

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Dario Paler

**Multielementna analiza ledenog čaja i kombuche
dostupnih na hrvatskom tržištu primjenom rendgenske
fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom:
zelena analitička metoda, rizici, ekološki otisak i
održiva rješenja**

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Jablan i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Rad je ostvaren korištenjem opreme koja je nabavljena kroz infrastrukturni projekt “Jačanje znanstveno-istraživačkih i inovacijskih kapaciteta Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (FarmInova, KK.01.1.1.02.0021)”. Projekt je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (European Regional Development Fund).

POPIS KRATICA

- AAS** (eng. Atomic Absorption Spectrometry) – Atomska apsorpcijska spektrometrija
- AGREE Calculator** (eng. The Analytical Greenness Calculator) – Kalkulator procjene stupnja primjene principa zelene analitičke kemije za odabrani analitički postupak
- AHFES** (eng. Atlantic Area Healthy Food Eco-System) – Projekt zemalja atlantske regije Europske unije za ekosustave zdrave hrane
- AOAC** (eng. The Association of Official Analytical Chemists) – Udruga službeno priznatih analitičkih kemičara
- CA** – (lat. Codex Alimentarius, eng. International Food Standards) – Zbirka međunarodnih standarda za hranu
- CRM** (eng. Certified Reference Material) – Certificirani referentni materijal
- EDXRF** (eng. Energy Dispersive X-Ray Fluorescence) – Energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija
- EU** (eng. European Union) – Europska Unija
- FAAS** (eng. Flame Atomic Absorption Spectrometry) – Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija
- FAO** (eng. Food and Agriculture Organization) – Organizacija za hranu i poljoprivredu
- FFC** (eng. Functional Food Center) – Centar za funkcionalnu hranu
- FSS** (eng. Food Safety Systems) – Sustav sigurnosti hrane
- GC** (eng. Green Chemistry) – Zelena kemija
- GF-AAS** (eng. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) – Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći
- GMP** (eng. Good Manufacturing Practice) – Dobra proizvođačka praksa
- GV** (eng. Guideline Value) – Vrijednost smjernice Svjetske zdravstvene organizacije za dozvoljenu količinu elementa u vodi za piće
- HCA** (eng. Hierarchical cluster analysis) – Hijerarhijska klusterska analiza
- ICP-MS** (eng. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) – Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu
- ICP-OES** (eng. Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) – Optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu
- LOD** (eng. Limit of detection) – Granica dokazivanja
- LOQ** (eng. Limit of quantification) – Granica određivanja

OIV (eng. International Organisation of Vine and Wine) – Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino

PMTDI (eng. Provisional Maximum Tolerable Daily Intake) – Vrijednost maksimalnog prihvatljivog dnevnog unosa koja je trenutno na snazi

PCA (eng. Principal Component Analysis) – Analiza glavnih komponenti

RfD (eng. Reference Dose) – Referentna doza

TDI (eng. Tolerable Daily Intake) – Prihvatljiv dnevni unos

TUIL (eng. Tolerable Upper Intake Level) – Gornja vrijednost preporučenog unosa

TXRF (eng. Total X-Ray Fluorescence Spectrometry) – Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom

UNESDA (eng. Union of European Soft Drinks Associations) – Udruženje europskih proizvođača bezalkoholnih pića

USEPA (eng. United States Environmental Protection Agency) – Agencija Sjedinjenih Američkih Država za zaštitu okoliša

WHO (eng. World Health Organisation) – Svjetska zdravstvena organizacija

1.	UVOD	1
1.1.	Hrana i piće	1
1.2.	Elementi	2
1.3.	Bezalkoholna pića	2
1.4.	Ledeni čaj	4
1.5.	Kombucha	5
1.6.	Analitičke tehnike	6
1.6.1.	Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)	7
1.6.2.	Zelena kemija i primjena TXRF	8
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	12
3.	MATERIJALI I METODE	14
3.1.	Kemikalije	14
3.2.	Pribor i instrumenti	14
3.3.	Uzorci	14
3.4.	Instrumentalne tehnike	15
3.4.1.	TXRF	15
3.4.2.	Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)	16
3.5.	Priprema uzoraka za TXRF analizu	17
3.6.	Priprema radnih otopina za ICP-MS	19
3.7.	Statistička analiza	19
3.8.	AGREE Calculator	20
4.	REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1.	Evaluacija TXRF metode	21
4.2.	Elementni sastav u uzorcima ledenog čaja i kombuche	22
4.3.	Ekološki otisak korištenih instrumentalnih tehnika analize	30
4.4.	Procjena usklađenosti sadržaja elemenata analiziranih uzoraka sa zahtjevima smjernica za kakvoću pitke vode	32
4.5.	Procjena dnevnog unosa elementa	34
4.6.	Multivarijatna analiza	36

4.6.1.	Pearsonova korelacijska matrica	37
4.6.2.	Analiza glavnih komponenti (PCA).....	38
4.6.3.	Hijerarhijska klasterska analiza (HCA)	43
5.	ZAKLJUČAK.....	46
6.	ZAHVALE	47
7.	POPIS LITERATURE.....	48
8.	SAŽETAK.....	57
9.	SUMMARY.....	58
10.	ŽIVOTOPIS.....	59

1. UVOD

1.1. Hrana i piće

Zdravlje i kvaliteta ljudskog života uvelike ovise o kvaliteti hrane koju svakodnevno konzumiramo. Kvaliteta hrane i pića uključuje sve karakteristike koje utječu na vrijednost proizvoda kako pozitivne kao što su izgled, podrijetlo, tekstura, okus i nutritivni sadržaj, tako i one negativne kao što su nečistoće, promjena boje, neugodni mirisi i kvarenje. Svaka od ovih karakteristika ima utjecaj na kvalitetu samog proizvoda, a time i na njenu vrijednost kako za proizvođača tako i za potrošača. Definicija kvalitete hrane je globalna i uzima u obzir proizvodnju, njezin utjecaj na zdravlje potrošača, uključujući hranjive tvari i sastav. Prehrambena industrija implementira zahtjeve kvalitete sustava za sigurnost hrane (eng. Food Safety Systems, FSS) kako bi izbjegla defektne proizvode i s njima povezane troškove, sigurnosne i zdravstvene probleme takvih proizvoda te pritužbe potrošača. U tom smislu pojam kvalitete možemo korelirati s usklađenosti s namjenom proizvoda, sigurnosti te ispunjenju očekivanja i percepcije potrošača. Standardi kvalitete ključni su na europskom tržištu kako bi se ispunili regulatorni zahtjevi te zahtjevi potrošača (Kafetzopoulos i Gotzamani, 2014).

Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu (eng. Food and Agriculture Organization, FAO) i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. World Health Organisation, WHO) sigurnost hrane odnosi se na sve opasnosti, kronične ili akutne, koje hranu mogu učiniti štetnom za zdravlje potrošača (FAO/WHO, 2003). Zakon o hrani Europske Unije (eng. European Union, EU) regulira sadržaj hrane, sastojke, opis proizvoda, kemijsku sigurnost, sanitarne uvjete, higijenske i druge specifikacije proizvoda. Regulativa onečišćenja temelji se na znanstvenim dokazima i načelu održavanja razine zagađivača na najnižoj mogućoj razini primjenom dobre proizvođačke prakse (eng. Good Manufacturing Practice, GMP). Radi zaštite javnog zdravlja utvrđene su maksimalne razine za specifične kontaminante, uključujući teške metale. Kontaminacija okoliša teškim metalima prepoznata je kao opasnost za javno zdravlje diljem svijeta (Tchounwou i sur., 2012). Opća populacija izložena je velikom broju kontaminanata kao što su metali putem konzumacije hrane, pića, vode. Smatra se da je prehrana (hrana, piće i voda) glavni način izlaganja metalima (FAO/WHO, 1989; Yusà i Pardo, 2015).

Hrana je glavni izvor esencijalnih, glavnih i elemenata u tragovima. Određivanje elemenata u uzorcima hrane i pića od velikog je interesa za društvo jer daje informacije o nutritivnom sastavu, omogućuje izradu tablica sastava hrane te prati koncentraciju toksičnih tvari (Mandlate i sur., 2017). Zbirka međunarodnih standarda za hranu (lat. Codex Alimentarius, eng.

International Food Standards, CA) i Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 utvrđuje maksimalne razine za potencijalno otrovne elemente u hrani i piću (Europska komisija, 2006; FAO/WHO, 2019). Elementna analiza ima veliki značaj u prehrambenoj industriji, kako s prehrambenog stanovišta tako i u svrhu kontrole sigurnosti i kvalitete.

1.2. Elementi

Elementi imaju značajnu ulogu u funkcioniranju ljudskog organizma vezano za metaboličke procese koji doprinose održavanju fizičkog zdravlja. Ipak, u slučajevima prekomjernog unosa mogu imati štetne posljedice po ljudsko zdravlje (Martins i sur., 2020).

Prema klasifikaciji koju su predložili De la Guardia i Garrigues (2015) elementni sastav hrane uključuje: glavne esencijalne elemente, Ca, Cl, C, H, Mg, N, O, P, K, Na, S; esencijalne elemente u tragovima, F, I, Fe, Si, Zn; esencijalne elemente u ultra-tragovima, Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V; neesencijalne elemente u tragovima, B, Ti, Sb, As, Ba, Ce, Ge, Rb, Sr; i potencijalno toksične elemente u tragovima; Al, As, Sb, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Th, Sn, U. Elementi u tragovima uobičajeno su definirani kao minerali potrebni u količini od 1 do 100 mg/dnevno za odraslu osobu ili oni koji sačinjavaju manje od 0,01% ukupne tjelesne mase. Vrlo rijetki elementi potrebni su u količinama manjim od 0,001 mg/dnevno. Glavni tzv. makro elementi su obično prisutni u većim količinama (%), dok elementi u tragovima i ultra-tragovima imaju širok raspon koncentracija od ppm do ppb (De la Guardia i Garrigues, 2015).

S obzirom da su pojedini elementi neophodni za funkcioniranje ljudskog organizma te njihov nedostatak, a u nekim slučajevima i višak, može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme, dok su pojedini elementi štetni, čak i u vrlo malim količinama (Lukaski i Penland, 1996; Viteri i Gonzalez, 2002), danas, većina industrijskih analitičkih laboratorija pridaje važnost multielementnoj analizi proizvoda koji su dostupni na tržištu kako bi se osigurala kvaliteta tih proizvoda i izbjegli potencijalni štetni učinci na ljudsko zdravlje. Osim toga, od velike je važnosti odrediti koncentracije metala u namirnicama kako bi se izračunala izloženost hranom i putem pića potrebna za procjenu mogućeg rizika povezanog s konzumacijom hrane i pića.

1.3. Bezalkoholna pića

Jedan od najstarijih i najkonzumiranijih bezalkoholnih napitaka je čaj, koji se izvorno pripremao kao infuz lišća biljke čajevac, vrsta *Camellia sinensis* L., a koja prema načinu obrade, sušenja i/ili fermentacije ubranih listova, na tržištu dolazi kao zeleni, crni i oolong čaj (Preedy,

2013). Danas se na tržištima mogu naći mnoge vrste, poput biljnih čajeva, ledenih čajeva s dodanim okusima (poput limuna, breskve, bobičastog voća i dr.), kombuche. Proizvode se od mineralne vode pomiješane sa šećerom ili ekstraktima zaslađivača sintetiziranih voćnih aroma kao što su guarana, naranča, limun, jabuka, marakuje i dr.

Sve ove vrste bezalkoholnih pića se smatraju značajnim izvorom hranjivih tvari poput minerala, vitamina, aminokiselina i antioksidansa kao što su primjerice polifenoli (Schmite i sur., 2019; Szymczycha-Madeja i sur., 2020). Uslijed zabrinutosti o utjecaju prehrane na zdravlje, potrošnja proizvoda s hranjivim sadržajem se posljednjih godina značajno povećala (Behrens i Silva, 2004). Njihova se konzumacija obično povezuje s prevencijom srčanih bolesti, raka kože te smanjenjem razine kolesterola (Jin i sur., 2005). Danas, važnost mjerenja metala prisutnih u bezalkoholnim pićima očituje se u nutritivnom smislu te u svrhu procjene kvalitete i procjene omjera koristi i rizika konzumacije za potrošače (Marguí i sur., 2022).

Prisutnost elemenata u tragovima u ovoj vrsti bezalkoholnih pića najčešće potječe iz tla, onečišćenja okoliša, vode korištene za navodnjavanje, metalne opreme korištene u industrijskom proizvodnom procesu (Milani i sur., 2020). Taj proces zajedno s ambalažom i dodanim aditivima manje je značajan za količinu metala, a veću ulogu ima sirovina korištena za izradu pića (Silva i sur., 2019). Kontaminacija sirovine može biti rezultat zagađenja tla gnojivom i pesticidima, atmosfere, podzemnih i površinskih voda.

U literaturi su opisani različiti slučajevi toksičnih efekata pojedinih elemenata. Prijavljeni su slučajevi trovanja alkoholnim pićima, likerima i jabukovačom koji su dugo vremena čuvani u keramičkim posudama obojanim lakovima koji su sadržavali Pb. Konzumacija piva koja je sadržavala dodani kobaltov sulfat, stabilizator pjene, jedan je od prvih prepoznatih slučajeva trovanja s Co u Sjedinjenim Američkim Državama između 1950-tih i 1970-tih. Co može izazvati alergijski kontaktni dermatitis, astmu, smanjenu plodnost, gubitak memorije, hepatotoksičnost (Scutarașu and Trincă, 2023). Toksičnost Zn uslijed pretjeranog unosa može dovesti do anemije, letargija, neuravnoteženosti elektrolita, mučnine (Bingöl i sur., 2010). Ni te Sr, već u malim količinama, ispoljavaju toksične efekte kroz gastrointestinalne i neurološke poremećaje te u karcinomima (Milani i sur., 2020). Podaci iz studija slučajeva gastrointestinalnih bolesti izazvanih Cu iz kontaminirane vode ili pića pokazuju da, pri nižim dozama, Cu može uzrokovati simptome tipične za trovanje hranom, kao što je glavobolja, mučnina, povraćanje, proljev (World Health Organization, 2011).

1.4. Ledeni čaj

Ledeni čaj svrstava se u kategoriju negaziranih bezalkoholnih pića. U ljetnim mjesecima popularna je zamjena za klasični čaj pripremljen kao infuz različitih biljaka, najčešće biljke čajevac (Preedy, 2013). U Sjedinjenim Američkim Državama 75% ukupne konzumacije čaja otpada upravo na ledeni čaj (Weisburger, 1997). Prosječni Portugalac godišnje popije 26 litara ledenog čaja, dok prosjek Europe iznosi 6 litara godišnje (Ferreira da Costa, 2015). Ipak, Švedska je država s najvećom konzumacijom ledenog čaja – 39 litara po glavi stanovnika godišnje (Fabijanić, 2020). U Brazilu proizvodnja, posljedično i konzumacija na tržištu ledenog čaja pokazuje progresiju (Milani i sur., 2020). Projekt atlantskih zemalja Europske unije za ekosustave zdrave hrane (eng. Atlantic Area Healthy Food Eco-System, AHFES) iznosi podatak da je prosječna godišnja stopa rasta broja novih proizvoda ledenog čaja na tržištu Francuske, Irske, Portugala, Španjolske i Velike Britanije, u razdoblju 2016. – 2020. iznosila 15,7% (AHFES, 2021). Udruženje europskih proizvođača bezalkoholnih pića (eng. Union of European Soft Drinks Associations, UNESDA) donosi podatak da je u Hrvatskoj konzumacija bezalkoholnih pića porasla za 33,4%, sa 68,5 L po stanovniku u 2016. godini na 91,4 L po stanovniku u 2023. godini. Stoga je za pretpostaviti da je došlo i do porasta konzumacije ledenog čaja (UNESDA, 2023).

U najvećem postotku ledeni čaj sadržava vodu što ju čini osnovnom sirovinom. Od prirodnih sladila najčešće je prisutan šećer saharoza, a sve su popularnije zamjene za šećere (šećerni polioli) u pićima koja nose oznaku „light“. Prisutnost umjetnih sladila, na primjer saharina, rjeđe je zabilježena (Holly Strawbridge, 2020). Kvaliteta napitka ovisi o kvaliteti i vrsti čaja, ali i o geografskom podrijetlu, tehnologiji izrade te drugim faktorima (Čížková i sur., 2008). Osim dodatka određene količine ekstrakta čaja, korištenim sirovinama pripadaju arome i regulatori kiselosti. Prirodne arome dobivene su iz biljnih sirovina, a umjetne sintetskim putem. Arome po svom kemijskom sastavu spadaju u alkohole, karboksilne kiseline, estere, aldehide, ketone. Svrha regulatora kiselosti je podesiti ili održavati željenu pH vrijednost. U upotrebi su limunska, jabučna i mliječna kiselina. Askorbinska kiselina, osim kao regulator kiselosti, jedan je od glavnih antioksidansa za sprječavanje oksidacijskih procesa u hrani i piću te je stoga u širokoj primjeni u prehrambenoj industriji ledenih čajeva (Jongen, 2002).

Određene države propisuju u zakonskoj regulativi i direktivama zahtjeve za kvalitetom proizvoda na bazi čaja. Primjerice Njemačka i Austrija donose zahtjev da bi količina ekstrakta čaja u takvim proizvodima trebala biti minimalno 1,2 g/L. S druge strane, Češka i Slovačka

nemaju sličnih zahtjeva osim prisutnosti ekstrakta čaja (Čížková i sur., 2008). U Pravilniku o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namjenjenim za konzumaciju nisu zabilježeni slični zahtjevi za proizvode na bazi čaja na hrvatskom tržištu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2009).

1.5. Kombucha

Kombucha je tradicionalno piće azijskih krajeva koje se dobiva fermentacijom zaslađenog crnog čaja. U pripremi se sve češće koriste i drugi čajevi. Smatra se da terapijski istraživana antioksidativna, antimikrobna, antikarcinogena djelovanja potječu od produkata fermentacije kao što su mikronutrijenti, organske kiseline, polifenoli, aminokiseline te octene i mliječne bakterije (Coelho i sur., 2020). Kombucha je često klasificirana kao funkcionalno piće. Najsveobuhvatnija definicija funkcionalnog pića predložena je od strane Centra za funkcionalnu hranu (eng. Functional Food Center, FFC). Funkcionalna hrana i piće predstavlja prirodnu ili procesuiranu hranu koja sadrži biološki aktivne supstance koje u definiranim efektivnim i netoksičnim količinama pružaju dokumentiran ili klinički dokazan zdravstveni benefit kroz specifične biomarkere, sa svrhom optimizacije zdravlja, smanjenja rizika kroničnih bolesti i kontrole njihovih simptoma (Kim i Adhikari, 2020).

Redovita konzumacija ovih napitaka može doprinijeti dnevnim prehrabnim potrebama nekih od ovih elemenata (Xie i sur., 1998). Iako su bezalkoholna pića na bazi čaja izvori makro i mikroelemenata, povezuju se sa zdravstvenim problemima, poput gubitka kalcija u organizmu, što može utjecati na kosti. Osim elemenata u tragovima kao što su Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Se i Zn koji su neophodni za ljudsku prehranu, neki elementi u tragovima s neesencijalnom ulogom također se mogu naći u napitcima od čaja. Ovi spojevi poznati su kao anorganski kontaminanti, kao što su Al, As, Cd, Li, Ni, Pb, Sb, Sn i Sr i mogu izazvati toksične učinke čak i u vrlo malim količinama, što uključuje rak, gastrointestinalne i neurološke poremećaje (Milani i sur., 2016; Zhang i sur., 2018). Ove napitke široko konzumiraju ljudi svih dobnih skupina, pri čemu su djeca osjetljivija na učinke neesencijalnih elemenata u tragovima koji mogu biti prisutni u hrani (FAO/WHO, 2017). Njihove maksimalne dopuštene razine utvrđene su diljem svijeta (European Commission, 2008).

