tradicionalnih tehnika uvođenja otopina uzorka u kvarcnu kivetu kao atomizacijski izvor atomskog apsorpcijskog spektrometara (Q-FAAS) što uz prethodno generiranje hidrida osigurava brz, jednostavan i jeftin pristup za određivanje selenija.⁹⁹ Za stvaranje kemijski hlapljivog spoja (engl. *chemical vapour generation*, CVG) najčešće je kao redukcijski agens korišten natrijev borhidrid u kiselom mediju (NaBH₄/HCl).^{63,97} Razmatrani su učinci redukcije L-cisteinom i kiselinama kao što su oksalna, vinska, adipinska, salicilna i neke aminokiseline.⁶⁶ Nastali plin vodikov selenid (H₂Se) prenosi se u zagrijanu kvarcnu ćeliju i prati se apsorpcija ultraljubičastog zračenja (obično 196 nm za Se). Parametari koji bi mogli utjecati na osjetljivost metode HG-AAS su izvedba sustava, vrsta i količina kiseline, količina natrijeva borhidrida i temperatura.⁹²

Na učinkovitost redukcije selenija u H₂Se utječu koegzistirajući ioni Fe³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Sb²⁺ i As³⁺, As³⁺ i Sb³⁺ koji također mogu reagirati s NaBH₄ i stvoriti odgovarajuće spojeve. Ioni bakra u koncentraciji > 10 000 µg L⁻¹ znatno smanjuju apsorpciju selenija što se može poboljšati upotrebom otopina HCl od 12 mol L⁻¹ umjesto 6,0 mol L⁻¹. Ostali istraživani ioni nisu utjecali na određivanje selenija.^{81,83,84} U pogledu visoke selektivnosti tehnike HG-

AAS, proučavan je učinak različitih iona na odvajanje Se^{4+} . Sustavnim proučavanjem interferirajućih iona u flotaciji $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Se}^{4+}$ pogrešku veću od 5 % nisu uzrokovali navedeni ioni: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} i Li^+ . Međutim, ioni Cr^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Sc^{3+} , Te^{2+} , Fe^{3+} , Pd^{2+} , Au^+ , Bi^{2+} , Zr^{4+} , Ti^{4+} , V^+ , Cu^{2+} , i Ni^{2+} masenih koncentraciji $> 200 \text{ mg L}^{-1}$ uzrokovali su pozitivne smetnje.⁸³

Osjetljivost tehnike Q-FAAS ograničena je smetnjama uzrokovanim kontaminacijom unutarnje površine kvarcne cijevi.^{66,84} Međutim, ova tehnika ima neke nedostatke koji bi se mogli pojaviti u procesu stvaranja i oslobađanja hidrida, tijekom transporta do atomizacijske ćelije, te u plinskoj fazi tijekom koraka atomizacije. Upotreba *in situ* hvatanja hidridnih para u grafitnu peć (HG-ETAAS) povećava relativnu moć detekcije kao rezultat pred koncentracije analita.^{66,67} Kao prikladna alternativa korištena je tehnika generiranja elektrokemijske pare (engl. *Electrochemical Vapour Generation*, EcVG) tj. redukcija analita u hlapljive kemijske oblike korištenjem električne struje u mediju mineralne kiseline.^{47,99}

U usporedbi s drugim tehnikama generiranja, korištenje ograničenog broja kemikalija, kao što su organske kiseline niske molekularne mase ili drugih kemikalija kao što su alkoholi ili aldehidi prednosti se daje UV-fotokemijskom generiranju (engl. *UV photochemical vapor generation*, UV-PVG). Korištenjem mravlje kiseline, koncentracije $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ kao fotokemijskog agensa tijekom UV potpomognute konverzije selenita iz kondenzirane u plinovitu fazu postignuta je vrlo niska granica detekcije, 40 ng L^{-1} . Mehanizam reakcije nije potpuno razjašnjen zbog složene prirode fotoreakcija. Pretpostavlja se stvaranje reaktivnih radikala koji nastaju fotolitičkom razgradnjom organskih kiselina i kontroliraju redukciju analita. U novije vrijeme korišten je fotokatalitički sustav za generiranje na bazi nanopoluvodiča ($\text{Ag-TiO}_2/\text{UV-PVG}$, $\text{ZrO}_2\text{-TiO}_2/\text{UV-PVG}$) i detekcija hlapljivih kemijskih oblika pomoću metoda AFS ili ICP-MS.⁴⁷ Za određivanje selenija u uzorcima vode korišten je automatizirani sustav koji spaja elektrokemijski sustav generiranja hidrida (*Electrochemical Hydride Generation*, EcHG) s ET-AAS i grafitnom cijevčicom obloženu paladijevim modifikatorom te kvarcnom kapilaram kao sučeljem. Ukupna učinkovitost generiranja hidrida elektrokemijskim sustavom je lošija ($71 \pm 7 \%$ za stanicu I i $80 \pm 5 \%$ za stanicu II) od generiranjem hidrida kemijskim putem (redukcijom NaBH_4 u kiselom mediju, $94 \pm 5 \%$).⁹⁷

U literaturi je opisano i nekoliko drugih tehnika koje uključuju generiranje hidrida za određivanje selenija u različitim uzorcima. Generiranje hidrida elektrotermičkim otparavanjem vezanim na optičku emisijsku spektrometriju uz mikrovalno induciranu plazmu (HG-ETV-

MIP-OES), odnosno generiranje hidrida vezano uz optičku ili masenu spektrometriju uz induktivno spregnutu plazmu (HG-ICP-OES ili HG-ICP-MS), obično dopuštaju istovremena više-elementna određivanja. Uporabom ovih metoda osiguravaju se granice detekcije ispod ng L⁻¹.⁹⁴ No, efikasnost primjene tehnike generiranja hidrida ovisi o kemijskom obliku selenija u uzorku.⁸⁸

Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES)

U kasnim 1980-ima postignuto je značajno poboljšanje analitičkih tehnika, zamjenom acetilena i drugih plinova za plamen korištenih u tehnici AAS plazmom za atomizaciju u ICP-OES i srodnim tehnikama. Ekscitacijski izvor mogu biti induktivno spregnuta argonska plazma (ICP), istosmjerna argonska plazma (engl. *Direct Current Plasma*, DCP) ili mikrovalno inducirana plazma (engl. *Microwave Induced Plasma*, MIP).^{89,91} Budući da su temperature u rasponu od 5000 do 9000 K, kemijske interferencije poput emisije molekulskih vrpca rijetko se događaju. Uzorak se uvodi preko raspršivača u komoru za raspršivanje. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES/OES) omogućuje istovremenu analizu više elemenata i u mnogim slučajevima pruža točnost usporedivu s metodom ETAAS. Postala je metoda izbora u mnogim laboratorijima jer omogućuje određivanja više elemenata u jednoj mjernoj otopini uzorka za razliku od metode ETAAS kojom se određuje jedan element.^{9,13}

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu međunarodno je prihvaćena metoda za kvantitativnu multielementnu analizu.^{13,16,55,69,88, 91-94,102} Značajnije prednosti metode ICP-MS su selektivnost i visoka osjetljivost. Metoda ICP-MS omogućuje određivanje različitih stabilnih izotopa u različitim vrstama uzoraka.¹⁶ Analizatori masa su komercijalno dostupni u izvedbama: kvadrupolni sustav Q-ICP-MS, sustavi s trostrukim kvadrupolom (QQQ) i sustavi sa sektorskim analizatorom masa visokog razlučivanja (sf-ICP-MS) koji poboljšava osjetljivost detekcije od 10 do 100 ili čak do 1000. Tehnikom sf-ICP-MS mogu se razlikovati interferencije i izotop elementa budući da je razlučivanje spektrometra masa 7500 do 10 000.¹⁰²

Analiza selenija metodom ICP-MS otežana je pojavom nekoliko izobarnih interferencija na glavnim izotopima.²² Tablica 1. prikazuje preklapanje izotopa i izobarne interferencije na izotopima selenija.

Tablica 1. Preklapanje izotopa i izobarne interferencije na izotopima selenija

| Element | Se (m/z) | Zastupljenost izotopa, % | Preklapanje izotopa % | Poliatomske interferencije | Interferencije dvostruko nabijenih iona |
|---------|----------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|---|
| Se | 74 | 0,9 | ^{74}Ge (36,3) | | ^{148}Nd , $^{148}\text{Sm}^{2+}$ |
| Se | 76 | 9,4 | ^{76}Ge (7,6) | $^{38}\text{Ar}_2^+$ | $^{152}\text{Sm}^{2+}$, $^{152}\text{Gd}^{2+}$ |
| Se | 77 | 7,6 | | $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ | $^{154}\text{Sm}^{2+}$, $^{154}\text{Gd}^{2+}$ |
| Se | 78 | 23,8 | | $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ | $^{156}\text{Gd}^{2+}$, $^{146}\text{Dy}^{2+}$ |
| Se | 80 | 49,6 | | $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ | $^{160}\text{Gd}^{2+}$, $^{160}\text{Dy}^{2+}$ |
| Se | 82 | 8,7 | Kr (11,6) | | $^{164}\text{Dy}^{2+}$, $^{164}\text{Er}^{2+}$ |

Od šest stabilnih izotopa selenija, mase ^{78}Se sa zastupljenošću od 23,8 % i ^{80}Se sa zastupljenošću od 49,6 %, su najveće osjetljivosti. Međutim, dimerni ioni argon-argon od $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ i $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ mogu stvarati interferencije pri određivanju selenija. Osim toga, Kr, koji je potencijalna nečistoća argona, preklapa se s ^{80}Se i ^{82}Se . Povijesno gledano, ^{77}Se i ^{82}Se u izotopi najčešće birani za analizu selenija u različitim uzorcima hrane. U određivanju izotopa ^{82}Se interferira $^{81}\text{Br}^1\text{H}^+$, dok ^{77}Se se može određivati samo u uzorcima s relativno niskim koncentracijama klorida zbog interferencija s $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$. Smanjiti ili potpuno eliminirati interferencije moguće je uporabom dinamičke reakcijske ćelije (engl. *dynamic reaction cell*, DRC) ili diskriminacije kinetičke energije (engl. *Kinetic Energy Discrimination*, KED)^{55,88}

Reaktivni plin vodik se koristi se u rijetkim situacijama u kojima način sudara He nije dovoljno učinkovit, na primjer $^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$ i $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ na $^{39}\text{K}^+$, $^{40}\text{Ca}^+$ i $^{56}\text{Fe}^+$. Za suzbijanje poliatomskih iona iz plazme kao što su ArO^+ i Ar_2^+ koristi se reaktivni plin vodik, ionizacijskog potencijala (15,5 eV). Molekule H_2 reagiraju s ArAr^+ ionima, ali ne reagiraju s ionima selenija, što omogućuje bolju detekciju selenija.^{88,69} Međutim, to ne znači nužno da su sve vrste reakcija odnosno interakcija između H_2 i iona analita zanemarive. Kada se poveća brzina protoka H_2 , dolazi do gubitka iona Cu^+ i As^+ , međutim gubitak tih iona je relativno mali u usporedbi s gubitkom uzrokovanim drugim reaktivnijim plinovima.^{55,94}

2.4. Multivarijatna statistička analiza mjernih rezultata

Multivarijatna analiza podataka predstavlja skup statističko-matematičkih postupaka u analizi mjernih podataka s primjenom u predviđanju više varijabli koje su u međusobnim odnosima u sustavima visoke kompleksnosti i optimizaciji modela pomoću kojih je moguće opisati i predvidjeti ponašanje takvih sustava. Dostupnost računalnih programa potrebnih za složena izračunavanja omogućuju primjenu različitih statističkih tehnika multivarijatne analize.

Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i hijerarhijska analiza klastera (engl. *Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) su multivarijantne statističke tehnike koje omogućuju analizu sličnosti ili razlika između uzoraka u skupovima s velikim brojem podataka, kao što je homogenost ili heterogenost, grupiranje uzoraka prema stupnju sličnosti.^{9-15,19,103,104}

2.4.1. Metoda analize glavnih komponenti (PCA)

Ova metoda primjenjuje se za redukciju dimenzionalnosti i interpretaciju podataka, gdje glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način, pri čemu se pronalaze i tumače skrivene složene i slučajno određene odnose (sličnosti i razlike) između značajki u skupu podataka. Glavni ciljevi metode PCA su redukcija i analiza linearne povezanosti većeg broja multivarijatno distribuiranih, međusobno koreliranih varijabli. Metoda ima za cilj dobivanje manjeg broja novih varijabli, međusobno nekoreliranih uz minimalni gubitak informacija. Najveći broj novih varijabli koji može nastati jednak je broju izvornih. Zbrajanjem varijanci svih izvornih varijabli dobije se ukupna varijanca, a dio ukupne varijance objašnjava jedna glavna komponenta (PC) poznata i kao svojstvena vrijednost, latentni korijen ili *eigen* vrijednost (*eigenvalue*). Prva glavna komponenta ima najveću svojstvenu vrijednost, PC1, druga manju, PC2, treća još manju, PC3 i tako dalje. Suma svih svojstvenih vrijednosti jednaka je ukupnoj varijanci, a cilj je izdvojiti što veći dio ukupne varijance u nekoliko prvih glavnih komponenata i na taj način reducirati broj izvornih varijabli.^{9-15,18,103,104}

2.4.2. Hijerarhijska analiza klastera (HCA)

Pojam analiza klastera ili grupiranja podataka obuhvaća metode koje su primarno korisne za pronalaženje i stvaranje vidljivih struktura unutar promatranih i danih podataka. Analiza

klastera je zajednički naziv za skup različitih klasifikacijskih postupaka, koji se ne temelje na nekim određenim statističkim testovima. Za razliku od drugih statističkih metoda, ova analiza najčešće se koristi u slučajevima kada još nemamo unaprijed (tj. u eksplorativnom dijelu istraživanja) definirane tvrdnje koje želimo testirati. Kako se analiza klastera i diskriminantna analiza odnose na problem klasifikacije objekata u kategorije, diskriminantna analiza zahtjeva poznavanje grupne pripadnosti za jedinice koje koristimo za utvrđivanje klasifikacijskih pravila.

Cilj analize klastera jest utvrđivanje homogenih grupa ili klastera tj. razvrstavanje slučajeva (točki praćenja) u grupe tako da stupanj povezanosti između članova istog klastera bude jak ili slab. Rezultirajući klasteri bi tada trebali pokazivati visoku unutarnju (unutar klastera) homogenost i visoku vanjsku (između klastera) heterogenost. Svaki klaster tako opisuje klasu kojoj pripadaju njegovi članovi. Euklidska udaljenost obično daje sličnost između dva uzorka, a udaljenost se može predstaviti razlikom između analitičkih vrijednosti iz uzoraka.^{14,15,103,104}

Postupci PCA i HCA su korisni alati za diferencijaciju i klasifikaciju biljnih uzoraka prema profilu elemenata. Stoga su ove metode primjenjive u kontroli kvalitete ishodnih biljnih materijala i njihovih prerađenih dodataka u smislu osiguranja njihove sigurnosti, kvalitete i učinkovitosti.¹⁵

2.4.3. Diskriminantna analiza (DA)

Diskriminantna analiza je metoda koja omogućava utvrđivanje koje varijable prave razliku između dviju ili više prirodno formiranih grupa/objekata. Cilj analize je da se definira manji broj novih varijabli, koje bi opisale razlike među grupama. Te se nove varijable nazivaju diskriminantnim varijablama na temelju kojih istraživač može izvršiti diskriminaciju između različitih (prirodno formiranih) grupa i klasificiranje entiteta (objekata) u različite grupe s većom točnošću nego što je slučajna (nasumična) klasifikacija.^{9,14,102,103}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije, uređaji i pribor

3.1.1. Kemikalije i certificirani referentni materijal, CRM

- klorovodična kiselina, $w(\text{HCl}) \geq 37\%$ (*Ultrapur for trace analysis*, Scharlab S.L., Scharlau, Barcelona, Španjolska)
 - dušična kiselina, $w(\text{HNO}_3) \geq 69\%$ (*Ultrapur for trace analysis*, Scharlab S.L. Scharlau, Barcelona, Španjolska)
 - referencijski standard iridija, koncentracije $\gamma(\text{Ir}) = (1000 \pm 2) \text{ mg L}^{-1}$ (Bernd Kraft GmbH, Duisburg, Njemačka)
 - natrijev hidroksid (*pellets for analysis*), $w(\text{NaOH}) \geq 99\%$ (Emsure ISO, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - natrijev borhidrit, $w(\text{NaBH}_4) > 98\%$ (Emsure ISO, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - vodikov peroksid, $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 31\%$ (*Ultrapur*, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - destilirana deionizirana voda, stupnja čistoće 18,2 M Ω cm (Milli-Q IQ 7000 system, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - referencijski standard selenija koncentracije, $\gamma(\text{Se IV}) = (1000 \pm 5) \text{ mg L}^{-1}$ u 0,5 mol L⁻¹ HNO₃ (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - multielementni referencijski standard 2A koncentracije $\gamma(\text{Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn}) = 10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - referencijski standardi koncentracije: $\gamma(\text{Mo}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$; $\gamma(\text{Hg}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$; $\gamma(\text{Au}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$; $\gamma(\text{B}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$ (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - unutarnji standard (engl. *Internal Standard Stability*, ISTD), koncentracije $\gamma(\text{Bi, Ge, In, Li}^6, \text{Sc, Tb, Y}) = 10,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - optimizacijska otopina koncentracije $\gamma(\text{Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
-

-
- certificirani referentni materijal (CRM) ili (*Standard Reference Material*, SRM) za provjeru efikasnosti pripreve i točnost analitičke metode:

SRM 1573a - *Tomato leaves* (National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, Maryland, SAD)

SRM 1570a - *Spinach leaves* (National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, Maryland, SAD)

SRM 1568b - *Rice flour* (National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, Maryland, SAD)

SRM 1548a - *Typical diet* (National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, Maryland, SAD)

SRM 3280 - *Multivitamin/Multielement tablets* (National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, Maryland, SAD)

SRM 1567a - *Wheat flour* (National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, Maryland, SAD)

SELM 1 - *Selenium enriched yeast* (National Research Council, NRC, Kanada)

IAEA 359 – *Trace and minor elements in cabbage* (International Atomic Energy Agency, Beč, Austria)

BCR 414 - *Plankton* (Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgia)

3.1.2. Uređaji i ostali pribor

- tarionik od ahata sa tučkom, promjera 80 i 150 mm, (*Sigma-Aldrich Handels GmbH*, Beč, Austria)
 - sistem za mikrovalnu razgradnju uzoraka, (*Ethos Easy, SK-15 high-pressure rotor*, Milestone, Srl Sorisole (BG), Italia)
 - Analitička vaga s podijeljkom $1d = 0,1$ mg, XP205DR (Mettler-Toledo, Switzerland)
 - Uređaj za deionizaciju vode, Milli Q IQ 7000 (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - Posudice za mjerenje s navojem, 30 mL, polipropilen PP (Sarstedt AG and Co, Nümbrecht, Njemačka)
 - automatske pipete različitih volumena s bezbojnim nastavcima (Eppendorf, Njemačka)
-

3.2. Uzorci biljnih dodataka prehrani

Uzorci biljnih dodataka prehrani ispitani u ovom radu predstavljaju hrvatsko (zagrebačko) tržište i prikupljeni su putem različitih kanala distribucije (online, ljekarne, supermarketi i drogerije) a njihov opis prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Opis i porijeklo uzoraka biljnih dodataka prehrani

| Oznaka | Proizvođač | Biljni dodatci prehrani - Opis, Sastav | Oblici |
|--------|------------|---|---------|
| 1 | SAD | Spirulina, (100 % mikroalga), prirodni uzgoj na farmi u Kona, Hawaii, USA; vitamini B1, B6, B12, E, 64 % proteini; beta-karoten; klorofil; minerali Fe i Na | Tableta |
| 2 | SAD | Spirulina (modro-zelena alga), vitamini C, E i B; minerali jod, brom, mangan, kalij, željezo esencijalne amino kiseline | Tableta |
| 3 | SAD | Spirulina, višestanične modro-zelena alga (<i>Arthrospira platensis</i>) uzgojena na sunčanoj obali Kona, Hawaii, USA, proteini; zasićene masene kiseline; fikobiliproteini; karotenoidi; polisaharidi; vitamini A, K1, K2, B12; minerali Fe, Mg, Mn, Cr, Na, K | Prah |
| 4 | UK | Spirulina, (modro-zelena alga) organski uzgoj svježa izvorska voda), vitamini B1, B6, B12, E; proteini (64 %); beta-karoten; klorofil i Fe | Prah |
| 5 | Indija | Spirulina, (modro-zelena mikroalge): 1,33 % klorofila; biljni proteini; beta-karoten; masne kiseline; vitamini B1, B2, B6, B12, E; minerali Ca, Fe, Na, K, Zn, Se | Tableta |
| 6 | SAD | Spirulina, višestanične modro-zelene alga (<i>Arthrospira platensis</i>), 100 % vegan; vitamini A, K, B12 i Fe | Prah |
| 7 | Rusija | Ekstrakt kupine (<i>Spirulina platensis</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>Eleutherococcus</i> , <i>Helianthus tuberosus</i>), Cr | Kapsula |
| 8 | SAD | Spirulina, 100 % prirodna, proteini, vitamini i minerali, Chlorella | Kapsula |
| 9 | Belgija | Organski uzgojena <i>Chlorella spp.</i> , klorofil; multivitamini A, C, B1, B2, B3, B6, B12; Fe, Mg, K | Tablete |
| 10 | UK | Crvena algae (<i>Lathothamminum sp.</i>), alge jezera Klamath, smeđa Algae (<i>Ascophyllum nodosum</i>); <i>Dunaliella Salina Algae</i> ; vitamini C, B12, Ca, Fe i beta-karoten | Kapsula |
| 11 | Hrvatska | Ekstrakti citrusa (<i>Citrus sinensis</i> , L Osbeck, <i>Citrus aurantium</i> , subsp. <i>Amara</i> , <i>Citrus paradisi</i> , <i>Paulinia cupana</i>); ekstrakt i smeđe morske alge <i>Ascophyllum nodosum</i> | Kapsula |
| 12 | Kina | Spirulina (iz organskog uzgoja), 100 %, višestanična modro-zelena alga raste u slatkovodnim jezerima | Prah |
| 13 | Slovenija | Spirulina, 50 %, Chlorella; 20 %, Barleygrass; 10 %, lucuma; 10 % klorofil; vitamin C i mineral Fe | Prah |
| 14 | Indija | Ashwagandha, VidarI Kanda, Guduchi, Gokshura, Amla, Satavari | Tableta |
| 15 | Indija | Ajurvedska formulacija (<i>Embllica officinalis</i>) | Tableta |
| 16 | Indija | Ajurvedska formulacija (<i>Bacopa monnieri</i> , <i>Glycyrrhiz glabra</i> , <i>Asparagus racemosus</i> , <i>Piper longum</i> , <i>Withania somnifera</i>) | Tableta |
| 17 | Indija | Ajurvedska formulacija, nepoznatog sastava | Džem |
| 18 | Indija | Ajurvedska formulacija (<i>Picrorhiza kurroa</i> , <i>Eclipta alba</i> , <i>Rubia cordifolia</i> , <i>Saussurea lappa</i> , <i>Cossia tora</i> , <i>Albizia lebbeck</i>) | Tableta |
| 19 | Indija | Ajurvedska formulacija, sivananda; vitamini A, B1, B2, B6, B12, C, D | Džem |

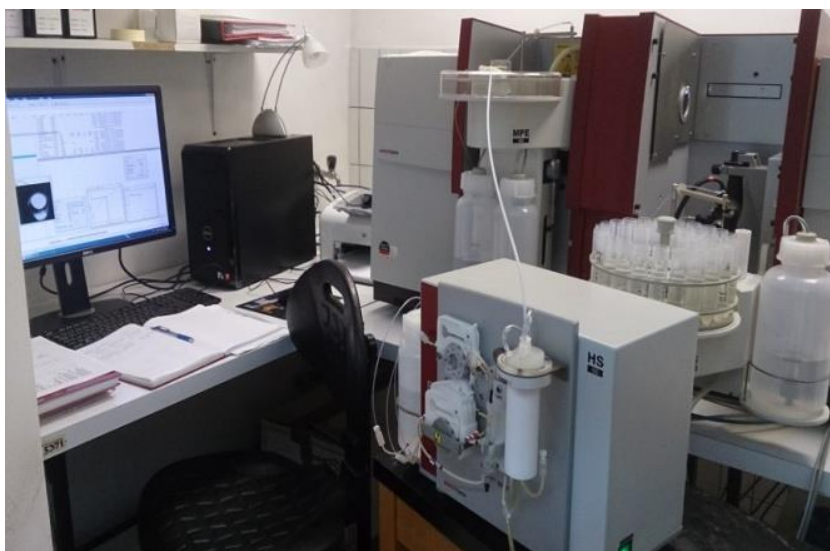
| | | | |
|----|-----------|---|---------|
| 20 | Indija | Ajurvedska formulacija (Ashoka, Shatavari, Vasaka); Ekstrakt <i>Saraca indica Dashamoola</i> i <i>Syiplocos racemose</i> | Kapsula |
| 21 | Indija | Ajurvedska formulacija, (<i>Albizia Lebbeck</i> , <i>Ocimum sanctum</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Ipomoea turpethum</i> , <i>Terminalia chebula</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Piper longum</i> , <i>Piper nigrum</i> , <i>Sipernat</i>) | Tableta |
| 22 | Indija | Ajurvedska formulacija, Dabur madhuvaani, Elaichi (<i>Elettaria cardamomum</i>), Vanslochan (<i>Bambusa arundinacia</i>), Dalchini (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) | Džem |
| 23 | Indija | Ajurvedska formulacija, (Ashtavaraga yukta) (kombinacija 44 odabrane biljke i minerali) | Džem |
| 24 | Indija | Ajurvedska formulacija (<i>Boswellia serrata</i> , <i>Commiphpra wightii</i> , <i>Alpinia galanga</i> , <i>Tinospora cordifolia</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Tribulus terrestris</i>) | Tableta |
| 25 | Indija | Ajurvedska formulacija, ekstrakt korijena <i>Capparis spinosa</i> ; <i>Tamaris gallica</i> ; <i>Terminalie ajrun</i> ; <i>Slamum nigr</i> ; <i>Cassa accidentalis</i> | Tableta |
| 26 | Indija | Ekstrakt kore garcinije (<i>Garcinia cambogia</i>); ekstrakt <i>Balsamodendron mukul</i> ; ekstrakt listova <i>Gymnema sylvestre</i> ; ekstrakt kore voća hebulске mirobalanke (<i>Terminalia chebula</i>); ekstrakt sjemenki <i>Trigonella foenum graecum</i> | Kapsula |
| 27 | Indija | Ajurvedska formulacija, (<i>Didymocarpus pedicellata</i> , <i>Saxifraga ligulata</i> , <i>Rubia cordifolia</i> , <i>Cyperus scariosus</i> , <i>Achyranthes aspera</i> , <i>Onosma bracteatum</i> , <i>Vernonia cinerea</i> , <i>Hajrul Yahoood Bhasma</i> , <i>Shilajeet</i>) | Tableta |
| 28 | Indija | Ekstrakt (<i>Chicorium intybus</i> , <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Andrographis paniculate</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Phyllanthus amarus</i> , <i>Emblica officinalis</i>) | Kapsula |
| 29 | Indija | Ekstrakt (<i>Bacopa monnieri</i> , <i>Centella asiatican</i> , <i>Withania somnifera</i> , <i>Evolvulus alsinoides</i> , <i>Nardostachys jastamansi</i> , <i>Valeriana wallichii</i>) | Tableta |
| 30 | Indija | Ekstrakt korijena (<i>Berberis aristata</i> , <i>Embica officinalis</i> , <i>Theminalia chebula</i> , <i>Theminalia belerica</i> , <i>Cassia fistula</i> , <i>Bauhinia veriegata</i>) | Tableta |
| 31 | Indija | Listovi nima (<i>Azadirachta Indica</i>) | Prah |
| 32 | Slovenija | Ekstrakt svježe brokule (<i>Brassica oleracea</i> , Ver. <i>Cymosa</i>) | Kapsula |
| 33 | Hrvatska | Ekstrakt svježe brokule (<i>Brassica oleracea</i> Ver. <i>Cymosa</i>) | Kapsula |
| 34 | UK | ekstrakt sušenog ružmarina (list); koncentrat povrća Crucifera (brokula, cvjetača, kupus i mrkva); ekstrakt sušene kurkume (korijen); koncentrat rajčice; kadulja (list); klinčić (cvijet) | tableta |
| 35 | Njemačka | Suhi standardizirani ekstrakt ploda platana (<i>Silybum marianum</i>); suhi ekstrakt listova artičoke (<i>Cynara scolymus</i>); vitamini E i minerali Zn, Se | kapsula |
| 36 | Hrvatska | Ekstrakt listova artičoke (<i>Cynara scolymus</i>) | Tableta |
| 37 | Hrvatska | Ekstrakt sjemenki platana; ekstrakt listova artičoke s cinarinom; listovi zelene masline | Kapsula |
| 38 | Bugarska | <i>Tribulus terrestris</i> L | Kableta |
| 39 | Hrvatska | <i>Lepidium meyenii</i> | Kapsula |
| 40 | Srbija | <i>Humulus lupulus</i> , <i>Mellissa</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Ginko biloba</i> | Kapsula |
| 41 | EU | Ekstrakt listova korejskog ginsenga, <i>Tribulus terrestris</i>); ekstrakti voća; minerali Zn, Se | Tableta |
| 42 | Indija | Ajurvedska formulacija, (<i>Tribulus terrestris</i> , <i>Asteracantha longifolia</i> , <i>Prunus amygdalus</i> , <i>Blepharisedulis</i> , <i>Crocus sativus</i>) | Kapsula |
| 43 | SAD | Organski uzgojene gljive (<i>Cordyceps sinensis</i> s.l., <i>Ganoderma lucidum</i>) | Kapsula |
| 44 | Slovenija | Gljive, Shii-take (<i>Letinus edodes</i>) | Kapsula |
| 45 | Slovenija | Gljive (<i>Ganoderma lucidum</i>); minerali Ca, Fe, K, Na, Mn, Zn. Ag, Ba | Kapsula |
| 46 | SAD | Gljive (<i>Ganoderma lucidum</i> var <i>resinaceum</i>) | Kapsula |
| 47 | Japan | Micelij japanske medicinske gljive; rižino brašno; Mg stearat | Kapsula |
| 48 | Rusija | Ekstrakti listova maline; breskve; kore limuna; bije; vitamini E, A, C | Kapsula |
| 49 | Rusija | Ekstrakti listova maline, borovnice, sjemenki grožđa; vitamini C, E i minerali Se, Zn, Mn | Kapsula |
| 50 | Hrvatska | Ulje češnjaka (<i>Allium sativum</i>) | Kapsula |
| 51 | Hrvatska | Laneno ulje (<i>Linum usitatissimum</i>), , 85 % omega 3 | Kapsula |

