



MAKÜ FEBED
ISSN Online: 1309-2243
<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/makufebed>

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Özel Sayı 1: 44-50 (2016)
The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University Special Issue 1: 44-50 (2016)

İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICPOES) ile Siyah Çikolata İçindeki Bazı Elementlerin Tayini^β

Diğdem TRAK¹, Yasin ARSLAN^{2*}

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Burdur

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Nanobilim ve Nanoteknoloji Bölümü, Burdur

✉ Sorumlu Yazar (Corresponding author)*: yasinarslan@mehmetakif.edu.tr

ÖZ

Bu çalışmada, Burdur'dan satın alınan siyah çikolatadaki bazı elementlerin (As, Bi, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V, Zn) tayini indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICPOES) ile gerçekleştirilmiştir. ICPOES tekniği ile örneklerin kantitatif analizinde kalibrasyon yöntemi kullanılmış ve sonuçlar %95 güven seviyesinde verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Siyah çikolata, Element, İndüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi

Determination of Some Elements in Dark Chocolate by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICPOES)

ABSTRACT

In this study, the some elements (As, Bi, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V, Zn) in the dark chocolate obtained from Burdur were determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICPOES). The calibration method was applied for the quantitative analysis of the samples and the results are given at 95% of confidence level.

Keywords: Dark chocolate, Metal, Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

GİRİŞ

Çikolata; kakao çekirdeği, şeker, kakao yağı, süt ve çeşni maddelerinin karıştırılmasıyla hazırlanan bir besindir (Begum et al., 2007) Kakao, süt ve kakao yağının bulunma miktarlarına bağlı olarak; siyah, sütlü ve beyaz çikolata olmak üzere başlıca 3 farklı çikolata çeşidi bulunmaktadır. Çikolatanın temel bileşeni olan kakao, Theobroma kakao çekirdeğinin kavrulup, kurutulup, toz haline getirilmesiyle elde edilmektedir (Leggli et al., 2011). Kakao ve çikolata ürünlerinin imalatı ve tüketimi çok eski yıllara dayanmaktadır. Örneğin Mayalar, kakao çekirdeğini doğurganlık ve yaşam sembolü olarak düşünmüşlerdir. Aztekler ise, kakao çekirdeklerini en az 150 hastalığın tedavisinde kullanmışlardır. 17. ve 18. yüzyıllarında ise çikolata; soğuk algınlığı, sindirim problemleri, ruhsal hastalıklar gibi çeşitli hastalıklar için ilaç olarak tüketilmiştir. Kakao çekirdeklerinde yağ, karbonhidrat ve protein bulunmaktadır. Ayrıca, kakao insan vücudunda çeşitli biyolojik olaylarda rol oynayan; çeşitli enzimler, suda ve yağda çözünen vitaminler, steroller, fosfolipitler, mineraller (potasyum, magnezyum, bakır, demir, fosfor), ksantin (kafein, teobromin) ve polife-

^β 10 -12 Mayıs 2016 tarihleri arasında Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından düzenlenen "2016 Akademik Gelişim Günleri" kapsamında sunulmuştur.

nol bileşiklerini de (fenolik asit, flavanoid) içermektedir (Todorovic et al., 2015). Çikolata, özellikle çocukların tükettiği kek, kurabiye, dondurma gibi çeşitli gıdaların hazırlanmasında kullanılan bir malzemedir. Bu nedenle çikolata içeriklerinin belirlenmesi gıdaların kontrol edilmesinde önemli rol oynamaktadır. (Silva et al., 2006). Özellikle piyasada %47- %75 hatta %90 oranında kakao içeriği bulunan siyah çikolata ürünleri satılmaktadır ve literatürde kakaonun ağır metal içerebileceği hakkında çalışmalar mevcuttur. Bu yüzden, siyah çikolatalardaki ağır metal içeriklerinin belirlenmesi önemli bir konudur (Yanus et al., 2014).