1.6. Analitičke tehnike

U okviru tehnika/metoda za rutinsko praćenje sadržaja elemenata, udruženje analitičara (eng. Association of Analytical Communities, AOAC) razvilo je standardne zahtjeve za izvedbe metoda za teške metale u hrani i pićima kako bi se osiguralo pouzdano praćenje putem rutinskih kontrola (AOAC, 2013). Definirane su potrebne vrijednosti za analitički raspon koncentracija, granicu određivanja (LOQ), ponovljivost, obnovljivost, i iskorištenje bez obzira na primijenjenu analitičku tehniku (Farooq i sur., 2008). Slično, Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (eng. International Organisation of Vine and Wine, OIV) postavlja standarde te smjernice u proizvodnji vina u dokumentima *International Code of Oenological Practices* i *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* (International Organisation of Vine and Wine, 2023). Spektroskopske tehnike kao što su spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (eng. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) (Ye i sur., 2017), optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (eng. Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP-OES) (Fernández i sur., 2002), plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS) (Szymczycha-Madeja i sur., 2015) i atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći (eng. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, GF-AAS) (Ashenef, 2014; Szymczycha-Madeja i sur., 2012) su najčešće korištene tehnike za elementnu analizu pića.

Međutim, korištenje ovih tehnika obično zahtijeva kompleksne postupke pripreme uzoraka što podrazumijeva potpuno uklanjanje organskog matriksa različitim postupcima uz primjenu štetnih kemikalija. Digestija uzorka kritičan je korak u većini analitičkih metoda koje se koriste za rutinsko određivanje elemenata u različitim uzorcima. Metode suhog pepeljenja i mokre digestije najčešće su korišteni postupci u tu svrhu (Akinyele i Shokunbi, 2015). Obje metode zahtijevaju puno vremena i česti su gubici analita otparavanjem. Alternativno, mikrovalne pećnice koriste se u zatvorenim sustavima kako bi se omogućila brža i učinkovitija digestija uzorka, kako bi se smanjila količina korištenih reagensa i kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka i gubici analita otparavanjem. Tijekom kontrole kvalitete u industrijskim laboratorijima uobičajeno je uključena analiza velikog broja uzoraka, a koja za posljedicu ima upotrebu velikih količina reagensa te generiranje velike količine otpada.

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (eng. Total X-Ray Fluorescence Spectrometry, TXRF) je tehnika za elementnu analizu koja je nedavno postala vrlo atraktivna u području okoliša i hrane. TXRF ima nekoliko prednosti u odnosu na tehnike

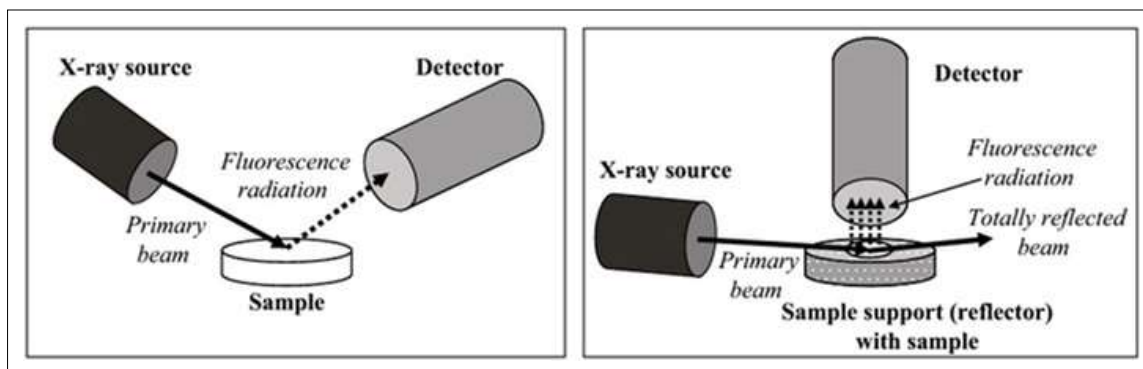
atomske apsorpcijske spektrometrije (eng. Atomic Absorption Spectrometry, AAS) i tehnike temeljene na induktivno spregnutoj plazmi: i) potrebna je samo mala količina uzorka (nekoliko ng ili μL) i kemikalija za analizu uzorka, ii) smanjen je utjecaj matrice, iii) postupak pripreme uzorka je brži, a postoji mogućnost izvođenja i izravne analize, iv) kratko vrijeme mjerenja (100 -1000 s) je potrebno za simultanu više-elementnu analizu. Također, različiti metali mogu se kvantificirati u jednom jedinom mjerenju, dok kalibracijske krivulje nisu nužne jer se kvantifikacija elemenata može provesti korištenjem unutarnjeg standarda. Nadalje, komercijalni dostupni sustavi ne trebaju plinove ili vodu za hlađenje, što omogućuje vrlo jednostavno postavljanje instrumenata i smanjenje troškova održavanja (Klockenkämper i sur., 1992; Varga i sur., 1999).

Danas postoji sve veća potražnja za metodama koje podrazumijevaju manje ili nimalo prethodne obrade uzorka za više elementnu analizu uzoraka prehrambenih proizvoda, osobito na rutinskoj osnovi.

1.6.1. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) snažan je analitički alat s obzirom na mogućnost detekcije širokog raspona elemenata, jednostavnost kvantifikacije i niske granice detekcije. TXRF ima sposobnost detekcije gotovo svih elemenata periodnog sustava, od B do U. Mogu se detektirati čak i elementi s velikim atomskim brojem (Z). Kvantitativno, dinamički raspon pokriva nekoliko redova veličine od ultra targova pa sve do većih koncentracija elemenata.

TXRF je geometrijska modifikacija konvencionalne energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije (eng. Energy Dispersive X-Ray Fluorescence, EDXRF) koja dovodi do značajnog poboljšanja granica dokazivanja (eng. Limit of detection, LOD) (Borgese i sur., 2014). Razlikuje se od EDXRF u upadnom kutu rentgenske zrake. Kut manji od $0,1^\circ$ potreban je kod TXRF kako bi došlo do potpune refleksije zrake na reflektoru dok kod EDXRF upadni kut je od 45° (Slika 1).



Slika 1. Instrumentalne postavke za konvencionalni EDXRF (lijevo) i TXRF (desno). Preuzeto iz (Klockenkämper i sur., 1992).

TXRF tehnika može se koristiti za multielementnu analizu različitih vrsta uzoraka. Prvenstveno se koristi za kemijsku mikro analizu i analizu elemenata u tragovima. Za ove namjene, male količine, otopine, suspenzije ili čvrste tvari, stavljaju se na optičke ravne reflektore (nosač uzorka), najčešće kvarcno staklo, te osuše u tanki sloj. Za uspješnu analizu, masa uzorka ne smije premašiti nekoliko μg uzorka koji treba biti nanešen u tankom sloju na nosač uzorka (oko 10–15 μm debljine) kako bi se omogućilo prodiranje primarne zrake kroz uzorak za potpunu refleksiju na površini podloge. Nakon toga, osušeni ostatak se mjeri u spektrometru s energetski disperzivnim detektorom postavljenim nekoliko milimetara iznad površine reflektora. Većina upadnog zračenje se reflektira i, kao posljedica, spektralna pozadina je smanjena. Na taj način prinos fluorescencije je vrlo visok i apsorpcijski učinci minimizirani. Učinci matrice su zanemarivi ako su zahtjevi za tanki film ispunjeni. Ove karakteristike dopuštaju bolje granice detekcije (10^{-7} do 10^{-12} g) u usporedbi s onima konvencionalnih EDXRF.

1.6.2. Zelena kemija i primjena TXRF

Zelena kemija (eng. Green Chemistry, GC) pojavila se 1990-ih kao način na koji se vještine, znanje i talenti kemičara mogu koristiti za izbjegavanje prijatnji ljudskom zdravlju i okolišu u svim vrstama kemijskih procesa. Jedno od najaktivnijih područja istraživanja i razvoja zelene kemije je razvoj analitičke metodologije. Posljednjih godina napori su usmjereni prema novim tehnikama/metodama koje osiguravaju jednostavnu, brzu, pouzdanu i jeftinu kvantitativnu analizu, te koje su u skladu s načelima zelene i održive analitičke kemije, smanjuju i eliminiraju upotrebu kao i stvaranje opasnih tvari kroz sve aspekte životnog ciklusa kemijske analize. Zelena kemija je inovativan i važan pristup prema postizanju održivosti. Može se definirati kao dizajn, razvoj i implementacija kemijskih procesa i proizvoda u svrhu smanjenja produkcije i korištenja supstanci opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš (Tablica 1). Njezina važnost nije više

orijentirana samo na održivost okoliša, već i na socijalne te ekonomske pozicije (Silvestri i sur., 2021).

Zelene tehnike/metode mogu biti korisne kako za elementnu analizu gotovih proizvoda, tako i za kontrolu uzoraka tijekom proizvodnog procesa. Poželjne značajke korištenja ovih tehnika/metoda za kontrolu kvalitete potrošačkih proizvoda uključuju minimalnu obradu uzorka, visok broj istovremeno analiziranih uzoraka i odgovarajuću specifičnost i osjetljivost za praćenje elemenata od interesa pri očekivanim razinama koncentracije.

Tablica 1. Temeljni principi zelene kemije i zelene analitičke kemije. Preuzeto i prilagođeno prema (Mejías i sur., 2023).

12 PRINCIPA ZELENE KEMIJE	12 PRINCIPA ZELENE ANALITIČKE KEMIJE
Prevenција	Trebaju se primjenjivati izravne analitičke tehnike kako bi se izbjegla suvišna obrada uzorka
Pretvorba reaktanata u produkte sa što većim iskorištenjem reakcije	Ciljevi su minimalna količina uzorka i minimalan broj uzoraka
Manje opasne kemijske sinteze	Mjerenja bi se trebala provoditi <i>in situ</i>
Dizajniranje sigurnijih kemikalija	Integracija analitičkih procesa i operacija štedi energiju i smanjuje uporabu reagensa
Sigurnija otapala i pomoćna sredstva	Treba odabirati automatizirane metode s minimalnim brojem koraka
Dizajniranje u skladu s energetsom učinkovitošću	Treba izbjegavati derivatizaciju
Korištenje obnovljivih sirovina	Treba izbjegavati generiranje velike količine analitičkog otpada te osigurati pravilno gospodarenje analitičkim otpadom
Smanjenje derivata	Prednost imaju metode istovremene analize više analita ili s višestrukim parametrima u odnosu na metode koje koriste jedan analit
Kataliza	Treba minimizirati uporabu energije
Dizajn za razgradnju	Prednost treba dati reagensima dobivenim iz obnovljivih izvora
Analiza u stvarnom vremenu za sprječavanje onečišćenja	Toksični reagensi trebaju biti uklonjeni ili zamijenjeni
Sigurnija kemija za prevenciju slučajeva nesreća	Treba povećati sigurnost analitičara

Identične boje (lijevo i desno) predstavljaju iste principe.

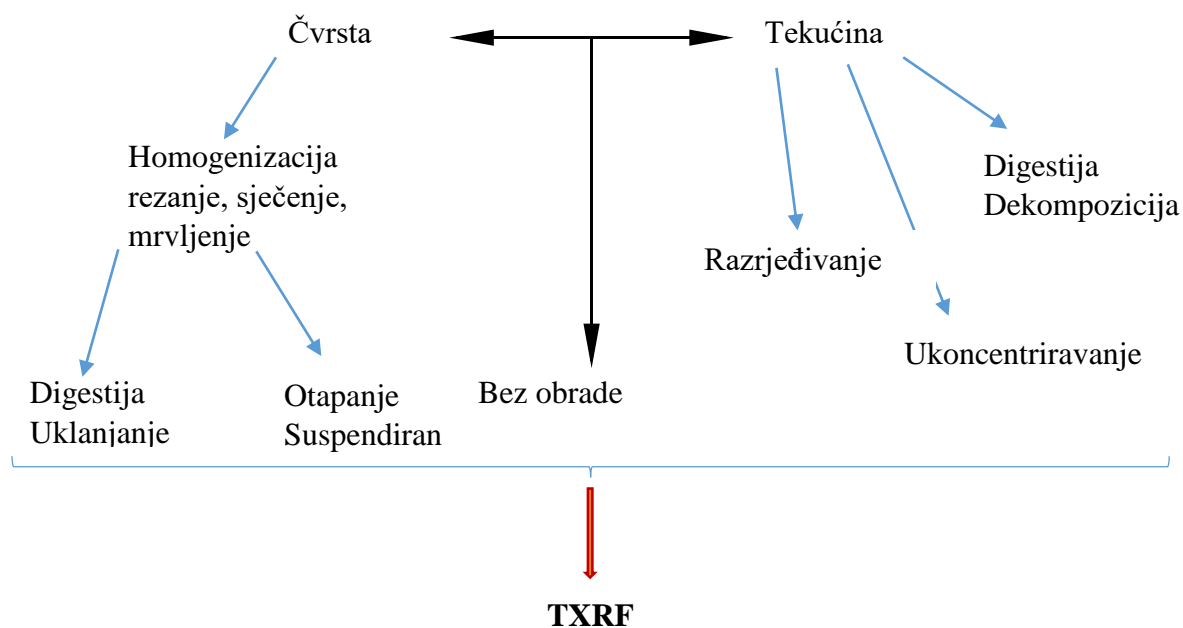
Posljednjih godina, razvoj i komercijalizacija stolnih TXRF instrumenata, koji nude iznimnu jednostavnost i niske troškove rada te kompaktan dizajn, potaknuli su široku primjenu ove tehnike u mnogim područjima (Tablica 2), između ostalih: voda (Bilo i sur., 2014; Moreira i sur., 2006; Stosnach, 2005), tlo (De Vives i sur., 2007; Marguí i sur., 2010; Stosnach, 2006), čestice zraka (Borgese i sur., 2012, 2009), biomonitoring (De Vives i sur., 2006; Turnau i sur., 2010; Wannaz i sur., 2011), biljke (Martinez i sur., 2008; Moreira i sur., 2005; Nečemer i sur., 2008), farmacija (Marguí i sur., 2024), medicina (Jablan i sur., 2021; Marguí i sur., 2019), umjetnost (Marguí i sur., 2022) i mnoga druga. U području analize hrane TXRF se sve više koristi (Borgese i sur., 2015; Vitali Čepo i sur., 2022; Klockenkämper i Bohlen, 2015), no njegova uporaba još uvijek je prvenstveno ograničena na istraživanja, a ne na stvarne industrijske primjene.

Tablica 2. Sumarni prikaz područja primjene TXRF tehnike.

Biomedicina	Okoliš	Industrija	Ostalo
Tjelesne tekućine	Biljni materijali	Visoko-pročišćene kemikalije	Forenzika
Tkivo	Voda	Metali i rude	Umjetnost i kulturna baština
Kosa	Čestice zraka	Ulja, kreme i masti	Hrana i farmaceutski proizvodi
	Tlo i stijene	Filmovi, folije, implantati, poluvodiči	

Metode pripreme uzoraka su obično nužan i vrlo važan korak u kemijskoj analizi, te je jedna od prednosti TXRF mogućnost analize složenih tekućih uzoraka uz jednostavnu pripremu uzoraka (direktna analiza ili postupak razrjeđenja) koji su više u skladu s načelima zelene analitičke kemije (Dalipi i sur., 2016; Jablan i sur., 2021; Pessanha i sur., 2010). Na Slici 2 prikazane su mogući načini pripreme uzoraka za TXRF analizu, a kao preferirani način u zelenoj kemiji ističe se metoda bez obrade, to jest direktna metoda analize. Analiza zahtijeva vrlo malu količinu uzorka i malu količinu otapala (μL ili ng). Kvantifikacija je brza i

jednostavna te se u većini slučajeva može provesti pomoću unutarnjeg standarda (eng. Internal standard, IS).



Slika 2. Shematski prikaz metoda pripreme uzoraka za TXRF analizu.

Kao unutarnji standard koristi se element koji se ne nalazi u samom uzorku, a najčešće primjenjivani su Ga, Y, V, Rh i dr. Jednostavna je za uporabu, a novi stolni sustavi ne trebaju plin ili medij za hlađenje što uveliko utječe i na samu cijenu analize. Kako se danas posvećuje velika pažnja primjeni analitičkih tehnika/metoda koje vode brigu o načelu “zelene analitičke kemije” prvenstveno potrošnja manje količine reagensa, energije, stvaranje manjih količina otpada, siguran i brz postupak, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementnu analizu (Dalipi i sur., 2017; Marguí i sur., 2022).

Unatoč prednostima korištenja alternativnih analitičkih tehnika kao što je TXRF, uvođenje takvih metodologija za rutinsku analizu u industrijsku praksu nije uvijek jednostavno. Glavni razlog jest regulatorne prirode, a tiče se poteškoća u akreditaciji novih metoda za dobivanje nacionalnog i međunarodnog priznanja. Stoga je od iznimne važnosti provesti odgovarajuću validaciju razvijenih alternativnih metoda kako bi se prikupili dokazi o kvaliteti dobivenih rezultata i potvrdila sigurnost i učinkovitost ciljanog proizvoda.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Značajan porast potražnje potrošača za „zdravom“ hranom i pićem te popularnost funkcionalne hrane i pića, kao što je kombucha, stečena na Zapadu prelila se i na Hrvatsku. Konzumacija ledenog čaja široko je zastupljena u ljudi svih dobnih skupina, a posebice adolescenata i djece koja su podložnija utjecaju elemenata u tragovima prisutnih u hrani i piću (Milani i sur., 2018). Pojedini elementi neophodni su za funkcioniranje ljudskog organizma te njihov nedostatak, a u nekim slučajevima i višak, može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme. Određivanje elemenata u tragovima u napitcima pripremljenim na bazi čaja – ledeni čaj i kombucha, važno je iz dva aspekta (a) za procjenu njihove nutritivne vrijednosti i (b) za zaštitu od mogućih štetnih učinaka. Iako je pijenje ovih napitaka popularno osvježeno u mnogim zemljama, potencijalni unos elemenata u tragovima na ovaj način nije uključen u procjene unosa hranom. Danas, važnost mjerenja metala prisutnih u bezalkoholnim pićima očituje se u nutritivnom smislu te u svrhu procjene kvalitete i odmjeravanja omjera koristi i rizika konzumacije za potrošače. Budući da se svijest i zabrinutost zbog elementnog sastava bezalkoholnih pića povećava iz godine u godinu, elementna analiza ledenog čaja i kombuche predstavlja aktualnu temu od velikog značaja i postoji potreba za brzim i osjetljivim analitičkim tehnikama/metodama koje se mogu primijeniti i u rutinskim analizama realnih uzoraka.

Kako se danas posvećuje velika pažnja primjeni analitičkih tehnika/metoda koje vode brigu o načelu “zelene analitičke kemije” (prvenstveno potrošnja manje količine reagensa, energije, stvaranje manjih količina otpada, siguran i brz postupak, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu multielementnu analizu.

