

Primjena difrakcijskih tehnika u analizi dodataka prehrani

Grbeša, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:009333>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PRIMJENA DIFRAKCIJSKIH TEHNIKA U ANALIZI DODATAKA
PREHRANI**

ZAVRŠNI RAD

**JELENA GRBEŠA
Matični broj: 109**

Split, srpanj 2023.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**PRIMJENA DIFRAKCIJSKIH TEHNIKA U ANALIZI DODATAKA
PREHRANI**

ZAVRŠNI RAD

**JELENA GRBEŠA
Matični broj: 109**

Split, srpanj 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY
FOOD TECHNOLOGY**

**APPLICATION OF DIFFRACTION TECHNIQUES IN THE
ANALYSIS OF FOOD SUPPLEMENTS**

BACHELOR THESIS

JELENA GRBEŠA

Parent number: 109

Split, July 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Mentor: prof. dr. sc. Dražan Jozić

PRIMJENA DIFRAKCIJSKIH TEHNIKA U ANALIZI DODATAKA PREHRANI

Jelena Grbeša, 109

Sažetak: Dodaci prehrani obogaćuju svakodnevnu prehranu s primarnim zadatkom očuvanja zdravlja. Upravo zbog svih benefita koje pružaju ljudskom organizmu, potrebno je zadovoljiti dnevne potrebe vitamina i minerala, no nažalost to je sve teže zbog suvremenog načina života i nedostatka raznolikosti u rutinskoj prehrani ljudi. Najučestaliji dodaci koji se koriste kao nadomjestak hrani su vitamini, minerali i biljni ekstrakti. U poslijednje vrijeme dostupnost različitih pripravaka od različitih proizvođača je lakša nego ikada do sada. Osim toga, prodaja ovih pripravaka je i medijski popraćena na način da se kupce stimulira na kupovinu istih kroz navođenje niza djelotvornih učinaka na zdravlje poput smanjenja apetita, povećanja mišićne mase, poboljšanja pamćenja i cirkulacije itd. Spomenuta kategorija pripravaka smatra se hranom zbog čega je zakonska regulativa manje rigorozna u usporedbi s kontrolom lijekova koji podliježu strogim ispitivanjima. Uobičajene analitičke metode koje se primjenjuju u analizi dodataka prehrani su kromatografske i spektroskopske metode. U ovom radu korištena je rendgenska difrakcijska analiza (XRD) na praškastim, polikristalnim uzorcima mineralnih dodataka prehrani u cilju utvrđivanja učinkovitosti iste u analizi dodataka prehrani.

Ključne riječi: dodaci prehrani, minerali, vitamini, XRD

Rad sadrži: 58 stranica, 40 slika, 10 tablica, 56 literaturnih reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

- | | |
|--|-------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza | član |
| 3. prof. dr.sc. Dražan Jozić | mentor |

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i električnom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study Food Tehnology**

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Supervisor: Dražan Jozic, PhD, Full professor

APPLICATION OF DIFFRACTION TECHNIQUES IN ANALYSIS OF FOOD SUPPLEMENTS

Jelena Grbeša, 109

Abstract: Dietary supplements enrich the daily diet with the primary task of maintaining health. Precisely because of all the benefits they provide to the human body, it is necessary to meet the daily needs of vitamins and minerals, but unfortunately this is increasingly difficult due to the modern way of life and the lack of variety in the routine diet of people. The most common supplements used as food substitutes are vitamins, minerals and plant extracts. Recently, the availability of various preparations from different manufacturers is easier than ever. In addition, the sale of these preparations is accompanied by the media in such a way as to stimulate customers to buy them by stating a number of effective effects on health, such as reducing appetite, increasing muscle mass, improving memory and circulation, etc. The mentioned category of preparations is considered as food, therefore the legal regulations are less strict than for medicinal products, which are subject to strict control. Common methods of analysis for food supplements are chromatographic and spectroscopic methods. In this work, X-ray diffraction analysis (XRD) was used on powdered, polycrystalline samples of mineral food supplements in order to determine the effectiveness of the same in supplement analysis.

Keywords: dietary supplements, minerals, vitamins, XRD

Thesis contains: 58 pages, 40 figures, 10 tables, 56 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- | | |
|---|----------------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, PhD, Assoc. Prof.. | chair person |
| 2. Danijela Skroza, PhD, Assoc. Prof. | member/co-supervisor |
| 3. Dražan Jozic, PhD, Full Prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Završni rad je izrađen u Zavodu za anorgansku tehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dražana Jozića u razdoblju od veljače do srpnja 2023. godine.

Iskreno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Dražanu Joziću na vodstvu i korisnim savjetima koji su mi pomogli prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i motivaciji tijekom studiranja.

ZADATAK

Zadatak ovog rada je istražiti sastav odabranih prehrabnenih dodataka Dietpharm tvrtke primjenom difrakcijskih tehnika u svrhu usporedbe vjerodostojnosti informacija prikazanih na deklaraciji pripravaka sa stvarnim sastavom istih. U prikupljanju difrakcijskih podataka koristiti Omega-2Theta geometriju te podatke prikupiti u širokom kutnom području. U svrhu identifikacije mineralnih vrsta prisutnih u dodacima prehrani prikupljene difrakcijske slike korigirati na sistematske pogreške te iste usporediti s podacima sadržanim u ICDD bazi podataka (eng. *International Crystallographic Diffraction Database, Release 2020*).

SAŽETAK

Dodaci prehrani obogaćuju svakodnevnu prehranu s primarnim zadatom očuvanja zdravlja. Upravo zbog svih benefita koje pružaju ljudskom organizmu, potrebno je zadovoljiti dnevne potrebe vitamina i minerala, no nažalost to je sve teže zbog suvremenog načina života i nedostatka raznolikosti u rutinskoj prehrani ljudi. Najučestaliji dodaci koji se koriste kao nadomjestak hrani su vitaminii, minerali i biljni ekstrakti. U poslijednje vrijeme dostupnost različitih pripravaka od različitih proizvođača je lakša nego ikada do sada. Osim toga, prodaja ovih pripravaka je i medijski popraćena na način da se kupce stimulira na kupovinu istih kroz navođenje niza djelotvornih učinaka na zdravlje poput smanjenja apetita, povećanja mišićne mase, poboljšanja pamćenja i cirkulacije itd. Spomenuta kategorija pripravaka smatra se hranom zbog čega je zakonska regulativa manje rigorozna u usporedbi s kontrolom lijekova koji podliježu strogim ispitivanjima. Uobičajene analitičke metode koje se primjenjuju u analizi dodataka prehrani su kromatografske i spektroskopske metode. U ovom radu korištena je rendgenska difrakcijska analiza (XRD) na praškastim, polikristalnim uzorcima mineralnih dodataka prehrani u cilju utvrđivanja učinkovitosti iste u analizi dodataka prehrani.

Ključne riječi: dodaci prehrani, minerali, vitamini, XRD

SUMMARY

Dietary supplements enrich the daily diet with the primary task of maintaining health. Precisely because of all the benefits they provide to the human body, it is necessary to meet the daily needs of vitamins and minerals, but unfortunately this is increasingly difficult due to the modern way of life and the lack of variety in the routine diet of people. The most common supplements used as food substitutes are vitamins, minerals and plant extracts. Recently, the availability of various preparations from different manufacturers is easier than ever. In addition, the sale of these preparations is accompanied by the media in such a way as to stimulate customers to buy them by stating a number of effective effects on health, such as reducing appetite, increasing muscle mass, improving memory and circulation, etc. The mentioned category of preparations is considered as food, therefore the legal regulations are less strict than for medicinal products, which are subject to strict control. Common methods of analysis for food supplements are chromatographic and spectroscopic methods. In this work, X-ray diffraction analysis (XRD) was used on powdered, polycrystalline samples of mineral food supplements in order to determine the effectiveness of the same in supplement analysis.

Keywords: dietary supplements, minerals, vitamins, XRD

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Vitamini i minerali | 2 |
| 1.1.1. Vitamini | 2 |
| 1.1.1.1. Povijest vitamina..... | 2 |
| 1.1.1.2. Podjela vitamina | 3 |
| 1.1.1.3. Funkcionalnost vitamina..... | 3 |
| 1.1.2. Minerali | 5 |
| 1.1.2.1. Povijest minerala..... | 5 |
| 1.1.2.2. Podjela minerala | 6 |
| 1.1.2.3. Funkcionalnost minerala..... | 6 |
| 1.2. Potrebe za dodacima prehrani | 8 |
| 1.3. Zakonska regulativa dodataka prehrani | 10 |
| 1.4. Proizvodnja dodataka prehrani..... | 12 |
| 1.5. Metode karakterizacije dodataka prehrani | 14 |
| 1.5.1. Kromatografija | 15 |
| 1.5.1.1. Tekućinska kromatografija | 15 |
| 1.5.1.2. Plinska kromatografija..... | 17 |
| 1.5.2. Rendgenska difrakcijska analiza | 18 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 23 |
| 2.1. Materijali | 23 |
| 2.2. Priprema uzorka | 24 |
| 2.3. Difrakcija X-zraka na praškastim uzrocima..... | 26 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1. | Uklanjanje sistematskih pogreški iz mjernih podatka..... | 28 |
| 3.2. | Obrada difrakcijske slike..... | 32 |
| 3.3. | Minerološka analiza difrakcijskih slika | 34 |
| 3.3.1. | Baze podataka koje se koriste u identifikaciji strukturno uređenih tvari prisutnih u difrakcijskim slikama | 34 |
| 3.4. | Primjena difrakcijskih tehnika i metoda u analizi dodataka prehrani | 41 |
| 4. | ZAKLJUČAK | 52 |
| 5. | POPIS KRATICA | 53 |
| 6. | LITERATURA | 54 |

UVOD

Dodatke prehrani definira odredba 2. članka Direktive 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća o usklađivanju zakona država članica u odnosu na dodatke prehrani od 10. lipnja 2002. godine (dalje u tekstu: Direktiva 2002/46/EZ) kao „hranu čija je svrha dopuniti uobičajenu prehranu, a koja predstavlja koncentrirane izvore hranjivih tvari ili druge tvari prehrambenog ili fiziološkog učinka, pojedinačne ili u kombinaciji, na tržištu u doziranom obliku, to jest u oblicima kao što su kapsule, pastile, tablete, pilule i slično, vrećice praha, ampule tekućine, boćice na kapaljku te ostali slični oblici tekućine i praha namijenjeni za uzimanje u odmjer enim malim količinama.”¹ U hranjive tvari svrstavaju se vitamini i minerali, dok se pod pojmom drugih tvari podrazumijevaju: aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, organi i ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i dr.²

Dodaci prehrani imaju primarni zadatak očuvati zdravlje ljudi. Usljed suvremenog načina života i nedostatka raznolikosti u rutinskoj ishrani ljudi, danas se dodaci prehrani sve više koriste. Upravo zbog toga na tržištu su dostupni razni proizvođači dodataka prehrani. Budući da se spomenuta kategorija pripravaka smatra hranom prema zakonskim regulativama podliježe manje strogim ispitivanjima u odnosu na ljekove.³

1. OPĆI DIO

1.1. Vitamini i minerali

Pod pojmom hrane obuhvaća se veliki broj nutrijenata koji u ljudskom organizmu obavljaju svojstvene metaboličke procese. Nutrijente dijelimo na makronutrijente i mikronutrijente. Masti, proteini i ugljikohidrati sastavljaju se u makronutrijente koje je potrebno unositi u većim količinama jer se njihovom razgradnjom organizam opskrbuje energijom. Vitamini i minerali pripadaju skupini mikronutrijenata koji su potrebni u relativno malim količinama u usporedbi sa makronutrijentima. Konzumiramo ih zbog njihovog specifičnog djelovanja u regulaciji metabolizma koje će biti pojašnjeno u dalnjem tekstu rada.⁴

1.1.1. Vitamini

Vitamini su organski spojevi koji u malim količinama imaju značajnu ulogu u prehrani pojedinca. Njihova prisutnost u hrani esencijalna je za razvoj i održavanje zdravlja organizma. Iako nisu nositelji energije, organizmi se bez njih ne mogu pravilno razvijati, a posebice obavljati sve fiziološke funkcije.⁵

Sisavci ih ne mogu sintetizirati, izuzev vitamina D i K, stoga je unos hranom od ključne važnosti.⁶ Endogena sinteza vitamina D započinje prilikom kontakta kože sa suncem, to jest ultraljubičastim (UV) B zračenjem valne duljine 290-320 nm.⁷ Djelovanjem crijevne mikroflore u debelom crijevu se stvara vitamin K.⁸

1.1.1.1. Povijest vitamina

Obzirom da su se tijekom 19. stoljeća glavnim uzročnicima bolesti smatrala bakterije i bakterijski toksini, unutar medicinskih krugova nije bila prihvaćena činjenica da su neke bolesti vezane uz prehranu, stoga je otkriće vitamina veliki znanstveni uspjeh koji doprinosi razumijevanju zdravlja i bolesti.⁴

Christiaan Eijkman zapazio je razvitak polineuritisa, upale koja istodobno pogoda veći broj perifernih živaca i analog je ljudskom beri-beriju. Primjetio je razvoj bolesti kod kokoši koja je hranjena rižom očišćenom od ljuški te je 1893. godine uspio eksperimentalno proizvesti bolest kod ptica. Netočno je pretpostavio da škrob nosi toksin u poliranoj riži, dok ga ljuške eliminiraju. Njegova istraživanja nastavio je Gerrit

Grijns koji je uočio da je beri-beri uzrokovani deficitom egzistencijalne supstance u prehrani.⁹

Naziv „vitamin“ (lat. *vita*, život) uveo je biokemičar Kazimir Funk 1912. godine kada je uspio izolirati nepoznatu tvar iz smede riže. Funk je tu komponentu smatrao vitalno važnom te zbog postojanja amino skupine nazvao ju je vitaminom, dok ju danas nazivamo tiamin ili vitamin B₁.⁶

1.1.1.2. Podjela vitamina

Prema metaboličkim putovima u organizmu razlikujemo dvije skupine vitamina: vitamini topljivi u vodi i oni topljivi u mastima. Vitamin C i vitamini B kompleksa ubrajaju se u grupu vitamina topljivih u vodi. U vitamine B kompleksa svrstavamo: vitamin B₁ (tiamin), vitamin B₂ (riboflavin), vitamin B₃ (niacin), vitamin B₅ (pantotenska kiselina), vitamin B₆ (piridoksin), vitamin B₇ (biotin), vitamin B₉ (folat) i vitamin B₁₂ (kobalamin). Vitamini A, D, E i K pripadaju u kategoriju vitamina topljivih u mastima.¹⁰ Apsorpcija, transport, skladištenje i izlučivanje vitamina ovise o njihovoj topljivosti.⁴

Vitamini topljivi u mastima se apsorbiraju u tankom crijevu na način da se implementiraju u miclele i zajedno s njima ujedinjuju u hilomikrone te tako putuju limfom i ne ulaze direktno u krvotok. Vitamini topljivi u vodi se također apsorbiraju u tankom crijevu, međutim prenose se pomoću transportnih proteina koji su karakteristični za određeni vitamin.¹⁰

Bubrezi uklanjanju višak vitamina topljivih u vodi, a vitamini topljivi u mastima su skloni nakupljanju u tijelu. Tako se dolazi do zaključka da će vitamini topljivi u mastima imati negativne učinke ako se uzimaju u prekomjernim količinama dok je kod vitamina topljivih u vodi važan kontinuirani unos budući da se ne skladište lako.⁴

1.1.1.3. Funkcionalnost vitamina

Iako su vitamini i minerali potrebni u malim koncentracijama dnevno za očuvanje balansa u ljudskom tijelu, njihov klinički značaj u održavanju homeostaze organizma je veoma važan jer posjeduju zaštitne i regulacijske funkcije, stimuliraju rast i razvoj, pružaju podršku kognitivnim funkcijama i obavezni su za optimalnu funkcionalnost imunološkog sustava.¹⁰

Vitamini se općenito pretvaraju u složenije molekule koje djeluju kao koenzimi, to jest komponente koje u pojedinim reakcijama djeluju kao katalizatori.¹¹ Hranom se mogu unijeti svi mikronutrijenti, stoga se preporuča konzumiranje namirnica koje obiluju njihovim sadržajem poput agruma, raznovrsnih biljaka iz porodice mahunarki, žitarica, mesa i mlječnih proizvoda.¹⁰ Postupci potrebnii za pretvorbu sirove robe u pakiranu hranu uvijek uzrokuju gubitak vitamina i minerala, stoga bi prerađenu hranu trebalo nastojati izbjegavati ili ju upotrebljavati u manjoj mjeri te se fokusirati na veći unos svježih namirnica.¹² Tablica 1. prikazuje izvore pojedinog vitamina te njegove primarne funkcije u organizmu.

Tablica 1. Prikaz funkcija i prirodnih izvora vitamina^{10, 12}

| VITAMIN | FUNKCIJA ^{10,12} | IZVORI ¹² |
|----------------------|---|---|
| Tiamin | Važan za aktivnost četiri ključna enzima u staničnom metabolizmu: piruvat dehidrogenaze, α -ketoglutaratdehidrogenaze, transketolaze i enzimatskog kompleksa α -ketodehidrogenaze | Grah, grašak, cjelevite žitarice, orašasti plodovi, svinjetina |
| Riboflavin | Antioksidativni efekt, učinak protiv starenja, protoupalno djelovanje | Jaja, meso, perad, mlijeko, gljive, plodovi mora, špinat |
| Niacin | Povećava udio kolesterola visoke gustoće („dobar“ kolesterol), a smanjuje udio kolesterola niske gustoće („loš“ kolesterol) | Grah, govedina, svinjetina, perad, plodovi mora, cjelevite žitarice |
| Pantotenska kiselina | Kao sastavnica koenzima A ima ulogu u oslobođanju energije iz masti i ugljikohidrata, stvaranje crvenih krvnih stanica, prijenos signala u stanici | Avokado, grah, grašak, jaja, mlijeko, gljive, perad, plodovi mora, slatki krumpir, cjelevite žitarice |
| Piridoksin | Funkcija živčanog sustava (koenzim u sintezi neuroprijenosnika), stvaranje crvenih krvnih stanica | Slanutak, voće, krumpir, losos |
| Biotin | Metabolizam hranjivih tvari (podržava proizvodnju aminokiselina i masnih kiselina, sudjeluje u pretvorbi hrane u glukozu), održavanje normalne funkcije živčanog sustava | Avokado, cvjetača, voće, jaja, mlijeko, svinjetina, losos, cjelevite žitarice |
| Folat | Neophodan za sintezu nukleinskih kiselina, | Avokado, šparoge, grah i |

| | | |
|-----------|---|--|
| | uključen u reakcije pretvorbe aminokiselina i oksidacijske reakcije | grašak, zeleno lisnato povrće, sok od naranče |
| Kobalamin | Sazrijevanje crvenih krvnih stanica | Mliječni proizvodi, jaja, meso, perad, plodovi mora |
| Vitamin C | Antioksidacijsko sredstvo, kolagenska i vezivna funkcija, imunološka funkcija | Brokula, prokulica, dinja, voće i voćni sokovi, paprika |
| Vitamin A | Normalna funkcija organa vida, rast i diferencijacija tkiva, pravilnost rada imunološkog i reproduktivnog sustava | Dinja, mrkva, mliječni proizvodi, jaja, zeleno lisnato povrće, bundeva, slatki krumpir |
| Vitamin D | Održavanje zdravlja kostiju i mišića, apsorpcija kalcija i fosfata | Jaja, riba, mliječni proizvodi |
| Vitamin E | Snažan antioksidans, potiče obrambene sposobnosti organizma | Zeleno lisnato povrće, orašasti plodovi i sjemenke, kikiriki, maslinovo ulje |
| Vitamin K | Zgrušavanje krvi, čvrstoća kostiju | Zeleno lisnato povrće |

1.1.2. Minerali

Minerali su anorganske čvrste tvari koje nastaju geološkim procesima, a definiraju se na temelju kemijskog sastava i kristalne strukture.¹³ Ljudski organizam ih ne može proizvoditi, stoga se moraju unositi vodom ili hranom.¹⁴

Tlo predstavlja izvor minerala. Selektivnom apsorpcijom iz tla, biljke ih hranidbenim lancem prenose ljudima. Važno ih je unositi u adekvatnim količinama jer su nužni za biokemijske reakcije i fiziološke potrebe organizma. Također se dodaju hrani radi ostvarivanja željenih funkcija. Na primjer, hrana poprima slan okus dodatkom natrijevog klorida koji još ima ulogu konzerviranja hrane suzbijanjem rasta mikroorganizama.¹²

1.1.2.1. Povijest minerala

Od otkrića prvih minerala, zlata i bakra, u periodu između 6000. i 3500. godine prije Krista pa sve do konca 17. stoljeća, bilo je pronađeno samo 13 minerala. Sedam je metala bilo poznato kao metali antike na kojima se temeljila civilizacija. Prvi otkriveni su zlato, bakar, srebro i olovo, dok su između 1750. i 750. godine prije Krista otkriveni željezo, kositar i živa. U 13. i 14. stoljeću otkrivena su četiri minerala: cink,

arsen, bizmut i antimon. Platina je pronađena u 16. stoljeću, a iz urina je izoliran fosfor 1696. godine.¹⁵

Krajem 18. stoljeća odvijale su se studije o analizi kostiju. Ustanovljeno je da kosti sadrže kalcijev fosfat, a Stephan Hales je došao do zaključka da se mineralni sastav kostiju neprestano mijenja. Potvrđeno je da se rahič može spriječiti i izlječiti unosom kalcija, fosfora i vitamina D. Vincenzo Antonio Menghini je 1747. godine zamijetio prisutnost željeza u krvi i te je to saznanje uvelike pridonijelo liječenju anemije. Godine 1824. Alexander Humboldt je utvrdio da se konzumiranjem jodirane soli prevenira gušavost. Liječenje brojnih teških bolesti kojima se nije poznavao uzrok, omogućeno je postupnim otkrićem minerala. Iz navedenih primjera uočavamo da su neophodni za normalno funkcioniranje organizma.¹⁵

1.1.2.2. Podjela minerala

Minerali se prema dnevnim potrebama dijele u dvije glavne skupine: makrominerali (glavni minerali) i mikrominerali (minerali u tragovima). Makrominerali uključuju: magnezij (Mg), kalij (K), kalcij (Ca), natrij (Na), fosfor (P), klor (Cl) i sumpor (S) te ih je potrebno unositi u količini većoj od 100 mg na dan, dok je potreba za mikromineralima znatno niža i iznosi manje od 100 mg dnevno. U tu kategoriju ubrajamo željezo (Fe), cink (Zn), jod (I), krom (Cr), bakar (Cu), fluor (F), mangan (Mn) i silicij (Si). Posebnu skupinu mikrominerala čine kemijski elementi za koje je potrebno manje od 50 ng dnevno za zadovoljavanje potreba organizma, a to su selen (Se), kositar (Sn), brom (Br), olovo (Pb), bor (B), litij (Li), kadmij (Cd), nikal (Ni), vanadij (V), molibden (Mo) i arsen (As).¹⁴ Nazivi minerala uglavnom potječu iz grčkog i latinskog jezika.¹⁶

1.1.2.3. Funkcionalnost minerala

Učinkovitost minerala očituje se u nizu metaboličkih reakcija i pri sintezi molekula poput masti i bjelančevina. Većina minerala djeluje kao kofaktor za niz enzima.¹¹ Kofaktor je neproteinska komponenta neophodna za normalnu katalitičku aktivnost enzima.¹⁷ Tablica 2. daje uvid u izvore minerala te njihove funkcije u organizmu.