Ağır Metaller

Yoğunluğu 5 g/mL'den büyük olan elementler ağır metal olarak adlandırılmaktadır. Ağır metaller, zehirli (arsenik, kadmiyum, krom, kurşun), vücut için gerekli (bakır, çinko) ve kısmen gerekli (Ni) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Zehirli ağır metaller çok küçük derişimde vücuda alınsa bile tehlikeli olabilirken, gerekli ağır metaller vücuda fazla miktarda alındığında zehir etkisi oluşturabilmektedirler (Guang Gua, 2016). Özellikle gelişmiş ülkelerde, madencilik, gübre ve kağıt endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucunda ağır metaller direkt ya da dolaylı olarak çevrede birikebilmektedir. Organik atıkların aksine, ağır metaller biyobozunur değildir ve canlı vücudunda birikebilir. Ayrıca birçok ağır metal zehirli veya kanserojendir. Kurşun, arsenik, kadmiyum, nikel, bakır ve çinko, endüstriyel faaliyetler neticesinde çevrede biriken başlıca ağır metaller arasında sayılabilmektedir (Fu and Wang, 2011).

Kurşun (Pb)

Pb; kimya ve plastik endüstrisinde, pil üretiminde, pigment üretiminde ve madencilik gibi farklı alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Pb, çevre ve insan sağlığı için tehlikeli olan zehirli metallerin başında gelmektedir. Pb, albümin serumuna çok güçlü şekilde bağlanma kapasitesine sahiptir. Ayrıca, vücudun hayati organlarının hasarına ve kansere neden olabilmektedir. Bu nedenle gerçek örneklerde kurşun tayini önemli bir çalışma alanıdır (Naghizadeh et al., 2015).

Arsenik (As)

As, insan sağlığını önemli derecede etkileyen bir metaldir. As ve bileşikleri düşük derişimde olsa bile merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler hastalıklar ve deri kanseri gibi önemli hastalıklara neden olabilmektedirler. Su, toprak ve hava yoluyla, canlılar arseniğe maruz kalabilmektedir. As; ahşap korumasında, tarımsal ürünlerde (herbisit, pestisit) ve madencilik uygulamaları gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmakta ve bunun sonucunda çevreye bulaşabilmektedir (Pereira et al., 2016). Arseniğin zehirliliği, organik ve inorganik kimyasal formuna bağlı olarak değişmektedir. As(III), organik arsenikten birkaç yüz kat daha zehirliken, As(V) formuna göre 25-60 kat daha zehirli olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bu yüzden çeşitli örneklerde arsenik türlerinin belirlenmesi gerekmektedir (Gürkan ve ark., 2015).

Kadmiyum (Cd)

Cd, düşük derişimlerde olsa bile çok zehirli bir metaldir. Cd; kalp rahatsızlıkları, kanser ve diyabet gibi öldürücü hastalıklara neden olabilmektedir. Kurşun ve civa metalleriyle karşılaştırıldığında kadmiyumun zehirlilik seviyesi, 10/1 seviyesinde olmasına rağmen, böbrek, karaciğer ve diğer organlar için kurşun ve civaya göre daha fazla zarar verebilmektedir. Cd, bakır alaşımlarında, kağıt ve plastik stabilizatörü olarak, sigara kağıtlarında, mantar ilaçları gibi çeşitli ürünlerin imalatında kullanılmaktadır. Bu endüstri kolları; su, hava ve yiyeceklerde kurşun kirlenmesine neden olmaktadır (İsmail et. al., 2016).

Nikel (Ni)

Ni, bazı enzimlerin önemli bir bileşenidir. Fakat diğer gerekli olan bazı metallerle kıyaslandığında zehir etkisi de gösterebilmektedir. Örneğin, Ni ve bileşikleri solunum sistemi kanserlerine sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca, egzama gibi deri hastalıkları ve alerjik reaksiyonlara da etkisi olabilmektedir. Bazı Ni bileşikleri ise kanserojen olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden, Ni tayinleri analitik kimyanın önemli çalışma konularından birisidir (Mirabi et al., 2015).