Glavni cilj ovog rada je odrediti sadržaj elemenata prisutnih u prikupljenim komercijalno dostupnim uzorcima ledenog čaja i kombuche (n=71) primjenom TXRF tehnike prvenstveno vodeći se načelima „zelene kemije“, kao i dobiti bolji uvid u zdravstvenu ispravnost i rizike potencijalno pretjeranog unosa elemenata u svakodnevnoj konzumaciji ledenog čaja i kombuche.

Specifični ciljevi ovoga istraživanja su:

- i) procijeniti sadržaj elemenata u tragovima (Fe, Mn, Ni, Cu, Zn i Sr) u prikupljenim uzorcima pomoću dvije analitičke tehnike (ICP-MS i TXRF) te dobivene rezultate usporediti prema kriterijima zelene analitičke kemije, a time indirektno i vremensku i ekonomsku zahtjevnost analize
- ii) procijeniti unos minerala konzumacijom ovih napitaka i potencijalni rizik vezan uz izloženost anorganskim kontaminantima njihovom konzumacijom
- iii) klasificirati vrste ledenog čaja i kombuche koristeći njihov elementni sastav primjenom multivarijantne analize. Korišteni alati za multivarijantnu analizu su analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA) i hijerarhijska klusterska analiza (eng. Hierarchical Cluster Analysis, HCA), kako bi se provela temeljita procjena izvornih podataka, što bi omogućilo identificiranje sličnosti između analiziranih uzoraka

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

- Standardna otopina galija (Ga) 1000 $\mu\text{g/mL}$ (ROMIL PrimAg, Velika Britanija)
- Certificirani referentni materijal (eng. Certified Reference Material, CRM) TMDA 64.2 – „Lake Ontario Water“ (National Laboratory for Environmental Testing, Burlington, Ontario, Canada)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm^{-1} , pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Merck Milipore, Milli-Q® IOQ 7015, Darmstadt, Njemačka)

3.2. Pribor i instrumenti

- Maseni spektrometar s induktivno spregnutom plazmom (Agilent 7500c, Santa Clara, CA, SAD)
- Rendgenski fluorescencijski spektrometar s totalnom refleksijom S2 PICOFOX (Bruker Nano Analytics GmbH, Berlin, Njemačka)
- Kvarcni stakleni reflektori (Bruker Nano Analytics GmbH, Berlin, Njemačka)
- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)
- Vortex mješalica (IKA Vortex Genius 3, Staufen, Njemačka)
- Grijača ploča C-MAG HS7 digital (IKA, Wilmington, SAD)
- Automatske mikropipete volumena 0,1-1000 μL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

3.3. Uzorci

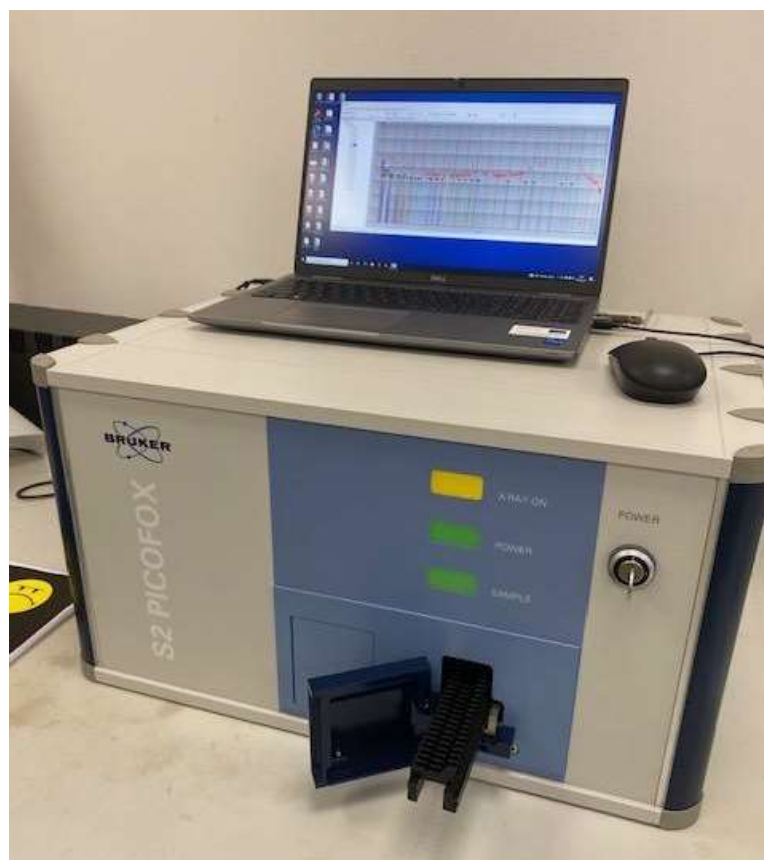
Ledeni čajevi i kombucha pića prikupljeni su u 4 trgovačka lanca i 4 maloprodajne prodavaonice na hrvatskom tržištu. Svi uzorci prikupljeni su u Zagrebu u periodu od 13. do 30. studenog 2023. Skupinu ledenih čajeva sačinjava 50 različitih komercijalnih proizvoda od 13 različitih proizvođača, dok skupina kombucha sadrži 21 komercijalni proizvod od 5 različitih proizvođača. Svaki od uzoraka označen je s dva slova. Prva slova kao što su F, D, J, R, Š, B, L, K, O, S, A, X, Č korištena su za obilježavanje ledenog čaja. Prva slova u oznaci E, V, N, C, H korištena su za uzorke kombuche. Drugo slovo dodijeljeno je slučajnim odabirom. Potpuni prikaz uzoraka vidljiv je na Slikama (7, 8, 9, 10, 11, 12).

3.4. Instrumentalne tehnike

Određivanje sadržaja metala u uzorcima ledenog čaja i kombuche provedena su primjenom TXRF i ICP-MS tehnike.

3.4.1. TXRF

Elementna analiza uzoraka provedena je primjenom rendgenskog fluorescencijskog spektrometra s totalnom refleksijom s molibdenovom anodom (TXRF-Mo, S2 PICOFOX Bruker Nano Analytics GmbH, Berlin, Njemačka) koji je prikazan na Slici 3. Detaljne karakteristike instrumenta i uvjeti mjerenja prikazani su u Tablici 3.



Slika 3. Rendgenski fluorescencijski spektrometar s totalnom refleksijom S2 PICOFOX, Bruker Nano Analytics GmbH, Berlin, Njemačka (Centar za translacijska istraživanja i inovacije u farmaciji, FarmInova, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu).

Tablica 3. Prikaz karakteristika instrumenta (TXRF-Mo) i uvjeta mjerenja.

S2 PICOFOX TXRF spektrometar (Bruker Nano Analytics GmbH, Berlin, Njemačka)	
Rendgenska cijev	Mo, 40 W
Napon	50 kV
Struja	1000 μ A
Optika	Višeslojni monokromator (17,5 keV)
Rezolucija detektora (SDD)	139,43 eV pri Mn-K α
Radno okruženje	zrak
Vrijeme mjerenja	600 s

3.4.2. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)

Elementna analiza uzoraka provedena je i korištenjem spektrometra masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) Agilent 7500c (Slika 4). Detaljne karakteristike instrumenta i uvjeta mjerenja prikazane su u Tablici 4.



Slika 4. Maseni spektrometar s induktivno spregnutom plazmom Agilent 7500c (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD).

Tablica 4. Prikaz karakteristika instrumenta (ICP-MS) i uvjeta mjerenja.

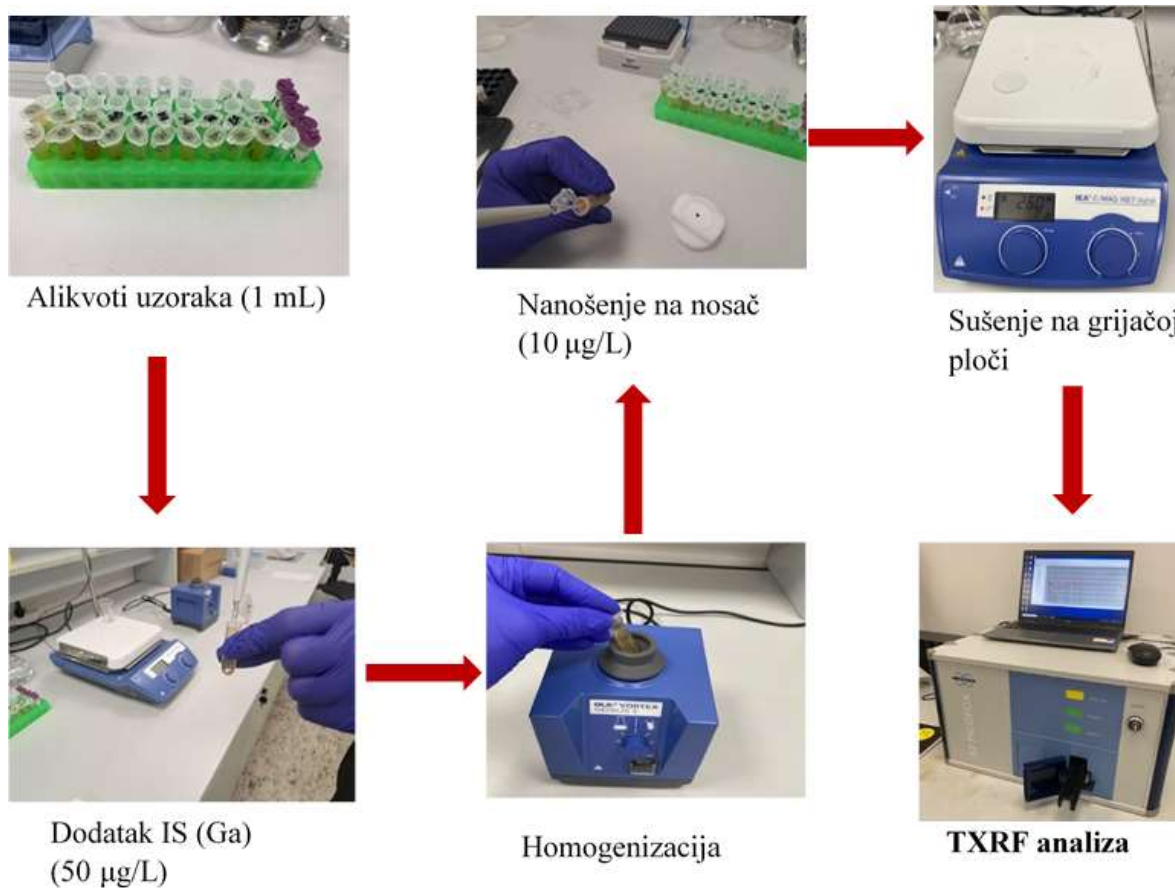
ICP-MS Agilent 7500c (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)	
Snaga	1500 W
Protok plina plazme	15 L/min
Protok plina raspršivača	1,2 L/min
Prvi/ drugi konus	Ni, 1mm/0.4mm
Vrijeme integriranja	0,1 s
Replike	3
Uvjeti mjerenja	1) Bez plina
	2) He 2mL/ min
Izotopi	1) ^{103}Rh
	2) ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{88}Sr , ^{103}Rh

3.5. Priprema uzoraka za TXRF analizu

Za TXRF analizu, u 1 mL nerazrijeđenog uzorka ledenog čaja ili kombuche doda se 50 μL standardne otopine Ga koncentracije 100 mg/L (unutarnji standard, IS). Iz matične otopine Ga koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$ pripremljena je radna otopina IS koncentracije 100 mg/L razrjeđenjem s ultračistom vodom.

Nakon temeljitog čišćenja kvarcnih nosača prema koracima koje preporuča proizvođač, na kvarcne nosače se nanese otopina silikona u izopropanolu (10 μL) te se osuše na grijačoj ploči ($\sim 40^\circ\text{C}$). Nakon sušenja nosači su spremni za nanošenje uzorka i daljnju analizu. Homogenizacija uzorka provodi se uz pomoć vortex mješalice nakon čega se 10 μL homogeniziranog uzorka otpipetira i nanese na silikonizirani nosač od kvarcnog stakla.

Uzorak se potom osuši na grijačoj ploči na temperaturi $\sim 40^\circ\text{C}$, nakon čega se analizira TXRF spektrometrom. Svi uzorci mjereni su 600 s (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz pripreme uzoraka za TXRF analizu.

Za provođenje analize u uvjetima potpune refleksije, uzorci moraju biti u obliku tankog filma na nosaču. Priprema uzoraka u tankom sloju u većini slučajeva isključuje učinke matriksa, kao što su primjerice apsorpcija i sekundarna pobuda te uslijed toga nema potrebe za vanjskom kalibracijom. Iz tog razloga, kvantifikacija se kod mjerenja TXRF može jednostavno izvesti dodatkom IS (Streli, 2006). U ovom radu, kvantifikacija je provedena uz Ga kao IS koristeći sljedeći izraz:

$$C_i = \left(\frac{N_i C_{is} S_{is}}{N_{is} S_i} \right)$$

gdje je C_i : koncentracija analita, N_i : neto područje vrha analita, C_{is} : koncentracija IS, S_{is} : instrumentalna osjetljivost za IS, N_{is} : IS neto područje vrha, S_i : instrumentalna osjetljivost za analit.

3.6. Priprema radnih otopina za ICP-MS

Iz matičnih otopina Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr koncentracije 1000 µg/mL napravljena su serijska razrjeđenja standardnih otopina u odgovarajućim rasponima koncentracija s ultra čistom vodom. Tako pripremljene standardne otopine korištene su za izradu baždarnih pravaca. Korišteni analitički uvjeti pripremljenih standardnih otopina i njihove koncentracije prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Analitički uvjeti za određivanje pojedinih elemenata u uzorcima ledenog čaja i kombuche.

Element	Jednadžba baždarnog pravca	Linearni raspon (µg/L)	R ²
Mn	$y = 12,117x + 3,0415$	0,1 – 200	0,9999
	$y = 8,3277x + 549,57$	500 - 4000	0,9997
Fe	$y = 11,911x + 63,388$	0,1 – 200	0,9573
	$y = 9,4185x + 185,49$	500 - 4000	0,9997
Ni	$y = 4,932x + 1,0915$	90,1 – 200	0,999
Cu	$y = 12,716x + 0,7221$	0,1 – 200	0,9998
Zn	$y = 3,423x + 7,4673$	0,1 – 200	0,9993
	$y = 1,9669x + 1082,6$	500 - 4000	0,9895
Sr	$y = 7,1557x + 2,3739$	0,1 – 200	0,9999
	$y = 4,4416x + 963,58$	500 - 4000	0,9989

R² - koeficijent determinacije

3.7. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka predstavljenih u ovoj studiji korištena je osnovna deskriptivna statistika (srednja vrijednost, medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti) i multivarijatne metode kao što su Pearsonova korelacija, analiza glavnih komponenti (PCA) i klasteraska analiza (AHC), kako bismo testirali statističku razliku sadržaja elemenata između analiziranih uzoraka. Korišten je program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 10.0.2*. (GraphPad Software, Inc, San Diego, SAD, www.graphpad.com), a za multivarijatnu analizu (PCA i HCA) korišten je programski paket *XLStat* (*XLStat Software*, New York, SAD). Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

Za procjenu stupnja primjene principa zelene analitičke kemije za odabrani analitički postupak korišten je AGREE Calculator Software (<https://mostwiedzy.pl/AGREE>, Gdańsk, Poljska).

3.8. AGREE Calculator

Kalkulator „zelenila“ u analitičkim metodama (eng. The Analytical Greenness Calculator, AGREE Calculator) softverski je alat za procjenu ekološke opasnosti analitičkog postupka zasnovan na 12 principa zelene analitičke kemije. Rezultat procjene prikazuje se u obliku grafa koji sadrži ukupno ostvareni rezultat, kao i rezultate po svakom od 12 principa. Svrhovit je alat za usporedbu različitih instrumentalnih tehnika/metoda kako bi se odabrala ona s najmanjim utjecajem na okoliš, za identificiranje potencijalnih ekoloških problema tijekom planiranja i razvoja novih analitičkih postupaka (Pena-Pereira i sur., 2020). Alat je svrhovit i zabilježena je njegova upotreba u literaturi (Mejías i sur., 2023).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je multielementna analiza prikupljenih uzoraka ledenog čaja i kombuche. Primjenom TXRF tehnike proveda se kvalitativna analiza u svrhu detekcije prisutnih elemenata u svim uzorcima. Odabir elemenata (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr) za daljnu analizu načinjen je prema njihovoj ulozi i važnosti za mnoge biološke mehanizme u ljudskom organizmu kao i njihove potencijalno toksične uloge.

4.1. Evaluacija TXRF metode

Uslijed nedostatka standardnog referentnog materijala za ovu vrstu uzoraka analitička procjena rezultata potvrđena je analizom certificiranog referentnog materijala (CRM) TMDA 46.2 („Lake Ontario Water“ National Laboratory for Environmental Testing, Burlington, Ontario, Canada). Rezultati dobiveni primjenom TXRF tehnike pokazali su dobro slaganje s referentnim vrijednostima (Tablica 6) gdje je analitički prinos za sve elemente bio u rasponu od 95% (Ni) do 110% (Mn i Zn). Nadalje, granica dokazivanja (LOD) izračunata je analizom ovog standardnog referentnog materijala prema izrazu (Marguí i Van Grieken, 2013):

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{koncentracija analita} \cdot \sqrt{\text{pozadina}}}{\text{površina pika analita}}$$

Vrijednosti LOD bile su unutar prihvatljivog raspona za određivanje Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Dobiveni rezultati TXRF analizom CRM TMDA 46.2. Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/L}$.