| | | | |
|----|-----------|---|----------|
| 52 | Egipat | Pepermint ulje (B.P. 80) | Kapsula |
| 53 | Italija | Ekstrakt soje (<i>Glycine Max</i>) i korijena biljke Yam (<i>Dioscorea Opposita</i>) | Tableta |
| 54 | Izrael | Ekstrakt fermentirane soje (DT56a, <i>Glycine max.</i>); mljevene sjemenke lana (<i>Linum usitatissimum</i>) | Kapsula |
| 55 | Njemačka | Prah od mladih listova ječma, (<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Oryza sativa</i>); organski uzgojena smeđa riža; vitamini A, C, K i minerali Ca, Fe, Na, Mg, K | Prah |
| 56 | Indija | Stabljike ječma, (<i>Hordeum vulgare</i>); vitamin C i minerali Ca, Fe, Na | Tableta |
| 57 | Kina | Ekstrakt korijena (<i>Panax Ginseng</i>) | Tableta |
| 58 | Indija | Đumbir (<i>Zingiber officinalis</i>) | Kapsula |
| 59 | Švicarska | Suhi ekstrakt korijena koprive (<i>Urtica dioica</i> , <i>Cucurbita pepo</i>); vitamin E | Kapsula |
| 60 | Hrvatska | Ekstrakt crvene riže pomoću kvasca <i>Monascus purpureus</i> | Kapsula |
| 61 | Hrvatska | Ekstrakt fermentirane crvene riže | Kapsula |
| 62 | Švicarska | Bazga (<i>Sambucus nigra L.</i>) i vitamin C | Kapsula |
| 63 | Slovenija | Vinova liza (<i>Vitis vinifera</i>); ekstrakt zelenog čaja (<i>Camellia sinensis</i>); rajčica u prahu (likopen), resveratrol | Kapsula |
| 64 | Hrvatska | Ekstrakt aronije (<i>Aronia melanocarpa</i>); vitamini C, B3, B2, A, D3 | Kapsula |
| 65 | Hrvatska | Ekstrakt <i>Phaseolus vulgaris L.</i> , plod bez sjemenki, <i>Vaccinium myrtillus L.</i> , <i>Herba Polygoni Avicularis</i> , <i>Caryophyllate</i> | Kapsula |
| 66 | Hrvatska | Suhi ekstrakt dijela kore Lapacho (<i>Tabebuia avellanadae</i> , <i>Tabebuia impetiginosa</i>) | Kapsula |
| 67 | Indija | Mješavina ekstrakta listova i praha biljke Sena (<i>Cassia augustifolia</i>) | Kapsula |
| 68 | Srbija | Ekstrakt korijena <i>Amorphophallus japonica</i> | Kapsula |
| 69 | SAD | Kora mačje kandže (<i>Uncaria tomentosa</i>); oksindol, alkaloidi; rižine mekinje u prahu | Kapsula |
| 70 | Hrvatska | Suhi ekstrakt <i>Passiflora incarnata</i> , <i>Valeriana officinalis</i> , <i>Melissa officinalis</i> | Tableta |
| 71 | SAD | Ekstrakt <i>Sillibum marigum</i> ; vitamini B1, B2, B6, B12 | Kapsula |
| 72 | SAD | Ekstrakt u prahu <i>Garcinia mangostana L.</i> , ekstrakt zelenog čaja; ekstrakt sjemenki grožđa, grejpa, nara; prah borovnice i ploda borovnice | Kapsula |
| 73 | Japan | Organski sok od mrkve i organske bobice acerole; vitamini A, C; alfa-karoten; beta-karoten | Prah |
| 74 | Hrvatska | Suhi ekstrakt aronije (<i>Aronia melanocarpa</i>) | Kapsula |
| 75 | Švicarska | Cimet u prahu (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>); minerali Cr, Zn | Tableta |
| 76 | UK | Ekstrakti listova ružmarina (<i>Rusmarinum officinalis</i>), korijena kozlinca (<i>Astragalus membranaceus</i>), kurkume (<i>Curcuma longa</i>); vitamini A, C, E | Prah |
| 77 | SAD | Ekstrakt voća Garcinie (<i>Garcinia cambogia</i>); Cr | Prah |
| 78 | SAD | Ekstrakt <i>Camellia sinensis</i> , <i>Malva sylvestris</i> , <i>Hibiscus sabdariffa L.</i> , <i>Elettaria cardamomum</i> ; ekstrakt limuna | Prah |
| 79 | Hrvatska | Suhi ekstrakt korijena bijelog sljeza (<i>Althaea officinalis</i>) | Tekućina |
| 80 | Hrvatska | Biljni bijeli trputac (<i>Plantago lanceolata</i>) | Tekućina |
| 81 | Hrvatska | Ekstrakt kozlinca i sjemenki grožđa | Kapsula |
| 82 | Hrvatska | Stanice kvasca (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); eterično ulje naranče; vitamini C, B6, B12, E i Zn | Kapsula |
| 83 | Hrvatska | Ekstrakt kore cejlonskog cimeta (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>); inulin | Kapsula |
| 84 | Njemačka | <i>Linum usitatissimum</i> , <i>Pimpinella anisum</i> | Tableta |
| 85 | Indija | Ekstrakt <i>Gymnema sylvestre</i> , <i>Pterocarpus marsupium</i> , <i>Glycymiza glabra</i> , <i>Casearia esculanta</i> (višekomponentni biljni proizvod) | Tableta |
| 86 | UK | <i>Polygonum cuspidatum</i> (korijen), 50 % resveratrol | Kapsula |
| 87 | Italija | Alkoholni ekstrakt konopljike, 65 % (<i>Vitex Agnus-castus L</i>) | Tekućina |

3.3. Instrumenti

3.3.1. Atomski apsorpcijski spektrometar s elektrotermičkom atomizacijom vezan na sustav generiranja hidrida (HG-ETAAS)

U ovom radu razvijena je jednostavna i brza analitička metoda za određivanje selenija u biljnim dodatcima prehrani pomoću elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije na principu *in situ* hvatanja razvijenog hidrida u grafitnoj kiveti obloženoj iridijem. Mjerenja su izvedena na atomskom apsorpcijskom spektrometru s elektrotermičkom atomizacijom, uz Zeemanov efekt, AAS 700 P vezan na sustav za generiranje hidrida, model HS 60, (*Analitik Jena AG, Jena, Germany*), prikazanom na slici 1.



Slika 1. AAS 700 P sa HG sustavom, model HS 60

Kao izvor zračenja korištena je lampa sa šupljom katodom (engl. *Hollow Cathode lamps, HCL*) jakosti električne struje 8,0 mA, valne duljine 196,0 nm i optičkim prorezom mjerne zrake 1,2 nm.

Za transport otopine kalibracijskog standarda/mjerne otopine uzorka do reakcijske jedinice korištena je jednokanalna pumpa. Za transport natrijeva borhidrata, klorovodične kiseline i otpadnih reagensa (iz separatora plin-tekućina u spremnik) korištena je trokanalna pumpa. U reakcijskoj jedinici selenij iz mjerne otopine u kiselom mediju (3 % HCl) reakcijom

sa redukcijskim reagensom 0,3 % NaBH₄ razvija plinoviti hidrid, H₂Se, kako je prikazano u jednadžbi (1) i (2).



Nakon prolaska kroz reakcijsku jedinicu, faze se odvajaju u separatoru plin-tekućina. Generirani hidrid, H₂Se kontinuirano putuje strujom inertnog plina (argona) i uvodi se kanilom od titanija u iridijem obloženu grafitnu kivetu.

Temperaturni program grafitne peći za *in situ* hvatanje razvijenog vodikovog selenida (H₂Se) i atomizaciju selenija prikazan je u Tablici 3. Optimalna temperatura atomizacije selenija uz minimalne interferencije je 2100 °C. Integriranjem apsorbancije (*peak area*) signali daju vrijednosti od dva uzastopna mjerenja. Putem softvera *ASpect LS 1.5.3.0. Software, Analytik Jena AG, Jena, Germany*, kontrolirane su sve funkcije instrumenta.

Tablica 3. Radni parametri HG-ETAAS ZEE nit 700P i HG sustava, HS 60

| Radni parametri HG-ETAAS | |
|---|--|
| Tip lampe | Šuplja katodna lampa (HCL) |
| Jakost električne struje za lampu | 8,0 mA |
| Optički prorez mjerne zrake | 1,2 nm |
| Valna duljina Se | 196 nm |
| Način integracije | Površina pika |
| Tip grafitne kivete | Standardna pirolitička kiveta bez platforme, obložena iridijem |
| Radni parametri tehnike generiranja hidrida, HS 60 | |
| Način rada | Kontinuiran |
| Brzina pumpe | 3 mL s ⁻¹ |
| Volume uzorka | 10 mL |
| Ciklus obogaćivanja | 1 |
| Vrijeme opterećenja mjernom otopinom | 16 s |
| Vrijeme reakcije | 30 s |
| Vrijeme oplahivanja | 10 s |
| Vrijeme ispiranja | 15 s |
| Protok plina | 100 mL min ⁻¹ |
| Nosač otopine | 3 % HCl |
| Reducirajući reagens | 0,3 % NaBH ₄ u 0,1 % NaOH |
| Čišćenje | 15 s (sa kiselinom) |

| Temperaturni program grafitne peći, AAS ZEE nit 700P | | | | | | |
|--|-------------|--------------|--|-----------------------------|-----------|----------------------------|
| No. | Korak | Temp./ °C | Brzina postiz. temp./°C s ⁻¹ | Vrijeme zadržav. temp./s | Vrijeme/s | Protok plina (argon) |
| 1 | Sušenje | 300 | 300 | 2 | 2,9 | Min. |
| 2 | Piroliza | 310 | 50 | 20 | 20,1 | Maks. |
| 3 | AZ* | 310 | 0 | 6 | 6 | Bez plina |
| 4 | Atomizacija | 2100 | 1200 | 5 | 6,8 | Bez plina |
| 5 | Čišćenje | 2100 | 500 | 4 | 4,1 | Maks. |

*automatic zero, AZ

U radu su korištene pirolitičke grafitne kivete bez platforme obložene s 200 µg Ir, deponiranjem pet replika od 50 µL osnovne otopine iridija, masene koncentracije 1000 mg L⁻¹ uz temperaturni program prikazan u tablici 4. Iridijem obložena kiveta koristila se do 300 atomizacija bez ponovnog oblaganja. Nakon atomizacije, uslijedilo je čišćenje grafitne kivete od zaostajanja reakcijskog plina (selenij hidrida). Kako bi se izbjegao gubitak iridija temperatura čišćenja nije prelazila temperaturu od 2200 °C.

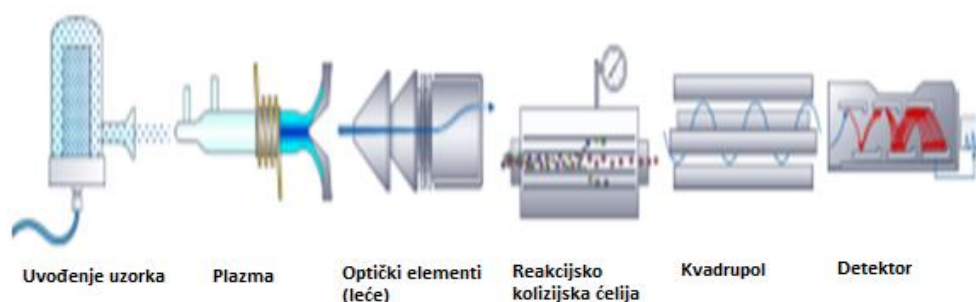
Tablica 4. Temperaturni program oblaganja grafitne kivete s iridijem

| Element | Korak | Temp./°C | Vrijeme postizanja temp./°C s ⁻¹ | Vrijeme zadržavanja temp. [s] | Plin (argon) |
|---------|-------------|----------|---|-------------------------------|--------------|
| Ir | Sušenje | 90 | 5 | 40 | Maks. |
| | Sušenje | 110 | 1 | 40 | Maks. |
| | Sušenje | 130 | 1 | 40 | Maks. |
| | Piroliza | 1200 | 300 | 26 | Bez plina |
| | Atomizacija | 2100 | 500 | 8 | Bez plina |
| | Čišćenje | 2100 | 0 | 5 | Srednje |

3.3.2. Spektrometar masa uz induktivno spregnutu plazmu, ICP-MS

U ovom radu korišten je spektrometar masa uz induktivno spregnutu plazmu, ICP-MS 7900, 1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) sa shematskim prikazom na slici 2. nakon prethodnog optimiranja radnih parametara koji su prikazani u tablici 5. Konstantan protok otopine kalibracijskog standarada/mjerne otopine u pneumatski raspršivač od borsilikatnog stakla, *MicroMist* uz dotok plina argona osigurava peristaltička pumpa. U komori za raspršivanje od kvarcnog stakla, tzv. *Scott double-pass* izdvajaju se male kapljice (< 10 µm) aerosola a veće kapljice kondenziraju i odvajaju u otpad. Izvor ionizacije je induktivno

spregnuta plazma koja se održava putem radio frekventnog polja od 1550 W. Ioni iz plazme se usmjeravaju u spektrometar masa kroz sučelje koje je pod vakuumom. Područje sučelja se sastoji od dvaju metalnih konusa (nikal), svaki s malim otvorom (0,6 mm do 1,2 mm) kako bi se ioni elektrostatički usmjeravali kroz ionske leće. Nakon što se ioni uspješno ekstrahiraju iz područja sučelja, oni se usmjeravaju u glavnu vakuumsku komoru s nizom elektrostatičkih leća. Ionska zraka, koja sadrži sve analitičke i matične ione, napušta ionsku optiku i prolazi u kvadrupolni spektrometar masa, frekvencije 3 MHz, s mogućnošću skeniranja masa u rasponu od 5 do 240 m/z (AMU). Ioni analita prolaze kroz središte kvadrupola i razdvajaju se prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Dospjeli ioni se detektiraju na detektoru sa diodnim nizom uz fotomultiplikator. Koncentracija elementa je proporcionalna broju iona. Faktor proporcionalnosti se određuje mjerenjem kalibracijskih otopina. Sustav za uklanjanje interferencija je oktopolska reakcijsko/kolizijska ćelija uz inertni plin helija i reakcijski plin vodika. Učinkovitost plazme se provjerava na snažno vezanu molekulu CeO ($^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+ < 1,5\%$).



Slika 2. Shematski prikaz kvadrupolnog sustava, ICP MS

Tablica 5. Radni parametri ICP-MS 7900 (Agilent Technologies, Japan)

Parameteri

| | |
|---|--|
| snaga radio frekventnog generatora (RF) | 1550 W |
| dubina uzorkovanja | 10,0 mm |
| plazma plamenik-H | 0,1 mm |
| plazma plamenik-V | 0,1 mm |
| peristaltička pumpa | 0,10 rps |
| protok plina za plazmu | 15 L/min |
| protok plina za oplahivanje | 0,12L/min |
| protok plina nosača | 1,05 L/min |
| raspršivač | <i>MicroMist</i> (borosilikatno staklo) |
| komora za raspršivanje | <i>Scott double-pass</i> (kvarc), hlađenje na 2 °C |

| | | | |
|---|---|------------|----------------------|
| konus | Nikal, promjer otvora 1 mm | | |
| konus | Nikal, promjer otvora 0,45 mm | | |
| granice za dvostruko nabijene ioni i okside | $^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^+ < 3,0 \%$ | | |
| | $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+ < 1,5 \%$ | | |
| | No gas | He | H₂ |
| protok kolizijsko-reakcijskog plina | / | 5,0 mL/min | 6,0 mL/min |
| ekstrakcijska leća 1 | 0 V | 0V | 0 V |
| ekstrakcijska leća 2 | -190 V | -190 V | -190 V |
| mjereni izotopi | $^{11}\text{B}, ^{23}\text{Na}, ^{24}\text{Mg}, ^{27}\text{Al}, ^{39}\text{K}, ^{44}\text{Ca}, ^{51}\text{V}, ^{52}\text{Cr}, ^{55}\text{Mn}, ^{56}\text{Fe}, ^{59}\text{Co}, ^{60}\text{Ni}, ^{63}\text{Cu}, ^{66}\text{Zn}, ^{75}\text{As}, ^{78}\text{Se}, ^{88}\text{Sr}, ^{96}\text{Mo}, ^{111}\text{Cd}, ^{121}\text{Sb}, ^{137}\text{Ba}, ^{202}\text{Hg}, ^{208}\text{Pb}, ^{205}\text{Tl}$ | | |

3.4. Postupak pripreme uzoraka za mjerenje selenija metodom HG-ETAAS

3.4.1. Homogenizacija uzoraka

Biljni dodatci prehrani su kompleksne matrice u kojima su prisutne amino kiseline, različiti dijelovi biljaka, ugljikohidrati, polisaharidi, soli i drugi sastojci. Prethodna priprema uzoraka biljnih dodataka prehrani ovisi o prirodi uzorka, odnosno nalazi se u čvrstom (kapsule, pilule praškasti uzorci), tekućem ili uzorku bogatom lipidima (uljne kapsule). Da bi se dobio reprezentativan uzorak, slučajnim odabirom uzeto je 10 jedinica iz originalnog uzorka svake marke i homogenizirano u fini prah u tarioniku od ahata. Kapsule s tekućim sadržajem su otvorene ili izrezane jednokratnim sterilnim skalpelom. Sadržaj kapsula je istisnut u tarionik i dobro promiješan. Tekući uzorci su homogenizirani okretanjem oko 15 min na rotacionoj miješalici prije uzimanja odgovarajućeg alikvota za razgradnju

3.4.2. Razgradnja uzorka

Priprava mjernih otopina biljnih dodataka prehrani provedena je u zatvorenom sustavu za razgradnju s pomoću mikrovalova (*Ethos Easy, Milestone Srl, Sorisole (BG) Italy*) opremljenim rotorom sa 15 reakcijskih posuda, izrađenih od fluoriranog polimera (politetrafluoretilena, PTFE), prikazan na slici 3. Maksimalna snaga sistema je 1800 W, a maksimalna temperatura do 220 °C. Kontrola temperature postiže se putem infracrvenog senzora koji automatski optimizira snagu magnetrona.



Slika 3. Sustav za mikrovalnu razgradnju uzoraka *Ethos Easy*

Prije svakog seta razgradnje, PTFE posude su čišćene dušičnom kiselinom primjenom programa za čišćenje sustava za mikrovalnu razgradnju preporučenim od strane proizvođača. Tijekom pripreme uzoraka kao i mjernog postupka korištena je destilirana deionizirana voda, (18,2 MΩ cm) pripravljena primjenom sustava Mili-Q za pročišćavanje vode. Ostali korišteni reagensi također su visoke analitičke čistoće. Stakleno i plastično laboratorijsko posuđe je prije uporabe namočeno u nitratnoj kiselini 24 sata, a zatim tri puta isprano destiliranom deioniziranom vodom.

Dva alikvota približne mase 0,3 g od svakog homogeniziranog biljnog dodatka prehrani izvagani su u PTFE posude, dodano je 2,0 mL destiliran deionizirane vode i 5,0 mL koncentrirane dušične kiseline (69 % *m/v*) te ostavljeno na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim je dodano 2,0 mL vodikovog peroksida H₂O₂ (30 % *m/v*). Kako bi izbjegli pjenjenje i prskanje, posude su ostavljene 20 minuta na sobnoj temperaturi, postavljene u sustav za mikrovalnu razgradnju pri programu prikazanom u tablici 6.

Tablica 6. Program razgradnje u zatvorenom sustavu za mikrovalnu razgradnju

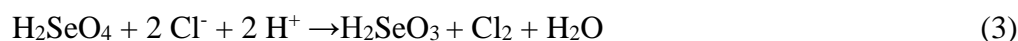
| Korak | Vrijeme, min | Temperatura, °C |
|-------|--------------|-----------------|
| 1 | 25 | 200 |
| 2 | 25 | 200 |
| 3 | 20 | hlađenje |

Nakon završetka razgradnje, ohlađene posude su pažljivo otvorene i otopine prebačene u PP posude, dopunjene sa destiliranom deioniziranom vodom na masu od 25 g. U svakom setu razgradnje obrađene su dvije slijepe probe i dva neovisna uzorka certificiranog referentnog materijala. Otopine za mjerenje su po potrebi višestruko razrjeđivane tako da je koncentracija selenija bila u linearnom području kalibracijske krivulje.

3.4.3. Redukcija Se(VI) u Se(IV)

Nakon mikrovalne razgradnje, priprema mjernih otopina za analizu selenija HG-ETAAS metodom zahtijeva dodatni korak kemijske obrade radi za pretvorbe svog prisutnog selenija u Se(IV) jer samo ionski tetravalentni selenij (selenit) formira selan, H₂Se. Na isti način se i heksavalentni selenij (selenat) u mjernim otopinama stanadarda mora reducirati u Se(IV) prije razvijanja hidrida.

Redukcija Se(VI) u Se(IV) izvedena je zagrijavanjem smjese alikvota (12,5 mL) otopine razgrađenog uzorka i 4 mol L⁻¹ HCl (faktor razrjeđenja 4) u vodenoj kupelji (*Grant, LSB Aqua Pro, UK*) na temperaturi od 90 °C tijekom 30 minuta, prikazano na slici 4. Otopine se ohlade na sobnu temperaturu prije mjerenja. Redukcija selenija iz visokog oksidacijskog stanja Se(VI) u kiselom mediju u niže oksidacijsko stanje Se(IV) prikazano je jednadžbom (3):

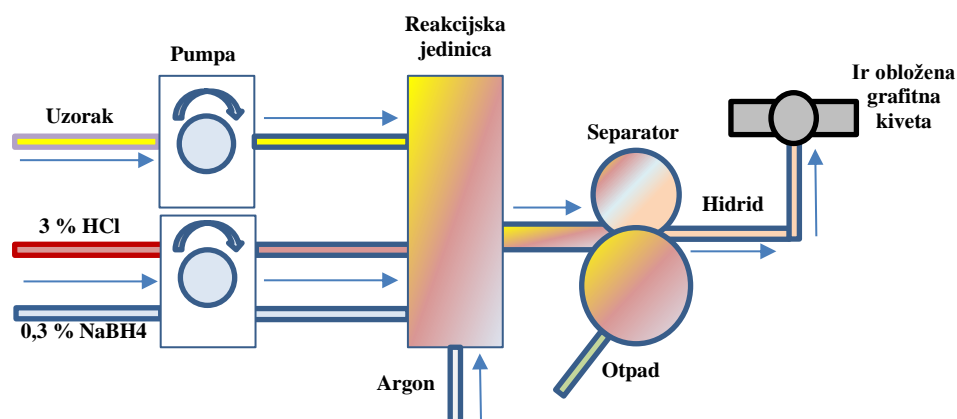


Slika 4. Vodena kupelj za redukcija selenija

3.4.4. Mjerni postupak za metodu HG-ETAAS

Prije svakog mjerenja pripravljene su otopine kalibracijskih standarda u koncentracijskom rasponu od 0,025 µg L⁻¹ do 0,50 µg L⁻¹ u 4 mol L⁻¹ HCl iz referencijskog standarda selenija Se (IV), koncentracije, $\gamma = (1000 \pm 5) \text{ mg L}^{-1}$. Također su svježe pripravljene 0,3 % (v/v) otopina NaBH₄ iz 3 % (w/v) NaBH₄, stabilizirane s 0,1 % (m/v) NaOH i otopina 3 % (v/v) HCl. Za redukciju Se(VI) u Se(IV) u mjernim otopinama uzoraka korištena je 4 mol L⁻¹ HCl. Koncentracija HCl za razrjeđenje mjerenih otopina uzoraka bila je usklađena sa koncentracijom kiseline u kalibracijskim otopinama, budući da osjetljivost odziva značajno ovisi o kiselosti matrice. Stoga, ako su izmjerene koncentracija selenija prelazile linearni raspon kalibracijske krivulje, ispitne otopine su višestruko razrjeđivane dodatkom 4 mg L⁻¹ HCl umjesto destiliranom deioniziranom vodom. Slijepe probe i certificirani referentni materijali podvrgnuti su identičnom postupku kao i ispitni uzorci.

Prethodno reducirane i po potrebi prethodno razrijeđene ispitne otopine i kalibracijske otopine mjerene su pomoću HG-ETAAS na principu *in situ* hvatanja razvijenog hidrida u grafitnoj kiveti obloženoj iridijem, shematski prikazanog na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz rada HG-ETAAS

Provedena su dva uzastopna mjerenja i dobiveni su podaci o integriranoj apsorbanciji (*peak area*) signala. Koncentracije selenija u ispitnim otopinama su dobivene izravno iz kalibracijske krivulje nakon korekcije za slijepu probu. Maseni udio selenija izražen je u jedinicama $\mu\text{g kg}^{-1}$, izračunat obzirom na odvagu i razrjeđenje. Sve navedeno obavlja se automatski u sklopu *ASpect LS* programa AAS uređaja.

Kontrola analitičkog postupka provedena je provjerom slijepih proba svakog seta razgradnje uzorka koje prolaze kroz cijeli analitički postupak uključujući razgradnju, razrjeđenja i analizu.

3.5. Postupak pripreve uzoraka za mjerenje elemenata metodom ICP-MS

3.5.1. Priprava uzoraka za metodu ICP-MS

Priprava mjernih otopina biljnih dodataka prehrani provedena je u zatvorenom sustavu za razgradnju s pomoću mikrovalova prema postupku već opisanom u poglavlju 3.4.2. Nakon razgradnje i hlađenja, otopine razgrađenih uzoraka su kvantitativno prebačene u plastične posudice volumena 50 mL i dopunjene do 50 g sa destiliranom deioniziranom vodom. Na isti način su pripravljene slijepe probe uzorka i certificirani referentni materijali. Po potrebi, mjerne otopine se višestruko razrjeđuju tako da je očekivana koncentracija analita u linearnom području kalibracijske krivulje. Efikasnost pripreve i točnost analitičke metode kontrolirana je certificiranim referentnim materijalima te dodatno metodama unutarnjeg standarda.