Bakır (Cu)

Cu, canlılar için gerekli bir metaldir ve çeşitli enzimatik tepkimelerde önemli rol oynamaktadır. Bakırın eksik ve fazla alınımı; anemi, Alzheimer ve Wilson hastalığı gibi çeşitli rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Endüstriyel kirlilik neticesinde de bakır insan vücudunda birikebilmektedir (Xu et al., 2015).

Çinko (Zn)

Zn, vücutta gerçekleşen biyokimyasal olaylar için gerekli bir metaldir. Transkripsiyon düzenleyici proteinlerin yaklaşık yarısını Zn bağlı proteinler oluşturur. Yetersiz çinko alınımı, ishal, büyüme geriliği, yaraların geç iyileşmesi gibi çeşitli hastalıklara sebep olabilmektedir (Bilandzic et al., 2014).

Gıda, su ve çevre örneklerindeki ağır metallerin tayinleri; alevli atomik absorpsiyon spektroskopisi (FAAS), grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektroskopisi (GFAAS), indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICPOES), indüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (ICPMS), elektroanalitik teknikler ve X-ray floresans spektroskopisi gibi metotlarla doğru ve kesin bir şekilde gerçekleştirilebilir (Gouda and Al Ghannam, 2016).

ICPOES, birçok elementin aynı anda kantitatif tayininde kullanılan analitik bir metottur. ICP kaynağında, argon gibi inert gazlardan yüksek enerjili ve yüksek frekanslı iyonlaşmış bir plazma üretilmektedir. Bir numune plazmanın merkezine enjekte edildiğinde, yaklaşık 6000-10000 K sıcaklıktaki plazma sayesinde, numunedeki elementlerin ayrışma, atomlaşma ve uyarılma işlemleri gerçekleşmektedir. Bu olaylar, çalışılan elementlerin kendilerine özgü frekanslarda ışın yayması ile sonuçlanmaktadır. Bu ışık şiddeti, numune içerisindeki elementlerin derişimi ile doğru orantılıdır. ICPOES, FAAS ile kıyaslandığında birçok önemli avantajlara sahiptir. Oyuk katot lambası kullanılmadan aynı anda birçok elementin tayini yüksek doğrulukla hızlı bir şekilde gerçekleştirilmekte ve daha yüksek dinamik doğrusal aralık elde edilebilmektedir. Ayrıca, analiz süresince daha az miktarda örnek hacimleri ile çalışılabilirlik mümkündür (Bakırdere et al., 2011).

MATERYAL VE YÖNTEM

Örneklerin Alınması ve Analize Hazırlanması

Bu çalışmada siyah çikolata içindeki bazı elementlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Gerçek örnek olarak seçilen siyah çikolata Burdur'daki marketlerin hemen hemen hepsinden bulunan çikolata türüdür. Çikolata örnekleri, çözme işlemi uygulanmadan önce porselen havanda iyice öğütülmüştür. Bu işlemden sonra çikolata örnekleri, asit karışımı ile yaş yakma tekniği kullanılarak çözünürleştirilmiştir.

Siyah Çikolata Örneklerinin Analize Hazırlanması

Öğütülmüş siyah çikolata örneğinden 2,5 g tartıldıktan sonra 100 mL'lik erlene konulmuştur. Küçük bir beherde ise 6 mL derişik hidroklorik asit (%37 (w/w) HCl) ve 2 mL derişik nitrik asit (%65 (w/w) HNO₃) karışımı hazırlanmış ve çikolata örneğine hazırlanan bu karışım damla damla eklenmiştir. Bu işlem gerçekleştirilirken erlen sürekli çalkalanmıştır. Asit karışımının tamamı eklendikten sonra, erlen ısıtıcı tabla üzerine konulmuş ve yaklaşık 60-70 °C aralığında 5 saat boyunca yaş yakma işlemi uygulanmıştır. 5 saatin sonunda kuruluğa yaklaşan çözelti üzerine 1,0 mol/L 5 mL HNO₃ çözeltisi eklendikten sonra erlen çalkalanmış ve süzgeç kağıdıyla (Marka: Munktell, çap 125 mm) süzme işlemi yapılmıştır. Daha sonra erlendeki kalıntı üzerine ikinci kez 1,0 mol/L 5 mL HNO₃ çözeltisi eklenmiş ve süzme işlemi tekrarlanmıştır ve homojen bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen homojen çözelti 25 mL'lik balon jöjeye alındıktan sonra balon jöjenin çizgisine kadar 1,0 mol/L HNO₃ çözeltisi eklenerek tamamlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen numune kapaklı polietilen kaplara konulup analiz zamanına kadar buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.