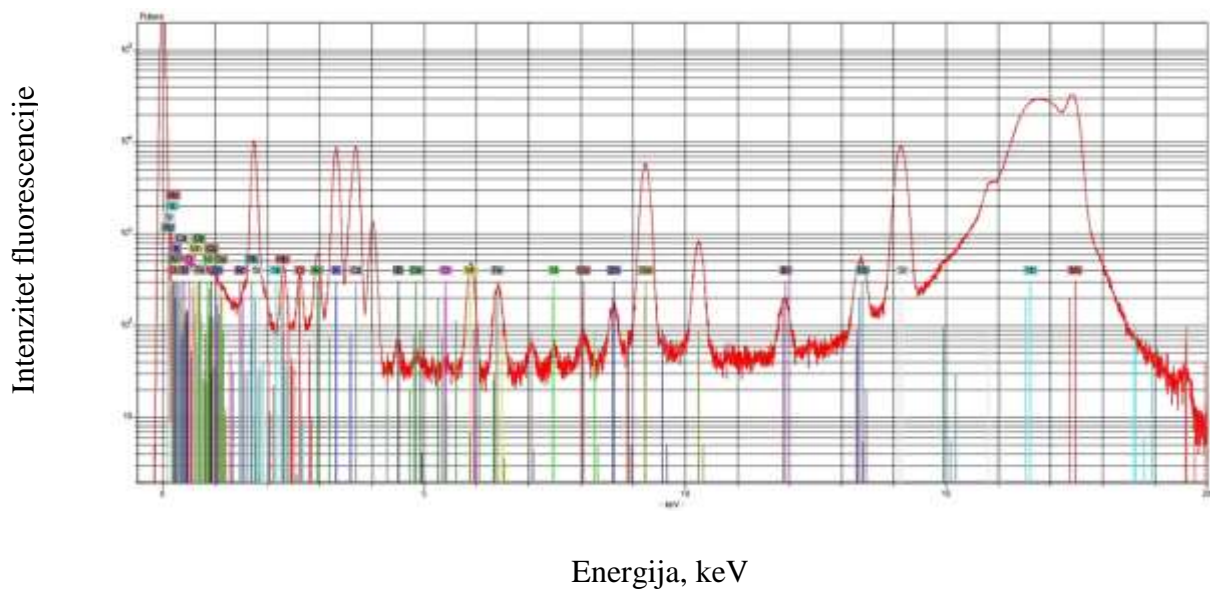
Element	TXRF metoda			Referentne vrijednosti	
	LOD	Srednja vrijednost (n=3)	SD	Srednja vrijednost	Analitički prinos (R)
Mn	19	330	16	299,5	110
Fe	16	330	8	306	108
Ni	7	250	5	263	95
Cu	9	290	12	275	105
Zn	11	340	15	310	110
Sr	16	680	13	641	106

Utjecaj matrice kod uzoraka ledenog čaja i kombuche ispitan je metodom standardnog dodatka. Uzorcima je dodan točno određeni volumen standardnih otopina (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr) različitih koncentracija (dodatak 1: 0,5 mg/L i dodatak 2: 2 mg/L) U svim je slučajevima postignuto dobro iskorištenje, s vrijednostima koje su varirale između 85 % (Ni) i 106% (Cu). Dobiveni rezultati koncentracija i iskorištenja za spomenute elemente u razmatranim otopinama pokazali su zadovoljavajuće kvantitativno iskorištenje. Stoga je zaključeno da nema značajnog utjecaja matrice na rezultate i da je predložena TXRF metoda prikladna za brzu multielementnu analizu ovog tipa uzoraka.

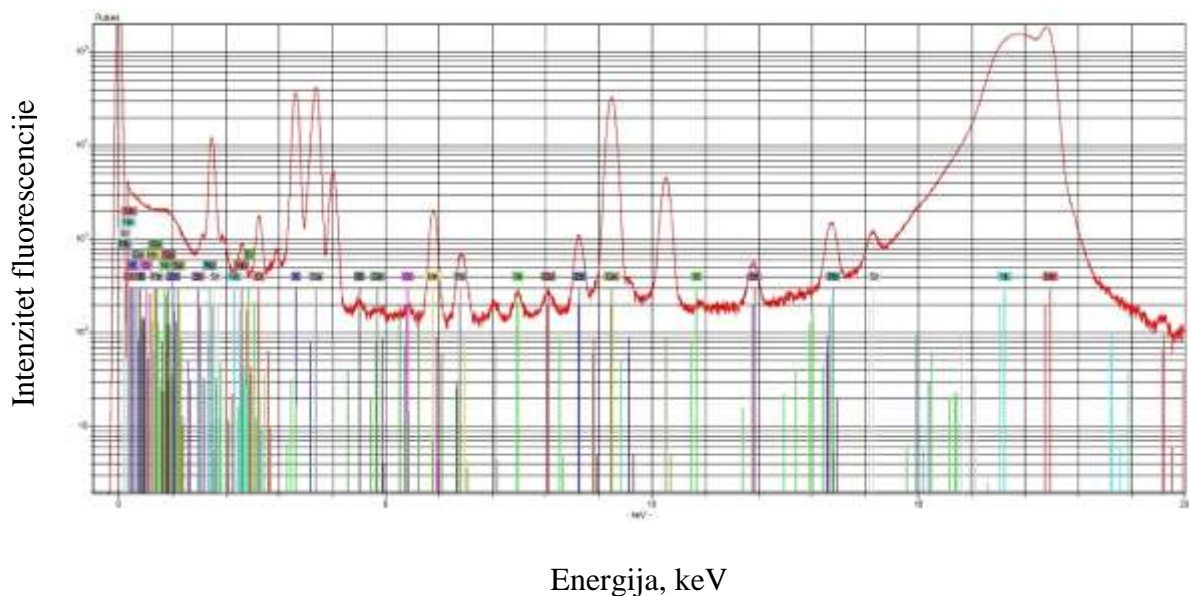
4.2. Elementni sastav u uzorcima ledenog čaja i kombuche

Multielementna analiza prikupljenih uzoraka ledenih čajeva (n=50 komercijalno dostupnih) i kombuche (n=21) provedena je primjenom TXRF tehnike. Primjer jednog TXRF spektra prikazan je na Slici 6. Prije same analize uzoraka provedena je kvalitativna analiza kako bi se odabrao odgovarajući unutarnji standard. S obzirom da Ga nije prisutan u ispitivanim uzorcima on se pokazao kao idealan kandidat. Iz dobivenog spektra moguće je provesti multielementnu analizu što je jedna od prednosti ove tehnike. Nadalje, prednost ove tehnike je i relativno jednostavno određivanje Br (vidljiv pik Br, Slika 6a i 6b) što nije slučaj kod ostalih spektroskopskih tehnika.

a)



b)



Slika 6. Prikaz TXRF spektra jednog uzorka a) ledenog čaja (RJ) i b) kombucha (NB).

Analiza elemenata u tragovima provedena je u 50 uzoraka ledenog čaja i 21 uzorku kombuche različitih proizvođača. Prikupljeni uzorci se razlikuju prema vrsti čaja od kojeg su izrađeni, postotku ekstrakta čaja te okusima. U Tablici 7 i 8 prikazan je raspon, srednja vrijednost raspona i medijan za određene elemente (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr) u prikupljenim uzorcima. Općenito, sadržaj pojedinih elemenata značajno je varirao između pojedinih uzoraka. Dobiveni rezultati određenih elemenata prikazani su na Slikama (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Raspon koncentracija kod uzoraka ledenog čaja kretao se od 0,955-4143,22 $\mu\text{g/L}$ za Mn, 14,178-1209,98 $\mu\text{g/L}$ za Fe, 0,523 - 37,133 $\mu\text{g/L}$ za Ni, 0,641 – 33,314 $\mu\text{g/L}$ za Cu, <LOD – 13637,45 za Zn i 10,516 – 5119,498 za Sr, a raspon koncentracija kod uzoraka kombuche bio je od 464,99-1963,295 $\mu\text{g/L}$ za Mn, 16,552-217,804 $\mu\text{g/L}$ za Fe, 5,762 – 19,360 $\mu\text{g/L}$ za Ni, 6,316 – 44,828 $\mu\text{g/L}$ za Cu, <LOD – 168,992 za Zn i 3,763 – 156,628 za Sr. Kod obe vrste uzoraka najveća koncentracija je u većini slučajeva određena za Mn i Fe. Uzorak ledenog čaja OA ima značajno veći sadržaj Zn što je očekivano jer je na proizvodu deklariran dodatak Zn laktata. U uzorcima oznaka RA, RB, RC, RD, RE, RF, RG, RH, RI, RJ, ŠA, ŠB i ŠC određen je značajno veći sadržaj Sr dok kod uzorka RB određena je značajno veća količina Fe. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima (Martins i sur., 2020; Milani i sur., 2018; Milani i sur., 2020).

Određene razlike u sadržaju elemenata u ova dva tipa uzoraka (ledeni čaj i kombucha) najvjerojatnije potječu od različite procedure izrade ovih napitaka kao i zbog samog industrijskog postupka proizvodnje. Veći sadržaj Cu, Fe i Ni može potjecati od primjene opreme izrađene od nehrđajućeg čelika (Zhang i sur., 2018).

Tablica 7. Sadržaj elemenata u uzorcima ledenim čajevima: raspon, medijan i srednja vrijednost (n=3). Rezultati su prikazani u $\mu\text{g/L}$.

	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Sr
Minimum	0,955	14,178	0,523	0,641	< LOQ	10,516
Maximum	4143,225	1209,978	37,133	33,314	13637,45	5119,498
Median	872,681	70,460	11,987	11,145	27,215	176,347
Mean	993,225	116,540	12,709	12,123	196,378	1251,666

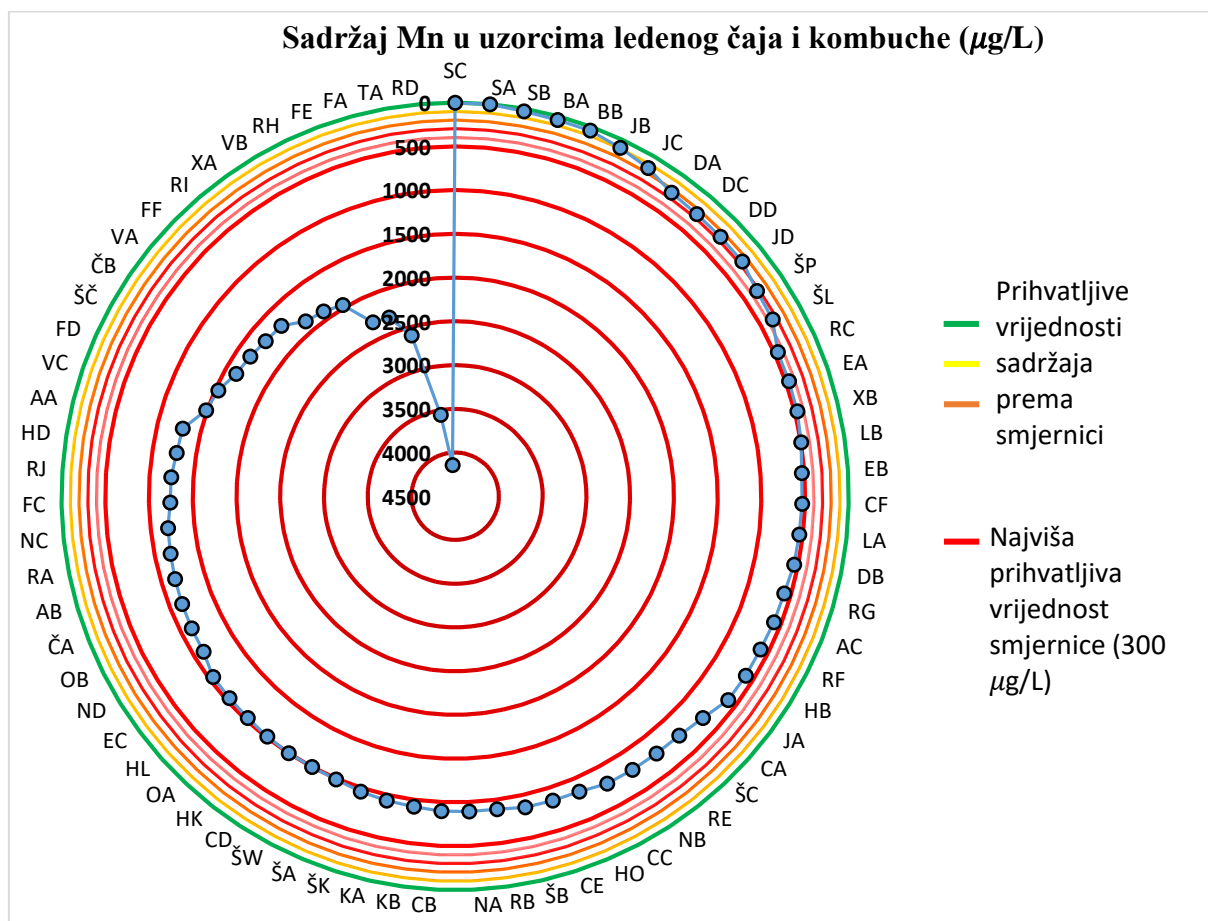
n – broj mjerenja po uzorku (uzorak je rotiran 3 puta)

Tablica 8. Sadržaj elemenata u uzorcima kombuche: raspon, medijan i srednja vrijednost (n=3).
Rezultati su prikazani u $\mu\text{g/L}$.

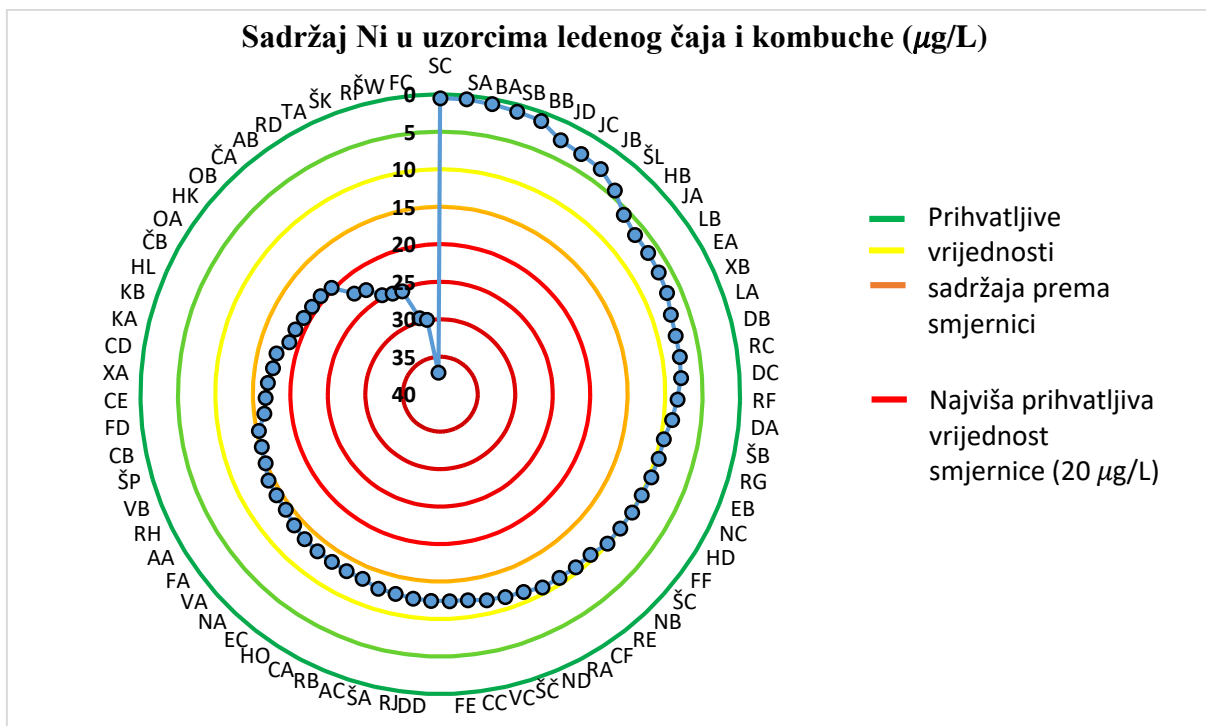
	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Sr
Minimum	464,988	16,552	5,762	6,316	< LOQ	3,763
Maximum	1963,295	217,804	19,360	44,828	168,992	156,628
Median	897,967	73,936	13,286	13,799	24,360	38,377
Mean	985,715	81,108	12,803	17,368	56,270	63,331

n – broj mjerenja po uzorku (uzorak je rotiran 3 puta)

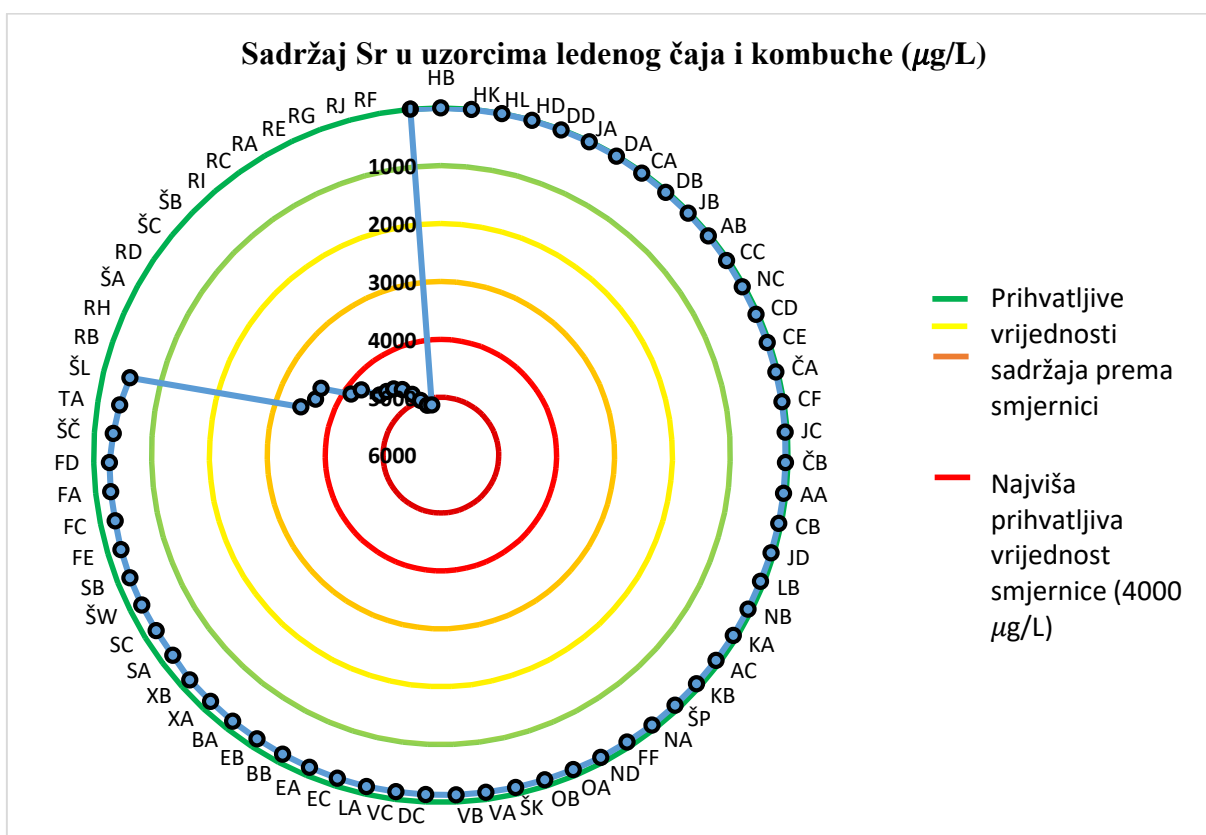
Na dolje priloženim slikama dan je grafički prikaz izmjereneog sadržaja analiziranih elemenata u uzorcima ledenog čaja i kombuche. Rezultati su prikazani u $\mu\text{g/L}$. Prvo su prikazani elementi (Mn, Ni, Sr) kod kojih je zabilježeno prekoračenje zahtjeva smjernice za kakvoću pitke vode (Tablica 10 i 11). Na njihovim grafičkim prikazima priložena je legenda. Zelene, žute i narančaste linije osi označuju prihvatljive vrijednosti sadržaja, to jest vrijednosti ispod najviše prihvatljive vrijednosti smjernice. Crvena linija osi označuje najvišu prihvatljivu vrijednost, to jest vrijednost iznad koje se element nalazi u neprihvatljivim količinama. Potom su prikazani elementi (Cu, Fe, Zn). Niti jedan od tih elemenata ne prelazi najvišu prihvatljivu vrijednost smjernice (Tablica 10 i 11). Stoga su na njihovim grafičkim prikazima legenda i bojom označene linije osi izostavljene, a poradi veće preglednosti samoga grafa. Dodatno, kod grafa za izmjereni sadržaj Zn izostavljen je prikaz za uzorak OA, koji zbog značajno većeg sadržaja ($13637,45 \mu\text{g/L}$) u odnosu na ostale uzorke narušava strukturu i preglednost grafa.