3.5.2. Mjerni postupak za metodu ICP-MS

Za određivanje 24 elementa (Se, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Mo, Cd, Sb, Se, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Sr, Tl, V, Zn) optimirani su parametri mjerenja tehnikom ICP-MS u svim uzorcima biljnih dodataka prehrani.

Kalibracijske otopine standarada pripremljeni su iz multielementnog referencijskog standarda i pojedinačnih referencijskih standarda u 2,5 % (*m/v*) HNO₃. Kalibracijske otopine standarada žive pripremljeni su u smjesi u 2,5 % (*m/v*) HNO₃ i 1,5 % (*m/v*) HCl. Kalibracijske krivulje izrađene su putem softvera (*MassHunter 4.4, Agilent Technologies*) iz izmjerenih intenziteta u odnosu na koncentracije za svaki element u kalibracijskim otopinama uz dodatak unutarnjeg standarda.

Unutarnji standard masene koncentracije 200 µg L⁻¹ (Bi, Ge, In, Li⁶, Sc, Tb, Y) uveden pomoću peristaltičke pumpe zajedno s otopinama, standarda za kalibraciju, slijepim probama i ispitnim otopinama u pneumatski raspršivač i komoru za raspršivanje te služi kao ionizacijski pufer kako bi se kompenzirali učinci matrice i *drift* te poboljšala preciznost mjerenja. Putem softvera uređaja omogućeno je praćenje omjera signala mjernog elementa i signala odabranog unutarnjeg standarda sa matricom.

Optimizacija radnih uvjeta unutar instrumenta (osjetljivost) s obzirom na nastajanje dvostruko nabijenih iona i oksida provodila se sa optimizacijskom otopinom masene koncentracije, γ (Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y) = 1 µg L⁻¹ koja sadrži ione koji pokrivaju čitavo

područje masa i ione koji su skloni formiranju oksida ili dvostruko nabijenih čestica. U ovom radu korišten je oktopolni sustav (*Octopole Reaction System*, ORS) uz inertni plin helij i reaktivni plin vodik za uklanjanje interferencija poliatomnih iona. H₂ je korišten pri analizi selenija i kalcija. Mjerenja berilija, bora i aluminija provedena su u načinu rada bez uvođenja plina (*tzv. „No gas“*) a ostali elementi su mjereni u inertnom plinu He. Sustav je ispiran s 2,5 % (v/v) HNO₃ i 1,5 % (v/v) HCl 15 minuta prije ugađanja instrumenta.

Kontrola pripreve i mjernog postupka provedena je pripravom i mjerenjem svakog uzorka i certificiranog referentnog materijala u duplikatu. Koncentracija svakog elementa je nakon preračuna s obzirom na odvagu i razrijeđenje prikazana kao maseni udio. Maseni udio Se, V, Cr, Co, As, Mo, Cd, Sb, Hg, Tl i Pb izražen je u $\mu\text{g kg}^{-1}$ a maseni udio B, Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr i Ba izražen je u mg kg^{-1} .

Za određivanje selenija metodom ICP-MS odabran je izotop ⁷⁸Se sa zastupljenosti od 23,6 % uz reakcijski plin H₂ i unutarnji standard ⁷²Ge.

3.6. Statistička obrada

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem programskog paketa *Statistica* verzija 13.5 (*TIBCO Software Inc., SAD*). Masena koncentracija elemenata Se, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Sr, Tl, V i Zn, dobivene metodom ICP-MS i masena koncentracija selenija dobivena metodom HG-ETAAS su obrađene automatskim skaliranjem i logaritamskom transformacijom što je rezultiralo korelacijskom matricom od 87 slučajeva i 25 varijabli.

Takav skup podataka podvrgnut je multivarijatnoj statistici (PCA, PLS-DA, HCA) kako bi se procijenile međusobne sličnosti i nepodudarnosti između uzoraka.

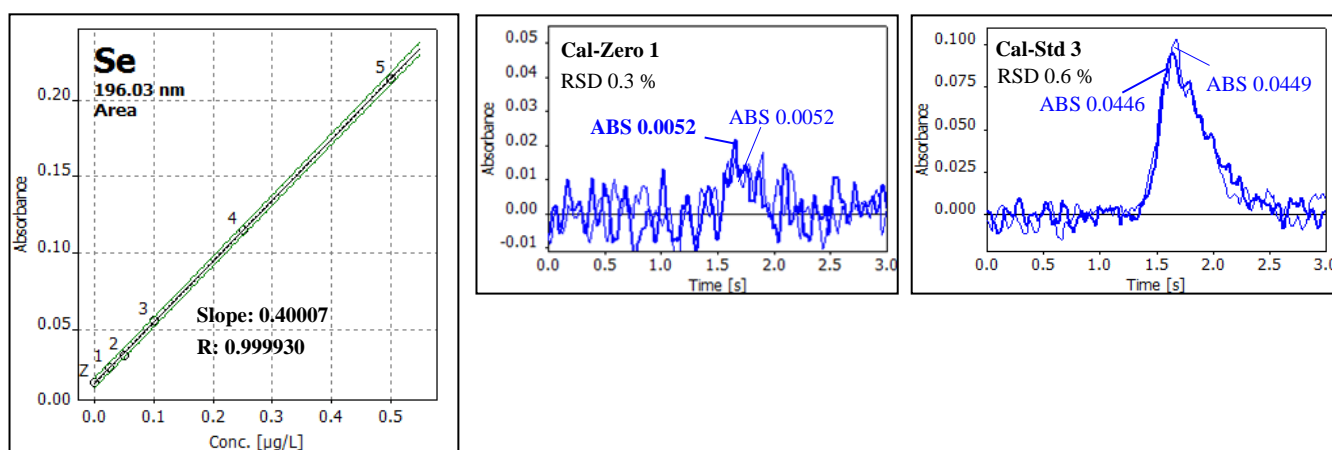
Generirani su dijagrami varijabilnosti rezultata i dijagram varijabilnog opterećenja. Provedena je parcijalna diskriminacijska analiza najmanjih kvadrata (PLS-DA) kako bi se poboljšala klasifikacija uzoraka. Generirane su vrijednosti parametra značajnosti varijabli (engl. *variable importance parameter*, VIP) koje omogućuju određivanje kandidata markerskih elemenata za diferencijaciju skupina uzoraka. Kako bi se identificirala struktura unutar skupa dobivenih podataka, na istoj je matrici provedena hijerarhijska analiza klastera (HCA) korištenjem euklidske udaljenosti uz potpunu vezanost, odnosno maksimalnu udaljenost između svih mogućih parova opažaja u dva klastera. Dobiveni dijagram, odnosno dendrogram, korišten je za klasifikaciju analiziranih uzoraka dodataka prehrani.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati određivanja selenija metodom HG-ETAAS

4.1.1. Validacijski parametri metode

Metodom HG-ETAAS ispitani su postupci određivanja ukupnog sadržaja selenija u obliku selenita Se(IV) u različitim formulacijama biljnih dodataka prehrani. Mjerenja su provedena u linearnom dinamičkom rasponu kalibracije od $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$ do $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, uz višestruko razrjeđivanje 4 mol L^{-1} HCl kiselinom za koncentracije selenija iznad gornje granice linearnog dinamičkog raspona kalibracije. Rezultirajuća kalibracijska krivulja prikazana je na slici 6.



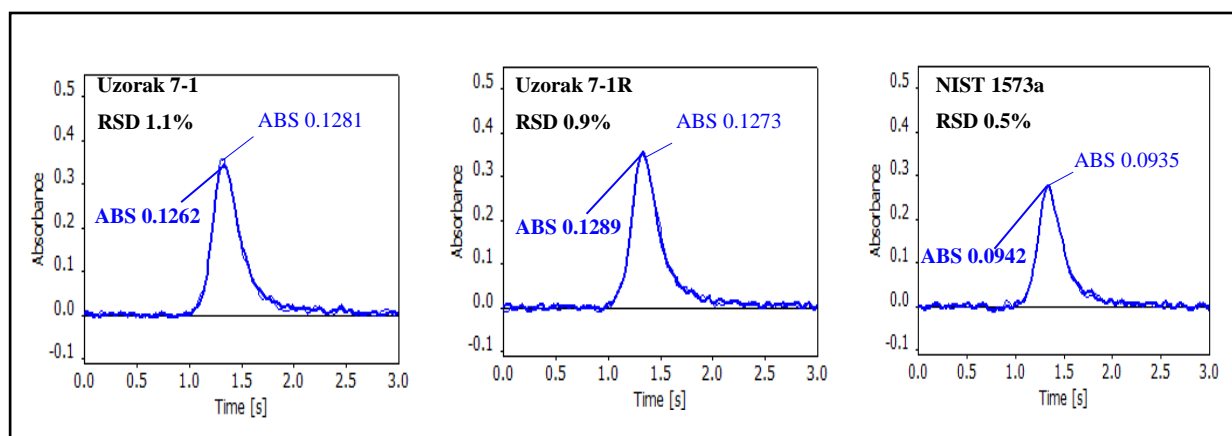
Slika 6. Kalibracijska krivulja za određivanje selenija (HG-ETAAS)

Iz dobivenih mjerenja i pripadajućih koeficijenata korelacije vidljivo je da je linearnost kalibracijskih krivulja iznimno zadovoljavajuća ($R = 0.9999$). Također je pozadinski šum (*background*) sveden na minimalne razine što svakako poboljšava detekcijske granice. Preciznost mjerenja selenija u iridijem obloženoj kivetu izražena kao relativno standardno odstupanje je iznimno zadovoljavajuća s rasponom od 0,3 % do 0,6 %.

Značajna prednost metode HG-ETAAS je potpuno odvajanje selenija iz matrice čime su uklonjene uobičajene interferencije koje se javljaju uporabom metode bez generiranja hidrida. Tehnika na principu *in situ* hvatanja razvijenog selenida koji kontinuirano putuje strujom inertnog plina argona, protoka 100 mL min^{-1} u grafitnu kivetu obloženu iridijem

dopušta adsorptivno prikupljanje selenida. Dakle, primjenom niza uzastopnih koraka pretkoncentracije povećavala se osjetljivost određivanja.

Svaki uzorak je pripremljen i mjerjen u duplikatu kao dva neovisna uzorka. Mjerni signali (*peak area*) dva uzastopna mjerenja uzorka u duplikatu i certificiranog referentnog materijala (NIST 1573) s preciznošću mjerenja od 0,5 % do 1,1 % prikazani su na slici 7.



Slika 7. Signali selenija u dva neovisna uzorka biljnog dodatka prehrani i certificiranog referentnog materijala, SRM 1573a (*Tomato Leaves*)

Metoda je validirana kroz sve stupnjeve analitičkog procesa na odabranim matricama koje su predstavljali CRM najbližiji mjerenim uzorcima biljnih dodataka prehrani. U tablici 7. prikazani su rezultati analize tri različite matrice CRM i validacijski parametri metode HG-ETAAS. Horwitzov omjer (*HorRat*) kao jedan od kriterija za procjenu prihvatljivosti metode s obzirom na preciznost iskazuje se kao omjer relativnog standardnog odstupanja (*Relative Standard Deviation*, RSD_R) izračunatog iz analize podataka i relativnog standardnog odstupanja odgovarajuće predviđene obnovljivosti (*Predicted Relative Standard Deviation*, $PRSD_R$). Parametar se izračunava pomoću *Horwitzove* jednadžbe (4):¹⁰⁵

$$PRSD_R (\%) = 2C^{-0,15} \quad (4)$$

gdje je C maseni udio analita izražen u $\mu\text{g kg}^{-1}$

Relativna standardna odstupanja ponovljivosti (RSD_r) su u rasponu od 1,03 % do 4,23 %, a relativna standardna odstupanja obnovljivosti (RSD_R Horwitz) varirala su od 12,28 % do 16,41

% . Dobivene *HorRat* vrijednosti od 0,084 do 0,258 su bile manje od 0,3 tj. $HorRat \ll 1$ tj. ispod kritične vrijednosti 2,0 ili $1 < HorRat \leq 2$ što se može objasniti manjim brojem izvedenih mjerenja na odabranim certificiranim materijalima.

Tablica 7. Validacijski parametri metode HG-ETAAS

| CRM | | <i>Tomato</i> | <i>Spinach</i> | <i>Rice flour</i> |
|--|-----------------------|---------------|----------------|-------------------|
| | | <i>Leaves</i> | <i>Leaves</i> | |
| | | NIST 1573a | NIST 1570a | NIST 1568b |
| Certificirana vrijednost ± Proširena mjerna nesigurnost (factor pokrivanja) $X_{CT} \pm U_{CT}$ (k = 2) | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 54,3±2 | 115,2 ± 4.3 | 366.1 ± 3.8 |
| Broj uzoraka, N | | 6 | 6 | 6 |
| Srednja vrijednost | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 53,4 | 113 | 366 |
| Standardno odstupnje, <i>Stdev_r</i> | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 2.26 | 3,22 | 3,76 |
| Relativno standardno odstupanje, RSD_r | % | 4,23 | 2,85 | 1,03 |
| Točnost | % | 98,3 | 98,2 | 100 |
| Ponovljivost, r | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 6,32 | 9,02 | 10,52 |
| RSD_R Horwitz | % | 16,41 | 14,66 | 12,28 |
| <i>HorRat</i> | | 0,258 | 0,194 | 0,084 |

Analitička točnost je procijenjena iz dobivenih prosječnih masenih udjela selenija i certificiranih vrijednosti u rasponu od 98 % do 100 %. Prosječna relativna standardna odstupanja u određivanju različitih CRM bila su manja od 3 % (od 0,71 % do 5,2 %) a na uzorcima u prosjeku do 5 % (1,1 % do 11,3 %). Granica detekcije za selenij dobivena izračunom standardnog odstupanja regresijskog pravca iznosi $LOD = 0,011 \mu\text{g L}^{-1}$, dok granica kvantifikacije (LOQ) iznosi $0,023 \mu\text{g L}^{-1}$, kako je prikazano u tablici 8.

Tablica 8. Izračun *LOD* i *LOQ* za selenij iz standardnog odstupanja regresijskog pravca metode HG-ETAAS

| Se (HG-ETAAS) | | | | | |
|---------------|----------------------|--------|---|-------------|---------------------------|
| | $\mu\text{g L}^{-1}$ | Abs. | Abs _{Siz.} | Razlika/Abs | Razlika ² /Abs |
| Slijepa proba | 0,000 | 0,0071 | 0,0065 | 0,00061235 | 0,000000 |
| Standard 1 | 0,025 | 0,0180 | 0,0165 | 0,00147251 | 0,000002 |
| Standard 2 | 0,050 | 0,0268 | 0,0266 | 0,00023267 | 0,000000 |
| Standard 3 | 0,100 | 0,0448 | 0,0466 | -0,00184701 | 0,000003 |
| Standard 4 | 0,250 | 0,1054 | 0,1069 | -0,00148606 | 0,000002 |
| Standard 5 | 0,500 | 0,2083 | 0,2073 | 0,00101554 | 0,000001 |
| | | | zbroj | 0,00000000 | 0,000009 |
| | | | S_{res} | | 0,00152 |
| | | | nagib pravca | | 0,40159 |
| | | | odsječak | | 0,00649 |
| | | | Granica detekcije ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | 0,011 |
| | | | Granica kvantifikacije ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | 0,023 |

Za procjenu nesigurnosti izmjerenih analitičkih rezultata dobivenih ovom metodom može se koristiti standardno odstupanje za ponovljivost. Na temelju prihvatljivih parametara validacije za preciznost, točnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije, metoda je prikladna za određivanje selenija u biljnim dodatcima prehrani.

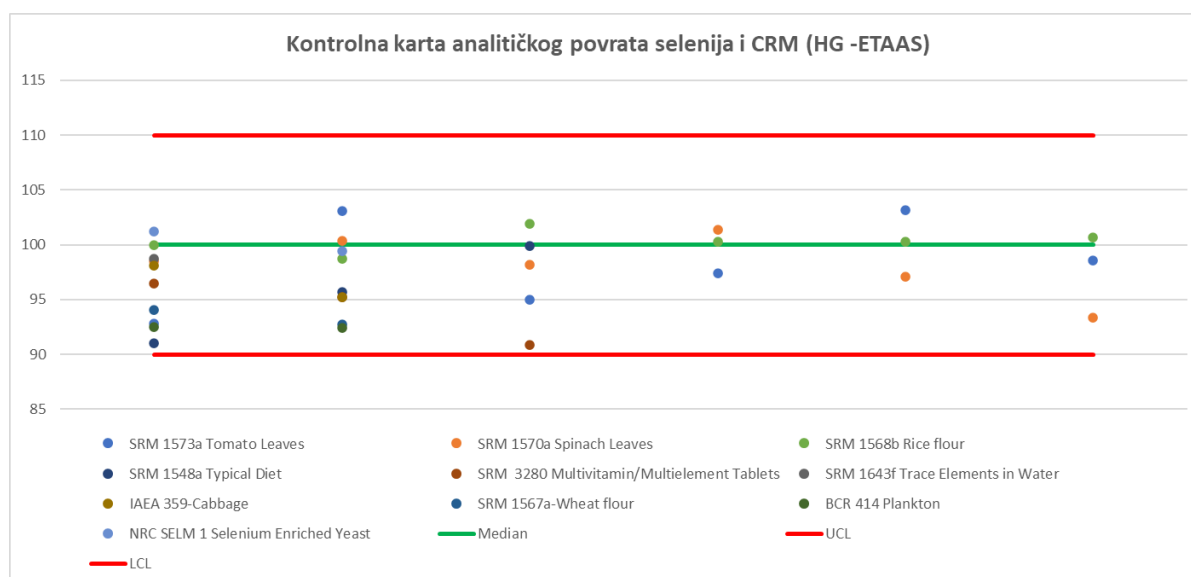
Obzirom na različite sastave biljnih dodataka prehrani korišteni su i drugi CRM, usklađeni sa sastavom matrice i očekivanim masenim udjelima selenija. Rezultati analize CRM i analitički povrati prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati analize CRM (prikazani kao srednja vrijednost (\bar{x}) \pm standardno odstupanje (σ) i analitički povrat

| CRM | Certificirana vrijednost \pm proširena mjerna nesigurnost $\mu\text{g kg}^{-1}$ | Izmjerena vrijednost \pm standardno odstupanje $\mu\text{g kg}^{-1}$ | Analitički povrat % | Broj uzoraka. N |
|--|--|---|------------------------|--------------------|
| SRM 1573a <i>Tomato Leaves</i> | 54,3 \pm 2,0 | 53,7 \pm 2,7 | 92,8 - 103 | 6 |
| SRM 1570a <i>Spinach Leaves</i> | 115,2 \pm 4,3 | 113,1 \pm 3,2 | 93,4 - 101 | 6 |
| SRM 1568b <i>Rice flour</i> | 365 \pm 29 | 366 \pm 3,8 | 98,7 - 102 | 6 |
| SRM 1548a <i>Typical Diet</i> | 245 \pm 28 | 234 \pm 11 | 91,1 - 99,9 | 3 |
| SRM 3280 <i>Multivitamin /Multielement Tablets</i> | 17421 \pm 450 | 16408 \pm 513 | 90,9 - 96,5 | 3 |
| IAEA 359- <i>Cabbage</i> | 120 \pm 11 | 116 \pm 2,4 | 98,1 - 95,3 | 2 |

| | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-------------|---|
| SRM 1567a <i>Wheat flour</i> | 1100 ± 200 | 1027 ± 11 | 94,1 - 92,7 | 2 |
| BCR 414 <i>Plankton</i> | 1750 ± 100 | 1619 ± 1,1 | 92,5 - 93,5 | 2 |
| NRC SELM 1 <i>Selenium Enriched Yeast</i> | 2031000 ± 70000 | 2037897 ± 25884 | 101 - 99,4 | 2 |

Kontrolna karta analitičkog povrata selenija za različite CRM prikazano u slici 8. Kontrolne granice su postavljene na granice rasipanja ($\pm 3\sigma$) izračunom iz pripadajućih statističkih parametara (aritmetičke sredine mjerenja, raspona i veličine uzoraka). Donja kontrolna granica (*Lower Control Limit*, LCL) je 90 %, a gornja kontrolna granica (*Upper Control Limit*, UCL) je 110 %.



Slika 8. Kontrolna karta analitičkog povrata selenija u različitim CRM

Analitički povrat selenija primjenjenom metodom HG-ETAAS snažno ovisi o vremenu koje je proteklo između redukcije Se(VI) do Se(IV) i generiranja hidrida. Ukoliko se mjerne otopine ne mogu analizirati odmah nakon njihove pripreme, primjenjuje se čišćenje otopine argonom protoka ($0,5 \text{ L min}^{-1}$ argona) tijekom postupka redukcije kako bi se uklonili kloridi iz otopine i održala stabilnost mjerne otopine tijekom 188 h (~ 8 dana).⁶⁷ Osim uobičajenih svakodnevnih varijacija osjetljivosti, integrirani signali absorbancije nisu pokazali bilo kakvu tendenciju smanjenja jer je generiranje hidrida slijedilo odmah nakon redukcije što je i potvrđeno dobrim analitičkim povratom. Niže vrijednosti analitičkih povrata dobivene su s

povećanim vremenom između redukcije i određivanja uslijed moguće povratne oksidacije Se(IV) do Se(VI) klorom koji nastaje u procesu redukcije. Potvrda tome je analitički povrat na CRM BCR 414 (*Plankton*) dobiven odmah nakon redukcije (92,5 %). Tjedan dana poslije redukcije, analitički povrat je dobiven 78,2 % i 65,8 %.

Udaljenost između vrh kanile od titanija kojom uvodimo razvijeni selenid u iridijem obloženu grafitnu kivetu nema utjecaja na analitički signal što je prednost u odnosu na druge *in-situ* uređaje za prikupljanje hidrida.⁸²

Literaturni podatci izdvajaju dvije vrste interferencija koje se javljaju tijekom metoda temeljenih na generiranju hidrida. Jedna od njih je vezana za konvencionalne HG tehnike (atomizacija u kvarcnoj ćeliji) i interferencije uslijed prisustva hlapljivih elemenata koji međusobno interferiraju.¹⁰⁶ Međusobne interferencije elemenata koji tvore hidride općenito su puno manje za metodu HG-ETAAS nego za HG-AAS s kvarcnim atomizatorom.^{81,83,84}

Literaturni podatci također ukazuju na šest elemenata: Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} i Pb^{2+} , koji mogu uzrokovati međusobne interferencije. Ioni Co^{2+} i Pb^{2+} interferiraju sa selenijem u masenoj koncentraciji iznad $10 \mu\text{g L}^{-1}$, dok Fe^{3+} i Ni^{2+} stvaraju interferencije ako su prisutni u masenim koncentracijama iznad $100 \mu\text{g L}^{-1}$.¹⁰⁶

Koncentracije selenija određivane metodom HG-ETAAS se ne razlikuju značajno od koncentracija selenija dobivenih usporednom metodom ICP-MS što ukazuje da masene koncentracije nikla nisu utjecali na određivanje selenija u uzorcima. Masene koncentracije olova u šest uzoraka su na granici utjecaja ($\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$). Jedan uzorak, oznake 63 pokazao je masenu koncentraciju olova od $68,1 \mu\text{g L}^{-1}$ i masenu koncentraciju selenija od $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$. Masena koncentracija selenija izmjerena u istom uzorku metodom ICP-MS je $0,57 \mu\text{g L}^{-1}$. Uzorci 81 i 85 s masenom koncentracijom olova od $15,61 \mu\text{g L}^{-1}$ i $32,24 \mu\text{g L}^{-1}$ sadrže selenij izmjeren u masenoj koncentraciji od $530 \mu\text{g L}^{-1}$ i $97,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Masena koncentracija selenija izmjerena u istim uzorcima ICP-MS metodom su $503 \mu\text{g L}^{-1}$ i $110 \mu\text{g L}^{-1}$ iz čega bi se dalo zaključiti da interferencija navedenih kationa pri određivanju selenija nije bilo.

Maseni udjeli selenija određivani metodom HG-ETAAS prikazani su u tablici P1 (u poglavlju 7. Dodatak) u rasponu od $3,47 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $88\,700 \mu\text{g kg}^{-1}$. Najveći maseni udjeli selenija od $12,8 \mu\text{g g}^{-1}$ do $88,7 \mu\text{g g}^{-1}$ detektirani su u dodatcima prehrani koji u svom sastavu sadrže različite ekstrakte (korejskog ginsenga, listova maline, breskve, borovnice, artičoke, kore limuna, ploda sjemenki grožđa, ekstrakt biljke, *Astragalus*, *Silybum marianum*, *Tribulus terrestris*, stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. U čistim modrozelenim algama

(*Arthrospira platensis*) udjeli selenija su od $0,096 \mu\text{g g}^{-1}$ do $2,06 \mu\text{g g}^{-1}$ dok je u većini biljnih dodataka selenij prisutan u rasponu od $0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,622 \mu\text{g g}^{-1}$ što je podjednako masenim udjelima selenija prema literaturnim podacima ($0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,58 \mu\text{g g}^{-1}$)¹⁰⁷

4.2. Rezultati elementne analize metodom ICP-MS

Općenito, dodaci prehrani biljnog podrijetla sadrže puno više elemenata od deklariranih na etiketama.^{3,86} Za analizu metodom ICP-MS odabrani su toksični metali: Al, As, Cd, Ni, Hg, Cr, Pb, Sb; elementi od nutritivnog značaja: Se, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, V, Zn i elementi koji do sada nisu proučavani u biljnim dodacima: B, Ba, Sr i Tl.