Siyah Çikolata Örneklerinin Analizi

Siyah çikolata örneği analize hazırlandıktan sonra, içindeki As, Bi, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V, Zn tayini ICPOES (Model: Thermo Icap 6500) ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak çalışılan elementlerin standart çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış (0-100 mg/L) ve her element için ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Her element için ayrı ayrı çizilen bu kalibrasyon grafikleri kullanılarak siyah çikolata örneği içindeki yukarıda bahsedilen elementlerin miktarları belirlenmiştir. Daha sonra elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilme ve yorumlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

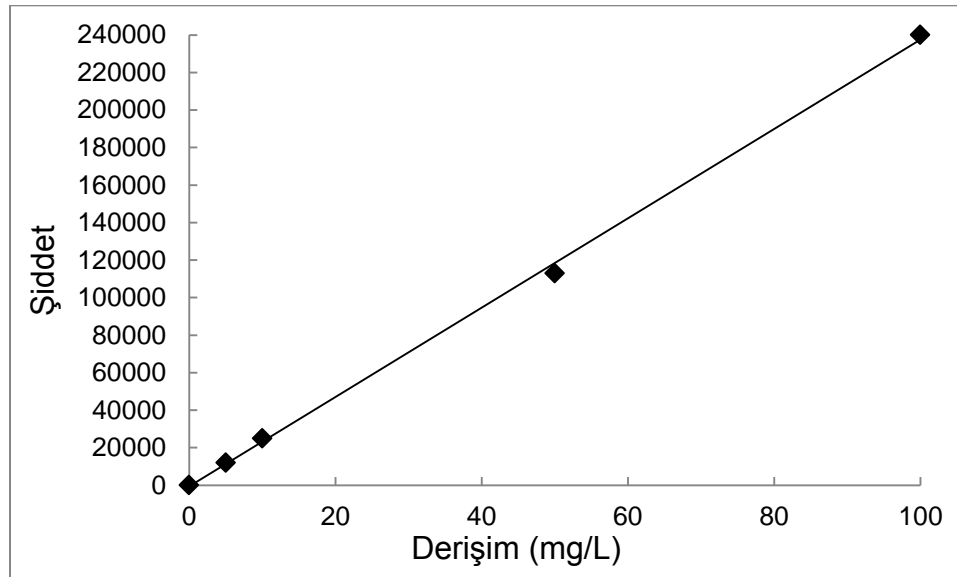
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, ICPOES tekniği kullanılarak siyah çikolata örneğinde As, Bi, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V ve Zn tayinleri gerçekleştirilmiştir. Çalışılan elementlerin tayini yapılırken kullanılan dalga boyları Tablo 1'de gösterilmiştir. En uygun şartlarda, çalışılan elementlerin standart çözeltilerinin emisyon şiddeti değerleri kullanılarak kalibrasyon