Slika 7. Izmjereni sadržaj Mn u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$) uspoređen sa smjericama za sadržaj Mn u pitkoj vodi.

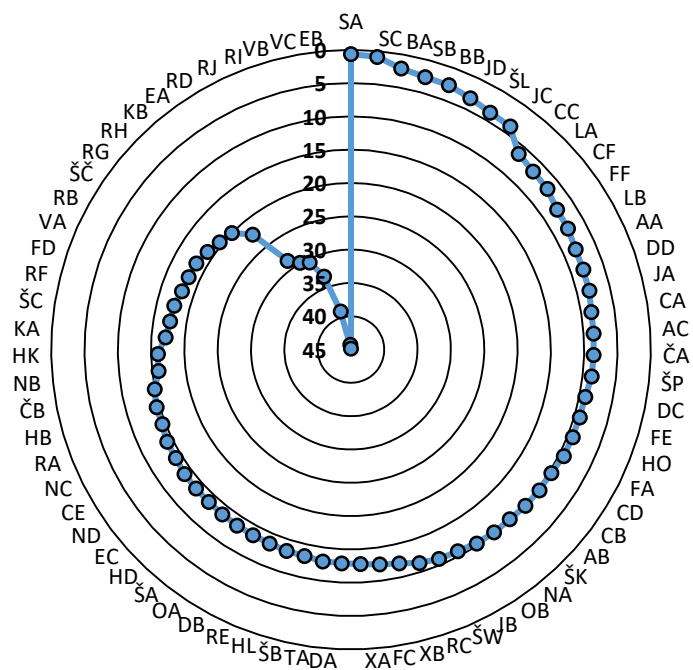


Slika 8. Izmjereni sadržaj Ni u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$) uspoređen sa smjernicama za sadržaj Ni u pitkoj vodi.



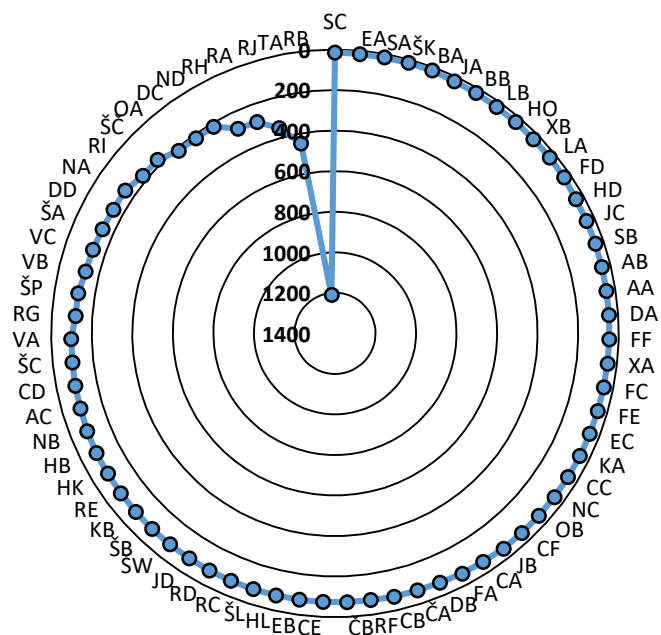
Slika 9. Izmjereni sadržaj Sr u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$) uspoređen sa smjernicama za sadržaj Sr u pitkoj vodi.

Sadržaj Cu u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$)

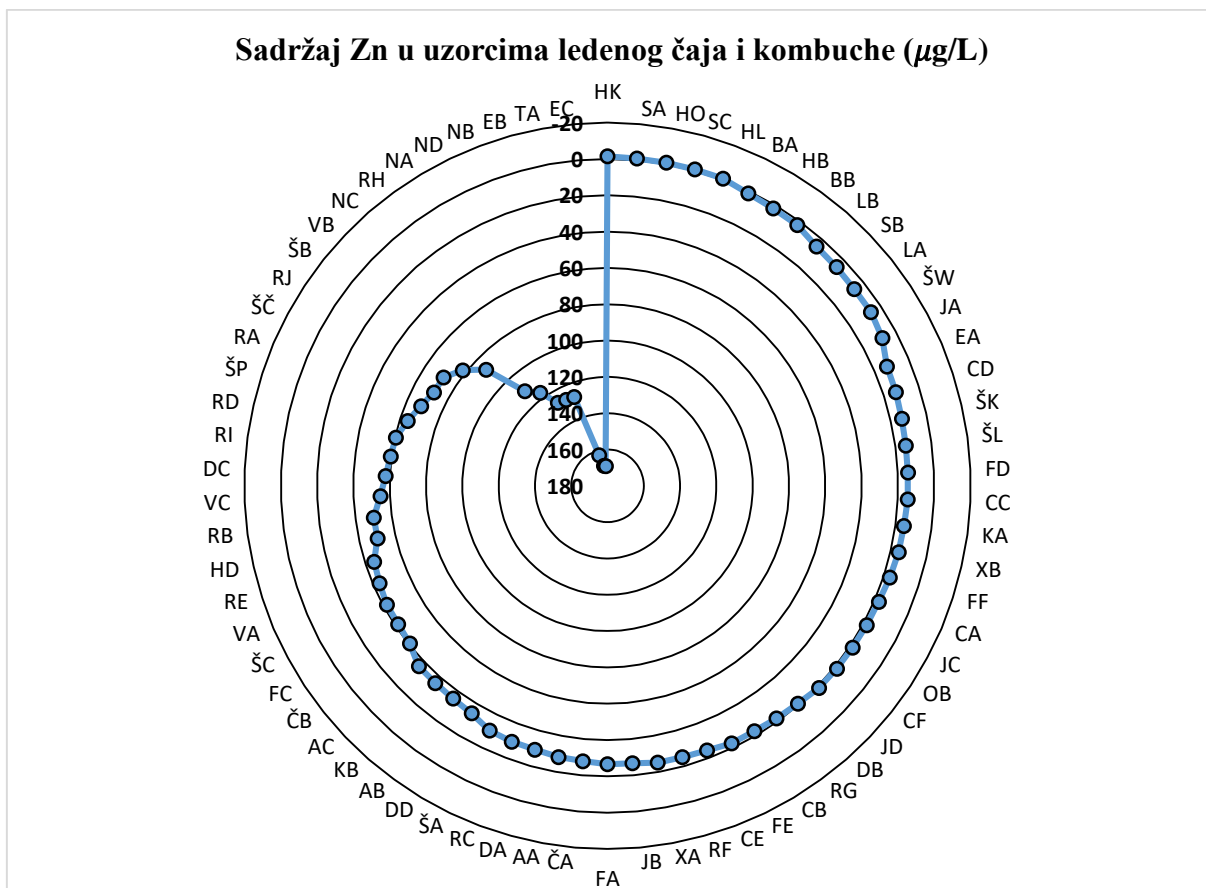


Slika 10. Izmjereni sadržaj Cu u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$). Najviša prihvatljiva vrijednost smjernice iznosi $1300 \mu\text{g/L}$.

Sadržaj Fe u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$)

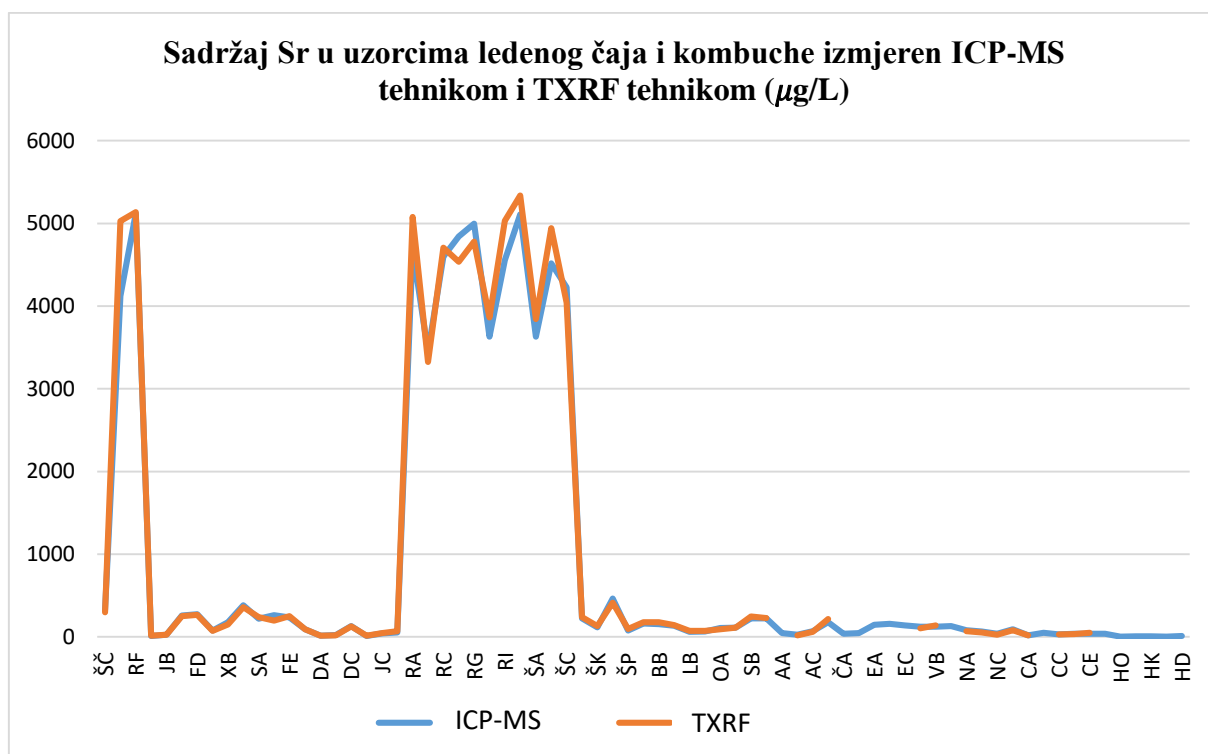


Slika 11. Izmjereni sadržaj Fe u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$). Prihvatljive vrijednosti nisu predložene smjernicama.



Slika 12. Izmjereni sadržaj Zn u uzorcima ledenog čaja i kombuche ($\mu\text{g/L}$). Najviša prihvatljiva vrijednost smjernice iznosi $2000 \mu\text{g/L}$. Uzorak OA nije prikazan.

Svi uzorci analizirani su i primjenom ICP-MS kao referentnom metodom koja se često koristi za elementnu analizu različitih tipova uzoraka. Dobiveni rezultati primjenom TXRF uspoređeni s rezultatima dobivenim primjenom ICP-MS (Slika 13, kao primjer slaganja prikazani su samo rezultati za Sr zbog jednostavnosti, ostali rezultati nisu prikazani u radu). Pokazalo se da dobivene koncentracije svih ispitivanih elemenata primjenom obje tehnike, ICP-MS i TXRF, nisu pokazale statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).



Slika 13. Usporedba sadržaja Sr u uzorcima ledenog čaja i kombuche izmjeren ICP-MS tehnikom i TXRF tehnikom ($\mu\text{g/L}$).

4.3. Ekološki otisak korištenih instrumentalnih tehnika analize

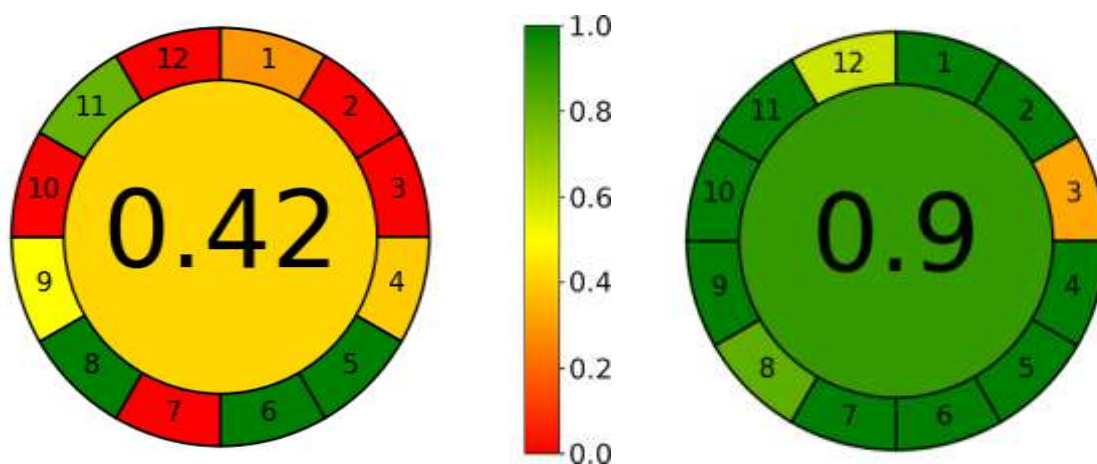
Primjenom software „AGREE kalkulator” (Pena-Pereira i sur., 2020) procijenjen je ekološki otisak primijenjenih tehnika/metoda. Na osnovu pitanja koja se temelje na 12 principa zelene kemije prikazanih u Tablici 9, (svako pitanje ima jednaku težinu), procijenjena je njihova ekološka prihvatljivost. Ocjene se kreću od 0,00 kao ekološki najneprihvatljivije tehnike/metode do 1,00 kao ekološki najprihvatljivije tehnike/metode.

Tablica 9. Kriteriji AGREE kalkulatora za procjenu „zelenosti“ primijenjene tehnike.

Kriterij	ICP-MS tehnika	TXRF tehnika
1 Uzorkovanje	Vanjska priprema i obrada uzorka te istovremena skupna analiza (smanjen broj koraka)	Bez štete po uzorak
2 Minimalna količina uzorka	600 mL	0,01 mL
3 Položaj analitičkog instrumenta	Off- line	At-line
4 Broj značajnih koraka	6	3 ili manje
5 Automatizacija / priprema uzorka	Manualno/ ne minimizirano	Manualno/ minimizirano
6 Derivatizacija	/	/
7 Količina otpada	600 mL	0,01 mL
8 Broj analita u jednom mjerenju / broj analiziranih uzoraka po satu	6 / 20	6 / 6
9 Korak najveće potrošnje energije	ICP-MS	EDXRF*
10 Podrijetlo reagenasa	Niti jedan reagens nije iz obnovljivog izvora	Reagensi nisu upotrijebljeni
11 Korištenje toksičnih reagensa i otapala	DA	NE
12 Prijetnje koje nisu izbjegnute	Toksično za vodeni okoliš, bioakumulirajuće, zapaljivo, ekspozivno, oksidirajuće i korozivno	Toksično za vodeni okoliš, bioakumulirajuće

* Kalkulator sadrži samo opciju EDXRF, no kako je TXRF varijanta EDXRF-a radi se o dobroj aproksimaciji

Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14. AGREE iznos za tehniku ICP-MS iznosio je 0,42, dok je za tehniku TXRF iznosio 0,9. Primjenom TXRF metode analize uzorka u odnosu na ICP-MS povećana je ekološka prihvatljivost za čak 114 %.



Slika 14. AGREE rezultat za korištenu ICP-MS tehniku (lijevo) i TXRF tehniku (desno).

S obzirom na dobivene rezultate usporedbom ove dvije tehnike te uzimajući u obzir određene parametre analize kao što je primjerice vrijeme potrebno za određivanje sadržaja ovih 6 elemenata, vrijeme potrebno za pripremu uzorka, kvantifikacija bez primjene vanjske kalibracije, TXRF tehnika je potencijalno vrlo značajna za analizu ovog tipa uzoraka. Nadalje, ICP-MS tehnika zahtjeva korištenje kiselina prilikom same analize, stvara veće količine otpada u odnosu na TXRF, te i veliku potrošnju argona, a i nekih drugih plinova dok TXRF ne zahtjeva plin i rashladne medije za rad. Iz svega navedenog može se zaključiti da je TXRF tehnika povoljnija sa stanovišta „zelene kemije“ kao i sa strane ekonomskog aspekta.

4.4. Procjena usklađenosti sadržaja elemenata analiziranih uzoraka sa zahtjevima smjernica za kakvoću pitke vode

Obzirom na nedostatak specifičnih smjernica za ledeni čaj i kombuchu, izmjerene koncentracije analiziranih elemenata uspoređene su za ciljanim zahtjevima kakvoće za pitku vodu od strane WHO, EU, Agencija Sjedinjenih Američkih Država za zaštitu okoliša (eng. United States Environmental Protection Agency, USEPA). WHO donosi smjernice (eng. Guidelines Values, GV) u vidu koncentracije onečišćenja vode koja tijekom konzumacije ne predstavlja značajan rizik za zdravlje. Slično, USEPA donosi zdravstvene preporuke (eng. Health Advisories, HA) koncentracije onečišćenja u vodi za piće za koju se ne očekuje da će izazvati bilo kakve štetne učinke tijekom izloženosti. HA temelji se na izloženosti osobe mase 70 kg koja konzumira 2 L vode dnevno, dok se GV temelji na pretpostavki da konzumacija 2 L vode dnevno predstavlja 20 % TDI-a za pojedino onečišćenje za osobu mase 60 kg (U.S. Environmental Protection

Agency, 2018; World Health Organization, 2017). Obzirom na sličnost definicija, smatrano je da se radi o istom tipu zahtjeva kvalitete za pitku vodu. Europska Komisija u Direktivi (EU) br. 2020/2184 iznosi vrijednosti parametara za kvalitetu vode za ljudsku potrošnju (European Commission, 2020). U Tablicama 10 i 11 pod zajedničkim imenom Smjernica objedinjene su vrijednosti zahtjeva kvalitete ovisno o dostupnom literaturnom podatku za pojedini element.

Tablica 10. Prikaz prekoračenja zahtjeva smjernice za analizirane elemente u uzorcima ledenog čaja.

Element	Smjernica ($\mu\text{g/L}$)			Uzorci koji prekoračuju najniži zahtjev smjernice		Uzorak minimalnog prekoračenja		Uzorak maksimalnog prekoračenja	
	WHO	USEPA	EU	Broj	Postotak	Sadržaj ($\mu\text{g/L}$)	Postotak	Sadržaj ($\mu\text{g/L}$)	Postotak
Mn	400	300	np	39	78%	328,919	9,64%	4143,225	1281,08%
Fe	np	np	np						
Ni	70	np	20	8	16%	22,328	11,64%	37,133	85,67%
Cu	2000	1300	2000	0	0%				
Zn	np	2000	np	1	2%	13637,450	581,87%	13637,45	581,87%
Sr	np	4000	np	10	20%	4122,206	3,06%	5119,498	9,64%

np - nije predloženo

Zabilježeno je 39 (78%) uzoraka ledenog čaja u kojih je zahtjev smjernice prekoračen za jedan element, u 9 (18%) uzoraka za dva elementa, u 1 (2%) uzorku za 3 elementa. 11 (22%) uzoraka zadovoljilo je zahtjeve za sve analizirane elemente.

Tablica 11. Prikaz prekoračenja zahtjeva smjernice za analizirane elemente u uzorcima kombuche.