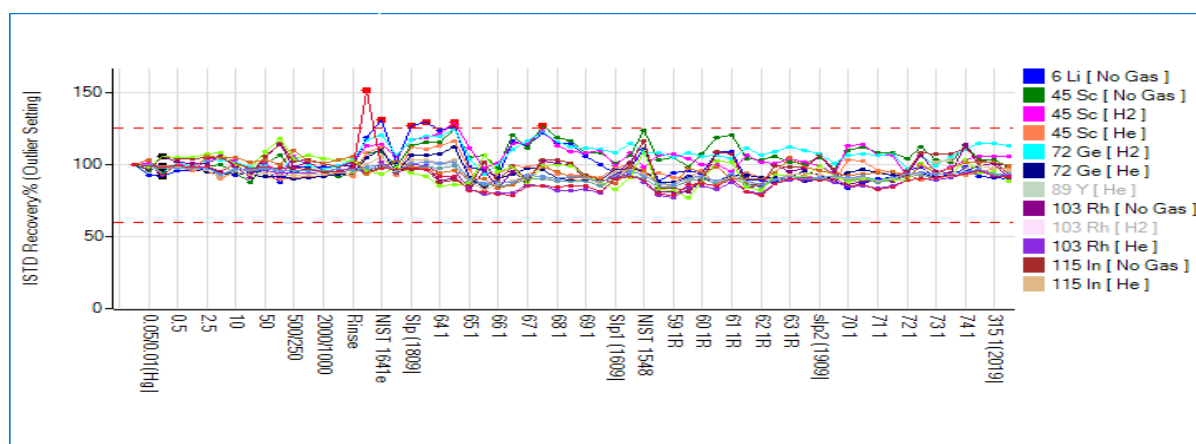
Često su opisivani problemi interferencija spektralnog i kemijskog tipa te postizanja zadovoljavajuće osjetljivosti.⁹⁴ Stoga su optimizirani uvjeti mjerenja radi kontrole utjecaja interferencija. Odabrani su najosjetljiviji izotopi i primijenjene su reakcijsko/kolizijski plinovi za smanjenje poliatomskih smetnji. Prema ionizacijskom potencijalu i analitičkoj masi, svaki izotop je bio povezan s unutarnjim standardom. Parametri mjernog postupka: izotopi elemenata, reakcijsko/kolizijski plin, unutarnji standardi te područje linearnosti, koeficijent korelacije (R); LOD i LOQ prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Parametri metode ICP-MS: izotopi elemenata, reakcijsko/kolizijski plin, ISTD te područje linearnosti, koeficijent korelacije (R), granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ)

| Element | Masa | Reakcijski/ kolizijski plin | Unutarnji standard (ISTD) | Područje linearnosti $\mu\text{g L}^{-1}$ | Koeficijent korelacije R | Granica detekcije $\mu\text{g L}^{-1}$ | Granica određivanja $\mu\text{g kg}^{-1}$ |
|---------|------|-----------------------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|--|---|
| B | 11 | bez plina | ⁶ Li | 0,05 - 50 | 0,9998 | 0,216 | 36 |
| Na | 23 | He | ⁴⁵ Sc | 1,00 - 500 | 0,9999 | 1,38 | 230 |
| Mg | 24 | He | ⁴⁵ Sc | 0,50 - 500 | 1,000 | 0,590 | 98 |
| Al | 27 | bez plina | ⁴⁵ Sc | 0,05 - 100 | 0,9999 | 0,483 | 80 |
| K | 39 | He | ⁴⁵ Sc | 2,50 - 500 | 1,000 | 4,44 | 740 |
| Ca | 40 | H ₂ | ⁴⁵ Sc | 0,50 - 500 | 0,9999 | 1,49 | 248 |
| V | 51 | He | ⁴⁵ Sc | 0,05 - 50 | 1,000 | 0,006 | 1,0 |
| Cr | 52 | He | ⁴⁵ Sc | 0,05 -100 | 1,000 | 0,048 | 8,0 |
| Mn | 55 | He | ⁴⁵ Sc | 0,05 -100 | 1,000 | 0,048 | 8,0 |
| Fe | 56 | He | ⁴⁵ Sc | 0,05 -100 | 1,000 | 0,121 | 20 |
| Co | 59 | He | ¹⁰³ Rh | 0,05 -100 | 1,000 | 0,009 | 1,5 |
| Ni | 60 | He | ¹⁰³ Rh | 0,05 -100 | 1,000 | 0,121 | 18 |
| Cu | 63 | He | ¹⁰³ Rh | 0,05 -100 | 1,000 | 0,047 | 8,0 |
| Zn | 66 | He | ⁴⁵ Sc | 0,05 -100 | 1,000 | 0,180 | 30 |
| As | 75 | He | ⁷² Ge | 0,05 -100 | 1,000 | 0,014 | 2,0 |
| Se | 78 | H ₂ | ⁷² Ge | 0,05 -100 | 1,000 | 0,013 | 2,2 |
| Sr | 88 | He | ¹⁰³ Rh | 0,05 -100 | 1,000 | 0,048 | 8,0 |
| Mo | 95 | He | ¹⁰³ Rh | 0,05 -10 | 0,9999 | 0,007 | 1,0 |
| Cd | 111 | He | ¹¹⁵ In | 0,05 -20 | 1,000 | 0,008 | 1,4 |

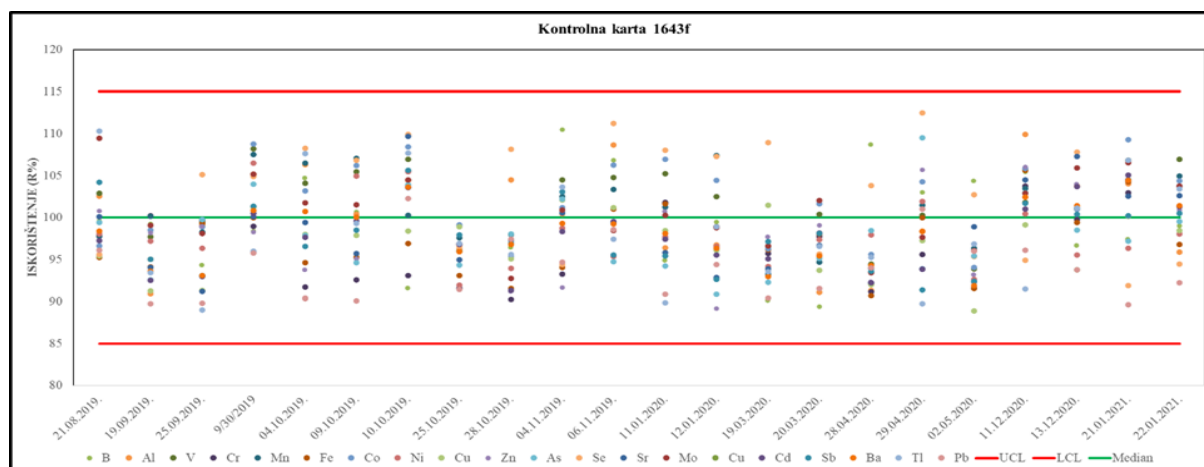
| | | | | | | | |
|----|-----|----|-------------------|------------|--------|-------|------|
| Sb | 121 | He | ^{115}In | 0,05 -50 | 1,000 | 0,006 | 1,0 |
| Ba | 137 | He | ^{159}Tb | 0,05 - 100 | 1,000 | 0,296 | 50 |
| Hg | 202 | He | ^{175}Lu | 0,05 - 2,5 | 0,9999 | 0,002 | 0,35 |
| Tl | 205 | He | ^{115}In | 0,05 -10 | 1,000 | 0,004 | 0,67 |
| Pb | 208 | He | ^{175}Lu | 0,05 - 50 | 1,000 | 0,015 | 2,5 |

Pomoću softvera je omogućeno praćenje omjera signala mjernog elementa i signala odabranog unutarnjeg standarda sa matricom. Analitički povrat unutarnjih standarda prikazana je u jednom setu mjerenja u zadanim granicama od 65 % do 130 % prikazani su na slici 9.



Slika 9. Analitički povrat unutarnjih standarda (ISTD) vezanih na mjerene elemente ICP-MS

Za provjeru kalibracijskih krivulja svih određivanih elemenata korišten je kao referencijski standard drugog izvora, NIST SRM 1643f, *Trace Elements in Water* (certificirana vrijednost za selenij je $11,97 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0,14 \mu\text{g L}^{-1}$). Na slici 10. je prikazana kontrolna karta sa kontrolnim granicama, donja kontrolna granica (*Lower Control Limit*, LCL) je 85 %, a gornja kontrolna granica (*Upper Control Limit*, UCL) je 115 %. Analitički povrat mjerenih elemenata od 90 % do 110 % je unutar zadanih granica i bez značajnih odstupanja.

Slika 10. Kontrolna karta SRM 1643f, *Trace Elements in Water*

Mjereni i certificirani sadržaj elemenata u dva CRM dobiveni metodom ICP-MS prikazan je u tablici 11. Općenito, dobiveni rezultati su prihvatljivi znajući da točnost ICP-MS metode obično ovisi o složenosti matrice i rasponu koncentracija analita. Stoga, primijenjeni postupak analitičke pripreme i prilagođenih instrumentnih radnih parametara pokazuje prikladnost za pouzdano određivanje sadržaja elemenata u razgrađenim uzorcima biljnih dodataka prehrane.

Tablica 11. Rezultati analize dva CRM (3280 *Multivitamin /Multielement Tablets* i 1573a *Tomato Leaves* prikazani kao srednja vrijednost (\bar{x}) \pm standardo odstupanje (σ)

| Elementi | | SRM 3280 | | | SRM 1573a | | |
|----------|---------------------|--|-----------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | <i>Multivitamin/Multielement tablets</i> (N=4) | | | <i>Tomato leaves</i> (N=5) | | |
| | | Certificirane vrijednosti | Izmjerene vrijednosti | Analitički povrat/% | Certificirane vrijednosti | Izmjerene vrijednosti | Analitički povrat/% |
| B | mg kg ⁻¹ | 141 \pm 7 | 136 \pm 7 | 96,3 | 33,1 \pm 0,4 | 30,7 \pm 3 | 92,8 |
| Na | mg kg ⁻¹ | 330 \pm 20 | 346 \pm 11 | 105 | 136 \pm 4 | 138 \pm 3 | 101 |
| Mg | mg kg ⁻¹ | 67800 \pm 4000 | 63100 \pm 3000 | 93,1 | 12000 (a) | 11000 \pm 300 | 91,4 |
| Al | mg kg ⁻¹ | - | - | | 598 \pm 7 | 557 \pm 21 | 93,1 |
| K | mg kg ⁻¹ | 53100 \pm 7000 | 48300 \pm 4500 | 90,9 | 26800 \pm 500 | 25000 \pm 1000 | 94,5 |
| Ca | mg kg ⁻¹ | 111000 \pm 5000 | 115000 \pm 2700 | 104 | 50450 \pm 550 | 48500 \pm 1100 | 96,0 |
| V | mg kg ⁻¹ | 8000 \pm 410 | 8690 \pm 410 | 109 | 835 \pm 34 | 759 \pm 49 | 90,8 |
| Cr | mg kg ⁻¹ | 93700 \pm 2700 | 90500 \pm 3000 | 96,6 | 1990 \pm 30 | 1780 \pm 60 | 89,6 |
| Mn | mg kg ⁻¹ | 1440 \pm 110 | 1420 \pm 210 | 98,3 | 246 \pm 7 | 234 \pm 13 | 94,8 |
| Fe | mg kg ⁻¹ | 12400 \pm 900 | 11100 \pm 600 | 89,9 | 368 \pm 4 | 340 \pm 9 | 92,4 |
| Co | mg kg ⁻¹ | 810 \pm 10 | 840 \pm 23 | 104 | 577 \pm 7 | 554 \pm 16 | 95,9 |
| Ni | mg kg ⁻¹ | 8,43 \pm 0,30 | 7,82 \pm 0,60 | 92,8 | 1,58 \pm 0,04 | 1,46 \pm 0,03 | 92,1 |
| Cu | mg kg ⁻¹ | 1400 \pm 170 | 1300 \pm 120 | 93,2 | 4,70 \pm 0,14 | 4,37 \pm 0,31 | 93,0 |
| Zn | mg kg ⁻¹ | 10200 \pm 800 | 9600 \pm 500 | 95,0 | 30,9 \pm 0,6 | 29,1 \pm 2,4 | 94,1 |

| | | | | | | | |
|----|---------------------|--------------|--------------|------|-------------------|------------|------|
| As | mg kg ⁻¹ | 132 ± 44 | 123 ± 6 | 93,5 | 113 ± 2 | 118 ± 5 | 104 |
| Se | mg kg ⁻¹ | 17400 ± 400 | 17700 ± 1100 | 102 | 54,3 ± 2,0 | 57,4 ± 3,0 | 106 |
| Sr | mg kg ⁻¹ | 29,8 ± 0,2 | 30,9 ± 0,5 | 104 | 85 ^{a)} | 83,0 ± 4,5 | 97,6 |
| Mo | mg kg ⁻¹ | 70700 ± 4500 | 75200 ± 3300 | 106 | 460 ^{a)} | 426 ± 35 | 92,7 |
| Cd | mg kg ⁻¹ | 80,1 ± 0,9 | 86,6 ± 4 | 108 | 1520 ± 30 | 1390 ± 30 | 91,7 |
| Sb | mg kg ⁻¹ | 142 ± 6 | 145 ± 5 | 89,4 | 61,9 ± 3,2 | 57,8 ± 4,9 | 93,3 |
| Ba | mg kg ⁻¹ | - | - | - | 63 ^{a)} | 59,2 ± 2,3 | 93,9 |
| Hg | mg kg ⁻¹ | - | - | - | 34,1 ± 1,5 | 30,7 ± 2,5 | 89,9 |
| Pb | mg kg ⁻¹ | 273 ± 2 | 253 ± 9 | 92,8 | | | |

^{a)} Informativne vrijednosti za elemente

Koncentracije 24 elementa u 87 analiziranih uzoraka biljnih dodataka prehrani izražene su $\mu\text{g kg}^{-1}$ i mg kg^{-1} ovisno o dobivenom koncentracijskom nivou, prikazani su u tablicama P1 i P2 (u poglavlju 7. Dodatak).

Stanovništvu Hrvatske, osobito u glavnom gradu Zagrebu nudi se širok izbor biljnih dodataka prehrani koji se koriste za potporu zdravlju, ublažavanje simptoma i liječenje bolesti. U Hrvatskoj je rađena procjena kumulativnog dnevnog unosa nekoliko metala (Pb, Cd, As, Hg, Cr, Ni i Zn) u ljekovitim biljkama/proizvodima na bazi bilja (N = 14). Nekoliko analiziranih formulacija imalo je maseni udio olova ($3,86 \mu\text{g g}^{-1}$), kroma ($64,4 \mu\text{g g}^{-1}$) i nikla ($339 \mu\text{g g}^{-1}$) iznad maksimalno dopuštenih granica.⁷⁹ Zbog različitog podrijetla biljnih dodataka, različitog sastava biljnih vrsta i njihove različite namjene, bilo je nepraktično obuhvatiti sve potencijalno prisutne elemente. Odabir elemenata vodio se činjenicom da se u dodacima biljnog podrijetla moguća kontaminacija toksičnim metalima (As, Cd, Ni, Pb, Sb), uzrokovana kontaminacijom biljnog materijala tijekom uzgoja zbog prirodne ili antropogene kontaminacije okoliša.^{2,8,9,79,92}

U nekoliko biljnih dodataka prehrani, kao što su ajurvedski pripravci, alge te pripravci s ekstraktima biljaka (*Bacopa monnieri*, *Lepidium meyenii*, *Hordeum vulgare*, *Vitis vinifera*, *Camellia sinensis*, *Zingiber officinalis*, *Astragalus*), nađeni su neželjeni toksični elementi u relativno visokim masenim udjelima. Mjereno je $1,47 \mu\text{g g}^{-1}$ i $17,3 \mu\text{g g}^{-1}$ arsena te $1,59 \mu\text{g g}^{-1}$ i $11,4 \mu\text{g g}^{-1}$ olova u uzorcima sa ekstraktima *Vitis vinifera*, i *Camellia sinensis*, te $454 \mu\text{g g}^{-1}$ i $8,94 \mu\text{g g}^{-1}$ žive u jednoj ajurvedskoj formulaciji odnosno u uljnom pripravku biljke pepermint. Općenito, literaturni podatci o biljnim dodacima ukazuju na minimalne masene udjele žive od $0,0001 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$. Međutim, postoje izvješća i o visokim masenim udjelima žive, npr. $4,29 \mu\text{g g}^{-1}$ u uzorku alge *Chlorella pyrenoidosa*.¹⁴ U biljnim dodacima koji se tradicionalno koriste u ajurvedi, živa je pronađena u masenim udjelima od $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ do $171\,000 \mu\text{g g}^{-1}$, pri čemu je najveći maseni udjel pronađen u uzorku pripravka *yogendra ras*. Prosječni maseni udio žive u uzorcima bio je $11\,800 \mu\text{g g}^{-1}$. Arsen je bio prisutan u rasponu od

0,2 do 89 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ s prosječnim masenim udjelom od 2300 $\mu\text{g g}^{-1}$ dok je olovo bilo prisutno u masenim udjelima od 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 60 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ s prosječnim masenim udjelom od 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$.⁹²

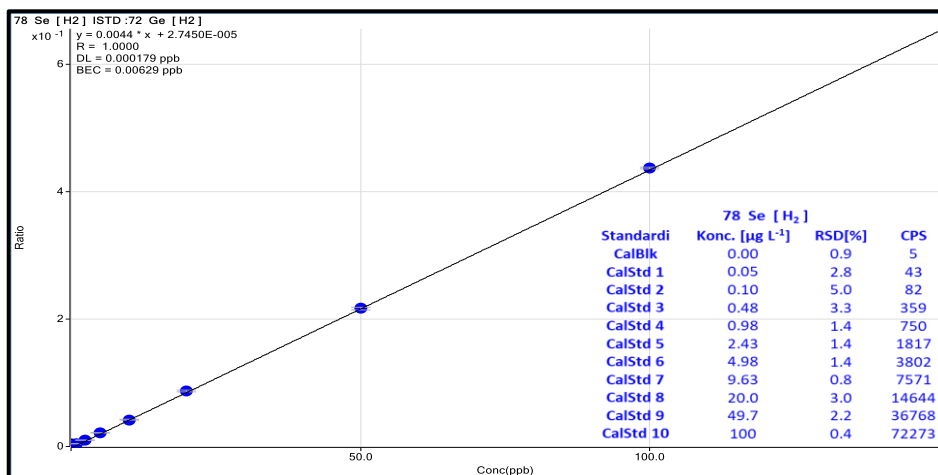
Ostali čimbenici koji mogu utjecati na sadržaj širokog spektra kemijskih elemenata (Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni i Zn) su: sposobnost biljaka da selektivno akumuliraju određene elemente, geokemijske karakteristike tla (npr. selenij u tlu), uvjeti uzgoja biljaka, proces proizvodnje i neprikladno skladištenje.^{8,10} Esencijalni elementi utvrđeni našim istraživanjem (Ca, K, Mg i Na) važni su za normalno odvijanje metaboličkih procesa.²¹ Bakar i cink su neophodni metali za tjelesne funkcije kao enzimski kofaktori. Vrlo su važni za funkcije središnjeg živčanog, imunološkog, koštanog i reproduktivnog sustava.^{8,21} Aluminij se smatra potencijalno toksičnim elementom za žive organizme.^{19,21} Glavni učinci kroma na ljudski organizam naširoko su proučavani, posebice u slučajevima iritacije probavnog sustava, anemije i oštećenja muškog reproduktivnog sustava.^{79-81,107} Vanadij i selenij su esencijalni elementi u tragovima, važni za enzimske i metaboličke reakcije.^{21,108} Mangan je važan aktivator enzima i pomaže u regulaciji oksidativne fosforilacije, metabolizma mukopolisaharida i kolesterola te ciklusa uree.^{21,108}

Koncentracije elemenata u biljnim dodacima prehrani su varijabilne. U nekim slučajevima literaturni podaci su slični rezultatima dobivenim u ovom radu, međutim, usporedba je teška zbog primjene različitih analitičkih metoda, pripreme i porijekla uzoraka.

Elementi kao što su bor, stroncij, barij, i talij koji do sada nisu proučavani u biljnim dodacima prehrani nađeni su u masenim udjelima: bor od 0,143 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 2150 $\mu\text{g g}^{-1}$, stroncij od 0,010 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 1100 $\mu\text{g g}^{-1}$, berilij od 0,010 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 76,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ i talij od 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 0,659 $\mu\text{g g}^{-1}$. Analizirani uzorak s ekstraktom vinove loze (*Vitis vinifera*) i zelenog čaja (*Camellia sinensis*) sadrži više razine Sr i Tl (1100 $\mu\text{g g}^{-1}$ i 0,659 $\mu\text{g g}^{-1}$). Utvrđeno je da uzorak 27 sa sastojcima: *Didymocarpus pedicellata*, *Saxifraga ligulata*, *Rubia cordifolia*, *Cyperus scariosus*, *Achyranthes aspera*, *Onosma bracteatum*, *Vernonia cinerea*, *Hajrul Yahood Bhasma*, *Shilajeet* sadrži maseni udio bora 2150 $\mu\text{g g}^{-1}$, a uzorak 29 s ekstraktom *Bacopa monnieri* sadrži maseni udio barija 76,8 $\mu\text{g g}^{-1}$.

4.2.1. Rezultati određivanja selenija metodom ICP-MS

Mjerenja selenija provedena su u linernom kalibracijskom području ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ do $100 \mu\text{g L}^{-1}$) uz razrijeđenja za koncentracije selenija iznad gornje granice linearnog dinamičkog raspona kalibracije. Kalibracijska krivulja selenija sa koeficijentom korelacije ($R=1,000$) prikazan je na slici 11.



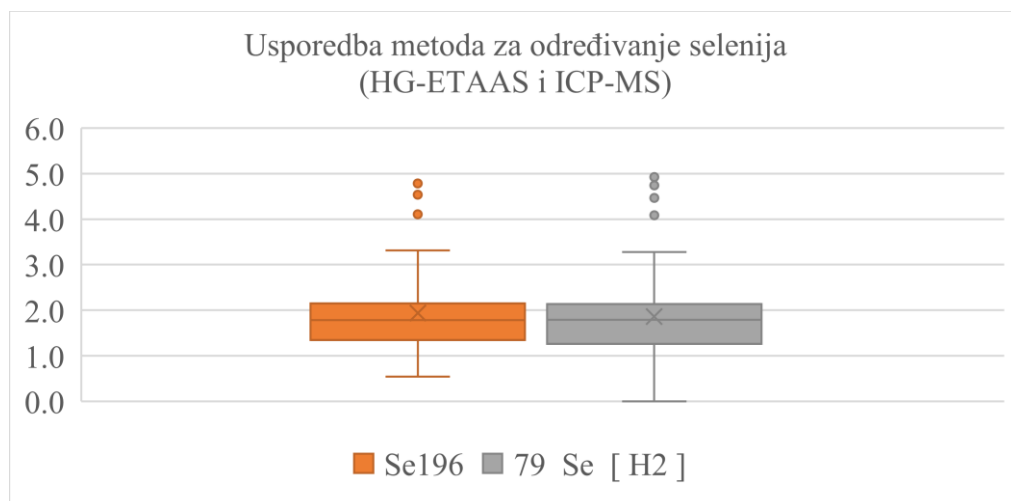
Slika 11. Kalibracijska krivulja selenija (ICP-MS)

Rezultati određivanja selenija u biljnim dodatcima prehrani metodom ICP-MS prikazani su u tablici P1 (u poglavlju 7. Dodatak) i kreću se u rasponu od $2,33 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $83\,900 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.3. Usporedba rezultata analize selenija metodom HG-ETAAS i ICP-MS

Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom postala je metoda izbora zbog svoje brze, precizne, točne i niske razine detekcije. Izvedbe ICP-MS ne ovise o specifičnom oksidacijskom stanju selenija.^{45,94} Međutim, analiza selenija tehnikom ICP-MS komplicirana je zbog pojave nekoliko spektralnih interferencija na glavnim izotopima jer selenij ima relativno visoku energiju ionizacije (IP = 9,75 eV). Za ovu tehniku vežu se interferencije visokog intenziteta s glavnim izotopima selenija izvedenim iz plina argona kao izvora plazme ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ na ^{80}Se i $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ na ^{78}Se). Obično se takve smetnje mogu ukloniti upotrebom kolizijsko-reakcijskih ćelija koje koriste H_2 (IP = 15,5 eV). Postoji manji gubitak energije analita upotrebom H_2 u usporedbi s težim He, a to obično poboljšavalo osjetljivost.^{55,68,69,109} Visoki sadržaj anorganskih tvari u uzorcima može uvelike utjecati na određivanje selenija tehnikom ICP-MS. Iako je određivanje selenija primjenom metode ICP-MS dobro utemeljeno još uvijek nedostaju usporedbe mjerenih rezultata s konvencionalnim analitičkim metodama koje su pogodne za kompleksne matrice.⁵⁵ Biljni dodatci prehrani sa složenim matricama mogli bi izazvati dodatne poremećaje u plazmi koji mogu utjecati na točnost analize selenija. Iz tog razloga, korištena je komplementarna tehnika HG-ETAAS za određivanje selenija u istom skupu uzoraka.

Statistička usporedba sadržaja selenija, dobivena dvjema različitim instrumentnim tehnikama, provedena je dvostranim *t*-Studentovim testom (*Paired Two Sample for Means*) na razini značajnosti $P = 0,05$. Izračunata *t*-vrijednost od 1,7440 bila je niža od kritične *t*-vrijednosti 1,9879, što upućuje na zaključak da se mjerne sposobnosti dvije metode nisu se značajno razlikovale. Na slici 12. prikazan je dijagram pravokutnika ili *box-plot* dijagram sličnog stupnja raspršenosti podataka dobivenih metodama HG-ETAAS i ICP-MS. Stoga, obje metode jednako ispunjavaju zahtjeve za određivanje sadržaja selenija u biljnim dodacima prehrani.



Slika 12. *Box-plot* dijagram selenija u skupu analiziranih uzoraka sa srednjim vrijednostima (25. i 75. percentila i whiskers at $\pm 1.5H$)

Granica detekcije, granica određivanja i preciznost dobivene za metode HG-ETAAS i ICP-MS uspoređene su istim ili sličnim metodama iz literature, prikazano u tablic 12. Metode HG-ETAAS i ICP-MS su slične metode obzirom na parametre granice detekcije i preciznosti.

Sličnost prema razmatranim parametrima pokazuje i metoda generiranja hidrida uz protočno ubrizgavanje s atomskom apsorpcijskom spektrometrijom uz grafitnu peć (engl. *Flow Injection Hydride Generation Graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry, FI-HG-ETAAS*).⁷²

Tablica 12. Usporedba parametara: granica detekcije (*LOD*), granica kvantifikacije (*LOQ*) i preciznost izražene kao relativno standardno odstupanje (*RSD*) metoda HG-ETAAS i ICP-MS primjenjenih u ovom radu sa metodama opisanih u literaturi

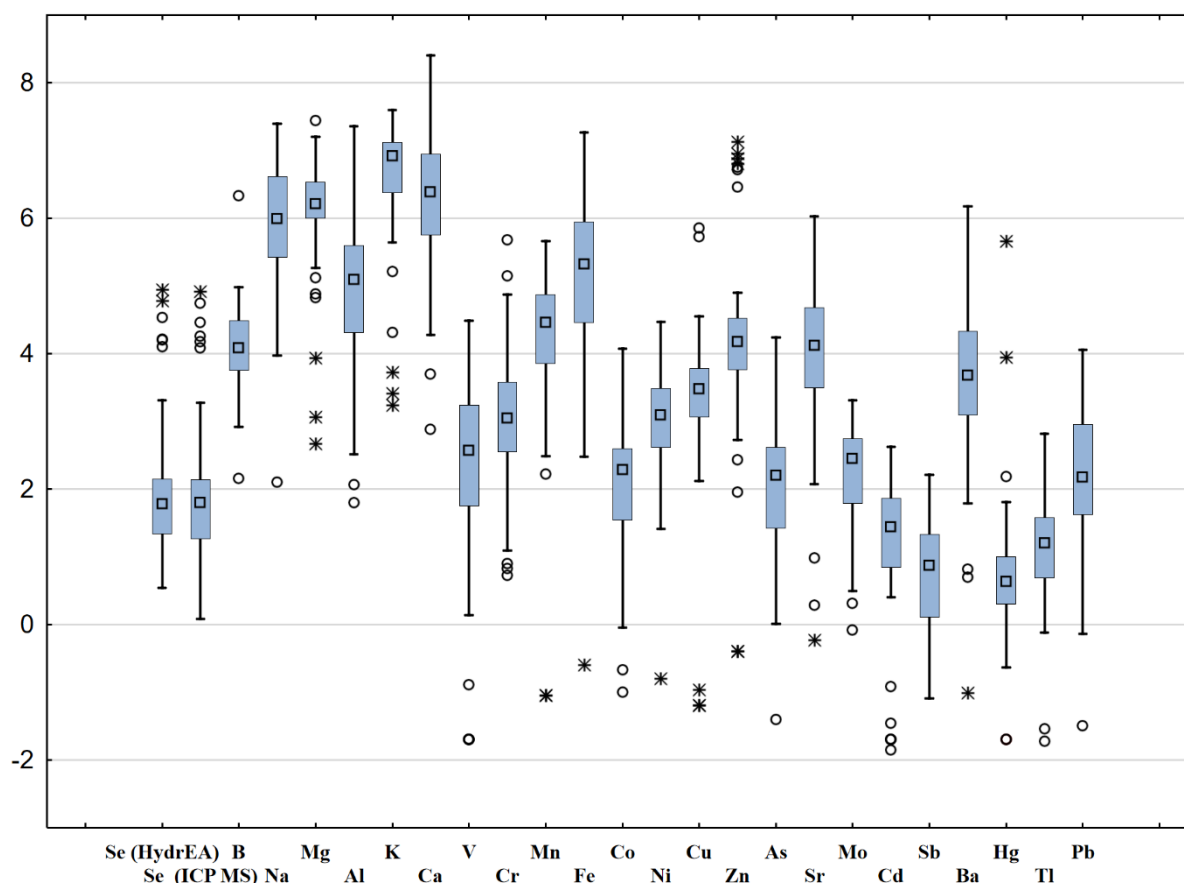
| Metode | LOD | LOQ | RSD/ % | N | Reference | |
|-------------------|-----------------------|-------|----------------------------|---------|-----------|--------------------------------|
| ICP-MS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,013 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ 2,2 | 1,5 -13 | 87 | primjenjena metoda u ovom radu |
| HG-ETAAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,011 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ 1,89 | 1 -11 | 87 | primjenjena metoda u ovom radu |
| ICP-MS | | | $\mu\text{g kg}^{-1}$ 50 | 10 | | Augustssona i sur. 2021. |
| HG-ETAAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 1,3 | $\mu\text{g L}^{-1}$ 4,0 | 3 | | Ueta i sur. 2020. |
| USA DMSPE HNTs | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,01 | $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,03 | 6 - 9 | | Krawczyk-Coda 2019. |
| HR-CS-ETAAS | | | $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,4 | | 3 | Airton i sur. 2018. |
| ICP-MS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,04 | | | | Butcher 2017. |
| HR-CS-ETAAS | | | $\mu\text{g kg}^{-1}$ 10 | | | Chevallier i sur. 2015. |
| ICP-MS | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 100 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ 340 | 7 | | Almeida i sur. 2015. |

| | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|---------|----|--------------------------|
| ^{a)} USA-IL-DLLME | | | | | | | |
| ETAAS (deuterijska lampa) | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,012 | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,04 | 4 | | Tuzen i sur. 2015. |
| ETAAS (deuterijska lampa) | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 4 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 52 | 6 - 8 | | Kazi i sur. 2014. |
| HG-AAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 7,6 | | | 1 - 6 | | Zhang i Zhao 2013. |
| HG-AAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 1,8 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 25 | 2 | | Kazi i sur. 2014. |
| ICP-MS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,125 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 25,0 | 2 - 4 | | Sullivan i sur. 2013. |
| ETAAS (Zeeman) | | | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 870 | 3 - 10 | | Silva i sur. 2013. |
| ICP-MS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,03 | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,2 | 0,3 - 1 | | Pacquette i sur. 2012. |
| FI-HG-ETAAS | $\mu\text{g/L}$ | 0,09 | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,30 | | | Marval-León i sur. 2012. |
| HG-ETAAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,100 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 3 | 2 - 11 | 19 | Shaltout i sur. 2011. |
| ETAAS (Zeeman) | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 4,72 | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 15,7 | | | Traipop i sur. 2010. |
| ICP-MS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,02 | | | | | Avula i sur. 2010. |
| HG-AFS | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 1,3 | | | 7 | | Reyes i sur. 2009. |
| HG-AAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,02 | | | | | Iqbal i sur. 2008. |
| ET-AAS (deuterijska lampa) | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,030 | - | | 10 | | Tuzen i sur. 2007. |
| HG-AAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,02 | | | < 1,0 | | Akl i sur. 2006. |
| HG-AFS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,011 | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,038 | < 3 | | Garcia i sur. 2005. |
| FI-HG-ETAAS | $\mu\text{g L}^{-1}$ | 0,06 | $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 3 | | 8 | Ajtony i sur. 2005. |

^{a)} USA-IL-DLLME (engl. *Ultrasound assisted ionic liquid dispersive liquid liquid microextraction*)
 Ultrazvučno potpomognuta mikroekstrakcija disperzivne tekućine iona

4.4. Elementno profiliranje uzoraka multivarijantnim statističkim metodama

Na temelju univarijantnog statističkog ispitivanja (*Tukey test*) dobivena je elementna distribucija unutar velikog skupa analiziranih uzoraka koja je grafički prikazana na Slici 13.