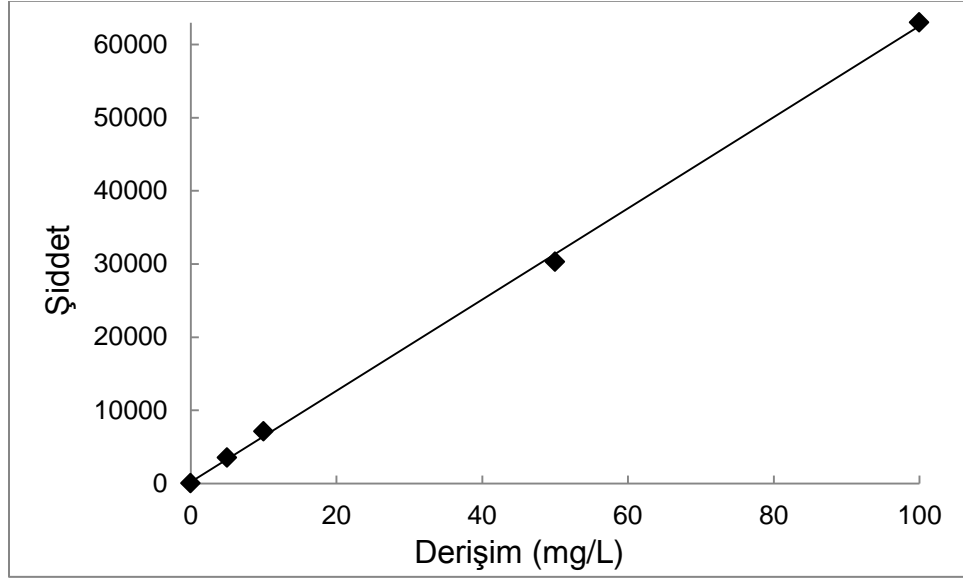
grafikleri çizilmiş ve Mn, Cu ve Zn için elde edilen kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 1-3'de verilmiştir. Her element için ayrı ayrı çizilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak örnek içindeki elementlerin derişimleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Çizelge 2'de de görüldüğü gibi çikolata örneğinde As, Bi, Co, Mo, Sb ve V 0,4 mg/kg'dan küçük, Cd içeriği ise 0,2 mg/kg'dan düşük çıkmıştır. Mn değeri 14 ± 0.4 mg/kg, Cu değeri $5,0 \pm 0,1$ mg/kg ve Zn değeri $24,0 \pm 0,2$ mg/kg olarak hesaplanmıştır. Çikolata örneği içinde Mn, Cu ve Zn tayinleri yapılırken Bağıl Standart Sapma (BSS%) değerleri sırasıyla, 2,9%, 2,0% ve 0,8% olarak bulunmuştur.

Tablo 1. ICPOES ile metallerin tayininde kullanılan dalga boyları

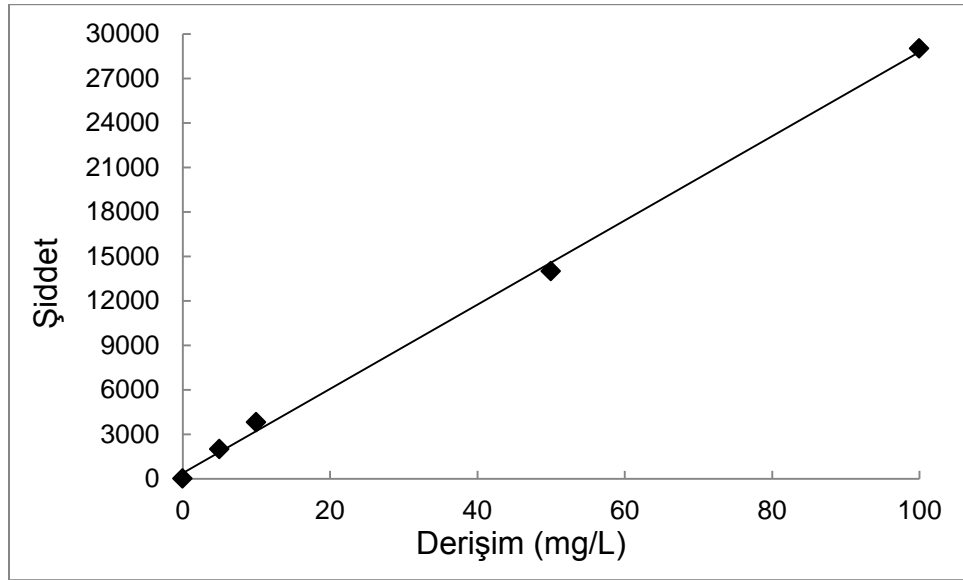
Element	Dalga Boyu (nm)
As	193,7
Bi	223,0
Co	228,8
Cu	237,8
Mn	324,7
Mo	257,6
Ni	202,0
Pb	341,4
Sb	220,3
V	206,8
Zn	292,4
Cd	213,8