Tablica 2. Prikaz funkcija i prirodnih izvora minerala¹²

| MINERAL | FUNKCIJA | IZVOR |
|----------|--|---|
| Kalcij | Zgrušavanje krvi, formiranje kostiju i zubi, lučenje hormona, kontrakcija mišića, rad živčanog sustava | Mliječni proizvodi, bademovo i kokosovo mlijeko, zeleno lisnato povrće |
| Magnezij | Regulacija krvnog tlaka i razine šećera, formiranje kostiju, jačanje imunološkog i živčanog sustava | Avokado, banane, grah, grašak, mliječni proizvodi, orasi, krumpir, grožđice, cjelovite žitarice |
| Natrij | Održavanje acidobazne ravnoteže, regulacija krvnog tlaka, kontrakcija mišića | Kruh, sir, prerađeno meso, juhe, kuhinjska sol |
| Klor | Održavanje acidobazne ravnoteže, funkcija živčanog sustava | Celer, zelena salata, masline, kuhinjska sol, rajčica |
| Kalij | Zgrušavanje krvi, čvrstoća kostiju | Zeleno lisnato povrće, cvjetna pelud |
| Fosfor | Održavanje acidobazne ravnoteže, čvrstoća kostiju, lučenje hormona | Grah, grašak, mliječni proizvodi, meso, perad, plodovi mora, cjelovite žitarice |
| Krom | Pojačava djelovanje inzulina, a posljedično tome potiče unos glukoze u stanice | Brokula, voće, banane, meso, češnjak, bosiljak, cjelovite žitarice |
| Bakar | Antioksidans, stvaranje vezivnog tkiva kolagena, metabolizam željeza | Kakao, školjke, leća, cjelovite žitarice |
| Fluor | Čvrstoća kostiju i zubi | Riba (sardine), perad |
| Jod | Rad štitnjače | Morski plodovi i morske alge, obogaćena kuhinjska sol |
| Željezo | Prijenos kisika iz pluća u krvotok, stvaranje crvenih krvnih stanica | Grah, grašak, tamno zeleno povrće, meso, perad, suhe šljive, plodovi mora, cjelovite žitarice |
| Mangan | Regulacija iskorištavanja šećera za dobitak energije, stvaranje hrskavice i kostiju | Grah, orasi, ananas, špinat, slatki krumpir, cjelovite žitarice |
| Selen | Antioksidans, regulacija staničnog ciklusa, funkcija rada štitnjače | Jaja, meso, orasi, perad, plodovi mora, cjelovite žitarice |
| Cink | Potiće rast i razvoj, jača imunološki sustav, reducira taloženje teških metala u tijelu | Grah, grašak, govedina, mliječni proizvodi, orasi, perad, plodovi mora, cjelovite žitarice |

1.2. Potrebe za dodacima prehrani

Raznovrsnom prehranom zasigurno se mogu osigurati dovoljne količine svih makronutrijenata i mikronutrijenata, no nedostatan unos vitamina i minerala je značajan javnozdravstveni problem današnjice. Primarna prepreka u održavanju izbalansirane prehrane je ubrzan stil života koji je popraćen učestalom konzumacijom „brze hrane“, *instant* obroka te konzervirane hrane bogate aditivima. Ako se uz nekvalitetnu prehranu vodi sjedilački način života ili podliježe pušenju i upotrebi alkohola, očekivano je da će razina mikronutrijenata u organizmu biti nedovoljna te da je potrebno posegnuti za nadomjeskom istih.¹⁰

Deficit odgovarajućeg mikronutrijenta uzrokuje specifična oboljenja. Anemija je uzrokovanja pomanjkanjem bakra i željeza, dok nedostatak cinka rezultira čirevima na koži i pogoršanjem imuniteta. Poremećaj u radu štitne žlijezde uzrokuje snižena količina joda, nastanak zubnog karijesa je usko povezan sa manjkom fluora, a inzulinska rezistencija posljedica je nedostatka kroma. Smanjene razine cinka i selenia kod kritično bolesnih pacijenata sa sindromom sustavnog upalnog odgovora i sepsom povezane su s povećanom smrtnošću. Postoje dokazi da dodaci prehrani koji sadrže cink i selen mogu sniziti stopu infekcija i poboljšati oporavak kod odabralih pacijenata.¹¹

Nedovoljan unos vitamina A dovodi do noćnog sljepila, dok je rahitis prouzročen manjkom vitamina D. Na degeneraciju živaca i mišića utječe snižen unos vitamina E, a oslabljena koagulacija krvi posljedica je manjka vitamina K. Skorbut nastaje zbog nedostatka vitamina C, a beri-beri zbog nedostatka tiamina. Deficit dvaju vitamina, riboflavina i biotina, dovodi do stanja dermatitisa. Pelagra je potaknuta niskim unosom niacinu.⁴ Manjak pantotenske kiseline je jako rijedak jer je široko rasprostranjen u hrani, a neki od simptoma su: umor, glavobolja, pogoršana koordinacija, grčevi u mišićima i razdražljivost.¹⁸ Ozbiljan nedostatak piridoksina nije uobičajen, ali se češće javlja s nedostatkom drugih vitamina B kompleksa. Konjuktivitis, loš zadah, rane u kutovima usana te ljuskave usne su pojave pomoću kojih se može zaključiti da tijelu nedostaje vitamina B₆.¹⁹ Anemija se veže za smanjen unos folata i kobalamina.⁴

Navedene konstatacije pokazuju do kakvih stanja može dovesti manjak određenog vitamina i minerala, njihova važnost za zdravlje je neupitna, stoga da bi organizam nesmetano izvršavao sve svoje funkcije potrebno ih je unositi u doстатnoj

količini. Preporučeni dnevni unos (eng. *Recommended Dietary Allowance*, RDA) je definiran kao dnevna razina unosa dovoljna da zadovolji potrebe za hranjivim tvarima gotovo svih (97%) zdravih pojedinaca prema spolu i dobi.¹² Općenito, potražnja organizma za esencijalnim tvarima utvrđena je kao najmanja količina tvari koja je potrebna za održavanje zadovoljavajuće tjelesne mase, morfologije, kemijskog sastava i fiziološke funkcije organizma te da obustavi pojavljivanje kliničkih znakova nedostatka tih tvari.⁴ U tablici 3. prikazani su preporučeni dnevni unosi vitamina i minerala za odrasle osobe.

Tablica 3. Preporučeni dnevni unos vitamina i minerala (odrasli)²⁰

| | 800 | Kalij (mg) | 2000 |
|---------------------------|-----|---------------|------|
| Vitamin A (µg) | | | |
| Vitamin D (µg) | 5 | Klor (mg) | 800 |
| Vitamin E (mg) | 12 | Kalcij (mg) | 800 |
| Vitamin K (µg) | 75 | Fosfor (mg) | 700 |
| Vitamin C (mg) | 80 | Magnezij (mg) | 375 |
| Tiamin (mg) | 1,1 | Željezo (mg) | 14 |
| Riboflavin (mg) | 1,4 | Cink (mg) | 10 |
| Niacin (mg) | 16 | Bakar (mg) | 1 |
| Pantotenska kiselina (mg) | 6 | Mangan (mg) | 2 |
| Piridoksin (mg) | 1,4 | Fluor (mg) | 3,5 |
| Biotin (µg) | 50 | Selen (µg) | 55 |
| Folna kiselina (µg) | 200 | Krom (µg) | 40 |
| Kobalamin (µg) | 2,5 | Molibden (µg) | 50 |
| | | Jod (µg) | 150 |

Zbog različitih navika i načina života, genetskih čimbenika te obzirom na spol i dob, potrebe za vitaminima i mineralima u ljudskoj populaciji se razlikuju.⁴ Povišenu potražnju za dodatnim unosom zahtijevaju: pušači, alkoholičari, vegetarijanci ili vegani, tinejdžeri s lošim prehrambenim navikama, odrasli s niskim kalorijskim unosom, starija skupina ljudi, dijabetičari, žene u periodu menopauze, trudnoće i laktacije i dr.²¹

Preporučljivo je voditi računa o gornjoj podnošljivoj razini unosa (eng. *Tolerable Upper Intake Level*, UL) koja predstavlja najviši prosječni dnevni unos hranjivih tvari koji vjerojatno neće predstavljati rizik od štetnih učinaka za gotovo sve pojedince u općoj populaciji.¹²

Narušeno zdravlje je posljedica prekoračenja te granice. Neki minerali u prevelikim koncentracijama imaju toksičan učinak, poput željeza koje uzrokuje hemokromatozu koja predstavlja oštećenje tkiva pri nakupljanju željeza, dok višak bakra potiče neurološka oštećenja. Prekomjerne doze vitamina topivih u mastima također imaju negativne efekte. Prevelik unos vitamina K rezultirati će gastrointestinalnim smetnjama, vitamin A će izazvati razvoj osjećaja razdražljivosti, a vitamin D zatajenje bubrega i kalcifikaciju mekih tkiva.¹¹

1.3. Zakonska regulativa dodataka prehrani

Globalna prodaja dodataka prehrani bilježi brzi rast, ali zbog općeg nedostatka predanosti donošenju učinkovite regulative (npr. izostanak jamstava o učinkovitosti i sigurnosti, nepostojanje dokumentacije o čistoći ili stabilnosti korištenih tvari, itd.) na trenutnom tržištu moguća je pojava patvorenih proizvoda. Kvaliteta i pouzdanost su upitni obzirom na lakoću njihovog stupanja na tržište.²²

U različitim državama svijeta postoje drugačija pravila za plasiranje dodataka prehrani na tržište. Ovlašteno tijelo u Sjedinjenim Američkim Državama je Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA). Prije proizvodnje ili prodaje dodataka prehrani proizvođači ne moraju dobiti dozvolu od FDA. Prije stavljanja na tržište proizvođači dodataka prehrani nisu primorani potvrditi sigurnost i učinkovitost proizvoda, već se mjere zakonske regulative vrše tek kada proizvod dospije na tržište.²³

Unutar Europske unije dodaci prehrani se reguliraju poput hrane i imaju ulogu u održavanju zdravlja, dok se lijekovi upotrebljavaju u cilju liječenja bolesti. Istodobno, dodaci prehrani lakše dospijevaju na tržište jer ne prolaze kompleksan i restriktivan postupak odobravanja kao lijekovi. Dodaci prehrani testiraju se na zdravstvenu i sanitarnu ispravnost, ali ne i na djelotvornost, sigurnost i farmaceutsku kvalitetu kao što to zahtijevaju lijekovi.

Dodaci prehrani podliježu propisima o hrani, a ista pravila vrijede za opće označavanje, prehrambene aditive, kontaminante, novu hranu, prehrambene i zdravstvene tvrdnje o hrani itd. U Republici Hrvatskoj sastav, označavanje i stavljanje na tržište uređeni su Zakonom o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima, Pravilnikom o dodacima prehrani, Pravilnikom o uvjetima za uvrštanje u program monitoringa i provedbu programa monitoringa dodataka prehrani

i Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno. Pravilnikom o dodacima prehrani koriste se odredbe Direktive 2002/46/EZ u cilju usuglašavanja zakona država članica. Uredbom Komisije (EZ) Europskog parlamenta i Vijeća su propisani svi vitaminii minerali te njihovi kemijski oblici koji se smiju koristiti prilikom proizvodnje dodataka prehrani.²⁴

Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (NN 160/2013) propisuje uvjete pod kojima se tvari, uključujući biljne vrste, mogu dodavati hrani i koristiti u njezinoj proizvodnji, kao i najveće dopuštene količine vitamina i minerala koje se smiju dodavati prilikom stavljanja hrane i dodataka prehrani na tržište u Republici Hrvatskoj te biljne vrste koje nisu dopuštene u hrani i dodacima prehrani. Najveće dopuštene količine vitamina i minerala koje se mogu dodavati hrani i dodacima prehrani, a namijenjeni su odraslim osobama, nalaze se u Prilogu I. koji je sastavni dio ovog Pravilnika, a prikazan je u tablici 4.²⁵

Tablica 4. Najveće dopuštene količine vitamina i minerala u hrani i dodacima prehrani²⁵

| | Dodaci prehrani* | Hrana** | | Dodaci prehrani* | Hrana** |
|---------------------------|------------------|---------|---------------|------------------|---------|
| VITAMINI | | | | | |
| Vitamin A (µg) | 1500 | 800 | Kalij (mg) | 2000 | 2000 |
| Vitamin D (µg) | 10 | 5 | Klor (mg) | 800 | 800 |
| Vitamin E (mg) | 200 | 12 | Kalcij (mg) | 1500 | 800 |
| Vitamin K (µg) | 100 | 75 | Fosfor (mg) | 1400 | 700 |
| Vitamin C (mg) | 800 | 160 | Magnezij (mg) | 375 | 375 |
| Tiamin (mg) | 25 | 3,3 | Željezo (mg) | 30 | 14 |
| Riboflavin (mg) | 25 | 4,2 | Cink (mg) | 15 | 10 |
| Niacin (mg) *** | 35 | 35 | Bakar (mg) | 3 | 1 |
| Pantotenska kiselina (mg) | 18 | 18 | Mangan (mg) | 4 | 2 |
| Piridoksin (mg) | 20 | 4,2 | Fluor (mg) | 10 | 3,5 |
| Biotin (µg) | 150 | 150 | Selen (µg) | 100 | 55 |
| Folna kiselina (µg) | 600 | 200 | Krom (µg) | 150 | 40 |
| Kobalamin (µg) | 25 | 7,5 | Molibden (µg) | 100 | 50 |
| | | | Jod (µg) | 225 | 150 |

* u najvećoj dopuštenoj dnevnoj dozi

** odnosi se na količinu namijenjenu konzumaciji kao jedan obrok

*** najveća dopuštena doza se odnosi ma kemijski oblik vitamina B₃ (nikotinamid), dok je najveća dopuštena dnevna doza nikotinske kiseline 10 mg

Ukoliko proizvođač želi lansirati na tržište dodatke prehrani koji sadrže izvor hranjivih tvari koje nisu na popisu dopuštenih tvari Direktive 2002/46/EZ, mora podnijeti zahtjev za odobrenje Europskoj komisiji. Tada Europska agencija za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*, EFSA) priprema znanstveno mišljenje na osnovu kojeg će Europska komisija ocijeniti zahtjev za odobrenje. Što se tiče regulacije postavljanja dodataka prehrani na tržište, Europska unija ima strože mjere u odnosu na SAD.²³

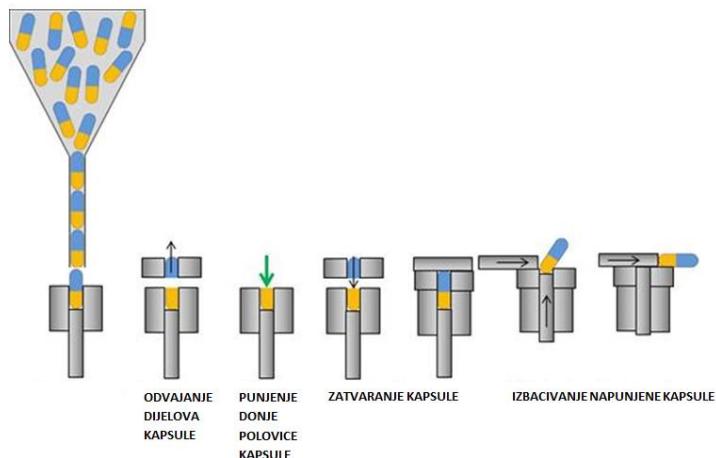
1.4. Proizvodnja dodataka prehrani

Kod proizvodnje dodataka prehrani na bazi vitamina i minerala nužna je kvalitetna oprema koje uključuje odgovarajuće mjerne instrumente za vaganje te opremu i strojeve za miješanje, granulaciju, kapsuliranje, tabletiranje i pakiranje. Dostupnost i vrsta sirovina je iznimno važna radi odabira tehnologija. Vitamini se, osim izoliranjem iz biljnih i životinjskih izvora, dobivaju u laboratorijima sintetskom proizvodnjom. Razlika u kemijskoj strukturi između sintetskih vitamina i onih proizvedenih iz prirodnih izvora ne postoji, stoga se u dodacima prehrani češće koriste sintetski vitamini obzirom na njihovu lakšu i jednostavniju proizvodnju. Primjerice, ulje riblje jetre je izvrstan prirodni izvor vitamina A, ali se isti može sintetizirati iz acetona (najjednostaviji keton, karakteriziran karbonilnom skupinom, C=O, koja je povezana s dvije metilne skupine).²⁶ Vitamini se također mogu proizvoditi biosintezom pomoću mikroorganizama. Biotehnološka proizvodnja vitamina je proces koji crpi najmanje energije i ima najniže troškove zbrinjavanja otpada. Biotehnološkom proizvodnjom mogu se istovremeno proizvoditi velike količine vitamina C, vitamina E i β-karotena uz pomoć slatkodne mikroalge *Euglena gracilis* Z., dok se vitamine B kompleksa dobivaju iz mnogobrojnih vrsta bakterija i kvasaca (kobalamin se dobiva isključivo postupkom fermentacije).²⁷

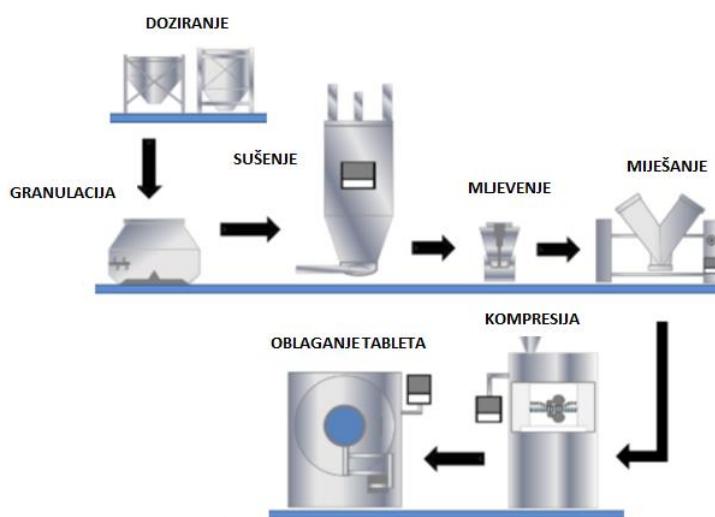
Na tržištu je česta kombinacija vitaminskih spojeva sa mineralima ili raznolikim biljnim vrstama te se one dodaju tijekom procesa proizvodnje. Nakon odabira aktivnih komponenti koje su uglavnom zastupljene u niskim koncentracijama u gotovom proizvodu, potrebno je izabrati aditive koji u velikoj mjeri pomažu u postupku proizvodnje. Kako bi kapsula ili tableta dobila odgovarajuću masu, u preparat se unosi niz punila poput malto-dekstrina, mikrokristalne celuloze i laktoze. Ukoliko je pripravak namijenjen djeci dodaju se arome kako bi proizvod bio što ukusniji. Kao

sredstvo za tečenje koristi se silicijev dioksid, dok magnezijev stearat ima ulogu lubrikanta te pomaže da prah prolazi glatko kroz strojeve.