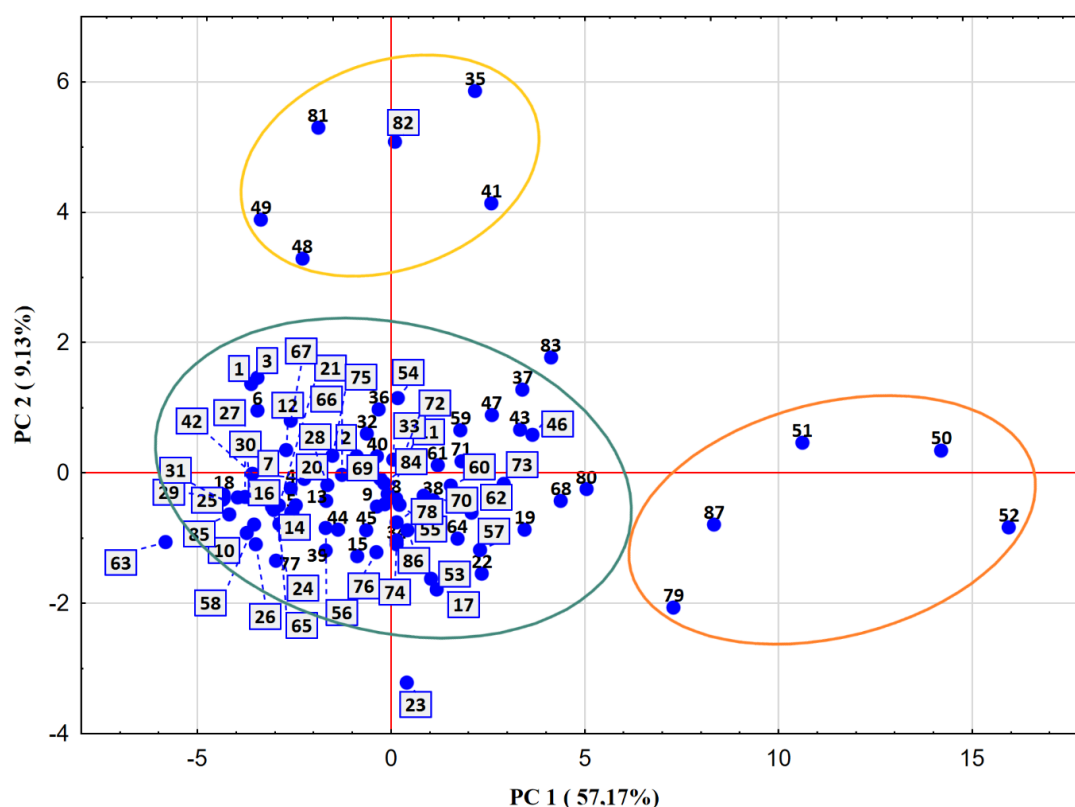
Slika 13. Elementni profili analiziranog skupa uzoraka prikazani *Box-plot* dijagramom

Specifične značajke u skupu podataka svake varijable prikazane su korištenjem dijagrama pravokutnika. Svaki okvir obuhvaća podatke: srednju vrijednost, veću ili manju vrijednost, tzv. *autlier*, donji i gornji kvartil unutar 1,5 interkvartilnih udaljenosti.

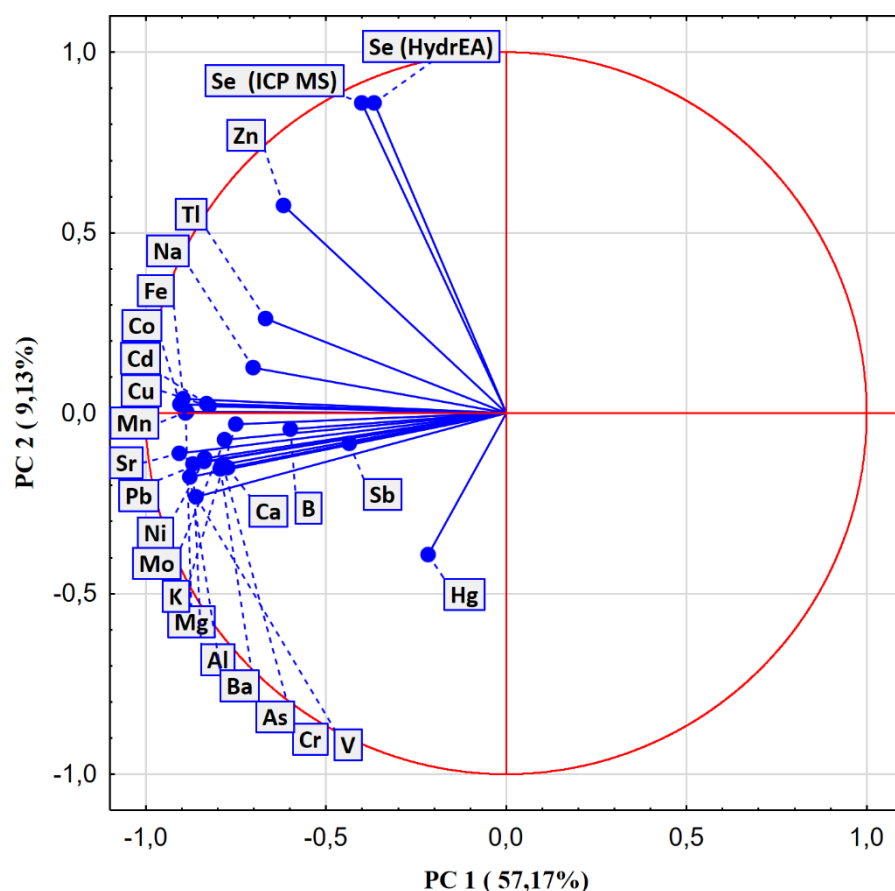
Glavni sastojci svih analiziranih uzoraka su Na, Mg, K i Ca sa srednjim vrijednostima masenih udjela od 2900 mg kg⁻¹, 2700 mg kg⁻¹, 9200 mg kg⁻¹, odnosno 16 600 mg kg⁻¹. Elementi srednjeg područja masenih udjela od (31,8 mg kg⁻¹ do 1050 mg kg⁻¹) su B, Al, Mn, Fe, Zn i Sr. Razine u tragovima i ultra-tragovima (od 21,7 µg kg⁻¹ do 11400 µg kg⁻¹) uključuju sadržaj Se, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Mo, Cd, Sb, Hg, Tl i Pb. Promatrajući sve sastavnice, vjerojatnost je da

imaju simetričnu distribuciju. Nekoliko iznimaka s negativnom asimetrijom su elementi K, Co i Mo. To implicira distribuciju unutar promatranja, ali također implicira i kvalitetu mjerenja. Negativna asimetrija sasvim je razumljiva s obzirom na kompromisne uvjete snage plazme, protoka i standardnog šaržnog protokola za ICP-MS mjerenja, koji su ostali konstantni tijekom svih analiza uzoraka. Ovi elementi obično zahtijevaju dodatno ugađanje radnih uvjeta instrumenta u načinu mjerenja s jednim elementom. Budući da je više-elementna ICP-MS analiza provedena korištenjem jedinstvenih radnih parametara za sve elemente, očekivana je manja asimetrija unutar skupa podataka.

Kako bi se otkrile sastavne skupine ispitivanih uzoraka, provedena je multivarijatna statistička analiza dobivene matrice. Analiza glavnih komponenti pokazala je da prvih pet svojstvenih vrijednosti korelacijske matrice čini 80 % ukupne varijance skupa podataka. Prve dvije komponente, koje objašnjavaju 66 % ukupne varijance, prikazane su na slici 14a. Faktorska opterećenja svakog elementa prikazana su na slici 14b.



Slika 14a. Klasifikacija uzoraka analizom glavnih komponenti (PCA), dijagram grupiranja u prve dvije glavne komponente PC1 I PC2

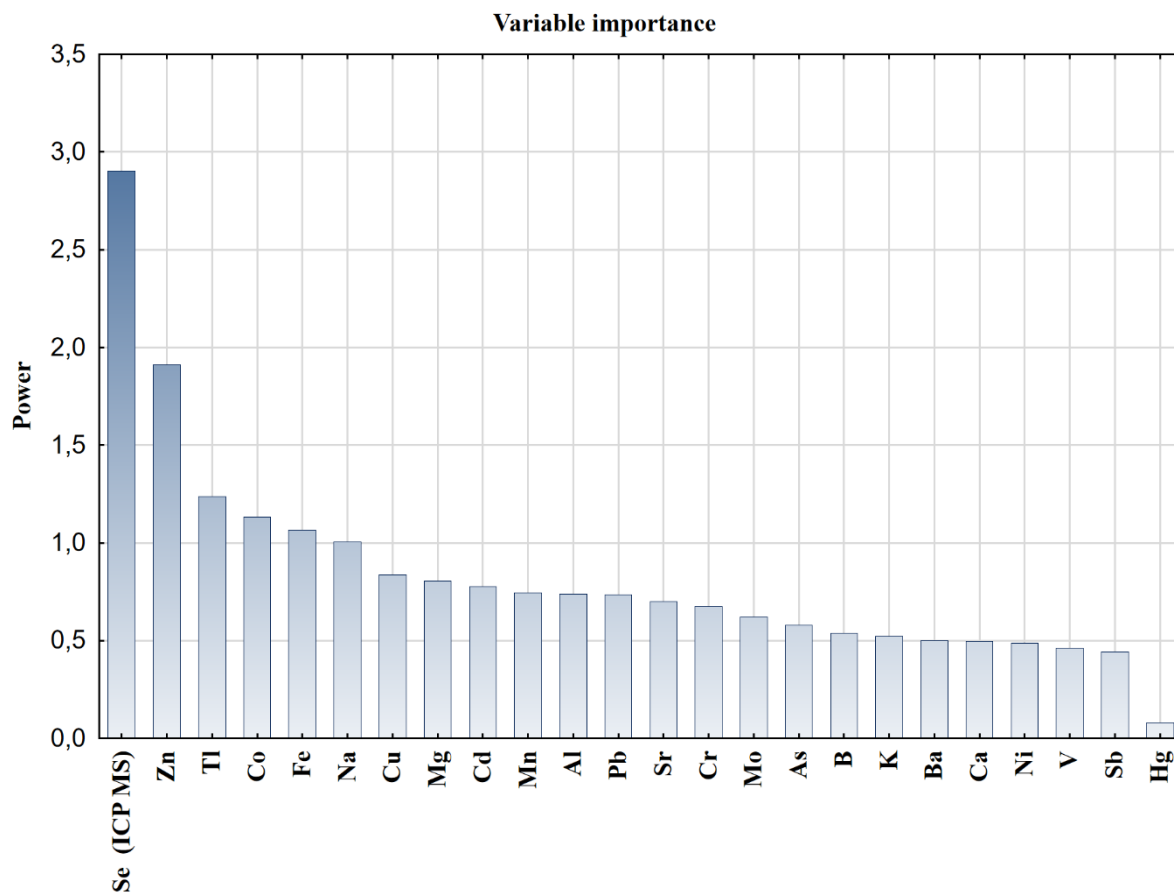


Slika 14b. Faktorska opterećenja varijabli u sustavu PCA1 / PCA2

Dijagram grupiranja, pokazao je tri skupine uzoraka. Prvu skupinu s uzorcima 35, 41, 48, 49, 81 i 82 duž pozitivne PC2 osi karakterizira veći doprinos Se i Zn. Druga skupina, koju su činili uzorci 50, 51, 52, 79 i 87 koji su smješteni duž PC1 osi, karakterizirana je negativnim doprinosom varijabli Se, Zn, Tl, Na i Fe. Većina uzoraka pripadala je središnjoj skupini u kojoj se ne može jasno razlučiti doprinos pojedinih varijabli. Uočeno je da su uzorci 23, 63 i 83 malo odmaknuti od većine uzoraka iz treće skupine. Kako bi se razjasnila aglomeracija u trećem središtu, značaj elemenata je procijenjen izračunavanjem parametra značajnosti varijabli (VIP) korištenjem linearne diskriminantne analize PLS-DA. Prikladnost metode već je prikazana u nekoliko studija elementnog profiliranja biljnih kultura i biljnih proizvoda.^{9,16-18,20,110}

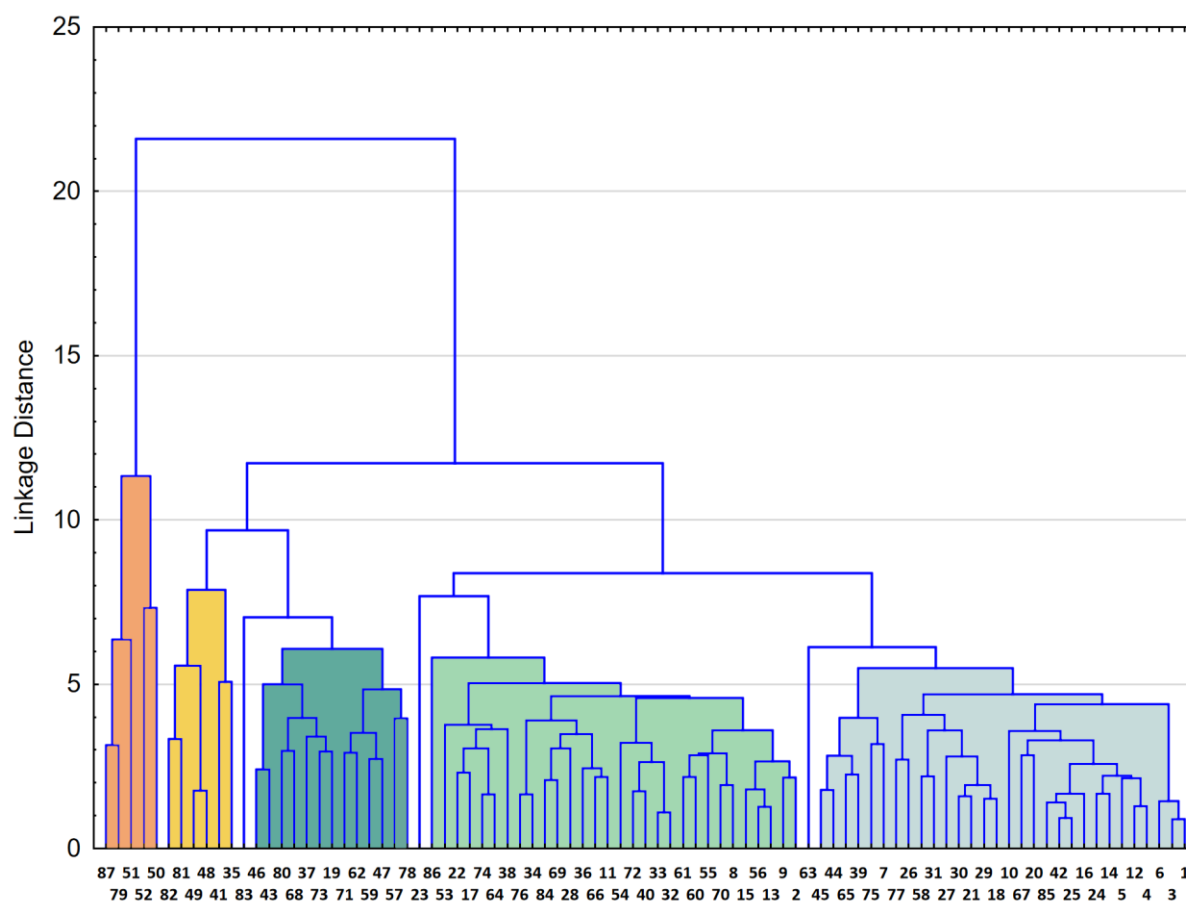
Statistička obrada podataka izdvaja elemente Na, Fe, Co, Tl, Zn i Se s diskriminirajućom snagom većom od 1,0 što je prikazano na slici 15. Stoga se ti elementi mogu smatrati potencijalnim markerima za diferencijaciju između klastera uzoraka dodatika

prehrani. Međutim, manji broj ispitanih uzoraka koji se nalaze između pozitivne PC2 i negativne osi PC1 pokazao je izravnu vezu s markerskim elementima.



Slika 15. Dijagram važnosti varijabli (VIP) potencijalnih markera elemenata za biljne dodatke prehrani

U svrhu boljeg pojašnjenja skupine uzoraka, provedena je hijerarhijska analiza klastera (HCA) na istom skupu podataka.¹¹¹ Primijenjena je *Euklidova matrica* udaljenosti i pravilo potpune vezanosti pri aglomeraciji. Odnosi između uzoraka prikazani su dijagramom stabla, odnosno dendrogramom, koji prikazuje obrazac sličnosti između uzoraka (slika 16).



Slika 16. Dendrogram generiran iz HCA za 87 uzoraka biljnih dodataka prehrani

Na slici 16. vidljivo je da su svi ispitani uzorci svrstani u tri skupine. Isti broj klastera dobiven je i analizom PCA. Međutim, bolja diskriminacija uzoraka koji su bili gusto naslagani u najvećem PCA klasteru postignuta je analizom HCA. Ovi uzorci su spješno razvrstani u manje podskupine. Klaster sa uzorcima 50, 51, 52, 79 i 87 izdvojen je jednako kao i primjenom PCA analize. Uzorci pripadaju skupini koju predstavljaju uljni i tekući oblici biljnih dodataka prehrani. U usporedbi s ostalim analiziranim uzorcima, ovu skupinu čine dodatci s najnižim masenim udjelima svih mjerenih elemenata. U ovu grupu spadaju i uzorci kapsuliranih ulja, kao što su ulje češnjaka, ulje paprene metvice i ulje sjemenki lana. Ovom skupu pripadaju i tekuće formulacije *Vitex Agnus-castus* i *Althaea officinalis*.

Drugi klaster se sastoji od dva podklastera. Prvi podklaster se odnosi na uzorke 35, 41, 48, 49, 81 i 82 s višim masenim udjelom Se i Zn nego što su mjereni u ostalim uzorcima. Općenito, sastojao se od uzoraka kapsula i tableta ekstrakata sjemenki grožđa, lišća maline, kvasca, plodova sikavice i lišća artičoke. Neki od tih uzoraka bili su obogaćeni Zn i Se, kako je

i deklarirano na njihovim pakiranjima. Raspon masenih udjela Se i Zn je bio u rasponu od 13 mg kg⁻¹ i 89 mg kg⁻¹, odnosno od 2,9 mg kg⁻¹ i 13,5 mg kg⁻¹. Drugi potklaster sastoji se od uzoraka 19, 37, 43, 46, 47, 57, 59, 62, 68, 71, 73, 78 i 80 gdje se ubrajaju tablete i kapsule ajurvedske formulacije, mješavine organskih gljiva, ekstrakti korijena *Panax Ginseng*, *Amorphophallus japonica*, *Urtica dioica*, *Cucurbita pepo*. Uz njih se mogu se naći I uzorci koji sadržavaju biljni materijal *Silbyum marianum* i *Amorphophallus*.

Nekoliko deklaracija ovih dodataka prehrani otkriva dodatak vitamina kao što su vitamin A, C, B₂, B₃, B₁₂ i D₃. S obzirom na elemente markere dobivene metodom PLS-DA, ovu skupinu karakterizira relevantan doprinos Co. Uzorak ekstrakta kore cejlonskog cimeta 83 povezan je uz drugi klister, kao odvojeni uzorak. Elementni sastav ovog uzorka nije pokazao značajan maseni udjel drugih elemenata markera osim Se. Međutim, može se vidjeti da su prijelazni metali, s izuzetkom Cr, i elementi u tragovima kao što su Hg, As, Cd i Pb bili prisutni u nižim masenim udjelima nego u ostalim uzorcima.

Dva brojnija podklastera predstavljala su treći klaster analiziranih dodataka prehrani. Prvi se sastojao od trideset uzoraka označenih brojevima 2, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 22, 28, 32, 33, 34, 36, 38, 40, 53, 54, 55, 56, 61, 64, 66, 69, 70, 72, 73, 74, 76, 84, 86. Biljni dodatci prehrani od zelenih algi i vrsta modrozelenih cijanobakterija pripadali su ovom potklasteru. Ovdje se mogu naći dodatci proizvedeni od biljnih vrsta, primjerice: brokule, artičoke, *Embllica officinalis*, *Tribulus terrestris*, *Aronia melanocarpa*, *Linum usitatissimum* i *Polygonum cuspidatum*. Ovaj podklaster karakterizirala je kombinacija niskog do umjerenog masenog udjela Se zajedno s niskim masenim udjelom Mn i umjerenim do visokim masenim udjelom Fe. Za usporedbu, maseni udjeli elemenata za vrste *Tribulus terrestris* dobiveni su metodom neutronske aktivacijske analize (NAA) u opsežnoj studiji Tkachenka i sur.²¹ Njihova mjerenja detektirala se masene udjele selenija u rasponu od 8 µg kg⁻¹ do 120 µg kg⁻¹.²¹ U ovom istraživanju uočen je maseni udio selenija od 24 µg kg⁻¹ u uzorku *Tribulus terrestris*. Ayurvedska formulacija, označena kao uzorak 23, odvojena je od ove podskupine. Razlika se može naći u neproporcionalno većoj koncentraciji Hg i Pb u usporedbi s istim sadržajem elemenata u susjednim uzorcima. Ovaj dodatak prehrani, po konzistenciji sličan džemu sastojao se od 44 različite biljke. Za neke od njih, poput preslice i izdanaka bambusa, već je potvrđeno da su biljke koje doprinose povišenom sadržaju žive u dodacima prehrani.^{14,92}

Drugi dio trećeg klastera činili su uzorci 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 39, 42, 44, 45, 58, 65, 67, 75, 77 i 85. Ovaj klaster karakterizirao je

umjeren do visok maseni udio Se, a maseni udjeli drugih elemenata su bile niži od masenih udjela elemenata u uzorcima koji pripadaju drugom klasteru. Karakterizira ga i kombinacija elemenata Ca, Mg, V, Tl i Cr, koji su umjerenom viših masenih udjela nego u ostalim uzorcima.

Uzorci spiruline temeljeni na *Arthrospira platensis*, koji su većinom bili smješteni u ovoj skupini, karakterizirani su izraženijim masenim udjelom Fe i Cr od uzoraka spiruline iz prvog podklastera. U literaturi je zabilježen visok sadržaj željeza u havajskoj spirulini u usporedbi s drugim vrstama plavozelenih cijanobakterija.¹⁰⁷ Autori su deklarirali raspon masenih udjela željeza u uzorcima spiruline od 280 mg kg⁻¹ do 3500 mg kg⁻¹, što općenito odgovara masenim udjelima željeza određenim u ovoj studiji od 110 mg kg⁻¹ do 2500 mg kg⁻¹. Više maseni udjeli željeza u *Arthrospiri* nego u dodacima na bazi *Chlorella* također odražavaju dodatak željeza u mediju za uzgoj ove vrste alge.¹¹² Elementi u uzorcima spiruline u ovom istraživanju uspoređeni sa literaturnim podacima nisu se značajno razlikovali. Mjereni su maseni udjela u rasponu: Ca (od 500 mg kg⁻¹ do 10500 mg kg⁻¹), K (od 5740 mg kg⁻¹ do 16700 mg kg⁻¹), Mn (od 6 mg kg⁻¹ do 443 mg kg⁻¹), V (od 115 μg kg⁻¹ do 12600 μg kg⁻¹), Zn (od 8 mg kg⁻¹ do 58 mg kg⁻¹), Hg (od 2,7 μg kg⁻¹ do 16 μg kg⁻¹) i Cu (od 0,5 μg kg⁻¹ do 12,3 mg kg⁻¹). Unutar ovog drugog dijela trećeg klastera mogu se pronaći i uzorci peruanskog ginsenga, cejlonskog cimeta, đumbira i lišća neema. Nadalje, većina uzoraka pripremljenih kao ajurvedska mješavina biljaka pripadala je ovom klasteru. Prema literaturnim podacima, katranska smola koja se često koristi kao baza za ajurvedske formulacije, obogaćena je esencijalnim elementima kao što su Ca, Mg i K. Literaturni podatak o masenom udjelu Ca od 145 000 mg kg⁻¹ u katranskoj smoli, usporediv je s masenim udjelom Ca 154 000 mg kg⁻¹ izmjerenim u uzorku ajurvedske formulacije broj 20 u ovom radu. Raspon masenog udjela K od 2200 mg kg⁻¹ do 39 800 mg kg⁻¹ i Mg od 186 mg kg⁻¹ do 27 900 mg kg⁻¹ utvrđen u ovom radu sasvim je usporediv s podacima iz literature.¹¹³

Međutim, korištenje smole također pridonosi većem sadržaju toksičnih elemenata kao što je Cr. U ovom radu, raspon masenih udjela Cr u ajurvedskim formulacijama bio je između 353 μg kg⁻¹ i 9830 μg kg⁻¹, dok je u objavljenoj studiji Aldakheela i suradnika srednja vrijednost iznosila 7400 μg kg⁻¹.¹¹³

U ovom radu utvrđeno je grupiranje uzoraka ajurvedskih formulacija između drugog i trećeg klastera. Ukupno sadržaj metala iz drugog klastera može se klasificirati kao općenito nizak, dok je u trećem klasteru prevladavao veći sadržaj metala. Uočena odstupanja mogu se pripisati dvjema vrstama postupaka pripreme, odnosno tradicionalnoj tzv. *rasashastra*, u kojoj

se biljke namjerno kombiniraju s metalima (npr. živom, olovom, željezom, cinkom) i mineralima i pripremi biljnih pripravaka bez dodataka metalnih soli (*kasthausadhi*). Velika varijabilnost elementnog sastava ispitivanih ajurvedskih pripravaka proizlazi i iz širokog asortimana korištenih sastojaka.^{9,92} U prijašnjim istraživanjima ajurvedskih formulacija, u uzorcima kupljenim u Indiji određen je sadržaj teških metala. Prikazani su udjeli metala u rasponu: Cr (od 370 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 9100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), Pb (od 410 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), Hg od 3640 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 49 400 mg kg^{-1}) i As (od 6 mg kg^{-1} do 388 mg kg^{-1}) proizvoda na bazi metala. Ajurvedski pripravci kupljeni na talijanskom tržištu sadržavali su značajno niže vrijednosti Hg i As.⁹ Uspoređujući ove podatke s elementnim sastavom ajurvedskih dodataka prehrani prisutnih na hrvatskom tržištu, mogu se izvući slična zapažanja. Naime, u ovom istraživanju izmjereni maseni udjeli Cr, Pb, Hg i As (od 353 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 9830 $\mu\text{g kg}^{-1}$), (od 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 5370 $\mu\text{g kg}^{-1}$), (od 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 155 $\mu\text{g kg}^{-1}$) odnosno (od 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 1600 $\mu\text{g kg}^{-1}$) nisu se značajno razlikovali od sadržaja istih metala s talijanskog tržišta.⁹

Uzorak 63 ističe se uz ovaj potklaster kao zaseban. Radi se o kapsulama ekstrakta vinove loze i zelenog čaja u kombinaciji s likopenom i resveratrolom. Divergencija uzorka 63 od ostalih uzoraka ovog klastera uočena je kroz najveće izmjerene masene udjele Al (23 000 mg kg^{-1}), As (17 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$), Sr (1100 mg kg^{-1}) i Ba (1500 mg kg^{-1}). To se može objasniti sposobnošću biljke čaja da akumulira tisuću miligrama Al po kilogramu u suhe mase.^{114,115} Osim toga, izražen sadržaj Ba i Sr može se pripisati prisutnosti vinove loze u kapsulama ovog uzorka. Njihove koncentracije često odražavaju geokemiju tla budući da sadržaj Ba i Sr u finalnim proizvodima nije pod utjecajem tehnološkog postupka vinove loze.¹¹⁶

Primijenjena kombinacija eksploratornih metoda statističke analize dobivenih masenih udjela elemenata omogućuje identifikaciju elementnih profila dodataka prehrani. Korištenjem kombinirane multivarijatne statistike utvrđeni su diskriminacijski markeri između cijelog skupa analiziranih elemenata. Štoviše, prednosti obje metode PCA i HCA ovdje su prikazane kroz međusobno usporedivu klasifikaciju brojnih uzoraka biljnih dodataka. Grupiranje uzoraka prema njihovim sličnim elementnim profilima također omogućuje razlikovanje nekoliko uzoraka iznimnih značajki u elementnom profilu.