Şekil 1. Mn tayini için ICPOES'de çizilen kalibrasyon grafiği



Şekil 2. Cu tayini için ICPOES'de çizilen kalibrasyon grafiği



Şekil 3. Zn tayini için ICPOES'de çizilen kalibrasyon grafiği

Tablo 2. Siyah çikolata içindeki bazı elementlerin miktarları, $(\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}})$

Örnek (mg/kg)	As	Bi	Cd	Co	Cu	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	V	Zn
Siyah çikolata	<0,4	<0,4	<0,2	<0,4	5±0,1	14±0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	24±0,2

SONUÇ

Bu çalışmada Burdur yerel marketten satın alınan siyah çikolatadaki As, Bi, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V ve Zn gibi sağlık ve yaşam açısından önemli olan bazı elementlerin miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerle literatürde bulunan değerler kıyaslanmış ve sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür. Örneğin Alagić ve Huremović farklı tür çikolata örneklerinde Mn, Cu, Zn, Cd ve Pb tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Siyah çikolata olarak farklı kakao içeriğine sahip (%32, %52, %65 ve % 75) 5 farklı çikolata örneğini kullanmışlardır (Alagić ve Huremović, 2015). Elde edilen sonuçlar Tablo 3'de gösterilmiştir ve Tablo 3'den de görüleceği gibi %65'lik siyah çikolata örneğinde elde edilen sonuçlar bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumludur. Diğer bir çalışmada Iwegbue, Nijerya'da çikolata üzerine yaptığı bir çalışmada elde ettiği ortalama değerler Tablo 4'de gösterilmiştir (Iwegbue, 2011). Sonuçlar karşılaştırıldığında sadece Mn ve Zn değerlerinde farklılık bulunmaktadır. Bu değerler analizlerde farklı çikolata türlerinin kullanılmasından kaynaklanabilir. Literatürde siyah çikolatada bulunan element miktarlarının diğer türlere oranla daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Çünkü siyah çikolata içinde daha fazla kakao, kakao çekirdeği ve kakao yağı bulunmaktadır (Dahiya et al., 2005).

Tablo 3. Siyah çikolatada bulunan bazı elementlerin tayin sonuçları (Alagić ve Huremović, 2015)

Örnek $\bar{x} \pm s^*$, ($\mu\text{g/g}$)	Cu	Zn	Mn	Cd	Pb
%65'lik kakao içeren siyah çikolata	11,42±0,63	27,50±1,14	13,67±0,63	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi

*s: standart sapma

Tablo 4. Nijerya'daki çikolata örneğindeki bazı elementlerin tayin sonuçları (Iwegbue, 2011)

Örnek ($\mu\text{g/g}$)	Cd	Ni	Cu	Pb	Mn	Zn	Co
Çikolata	0,07	5,4	0,4	0,8	4,5	3,1	0,8

Bu çalışma kapsamında siyah çikolata içinde, Cu değeri $5,0 \pm 0,1$ mg/kg, Mn değeri $14 \pm 0,4$ mg/kg ve Zn değeri $24,0 \pm 0,2$ mg/kg olarak hesaplanmıştır. Cu için önerilen günlük alım miktarı ise yetişkinler için 900 $\mu\text{g/g}$ gündür. Bu yüzden 25 g siyah çikolata tüketildiğinde günlük Cu alım miktarının %14'ünü sağlanabilmektedir. Mn için yeterli alım miktarı yetişkinler için 2,0 mg/gündür ve 25 g siyah çikolata tüketildiğinde Mn günlük alım miktarının %18'ini karşılanmaktadır (Ieggli et al., 2011). Zn için alınabilecek limit değer 42 mg/gündür (Iwegbue, 2011). 25 g siyah çikolata tüketildiğinde Zn alım miktarının %1,4'ünü sağlanabilmektedir.