Tijekom proizvodnje važno je da svi sastojci smjese budu adekvatno usitnjeni, homogenizirani, osušeni u komorama za sušenje te trebaju poprimiti glatku formu koja će nesmetano prolaziti kroz daljnje uređaje. Postupak proizvodnje smjese je isti, a ovisno o tome želimo li dobiti kapsule ili tablete, smjesa se prenosi u stroj za kapsuliranje ili u stroj za tabletiranje. Prilikom postupka kapsuliranja stroj kapsule dijeli na dvije polovice. Donje polovice odlaze u posudu za doziranje, a stroj odmjerava točno određenu količinu smjese u svaku otvorenu donju polovicu kapsule. Smjesa se uz pomoć igli za nabijanje potiskuje prema dolje, nakon čega se gornje polovice sjedine s donjim polovicama i dobijemo zatvorenu napunjenu kapsulu. Zatim kapsule odlaze u stroj za poliranje gdje se mekim četkicama uklanjanju nečistoće sa vanjske strane kapsula. Inspekcija je korak koji prethodi pakiranju, a služi za uklanjanje kapsula koje imaju defekte. Postupak tabletiranja započinje ubacivanjem smjese u spremnik za doziranje. Nakon provedbe postupaka usitnjavanja materijala, smjesa se transportira do stanice za punjenje, a odatle do rotirajućeg stola koji na vanjskom rubu sadrži matrice u obliku željene tablete (okrugle, ovalne, itd.). Iz punionice dolazi smjesa koja napuni matricu, stol se zarotira i napunjena matrica odlazi u prešu za bušenje. Prilikom spajanja gornje i donje polovice preše, na smjesi se vrši veliki pritisak i smjesa se pretvara u kompaktnu tabletu. Tablete potom odlaze na vibrirajuću traku gdje se ukloni sva prašina zaostala na njihovoј površini. Zatim se tablete trebaju obložiti. Ukoliko se tableta obloži pH osjetljivom ovojnicom otpornom na kiselinu u želucu, tablete će se otopiti tek u crijevu. Obloga može prekriti neugodan okus i olakšati gutanje tablete. Oblaganje se vrši pomoću pumpi koje prskaju premaz preko tableta. Tablete se pakiraju nakon što se premaz osuši. Pakiranje je posljednja radnja u procesu proizvodnje, a provodi se kroz nekoliko koraka koje obavljaju strojevi. Proces pakiranja podrazumijeva stavljanje tableta ili kapsula u odgovarajuću ambalažu, zatvaranje i označavanje te ambalaže.²⁶ Shematski prikazi postupaka kapsuliranja i tabletiranja prilikom proizvodnje dodataka prehrani nalaze se na slikama 1. i 2.



Slika 1. Shematski prikaz postupka kapsuliranja²⁸



Slika 2. Shematski prikaz postupka tabletiranja²⁹

Dodaci prehrani su kategorija prehrabnenih i zdravstvenih proizvoda i uključuju formulacije bez recepta. Kapsule i tablete su najčešći oblici u kojima se proizvode dodaci prehrani, no postoje i druge varijante poput prašaka, tekućina, gumenih bombona, energetskih pločica itd. Proizvođači koriste razna bojila, sladila te oblike pripravka kako bi ga učinila što atraktivnijim kupcima.³⁰

1.5. Metode karakterizacije dodataka prehrani

Zbog očuvanja povjerenja potrošača obzirom na mogućnost pojave patvorenih proizvoda, u upotrebi su brojne analitičke metode koje služe za identifikaciju i određivanje njihovog sastava kako bi se dokazala kvaliteta i sigurnost takvih

pripravaka. Ispitivanja se provode pomoću raznih analitičkih metoda kao što su ekstrakcija, kromatografija uz korištenje raznih detektora, primjena masene spektrometrije ili kombinacija većeg broja detekcijskih metoda. Ekstrakcija je metoda pomoću koje izdvajamo bioaktivnu tvar iz uzorka na temelju selektivnog odjeljivanja između dvije faze koje se ne miješaju. Najčešće su u primjeni tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, plinska kromatografija, fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima te elektroforeza. Testiranje dodataka prehrani također možemo provesti pomoću tehnike difrakcije X-zraka kojom u kratkom vremenskom periodu dobivamo uvid u mineraloški sastav i strukturnu informaciju željenog pripravka, zatim nuklearna magnetska rezonancija, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, spektrometrija masa induktivno spregnute plazme te tankoslojna kromatografija visokih performansi.^{22,31}

1.5.1. Kromatografija

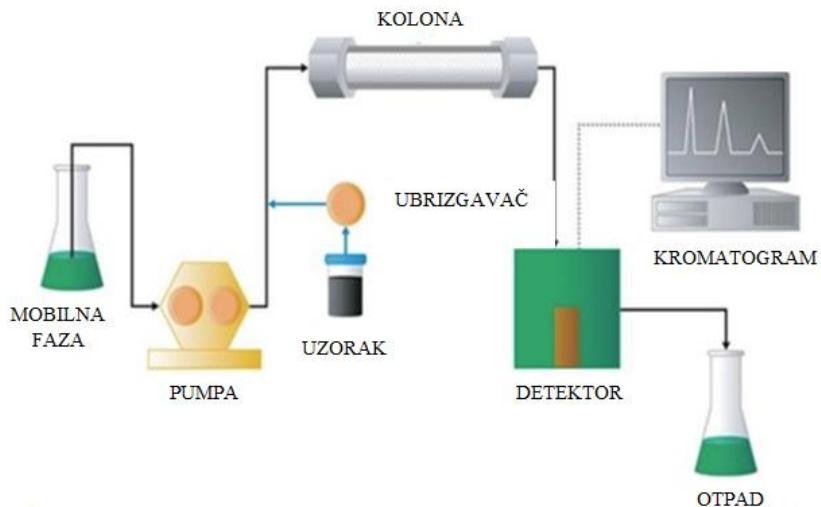
Općenito, kromatografija je separacijska metoda koja se zbog svoje jednostavnosti, učinkovitosti i praktičnosti upotrebljava u analizi raznoraznih uzoraka. Svaka kromatografska metoda uključuje mobilnu i stacionarnu fazu gdje mobilna faza prolazi kroz stacionarnu fazu ili prelazi preko njene površine. Brzina kojom svaka komponenta prolazi kroz stacionarnu fazu zajedno s mobilnom fazom utječe na razdvajanje komponenti smjese. Prema izvedbi, kromatografske tehnike dijele se na plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu. Kod plošne kromatografije stacionarna faza nanosi se na ravnu plohu, dok se uska cijev ispunjava stacionarnom fazom kod kromatografije na stupcu.³² Tankoslojna kromatografija, elektrokromatografija i papirna kromatografija su vrste plošne kromatografije, dok u kromatografiju na stupcu ubrajamo tekućinsku, plinsku i kromatografiju sa superkritičnim fluidom.²⁴

1.5.1.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) često se koristi jer je klasična tekućinska kromatografija relativno spor proces i uglavnom se ne upotrebljava u analitičke svrhe. Kod HPLC metode osigurava se brži protok tvari, a mobilna faza propušta se pod visokim ulaznim tlakom.³² Mobilna faza (pokretna faza) je zapravo smjesa otopljenih tvari zbog toga što

je sastavljena od tekućine u kojoj je uzorak otopljen.²⁴ Stacionarna faza (nepokretna faza) koja je najčešće u upotrebi je anorganski materijal silikagel te se analiza vrši odvajanjem određenog analita na kromatografskoj koloni i detektiranjem pomoću prikladne tehnike.²³

Tekućinski kromatogram je uređaj s kojim se provodi HPLC metoda. Pumpa, ubrizgivač (injektor), kolona i detektor su osnovi dijelovi koji čine uređaj. U rezervoaru se nalazi mobilna faza koja se pomoću pumpe koja generira dovoljno visok tlak prenosi u kolonu. Funkcija injektora je unos uzorka u tok struje pokretne faze. Na temelju različitih kemijskih i fizikalnih parametara, kolona odvaja komponente smjese. Detektor je posljednji dio HPLC uređaja koji se koristi za utvrđivanje identiteta i određivanje analita. U obliku električnog vala detektor prosljeđuje računalu podatke te se formira kromatogram.³³ Slika 3. prikazuje dijelove uređaja pomoću kojeg se provodi HPLC.



Slika 3. Shema tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti³⁴

U primjeni je HPLC sa raznovrsnim detektorima, a to su UV detektor, maseni detektor, foto-diodni detektor, detektor fluorescentnih zraka i detektor električne vodljivosti.²⁴

HPLC spregnut sa masenom spektrometrijom (eng. *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, HPLC-MS) je analitička kemijska metoda koja spaja sposobnost fizičkog odvajanja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti sa

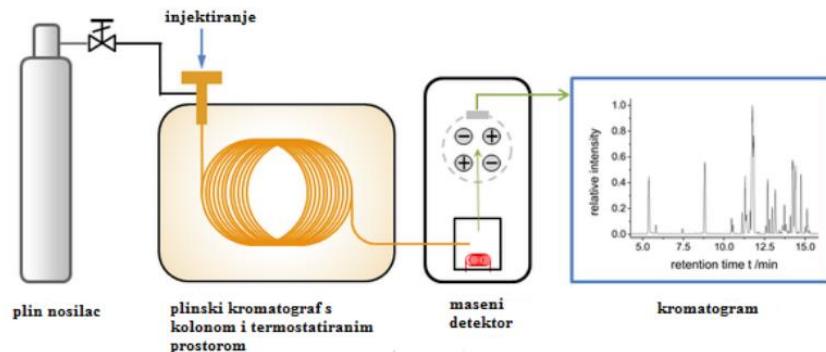
pogodnostima masene spektrometrije koja obavlja analizu molekula na osnovu omjera molekularnih masa i naboja (m/z).³⁴ Ionizator, analizator i detektor su glavni dijelovi masenog spektrometra. Ioniziranje molekula u ionizatoru je početna faza u analizi. Nastali ioni se u analizatoru odvajaju prema odnosu m/z , a razdvojeni ioni se identificiraju pomoću detektora.²³ Kao rezultat analize imamo kromatogram sa specifičnim pikovima. Retencijsko vrijeme označava se na apcisi, dok se na ordinati prikazuje intenzitet signala razmjeran koncentraciji odgovarajuće tvari. Retencijsko vrijeme je period koji prođe od ubrizgavanja do eluiranja uzorka, to jest ispiranja adsorbiranog uzorka sa stacionarne faze. Spektrometar masa identificira svaku komponenu zasebno te se stvara grafički prikaz tijekom svakog skeniranja. Intenzitet signala prikazuje se na ordinati, a omjer m/z za svaku detektiranu komponentu na apcisi. Maseni spektar za svaku tvar je jedinstven poput „otiska prsta“ pa se koristi za utvrđivanje identiteta.³²

1.5.1.2. Plinska kromatografija

Za razliku od HPLC koja služi za separaciju otopljenih tvari, plinskom kromatografijom (eng. *Gas Chromatography*, GC) odvajaju se hlapljive komponente uzorka u plinovitoj fazi. Obzirom da stacionarna faza može biti tekuća ili čvrsta, razlikuje se plinsko-tekućinska te plinsko-čvrsta kromatografija. Mobilnu fazu predstavlja kemijski inertan plin poput dušika, helija i argona.³² Kao i kod tekućinske kromatografije, u plinskoj kromatografiji možemo posegnuti za korištenjem raznovrsnih detektora. Najviše korišteni su maseni detektor, detektor toplinske vodljivosti i plameno-ionizacijski detektor.²⁴

Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (eng. *Gas chromatography mass spectrometry*, GC-MS) je analitička metoda kojom se u spregu stavljuju dvije tehnike čime se pojedinačna učinkovitost povećava i omogućava se istovremeno kvalitativno i kvantitativno analiziranje uzorka. Plinski kromatograf je uređaj koji se sastoji od spremnika plina nosača, regulatora tlaka, regulatora protoka, ubrizgavača, kolone, kolonske peći te detektora. Uvjet za analizu plinskim kromatografom je taj da se uzorak treba dovesti u stanje pri radnoj temperaturi uređaja koja iznosi do $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na početku kolone ubrizgava se uzorak te ovisno o afinitetu pojedinih komponenti uzorka za nepokretnu fazu, dolazi do njihovog odjeljivanja i u drugaćijim vremenskim periodima one stižu do detektora koji ih detektira i šalje signal računalu. Veća

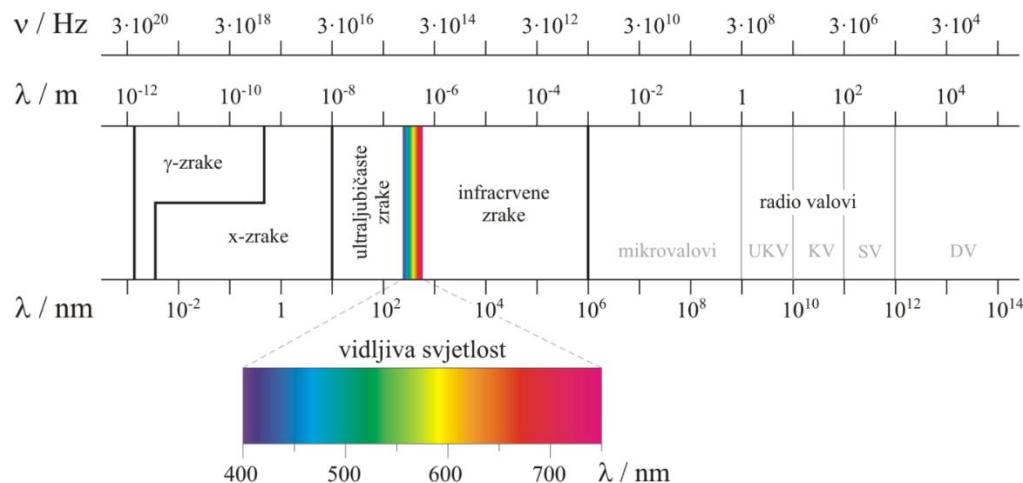
konzentracija komponente uzrokuje pojavu većeg signala. Kao kod HPLC-MS metode, rezultat analize prikazuje se kromatogramom. Glavni nedostatak GC-MS metode je nemogućnost analize spojeva osjetljivih na povišenu temperaturu.³⁵ Slika 4. daje uvid u shematski prikaz uređaja za plinsku kromatografiju s masenim spektrometrom.



Slika 4. Uređaj za plinsku kromatografiju s masenim spektrometrom³⁵

1.5.2. Rendgenska difrakcijska analiza

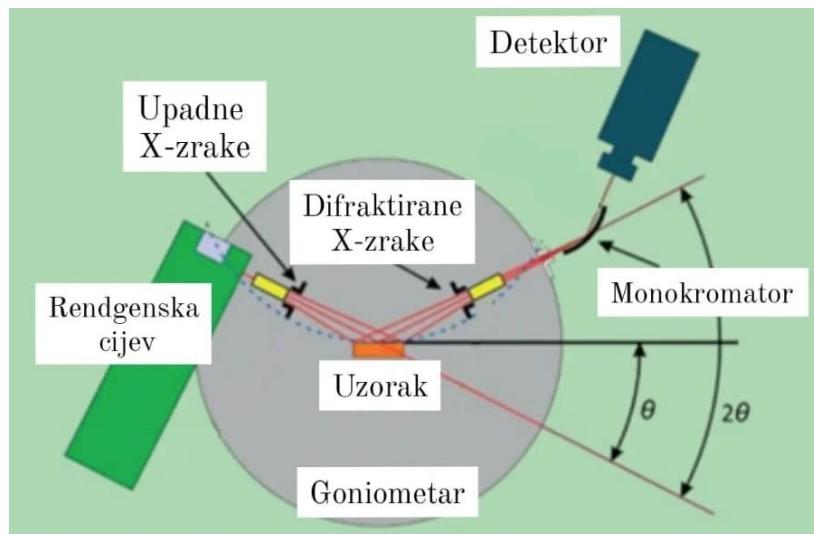
Rendgensko zračenje je oblik elektromagnetskog zračenja vrlo malih valnih duljina, ali visokih energija i frekvencija. Zbog velike energije koje posjeduju, rendgenske zrake ioniziraju atom na način da iz ljske atoma mogu izbaciti elektrone. Rendgenske zrake imaju valnu duljinu dužu od valne duljine spektra gama zraka, no kraću valnu duljinu od valne duljine zraka ultraljubičastog zračenja. Raspon valnih duljina rendgenskog zračenja kreće se između vrijednosti od 0,01 do 10 nm. Valna duljina je reda veličine udaljenosti između atoma u kristalu, zbog čega kristalni uzorak djeluje poput optičke rešetke za rendgensko zračenje.³⁶ Slika 5. prikazuje spektar elektromagnetskog zračenja.



Slika 5. Prikaz spektra elektromagnetskog zračenja s odgovarajućim valnim duljinama³⁷

Rendgenska difrakcijska analiza (eng. *X-ray diffraction analysis*, XRD) je brza i nedestruktivna analitička metoda kojom se dobiva uvid u strukturu materijala.³¹ Zbog iznimne točnosti i osjetljivosti ova se metoda primjenjuje u mnogim poljima. Ima važnu ulogu u analizi većine krutih tvari, uključujući lijekove i dodatke prehrani. Kao nerazorna tehnika koristi se prilikom utvrđivanja identiteta nepoznatih spojeva, određivanja fizikalno-kemijskih svojstava i otkrivanja nečistoća u medicinskim pripravcima. Općenito, rendgenska difrakcijska analiza može se uspješno primijeniti za analizu bilo koje tvari koja posjeduje pravilno strukturno uređenje.³⁸

Uredaj pomoću kojeg se provodi mjerjenje difrakcije naziva se rendgenski difraktometar. Glavni elementi uređaja su: su izvor rendgenskih zraka (rendgenska cijev), goniometar, monokromator, detektor i uzorak.³¹ Slika 6. prikazuje jednu od geometrija koje se koriste tijekom snimanja difrakcijskih slika s naznačenim pojedinim dijelovima difraktometra. Na prikazu na ljevoj strani nalazi se izvor zračenja (rendgenska cijev) na koju se montira optika koja služi za reguliranje dimenzije i oblika zračenja koje dolazi na sam uzorak u tijeku mjerjenja. Ova strana goniometra naziva se i primarna ili Omega (ω) strana goniometra, a na suprotnoj strani nalazi se detektor kojim se mjeri intenzitet nastale interakcije između upadnog snopa i tvari od koje je izgrađen uzorak. Pozicija uzorka je uvek u fokusu goniometra za vrijeme provedbe eksperimenta. Desna strana goniometra na kojoj je detektor naziva se i sekundarna strana goniometra ili 2Theta.