§ 5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu istražene su postojeće i razvijena jednostavna analitička metoda za određivanje selenija u obliku selenita, Se(IV) pomoću elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije na principu *in situ* hvatanja razvijenog hidrida u grafitnoj kivetu obloženoj iridijem, (HG-ETAAS) u različitim formulacijama biljnih dodataka prehrani.
 - Optimizirana je razgradnja uzoraka i dodatni korak kemijske obrade za pretvorbu svih specija selenija u Se(IV).
 - Efikasnost metode provjerena je kroz sve stupnjeve analitičkog procesa analizom različitih certificiranih referentnih materijala (N = 10) koje su po sastavu matrice uzoraka i očekivanim koncentracijskim nivoima selenija najbliži uzorcima.
 - Postignuto je potpuno odvajanje selenija iz matrice čime su uklonjene uobičajeni interferencije koje se javljaju uporabom ETAAS metode. Osim uobičajenih svakodnevnih varijacija osjetljivosti, integrirani signali apsorbancije nisu pokazali bilo kakvu tendenciju smanjenja što je i potvrđeno dobrim analitičkim povratom od 91 % do 103 %.
 - Metoda je validirana kroz sve stupnjeve analitičkog procesa. Na temelju prihvatljivih vrijednosti za preciznost (od 1,1 % do 11,3 %), točnost (od 91 % do 103 %), granicu detekcije ($0,011 \mu\text{g L}^{-1}$) i granicu kvantifikacije ($0,023 \mu\text{g L}^{-1}$) metoda je prikladna za određivanje biljnih dodataka prehrani.
 - U 87 uzoraka biljnih dodataka prehrani izmjereni su maseni udjeli selenija u rasponu od $3,47 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $88\,651 \mu\text{g kg}^{-1}$.
 - Učinkovitosti obje metode statistički su uspoređene te njihove mjerne mogućnosti nisu pokazale značajne razlike.
 - Glavni sastojci biljnih dodataka prehrani su Na, Mg, K i Ca, dok su elementi srednjeg raspona masenih udjela: B, Al, Mn, Fe, Zn i Sr. Metali u tragovima su: Se, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Mo, Cd, Sb, Hg, Tl i Pb.
 - Multivarijatna PCA analiza pokazala je tri skupine dodataka prehrani bez jasnog međusobnog razlikovanja. Međutim, dobivena kombinacija elementnih opterećenja dovela je do uspješne diskriminacije dodataka prehrani obogaćenih Se i Zn iz većine ispitivanih uzoraka.
-

-
- Skupine ajurvedskih dodataka i različite skupine uzoraka spiruline uspješno su klasificirane.
 - Specifičnosti nekoliko različitih uzoraka, koji su proizvedeni kao mješavina biljaka, upućuju na utjecaje botaničkih, okolišnih i/ili proizvodnih uvjeta na dobivene elemente.
 - Prepoznati su markerski elementi: Se, Na, Fe, Co, Tl i Zn.
 - Ostvareni rezultati mogu poslužiti kao znanstvena podloga uređenju sustava kontrole kvalitete dodataka prehrani. Daljnja istraživanja bi trebala uključivati određivanje dodatnih elemenata, kao što su elementi rijetkih zemalja (engl. *Rare Earth Elements* REE) i nemetala za pojašnjenje međusobnih odnosa između skupa tako složenih uzoraka.
-

§ 6. LITERATURNI IZVORI

- ¹ Direktiva 2002/46/EZ Europskog Parlamenta i Vijeća o usklađivanju zakona država članica u odnosu na dodatke prehrani, OJ L 183, 12.7.2002, str. 51–57.
Konsolidirana verzija 26/07/2017. <http://data.europa.eu/eli/dir/2002/46/oj>
 - ² A. Augustsson, A. Qvarforth, E. Engstrom, C. Paulukat i I. Rodushkin, *Toxicol. Rep.* **8** (2021)1067–1080.
 - ³ M. C. Almeida, M. T. Oliva-Teles, J. Santos, C. Delerue-Matos i M. B. P. P. Oliveira, *Austin J Nutri Food Sci.* **3** (2015) 1072.
 - ⁴ A. Vettorazzi, A. López de Cerain, J. G. Sanz-Serrano, A. Gil i A. Azqueta, *Nutrients*, **12** (2020) 613.
 - ⁵ Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog Parlamenta i Vijeća o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane. OJ L, 31(1.2) 2002.
 - ⁶ EFSA Journal 2009a; 7(9): 280 104 ESCO report: *Advice on the EFSA guidance document for the safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as food supplements, based on real case studies.* <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.280>
 - ⁷ EFSA Journal 2009 b, 7(9): 281. *EFSA Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substances of concern.* <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.281>
 - ⁸ A. Filipiak-Szok, M. Kurzawa, M. Cichosz i E. Szlyk, *Anal. Lett.* **48** (2015) 2626–2638
 - ⁹ A. Giacomino, O. Abollino, C. Casanova, C. La Gioia, E. Magi i M. Malandrino, *Microchem. J.* **120** (2015) 6–17.
 - ¹⁰ P. Smichowski i A. Londonio, *Microchem. J.* **136** (2016) 113–120
 - ¹¹ A. Krejčova, I. Ludvikova, T. Černohorsky i M. Pouzar, *Food Chem.* **132** (2012) 588–596.
 - ¹² K. Bu, J. V. Cizdziel i L. Reidy, *Microchem. J.* **106** (2013) 244–249.
 - ¹³ E. Chevallier, R. Chekri, J. Zinck, T. Guerin i L. Noel, *J. Food Compos. Anal.* **41** (2015) 35–41.
 - ¹⁴ B. Brodziak-Dopierała, A. Fischer, W. Szczelina i J. Stojko, *Biol. Trace Elem. Res.* **185** (2018) 236–243.
-

- ¹⁵ R. Arumugam, R. R. R. Kannan, J. Jayalakshmi, K. Manivannan, K. Devi i P. Anantharaman, *Food Chem.* **135** (2012) 2372–2377.
- ¹⁶ D. Bertoldi, L. Cossignani, F. Blasi, M. Perini, A. Barbero, S. Pianezze i D. Montesano, *Food Chem.* **275** (2018) 585–593.
- ¹⁷ L. Meng, X. Chen, X. Chen, L. Yuan, W. Shi, Q. Cai i G. Huang, *Microchem. J.* **153** (2020) 104512.
- ¹⁸ M. Esteki, E. Heydari, J. Simal-Gandara, Z. Shahsavari i M. Mohammadlou, *Food Control*, **124** (2021)107889.
- ¹⁹ C. de Aragao Tannus, F. de Souza Dias, F. Barbosa Santana, D. C. M. Batista dos Santos, H. I. Ferreira Magalhaes, F. de Souza Dias i A. de Freitas Santos Junior, *Biol. Trace Elem. Res.* **199** (2021) 2330–2341.
- ²⁰ C. M. Airton Jr, C. Maione, R. M. Barbosa, M. Gallimberti, A. C. C. Paulelli, F. R. Segura, V. C. O. Souza, B. L. Batista i F. Barbosa Jr, *J. Chemom.* 2018; e3036. <https://doi.org/10.1002/cem.3036>
- ²¹ K. Tkachenko, M. Frontasyeva, A. Vasilev, L. Avramov i L. Shi, *Plants*, **9** (2020) 1764.
- ²² M. Sager, *Pure Appl. Chem.* **78** (2006) 111–133.
- ²³ M. Slekovca i W. Goessler, *Chem. Speciation Bioavailability*, **17** 2 (2005) 63–72.
- ²⁴ M. Gupta i S. Gupta, *Front. Plant Sci.* **7** (2017) 2074.
- ²⁵ N. V. C. Ralston J. Urine i D. Wallschläger (ur.), *Biogeochemistry and Analysis of Selenium and its Species*, Vol. 3. North American Metals Council, Washington, 2008
- ²⁶ K. Pyrzynska, *Food Chem.* **114** (2009) 1183–1191.
- ²⁷ M. Schiavon i E. A. H. Pilon-Smits, *J. Environ. Qual.* **46** (2017) 10–19.
- ²⁸ R. G. Moreno, R. Burdock, M. C. D. Álvarez i J. W. Crawford, *Appl. Environ. Soil Sci.* 2013, Article ID 283468, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/283468>
- ²⁹ P. J. White i M. R. Broadley, *New Phytologist* **182** (2009) 49–84.
- ³⁰ S. Traipop, W. T C. Chaiyasith, R. Sananmuang i N. Nabheerong, *Naresuan University Journal*, **18** (3) (2010) 2553.
- ³¹ Z. Ajtony, N. Szoboszlai, Z. Bella, S. Bolla, P. Szaka 1, i L. Bencs, *Microchim Acta* **150** (2005) 1–8.
- ³² Environmental Health Criteria 58, SELENIUM, WHO 1986.
- ³³ Food Safety Authority of Ireland, 2020. (Revision 2) *Report of the Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland, The Safety of Vitamins and Minerals in Food*
-

Supplements – Establishing Tolerable Upper Intake Levels and a Risk Assessment Approach for Products Marketed in Ireland

- ³⁴ A. F. Oliveira, J. Landero, K. Kubachka, A. R. A. Nogueira, M. A. Zanettie i J. Caruso, J. *Anal. At. Spectrom.* **31** (2016) 1034–1040.
- ³⁵ M. G. Ventura, V. Stibilj, M. do Carmo Freitas i A. M. G. Pacheco, *Food Chemistry*, **115** (2009) 200–206.
- ³⁶ A. F. Klapca, M. L. Mandić, J. Grgić, Lj. Primoraca, A. Perla i V. Krstanović, *Food Chemistry*. **85** (2004) 445–452
- ³⁷ M. Lazarusa, A. Sekovanić, S. Reljić, J. Kusakb, J. Kovačić, T. Orcta, J. Jurasović i Đ. Huberb, *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **49** (2014) 1392–1401.
- ³⁸ Food and Nutrition Bord, *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Institute of Medicine.* 2000 National Academy Press, New York, 284–324
www.fsai.ie (preuzeto 30. travnja 2022. god.)
- ³⁹ U. S. EPA 2018, Integrated Risk Information System (IRIS), Chemical Assessment Summary National Center for Environmental Assessment information concerning the carcinogenicity of this substance, *Selenium and Compounds*; CASRN 7782-49-2
https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=472
(preuzeto 02. svibnja 2022. god.)
- ⁴⁰ EFSA 2006. Scientific Committee on Food, Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals: Opinion of the Scientific Committee on food on tolerable upper intake level of selenium.*
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf
- ⁴¹ EFSA Journal 2014; **12** (10) 3846. *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium*, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italija. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846>
- ⁴² EFSA 2018; **4** Scientific Committee on Food (SCF) and the EFSA Panel on Dietetic Products. Nutrition and Allergies (NDA), *Overview on Tolerable Upper Intake Levels. Summary of Tolerable Upper Intake Levels–version 4* (September2018)
www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/UL_Summary_tables.pdf
- ⁴³ L. Cordóba-Tovar, J. Marrugo-Negrete, P. R. Baron i S. Díez, *Environ. Res.* **204** (2022) 112226.
-

- ⁴⁴ A. Sulimanec Grgec, J. Jurasović, Z. Kljaković-Gašpić, T. Orct, I. Rumora Samarin, T. Janči, A. Sekovanić, J. Grzunov Letinić, M. Matek Sarić, A. Benutić, K. Capak i M. Piasek, *Environ. Adv.* **8** (2022) 100226.
- ⁴⁵ D. Constantinescu-Aruxandei, R. M. Frîncu, L. Capră i F. Oancea, *Nutrients* **10** (2018) 1466
- ⁴⁶ M. Kielczykowska, J. Kocot, M. Paździor i I. Musik, *Adv. Clin. Exp. Med.* **27** (2018) 245–255.
- ⁴⁷ M. Rybinová, V. Červený, J. Hraniček i P. Rychlovský, *Microchem. J.* **124** (2016) 584–593.
- ⁴⁸ A. Haug, R. D. Graham, O. A. Christophersen i G. H. Lyons, *Microb. Ecol. Health Dis.* **19** (2007) 209–228.
- ⁴⁹ M. Navarro-Alarcon i C. Cabrera-Vique, *Sci. Total Environ.* **400** (2008) 115–141.
- ⁵⁰ M. Kieliszek i S. Błażej, *Molecules*, **21** (2016) 609
- ⁵¹ M. Kieliszek, I. Bano i H. Zare, *Biol. Trace Elem. Res.* **200** (2022) 971–987.
- ⁵² M. M. Rahman, A. M. Asiri, A. Khan i Inamuddin (ur.), (2020). Importance of Selenium in the Environment and Human Health. str. 1–58
<https://doi.org/10.5772/intechopen.83202>
- ⁵³ S. J Fairweather-Tait, R. Collings i R. Hurst, *Am. J. Clin. Nutr.* **91** (2010) 1484S–91S.
- ⁵⁴ Z. Pedrero i Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, **634** (2009) 135–152.
- ⁵⁵ A. Hirtza i K. Gunther, *Anal. Lett.* **53** (2020) 2529–2544
- ⁵⁶ T. G. Kazi, N. F. Kolachi, H. I. Afridi, K. D. Brahman, i F. Shah, *J. AOAC Int.* **97** (2014) 1696–1700.
- ⁵⁷ R. Nageswara Rao i M. V. N. Kumar Talluri, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 1–13.
- ⁵⁸ Uredba Komisije (EZ) br. 1170/2009 o izmjeni Direktive 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća i Uredbe (EZ) br. 1925/2006 Europskog parlamenta i Vijeća u odnosu na popise vitamina i minerala i njihovih oblika koji se mogu dodavati hrani, uključujući dodatke prehrani
- ⁵⁹ R. B. Khouzam, J. Szpunar, M. Holeman i R. Lobinski, *Pure Appl. Chem.* **84** (2012) 169–179
- ⁶⁰ B. Hosnedlova, M. Kepinska, S. Skalickova, C. Fernandez, B. Ruttkay-Nedecky, Q. Peng, M. Baron, M. Melcova, R. Opatrilova, J. Zidkova, G. Bjørklund, J. Sochor i R. Kizek, *Int. J. Nanomed.* **13** (2018) 2107–2128.
-

-
- ⁶¹ H. C. Rezende, I. L. S. Almeida, L. M. Coelho, N. M. M. Coelho i T. L. Marque, *Sample Prep.* **2** (2014) 31–48.
- ⁶² N. F. Kolachi, T. G. Kazi, H. I. Afridi, S. Khan, S. K. Wadhwa, A. Q. Shah, F. Shah, J. A. Baig i Sirajuddin, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 3327–3332.
- ⁶³ W. Zam, M. Alshahneh i A. Hasan, *Research J. Pharm. and Tech.* **12** 12 (2019) 6149–6152.
- ⁶⁴ M. Tuzen, K. O. Saygi i M. Soylak, *Talanta*, **71** (2007) 424–429.
- ⁶⁵ M. Tuzen i O. Z. Pekiner, *Food Chem.* **188** (2015) 619–624.
- ⁶⁶ A. Helaluddin, R. S. Khalid, M. Alaama i S. A. Abbas, *Trop. J. Pharm. Res.* **15** (2) (2016) 427–434.
- ⁶⁷ A. A. Shaltout, I. N. B. Castilhoa, B. Welz, E. Caraseka, B. Irland G. Martens, A. Martens i S. M. F. Cozzolinog, *Talanta* **85** (2011) 1350–1356.
- ⁶⁸ B. Avula, Y. H. Wang, T. J. Smillie, N. S. Duzgoren-Aydin i I. A. Khan, *J. Agric. Food. Chem.* **58** (2010) 8887–8894.
- ⁶⁹ B. Avula, Y. H. Wang, N. S. Duzgoren-Aydin i I. A. Khan, *Food Chem.* **127** (2011) 54–62
- ⁷⁰ D. J. Butche, *Appl. Spectrosc. Rev.* **52** 9 (2017) 755–773.
- ⁷¹ M. N. M. Reyes, M. L. Cervera i M. de la Guardia, *Anal Bioanal Chem.* **394** (2009) 1557–1562.
- ⁷² M. A. Akl, D. S. Ismael i A. A. El-Asmy, *Microchem. J.* **83** (2006) 61–69.
- ⁷³ S. Iqbal, T. G. Kazi, M. I. Bhangar, M. Akhtar i R. A. Sarfraz, *Int. J. Food Sci.* **43** (2008) 339–345.
- ⁷⁴ J. R. Marval-León, F. Cámara-Martos, F. Pérez-Rodríguez, M. A. Amaro-López i R. Moreno-Rojas, *Food Anal. Methods*, **5** (2012) 1054–1061.
- ⁷⁵ H. Chassigne, C. C. Chéry, G. Bordin i A. R. Rodriguez, *J. Chromatogr. A*, **976** (2002) 409–422.
- ⁷⁶ G. Vale, A. Rodrigues, A. Rocha, R. Rial, A. M. Mota, M. L. Goncalves, L. P. Fonseca i J. L. Capelo, *Food Chem.* **121** (2010) 268–274.
- ⁷⁷ L. Ruzik, *Talanta*, **93** (2012) 18–31.
- ⁷⁸ E. do N. da Silva, N. Baccana, S. Cadore i J. Braz. *Chem. Soc.* **24** 8 (2013) 1267–1275.
- ⁷⁹ H. Tumir, J. Bošnjir, I. Vedrina-Dragojević, Z. Dragun, S. Tomić, D. Puntarić i G. Jurak, *Food Control*, **21** (2010) 885–889.
-

- ⁸⁰ C. Kurt, A. Demirbas, M.A. Nawaz, G. Chung, F.S. Baloch i N. Altunay, *J. Food Compos. Anal.* **94** (2020) 103621.
- ⁸¹ L. Valiente, M. Piccinna, E. R. Alea, A. Grillo, P. Smichowski, *At. Spectrosc.* **23** (2002) 129–134.
- ⁸² B. Dočekal, S. Gucer i A. Selecka, *Spectrochim. Acta, Part B*, **59** (2004) 487–495.
- ⁸³ O. Alp i N. Ertaş, *Talanta* **81** (2010) 516–520.
- ⁸⁴ I. Ueta, D. Kato i M. Nagao, *Int J Anal Chem.* (2020).
<https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1839061>
- ⁸⁵ R. M. Brown, Jr., R. C. Fry, J. L. Moyers, S. J. Northway, M. B. Denton i G. S. Willson, *Anal. Chem.* **53** (1981) 1560–1566.
- ⁸⁶ V. Stibilj, P. Smrkolj i A. Krbavčič, *Microchim Acta*, **150** (2005) 323–327.
- ⁸⁷ C. Lang, X. Zhou, C. Deng, X. Wu i L. Zhou, *Medicinal Plant*, **6** (2015) 15–18.
- ⁸⁸ J. B. Garcia, M. Krachler i B. C. W. Shotyk, *Anal. Chim. Acta*, **534** (2005) 255–261.
- ⁸⁹ D. Sanchez-Rodas, W. T. Corns. B. Chen i P. B. Stockwell, *J. Anal. At. Spectrom.* **25** (2010) 933–946.
- ⁹⁰ A. Tyburska i K. Jankowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **74** (2013) 268–272.
- ⁹¹ M. Montes-Bayon, K. DeNicola i J. A. Caruso *J. Chromatogr. A* **1000** (2003) 457–476.
- ⁹² M. J. Martena, J. C. A. Van Der Wielen, I. M. C. M. Rietjens, W. N. M. Klerx, H. N. De Groot i E. J. M. Konings, *Food. Addit. Contam.: Part A*, **27** 2 (2010) 190–205.
- ⁹³ C. Agatemor i D. Beauchemin, *Anal. Chim. Acta*, **706** (2011) 66–83.
- ⁹⁴ D. Sullivan, R. Zywicki i M. Yancey, *J. AOAC Int.* **4** (2013) 786–794.
- ⁹⁵ M. Krawczyk-Coda, *Food Anal. Methods*, **12** (2019) 128–135.
- ⁹⁶ H. M. Anawar, *AJCE*, **2** (3) (2012) 37–46.
- ⁹⁷ J. Sıma, P. Rychlovsky, *Spectrochimica Acta Part B* **58** (2003) 919–930.
- ⁹⁸ D. Pozebon, V. L. Dressler i A. J. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 7–11.
<https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1839061>
- ⁹⁹ E. Nováková, P. Rychlovský, T. Resslerová, J. Hraníček i V. Červený, *Spectrochim. Acta, Part B*, **117** (2016) 42–48.
- ¹⁰⁰ J. Pedro, J. Stripekis, A. Bonivardi i M. Tudino, *Spectrochim. Acta, Part B*, **107** (2015) 152–158.
- ¹⁰¹ A. B. Volynsky, *Spectrochim. Acta, Part B*, **59** (2004) 1799–1821.
-

- ¹⁰² D. Beauchemin (ur.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (treće izdanje), Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Methods 2017, str. 236-245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11222-3>
- ¹⁰³ S. Wold, M. Sjöström i L. Eriksson, *Chemometr Intell Lab Syst.* **58** (2001) 109–130.
- ¹⁰⁴ B. H. Mevik i R. Wehrens, *J. Stat. Softw.* **18** (2007) 1-2.
- ¹⁰⁵ W. Horwitz i R. Albert, *J. AOAC Int.* **89** (2006) 1095–1109.
- ¹⁰⁶ J. Murphy, G. Schlemmer, I. L. Shuttler, P. Jones i S. J. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1593.
- ¹⁰⁷ J. Kejžar, M. Jagodic Hudobivnik, M. Nečemer, N. Ogrinc, J. Masten Rutar i N. Poklar Ulrih, *Frontiers in Nutrition*, **7** (2021) 618503
- ¹⁰⁸ S. Treviñon, A. Díaz, E. Sánchez-Lara, B. L. Sanchez-Gaytan, J.M. Perez-Aguilar i E. González-Vergara, *Biol. Trace Elem. Res.* **188** (2019) 68–98.
- ¹⁰⁹ B. Russell, S. L. Goddard, H. Mohamud, O. Pearson, Y. Zhang, H. Thompkins i R. J. C. Brown, *J. Anal. At. Spectrom.* **36** (2021) 2704.
- ¹¹⁰ S. Mi, X. Zhang, Y. Wang F. Yan, Y. Sang, H. Gong i X. Wang, *Food Control*, **130** (2021) 108328.
- ¹¹¹ S. Chanana, C. S. Thomas, F. Zhang, S. R. Rajski i T. S. Bugni, *Metabolites*, **10** (2020). <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
- ¹¹² P. Sukumaran, F. L. Dahlan, H. Omar i A. Ismail, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **3** (2014) 384–391.
- ¹¹³ R. K. Aldakheel, M. A. Gondal, H. N. Alsayed, M. A. Almessiere, M. M. Nasr i A. M. Shemsi, *Biol. Trace Elem. Res.*, **200** (2022) 4199–4216. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03014-4>
- ¹¹⁴ D. A. Barcena-Padilla, M. Bernal-Gonzalez, A. Panizza-de-Leon, R. S. Garcia-Gomez, i C. Duran-Dominguez-de-Bazua, *Nat. Resour.* **2** (2011) 141–145.
- ¹¹⁵ Y. M. Chen, T. M. Tsao, C. C. Liu, K. C. Lin i M. K. Wanga, *J. Sci. Food Agric.* **91** (2011) 1111–1117.
- ¹¹⁶ S. Blotevogel, E. Schreck, C. Laplanche, P. Besson, N. Saurin, S. Audry, J. Viers i P. Oliva, *Food Chem.* **298** (2019) 125033.
-