Element	Smjernica ($\mu\text{g/L}$)			Uzorci koji prekoračuju najniži zahtjev smjernice		Uzorak minimalnog prekoračenja		Uzorak maksimalnog prekoračenja	
	WHO	USEPA	EU	Broj	Postotak	Sadržaj ($\mu\text{g/L}$)	Postotak	Sadržaj ($\mu\text{g/L}$)	Postotak
Mn	400	300	np	21	100%	464,988	55,00%	1963,295	554,43%
Fe	np	np	np						
Ni	70	np	20	0	0%				
Cu	2000	1300	2000	0	0%				
Zn	np	2000	np	0	0%				
Sr	np	4000	np	0	0%				

np - nije predloženo

Zabilježen je 21 (100%) uzorak kombuche u kojem je zahtjev smjernice prekoračen za jedan element, što ukazuje na to da niti jedan uzorak nije zadovoljio svim zahtjevima za analizirane elemente.

4.5. Procjena dnevnog unosa elementa

U svrhu evaluacije i procjene rizika prekoračenja zahtjeva kvalitete izrađena je procjena dnevnog unosa pojedinog elementa u organizam. Uspostavljena je vrijednost nazvana referentna količina, koja predstavlja preporuku količine elementa u μg unesenog od strane prosječne osobe od 70 kg u jednom danu, preračunato prema literaturno dostupnom podatku smjernice. Time se sve dostupne smjernice normalizirane na veličinu mase elementa koja se ne bi smjela prekoračiti. Većina analiziranih proizvoda na tržištu pakirana je u bocama od 0,5 L, stoga je za izračun količine unesenog elementa pretpostavljena konzumacija jedne boce pića od 0,5 L dnevno. U Tablici 12 dan je prikaz korištenih preporuka unosa za svaki element.

Tablica 12. Korištene preporuke dnevnog unosa za svaki analizirani element.

Element	Smjernica
Mn	TDI = 60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$
Fe	PMTDI = 800 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$
Ni	TDI = 13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$
Cu	TUIL = 10 000 $\mu\text{g}/\text{dan}$
Zn	RfD = 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$
Sr	RfD = 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$

Prihvatljivi dnevni unos (eng. Tolerable Daily Intake, TDI) je procjena količine tvari u hrani i pitkoj vodi, izraženo na temelju tjelesne mase, koji se mogu unositi tijekom dana unutar granica sigurnosti, to jest bez značajnog rizika za zdravlje. Vrijednost maksimalnog prihvatljivog dnevnog unosa koja je trenutno na snazi (eng. Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, PMTDI) izražava provizornu procjenu razine doze ispod koje se neće pojaviti štetni učinci. PMTDI je uspostavljena za kontaminante kod kojih nedostaje pouzdanih podataka o posljedicama izloženosti ljudi. Gornja vrijednost prihvatljivog unosa (eng. Tolerable Upper Intake Level, TUIL) odnosi se na najvišu razinu dnevnog unosa kontaminanta za koju je vjerojatno da neće predstavljati rizik od štetnih zdravstvenih učinaka za gotovo sve pojedince u populaciji (World Health Organization, 2017). Referentna doza (eng. Reference dose, RfD) predstavlja procjenu vrijednosti dnevnog unosa oralnim putem koja je vjerojatno bez značajnog rizika od štetnih učinka tijekom života elementa u organizmu (U.S. Environmental Protection Agency, 2018).

Tablica 13. Prikaz unesene količine pojedinog elementa u odnosu na preporuke dnevnog unosa konzumacijom 0,5 L ledenog čaja dnevno.

Element	Referentna količina unosa (μg)	Maksimum izmjerenog sadržaja ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Količina unesena konzumacijom jednog pića od 0,5 L (μg)	Postotak referentne količine
Mn	4200	4143,225	2071,612	49,32%
Fe	56000	1209,978	604,989	1,08%
Ni	910	37,133	18,566	2,04%
Cu	10000	33,314	16,657	0,17%
Zn	21000	13637,45	4075,172	32,47%
Sr	42000	5119,498	2559,749	6,09%

Tablica 14. Prikaz unesene količine pojedinog elementa u odnosu na preporuke dnevnog unosa konzumacijom 0,5 L kombuche dnevno.

Element	Referentna količina unosa (μg)	Maksimum izmjereneog sadržaja ($\mu\text{g/L}$)	Količina unesena konzumacijom jednog pića od 0,5 L (μg)	Postotak referentne količine
Mn	4200	1963,295	981,647	23,37%
Fe	56000	217,804	108,902	0,19%
Ni	910	19,36	9,68	1,06%
Cu	10000	44,828	22,414	0,22%
Zn	21000	168,992	84,496	0,40%
Sr	42000	156,628	78,314	0,19%

Konzumacija niti jednog ledenog čaja ili kombuche u količini od 0,5 L dnevno ne prelazi preporučene referentne količine ukupnog dnevnog unosa pojedinog elementa za osobu od 70 kg. Unatoč tome, konzumacija jedne boce od 0,5 L ledenog čaja RD čini 49,32 % preporučenog dnevnog unosa Mn, ledenog čaja OA 32,47 % unosa Zn, kombuche VB 23,37 % unosa Mn (Tablica 13 i 14). Konzumacija putem ledenog čaja ili kombuche predstavlja tek jedan od puteva unosa elemenata u organizam. Imajući u vidu unos elemenata i drugim putevima, gornje navedene vrijednosti mogu biti okarakterizirane kao značajne i potencijalno visoke.

4.6. Multivarijatna analiza

Određene koncentracije elemenata dobivenih u ovom istraživanju pokazale su velike varijacije u sadržaju ispitivanih elemenata kod različitih uzoraka ledenog čaja i kombuche. Kako bi se dobio što bolji uvid u sadržaj određivanih elemenata kod ispitivanih uzoraka dobiveni podaci podvrgnuti su kemometrijskim metodama analize.

U ovom radu analiza glavnih komponenti (PCA) primijenjena je za interpretaciju i klasifikaciju uzoraka na temelju njihovog sastava elemenata u tragovima. PCA je korištena za smanjenje dimenzionalnosti skupa podataka kako bi se olakšala interpretacija podataka i detekcija najznačajnijih varijabli u razlikovanju analiziranih uzoraka ledenog čaja i kombuche koje opisuje skup podataka uz minimalni gubitak izvornih podataka odnosno uz očuvanje maksimalne informacije. Ovaj se postupak provodi izračunavanjem linearnih kombinacija izvornih varijabli kako bi se oblikovale glavne komponente. S rezultatom PCA dobivaju se dvo-

ili trodimenzionalni grafikoni rezultata, koji olakšavaju vizualizaciju distribucije uzorka i važnosti varijabli u eksperimentalnim podacima (Beebe i sur., 1998).

Prije primjene multivarijatne analize konstruirana je matrica podataka koja sadrži 50 redova za uzorke ledenog čaja i 21 red za uzorke kombuche. Određene su prosječne koncentracije ($n = 3$, uzorak tri puta rotiran i analiziran) različitih elemenata (varijable: Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr) za svaki uzorak te svrstane u šest stupaca. PCA je primijenjen na matrix 50 x 6 za uzorke ledenog čaja i 21 x 6 za uzorke kombuche gdje svaki red i stupac odgovara jednom uzorku i jednom određenom elementu. Niti jedna vrijednost nije odbačena kao sumnjiva („outliers“).

Pearsonova linearna korelacija korištena je za procjenu stupnja ovisnosti ili neovisnosti jedne varijable u odnosu na drugu, što pomaže u tumačenjima u PCA i HCA (Peixoto i sur., 2012). Hijerarhijska klaster analiza (HCA) korištena je kako bi se skup podataka analizirao na hijerarhijski način, što omogućuje provjeru stupnja sličnosti utvrđenog između grupa formiranih u dendrogramu uzorcima ledenih čajeva i kombuche.

4.6.1. Pearsonova korelacijska matrica

Na skup podataka primjenjena je korelacijska analiza (Pearson's correlations) koja pokazuje korelaciju između elemenata određenih u svim ispitanim uzorcima. Rezultati su prikazani u Tablici 15 i 16. Što je koeficijent korelacije bliži 1 to je veća povezanost među varijablama.

Tablica 15. Korelacijska matrica za 6 elemenata određenih u ispitivanim uzorcima ledenog čaja.

Varijable	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Sr
Mn	1					
Fe	0,183	1				
Ni	0,609	0,127	1			
Cu	0,536	0,332	0,511	1		
Zn	0,015	0,085	0,119	0,036	1	
Sr	0,181	0,328	0,037	0,613	-0,080	1

Masno otisnute vrijednosti različite su od 0 (nivo značajnosti iznosi 0,05).

Tablica 16. Korelacijska matrica za 6 elemenata određenih u ispitivanim uzorcima kombuche.

Varijable	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Sr
Mn	1					
Fe	0,432	1				
Ni	0,331	0,153	1			
Cu	0,314	0,227	-0,210	1		
Zn	0,153	0,371	-0,237	0,331	1	
Sr	0,244	0,288	-0,255	0,718	0,614	1

Masno otisnute vrijednosti različite su od 0 (nivo značajnosti iznosi 0,05).

Najveća pozitivna korelacija uočena je između elemenata Sr-Cu (0,613), Mn – Ni (0,609), Mn-Cu (0,536) i Ni-Cu (0,511) u slučaju ledenih čajeva dok kod kombuche najveća pozitivna korelacija uočena je između Sr-Cu (0,718), Sr-Zn (0,614) i Fe-Mn (0,432) dok kod ostalih varijabilni nije uočena značajna korelacija. Veća korelacija upućuje na pretpostavku o sličnom porijeklo metala u ispitivanim uzorcima.

4.6.2. Analiza glavnih komponenti (PCA)

Kako bi se dobilo što više informacija iz uzoraka i iz varijabli te za detaljniju procjenu podataka primijenjena je PCA. PCA omogućuje promatranje sličnosti i/ili razlika između uzoraka ledenog čaja i kombuche pića procjenom njihovog mineralnog sastava Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr.

Za oba tipa uzoraka PCA je svrstao podatke u šest glavnih komponenti (PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6). Prema Kaiserovom kriteriju, samo su prve tri komponente kod uzoraka ledenog čaja (PC1: 40,91%; PC2: 20,5%, PC3: 16,96%) bile značajne za objašnjenje varijance podataka dok kod uzoraka kombuche samo prve dvije komponente (PC1: 42,291%; PC2: 25,374%). Budući da je svaka komponenta pokazala svojstvene vrijednosti > 1 , zajedno, one su objasnile 78,37% ukupne varijance za uzorke ledenog čaja odnosno 67,664% ukupne varijance za uzorke kombuche (Tablica 17 i 18) i smatrale su se dovoljnim za opisivanje dobivenih podataka (Slika 15 i 16). Ostale glavne komponente nisu značajno doprinosile interpretaciji podataka pa su isključene iz analize. Prva komponenta povezana je sa sadržajem Mn (0,756), Fe (0,498), Ni (0,695) i Cu (0,889); druga komponenta sadrži Sr (0,667) dok treća Zn (0,870) kod uzoraka

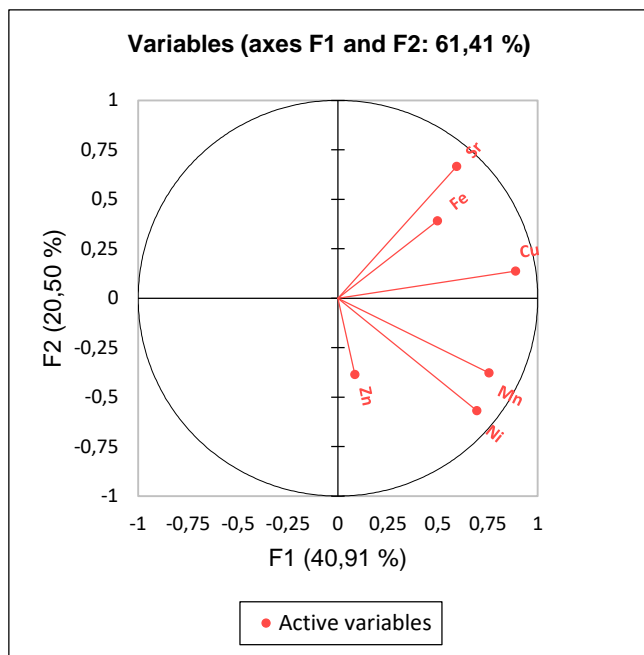
ledenog čaja, a kod uzoraka kombuche prva komponenta sadrži Fe (0,575), Cu (0,781), Zn (0,738) i Sr (0,878), dok druga komponenta sadrži Mn (0,689) i Ni (0,493).

Tablica 17. PCA komponente za uzorke ledenog čaja.

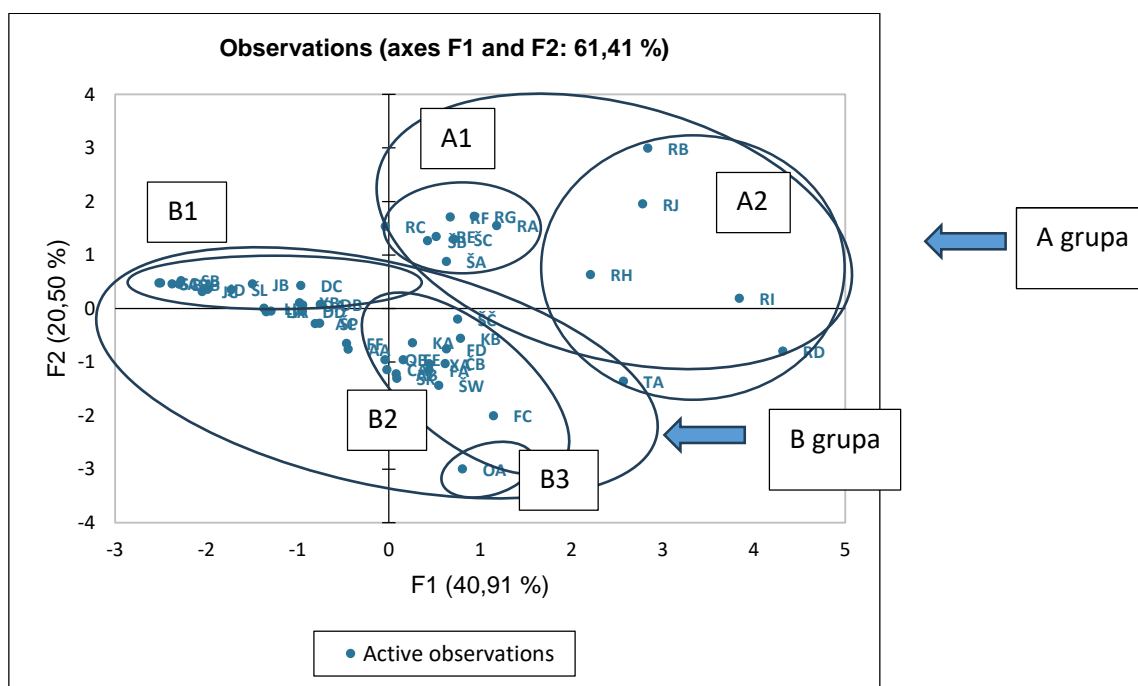
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Vrijednost komponente	2,454	1,230	1,018	0,697	0,382	0,219
Varijanca(%)	40,907	20,502	16,964	11,617	6,365	3,645
Ukupna varijanca %	40,907	61,409	78,373	89,990	96,355	100,000

Tablica 18. PCA komponente za uzorke kombuche.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Vrijednost komponente	2,537	1,522	0,794	0,515	0,433	0,198
Varijanca(%)	42,291	25,374	13,230	8,590	7,217	3,299
Ukupna varijanca %	42,291	67,664	80,894	89,484	96,701	100,000



Slika 15. Graf opterećenja analiziranih ledenih čajeva.



Slika 16. Graf rezultata analiziranih ledenih čajeva.

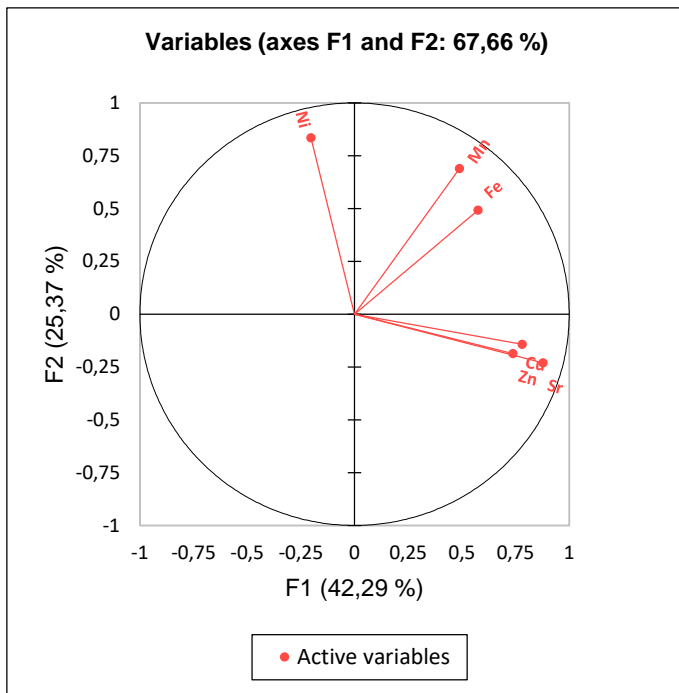
Na grafu rezultata dobivenih projekcijom $PC1 \times PC2$ za uzorke ledenog čaja (Slika 16), postoji jasno odvajanje dviju glavnih skupina, nazvanih skupina A i B. Skupine A i B podijeljene su prema sličnostima koje pokazuju uzorci kako slijedi: Grupa A se sastojala od 14 uzoraka ledenog čaja) podijeljena u 2 podskupine (A1, i A2), a grupa B se sastojala od 36 uzoraka

podijeljena u 3 podskupine (B1, B2 i B3). Do ovog odvajanja prvenstveno je došlo zbog razlika u sadržaju elemenata između ispitivanih uzoraka ledenog čaja.

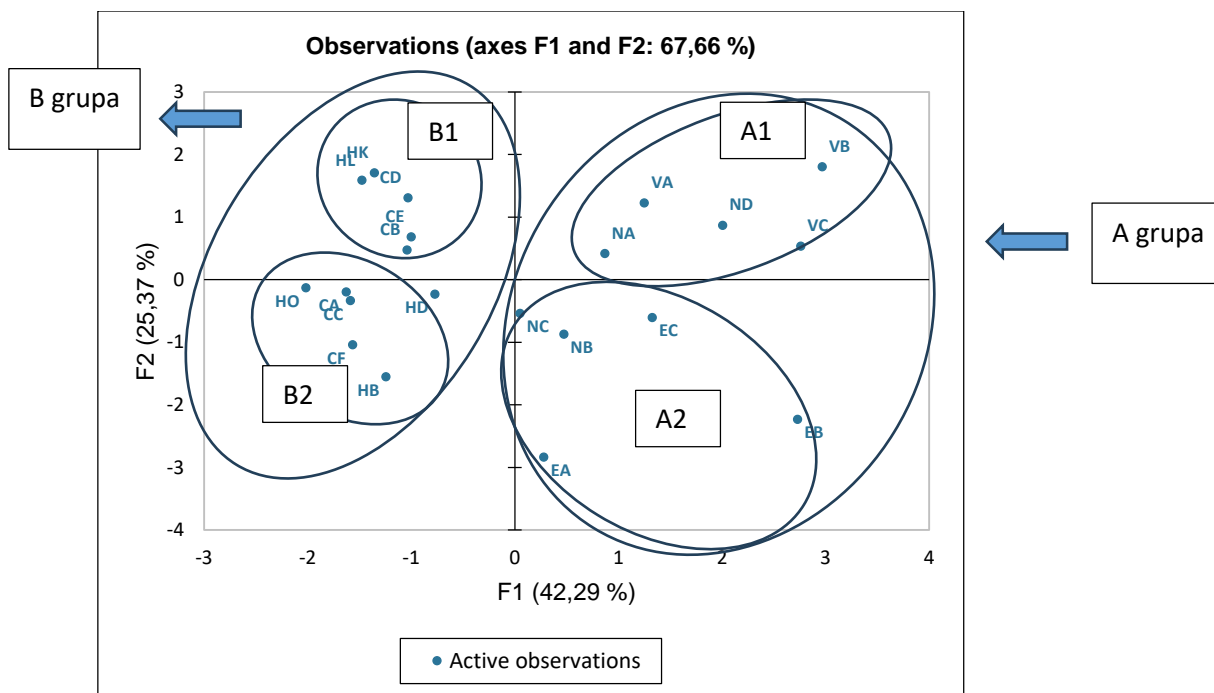
Uzorci iz grupe A su pozitivno pozicionirani u PC1 naspram PC2, s izuzetkom RC uzorka koji je negativno pozicioniran u podskupini A1.