Slika 6. Shematski prikaz difraktometra³⁹

Za vrijeme provedbe mjerenja metodom difrakcije X-zraka na polikristalnim uzorcima upadne X-zrake interagiraju s elektronima sadržanim u atomima koji čine uzorak. U toj interakciji elektroni sadržani u atomima koherentno raspršuju X-zračenje, odnosno emitiraju zračenje iste valne duljine i energije kao što je i upadni snop te postaju sekundarni izvor zračenja koji emitira novi val koji se širi u svim pravcima. Da bi došlo do pojave difrakcije elektromagnetskog zračenja mora biti osiguran osnovni preduvjet da je materijal koji se analizira struktorno uređen, što znači da ima pravilnu unutarnju građu drugog reda.⁴⁰ Kada zrake rendgenskog zračenja dođu u interakciju s uzorkom, moguće interakcije između sekundarno produciranog zračenja koje potječe od atoma sadržanih u uzorku mogu biti konstruktivne i destruktivne. U eksperimentu to znači da u određenim smjerovima dolazi do pojave intenziteta zračenja (konstruktivna interferencija) i u drugom slučaju dolazi do pogašenja zračenja (destruktivna interferencija). Razlog i opis ove pojave moguće je objasniti Braggovim zakonom, a jednadžba koja ga opisuje je sljedeća:

$$n\lambda = 2ds\sin\theta$$

gdje je:

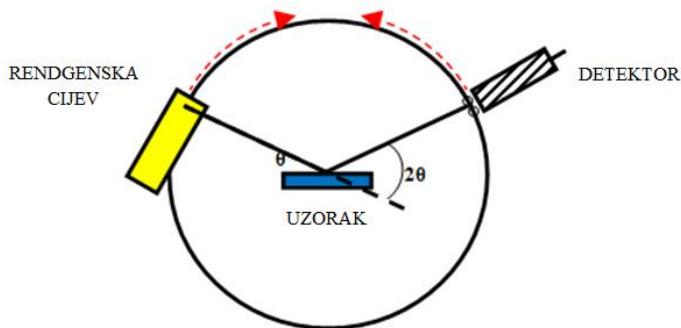
n – cijeli broj

λ – valna duljina upadne rendgenske zrake

d – udaljenost između atomskih ravnina

θ – kut raspršenja (Braggov kut)

Upadne rendgenske zrake dolaze na kristalnu ravninu pod kutem θ (upadni kut) i difraktiraju se pod kutem θ (kut difrakcije). U odnosu na okomicu kristalne rešetke kut θ je simetričan.⁴¹ Slika 7. prikazuje Omega-2theta geometriju.



Slika 7. Omega-2Theta geometrija⁴²

Naime, konstruktivna interferencija događa se u strukturno uređenim sustavima te isti potječe s ravnina sadržanih u strukturi materijala koji se ispituje. Ove ravnine u kristalografskoj se nazivaju kristalografske ravnine i označavaju se Mullerovim indeksima. Kristalografske ravnine sadrže na točnim pozicijama raspoređene atome, a jedna od druge su na točnim međuplošnim udaljenostima koje se označavaju s d. Dakle, kristalografske ravnine označavaju su Millerovim indeksima (hkl) i iste su ekvidistantne (npr. d_{hkl}). Ukoliko je razlika u geometrijskom hodu valnih duljina cijeli broj, doći će do konstruktivne interferencije raspršenih zraka, to jest rezultanta interakcije je povećanje intenziteta. Do destruktivne interferencije dolazi kada mrežne ravnine nisu ekvidistantne, stoga razlika u hodu varira i nema cjelobrojan iznos.⁴³

Detektor služi za skupljanje signala te kao rezultat provedene analize imamo difrakcijsku sliku koju još zovemo i difraktogram. Difraktogram prikazuje ovisnost intenziteta difraktiranog zračenja o difrakcijskom kutu.³⁸ Ukoliko je zadovoljen Braggov uvjet na difraktogramu dolazi do pojave difrakcijskog maksimuma koji predstavlja zaobljenu liniju oblika zvona. Nesavršenost kristala ili instrumenta uzrokovati će proširenje difrakcijskog maksimuma. Na difraktometru možemo iščitati sljedeće podatke: intenzitet i položaj pika te širinu na polu intenziteta. Svaka kristalna tvar ima karakterističan uzorak difrakcije X-zraka s određenim položajima difrakcijskih linija i njihovim intenzitetom. Pomoću baze podataka i primjenom računala možemo pretražiti koji od spojeva ima difrakcijski maksimum na odgovarajućoj poziciji te

usporedbom difraktograma analiziranog uzorka i baze podataka možemo potvrditi identitet spoja.⁴¹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj rada bio je ispitati mineraloški sastav dodataka prehrani primjenjujući rendgensku difrakcijsku metodu analize.

2.1. Materijali

Istraživanje u ovom radu izvršeno je na 5 uzoraka dodataka prehrani na bazi minerala i vitamina. Svi uzorci proizvedeni su od strane istog proizvođača Dietpharm. Korišteni uzorci su: Magnezij citrat 375, Magnezij 375, Calcium 600, Kalcij + C i Kalcij citrat + D. Pripravci sadrže kiselinu (uglavnom limunsku kiselinu), regulatore kiselosti, tvari za sprječavanje zgrudnjavanja, tvari za povećanje volumena, arome, sladila te bojila. Slike u nastavku prikazuju korištene uzorke te njihove LOT brojeve.



Slika 8. Uzorak Magnezij 375



Slika 9. Uzorak Magnezij citrat 375



Slika 10. Uzorak Calcium 600



Slika 11. Uzorak Kalcij + C



Slika 12. Kalcij citrat + D

2.2. Priprema uzorka

Postupak pripreme uzorka od velike je važnosti za dobivanje pouzdanih eksperimentalnih rezultata. Kako bi se dobili visokokvalitetni rezultati analize potrebno je usitniti uzorak. Za provedbu rendgenske difrakcije na praškastim materijalima dobro samljeveni uzorak mora imati veličinu čestica od najviše 44 µm. Identifikacija faza, procjena količine i kristalnosti uzorka biti će pogrešna ukoliko se uzorak ne pripremi na

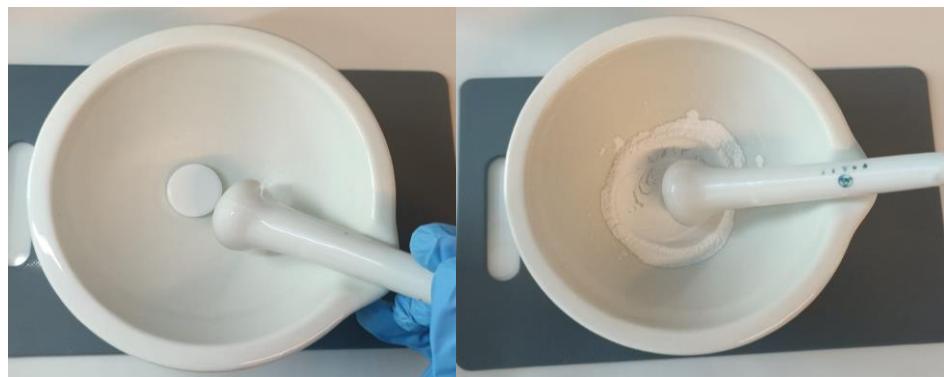
adekvatan način. Može doći do toga da neki manji vrhovi difrakcijskih maksimuma nisu dovoljno dobro izraženi i stajaju se sa pozadinskim šumom. Ako se mogu vidjeti ili osjetiti pojedinačna zrnca u uzorku, potrebno je nastaviti s mljevenjem.⁴⁴

Priprema uzorka odvija se u prostoru bez prašine i koristi se čisti, prethodno dezinficirani pribor kako bi se spriječila kontaminacija uzorka. Aparatura potrebna za usitnjavanje tablete dodatka prehrani je slijedeća: podložak za rad, tarionik s tučkom, metalna špatula, kist, satno stakalce te dijelovi držača uzorka. Potreban pribor za rad vidljiv je na slici 13.



Slika 13. Pribor potreban za usitnjavanje uzorka

Od tablete potrebno je dobiti fino samljeveni prah. Primjenom blagog pritiska zdrobimo tabletu te miješamo dok čestice ne postanu odgovarajuće veličine. Slike 14. prikazuju izgled ispitivanog materijala (tableta Magnezij 375 dodatka prehrani) prije i poslije usitnjavanja.



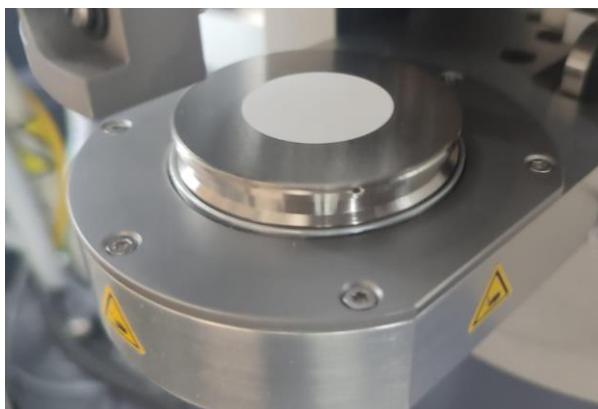
Slika 14. Uzorak Magnezij 375 prije usitnjavanja a) i nakon usitnjavanja b).

Nakon usitnjavanja uzorka, potrebno ga je postaviti u odgovarajući držač. Na glavni blok postavlja se gornji dio držača uzorka s ravnom stranom prema dolje te se fiksira u centru. Uzorak se unosi pomoću metalne špatule. Predmetno stakalce koristi se za poravnanje površine i uklanjanje viška uzorka. Potom se čvrstim i ravnomjernim

pritiskom pomoću bloka za stiskanje vrši pritisak na ispitivani materijal. Ukoliko se primijeti da nedostaje uzorka, postupak se ponavlja sve dok udubina namijenjena za punjenje uzorka ne bude potpuno ispunjena. Ostatke uzorka koji su zaostali na držaču uklanjamo kistom. Slijedi postavljanje donjeg dijela držača s licem prema dolje. Zatim se okrene cijeli blok i pritisne gumb za otpuštanje. Dobiven je uzorak koji ima finu, glatku i ravnu površinu.⁴⁴ Slika 15. prikazuje glavni blok na kojeg je postavljen gornji dio držača uzorka te donji dio držača koji će se postaviti nakon što se unese uzorak, dok slika 16. predstavlja izgled gotovog uzorka spreman za analizu.



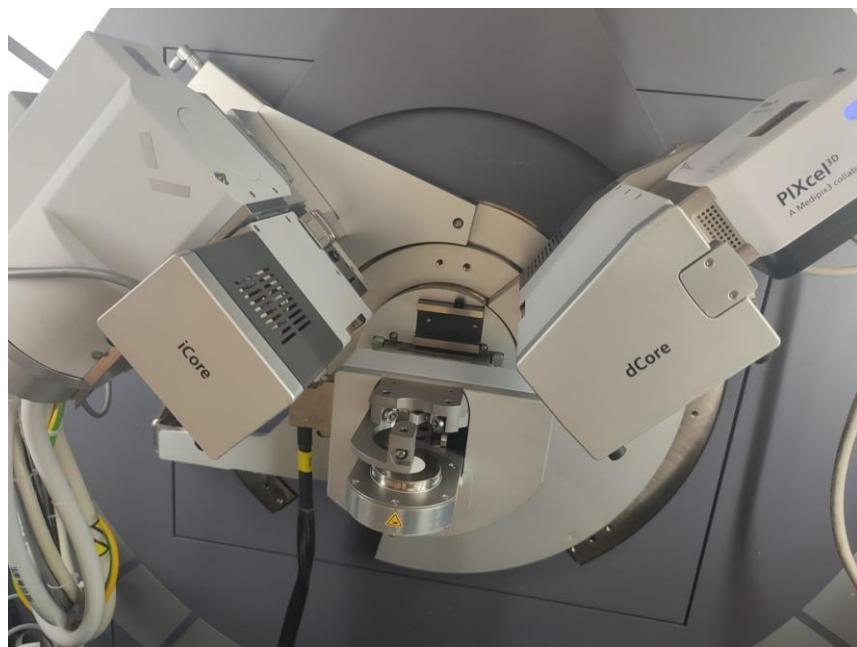
Slika 15. Prikaz donjeg i gornjeg držača uzorka za XRD analizu



Slika 16. Izgled gotovog uzorka spremnog za XRD analizu

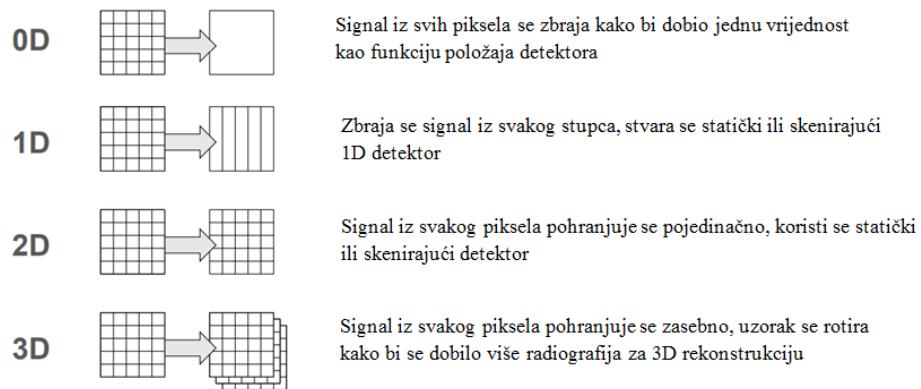
2.3. Difrakcija X-zraka na praškastim uzorcima

Rendgenska difrakcijska analiza na uzorcima dodataka prehrani izvršena je na uređaju Malvern Panalytical Empyrean prikazanom na slici 17. Na primarnoj strani goniometra korišten je prefiks iCore, a na sekundarnoj strani upotrijebljen je dCore uz detektor PIXcel3D s Medipix3. Prilikom analize korišten je program HighScore Plus i ICDD PDF2 kristalografska baza podataka.



Slika 17. Malvern Panalytical Empyrean uređaj

Postoji više modova rada detektora koji se koriste u XRD analizi, a to su: 0D, 1D, 2D i 3D detektori. Prilikom izvođenja ovog eksperimenta korišten je 1D detektor.⁴⁵ Slika 18. ilustrira rad s različitim modovima detektora.



Slika 18. Modovi rada 0D, 1D, 2D, i 3D detektora⁴⁵

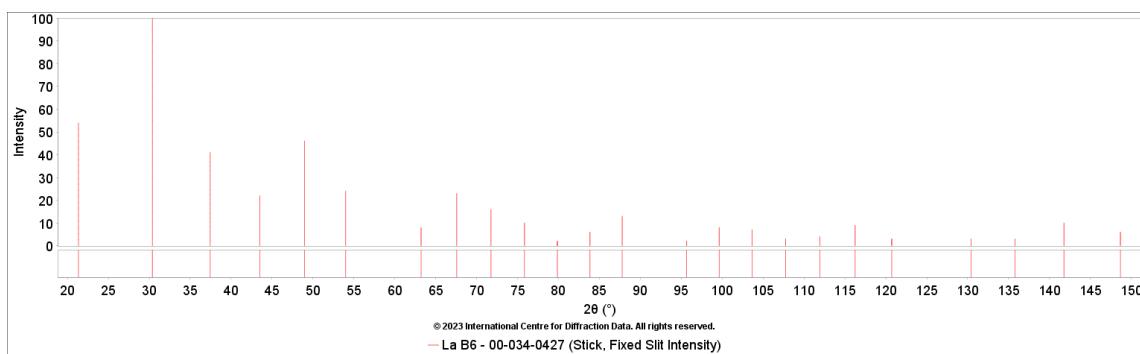
Detektor ima veličinu senzora $14 \text{ mm} \times 14 \text{ mm}$ ili 256×256 piksela (dimenzija piksela je $55 \mu\text{m} \times 55 \mu\text{m}$). Tijekom rada detektor može primiti zračenje u maksimalnoj ekspoziciji X-zraka u iznosu od 120×10^6 cps (counts per second) po svakom stupcu, a sveukupnu brzinu brojanja (count rate) od 30×10^9 cps. Najmanja veličina koraka tijekom provedbe mjerena iznosi $0,0016^\circ$ 2θ na radijusu goniometra od 240 mm.^{45,46}

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uklanjanje sistematskih pogreški iz mjernih podatka

Kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu, difrakcijske slike na polikristalnim uzorcima snimljeni su na Malvern Panalytical Empyrean modelu višenamjenskog difraktometra uz korištenje nosača uzorka Refelction transmission spinner 3.0. Snimak je načinjen na svim uzorcima u kutnom području od 4° do 90° 2Theta. Zbog instrumentalne nesavršenosti mjerni podaci uvijek sadrže i određene pogreške. Pogreške koje se mogu ukloniti iz mjernih podataka su sistematske pogreške koje potječu od geometrije samog uređaja, od korištene optike, pozicije nosača uzorka itd. A kao rezultat nastaje pogreška koja je pri toj geometriji za sve uzorke predvidiva i konstantna u cijelom području mjerjenja. Upravo zbog navedenog koriste se standardi koji omogućavaju provedbu navedene korekcije. Standardi koji se najčešće koriste su LaB₆ i Si.

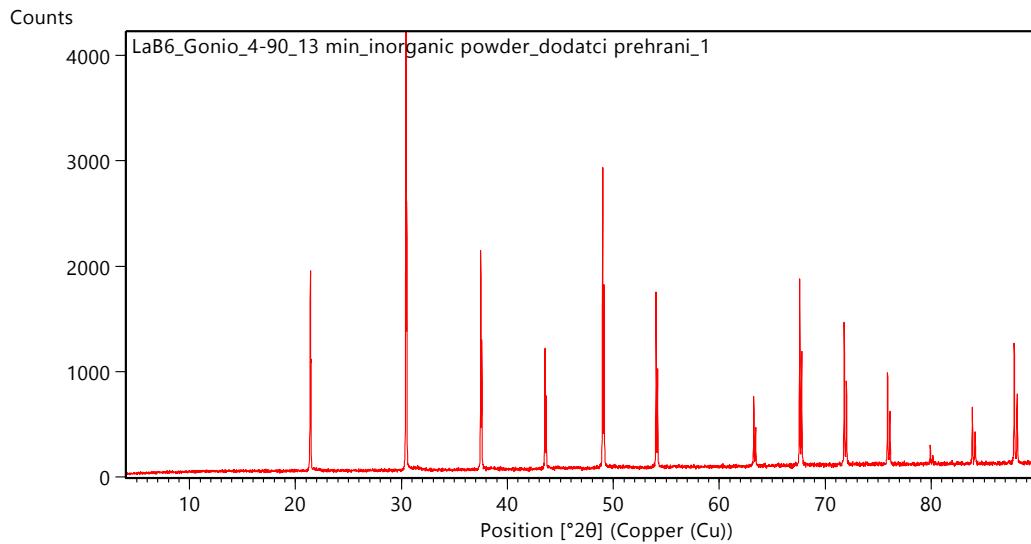
U bazi ICDD pod referentnom PDF karticom 00-034-0427 nalaze se spremljeni podaci o LaB₆ kao standardu, koji sadrže sve kristalografske podatke o navedenom spoju. Na slici 19. prikazana je difrakcijska slika LaB₆ standarda koji je snimljen na uređaju pri istim eksperimentalnim uvjetima kao što su snimljeni i ispitivani uzorci dodataka prehrani. U tablici 5. prikazani su podaci o poziciji difrakcijskih maksimuma, njihovom intenzitetu kao i Millerovim indeksima (hkl) za svaki od difrakcijskih maksimuma.