§ 7. DODATAK

Tablica P1) Maseni udjeli elemenata ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u biljnim dodatcima prehrani dobiveni metodom ICP-MS i maseni udio selenija dobiven metodom HG-ETAAS predstavljani kao srednja vrijednost (\bar{x}) \pm standardo odstupanje (σ) mjerenja dva neovisna uzorka svakog homogeniziranog biljnog dodatka hrani

| Broj uzoraka | Se [HG-ETAAS] | 78 Se [H ₂] [ICP-MS] | 51 V [He] [ICP-MS] | 52 Cr [He] [ICP-MS] | 59 Co [He] [ICP-MS] | 75 As [He] [ICP-MS] | 95 Mo [He] [ICP-MS] | 111 Cd [He] [ICP-MS] | 121 Sb [He] [ICP-MS] | 202 Hg [He] [ICP-MS] | 205 Tl [He] [ICP-MS] | 208 Pb [He] [ICP-MS] |
|--------------|----------------|----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 2060 \pm 92 | 1890 \pm 82 | 6610 \pm 70 | 16700 \pm 110 | 6750 \pm 90 | 410 \pm 14 | 860 \pm 11 | 61.0 \pm 14 | 19.6 \pm 0.5 | 13.6 \pm 0.8 | 36.0 \pm 2.1 | 103 \pm 1 |
| 2 | 90.2 \pm 2.3 | 78.8 \pm 9.1 | 294 \pm 2 | 487 \pm 3 | 246 \pm 5 | 791 \pm 9 | 288 \pm 1 | 26.6 \pm 2.7 | 7.90 \pm 0.22 | 4.22 \pm 0.10 | 80.6 \pm 1.9 | 276 \pm 2 |
| 3 | 2060 \pm 43 | 1850 \pm 10 | 6290 \pm 100 | 22800 \pm 480 | 3340 \pm 70 | 304 \pm 1 | 518 \pm 9 | 42.8 \pm 0.9 | 34.6 \pm 0.1 | 15.5 \pm 0.5 | 89.4 \pm 2.8 | 111 \pm 4 |
| 4 | 108 \pm 3 | 118 \pm 5 | 1170 \pm 60 | 4190 \pm 110 | 339 \pm 30 | 382 \pm 15 | 198 \pm 22 | 72.8 \pm 1.0 | 38.4 \pm 0.6 | 12.4 \pm 0.1 | 40.6 \pm 0.7 | 1350 \pm 80 |
| 5 | 96.4 \pm 2.1 | 93.6 \pm 3.6 | 12600 \pm 90 | 2090 \pm 75 | 308 \pm 9 | 949 \pm 10 | 288 \pm 8 | 94.7 \pm 1.1 | 16.7 \pm 1.3 | 12.6 \pm 1.5 | 21.5 \pm 0.7 | 904 \pm 11 |
| 6 | 608 \pm 3 | 595 \pm 1 | 4420 \pm 70 | 15200 \pm 300 | 11900 \pm 60 | 366 \pm 13 | 900 \pm 26 | 44.4 \pm 7.5 | 31.0 \pm 1.2 | 4.56 \pm 0.56 | 29.2 \pm 0.7 | 66.4 \pm 2.6 |
| 7 | 133 \pm 2 | 129 \pm 4 | 197 \pm 7 | 482000 \pm 28500 | 171 \pm 1 | 447 \pm 2 | 98 \pm 4.2 | 51.8 \pm 2.6 | 19.2 \pm 3.2 | 9.80 \pm 0.48 | 23.7 \pm 0.5 | 487 \pm 9 |
| 8 | 31.6 \pm 1.4 | 35.0 \pm 7.6 | 155 \pm 3 | 185 \pm 9 | 216 \pm 3 | 103 \pm 2 | 495 \pm 8 | 3.70 \pm 0.27 | 1.06 \pm 0.21 | 4.23 \pm 0.52 | 3.77 \pm 0.12 | 39.7 \pm 1.1 |
| 9 | 23.6 \pm 1.3 | 22.5 \pm 0.7 | 115 \pm 5 | 444 \pm 33 | 337 \pm 7 | 954 \pm 26 | 283 \pm 2 | 14.9 \pm 0.7 | 11.2 \pm 0.6 | 2.61 \pm 0.24 | 20.8 \pm 2.1 | 349 \pm 3 |
| 10 | 118 \pm 6 | 106 \pm 11 | 3730 \pm 630 | 1740 \pm 430 | 410 \pm 85 | 8270 \pm 120 | 1590 \pm 230 | 259 \pm 33 | 48.0 \pm 7.1 | 15.9 \pm 0.4 | 5.49 \pm 0.09 | 349 \pm 16 |
| 11 | 62.9 \pm 0.2 | 62.5 \pm 2.7 | 248 \pm 8 | 667 \pm 21 | 80.5 \pm 0.2 | 2530 \pm 90 | 221 \pm 2 | 19.2 \pm 0.1 | 32.3 \pm 0.4 | 6.38 \pm 0.15 | 4.75 \pm 0.03 | 52.6 \pm 1.2 |
| 12 | 219 \pm 8 | 215 \pm 18 | 976 \pm 40 | 2450 \pm 90 | 360 \pm 3 | 248 \pm 2 | 384 \pm 8 | 90 \pm 2.6 | 69.8 \pm 5.7 | 8.07 \pm 0.10 | 72.5 \pm 0.1 | 987 \pm 60 |
| 13 | 58.7 \pm 0.9 | 52.7 \pm 5.6 | 412 \pm 21 | 1850 \pm 70 | 226 \pm 7 | 281 \pm 4 | 416 \pm 3 | 54.3 \pm 4.8 | 21.4 \pm 1.0 | 5.51 \pm 0.94 | 13.3 \pm 0.6 | 880 \pm 4 |
| 14 | 168 \pm 3 | 153 \pm 1 | 1890 \pm 2.2 | 5920 \pm 290 | 369 \pm 7 | 1020 \pm 440 | 414 \pm 8 | 16.7 \pm 2.3 | 20.3 \pm 3.1 | 42.3 \pm 9.1 | 20.8 \pm 0.7 | 1330 \pm 84 |

§ 7. Dodatak

viii

| | | | | | | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------------|----------|
| 5 | 25.7±5.3 | 23.2±1.1 | 1130±1.5 | 5070±180 | 352±40 | 122±6 | 168±9 | 19.9±0.4 | 10.0±1.5 | 22.9±6.8 | 6.14±0.08 | 489±10 |
| 16 | 91.7±8.7 | 88.7±1.6 | 2200±90 | 2690±130 | 403±13 | 223±9 | 427±3 | 141±8 | 50.5±7.9 | 6.28±1.14 | 35.6±2.6 | 1350±90 |
| 17 | 9.03±0.38 | 6.20±0.24 | 240±5.8 | 1724±18 | 116±3 | 253±7 | 41.0±5.0 | 7.04±2.43 | <1.0 | 42.9±3.5 | 3.95±0.87 | 346±3 |
| 18 | 147±12 | 148±4 | 1290±3.6 | 9830±140 | 1800±40 | 1600±30 | 555±38 | 137±3 | <1.0 | 10.0±0.7 | 31.2±0.7 | 1330±50 |
| 19 | 8.44±0.16 | 5.24±0.42 | 3.63±0.49 | 1120±77 | 24.2±0.1 | 5.01±0.36 | 36.7±4.0 | 3.64±0.43 | <1.0 | 0.797±0.230 | 2.89±0.87 | 84.0±16 |
| 20 | 55.5±0.4 | 45.7±0.15 | 688±15 | 979±110 | 376±1 | 445±1 | 136±5 | 34.4±4.7 | 16.0±4.8 | 4.64±0.06 | 28.9±1.2 | 870±50 |
| 21 | 82.5±1.7 | 86.8±9.6 | 1980±110 | 5260±530 | 564±45 | 165±20 | 678±88 | 53.3±3.1 | <1.0 | 8.78±0.54 | 23.7±1.8 | 947±60 |
| 22 | 7.45±1.08 | 3.79±0.52 | 200±3 | 353±14 | 19.6±0.4 | 16.5±1.8 | 55.7±2.0 | 10.0±2.5 | <1.0 | 7.74±0.32 | 1.85±0.74 | 386±38 |
| 23 | 39.5±1.1 | <2.2 | 270±18 | 1700±100 | 259±3 | 1320±7 | 27.1±0.54 | 4.85±1.6 | 26.4±1.9 | 454000±59000 | 0.767±0.057 | 1760±13 |
| 24 | 172±7 | 170±5 | 2060±4.2 | 2430±65 | 483±2 | 308±9 | 261±13 | 53.1±1.9 | 39.9±1.6 | 155±7 | 18.0±0.4 | 709±4 |
| 25 | 203±8 | 195±3 | 8930±680 | 5000±40 | 1650±100 | 650±34 | 591±41 | 149±10 | 45.8±3.4 | 10.7±0.64 | 43.1±2.7 | 2000±120 |
| 26 | 46.5±3.2 | 41.3±3.7 | 30800±2600 | 3810±240 | 712±57 | 284±23 | 577±27 | 250±4 | <1.0 | 3.13±0.72 | 15.9±0.6 | 1350±57 |
| 27 | 128±0 | 127±2.5 | 2010±48 | 2710±15 | 510±26 | 366±4 | 485±3 | 54.0±3.1 | 2.15±1.33 | 11.4±2.0 | 51.0±1.3 | 926±32 |
| 28 | 108±1 | 100±2 | 598±3 | 718±46 | 328±2 | 322±5 | 748±21 | 17.6±4.7 | <1.0 | 4.12±0.56 | 38.0±0.1 | 151±2 |
| 29 | 166±3 | 166±3 | 6220±280 | 6090±230 | 1350±90 | 1280±120 | 498±37 | 134±25 | <1.0 | 36.1±2.7 | 82.7±5.3 | 2770±150 |
| 30 | 141±7 | 137±0 | 4230±210 | 9930±820 | 690±8 | 851±19 | 915±14 | 118±3 | <1.0 | 7.86±1.05 | 38.4±2.6 | 1780±29 |
| 31 | 621±1 | 495±7 | 5670±140 | 141000±570 | 1280±9 | 536±15 | 1440±10 | 27.6±0.1 | 36.0±2.4 | 42.2±6.52 | 29.9±0.9 | 1930±250 |
| 32 | 92.9±0.7 | 90.8±1 | 78.7±3.0 | 553±19 | 135±1 | 15.7±0.5 | 408±8 | 173±6 | 2.68±0.5 | 2.75±0.45 | 53.3±2.2 | 27.5±0.3 |
| 33 | 34.2±0.9 | 30.1±0.3 | 32.9±1.4 | 212±15 | 165±11 | 8.47±0.37 | 379±13 | 76.8±3.7 | 1.84±0.54 | 2.26±0.33 | 56.5±0.9 | 18.9±0.3 |
| 34 | 16.6±0.5 | 14.6±1.2 | 744±3 | 1770±560 | 101±11 | 16.4±0.3 | 183±1 | 254±6.8 | 7.89±0.44 | 1.34±0.39 | 15.7±1.8 | 45.4±1.3 |
| 35 | 60400±7200 | 55200±6700 | <1.0 | 153±17 | 28.2±2.1 | 12.3±0.6 | 38.0±1 | 30.1±0.9 | 1.29±0.63 | 0.980±0.663 | 39.3±1.1 | 55.2±0.6 |

§ 7. Dodatak

viii

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|-----------|
| 36 | 544±5 | 487±2 | 427±15 | 837±8 | 102±3 | 92.3±3.8 | 326±7 | 45.9±4.4 | 8.61±0.15 | 2.47±0.08 | 5.35±0.15 | 29.1±0.2 |
| 37 | 89.4±6.5 | 83.8±5.5 | 1.43±0.39 | 92.9±16 | 23.6±2.5 | 16.5±2.1 | 24.0±0.3 | 8.00±1.5 | 3.97±0.49 | <0.35 | 5.16±0.07 | 24.4±7.1 |
| 38 | 23.7±4.9 | 20.2±1.7 | 1720±150 | 401±73 | 365±27 | 127±10 | 22.0±1.2 | 9.80±1.33 | <1.0 | 2.70±1.30 | 14.0±1.2 | 57.8±0.7 |
| 39 | 13.8±0.8 | 8.07±0.21 | 502±34 | 1720±40 | 87.8±4.3 | 711±27 | 182±19 | 423±27 | 84.5±2.2 | 4.13±0.69 | 168±10 | 1790±100 |
| 40 | 81.7±2.8 | 80.3±1.0 | 33.4±3.2 | 736±66 | 288±7 | 108±4 | 191±13 | 6.51±0.16 | 15.7±1.0 | 3.13±0.71 | 14.9±0.1 | 54.5±0.4 |
| 41 | 12800±320 | 12200±690 | 75.1±10 | 166±14 | 38.2±1.2 | 15.7±0.7 | 16.3±5.0 | 4.95±0.31 | <1.0 | 3.47±0.18 | 5.34±0.01 | 44.2±3.8 |
| 42 | 345±7 | 339±3 | 6180±200 | 4110±350 | 1400±200 | 419±27 | 901±32 | 89.5±11 | 64.0±6.1 | 9.26±2.54 | 27.3±1.0 | 1690±31 |
| 43 | 54.7±0.1 | 38.3±2.4 | 3.08±0.43 | 21.8±1.6 | 22.4±0.5 | 151±6 | 659±12 | 10.6±0.42 | <1.0 | 2.29±0.15 | 10.8±1.8 | 5.13±0.42 |
| 44 | 27.3±1.5 | 18.4±0.2 | 2280±280 | 1950±44 | 397±29 | 391±71 | 538±19 | 54.2±3.3 | 27.4±4.8 | 7.29±0.19 | 40.1±10 | 697±94 |
| 45 | 21.6±0.1 | 16.1±0.4 | 920±18 | 1120±70 | 171±1 | 161±2 | 570±9 | 30.8±1.9 | 13.6±0.2 | 2.65±0.31 | 18.7±2.8 | 308±9 |
| 46 | 34.1±1.3 | 33.5±1.8 | <1.0 | 18.5±2.3 | 15.7±0.7 | 245±9 | 899±38 | 6.98±0.75 | 1.8±0.30 | 5.78±0.96 | 8.18±0.54 | 4.83±2.05 |
| 47 | 121±2 | 119±2 | 16.5±2 | 125±10 | 13±0.5 | 656±36 | 125±5 | 3.81±0.46 | 8.00±0.10 | 0.672±0.051 | 4.82±0.48 | 2.61±0.77 |
| 48 | 16100±240 | 15100±350 | 808±9 | 808±56 | 181±1 | 125±3 | 101±2 | 60.4±0.4 | 13.9±0.5 | 63.8±1.1 | 49.6±0.8 | 693±9 |
| 49 | 344000±5500 | 29500±700 | 1130±110 | 1110±130 | 243±26 | 291±35 | 140±3 | 59.4±8.7 | 32.8±5.8 | 5.29±0.07 | 184±11 | 1050±15 |
| 50 | 14.5±1.6 | 8.49±0.21 | <1.0 | <8.0 | <1.5 | 4.02±0.02 | 3.12±2.44 | <1.4 | <1.0 | 0.346±0.014 | 4.43±0.59 | <2.5 |
| 51 | 11.4±2.9 | 3.24±0.70 | <1.0 | <8.0 | <1.5 | <2.0 | <1.0 | <1.4 | <1.0 | <0.35 | 2.9±0.523 | 3.50±0.29 |
| 52 | 19.3±0.8 | 18.3±0.2 | <1.0 | <8.0 | <1.5 | <2.0 | 2±0.25 | <1.4 | <1.0 | 8940±58 | 0.914±0.03 | <2.5 |
| 53 | 6.43±0.73 | 9.04±3.42 | 637±1 | 1240±19 | 32.8±2.3 | 68.5±16 | 236±2 | 10.4±0.8 | <1.0 | 2.08±0.28 | 4.33±0.50 | 49.4±0.7 |
| 54 | 294±13 | 287±1 | 32.0±3.9 | 137±8 | 63.7±3.2 | 12.6±0.3 | 1360±24 | 156±4 | 2.68±0.26 | 2.07±0.42 | 1.47±0.37 | 34.1±0.9 |
| 55 | 22.1±0.6 | 20.1±0.57 | 217±2 | 465±2 | 34.2±0.8 | 37.5±0.6 | 1090±29 | 22.1±0.1 | 1.93±0.68 | 5.43±0.29 | 24.2±7.2 | 97.1±1.5 |
| 56 | 35.2±1.5 | 30.6±1.2 | 869±30 | 5220±14 | 159±3 | 172±1 | 1100±11 | 69.6±6.2 | 35.4±8.0 | 8.51±0.41 | 8.98±0.64 | 1030±65 |

§ 7. Dodatak

viii

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| 57 | 10.0±0.8 | <2.2 | 20.5±1.6 | 2430±240 | 34.6±3.7 | 7.48±0.93 | 24.1±0.6 | 9.60±1.84 | 9.70±1.43 | 3.29±0.69 | 9.80±0.35 | 161±18 |
| 58 | 111±1 | 96.3±2.6 | 4710±48 | 35800±3000 | 1040±40 | 446±55 | 1930±4 | 53.9±5.0 | 21.4±3.4 | 15.4±5.4 | 31.1±0.8 | 1370±140 |
| 59 | 49.0±5.4 | 61.3±4.3 | 50.7±0.1 | 149±13 | 330±3 | 347±13 | 55.4±3.2 | 5.28±0.24 | 6.89±0.44 | 0.858±0.081 | 16.6±0.8 | 6.65±2.16 |
| 60 | 32.5±1.7 | 21.4±1.6 | 57.0±2.4 | 217±9 | 31.4±0.3 | 40.9±1.5 | 441±23 | 5.64±0.13 | 14.3±1.98 | 1.38±0.11 | 3.71±0.05 | 651±49 |
| 61 | 29.7±0.9 | 29.3±3.5 | 117±9 | 729±1 | 42.2±1.2 | 79.7±1.6 | 427±61 | 83.1±0.8 | 3.01±0.88 | 0.775±0.319 | 7.94±0.55 | 46.6±2.5 |
| 62 | 10.9±1.3 | 12.9±3.3 | 82.4±4.7 | 437±47 | 29.2±2.7 | 26.5±0.8 | 149±3 | 2.56±0.38 | 7.22±0.48 | 1.23±0.32 | 35.6±9.5 | 54.2±3.1 |
| 63 | 108±1 | 95.2±2.5 | 5590±62 | 4080±6.3 | 1850±22 | 17300±150 | 2080±100 | 39.0±4.5 | 48.8±3.6 | 16.1±1.23 | 659±28 | 11400±360 |
| 64 | 10.0±2.2 | 9.92±1.55 | 149±8 | 500±45 | 51.5±2.6 | 18.4±0.6 | 34.9±0.1 | 15.1±0.5 | 6.97±0.24 | 1.02±0.03 | 3.17±0.23 | 110±2 |
| 65 | 45.6±3.1 | 46.0±6.6 | 1560±48 | 2180±390 | 576±37 | 718±41 | 257±11 | 134±5 | 160±3 | 11.4±0.3 | 41.9±1.3 | 885±21 |
| 66 | 105±2 | 104±2 | 203±2 | 767±47 | 390±8 | 565±19 | 465±8 | 11.0±0.2 | 16.5±1.5 | 1.59±0.23 | 15.6±0.4 | 94.3±0.4 |
| 67 | 1370±20 | 1350±15 | 495±30 | 1750±140 | 219±9 | 301±25 | 488±41 | 6.87±0.20 | 38.6±3.8 | 18±1.3 | 22.0±0.8 | 840±98 |
| 68 | 8.10±0.97 | 6.89±0.61 | 27.0±0.4 | 86.5±5.4 | 2.93±0.37 | 4.19±0.29 | 53.4±2.3 | 83.7±11 | 1.50±0.29 | 1.11±0.14 | 4.60±0.23 | 27.0±8.7 |
| 69 | 118±3 | 112±4 | 162±13 | 374±5 | 84.0±4.1 | 256±5 | 634±28 | 9.63±0.33 | 8.69±0.72 | 5.34±1.33 | 5.63±0.11 | 121±16 |
| 70 | 18.2±3.5 | 19.6±6.7 | 371±19 | 305±85 | 236±83 | 172±62 | 66.9±23 | 5.68±1.76 | 1.18±0.41 | 0.512±0.162 | 5.01±1.19 | 42.3±13 |
| 71 | 94.2±5.7 | 98.1±14 | 8.18±0.61 | 408±21 | 389±1 | 101±4 | 291±10 | 6.51±0.68 | 5.62±0.25 | 5.26±0.27 | 3.59±0.54 | 32.9±0.4 |
| 72 | 57.7±0.5 | 63.8±8.2 | 250±1.0 | 1580±370 | 139±1 | 128±2 | 321±3 | 13.5±0.5 | 5.57±0.28 | 4.32±0.19 | 7.79±0.15 | 136±8 |
| 73 | 18.8±0.8 | 18.3±0.4 | 27.3±1.0 | 62.7±6.9 | 25.3±1.2 | 27.5±0.5 | 60.0±0.4 | 5.60±0.33 | 1.05±0.10 | 1.09±0.34 | 3.26±0.48 | 5.72±0.06 |
| 74 | 16.8±3.4 | 16.7±0.7 | 257±4 | 888±68 | 111±1 | 36.8±1.2 | 75.6±0.5 | 31.3±2.7 | 10.6±0.48 | 3.40±0.04 | 3.86±0.22 | 234±1 |
| 75 | 47.7±4.7 | 45.8±3.2 | 802±38 | 30300±620 | 79.0±0.3 | 20.1±0.8 | 87.2±0.7 | 34.4±2.5 | 7.43±0.20 | 8.35±2.04 | 46.8±1.9 | 271±2 |
| 76 | 23.2±4.8 | 13.3±3.7 | 501±15 | 1240±17 | 82.2±2.6 | 46.6±2.3 | 62.2±5.0 | 284±2 | 6.24±0.27 | 2.18±0.59 | 9.78±0.79 | 103±1 |
| 77 | 24.7±0.3 | 21.5±1.1 | 8560±123 | 74000±3800 | 535±6 | 143±5 | 147±1 | 389±14 | 5.00±1.20 | 2.45±0.51 | 7.00±0.23 | 489±4 |

§ 7. Dodatak**viii**

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------|------------|------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 78 | 14.8±0.1 | 14.7±1.7 | 57.2±2.9 | 598±106 | 195±1 | 43.8±2.5 | 24.9±0.6 | 3.98±0.66 | 4.49±0.47 | 8.41±1.49 | 75.5±0.7 | 32.8±3.9 |
| 79 | 3.47±0.49 | <2.2 | 7.88±0.25 | 14.9±1.8 | 8.88±0.10 | 13.6±1.1 | 6.72±1.37 | <1.4 | 6.34±0.95 | 1.36±0.44 | <0.67 | 9.57±0.30 |
| 80 | 21.9±0.2 | 20.8±1.5 | 5.91±0.02 | 12.4±4.2 | 21.1±0.5 | 13.8±0.9 | 16.4±3.6 | 3.91±0.32 | 7.74±0.18 | 2.02±0.46 | 1.01±0.24 | 10.8±0.9 |
| 81 | 88700±5600 | 83900±8900 | 143±5 | 265±11 | 1280±150 | 87.9±0.8 | 115±8 | 179±8 | 6.62±0.89 | <0.35 | 22.5±1.3 | 2600±11 |
| 82 | 16200±950 | 18300±3400 | 127±4 | 679±8 | 193±5 | 16.2±1.7 | 87.0±0.4 | 11.3±2.2 | 1.31±0.05 | <0.35 | 47.2±0.5 | 111±3 |
| 83 | 622±2 | 530±26 | 53.6±1 | 8030±13 | 25.8±2.4 | 4.64±0.73 | 15.6±2.7 | <1.4 | 1.00±0.32 | <0.35 | 4.93±0.59 | 2.47±0.47 |
| 84 | 96.5±7.4 | 101±11 | 464±1 | 888±39 | 130±3 | 55.2±0.1 | 384±5 | 22.0±1.1 | 6.90±0.67 | 3.06±0.41 | 6.35±0.86 | 154±9 |
| 85 | 134±8 | 133±3 | 3340±150 | 7770±340 | 710±50 | 588±30 | 999±37 | 38.3±6.7 | 50.1±0.2 | 13.5±0.8 | 46.3±1.0 | 5370±130 |
| 86 | 60.5±2.3 | 51.1±2.6 | 1710±47 | 2420±74 | 24.7±3.4 | 56.7±3.3 | 1610±29 | 23.7±2.1 | 164±8 | 6.86±1.48 | 16.5±0.6 | 52.9±1.5 |
| 87 | 8.18±1.32 | 2.33±0.58 | 1.38±0.38 | 16.6±5.0 | 15.9±0.3 | 2.16±1.06 | 8.69±3.64 | <1.4 | 1.07±0.69 | <0.35 | <0.67 | 8.36±1.46 |

Tablica P2. Maseni udjeli elemenata (mg kg^{-1}) dobiveni metodom ICP-MS predstavljeni kao srednja vrijednost (\bar{x}) \pm standardo odstupanje (σ) mjerjenja dva neovisna uzorka svakog homogeniziranog biljnog dodatka hrani

| Broj uzorka | 11 B [No Gas] [ICP-MS] | 23 Na [He] [ICP-MS] | 24 Mg [He] [ICP-MS] | 27 Al [No Gas] [ICP-MS] | 39 K [He] [ICP-MS] | 40 Ca [H ₂] [ICP-MS] | 55 Mn [He] [ICP-MS] | 56 Fe [He] [ICP-MS] | 60 Ni [He] [ICP-MS] | 63 Cu [He] [ICP-MS] | 66 Zn [He] [ICP-MS] | 88 Sr [He] [ICP-MS] | 137 Ba [He] [ICP-MS] |
|-------------|---------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | 67.7 \pm 1.8 | 11500 \pm 100 | 5380 \pm 10 | 280 \pm 1 | 14300 \pm 100 | 1620 \pm 100 | 107 \pm 1 | 1360 \pm 17 | 3.95 \pm 0.04 | 12.3 \pm 0.2 | 25.6 \pm 0.4 | 18.2 \pm 0.4 | 2.49 \pm 0.03 |
| 2 | 5.98 \pm 0.21 | 18300 \pm 500 | 1680 \pm 30 | 124 \pm 4 | 10000 \pm 80 | 496 \pm 61 | 21.5 \pm 0.6 | 349 \pm 2 | 0.896 \pm 0.021 | 1.37 \pm 0.04 | 9.42 \pm 0.15 | 14.3 \pm 0.2 | 1.94 \pm 0.04 |
| 3 | 53.8 \pm 0.2 | 6410 \pm 170 | 4790 \pm 150 | 373 \pm 4 | 13800 \pm 400 | 2170 \pm 20 | 75.9 \pm 1.1 | 2510 \pm 10 | 3.63 \pm 0.05 | 5.12 \pm 0.09 | 37.5 \pm 0.3 | 15.9 \pm 0.2 | 2.32 \pm 0.03 |
| 4 | 68.3 \pm 1.9 | 4180 \pm 5 | 3400 \pm 20 | 905 \pm 20 | 12200 \pm 8 | 2620 \pm 30 | 36.0 \pm 1.8 | 1180 \pm 70 | 1.27 \pm 0.01 | 2.83 \pm 0.11 | 23.4 \pm 0.8 | 23.3 \pm 1.1 | 11.8 \pm 0.3 |
| 5 | 7.69 \pm 0.05 | 13100 \pm 140 | 2740 \pm 40 | 345 \pm 4 | 8450 \pm 20 | 3000 \pm 200 | 24.0 \pm 0.6 | 732 \pm 19 | 9.21 \pm 0.05 | 3.06 \pm 0.04 | 10.9 \pm 0.5 | 43.5 \pm 0.2 | 11.0 \pm 0.2 |
| 6 | 73.6 \pm 3.9 | 17700 \pm 210 | 4020 \pm 50 | 393 \pm 20 | 14400 \pm 400 | 1560 \pm 10 | 136 \pm 1 | 2360 \pm 10 | 6.03 \pm 0.07 | 9.77 \pm 0.09 | 34.3 \pm 0.9 | 9.19 \pm 0.15 | 1.35 \pm 0.03 |
| 7 | 12.8 \pm 0.4 | 2560 \pm 10 | 1620 \pm 30 | 168 \pm 2 | 7810 \pm 30 | 2580 \pm 70 | 443 \pm 6 | 255 \pm 1 | 1.61 \pm 0.05 | 2.70 \pm 0.06 | 58.4 \pm 1.6 | 20.9 \pm 0.8 | 28.5 \pm 1.0 |
| 8 | 7.32 \pm 0.35 | 4270 \pm 70 | 2480 \pm 40 | 25.0 \pm 0.1 | 11600 \pm 100 | 1090 \pm 140 | 26.6 \pm 0.5 | 325 \pm 2 | 3.05 \pm 0.05 | 2.78 \pm 0.05 | 13.0 \pm 0.1 | 9.28 \pm 0.12 | 7.17 \pm 0.11 |
| 9 | 6.13 \pm 0.74 | 637 \pm 10 | 2110 \pm 40 | 54.8 \pm 0.8 | 7310 \pm 170 | 1620 \pm 60 | 42.9 \pm 1.8 | 796 \pm 10 | 0.238 \pm 0.003 | 3.55 \pm 0.14 | 15.1 \pm 0.2 | 10.4 \pm 0.4 | 2.76 \pm 0.07 |
| 10 | 61.8 \pm 5.3 | 25200 \pm 2900 | 16100 \pm 2100 | 209 \pm 29 | 9180 \pm 800 | 105000 \pm 9000 | 54.2 \pm 12 | 573 \pm 20 | 1.11 \pm 0.24 | 2.38 \pm 0.44 | 9.04 \pm 1.55 | 927 \pm 10 | 6.67 \pm 1.18 |
| 11 | 11.8 \pm 0.7 | 5820 \pm 160 | 1680 \pm 40 | 35.3 \pm 1.3 | 5740 \pm 100 | 4640 \pm 50 | 5.83 \pm 0.09 | 107 \pm 2 | 1.16 \pm 0.03 | 0.513 \pm 0.001 | 7.68 \pm 0.19 | 30.7 \pm 1.1 | 1.52 \pm 0.24 |
| 12 | 18.2 \pm 1.7 | 4140 \pm 20 | 3550 \pm 10 | 322 \pm 11 | 12700 \pm 20 | 2470 \pm 30 | 36.7 \pm 0.3 | 1300 \pm 10 | 1.64 \pm 0.05 | 1.58 \pm 0.04 | 55.8 \pm 0.7 | 44.9 \pm 0.2 | 42.5 \pm 0.3 |
| 13 | 24.9 \pm 1.6 | 6000 \pm 40 | 1880 \pm 140 | 180 \pm 3 | 16700 \pm 50 | 2770 \pm 100 | 32.0 \pm 0.1 | 412 \pm 1 | 1.04 \pm 0.04 | 4.48 \pm 0.01 | 19.5 \pm 0.2 | 19.4 \pm 0.2 | 6.39 \pm 0.02 |
| 14 | 10.8 \pm 0.5 | 1760 \pm 20 | 2260 \pm 5 | 229 \pm 2 | 11300 \pm 30 | 15500 \pm 100 | 32.1 \pm 0.2 | 439 \pm 28 | 2.73 \pm 0.07 | 4.92 \pm 0.05 | 12.8 \pm 0.4 | 60.1 \pm 0.1 | 28.3 \pm 0.1 |
| 15 | 6.16 \pm 0.25 | 2400 \pm 10 | 925 \pm 10 | 279 \pm 4 | 9110 \pm 50 | 1340 \pm 70 | 36.1 \pm 0.4 | 409 \pm 1 | 2.65 \pm 0.04 | 2.85 \pm 0.08 | 6.25 \pm 0.16 | 7.79 \pm 0.19 | 6.42 \pm 0.04 |
| 16 | 23.1 \pm 4.9 | 503 \pm 1 | 3260 \pm 80 | 1170 \pm 130 | 12900 \pm 500 | 9400 \pm 100 | 62.7 \pm 1.6 | 898 \pm 34 | 1.84 \pm 0.02 | 10.2 \pm 0.2 | 25.5 \pm 0.4 | 106 \pm 3 | 65.3 \pm 0.2 |
| 17 | 2.41 \pm 0.22 | 343 \pm 26 | 323 \pm 20 | 130 \pm 3 | 2580 \pm 150 | 1860 \pm 130 | 9.26 \pm 0.45 | 212 \pm 13 | 1.4 \pm 0.09 | 1.17 \pm 0.03 | 4.74 \pm 0.08 | 5.26 \pm 0.21 | 4.00 \pm 0.15 |