PC1 komponenta objašnjava 40,91 % varijance te pokazuje informacije o svim elementima (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn i Sr) koji su pozitivno pozicionirani na grafu PC1 te su značajni diskriminirajući faktor za uzorke prisutne u skupini A u odnosu na uzorke prisutne u skupini B (Slika 15). Uzorci prisutni u podskupini A2 (TA, RB, RD, RH, RI i RJ) pokazuju veliku pozitivnu korelaciju sa većim sadržajem Fe dok uzorci RD i TZ ide i prema Mn i Ni zbog većeg sadržaja ovih elemenata u ovim uzorcima u odnosu na druge. Kod grupe A vidljiva je i podjela u podskupine prema vrsti osnovnog čaja od kojeg su izrađeni pa tako uzorci podskupine A1 izrađeni su od crnog i voćnog čaja dok uzorci podskupine A2 samo od voćnog čaja a, kod uzorka RD nije naveden podatak o vrsti čaja.

PC2, koji objašnjava 20,5% varijance podataka, varijable Fe, Cu, i Sr, koje su pozitivno pozicionirane na PC2, direktno su povezane s uzorcima sadržanim u podskupini B1, dok negativno pozicionirane varijable Zn, Mn i Ni odgovorne su za grupiranje uzoraka u podskupinu B2. Varijable Mn i Ni su negativno pozicionirani na PC2 i direktno su povezane s uzorcima koji pripadaju B2 podskupini jer sadrže značajno veće koncentracije ovih elemenata u odnosu na druge uzorke iz drugih skupina. Nadalje, također se može potvrditi da se samo jedan uzorak (OA) izdvaja izolirano od onih koji pripadaju skupini B1 i B2 jer predstavlja značajnu korelaciju s visokim razinama Zn koji je negativno pozicionirajući u PC2 naspram PC1.



Slika 17. Graf opterećenja analiziranih kombucha.



Slika 18. Graf rezultata analiziranih kombucha.

Kao i kod uzoraka ledenog čaja, na grafu rezultata dobivenih projekcijom $PC1 \times PC2$ za uzorke kombuche (Slika 18), postoji jasno odvajanje dviju skupina, skupina A i B. Skupine A i B podijeljene su prema sličnostima koje pokazuju uzorci kako slijedi: Skupina A se sastojala od 9 uzoraka kombuche) podijeljena u 2 podskupine (A1 i A2), a grupa B se sastojala od 12

uzoraka podijeljena utakođer u 2 podskupine (B1 i B2). Kao i kod ledenog čaja i u ovom slučaju do ovog odvajanja prvenstveno je došlo zbog razlika u sadržaju elemenata između ispitivanih uzoraka kombuche.

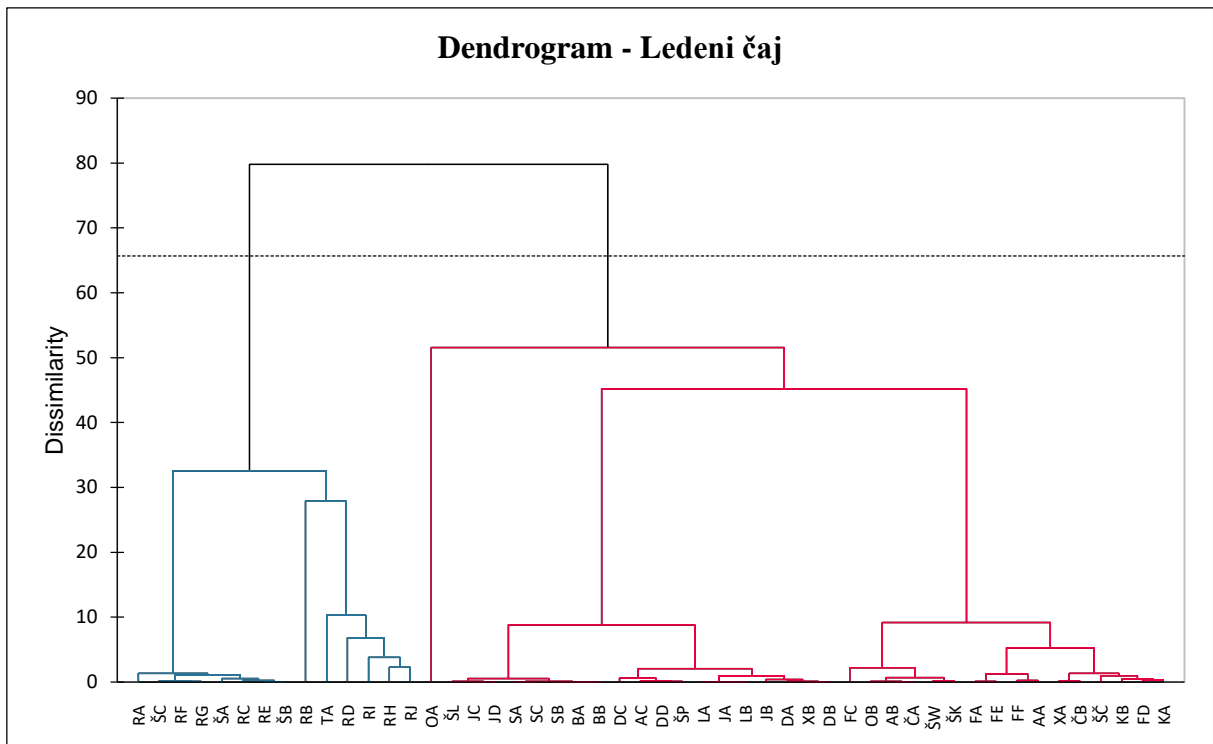
Svi uzorci iz skupine A su pozitivno pozicionirani u PC1. PC1 komponenta objašnjava 42,29 % varijance te pokazuje informacije o svim elementima (Mn, Fe, Cu, Zn i Sr) koji su pozitivno pozicionirani na grafu PC1 (Slika 17). Uzorci prisutni u podskupini A2 (EA, EB, EC i NB) pokazuju veliku pozitivnu korelaciju sa većim sadržajem Sr i Zn u odnosu na uzorke svrstane u podskupinu A1. S druge strane, varijable Mn i Fe su direktno povezane s uzorcima iz podskupine A1, s obzirom na veliki sadržaj ovih elemenata u svim ispitivanim uzorcima. Nadalje, uzorci podskupine A1 izrađeni su prvenstveno od zelenog čaja dok uzorci iz podskupine A2 od mješavine crnog i zelenog.

Varijable Mn, Fe i Ni su pozitivno pozicionirani na PC2 i direktno su povezane s uzorcima koji pripadaju B1 podskupini (CB, CD, CE, HK i HL) jer sadrže značajno veće koncentracije ovih elemenata u odnosu na druge uzorke iz druge skupine. PC2, koji objašnjava 25,37% varijance podataka, varijable Zn, Cu, i Sr, koje su negativno pozicionirane na PC2, direktno su povezane s uzorcima sadržanim u podskupini B2.

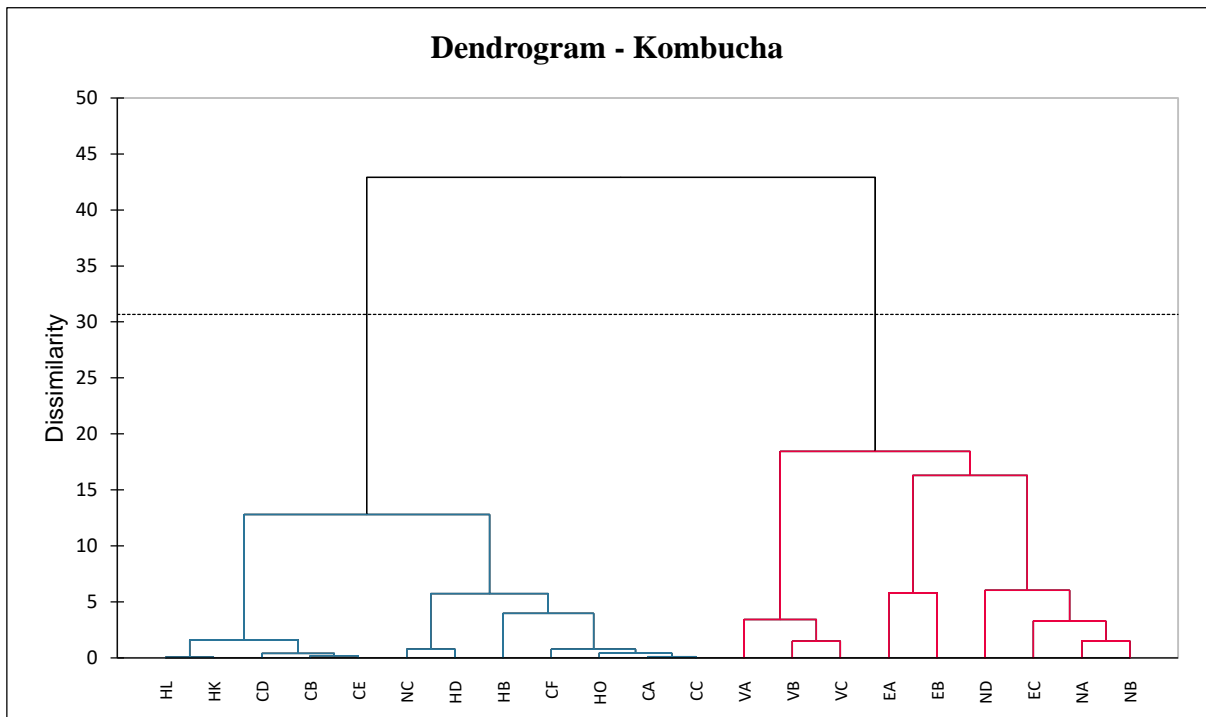
Svi prikupljeni uzorci gotovih ledenih čajeva kao i kombuche pripadaju različitim proizvođačima, imaju različitu vrstu osnovnog čaja, % ekstrakta čaja i/ili koncentriranog soka, različitog okusa, multivarijatna analiza ih je uspješno svrstala u skupine na temelju sličnosti u sastavu elemenata u tragovima.

4.6.3. Hijerarhijska klusterska analiza (HCA)

Rezultati korelacija uočenih dvodimenzionalnom projekcijom glavnih komponenti PC1 × PC2 rezultata za oba tipa uzoraka (Slika 16 i 18) potvrđeni su formiranim klasterima (Slika 19 i 20).



Slika 19. Dendrogram za uzorke ledenog čaja.



Slika 20. Dendrogram za uzorke kombuche.

Dendrogrami prikazani na slici 19 i 20 primijenjeni na podatke o sadržaju metala u ispitanim uzorcima jasno pokazuju formiranje dva klastera odvojenih najvećom različitošću, identificiranih kao klasteri A i B s euklidskom udaljenošću od 80 kod uzoraka ledenog čaja, a 43 kod uzoraka kombuche. Analizirajući dendrogram ledenog čaja s lijeva na desno, klaster A pokazao je euklidsku udaljenost od 32,0. Ovaj klaster formirala je podskupina A1, dok je podskupina A2 pokazala manju sličnost prema analizi podskupina formiranih u HCA, što odgovara rezultatima PCA.

Klaster B pokazao je euklidsku udaljenost od 50. Ovaj klaster čini podskupina B1 i podskupina B2 te posebno uzorak OA (B3). Kod ovog klastera vidljiva je veća sličnost između podskupina, što je također u skladu s opažanjima na grafikonu rezultata $PC1 \times PC2$.

Analizirajući dendrogram kombuche s lijeva na desno, klaster B pokazao je euklidsku udaljenost od 13,0. Ovaj klaster formirao je podskupinu B1 i podskupinu B2 te pokazuje manju sličnost prema analizi podskupina formiranih u HCA, što odgovara rezultatima PCA.

Klaster A pokazao je euklidsku udaljenost od 18. Ovaj klaster čini podskupina A1 i podskupina A2 koja sadrži isto još dvije podskupine. Kod ovog klastera vidljiva je veća sličnost između najmanjih formiranih podgrupa, što je također u skladu s opažanjima na grafikonu rezultata $PC1 \times PC2$.

5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju korištena je TXRF tehnika za kvantitativnu analizu Fe, Mn, Ni, Cu, Zn i Sr u komercijalno dostupnim uzorcima ledenog čaja (n= 50) i kombuche (n=21) na hrvatskom tržištu. Kroz istraživanje istaknuto je slijedeće:

- Izmjerene koncentracije elemenata pokazale su velike varijacije u sadržaju ispitivanih elemenata kod različitih uzoraka ledenog čaja i kombuche.
- Radi potvrde točnosti rezultata dobivenih primjenom TXRF, svi uzorci analizirani su i referentnom tehnikom, ICP-MS. Dobivene koncentracije svih ispitivanih elemenata primjenom obje tehnike, ICP-MS i TXRF, nisu pokazale statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).
- TXRF tehnika je potencijalno ekološki vrlo značajna za analizu ovog tipa uzoraka (AGREE rezultat = 0,9).
- 60 uzoraka (84,5 %) od ukupno 71 analiziranog ledenog čaja i kombuche, zabilježilo je prekoračenje zahtjeva smjernice za barem jedan analizirani element.
- Prekoračenja zahtjeva smjernice za analizirane elemente u uzorcima ledenog čaja i kombuche kretala su se od minimalnog prekoračenja od 3,06 % za Cu, do maksimalnog prekoračenja od 1281,08 % za Mn.
- Konzumacija niti jednog ledenog čaja ili kombuche u količini od 0,5 L dnevno ne prelazi preporučene referentne količine ukupnog dnevnog unosa pojedinog elementa.
- Imajući u vidu različite puteve unosa, 49,32 % preporučenog dnevnog unosa Mn za ledeni čaj RD, 32,47 % unosa Zn za ledeni čaj OA, 23,37 % unosa Mn za kombuchu VB mogu biti okarakterizirane kao značajne i potencijalno visoke.
- Multivarijatna analiza je sve analizirane uzorke gotovih ledenih čajeva kao i kombuche uspješno svrstala u skupine na temelju sličnosti u sastavu elemenata u tragovima.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan, na uloženom trudu, nesebičnoj pomoći, konstantnoj dostupnosti te bezuvjetnoj spremnosti na odgovaranje svih mojih upita. Prijateljskim pristupom tokom rada učinila je ovo istraživanje i pisanje poticajnim i zanimljivim.

Zahvaljujem i tehničkoj suradnici na Zavodu za analitičku kemiju, Nensi Cicvara na trudu, pomoći i podršci tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja u laboratoriju.

7. POPIS LITERATURE

- AHFES, 2021. Soft Drinks : European market , consumer trends ,and innovation (No. AHFES A6.2_Soft drinks report_20210722).
- Akinyele, I.O., Shokunbi, O.S., 2015. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chem.* 173, 682–684. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.097>
- AOAC, 2013. AOAC SMPR 2012.007: Standard Method Performance Requirements for Determination of Heavy Metals in a Variety of Foods and Beverages. *J. AOAC Int.* 96, 704. <https://doi.org/10.5740/jaoac.int.2012.007>
- Ashenef, A., 2014. Essential and toxic metals in tea (*Camellia sinensis*) imported and produced in Ethiopia. *Food Addit. Contam. Part B* 7, 30–36. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.831951>
- Ferreira da Costa, B., 2015. Luso Tea Case Study: A natural brand extension in the ice-tea category (MSc in Business Administration). Universidade Católica Portuguesa, Lisbon.
- Behrens, J.H., Silva, M.A.A.P.D., 2004. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. *Ciênc. E Technol. Aliment.* 24, 431–439. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000300023>
- Bilo, F., Borgese, L., Cazzago, D., Zacco, A., Bontempi, E., Guarneri, R., Bernardello, M., Attuati, S., Lazo, P., Depero, L.E., 2014. TXRF analysis of soils and sediments to assess environmental contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13208–13214. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2203-y>
- Bingöl, M., Yentür, G., Er, B., Öktem, A.B., 2010. Determination of some heavy metal levels in soft drinks from Turkey using ICP/OES method. *Czech J. Food Sci.* 28, 213–216. <https://doi.org/10.17221/158/2008-CJFS>
- Borgese, L., Bilo, F., Dalipi, R., Bontempi, E., Depero, L.E., 2015. Total reflection X-ray fluorescence as a tool for food screening. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 113, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.08.001>
- Borgese, L., Bilo, F., Tsuji, K., Fernández-Ruiz, R., Margui, E., Strelis, C., Pepponi, G., Stosnach, H., Yamada, T., Vandenabeele, P., Maina, D.M., Gatari, M., Shepherd, K.D., Towett, E.K., Bennun, L., Custo, G., Vasquez, C., Depero, L.E., 2014. First Total Reflection X-Ray Fluorescence round-robin test of water samples: Preliminary results. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 101, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.06.024>

- Borgese, L., Salmistraro, M., Gianoncelli, A., Zacco, A., Lucchini, R., Zimmerman, N., Pisani, L., Siviero, G., Depero, L.E., Bontempi, E., 2012. Airborne particulate matter (PM) filter analysis and modeling by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) and X-ray standing wave (XSW). *Talanta* 89, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.073>
- Borgese, L., Zacco, A., Bontempi, E., Colombi, P., Bertuzzi, R., Ferretti, E., Tenini, S., Depero, L.E., 2009. Total reflection of x-ray fluorescence (TXRF): a mature technique for environmental chemical nanoscale metrology. *Meas. Sci. Technol.* 20, 084027. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/20/8/084027>
- Čížková, H., Voldřich, M., Mlejnecká, J., Kvasnička, F., 2008. Authenticity evaluation of tea-based products. *Czech J. Food Sci.* 26, 259–267. <https://doi.org/10.17221/10/2008-CJFS>
- Coelho, R.M.D., Almeida, A.L.D., Amaral, R.Q.G.D., Mota, R.N.D., Sousa, P.H.M.D., 2020. Kombucha: Review. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Vitali Čepo, D., Karoglan, M., Borgese, L., Depero, L.E., Marguí, E., Jablan, J., 2022. Application of benchtop total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and chemometrics in classification of origin and type of Croatian wines. *Food Chem.* 13. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100209>
- Dalipi, R., Marguí, E., Borgese, L., Bilo, F., Depero, L.E., 2016. Analytical performance of benchtop total reflection X-ray fluorescence instrumentation for multielemental analysis of wine samples. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 120, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.04.001>
- Dalipi, R., Marguí, E., Borgese, L., Depero, L.E., 2017. Multi-element analysis of vegetal foodstuff by means of low power total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Food Chem.* 218, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.022>
- De Vives, A.E.S., Brienza, S.M.B., Moreira, S., Zucchi, O.L.A.D., Barroso, R.C., Do Nascimento Filho, V.F., 2007. Evaluation of the availability of heavy metals in lake sediments using SR-TXRF. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* 579, 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2007.04.111>
- De Vives, A.E.S., Moreira, S., Brienza, S.M.B., Medeiros, J.G.S., Filho, M.T., Zucchi, O.L.A.D., Filho, V.F.D.N., 2006. Monitoring of the environmental pollution by trace

- element analysis in tree-rings using synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 61, 1170–1174. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.08.007>
- European Commission, 2020. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption (recast) (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union* L 435/1, 1–62.
- European Commission, 2008. Commission Regulation (2008) N.° 629/2008 amending regulation (EC) N.° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* L 173/6, 6–9.
- Europska komisija, 2006. Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (Tekst značajan za EGP). *Off. J. Eur. Union*.
- Fabijanić, I., 2020. Mikrobiološka kontrola u proizvodnji ledenog čaja (Undergraduate thesis). Karlovac University of Applied Sciences, Karlovac.
- FAO/WHO, 2019. Codex Alimentarius, General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed.
- FAO/WHO, 2017. Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF.
- FAO/WHO, 2003. Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems, in: Food and Agriculture Organization of The United Nations and World Health Organization (Ed.). Agriculture and consumer protection, Rome, pp. 1–73.
- FAO/WHO, 1989. Evaluation of certain food additives and contaminants, in: Thirty-Third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. AdditivesWHO Technical Report Series No. 776., Geneva.
- Farooq, M., Anwar, F., Rashid, U., 2008. Appraisal of heavy metal contents in different vegetables grown in the vicinity of an industrial area. *Pak. J. Bot.* 40(5), 2099–2106.
- Fernández, P.L., Pablos, F., Martín, M.J., González, A.G., 2002. Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chem.* 76, 483–489. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00312-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00312-0)
- Holly Strawbridge, 2020. Artificial sweeteners: sugar-free, but at what cost? *Harv. Health Publ. Harv. Med. Sch.* URL <https://www.health.harvard.edu/blog/artificial-sweeteners-sugar-free-but-at-what-cost-201207165030> (pristupljeno 25.08.2024.).