Slika 19. Difrakcijska slika LaB₆

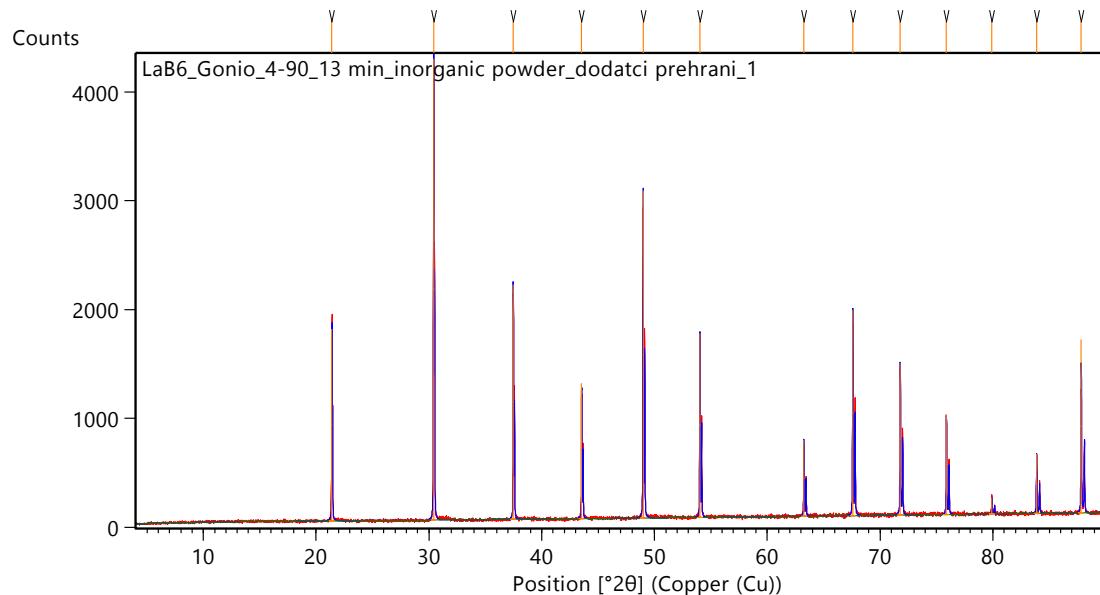
Tablica 5. Pozicije difrakcijskih maksimuma za LaB₆ referentni PDF kod 00-034-0427

| 2θ (°) | d (Å) | I | h | k | l | * | 2θ (°) | d (Å) | I | h | k | l | * | 2θ (°) | d (Å) | I | h | k | l | * |
|--------|-----------------|-----|---|---|---|---|---------|----------|----|---|---|---|---|---------|----------|----|---|---|---|---|
| 21.353 | 4.157660 | 54 | 1 | 0 | 0 | | 71.755 | 1.314350 | 16 | 3 | 1 | 0 | | 107.751 | 0.953625 | 3 | 3 | 3 | 1 | |
| 30.386 | 2.939180 | 100 | 1 | 1 | 0 | | 75.847 | 1.253290 | 10 | 3 | 1 | 1 | | 111.936 | 0.929477 | 4 | 4 | 2 | 0 | |
| 37.444 | 2.399800 | 41 | 1 | 1 | 1 | | 79.866 | 1.200010 | 2 | 2 | 2 | 2 | | 116.245 | 0.907086 | 9 | 4 | 2 | 1 | |
| 43.516 | 2.077980 | 22 | 2 | 0 | 0 | | 83.847 | 1.152880 | 6 | 3 | 2 | 0 | | 120.720 | 0.886245 | 3 | 3 | 3 | 2 | |
| 48.968 | 1.858620 | 46 | 2 | 1 | 0 | | 87.790 | 1.110970 | 13 | 3 | 2 | 1 | | 130.410 | 0.848500 | 3 | 4 | 2 | 2 | |
| 53.994 | 1.696870 | 24 | 2 | 1 | 1 | | 95.662 | 1.039280 | 2 | 4 | 0 | 0 | | 135.787 | 0.831399 | 3 | 5 | 0 | 0 | |
| 63.216 | 1.469700 | 8 | 2 | 2 | 0 | | 99.636 | 1.008220 | 8 | 4 | 1 | 0 | | 141.765 | 0.815242 | 10 | 5 | 1 | 0 | |
| 67.562 | 1.385340 | 23 | 3 | 0 | 0 | | 103.652 | 0.979826 | 7 | 4 | 1 | 1 | | 148.660 | 0.800014 | 6 | 5 | 1 | 1 | |



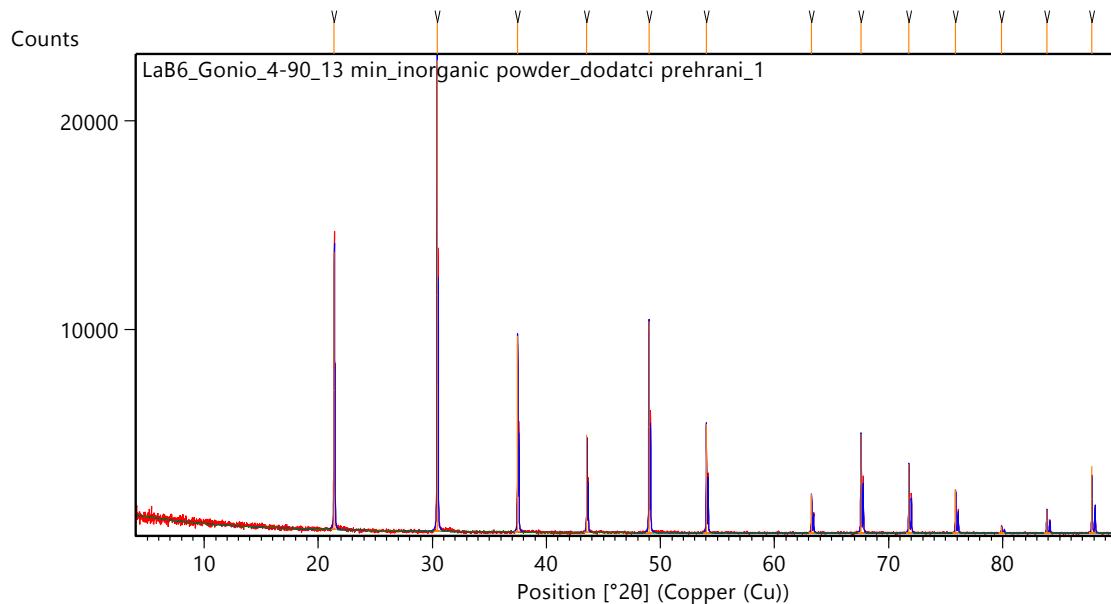
Slika 20. Difrakcijska slika uzorka LaB₆ snimljena u ADS modu

U postupku pripreme eksperimentalnih podataka na istima je potrebno izvršiti pripremu prema uobičajenom postupku koji uključuje određivanje pozadinskog zračenja, tzv. Background ili kraće Bckg, odrediti pozicije difrakcijskih maksimuma te po potrebi napraviti korekciju za divergentni slit (što ovisi o načinu prikupljanja podataka) te sistematsku korekciju.



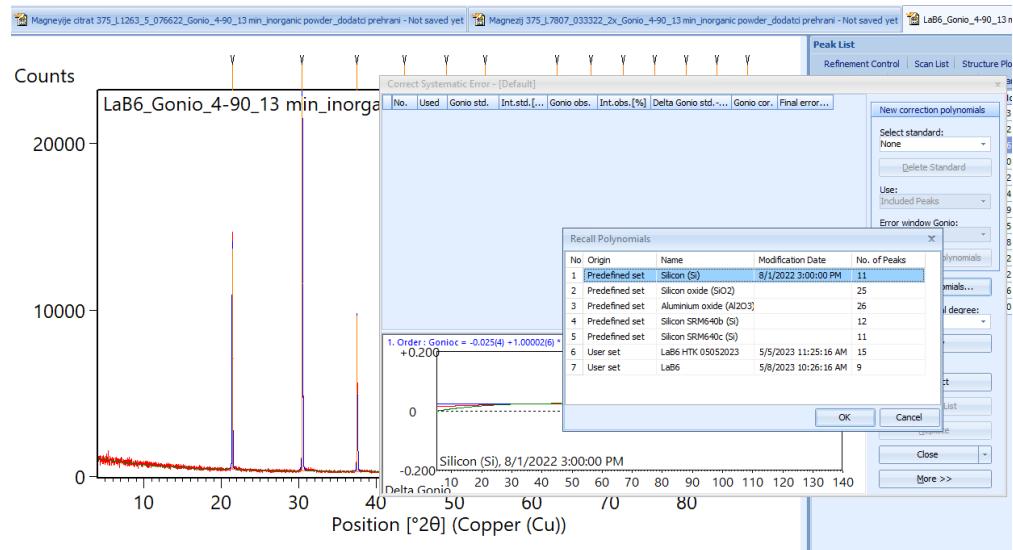
Slika 21. Difrakcijska slika uzorka LaB₆ snimljena u ADS modu (eng. *Automatic divergent slit*), s označenim Bckg i difrakcijskim maksimumima

Potrebno je provesti korekciju za divergentni slit odnosno korigirati ADS u FDS podatke (eng. *Fixed Divergence Slit*). U FDS modu je ozračeni volumen ispitivanog uzorka konstantan. Korištenjem ADS načina rada prikupljeni podaci pri višim kutovima difrakcije imaju veći intenzitet u usporedbi s fiksnim divergentnim prorezima obzirom da se volumen ozračenog uzorka povećava s povećanjem kutova. Slika 22. prikazuje korekciju za fiksni divergentni slit.

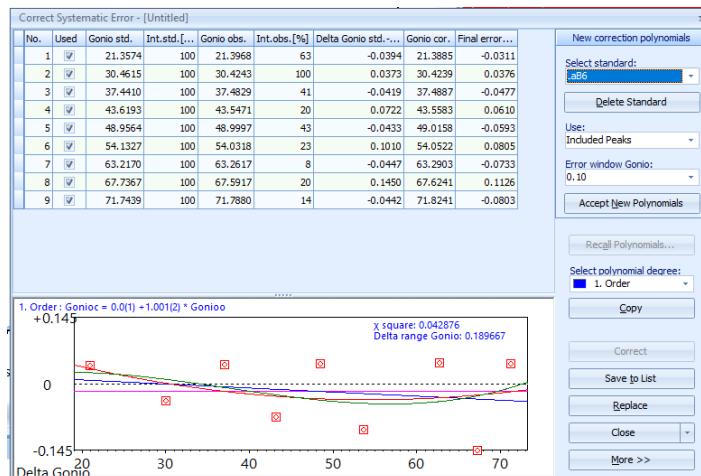


Slika 22. Korekcija za divergentni slit

Za provedbu sistematske korekcije kao što je to ovdje slučaj mjereni podaci prikupljeni korištenjem standarda LaB₆ kao uzorka služi za generiranje matematičke funkcije (koja je uglavnom polinom drugog ili trećeg reda) koja će na temelju odstupanja pozicije difrakcijskih maksimuma standardnog uzorka i teoretskih vrijednosti LaB₆ (slika 19. LaB₆ iz baze) definirati za svaki pojedini maksimum odstupanje te iz tih odstupanja definirati koja matematička funkcija najbolje opisuje ta odstupanja. Bitno je naglasiti da se generirana matematička formula odnosi na točno definirani raspon mjernih podataka. Stoga svako odstupanje od mjernog područja, ako je mjerno područje šire, nužno je napraviti ponovno kalibracijsku krivulju za provedbu sistematske korekcije. Slika 23. daje uvid u postupak provođenja korekcije na sistematske pogreške, dok slika 24. prikazuje odstupanje eksperimentalnih podataka za LaB₆ u odnosu na standard. prema CIF file od LaB₆.



Slika 23. Korekcija za sistematske pogreške

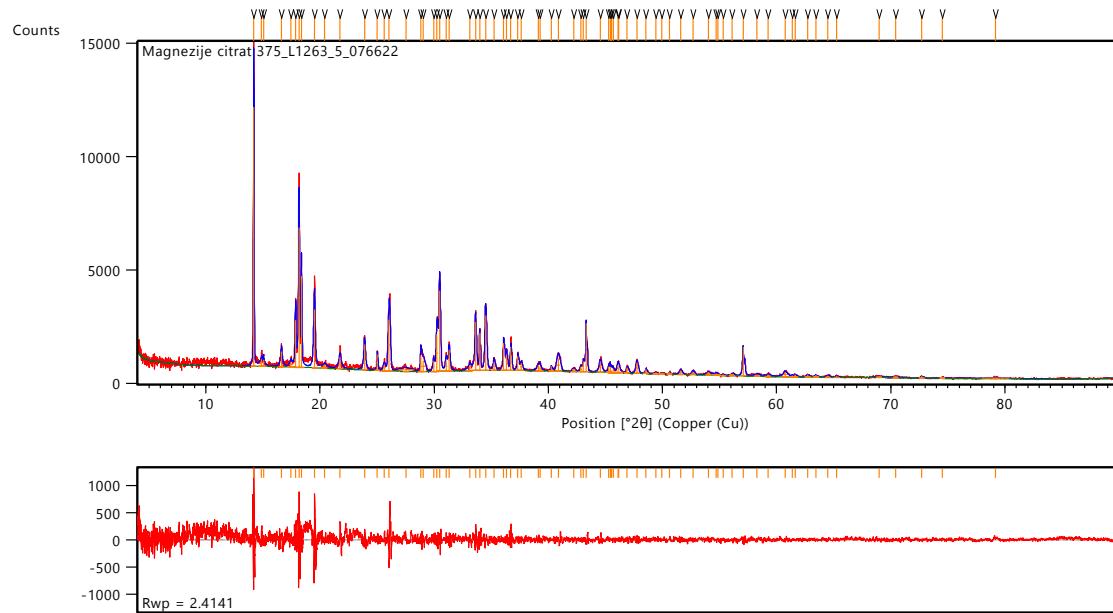


Slika 24. Odstupanja eksperimentalnih podataka za LaB_6 u odnosu na standard prema CIF file od LaB_6

3.2. Obrada difrakcijske slike

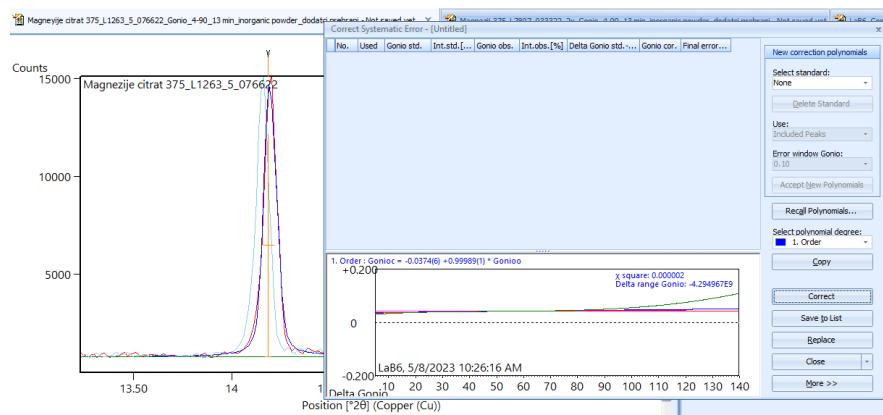
Difrakcijska slika uzorka Magnezijeva citrata 375 nakon određivanja pozadinskog zračenja, pronađenih pozicija difrakcijskih maksimuma, provedene korekcije na sistematske pogreške i utočnjenog profila difrakcijskih maksimuma prikazana je na slici 25. Utočnjavanje difrakcijskih profila je provedeno uz postavke da se u funkciju utočnjavanja uključi i dio asimetrije difrakcijskih maksimuma uz korištenja Voit-ove funkcije. Rwp vrijednost prikazana ispod difrakcije slike ukazuje na dobro slaganje korištenog modela utočnjavanja s mjernim, eksperimentalnim

difrakcijskim maksimumima. Što je manja vrijednost R_{wp} to je točnije određena pozicija difrakcijskih maksimuma prisutnih u difrakcijskoj slici, ali i ostali parametri kao što je intenzitet, širina na polovici intenziteta te asimetrija svakog difrakcijskog maksimuma.



Slika 25. Difrakcijska slika Magnezijevog citrata 375 nakon utočnjavanja i prikaz R_{wp} vrijednosti

Nakon utočnjavanja profila difrakcijskih maksimuma može se provesti korekcija na sistematske pogreške. Provedbom procedure za uklanjanje sistematskih pogreški pozicije mjernih difrakcijskih maksimuma pomiču se prema stvarnim vrijednostima. Metoda koja je korištena je metoda vanjskog standarda, LaB_6 .



Slika 26. Korekcija sistematskih pogreški kod uzorka Magnezijevog citrata 375

Na slici 26. je vidljiv pomak koji će se dogoditi nakon primjene procedure za sistematsku korekciju i taj pomak je simuliran na eksperimentalnim podacima prikazanim na slici svjetlo plavom bojom. Dakle, ono što se događa u korekciji sistematskih pogreški je samo pomak mjernih podatka prema polinomu koji je utvrđen uz mjerni standard uspoređen s teoretskim vrijednostima pozicije difrakcijskih maksimuma.

Ovako pripremljeni mjerni podaci s provedenim korekcijama koje uključuju korekciju za divergentni slit (ADS u FDS) i sistematsku pogrešku predstavlja difrakcijsku sliku koja se koristi za faznu ili tzv. mineralošku analizu svih materijala. Napomena, za sve ostale tipove korekcija koje mogu biti hraptavost površine, odstupanje visine iz fokusa, preferirana orijentacija itd. Iste trebaju biti uključene u korekciju prije provedbe strukturnih utočnjavanja ili mineraloške analize ako su iste prisutne u mjernim podacima.

3.3. Minerološka analiza difrakcijskih slika

Minerološka analiza provodi se usporedbom korigiranih mjernih podataka i to pozicije difrakcijskih maksimuma i njima pripadajućih intenziteta i njihovih relativnih omjera s podacima deponiranim u bazama podataka.

3.3.1. Baze podataka koje se koriste u identifikaciji struktorno uređenih tvari prisutnih u difrakcijskim slikama

ICSD baza podataka je sveobuhvatna zbirka koja sadrži kristalografske podatke vezane za strukture spojeva kojima je određena struktura metodom snimanja monokristala. Ista omogućava pretraživanje po različitim pojmovima kao što je kemijski sastav, naziv časopisa, DOI, parametri jedinične celije, volumen celije, simetrijski elementi (simbol i broj prostorne grupe) itd. U svrhu provedbe postupka kalibracije i uklanjanja sistematskih pogreški potrebno je provesti mjerjenje nad standardom te je u računskom dijelu nužno raspolagati s CIF (eng. *Crystallographic Information File*) modelom koji omogućava provedbu korekcije. Na slici 27. prikazano je sučelje korišteno u ICSD bazi.

Welcome to ICSD Web. Logged in: Drazan, Joszik

Content Selection

- Experim. inorganic structures
- Experim. metal-organic str.
- Theoretical structures

Navigation

- Basic search & retrieve
- Advanced search & retrieve
- Bibliography
- Cell
- Chemistry
- Symmetry
- Crystal Chemistry
- Structure Type
- Experimental Information
- DB Info
- Expert Search
- Query Management
- Manage Queries
- List Combined Queries
- Create Combined Query
- ICSD links
- ICSD News

Basic Search & Retrieve

Free Text Search

General Attributes

Bibliography

Authors

Title of Journal

Title of Article

DOI

Chemistry

Composition B66 La:1:1 Periodic Table

Number of Elements 2

Cell

Cell Parameters

Cell Volume

Tolerance +/- %

Symmetry

Space Group Symbol

Space Group Number

Crystal System

Centering

Exp. Info. & Ref. Data

New Data Only

PDF Number

Temperature K

ICSD Collection Code

Pressure MPa

Slika 27. Sučelje u ICSD bazi podataka

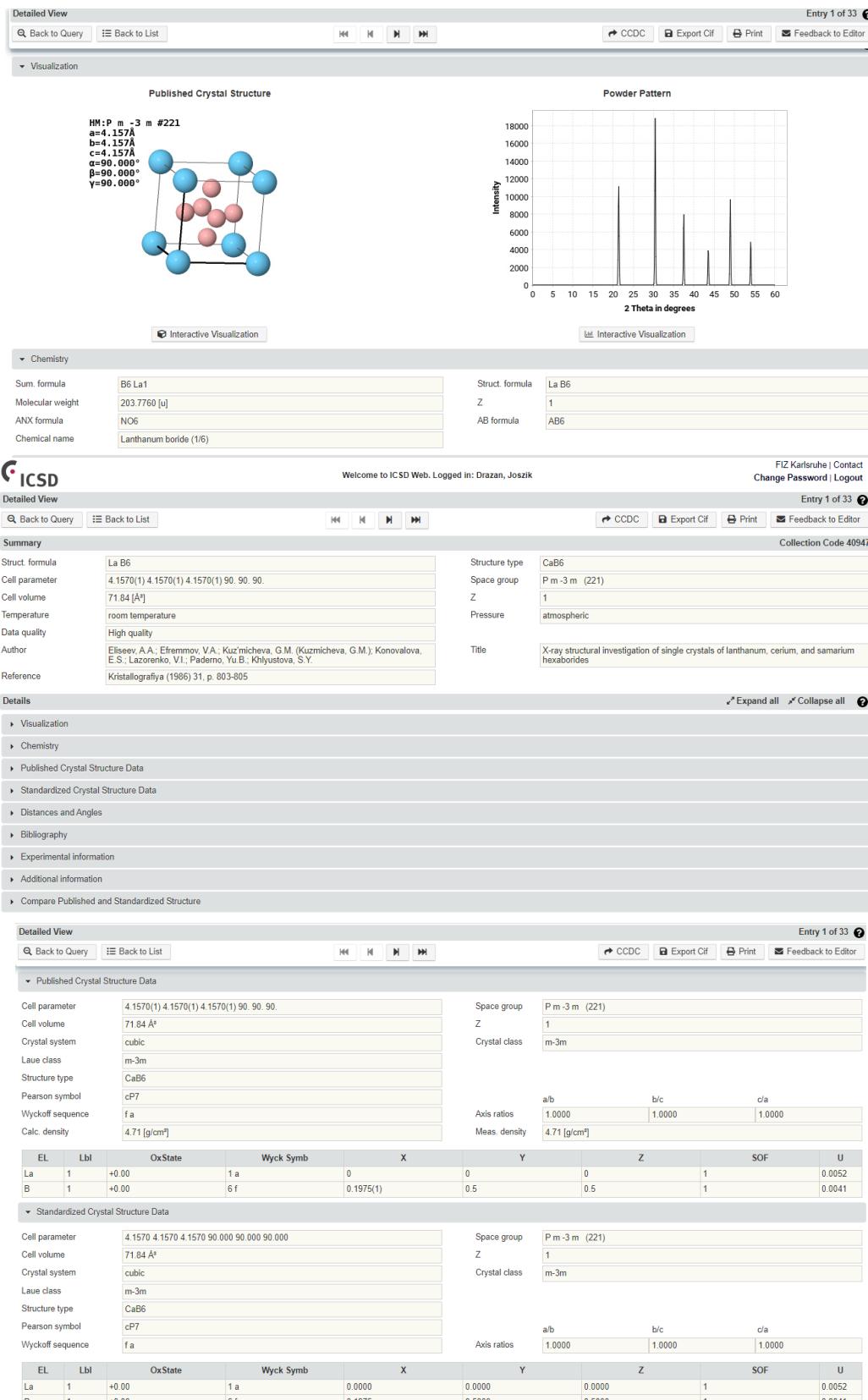
Lantanov heksaborid je spoj koji je korišten kao standard. Rezultat pretraživanja uključuje cijeli niz spojeva koji su deponirani u ICSD bazi, a u sebi sadrže ključne riječi koje smo unijeli u početni izbornik u polje za pretraživanje prema traženim ključnim riječima. Tako za pretraživanje LaB_6 (lantanovog heksaborida) rezultat pretraživanja je prikazan na slici 28.:

| Coll. Code | HMS | Struct. Form. | Struct. Type | Title | Authors | Reference | |
|------------|----------|-------------------|------------------|---|----------------------------------|--|--|
| 40947 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | X-ray structural investigation of LaB ₆ | Eliseev, A.A.; Efremov, V.E. | Kristallografiya (1986) 31, 1 | |
| 120585 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Low temperature synthesis of LaB ₆ | Simsik, Tuncay; Chatopha | Journal of Solid State Chemistry (1990) 100, 1 | |
| 152466 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Rietveld refinement of LaB ₆ | Ning Guangrong; Flemming | Journal of Applied Crystallography (1990) 23, 1 | |
| 248437 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Local and average crystal structure of LaB ₆ | Booth, C.H.; Sarrao, J.L.; Conde | Physical Review B: Condensed Matter (1990) 41, 1 | |
| 248438 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Local and average crystal structure of LaB ₆ | Booth, C.H.; Sarrao, J.L.; Conde | Physical Review B: Condensed Matter (1990) 41, 1 | |
| 248439 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Local and average crystal structure of LaB ₆ | Booth, C.H.; Sarrao, J.L.; Conde | Physical Review B: Condensed Matter (1990) 41, 1 | |
| 248440 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Local and average crystal structure of LaB ₆ | Booth, C.H.; Sarrao, J.L.; Conde | Physical Review B: Condensed Matter (1990) 41, 1 | |
| 612685 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | The structure of high-temperature LaB ₆ | Korsukova, M.M.; Gurin, V. | Journal of the Less-Common Metals (1986) 102, 1 | |
| 100930 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Magnetic susceptibility of lanthanide borides | Ayvazov, M.I.; Aleksandrov | Physics of Metals and Metallography (1986) 61, 1 | |
| 194636 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Structural refinement and magnetic properties of LaB ₆ | Chen, Chun-Hua; Alzawa, T. | Journal of Alloys and Compounds (1990) 190, 1 | |
| 196907 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | The borides of some transition metals | Kiessling, Roland | Acta Chemica Scandinavica (1970) 24, 1 | |
| 198728 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Borides of rare earth and transition metals | Post, B.; Moskowitz, D.; Gl | Plansee Proceedings, Paper (1970) | |
| 199000 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Production and X-ray investigation of lanthanide borides | Mamedov, F.G.; Meerson, I. | Inorganic Materials (1967) | |
| 199026 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Physicochemical properties of lanthanide borides | Timofeeva, I.I.; Timofeeva, N. | Inorganic Materials (1968) | |
| 199064 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Rare-earth element hexaborides | Mordovin, O.A.; Timofeeva, N. | Russian Journal of Inorganic Chemistry (1968) | |
| 259514 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | X-ray analysis of the lanthanide borides | Zhuravlev, N.N.; Manelli, F. | Soviet Powder Metallurgy and Metal Ceramics (1970) | |
| 259515 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | X-ray analysis of the lanthanide borides | Zhuravlev, N.N.; Manelli, F. | Soviet Powder Metallurgy and Metal Ceramics (1970) | |
| 259516 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | X-ray analysis of the lanthanide borides | Zhuravlev, N.N.; Manelli, F. | Soviet Powder Metallurgy and Metal Ceramics (1970) | |
| 259517 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | X-ray analysis of the lanthanide borides | Zhuravlev, N.N.; Manelli, F. | Soviet Powder Metallurgy and Metal Ceramics (1970) | |
| 614585 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | On the homogeneity range of LaB ₆ | Paderno, Yu.B.; Lundstroem, S. | Acta Chemica Scandinavica (1970) | |
| 614588 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Superconductivity of the borides | Shul'shova, O.I.; Shcherba, V. | Inorganic Materials (1967) | |
| 614590 | P m -3 m | La B ₆ | CaB ₆ | Thermal properties of metal borides | Dutchak, Ya.I.; Fedyshin, Y. | Inorganic Materials (1972) | |

Slika 28. Rezultat pretrage za standard LaB₆

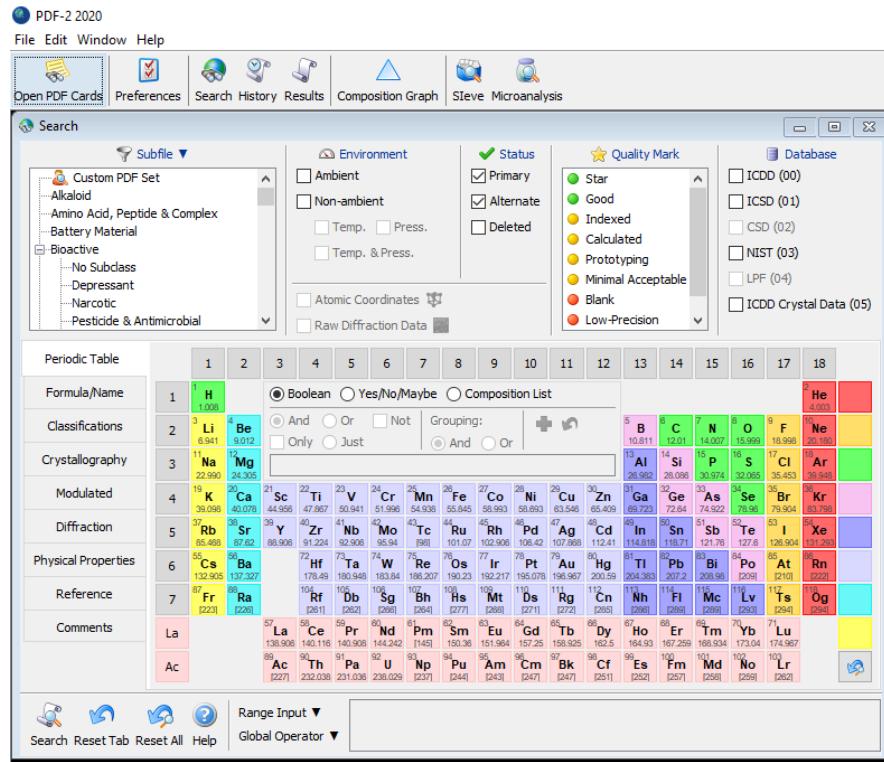
Među rezultatima posebno su istaknuti mjerni podaci koji imaju visoki stupanj pouzdanosti te su isti označeni sa zvjezdicom. To je uobičajeni način označavanja spojeva u svim kristalografskim bazama te se isti nazivaju High Quality Data ili Star quality. Za svaki spoj na popisu navodi se referentni kod spoja koji u navedenoj bazi uvijek dovodi do istih podataka. Kao što je iz slike iznad vidljivo za primjer pretraživanja baze po kemijskom sastavu za LaB₆ rezultat pretraživanja su 33 CIF kartice s definiranim referentnim brojem. Iste se razlikuju u načinu snimanja, uvjetima snimanja kao i kvaliteti podataka što je razlog potrebnog referiranja u radovima koji podatci su korišteni kao referentni.

Svaka kartica u ICSD bazi sadrži podatke o spoju razvrstane u različita polja (podaci sadržani u poljima kartice služe za pretraživanje baze i filtriranje rezultata pretraživanja). Iz kartice možemo vidjeti kako izgleda kristalna struktura spoja te kakav je njen uzorak na difraktometru. Također dobivamo uvid u eksperimentalne informacije, molekulsku masu spoja te možemo vizualno usporediti standardiziranu i objavljenu kristalnu strukturu. Podaci o spoju u ICSD bazi prikazani su na slici 29.

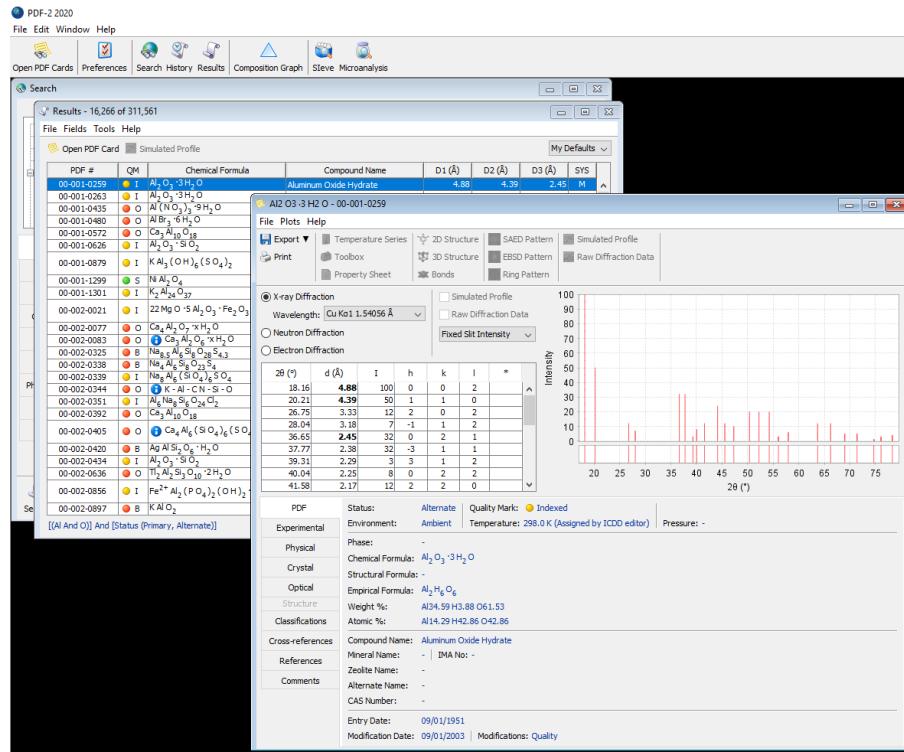


Slika 29. Podaci o spoju lantanovog heksaborida sadržani unutar kartice u ICSD bazi podataka

U analizi difrakcijske slike dodatka prehrani korištena je baza ICDD PDF2 (Released 2020) u prvom pretraživanju bez primijenjenih ograničenja (filtera za pretraživanje baze). Na slici 30. je prikazano sučelje za pretraživanje baze podataka koje omogućava uvid u deponirane difrakcijske slike praškastih uzorka u navedenoj bazi, a na slici 31. rezultat jednog pretraživanja.

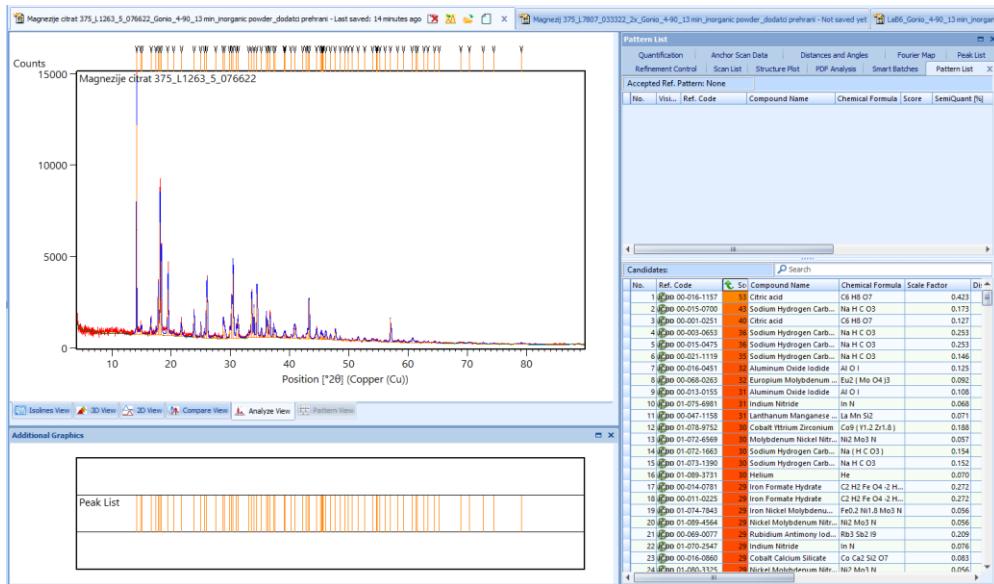


Slika 30. Prikaz sučelja za pretraživanje ICDD PDF2 baze podataka



Slika 31. Rezultat jednog pretraživanja u navedenoj bazi

U direktnom korištenju baze omogućeno je pretraživanje baze prema nizu ključnih riječi koje uključuju kemijski sastav, optička svojstva, DOI, časopis, autore, kristalni sustav itd. Ista baza je integrirana u program HighScore Plus, proizvod od Malvern Panalytical koji omogućava pretraživanje i uspoređivanje deponiranih difrakcijskih podataka u bazi s eksperimentalno dobivenim podacima. Rezultat pretraživanja bez ograničavajućih faktora prikazan je na slici 32.



Slika 32. Prikaz podataka bez ograničavajućih faktora

Rezultat pretraživanja je dan u obliku tablice potencijalnih kandidata uz naglašenu vjerojatnoću da se isti nalaze u ispitivanom uzorku u stupcu Score. Izgled tablice prikazan je na slici 33.

| No. | Ref. Code | Score | Compound Name | Chemical Formula | Scale Factor |
|-----|------------------|-------|---------------------------|---|--------------|
| 1 | Icpd 00-016-1157 | 53 | Citric acid | C ₆ H ₈ O ₇ | 0.423 |
| 2 | Icpd 00-015-0700 | 43 | Sodium Hydrogen Carb... | Na H C O ₃ | 0.173 |
| 3 | Icpd 00-001-0251 | 40 | Citric acid | C ₆ H ₈ O ₇ | 0.127 |
| 4 | Icpd 00-003-0653 | 36 | Sodium Hydrogen Carb... | Na H C O ₃ | 0.253 |
| 5 | Icpd 00-015-0475 | 36 | Sodium Hydrogen Carb... | Na H C O ₃ | 0.253 |
| 6 | Icpd 00-021-1119 | 35 | Sodium Hydrogen Carb... | Na H C O ₃ | 0.146 |
| 7 | Icpd 00-016-0451 | 32 | Aluminum Oxide Iodide | Al O I | 0.125 |
| 8 | Icpd 00-068-0263 | 32 | Europium Molybdenum... | Eu ₂ (Mo O ₄) ₃ | 0.092 |
| 9 | Icpd 00-013-0155 | 31 | Aluminum Oxide Iodide | Al O I | 0.108 |
| 10 | Icpd 01-075-6981 | 31 | Indium Nitride | In N | 0.068 |
| 11 | Icpd 00-047-1158 | 31 | Lanthanum Manganese... | La Mn Si ₂ | 0.071 |
| 12 | Icpd 01-078-9752 | 30 | Cobalt Yttrium Zirconium | Co ₉ (Y _{1.2} Zr _{1.8}) | 0.188 |
| 13 | Icpd 01-072-6569 | 30 | Molybdenum Nickel Nitr... | Ni ₂ Mo ₃ N | 0.057 |
| 14 | Icpd 01-072-1663 | 30 | Sodium Hydrogen Carb... | Na (H C O ₃) | 0.154 |
| 15 | Icpd 01-073-1390 | 30 | Sodium Hydrogen Carb... | Na H C O ₃ | 0.152 |
| 16 | Icpd 01-089-3731 | 30 | Helium | He | 0.070 |
| 17 | Icpd 00-014-0781 | 29 | Iron Formate Hydrate | C ₂ H ₂ Fe O ₄ ·2 H ₂ O | 0.272 |
| 18 | Icpd 00-011-0225 | 29 | Iron Formate Hydrate | C ₂ H ₂ Fe O ₄ ·2 H ₂ O | 0.272 |
| 19 | Icpd 01-074-7843 | 29 | Iron Nickel Molybdenu... | Fe _{0.2} Ni _{1.8} Mo ₃ N | 0.056 |
| 20 | Icpd 01-089-4564 | 29 | Nickel Molybdenum Nitr... | Ni ₂ Mo ₃ N | 0.056 |
| 21 | Icpd 00-069-0077 | 29 | Rubidium Antimony Iod... | Rb ₃ Sb ₂ I ₉ | 0.209 |
| 22 | Icpd 01-070-2547 | 29 | Indium Nitride | In N | 0.076 |
| 23 | Icpd 00-016-0860 | 29 | Cobalt Calcium Silicate | Co Ca ₂ Si ₂ O ₇ | 0.083 |
| 24 | Icpn 01-080-3325 | 29 | Nickel Molybdenum Nitr... | Ni ₂ Mo ₃ N | 0.056 |

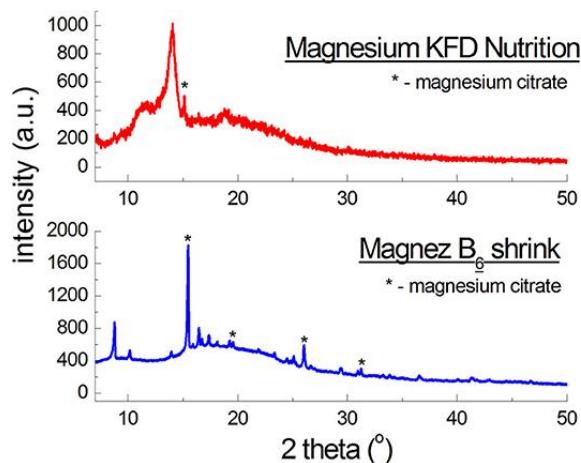
Slika 33. Prikaz kandidata koji se mogu pronaći u ispitivanom uzorku uz naglašen postotak vjerojatnoće

3.4. Primjena difrakcijskih tehnika i metoda u analizi dodataka prehrani

Obzirom da se kod većine dodataka prehrani prilikom izlaska na tržište ne provodi stroga kontrola kvalitete korištenih komponenti, koriste se dostupne ispitne metode kojima je moguće otkriti njihov mineraloški sastav. To je posebno važno jer neki proizvodači koriste strukturne analoge i kemijske spojeve slične onima koji se dodaju u pripravi lijekova. Ovakvi pripravci uobičajeno izazivaju brojne negativne učinke za zdravlje. Uz standardne metode za ispitivanje dodataka prehrani koji sadrže vitamine i minerale poput kromatografije i ekstrakcije, neki primjeri analiza provedenih na sličnim uzorcima ukazuju na efikasnost primjene XRD tehnike u iste svrhe.³⁸

U Institutu za kemiju na Fakultetu znanosti i tehnologije u Poljskoj Izabela Jendrzejewska³⁸ provela je analizu dodataka prehrani koji sadrže magnezij i kalcij. Rendgenskom difrakcijskom analizom omogućeno je dokazivanje prisutnosti spojeva magnezija i kalcija koje je proizvođač istaknuo na deklaraciji proizvoda te utvrđivanje kristalne strukture istih. Svaka kristalna tvar ima karakterističan difraktogram koji sadrži specifične položaje difraktiranih linija i njihove intenzitete. Najznačajniji uvjet pri analiziranju gdje se utvrđuje nazočnost određene faze je kompatibilnost položaja difrakcijskih linija na difrakcijskoj slici ispitivanog uzorka s položajima difrakcijskih linija na difrakcijskoj slici u bazi podataka. Pomak difrakcije za pojedinačni kut 2θ ne bi trebao odstupati više od $0,2^\circ$ u usporedbi s podacima iz baze podataka. Pomak veći od $0,2^\circ$ ukazuje na drugačiju kristalnu strukturu.