§ 7. Dodatak

viii

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|--------------|-----------|-----------|-------------|-------------|-----------|------------|-------------|
| 18 | 38.5±0.5 | 3230±100 | 5160±70 | 896±1 | 39800±1200 | 15500±100 | 203±6 | 16900±300 | 11.8±0.3 | 11.1±0.5 | 30.2±0.1 | 140±1 | 62.2±0.1 |
| 19 | 2.04±0.46 | 511±40 | 191±15 | 12.2±1.2 | 2450±160 | 418±40 | 10.4±0.6 | 17.4±0.6 | 0.579±0.032 | 1.05±0.08 | 1.49±0.21 | 2.58±0.14 | 2.34±0.17 |
| 20 | 13.5±0.8 | 7420±230 | 8730±70 | 484±24 | 8710±70 | 154000±11000 | 55.8±1.7 | 356±18 | 0.777±0.021 | 1.21±0.01 | 56.2±0.3 | 163±2 | 20.8±0.6 |
| 21 | 32.3±1.3 | 4360±470 | 3540±300 | 743±7.4 | 13700±1100 | 14300±400 | 66.5±6.3 | 1530±150 | 3.06±0.33 | 9.30±1.08 | 17.5±1.3 | 81.1±7.3 | 42.4±4.1 |
| 22 | 4.21±2.82 | 1040±60 | 186±8 | 76.3±0.34 | 2200±70 | 640±64 | 22.1±1.0 | 40.7±2.9 | 0.226±0.015 | 1.88±0.07 | 2.86±0.15 | 2.59±0.12 | 4.81±0.27 |
| 23 | 1.90±0.08 | 265±3 | 372±5 | 204±2 | 2070±10 | 571±27 | 7.81±0.08 | 292±7 | 1.65±0.04 | 2.71±0.10 | 8.05±0.21 | 3.15±0.09 | 9.13±0.15 |
| 24 | 29.2±0.5 | 6840±7 | 11500±100 | 333±4 | 7980±20 | 27400±200 | 86.6±0.6 | 772±1 | 4.16±0.06 | 4.81±0.02 | 19.2±1.2 | 51.3±1.3 | 12.5±0.1 |
| 25 | 9.39±0.56 | 1470±20 | 4310±80 | 1720±90 | 15300±1000 | 7250±70 | 131±9 | 2090±60 | 2.91±0.05 | 24±1.4 | 14.3±0.5 | 69.9±5.8 | 75.6±6.1 |
| 26 | 65.9±3.7 | 1840±90 | 1730±110 | 712±21 | 6570±30 | 137000±6000 | 128±10 | 1180±70 | 29.3±2.1 | 5.98±0.57 | 25.0±2.1 | 62.8±3.3 | 35.7±1.0 |
| 27 | 2150±240 | 5340±10 | 2310±50 | 916±110 | 22700±600 | 23700±1500 | 53.5±2.1 | 1480±10 | 2.51±0.08 | 5.84±0.07 | 22.2±0.5 | 91.1±1.1 | 45.6±1.5 |
| 28 | 65.9±25 | 2260±90 | 4210±60 | 87.4±1.9 | 20500±300 | 27700±100 | 22.2±0.4 | 95.2±2.7 | 2.01±0.03 | 4.12±0.03 | 5.37±0.3 | 48.3±0.2 | 15.7±0.2 |
| 29 | 26.5±1.4 | 4330±300 | 5700±400 | 4000±210 | 16900±800 | 16500±1100 | 203±11 | 4100±300 | 5.02±0.35 | 12.4±0.9 | 27.8±2.1 | 83.1±4.0 | 76.8±4.5 |
| 30 | 78.8±1.2 | 1510±30 | 27900±200 | 1580±20 | 9750±100 | 8890±130 | 84.0±0.2 | 2780±20 | 3.53±0.07 | 7.86±0.20 | 17.9±0.2 | 47.7±1.5 | 27.5±0.2 |
| 31 | 58.1±2.1 | 179±3 | 2420±40 | 1380±40 | 8500±90 | 13300±100 | 168±2 | 2360±10 | 12.4±0.1 | 14.1±0.1 | 13.1±0.5 | 244±1 | 40.6±0.6 |
| 32 | 30.5±0.5 | 650±10 | 1600±30 | 41.9±1.3 | 22500±200 | 3850±110 | 28.3±0.2 | 77.9±0.7 | 4.96±0.09 | 5.38±0.03 | 51.4±0.7 | 10.4±0.2 | 3.43±0.02 |
| 33 | 24.4±0.2 | 529±12 | 1660±50 | 19.8±1.3 | 21200±700 | 3900±80 | 29.1±1.9 | 61.7±12 | 3.72±0.27 | 3.42±0.12 | 38.4±1.5 | 10.8±0.2 | 3.07±0.08 |
| 34 | 9.37±0.07 | 3750±30 | 1040±20 | 14.9±0.6 | 1360±20 | 131000±3000 | 5.79±1.05 | 19.5±4.1 | 1.01±0.01 | 0.581±0.012 | 1.98±0.08 | 33.9±0.5 | 13.4±0.2 |
| 35 | 25.5±0.3 | 1160±10 | 371±1 | 1.42±0.3 | 6560±130 | 1380±60 | 3.16±0.06 | 6.41±0.17 | 0.242±0.019 | 0.146±0.028 | 8980±50 | 2.02±0.01 | 0.353±0.013 |
| 36 | 8.94±0.53 | 7050±110 | 1940±10 | 34.3±0.3 | 22700±100 | 26600±200 | 7.23±0.01 | 42.2±0.7 | 0.579±0.003 | 1.25±0.01 | 11.1±0.9 | 22.1±0.3 | 1.51±0.03 |
| 37 | 7.69±0.07 | 764±22 | 646±1 | 6.08±0.07 | 3430±70 | 939±2 | 1.35±0.04 | 10.3±0.2 | 0.237±0.006 | 2.00±0.03 | 3.12±0.33 | 1.95±0.01 | 0.402±0.067 |
| 38 | 6.86±0.09 | 144±6 | 1330±120 | 61.0±4.4 | 8330±60 | 271±29 | 3.71±0.25 | 2140±200 | 1.01±0.10 | 3.34±0.01 | 7.62±0.64 | 0.640±0.05 | 1.19±0.24 |

§ 7. Dodatak

viii

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------|----------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| 39 | 12.9±0.4 | 178±6 | 1430±80 | 228±17 | 13200±500 | 3160±30 | 31.3±1.9 | 162±13 | 1.56±0.07 | 3.42±0.21 | 43.4±3.3 | 15.7±0.8 | 19.4±1.1 |
| 40 | 20.9±0.7 | 378±16 | 5240±170 | 36.0±1.5 | 38200±2500 | 3460±20 | 66.1±4.6 | 28.7±0.4 | 3.09±0.08 | 8.28±0.14 | 34.6±0.4 | 4.82±0.14 | 1.30±0.05 |
| 41 | 1.78±0.406 | 273±7 | 1270±10 | 179±37 | 763±5 | 198±7 | 1.31±0.02 | 22.7±2.1 | 0.188±0.008 | 0.159±0.029 | 2900±100 | 1.40±0.04 | 0.440±0.007 |
| 42 | 18.3±0.4 | 607±34 | 3260±100 | 1260±40 | 143000±600 | 5180±60 | 117±6 | 1810±90 | 2.71±0.14 | 15.2±0.9 | 20.6±1.0 | 59.9±5.3 | 30.7±1.3 |
| 43 | 2.20±0.76 | 11.9±0.3 | 1100±20 | 1.55±0.04 | 2600±50 | 80.6±1.1 | 33.2±1.3 | 9.47±0.42 | 0.671±0.005 | 3.16±0.05 | 17.3±0.2 | 0.367±0.032 | 0.306±0.012 |
| 44 | 2.40±0.29 | 109±2.6 | 2230±20 | 827±50 | 3380±50 | 274±4 | 46.1±2.3 | 885±11 | 2.98±0.06 | 8.60±0.14 | 44.1±1.3 | 4.31±0.18 | 8.78±0.75 |
| 45 | 1.75±0.15 | 147±4 | 1620±50 | 362±6 | 3690±170 | 3010±340 | 22.3±1.0 | 360±1 | 1.88±0.02 | 6.10±0.31 | 30.8±0.2 | 16.2±2.0 | 3.95±0.16 |
| 46 | 8.21±0.95 | 17.6±1.4 | 1010±10 | 2.09±0.06 | 2500±10 | 88.7±5.0 | 26.9±0.3 | 10.9±0.1 | 0.322±0.003 | 2.27±0.02 | 17.7±0.3 | 0.430±0.01 | 0.235±0.002 |
| 47 | 12.2±1.0 | 3520±40 | 1200±7 | 1.23±0.04 | 9410±50 | 122±8 | 12.8±0.1 | 6.37±0.13 | 0.826±0.007 | 0.603±0.004 | 3.82±0.11 | 0.826±0.05 | 0.420±0.009 |
| 48 | 5.32±0.07 | 1040±30 | 585±2 | 584±11 | 3400±10 | 1340±130 | 73.5±1.7 | 244±6 | 1.23±0.04 | 533±15 | 5620±100 | 9.23±0.23 | 18.8±1.0 |
| 49 | 18.3±1.7 | 664±38 | 1180±100 | 480±48 | 8640±700 | 3730±200 | 61.3±5.3 | 384±25 | 1.68±0.14 | 714±69 | 7670±300 | 21.3±2.0 | 27.8±4.0 |
| 50 | 0.882±0.524 | 78.6±1.5 | 0.469±0.293 | 0.117±0.003 | 5.30±1.59 | 0.763±0.269 | <0.008 | 0.300±0.224 | 0.026±0.005 | <0.008 | <0.03 | <0.008 | <0.05 |
| 51 | 0.824±0.066 | 13.4±0.3 | 8.60±0.16 | 0.325±0.044 | 1.75±0.50 | 18.8±0.2 | 0.438±0.007 | 0.721±0.493 | 0.089±0.026 | <0.008 | 2.84±2.52 | 0.118±0.02 | 0.083±0.003 |
| 52 | 0.143±0.017 | <0.23 | 1.17±0.19 | <0.08 | 2.62±0.20 | 5.03±1.96 | <0.008 | <0.02 | <0.02 | <0.008 | <0.03 | <0.008 | <0.05 |
| 53 | 11.7±0.4 | 81.3±0.9 | 2380±40 | 786±20 | 443±7 | 26300±300 | 2.29±0.05 | 162±5 | 0.664±0.028 | 7.17±0.07 | 2.82±0.05 | 16.1±0.2 | 0.639±0.045 |
| 54 | 33.9±0.1 | 174±2 | 6600±90 | 11.0±0.5 | 7850±80 | 2680±70 | 28.7±0.4 | 115±1 | 0.641±0.001 | 15.2±0.2 | 80.0±2.7 | 13.2±0.3 | 1.38±0.04 |
| 55 | 0.970±0.137 | 4320±50 | 1700±20 | 117±3 | 30800±700 | 2390±30 | 22.2±1.6 | 71.8±4.1 | 0.365±0.133 | 3.38±0.07 | 13.2±0.3 | 5.06±0.01 | 6.55±0.08 |
| 56 | 5.64±0.80 | 3850±80 | 1370±10 | 290±5 | 12000±100 | 2080±30 | 24.7±0.1 | 391±10 | 2.40±0.13 | 7.38±0.14 | 33.4±0.7 | 13.6±0.6 | 5.62±0.29 |
| 57 | 3.05±0.58 | 80.6±3.0 | 1390±100 | 10.5±1.5 | 1450±50 | 133±16 | 11.2±1.0 | 25.5±2.9 | 2.93±0.91 | 4.23±0.46 | 17.8±1.3 | 1.11±0.13 | 1.74±0.28 |
| 58 | 7.49±0.23 | 974±67 | 2580±10 | 1410±40 | 9670±100 | 3040±90 | 160±4 | 1580±20 | 17.8±0.2 | 7.24±0.43 | 18.1±0.4 | 20.9±0.7 | 33.1±0.1 |
| 59 | 25.8±0.8 | 632±3 | 746±12 | 1.42±0.06 | 14300±500 | 322±13 | 2.06±0.07 | 8.25±0.56 | 3.37±0.22 | 12.1±0.1 | 17.5±1.0 | 0.747±0.01 | 0.144±0.007 |

§ 7. Dodatak

viii

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 60 | 3.42±0.07 | 2290±80 | 1100±20 | 25.0±0.4 | 2110±60 | 146±2 | 6.78±0.31 | 47.1±2.8 | 0.605±0.03 | 2.66±0.21 | 13.5±0.4 | 2.60±0.09 | 1.21±0.23 |
| 61 | 4.84±0.88 | 721±12 | 1200±200 | 26.7±0.4 | 1910±210 | 258±14 | 19.2±0.2 | 38.0±0.4 | 0.988±0.012 | 2.18±0.11 | 33.7±0.4 | 0.993±0.041 | 1.12±0.03 |
| 62 | 13.3±0.7 | 82.2±2.0 | 1850±50 | 2.81±0.07 | 11800±400 | 659±24 | 6.72±0.21 | 19.8±3.4 | 0.393±0.071 | 0.317±0.034 | 4.63±0.22 | 4.39±0.22 | 2.13±0.12 |
| 63 | 79.9±0.3 | 4490±30 | 3780±50 | 22800±400 | 5210±100 | 12600±200 | 75.7±1.5 | 6830±170 | 6.97±0.16 | 5.40±0.08 | 20.7±0.39 | 1100±10 | 1490±30 |
| 64 | 3.96±0.42 | 331±12 | 1000±10 | 70.7±1.1 | 2090±20 | 919±15 | 41.1±0.1 | 56.0±0.86 | 0.479±0.013 | 0.280±0.02 | 5.82±0.19 | 6.14±0.03 | 8.21±0.05 |
| 65 | 25.4±0.6 | 241±20 | 3800±20 | 689±6 | 22500±400 | 2690±20 | 368±19 | 496±13.379 | 4.36±0.33 | 9.24±0.40 | 54.3±0.7 | 13.2±0.5 | 19.2±0.2 |
| 66 | 48.0±1.1 | 16600±300 | 5070±40 | 20.6±0.6 | 23800±100 | 6670±160 | 38.1±0.9 | 45.1±0.364 | 0.966±0.016 | 0.849±0.015 | 4.27±0.14 | 59.1±1.7 | 8.62±0.14 |
| 67 | 69.6±1.1 | 5020±170 | 5440±50 | 178±1 | 9310±700 | 18900±500 | 38.8±2.5 | 199±9.332 | 1.29±0.11 | 3.99±0.29 | 12.1±0.9 | 197±14 | 27.5±1.5 |
| 68 | 2.61±0.11 | 29.4±2.1 | 433±42 | 1.56±0.26 | 747±70 | 372±5 | 5.48±0.19 | 7.24±0.354 | 0.0342±0.01 | 0.132±0.008 | 9.96±0.42 | 4.90±0.36 | 1.37±0.07 |
| 69 | 7.79±0.03 | 156±1.2 | 1640±40 | 54.8±0.3 | 4460±110 | 7740±30 | 167±2 | 78.8±0.41 | 0.338±0.017 | 3.48±0.11 | 18.7±0.5 | 30.3±0.9 | 21.5±0.6 |
| 70 | 8.55±2.84 | 2160±780 | 1110±60 | 36.8±8.4 | 10200±600 | 1410±60 | 12.9±4.4 | 401±105.606 | 1.59±0.53 | 2.52±0.87 | 10±3.3 | 3.22±1.08 | 0.675±0.18 |
| 71 | 12.3±0.5 | 401±6 | 688±10 | 5.04±0.68 | 1110±10 | 2420±50 | 4.33±0.05 | 21.4±0.057 | 0.413±0.03 | 0.757±0.037 | 3.44±0.11 | 6.63±0.09 | 0.796±0.05 |
| 72 | 14.8±0.3 | 694±9 | 2950±20 | 37.2±0.2 | 11900±200 | 171±23 | 16.3±0.1 | 33±1.408 | 4.58±0.06 | 4.54±0.07 | 7.60±0.13 | 3.47±0.04 | 1.25±0.07 |
| 73 | 7.30±1.03 | 2850±20 | 491±10 | 4.25±0.31 | 8700±100 | 725±4 | 2.30±0.07 | 5.86±0.097 | 0.143±0.022 | 2.85±0.06 | 4.50±0.11 | 8.83±0.31 | 3.96±0.02 |
| 74 | 8.08±0.18 | 303±1 | 1680±20 | 97.3±4.5 | 4730±40 | 2140±80 | 96.3±0.8 | 101±0.165 | 0.952±0.031 | 1.45±1.37 | 13.5±0.1 | 14.7±0.3 | 19.7±0.2 |
| 75 | 6.88±0.40 | 622±8 | 1360±50 | 291±6 | 2900±20 | 6190±80 | 171±3 | 286±3.667 | 0.404±0.01 | 4.24±0.06 | 5200±60 | 75.7±0.3 | 47.3±0.4 |
| 76 | 71.3±2.7 | 2100±30 | 1440±10 | 40.7±1.3 | 4700±90 | 112000±4000 | 12.0±0.1 | 40±0.569 | 0.340±0.014 | 0.8±0.006 | 2.46±0.07 | 55.4±0.2 | 30.8±0.2 |
| 77 | 96.0±0.7 | 3150±30 | 3580±50 | 228±6 | 647±1 | 256000±4000 | 76.3±0.5 | 459±3.578 | 7.94±0.35 | 2.54±0.03 | 50.5±1.2 | 84.7±0.3 | 31.4±0.3 |
| 78 | 80.7±3.3 | 690±7 | 1150±10 | 599±26 | 20700±200 | 370±15 | 454±11 | 8.61±0.03 | 3.90±0.09 | 2.32±0.117 | 8.19±0.09 | 2.76±0.06 | 7.09±0.08 |
| 79 | 61.4±6.0 | 82.0±2.9 | 67.6±0.7 | 3.53±0.04 | 644±17 | 68.9±15 | 0.310±0.03 | 3.46±0.14 | 0.046±0.004 | 0.177±0.047 | 0.090±0.048 | 0.277±0.042 | 0.061±0.004 |
| 80 | 16.5±0.8 | 35.0±1.4 | 134±1 | 1.28±0.01 | 1950±50 | 458±1 | 2.07±0.01 | 3.33±0.09 | 0.111±0.008 | 0.185±0.006 | 1.56±0.33 | 0.965±0.017 | 0.384±0.01 |

§ 7. Dodatak**viii**

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|----------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 81 | 7.57±0.09 | 1590±10 | 1090±10 | 40.3±0.8 | 2400±100 | 1330±10 | 74.5±1.2 | 18500±200 | 0.826±0.084 | 1.24±0.031 | 13500±200 | 5.10±0.02 | 2.95±0.04 |
| 82 | 2.26±0.19 | 8040±30 | 1280±7 | 80.4±0.5 | 164±1 | 862±20 | 31.2±0.1 | 2780±10 | 0.269±0.01 | 0.637±0.006 | 6490±10 | 4.85±0.07 | 1.64±0.02 |
| 83 | 2.34±0.01 | 291±10 | 984±70 | 56.3±8.5 | 1400±50 | 265±16 | 3.00±0.13 | 33.4±3.0 | 0.150±0.015 | 0.159±0.001 | 0.270±0.03 | 0.919±0.016 | 0.187±0.008 |
| 84 | 15.0±0.6 | 532±8 | 983±5 | 200±1 | 3660±10 | 2880±30 | 12.0±0.1 | 163±2 | 1.13±0.03 | 2.99±0.174 | 6.95±0.15 | 18.8±0.1 | 4.53±0.02 |
| 85 | 34.2±2.5 | 2170±140 | 3850±20 | 1790±60 | 17300±900 | 10400±400 | 84.5±8.7 | 2500±100 | 6.37±0.32 | 35.7±2.493 | 23.0±1.2 | 104±4 | 48.2±3.3 |
| 86 | 5.42±1.85 | 30.3±1.8 | 1320±70 | 173±20.736 | 20.7±0.5 | 166000±1000 | 5.69±0.04 | 244±6 | 0.591±0.014 | 0.355±0.002 | 4.10±0.05 | 52.7±1.0 | 0.831±0.04 |
| 87 | 22.1±1.2 | 9.44±0.27 | 76.7±1.7 | 0.757±0.011 | 563±15 | 20.3±8.2 | 0.168±0.008 | 0.463±0.009 | 0.207±0.005 | 0.344±0.023 | 0.536±0.009 | 0.010±0.004 | <0.05 |

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Anica Benutić
Datum rođenja: 22. ožujka 1962.
Mjesto rođenja: Livno, BiH

Obrazovanje

2000. Magistarski studij biotehničke znanosti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, polje: biotehnologija u okviru studija biokemijsko inženjerstvo. Magistarski rad na temu „Priprava i biološka aktivnost nekih Schiffovih baza i benzimidazola“ izrađenim pod mentorstvom prof. dr. sc. Vladimira Rapića
1985. Studij prehrambene tehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad „Organski derivati arsena u nekim ribama i lignjama Kvarnerskog zaljeva“ izrađenim pod mentorstvom prof. dr. sc. Miroslave Fišter
1980. opća gimnazija u Livnu

Radno iskustvo

- 2009 - Voditelj Odsjeka za metale i metaloide i Nacionalnog referentnog laboratorija za metale i dušikove spojeve, Služba za zdravstvenu ekologiju, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Zagreb
- 1994 - 2009 Stručni suradnik u Odsjeku za metale, Služba za zdravstvenu ekologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Zagreb
- 1991 - 1992 Stručni suradnik u Odsjeku za metale, Služba za zdravstvenu ekologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Zagreb
- 1989 - 1991 Mladi istraživač, Zavod za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Sveučilišta u Zagrebu

1987 - 1989 Sanitarni inspektor u Sanitarnoj inspekciji Općine Maksimir, Zagreb

Nastavne aktivnosti:

1989 - 1991 Sudjelovanje u praktičnoj nastavi u okviru kolegija Organska kemija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu

Članstvo: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa

Stručno usavršavanje:

2010. Study visit on official controls on mycotoxins and heavy metals for laboratory workers from Croatia, The Hague, Netherlands
2004. Workshop on Sample Preparation and Homogenisation for Food and Feed Analysis, Geel
2002. Food Safety First, Noordwijkerhout

Sudjelovanje u izradbi znanstveno-istraživačkih projekata:

- 2020 - 2025 “Istraživanje paleoklimatske varijabilnosti visoke rezolucije pomoću posrednih pokazatelja u sigama iz Nove Grgosove spilje“, Hrvatska zaklada za znanost, Voditelj projekta dr. sc. Petra Bajo Hrvatski geološki institut.
- 2020 - 2023 „Clean label“ – razvoj linije mesnih prerađevina bez aditiva”, IRI2, PIK Vrbovec
- 2007 - 2010 Oligoelementi u biološkim matricama i kontrola kvalitete multielementnih profila, (022-0222412-2403), Voditelj: Nikola Ivičić, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb,

Poveznica na CROSBİ profil: <http://bib.irb.hr/lista-radova?autor=169724>

Matični broj istraživača: 169724

Izvorni znanstveni radovi

- 1 A. Benutić, B. Marciuš, Ivan Nemet i Sanda Rončević, Chemometric classification and discrimination of herbal dietary supplements based on ICP-MS elemental profiling, *J Food Compost Anal*, 114 (2022) 104794.
- 2 A. Sulimanec Grgec, J. Jurasović, Z. Kljaković-Gašpić, T. Orct, I. Rumora Samarin, T. Janči, A. Sekovanić, J. Grzunov Letinić, M. Matek Sarić, A. Benutić, K. Capak i M. Piasek, Potential risks and health benefits of fish in the diet during the childbearing period: Focus on trace elements and n-3 fatty acid content in commonly consumed fish species from the Adriatic Sea, *Environ Adv*, **8** (2022) 100226.
- 3 S. Rončević, A. Benutić, I. Nemet i B. Gabelica, Tin Content Determination in Canned Fruits and Vegetables by Hydride Generation Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (HG-ICP-OES), *Int. J. Anal. Chem.* **2012** (2012) 1-7.
- 4 I. Šutej, K. Peroš, A. Benutić, K. Capak, K. Bašić, K. Rošin-Grget, Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking, *Oral Health & Prev Dent.* **10** 4 (2012) 397-403.

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

- 1 Benutić, J. Pongračić, I. Nemet i R. Vazdar, Određivanje anorganskih specija arsena u hrani metodom ETAAS uz *in situ* iridijevu stupicu // Knjiga sažetaka / 25. *Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem*”, Šantić, Ana; Đaković, Marijana (ur.). Zagreb, 2017. (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
- 2 A. Benutić, N. Janev Holcer, J. Jurasović i S. Rončević, Method development for the determination of selenium in herbal supplements by hydride generation ETAAS // *J Trace Elem Med Biol*, Abstracts XI ISTERH Conference, Recent Advances in Trace Element Research in Health and Disease / Jurasović, Jasna; Aschner, Michael (ur.). Amsterdam: Elsevier, 2015. 8-8.
- 3 I. Blažević, I. Nemet, A. Benutić, P. Vrhovnik i S. Rončević, Sensitive Determination of Pb in Adipose Tissue Using Dithizone with Micellar Media // *J Trace Elem Med Biol*, Abstracts XI ISTERH Conference, Recent Advances in Trace Element Research in Health and Disease / Jurasović, Jasna ; Aschner, Michael (ur.). Amsterdam: Elsevier, 2015. 9-9 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 4 I. Nemet, T. Hudina, S. Rončević, B. Mitić, A. Benutić, Spektrometrijska elementna analiza u kontroli kakvoće namirnica // *Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera (23; 2013; Osijek)*/ Hadžiev, Andrea; Blažeković, Zdenko (ur.). Zagreb: Hrvatsko kemijsko društvo, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2013. 82-82 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

- 5 A. Benutić, A. Lulić (Sekovanić), J. Pongračić i J. Jurasović, Procjena izloženosti hrvatskih potrošača toksičnim elementima uzimanjem dodataka prehrani // *Zbornik sažetaka, 1. hrvatski kongres zdravstvene ekologije (35. stručni skup) s međunarodnim sudjelovanjem* / Haberle, Vjera ; Pollak, Lea (ur.). Zagreb, 2011. 117 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
- 6 A. Lulić (Sekovanić), A. Benutić, T. Orci i J. Jurasović, Metals in dietary supplements: ICP-MS determination and evaluation of population exposure to toxic metals // *Book of Abstracts / European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2011.* / Castillo, Juan R. (ur.). Zaragoza, 2011. 264-264 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 7 I. Šutej, K. Peroš, A. Benutić, K. Capak i K. Rošin-Grget, Salivary flow, pH and calcium concentration in the saliva of tobacco smokers // *Periodicum biologorum* / Vitale, Branko (ur.). Zagreb: Hrvatsko prirodoslovno društvo, 2010. 112-112 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 8 R. Momčilović, J. Prejac, D. Veber, N. Ivičić, J. Pongračić, A. Benutić, G. I. Lykken i B. Momčilović, The elementome matrix map for a complex contextual interactions in the human whole blood // *13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals: Trace elements from the andes to the world* : abstracts, Pucon, 2008. str. 184-185 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)