- International Organisation of Vine and Wine, 2023. Compendium of International Methods of Wine and Must.
- Jablan, J., Besalú, E., Žarak, M., Dumić, J., Marguí, E., 2021. Analytical potential of total reflection X-ray fluorescence spectrometry for simultaneous determination of iron, copper and zinc in human blood serum and plasma. *Talanta* 233, 122553. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122553>
- Jin, C.W., Zheng, S.J., He, Y.F., Zhou, G.D., Zhou, Z.X., 2005. Lead contamination in tea garden soils and factors affecting its bioavailability. *Chemosphere* 59, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.058>
- Kafetzopoulos, D.P., Gotzamani, K.D., 2014. Critical factors, food quality management and organizational performance. *Food Control* 40, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.029>
- Beebe, K.R., Pell, R.J., Seasholtz, M.B., 1998. *Chemometrics: A Practical Guide*. John Wiley & Sons, New York.
- Kim, J., Adhikari, K., 2020. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages* 6, 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>
- Klockenkämper, R., Bohlen, A. von, 2015. Total reflection X-ray fluorescence analysis and related methods, 2. ed. ed, *Chemical analysis*. Wiley, Hoboken, NY.
- Klockenkämper, R., Knoth, J., Schwenke Heinrich, Prange Andreas, 1992. Total-Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy. *Anal. Chem.* 64, 1115A-1123A. <https://doi.org/10.1021/ac00047a717>
- Lukaski, H.C., Penland, J.G., 1996. Functional Changes Appropriate for Determining Mineral Element Requirements. *J. Nutr.* 126, 2354S-2364S. https://doi.org/10.1093/jn/126.suppl_9.2354S
- Mandlate, J.S., Soares, B.M., Seeger, T.S., Vecchia, P.D., Mello, P.A., Flores, E.M.M., Duarte, F.A., 2017. Determination of cadmium and lead at sub-ppt level in soft drinks: An efficient combination between dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 221, 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.075>
- Marguí, E., Dalipi, R., Sangiorgi, E., Bival Štefan, M., Sladonja, K., Rogga, V., Jablan, J., 2022. Determination of essential elements (Mn, Fe, Cu and Zn) in herbal teas by TXRF, FAAS and ICP-OES. *X-Ray Spectrom.* 51, 204–213. <https://doi.org/10.1002/xrs.3241>

- Marguí, E., Eichert, D., Jablan, J., Bilo, F., Depero, L.E., Pejović-Milić, A., Gross, A., Stosnach, H., Kubala-Kukuš, A., Banaš, D., Borgese, L., 2024. An overview of the applications of total reflection X-ray fluorescence spectrometry in food, cosmetics, and pharmaceutical research. *J. Anal. At. Spectrom.* 39, 1700–1719. <https://doi.org/10.1039/D4JA00096J>
- Marguí, E., Floor, G.H., Hidalgo, M., Kregsamer, P., Román-Ross, G., Strelj, C., Queralt, I., 2010. Analytical Possibilities of Total Reflection X-ray Spectrometry (TXRF) for Trace Selenium Determination in Soils. *Anal. Chem.* 82, 7744–7751. <https://doi.org/10.1021/ac101615w>
- Marguí, E., Jablan, J., Gerić, M., Inić, S., Domijan, A.-M., Janušić, R., Šarčević, B., Queralt, I., Garaj-Vrhovac, V., 2019. Critical evaluation of the use of total reflection X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of whole blood samples: application to patients with thyroid gland diseases. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01618-3>
- Marguí E., Van Grieken, R., 2013. X-ray fluorescence spectrometry and related techniques: An introduction. Momentum Press, New York.
- Marguí, E., Queralt, I., Pessanha, S., Jablan, J., Bačić, I., Pavić, M., 2022. Characterization of binders and pigments using an integrated analytical approach: Application to wooden reliefs created by Vasko Lipovac in the 1970s. *Microchem. J.* 173.
- Martinez, T., Lartigue, J., Zarazua, G., Avila-Perez, P., Navarrete, M., Tejeda, S., 2008. Application of the Total Reflection X-ray Fluorescence technique to trace elements determination in tobacco. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 63, 1469–1472. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.008>
- Martins, A.S., Junior, J.B.P., De Araújo Gomes, A., Carvalho, F.I.M., Filho, H.A.D., Das Graças Fernandes Dantas, K., 2020. Mineral Composition Evaluation in Energy Drinks Using ICP OES and Chemometric Tools. *Biol. Trace Elem. Res.* 194, 284–294. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01770-y>
- Mejías, C., Arenas, M., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2023. Green Assessment of Analytical Procedures for the Determination of Pharmaceuticals in Sewage Sludge and Soil. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2276294>
- De la Guardia, M., Garrigues, S., 2015. Handbook of Mineral Elements in Food. Wiley-Blackwell.

- Milani, R.F., Morgano, M.A., Cadore, S., 2018. A Simple and Reliable Method to Determine 16 Trace Elements by ICP OES in Ready to Drink Beverages. *Food Anal. Methods* 11, 1763–1772. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1172-7>
- Milani, R.F., Morgano, M.A., Cadore, S., 2016. Trace elements in *Camellia sinensis* marketed in southeastern Brazil: Extraction from tea leaves to beverages and dietary exposure. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.041>
- Milani, R.F., Sanches, V.L., Morgano, M.A., Cadore, S., 2020. Trace elements in ready-to-drink ice tea: Total content, in vitro bioaccessibility and risk assessment. *Food Res. Int.* 137, 109732. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109732>
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2009. Pravilniku o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namjenjenim za konzumaciju.
- Moreira, S., Ficarís, M., Vives, A.E.S., Filho, V.F.N., Zucchi, O.L.A.D., Barroso, R.C., De Jesus, E.F.O., 2006. Heavy Metals in Groundwater using Synchrotron Radiation Total Reflection X-Ray Analysis. *Instrum. Sci. Technol.* 34, 567–585. <https://doi.org/10.1080/10739140600811682>
- Moreira, S., Vieira, C.B., Filho, B.C., Stefanutti, R., Jesus, E.F.O., 2005. Study of the Metals Absorption in Culture Corn Irrigated with Domestic Sewage by SR-TXRF. *Instrum. Sci. Technol.* 33, 73–85. <https://doi.org/10.1081/CI-200040874>
- Nečemer, M., Kump, P., Ščančar, J., Jaćimović, R., Simčič, J., Pelicon, P., Budnar, M., Jeran, Z., Pongrac, P., Regvar, M., Vogel-Mikuš, K., 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 63, 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.07.006>
- Peixoto, R.R.A., Oliveira, A., Cadore, S., 2012. Multielemental Determinations in Chocolate Drink Powder Using Multivariate Optimization and ICP OES. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8117–8122. <https://doi.org/10.1021/jf303022r>
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M., 2020. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.* 92, 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- Pessanha, S., Carvalho, M.L., Becker, M., Von Bohlen, A., 2010. Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-ray Fluorescence and Energy Dispersive X-ray Fluorescence: Comparison on two vineyards. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 65, 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2010.04.003>

- Preedy, V.R. (Ed.), 2013. Tea in health and disease prevention. Elsevier/Academic Press, London ; Waltham, MA.
- Schmite, B.D.F.P., Bitobrovec, A., Hacke, A.C.M., Pereira, R.P., Weinert, P.L., Dos Anjos, V.E., 2019. In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastrointestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea. *Food Chem.* 281, 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.102>
- Scutarașu, E.C., Trincă, L.C., 2023. Heavy Metals in Foods and Beverages: Global Situation, Health Risks and Reduction Methods. *Foods* 12, 3340. <https://doi.org/10.3390/foods12183340>
- Silva, E.D.S., Da Silva, E.G.P., Silva, D.D.S., Novaes, C.G., Amorim, F.A.C., Dos Santos, M.J.S., Bezerra, M.A., 2019. Evaluation of macro and micronutrient elements content from soft drinks using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. *Food Chem.* 273, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.021>
- Silvestri, C., Silvestri, L., Forcina, A., Di Bona, G., Falcone, D., 2021. Green chemistry contribution towards more equitable global sustainability and greater circular economy: A systematic literature review. *J. Clean. Prod.* 294, 126137. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126137>
- Stosnach, H., 2006. On-site analysis of heavy metal contaminated areas by means of total reflection X-ray fluorescence analysis (TXRF). *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 61, 1141–1145. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.06.007>
- Stosnach, H., 2005. Environmental Trace-Element Analysis Using a Benchtop Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometer. *Anal. Sci.* 21, 873–876. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.873>
- Streli, C., 2006. Recent Advances in TXRF. *Appl. Spectrosc. Rev.* 41, 473–489. <https://doi.org/10.1080/10543400600809318>
- Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., Pohl, P., 2020. Simplified Method of Multi-Elemental Analysis of Dialyzable Fraction of Tea Infusions by FAAS and ICP OES. *Biol. Trace Elem. Res.* 195, 272–290. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01828-x>
- Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., Pohl, P., 2015. Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified – multivariate classification of different tea products. *Microchem. J.* 121, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.02.009>

- Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., Pohl, P., 2012. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* 35, 165–181. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.12.005>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Experientia Supplementum*. Springer Basel, Basel, pp. 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Turnau, K., Ostachowicz, B., Wojtczak, G., Anielska, T., Sobczyk, Ł., 2010. Metal uptake by xerothermic plants introduced into Zn-Pb industrial wastes. *Plant Soil* 337, 299–311. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0527-7>
- UNESDA, 2023. Sales and Consumption. URL <https://www.unesda.eu/sales-and-consumption/> (pristupljeno 25.08.2024.).
- U.S. Environmental Protection Agency, 2018. 2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories.
- Varga, A., Martinez, R.M.G., Zaray, G., Fodor, F., 1999. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. *At. Spectrosc.*
- Viteri, F.E., Gonzalez, H., 2002. Adverse Outcomes of Poor Micronutrient Status in Childhood and Adolescence. *Nutr. Rev.* 60, S77–S83. <https://doi.org/10.1301/00296640260130795>
- Yusà, V., Pardo, O., 2015. Human risk assessment and regulatory framework for minerals in food, in: *Handbook of Mineral Elements in Food*. John Wiley & Sons, p. Chapter 4.
- Wannaz, E.D., Carreras, H.A., Abril, G.A., Pignata, M.L., 2011. Maximum values of Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ in the biomonitor *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae): Relationship with cell membrane damage. *Environ. Exp. Bot.* 74, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.06.012>
- Weisburger, J.H., 1997. Tea and health: a historical perspective. *Cancer Lett.* 114, 315–317. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04691-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04691-0)
- Jongen, W., 2002. *Fruit and vegetable processing: improving quality*. CRC Press, New York.
- World Health Organization, 2017. *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating first addendum, 4th ed + 1st add. ed*. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 2011. *Manganese in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*.

- Xie, M., Von Bohlen, A., Klockenkämper, R., Jian, X., Günther, K., 1998. Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Z. Fr Leb. -Forsch. A* 207, 31–38. <https://doi.org/10.1007/s002170050291>
- Ye, X., Jin, S., Wang, D., Zhao, F., Yu, Y., Zheng, D., Ye, N., 2017. Identification of the Origin of White Tea Based on Mineral Element Content. *Food Anal. Methods* 10, 191–199. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0568-5>
- Zhang L., Zhang J., Chen L., Liu T., Ma G., Liu X., 2018. Influence of manufacturing process on the contents of iron, copper, chromium, nickel and manganese elements in Crush, Tear and Curl black tea, their transfer rates and health risk assessment. *Food Control* 89, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.030>

8. SAŽETAK

Dario Paler

Multielementna analiza ledenog čaja i kombuche dostupnih na hrvatskom tržištu primjenom rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom : zelena analitička metoda, rizici, ekološki otisak i održiva rješenja

Elementna analiza ima veliki značaj u prehrambenoj industriji, kako s prehrambenog stanovišta tako i u svrhu kontrole sigurnosti i kvalitete. U istraživanju su TXRF i ICP-MS tehnikom određeni sadržaji elemenata prisutnih u prikupljenim komercijalno dostupnim uzorcima ledenog čaja (n=50) i kombuche (n=21) na hrvatskom tržištu. Dobivene koncentracije svih ispitivanih elemenata primjenom obje tehnike nisu pokazale statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Procjenom usklađenosti sadržaja elemenata analiziranih uzoraka sa zahtjevima smjernica za kakvoću pitke vode, 60 uzoraka (84,5 %) od ukupno 71 analiziranog ledenog čaja i kombuche, zabilježilo je prekoračenje zahtjeva smjernice za barem jedan analizirani element. Tokom procjene dnevnog unosa elementa zabilježeno je da konzumacija niti jednog ledenog čaja ili kombuche u količini od 0,5 L dnevno ne prelazi preporučene referentne količine ukupnog dnevnog unosa pojedinog elementa za osobu od 70 kg. Primjenom software „AGREE kalkulator” procijenjen je ekološki otisak primijenjenih tehnika/metoda. Uz ostvareni AGREE rezultat od 0,9 TXRF tehnika nameće se kao potencijalno ekološki vrlo značajna za analizu ovog tipa uzoraka naspram referentne ICP-MS tehnike (AGREE rezultat od 0,42). Pearsonovom korelacijskom analizom najveća pozitivna korelacija uočena je između elemenata Sr-Cu (0,613), Mn – Ni (0,609), Mn-Cu (0,536) i Ni-Cu (0,511) u slučaju ledenih čajeva dok kod kombuche najveća pozitivna korelacija uočena je između Sr-Cu (0,718), Sr-Zn (0,614) i Fe-Mn (0,432) dok kod ostalih varijabilni nije uočena značajna korelacija. Svi prikupljeni uzorci gotovih ledenih čajeva kao i kombuche pripadaju različitim proizvođačima, imaju različitu vrstu osnovnog čaja, postotak ekstrakta čaja i/ili koncentriranog soka, različitog su okusa te su multivarijantnom analizom uspješno svrstani u skupine na temelju sličnosti u sastavu elemenata u tragovima.

KLJUČNE RIJEČI: ledeni čaj, kombucha TXRF, ICP-MS, AGREE kalkulator

9. SUMMARY

Dario Paler

Multi-elemental analysis of iced tea and kombucha on the Croatian market using total reflection X-ray fluorescence spectrometry: green analytical method, risks, ecological footprint and sustainable solutions

Elemental analysis is of great importance in the food industry both from a nutritional point of view and for the purposes of safety and quality control. In this study, the elemental contents in commercially samples of ready-to-drink iced teas (n=50) and kombuchas (n=21) on the Croatian market were determined using TXRF and ICP-MS techniques. The concentrations of all tested elements determined with both techniques showed no statistically significant differences ($p < 0.05$). When assessing the compliance of the element contents of the analyzed samples with the requirements of drinking water quality guidelines, 60 samples (84.5%) out of the total 71 analyzed iced teas and kombuchas exceeded the guideline values for at least one analyzed element. When evaluating the daily intake of elements, it was found that neither the consumption of iced tea nor kombuchas in a quantity of 0.5 L per day exceeded the recommended reference quantities for the total daily intake of the individual elements for a 70 kg person. The ecological footprint of the techniques/methods used was assessed using the "AGREE calculator" software. With an AGREE value of 0.9, the TXRF technique proves to be potentially very environmentally relevant for the analysis of this type of sample compared to the ICP-MS reference technique (AGREE value of 0.42). Pearson's correlation analysis showed the highest positive correlation between Sr-Cu (0.613), Mn-Ni (0.609), Mn-Cu (0.536), and Ni-Cu (0.511) elements in the case of iced tea, while in kombuchas, the highest positive correlation was found between Sr-Cu (0.718), Sr-Zn (0.614) and Fe-Mn (0.432), while no significant correlation was observed for other variables. All collected samples of ready-to-drink iced teas and kombuchas are from different manufacturers, have different types of base tea, different percentages of tea extract and/or concentrated juice, and different flavors, and were successfully grouped by multivariate analysis based on similarities in trace element composition.

KEYWORDS: ready-to-drink iced tea, kombucha, TXRF, ICP-MS, AGREE calculator

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 16. lipnja 2001. u Zagrebu. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja četiri puta sam sudjelovao na Državnom natjecanju iz kemije te jednom na Državnom natjecanju iz biologije. Osvojio sam prvo mjesto na Državnom natjecanju školskih sportskih društava u futsalu te sudjelovao kao finalist na Europskom statističkom natjecanju. Završio sam zagrebačku XV. gimnaziju te sam trenutno student 4. godine studija Farmacija na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Tokom prethodne tri studijske godine dobitnik sam nagrade za najbolji postignuti uspjeh u akademskim godinama 2020./2021., 2021./2022., 2022./2023. U akademskoj godini 2023./2024. obnašam dužnost tajnika Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske, tajnika Studentskog zbora Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te voditelja tima logistike 10. CPSA Kongresa. Aktivno se uključujem u većinu projekata Udruge te sam tako sudjelovao u Natjecanju u marketinškim vještinama na temu debljine, Natjecanju u konzultacijskim vještinama na temu nesanice (2. mjesto), Soft Skills Akademiji, Student Exchange Programme-u.