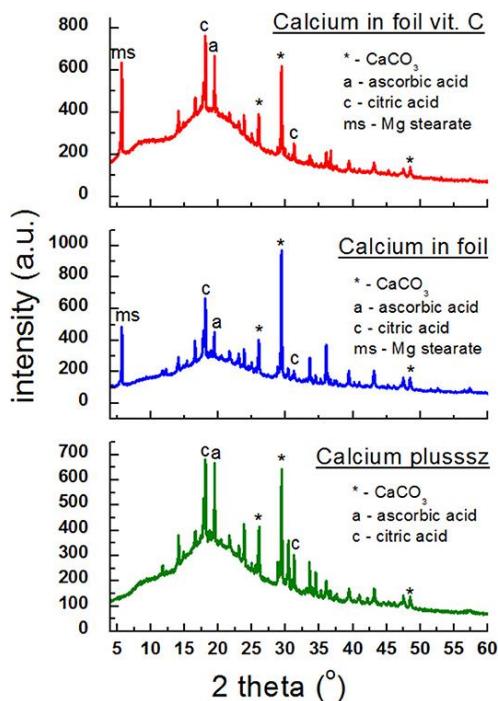
Magnezij citrat je jedan od spojeva koji se često pronađe u dodacima prehrani. Provedeno istraživanje u Poljskoj³⁸ proučavalo je 2 proizvoda u čijem se sastavu nalazi ovaj spoj, a to su *Magnez B₆ skurcz INV Poland* i *Magnesium KFD Nutrition*. Sadržaj magnezijevog citrata deklariranog od strane proizvođača iznosi 100 mg u jednoj tabletu za *Magnez B₆ skurcz INV Poland*, te 125 mg za *Magnesium KFD Nutrition*. Slika 34. prikazuje rezultate provedene XRD analize.



Slika 34. Prikaz difrakcijskih slika dodataka prehrani koji sadrže magnezijev citrat³⁸

Kod uzorka *Magnesium KFD Nutrition* uočavamo pojavu jednog difrakcijskog maksimuma pri 2θ vrijednosti 15° gdje se uočava najjača difrakcijska linija za magnezijev citrat, dok kod *Magnez B₆ skurcz INV Poland* su izražena četiri difrakcijska maksimuma pri 2θ vrijednostima: 15° , 19° , 26° i 32° . Obzirom da je linija pri 2θ vrijednosti 15° kod proizvoda *Magnesium KFD Nutrition* nižeg intenziteta unatoč većoj deklariranoj količini od strane proizvođača, zaključujemo da proizvod sadrži značajno manju količinu magnezijevog citrata od propisane. Pomak difrakcije za pojedinačni kut 2θ kod *Magnez B₆ skurcz INV Poland* niži je od $0,2^\circ$, dok kod *Magnesium KFD Nutrition* prelazi tu vrijednost. Iz navedenih rezultata možemo pretpostaviti da se u sastavu proizvoda nalazi tvar koja daje difrakcijski uzorak sličan magnezijevom citratu.³⁸

Kalcijev karbonat izvor je kalcija u dodacima prehrani ispitivanim ovim istraživanjem. Promatrana su tri pripravka čiji nazivi su sljedeći: *Calcium plusssz Polski lek*, *Calcium in foil ZDROVIT NATUR PRODUKT PHARMA* i *Calcium in foil + vit.C ZDROVIT NATUR PRODUKT PHARMA*.³⁸ Osim difrakcijskih maksimuma kalcijeva karbonata kao djelatne tvari, na difraktogramu možemo očitati difrakcijske maksimume pomoćnih tvari poput limunske kiseline, askorbinske kiseline i magnezijevog stearata. Usprkos tome što askorbinska kiselina nije navedena kao dio sastava na deklaraciji, detektirana je u *Calcium plusssz Polski lek* i *Calcium in foil ZDROVIT NATUR PRODUKT PHARMA*. Tri karakteristične difrakcijske linije kalcijeva karbonata pri 2θ vrijednostima 26° , 29° i 49° u sva tri pripravka uočljive su na difraktogramima prikazanima na slici 35.



Slika 35. Prikaz difrakcijskih slika dodataka prehrani koji sadrže kalcijev karbonat³⁸

Sadržaj kalcijevog karbonata deklariran od strane proizvođača u jednoj tableti za sva tri pripravka iznosi 300mg. Autori na temelju difrakcijske linije kalcijevog karbonata na difraktogramima koji su približno istog intenziteta koriste za utvrđivanje količine spoja te potvrđuju da je ona u skladu s deklariranim. Također, ustanovljena je zadovoljavajuća usklađenost vrijednosti kutova 2θ sa standardom u bazi podataka što upućuje na to da je isti kristalni oblik spoja prisutan u ovim dodacima prehrani te da su isti autentični. Navedeni primjeri upućuju na to da se odgovarajuće komponente uspješno mogu determinirati XRD metodom. Nedostatak linija ili prisutnost dodatnih linija, kao i pomaci linija na difraktogramu upozoravaju na patvorenje proizvoda. Kada rezultat analize dovodi u pitanje autentičnost proizvoda, preporučljivo je ispitivanje proširiti drugim metodama. Kvalitetniji rezultati dobiju se primjenom više detekcijskih tehniki.³⁸

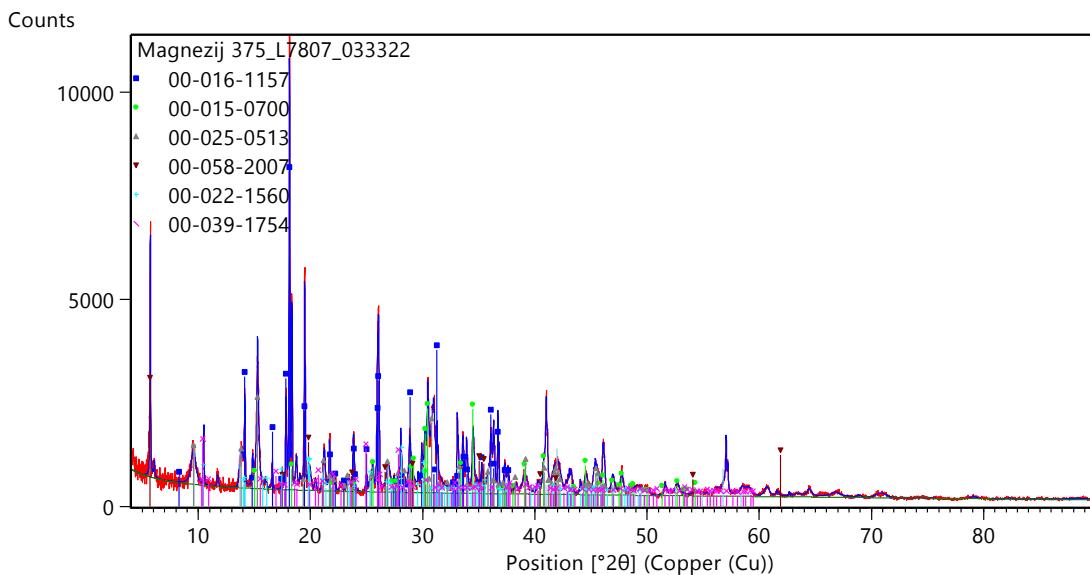
U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada korišteni su dodaci prehrani tvrtke Dietpharm i to: Magnezij citrat 375, Magnezij 375, Calcium 600, Kalcij + C te Kalcij citrat + D u svrhu utvrđivanja mogućnosti primjene difrakcijskih tehniki u analizi dodataka prehrani kao i sukladnosti eksperimentalno utvrđenog mineraloškog sastava dodatka prehrani s deklariranim sastavom.

Prema Pravilniku o informiranju potrošača o hrani, 375 mg magnezija na dan je dovoljno za održavanje zdravlja. Proizvođač je deklarirao da je u jednoj šumećoj tableti sadržaj magnezija 375 mg što odgovara preporučenom dnevnom unosu, stoga je preporučljivo koristiti ovaj dodatak prehrani jer lako i brzo možemo unijeti potpunu potrebnu količinu minerala. Doprinos ravnoteži elektrolita, normalnoj funkciji mišića i živčanog sustava te sintezi bjelančevina su neki od ključnih benefita ovoga pripravka. Preporuča se svim osobama, a posebice onima koje se bave sportom i rekreacijom. Također je pogodan za pojedince koji osjećaju manjak energije i umor.⁴⁷ O kemijskom obliku magnezija prisutnog u dodatku prehrani ovisi kolika će količina minerala biti iskorištena u organizmu. Nije poželjno konzumirati magnezijeve soli u većim koncentracijama nego što je potrebno, obzirom da se većina njih slabo apsorbira te mogu djelovati lokalno u probavnom sustavu i izazvati gastrointestinalne tegobe u vidu laksativnog učinka.⁴⁸ Poznato je da se anorganski oblici magnezija slabije apsorbiraju u odnosu na organske magnezijeve soli. Istraživanjem koje su proveli J. S. Linberg i sur.⁴⁹ ispitivana je topljivost različitih oblika soli magnezija uspoređujući apsorpciju magnezijeva oksida kao anorganskog oblika i magnezijeva citrata kao predstavnika organske magnezijeve soli.⁴⁹ Dokazano je da magnezijev citrat visoko topljiv u vodi, dok je magnezijev oksid slabo topljiv. Izvršeno je testiranje apsorpcije dvaju spojeva na zdravim dobrovoljcima, a rezultat analize je pokazao značajno bolju apsorpciju magnezijeva citrata. Zbog brže apsorpcije i visoke bioraspoloživosti pripravak Magnezijev citrat 375 smatra se boljim odabirom.⁴⁹ Dietpharm dodatak prehrani Calcium 600 ne osigurava preporučeni dnevni unos minerala. Uz korištenje suplementacije, potrošači također moraju konzumirati hranu bogatu kalcijem kako bi osigurali potrebe za njim. U tijelu je uglavnom vezan u kostima i zubima, stoga je unos kalcija bitan radi njihovog održavanja i preporuča se posebice starijim osobama.⁵⁰ Pri konzumiranju dodatka prehrani treba bit umjeren obzirom da može doći do hiperkalcemije, to jest povištene razine kalcija u krvi. Kalcitonin i paratireoidni hormon upravljaju razinom kalcija u krvi, stoga visoke koncentracije kalcija mogu uzrokovati disbalans hormona.⁵¹ Jedna tableta pripravka Kalcij + C sadrži 63% preporučenog dnevног unosa kalcija za odrasle i 313% preporučenog dnevног unosa vitamina C. Dobrobiti kalcija već su opisane, a vitamin C snižava razinu iscrpljenosti i umora. Kalcij + C preporuča se svima koji žele održati normalan rad imunološkog sustava.⁵²

Obzirom da pripravak sadrži više vitamina C nego što je potrebno za podmirivanje dnevnih potreba, poželjno je pristupiti konzumiranju s velikim oprezom jer višak vitamina C može izazvati smetnje poput dijareje kao i promjene u menstrualnom ciklusu.⁵³ Vitamin D u pripravku Kalcij citrat + D pridonosi boljoj apsorpciji kalcija. Proizvod se preporuča fizički aktivnim i starijim osobama za očuvanje zdravlja kostiju, a sadrži 100% preporučenog dnevnog unosa vitamina D i 75% preporučenog dnevnog unosa kalcija za odrasle.⁵⁴ U dodacima prehrani kalcij se može pojaviti u obliku raznih soli, stoga apsorpcija kalcija varira ovisno o korištenoj soli. Na primjer, kalcijev citrat se izvrsno apsorbira neovisno uzima li se s hranom ili ne, dok se kalcijev karbonat bolje apsorbira kada se konzumira zajedno s hranom jer apsorpcija ovisi o želučanoj kiselini.⁵⁵ Preporuča se umjerena konzumacija vitamina D kao dodatka prehrani jer prevelike doze dovode do visoke razine kalcija u krvi.⁵⁶

Magnezij 375

Prema podacima vidljivima na deklaraciji proizvoda, dodatak prehrani Magnezij 375 sadrži magnezijev karbonat kao izvor magnezijevih iona. Osim glavne komponente, u pripravak su dodani odgovarajući spojevi koji unutar šumeće tablete izvršavaju specifične funkcije. Prema deklaraciji pripravak sadrži sljedeće spojeve: limunsku kiselinu, potom natrijev bikarbonat kao regulator kiselosti, zatim sorbitol, L-askorbinsku kiselinu, inulin i kukuruzni škrob kao tvari za povećavanje volumena. Natrijev saharin, natrijev ciklamat i piridoksin hidroklorid se nalaze u sastavu proizvoda jer imaju funkciju sladila, a riboflavini se koriste kao bojilo.



Slika 36. Difraktogram uzorka Magnezij 375

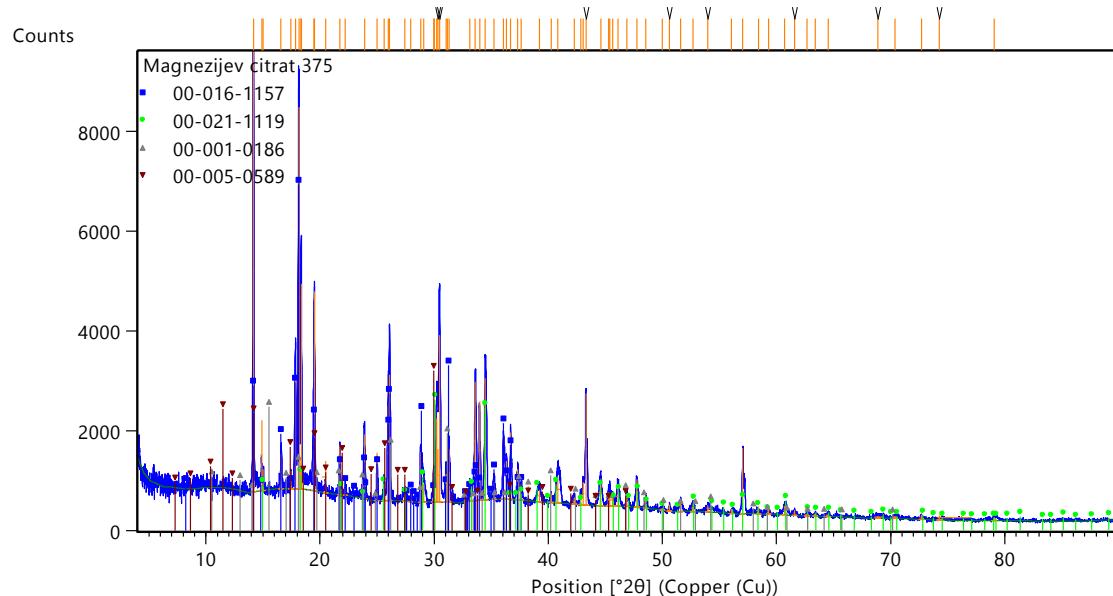
Tablica 6. Minerološki sastav uzorka Magnezij 375

| Referentni kod | Naziv spoja | Kemijska formula |
|----------------|---|---|
| 00-016- 1157 | Limunska kiselina | $C_6H_8O_7$ |
| 00-015-0700 | Natrijev bikarbonat | $NaHCO_3$ |
| 00-025-0513 | Magnezijev karbonat hidroksid hidrat | $Mg_5(CO_3)_4(OH)_2 \cdot 4 H_2O$ |
| 00-058-2007 | Kalcij magnezij aluminij silikat hidroksid hidrat | $Ca_{0.2}(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$ |
| 00-022-1560 | Askorbinska kiselina | $C_6H_8O_6$ |
| 00-039-1754 | Piridoksin hidroklorid | $C_8H_{12}ClNO_3$ |

Rezultati minerološke analize koja je provedena na uzorku prikazani su u tablici 6. i ukazuju na prisutnost limunske kiseline (PDF 00-016-1157), natrijeva bikarbonata (PDF 00-015-0700), magnezijeva karbonata hidroksid hidrata (PDF 00-025-0513), kalcij magnezij aluminij silikat hidroksid hidrata (PDF 00-058-2007), askorbinske kiseline (PDF 00-022-1560) i piridoksin hidroklorida (PDF 00-039-1754). Prisutnost navedenih mineralnih vrsta u ispitivanom uzorku nije u potpunosti skladu s navodima koji se nalaze na deklaraciji samog proizvoda. Analizom difrakcijske slike nije dokazana prisutnost sorbitola, inulina, kukuruznog škroba, natrijeva saharina, natrijeva ciklamata ni riboflavina. Proizvođač je deklarirao magnezijev karbonat kao izvor magnezijevih iona u pripravku, a analiza ukazuje i na prisutnost silikatnog oblika magnezija.

Magnezijev citrat 375

Od strane proizvođača je deklarirano da je spoj magnezijev citrat izvor magnezijevih iona unutar dodatka prehrani Magnezijev citrat 375. U sastavu ovog pripravka, prema deklariranim podacima, također se nalaze sljedeći sastojci: limunska kiselina, inulin, zatim natrijev bikarbonat kao regulator kiselosti, polietilen glikol kao tvar za sprječavanje zgrudnjavanja. Sukraloza je dodana kao sladilo, a riboflavini kao bojilo.



Slika 37. Difraktogram uzorka Magnezij citrat 375

Tablica 7. Minerološki sastav uzorka Magnezij citrat 375

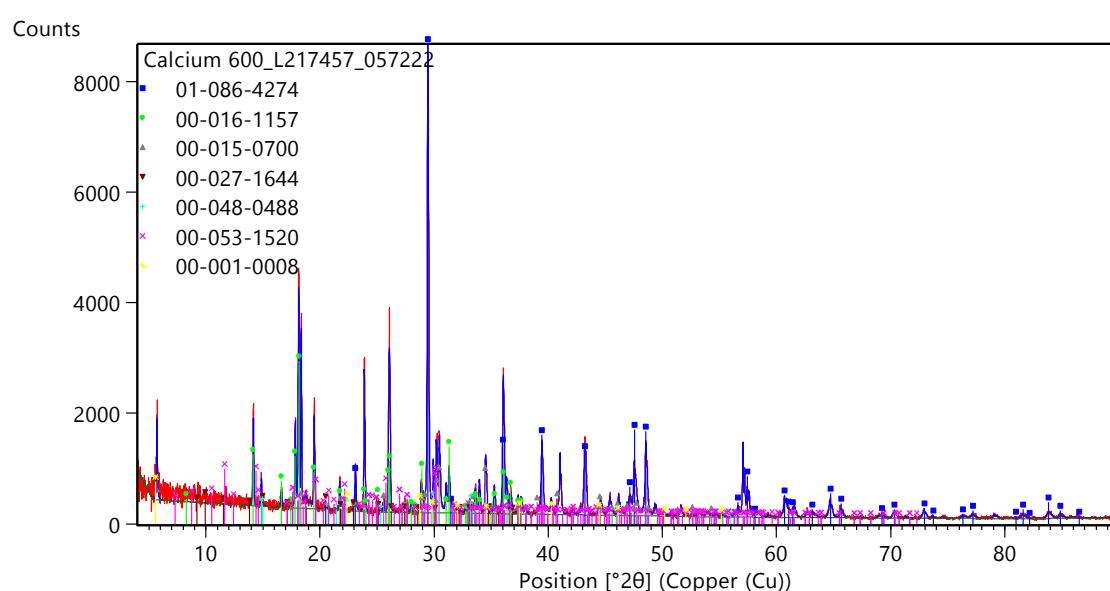
| Referentni kod | Naziv spoja | Kemijska formula |
|----------------|-----------------------------------|---|
| 00-015-0700 | Natrijev bikarbonat | NaHCO_3 |
| 00-016-1157 | Limunska kiselina | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ |
| 00-001-0186 | Magnezijev citrat tetradekahidrat | $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Mg}_3\text{O}_{14} \cdot 14 \text{ H}_2\text{O}$ |
| 00-005-0589 | Riboflavin | $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ |

Iz analize difrakcijskih slika snimljenih na uzorku dokazana je prisutnost mineralnih vrsta prikazanih u tablici 7., a to su: magnezijev citrat tetradekahidrat (PDF 00-001-0186), limunska kiselina (PDF 00-016-1157), natrijev bikarbonat (PDF 00-015-0700) te riboflavin (PDF 00-005-0589). U uzorku nisu detektirane iduće mineralne vrste: inulin, polietilen glikol i sukraloza. Proizvođač je deklarirao magnezijev citrat kao

izvor magnezijevih iona u pripravku, a analiza ukazuje na prisutnost magnezijevog citrata tetradekahidrata.

Calcium 600

Calcium 600 je dodatak prehrani koji se prema deklaraciji sastoji od kalcijeva karbonata i trikalcijeva fosfata kao izvora kalcijevih iona. Isti prema deklaraciji sadrži sljedeće sastojke: limunsku kiselinu, potom natrijev karbonat, natrijev bikarbonat te krumpirov škrob kao regulatore kiselosti, zatim sorbitol i inulin kao tvari za zadržavanje vlage. Natrijev ciklamat, maltodekstrin i natrijev saharin dodani su kao sladila, dok su se kao bojila upotrijebili riboflavini i Beetroot Red.