KAYNAKLAR

- Alagić, N., Huremović, J. (2015). Determination of metal contents in various chocolate samples. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina 45: 39-42.
- Bakirdere, S., Aydın, F., Bakirdere, E. G., Titretir, S., Akdeniz, İ., Aydın, I., Yıldırım, E., Arslan, Y. (2011). From mg/kg to pg/kg levels: a story of trace element determination: a review. Applied Spectroscopy Reviews, 46: 38-66.
- Begum, K., Reddy, P. V., Leelaja, B.C., Rajashekar, Y., Rajendran, S. (2007). Studies on insect infestation in chocolates. Journal of Stored Products Research 43: 118-122.
- Bilandžić, N., Sedak, M., Đokić, M., Varenina, I., Kolanović, B. S., Božić, D., Brstilo, M., Šimić, B. (2014). Determination of zinc concentrations in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake. Journal of Food Composition and Analysis 35: 61-66.
- Dahiya, S., Karpe, R., Hegde, A. G., Sharma, R. M. (2005). Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. Journal of Food Composition and Analysis 18: 517-522.
- Fu, F., Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. Journal of Environmental Management 92: 407-418.

- Gouda, A. A., Ghannam, S. M. A. (2016). Impregnated multiwalled carbon nanotubes as efficient sorbent for the solid phase extraction of trace amounts of heavy metal ions in food and water samples. *Food Chemistry* 202: 409–416.
- Gu, Y.G., Huang, H. H., Lin, Q., Concentrations and human health implications of heavy metals in wild aquatic organisms captured from the core area of Daya Bay's Fishery Resource Reserve, South China Sea. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 45: 90–94.
- Gürkan, R., Kır, U., Altunay, N. (2015). Development of a simple, sensitive and inexpensive ion-pairing cloud point extraction approach for the determination of trace inorganic arsenic species in spring water, beverage and rice samples by UV–Vis spectrophotometry. *Food Chemistry* 180: 32–41.
- leggli, C.V.S., Bohrer, D., Nascimento, P. C., Carvalho, L. M., Gobo, L. A. (2011). Determination of aluminum, copper and manganese content in chocolate samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a microemulsion technique. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 465–468.
- Ismail, A., Kawde, A., Muraza, O., Sanhoob, M.A., Al-Betar, A.R. (2016). Lanthanum-impregnated zeolite modified carbon paste electrode for determination of Cadmium (II). *Microporous and Mesoporous Materials* 225: 164–173.
- Iwegbue, C. M. A. (2011). Concentrations of selected metals in candies and chocolates consumed in southern Nigeria. *Food Additives and Contaminants: Part B* 4: 22–27.
- Mirabi, A., Rad, A. S., Nourani, S. (2015). Application of modified magnetic nanoparticles as a sorbent for preconcentration and determination of nickel ions in food and environmental water samples. *Trends in Analytical Chemistry* 74: 146–151.
- Naghizadeh, M., Taher, M. A., Behzadi, M., Moghaddam, F. H. (2015). Simultaneous preconcentration of bismuth and lead ions on modified magnetic core–shell nanoparticles and their determination by ETAAS. *Chemical Engineering Journal* 281: 444–452.
- Pereira, É. R., Almeida, T. S., Borges, D. L.G., Carasek, E., Welz, B., Feldmann, J., Menoyo, J. C. (2016). Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 150: 142–147.
- Silva, E. G. P., Santos, A. C. N., Costa, A.C.S., Fortunato, D. M. N., José, N. M., Korn, M. G. A., Santos, W. N. L., Ferreira, S. L.C. (2006). Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* 82: 159–162.
- Todorovic, V., Redovnikovic, I. R., Todorovic, Z., Jankovic, G., Dodevska, M., Sobajic, S. (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 137–143.
- Xu, C., Liao, L., He, Y., Wu, R., Li, S., Yang, Y. (2015). Determination of copper (II) in foodstuffs based on its quenching effect on the fluorescence of N,N0-bis(pyridoxal phosphate)-o-phenylenediamine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 149: 662–666.
- Yanus, R. L., Sela, H., Borojovich, E. J.C., Zakon, Y., Saphier, M., Nikolski, A., Gutflais, E., Lorber, A., Karpas, Z. (2014). Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta* 119: 1–4.
-