Slika 38. Difraktogram uzorka Calcium 600

Tablica 8. Minerološki sastav uzorka Calcium 600

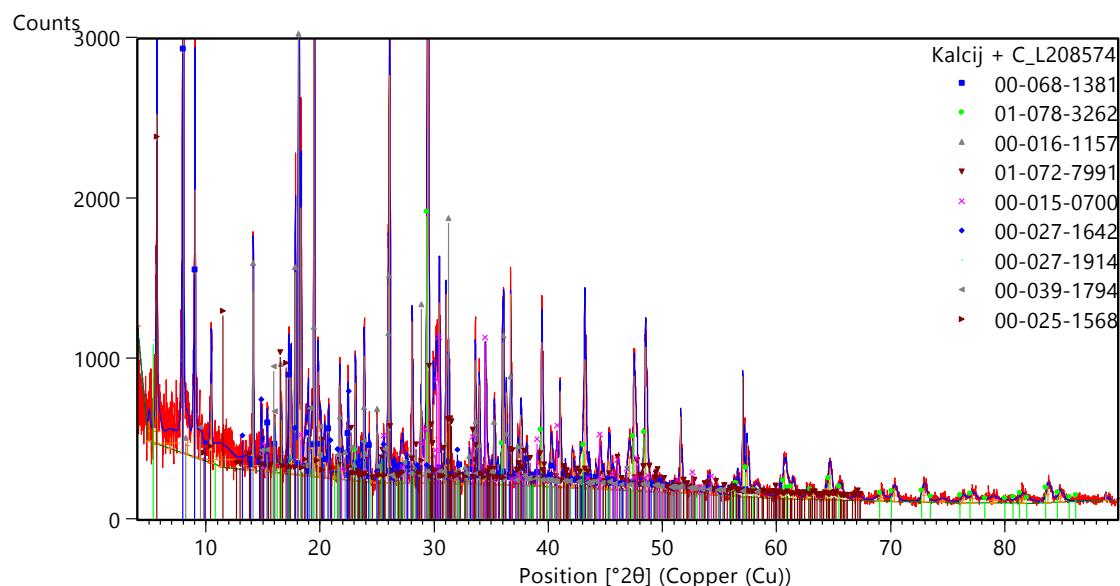
| Referentni kod | Naziv spoja | Kemijska formula |
|----------------|----------------------|--|
| 01-086-4274 | Kalcijev karbonat | CaCO_3 |
| 00-016-1157 | Limunska kiselina | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ |
| 00-015-0700 | Natrijev bikarbonat | NaHCO_3 |
| 00-027-1644 | Sorbitol | $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ |
| 00-048-0488 | Trikalcijev fosfat | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| 00-053-1520 | Riboflavin | $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ |
| 00-001-0008 | Kalcij citrat hidrat | $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Ca}_3\text{O}_{14} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |

Rezultati minerološke analize uzorka navedeni su u tablici 8. i ukazuju na prisustvo kalcijeva karbonata (PDF 01-086- 4274), limunske kiselina (PDF 00-016-1157), natrijeva bikarbonata (PDF 00-015-0700), sorbitola (PDF 00-027-1644),

trikalcijeva fosfata (PDF 00-048-0488), riboflavina (PDF 00-053-1520) te kalcij citrat hidrata (PDF 00-001-0008) koji na deklaraciji nije evidentiran kao izvor kalcijevih iona u dodatku prehrani. Prilikom analize uzorka nije dokazana prisutnost natrijeva karbonata, krumpirovog škroba, sorbitola, inulina, maltodekstrina, natrijevog ciklamata, natrijevog saharina ni Beetroot Red-a.

Kalcij + C

Kalcijev karbonat i kalcijev glukonat su glavni izvori kalcijevih iona u pripravku. Isti također sadrži: limunsku kiselinu, zatim natrijev bikarbonat, natrijev karbonat i krumpirov škrob kao tvari koje reguliraju kiselost, od tvari koje zadržavaju vlagu korišteni su inulin, sorbitol i L-askorbinska kiselina. Natrijev ciklamat i natrijev saharin su sladila koja su prisutna u pripravku.



Slika 39. Difraktogram uzorka Kalcij + C

Tablica 9. Minerološki sastav uzorka Kalcij + C

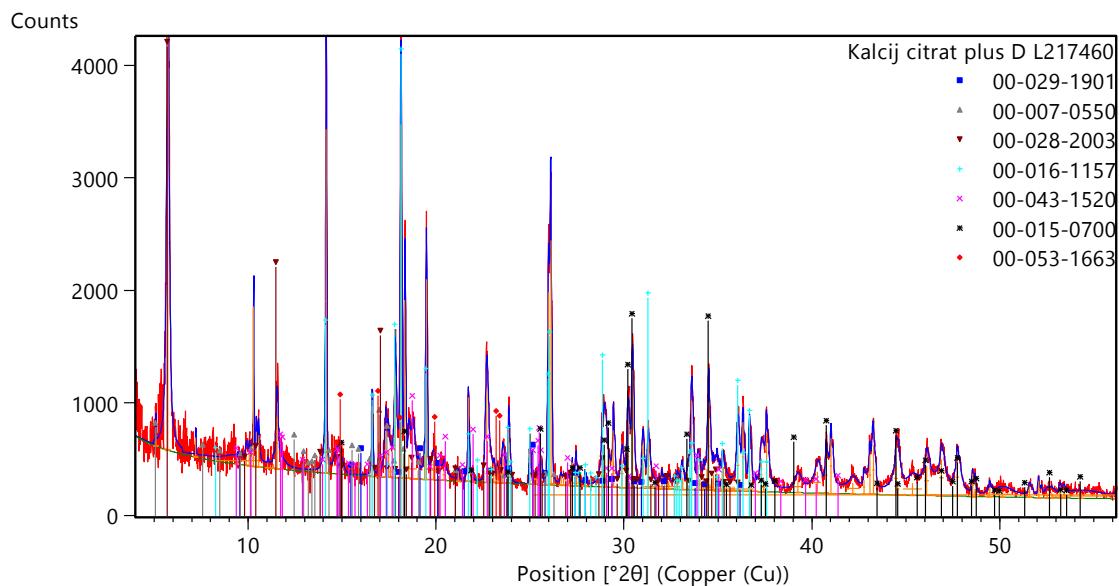
| Referentni kod | Naziv spoja | Kemijska formula |
|----------------|--------------------------------|--|
| 00-068-1381 | Kalcijev D-glukonat monohidrat | $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ |
| 01-078-3262 | Kalcijev karbonat | $Ca(CO_3)$ |
| 00-016-1157 | Limunska kiselina | $C_6H_8O_7$ |
| 01-072-7991 | Natrijev karbonat hidrat | $Na_2(CO_3)(H_2O)_{10}$ |
| 00-060-0319 | Natrij kalcij aluminij silikat | $(Ca,Na)_{0.3}Al_2(Si,Al)_4O_{10}(OH)_2 \cdot xH_2O$ |

| | | |
|-------------|-----------------------------|--|
| 00-015-0700 | hidroksid hidrat | |
| 00-027-1642 | Natrijev bikarbonat | NaHCO ₃ |
| 00-027-1914 | Sorbitol | C ₆ H ₁₄ O ₆ |
| 00-039-1794 | Kalcijev ciklamat | C ₁₂ H ₂₄ CaN ₂ O ₆ S ₂ |
| 00-025-1568 | Saharin | C ₇ H ₅ NO ₃ S |
| | Kalcijev citrat tetrahidrat | C ₁₂ H ₁₀ Ca ₃ O ₁₄ ·4H ₂ O |

Rezultati mineraloške analize provedene na uzorku prikazani su u tablici 9. Kalcijev karbonata (PDF 01-078-3262) i kalcijev D-glukonat monohidrat (PDF 00-068-1381) detektirani su kao izvori iona kalcija u uzorku. Na deklaraciji je istaknuta prisutnost kalcijeva glukonata, no analizom je utvrđen kalcijev D-glukonat monohidrat. Također se u uzorku nalaze kalcijev citrat tetrahidrat (PDF 00-025-1568) i natrij kalcij aluminij silikat hidroksid hidrat (PDF 00-060-0319) koji nisu deklarirani. Dokazana je prisutnost limunske kiseline (PDF 00-016-1157), natrijevog karbonat hidrata (PDF 01-072-7991) umjesto natrijevog karbonata, natrijevog bikarbonata (PDF 00-015-0700) i sorbitola (PDF 00-027-1642). Umjesto natrijevog ciklamata i natrijevog saharina u analizi je otkriven kalcijev ciklamat (PDF 00-027-1914) i običan saharin (PDF 00-039-1794). Krumpirov škrob, inulin i L-askorbinska kiselina nisu identificirani. Iz navedenih podataka zaključujemo da podaci navedeni na deklaraciji nisu u potpunosti u skladu s realnim sadržajem uzorka.

Kalcij citrat + D

Podaci na deklaraciji ukazuju na to da je kalcijev citrat izvor kalcijevih iona u ovom dodatku prehrani. Osim spomenutog spoja, u sastav pripravka također ulaze: limunska kiselina, natrijev bikarbonat kao regulator kiselosti, potom sorbitol i inulin kao tvari za zadržavanje vlage, dok izvor sladila predstavljaju natrijev ciklamat, natrijev saharin, krumpirov škrob i kolekalciferol (vitamin D).



Slika 40. Difraktogram uzorka Kalcij citrat + D

Tablica 10. Minerološki sastav uzorka Kalcij citrat + D

| Referentni kod | Naziv spoja | Kemijska formula |
|----------------|------------------------|---------------------------------|
| 00-029-1901 | Saharin | $C_7H_5NO_3S$ |
| 00-007-0550 | Vitamin D ₂ | $C_{28}H_{44}O$ |
| 00-028-2003 | Kalcijev citrat hidrat | $Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 4H_2O$ |
| 00-016-1157 | Limunska kiselina | $C_6H_8O_7$ |
| 00-043-1520 | γ -sorbitol | $C_6H_{14}O_6$ |
| 00-015-0700 | Natrijev bikarbonat | $NaHCO_3$ |
| 00-053-1663 | Pšenični škrob | $(C_6H_{10}O_5)_n$ |

Rezultati minerološke analize uzorka navedeni su u tablici 10. Sadržaj mineralnih vrsta ukazuje na prisustvo kalcijeva citrata hidrata (PDF 00-028-2003) umjesto kalcijeva citrata kao izvora kalcijevih iona. Također su prisutne sljedeće mineralne vrste: limunska kiselina (PDF 00-016-1157), natrijev bikarbonat (PDF 00-015-0700) i vitamin D (PDF 00-007-0550). Umjesto krumpirovog škroba identificiran je pšenični škrob (PDF 00-053-1663), umjesto natrijevog saharina prisutan je običan saharin (PDF 00-029-1901), a umjesto sorbitola je prisutan γ -sorbitol (PDF 00-043-1520). Inulin i natrijev ciklamat nisu identificirani. Analiza navedenog uzorka ukazuje na nepodudarnost informacija istaknutih na deklaraciji proizvoda sa stvarnim sastavom.

4. ZAKLJUČAK

Dodaci prehrani u posljednje vrijeme su sve češće korišteni jer omogućuju brz unos esencijalnih mikronutrijenata, ali obzirom na manjak mjera zakonske regulative poželjno je istražiti njihov sastav. Na temelju rezultata dobivenih istraživanjem koje je provedeno u svrhu ovog završnog rada može se donijeti zaključak da je rendgenska difrakcijska analiza jednostavna i brza metoda kojom se mogu identificirati mineralne vrste u odabranim dodacima prehrani. Rezultati XRD analize na praškastim uzorcima upućuju na uspješnu identifikaciju strukturno uređenih mineralnih i vitaminskih vrsta. Međutim nedostatak difrakcijskih tehnika je njihova nemogućnost identifikacije amorfne, strukturno ne uređene faze. Upravo zbog navedenog preporuča se korištenje i drugih tehnika karakterizacije poput kromatografskih i/ili spektroskopskih metoda u svrhu bolje karakterizacije materijala. Za razliku od ostalih metoda koje zahtijevaju predobradu uzorka, rendgenska difrakcijska analiza pruža mogućnost korištenja izvornih uzorka bez posebno zahtjevnih priprema i bez narušavanja unutarnje strukture materijala.

5. POPIS KRATICA

| | |
|---------|--|
| XRD | - rendgenska difrakcijska analiza - X-ray diffraction analysis |
| ICDD | - međunarodna baza podataka o kristalografskoj difrakciji - international crystallographic diffraction database |
| RDA | - preporučeni dnevni unos - recommended dietary allowance |
| UL | - gornja podnošljiva razina unosa - tolerable upper intake level |
| FDA | - američka agencija za hranu i lijekove - food and drug administration |
| EFSA | - europska agencija za sigurnost hrane - european food safety authority |
| HPLC | - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - high-performance liquid chromatography |
| HPLC-MS | - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta sa masenom spektrometrijom - high performance liquid chromatography-mass spectrometry |
| GC | - plinska kromatografija - gass chromatography |
| GC-MS | - plinska kromatografija s masenom spektrometrijom - gas chromatography-mass spectrometry |

6. LITERATURA

1. Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća o usklađivanju zakona država članica u odnosu na dodatke prehrani (2002/46/EZ). Službeni list Europske unije **46** (2002).
2. Pravilnik o dodacima prehrani (NN 46/2011). Narodne novine **46** (2011).
3. A. Kowalskaa, M. Bienieka, L. Manningb, Food supplements' non-conformity in europe – Poland: A case study, Trends in Food Sci Technol. **93** (2019) 262-270, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.022>.
4. D. Vranešić Bender, S. Krstev, Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka, Medicus. **17** (2008) 19-25, <https://hrcak.srce.hr/37974>.
5. F. Mihelić, Kratak pregled vitamina, Farmaceutski glasnik. **10** (2) (1954) 45-52, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:802856>.
6. URL: [Vitamini | Definicija hrane](#) (07.03.2023.)
7. URL: [Izvori | Definicija hrane](#) (07.03.2023.)
8. URL: [Izvori | Definicija hrane](#) (07.03.2023.)
9. R. D. Semba, The Discovery of the Vitamins, Int J for Vitam Nutr Res. **82** (5) (2012) 310-315, doi: <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000124>.
10. D. Šupraha, Unos vitamina među studentima na Sveučilištu u Rijeci. Završni rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, 2020.
11. R. Costa-Pinto, D. Gantner, Macronutrients, minerals, vitamins and energy, Anaesth. **21** (3) (2020) 157-161, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.12.006>.
12. M. Zeece, Vitamins and minerals, Introduction to the Chemistry of Food. Academic Press (2020) 163-212, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809434-1.00005-0>.
13. E. H. Nickel, MINERALS | Definition and Classification, Encyclopedia of Geology (2005) 498–503, doi: <https://doi.org/10.1016/b0-12-369396-9/00259-8>.
14. URL: [Minerali | Definicija hrane](#) (13.03.2023.)
15. L. McDowell, Mineral Nutrition History: The Early Years, First Edition Design Publishing, Florida USA, 2017., str. 6-10
16. URL: [minerali | Hrvatska enciklopedija](#) (13.03.2023.)

17. URL: [kofaktor | Hrvatska enciklopedija](#) (18.03.2023.)
18. URL: [Nedostatak u organizmu | Definicija hrane](#) (20.03.2023.)
19. URL: [Nedostatak u organizmu | Definicija hrane](#) (20.03.2023.)
20. Pravilnik o informiranju potrošača o hrani (NN 8/2013). Narodne novine **8** (2013).

21. I. Hamrick, S. H. Counts, Vitamin and mineral supplements, Prim. Care **35** (4) (2008) 729-747, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2008.07.012>.
22. J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts, Anal Chim Acta. **1036** (2018) 1-15, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.017>.
23. M. Begić, Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafila u dodacima prehrani za erektilnu disfunkciju. Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, 2018.
24. A. Jovanović, Određivanje kvalitete i sigurnosti dodataka prehrani separacijskim tehnikama. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, 2021.

25. Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (NN 160/2013). Narodne novine **160** (2013).

26. URL: [How vitamin is made - ingredients of, making, history, used, processing, components, steps, product \(madehow.com\)](#) (25.03.2023.)
27. S. Survase, I. Bajaj, R. S. Singhal, Biotechnological Production of Vitamins, Food Technol. Biotechnol. **44** (3) (2006) 381-395, <https://hrcak.srce.hr/109918>.
28. URL:http://sajamideja.fkit.hr/sajam%202017/Predavanja/F_Leva%C4%8Di%C4%87%20Ko%C5%A1%C4%87ak_I_Babec_ACG%20Lukaps.pdf (19.05.2023.)
29. URL: <https://www.pharmaguideline.com/2021/10/tablet-manufacturing-process-overview.html> (29.05.2023.)
30. M.A. Augustin, L. Sanguansri, Challenges in developing delivery systems for food additives, nutraceuticals and dietary supplements, Encapsulation

- Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals. (2012) 19-48, doi: <https://doi.org/10.1533/9780857095909.1.19>.
31. T. M. Ho, T. Truong, B. R. Bhandari, Methods to characterize the structure of food powders - a review, *Bosci Biotechnol Biochem.* 81 (4) (2017) 651-671, doi: <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1274643>.
 32. A. Martinko, Analitičke metode za određivanje vitamina. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2019.
 33. T. Buhač, Nove metode u analitici dodataka prehrani za ublažavanje simptoma menopauze. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2022.
 34. D. Džambić, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek, 2019.
 35. A. Perković, Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, 2018.
 36. A. Bićanić, Termičko, rengensko i UV zračenje. Specijalistički diplomske stručne radove, Veleučilište u Karlovcu, Specijalistički diplomske stručne studije sigurnosti i zaštite, 2022.
 37. A. Ćupurdija, Atomski spektri. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za fiziku, 2014.
 38. I. Jendrzejewska, Application of X-Ray Powder Diffraction for Analysis of Selected Dietary Supplements Containing Magnesium and Calcium, *Front Chem.* **8** (2020) 1-12, doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00672>. (09.04.2023.)
 39. V. D. Pavkov, G. Bakić, V. Maksimović i sur., Rendgenska difraktometrija praha XRPD, *Sinteza* (2019), doi: <https://doi.org/10.15308/Sinteza-2019-341-348>.
 40. N. Fišter, FTIR i XRD analiza sedimenata i tla na području Plitvičkih jezera. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Geotehnički fakultet, 2018.
 41. D. Šimčić, Istraživanje materijala pomoću raspršenja x-zraka. Završni rad, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2015.

42. URL:https://www.researchgate.net/post/In_XRD_why_is_2-theta_used_instead_of_theta (26.05.2023.)
43. S. Modric, Rendgenska difrakcija u polikristalu. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2018.
44. URL: <https://cms.eas.ualberta.ca/xrd/sample-preparation/> (14.05.2023.)
45. URL:https://cdifx.univrennes1.fr/RECIPROCS/ANF2016_Frejus/pdf/RECIPROCS2016_M_Fransen_PANalytical.pdf (14.05.2023.)
46. URL: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/category/x-ray-components/detectors/pixcel3d> (19.05.2023.)
47. URL: <https://www.dietpharm.com/proizvodi/magnezij-375-sumece-tablete-a45/#> (20.05.2023.)
48. URL: <https://www.dietpharm.com/blog/svojstva-i-primjena-magnezijevog-citrata/> (20.05.2023.)
49. J. S. Linberg, M. M. Zobitz, J. R. Poindexter i sur., Magnesium bioavailability from magnesium citrate and magnesium oxide, *J. Am. Coll. Nutr.* 9 (1) (1990) 48-55, doi: <https://doi.org/doi:10.1080/07315724.1990.10720349>. (20.05.2023.)
50. URL: <https://www.dietpharm.com/en/products/calcium-600-effervescent-tablets/#> (20.05.2023.)
51. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/poremecaji-prehrane-i-metabolizma/ravnoteza-soli/upravljanje-kalcijem> (20.05.2023.)
52. URL: https://www.dietpharm.com/proizvodi/kalcijc-sumece-tablete/#modal_699_2 (23.05.2023.)
53. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/poremecaji-prehrane-i-metabolizma/vitamini-i-minerali/visak-vitamina-c> (23.05.2023.)
54. URL: <https://www.dietpharm.com/proizvodi/kalcij-citratd-sumece-tablete/#> (23.05.2023.)
55. URL: <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/minerali/kalcij-ca/izvori/> (23.05.2023.)

56. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/poremecaji-prehrane-i-metabolizma/vitamini-i-minerali/visak-vitamina-d>
(23.05.2023.)