

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Vanessa Vana Rogga i Katarina Sladonja

Usporedba plamene atomske apsorpcijske  
spektrometrije i rendgenske fluorescencijske  
spektrometrije s totalnom refleksijom za  
određivanje sadržaja teških metala u realnim  
uzorcima - kemometrijski pristup

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan i doc. dr. sc. Maje Bival Štefan i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

## **POPIS KRATICA**

**AAS** (eng. Atomic absorption spectrometry) - Atomska apsorpcijska spektrometrija

**EDXRF** (eng. Energy Dispersive X-Ray Fluorescence) - Energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija

**ETAAS** (eng. Electro thermal atomic absorption spectrometry) – Elektrotermalna atomska apsorpcijska spektrometrija

**FAAS** (eng. Flame atomic absorption spectrometry) - Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija

**GFAAS** (eng. Graphite furnace atomic absorption spectrometry) - Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći

**ICP-MS** (eng. Inductively coupled plasma mass spectrometry) - Induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa

**ICP-OES** (eng. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) - Induktivno spregnuta plazma optička emisijska spektrometrija

**LOD** (eng. Limit of detection) - Granica dokazivanja

**LOQ** (eng. Limit of quantification) - Granica određivanja

**NAA** (eng. Neutron activation analysis) - Analiza aktivacije neutrona

**PCA** (eng. Principal component analysis) - Analiza glavnih komponenata

**TXRF** (eng. Total x-ray fluorescence spectrometry) - Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom

**XRF** (eng. X-ray fluorescence spectrometry) – Rendgenska fluorescencijska spektrometrija

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Minerali.....	1
1.2. Teški metali.....	1
1.2.1. Nikal.....	2
1.2.2. Bakar.....	2
1.2.3. Cink.....	3
1.2.4. Krom.....	4
1.2.5. Željezo.....	4
1.2.6. Mangan.....	5
1.2.7. Olovo.....	5
1.3. Čajne mješavine.....	5
1.4. Biljne vrste.....	7
1.4.1. <i>Vaccinium vitis-idaea</i> , L. ....	7
1.4.2. <i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik. ....	7
1.4.3. <i>Urtica dioica</i> L. ....	7
1.4.4. <i>Juniperus communis</i> L. ....	7
1.4.5. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. ....	8
1.4.6. <i>Crataegus oxyacantha</i> auct. ....	8
1.4.7. <i>Calendula officinalis</i> L. ....	8
1.4.8. <i>Plantago major</i> L. ....	8
1.4.9. <i>Hypericum perforatum</i> L. ....	8
1.4.10. <i>Rosa canina</i> L. ....	8
1.5. Analitičke tehnike za određivanje teških metala.....	9
1.5.1. Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (FAAS).....	14
1.5.1.1. Priprema uzorka za FAAS.....	15
1.5.2. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)..	15
1.5.2.1. Priprema čvrstih uzoraka za TXRF.....	17
1.5.2.2. Prednosti i nedostaci TXRF tehnike.....	17
1.5.2.3. Usporedba s drugim analitičkim tehnikama.....	17
2. Opći i specifični ciljevi rada.....	19
3. Materijali i metode.....	20
3.1. Materijali.....	20
3.1.1. Kemikalije.....	20

3.1.2. Radni instrumenti i pribor.....	20
3.1.3. Uzorci.....	21
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (FAAS).....	21
3.2.1.1. Priprema uzoraka za FAAS.....	22
3.2.1.2. Priprema radnih otopina.....	23
3.2.2. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)..	23
3.2.2.1. Priprema uzoraka za TXRF.....	24
3.2.3. Statistička analiza.....	24
4. Rezultati i rasprava.....	25
4.1. Kemometrijske metode obrade podataka.....	30
4.1.1. Univarijatna analiza.....	30
4.1.2. Multivarijatna analiza.....	32
5. Zaključak.....	36
6. Zahvale.....	37
7. Popis literature.....	38
8. Sažetak.....	47
9. Summary.....	48

## 1. UVOD

### 1.1. Minerali

Minerali imaju važnu ulogu u mnogim kemijskim, biološkim, biokemijskim, metaboličkim, kataboličkim i enzimatskim reakcijama u biljnim, životinjskim i ljudskim stanicama. Mogu se akumulirati u vitalnim ljudskim organima kroz duži vremenski period.

Različiti autori predložili su različite klasifikacije elemenata. Elementi koji su potrebni organizmu u količini većoj od 100 mg dnevno poput natrija, kalija, magnezija, fosfora, klora, sumpora i kalcija nazivaju se makro elementima. Manjak ovih elemenata u organizmu može dovesti do ozbiljnih pa čak i do smrtnih posljedica. Elementi koji su neophodni za ljudski organizam, ali u količinama manjim od 100 mg dnevno, poznati su kao elementi u tragovima ili mikroelementi koji uključuju: jod, željezo, bakar, mangan, cink, kobalt, molibden, selen i krom. U svim predloženim klasifikacijama i makro i elementi u tragovima, smatraju se ključnim za normalan rast i razvoj (Frieden, 1986).

Elementi u tragovima igraju vrlo važnu ulogu u stvaranju biološki aktivnih sastavnica prisutnih u biljnim vrstama pa su stoga odgovorni za njihova ljekovita, ali i potencijalno toksična svojstva (Abugassa i sur., 2008). Budući da su mnogi od ovih elemenata neophodni za očuvanje zdravlja, nedostatak kao i unos velike koncentracije tih elemenata mogu imati značajne zdravstvene posljedice (Feng i sur. 2003).

### 1.2. Teški metali

Pojam teški metali podrazumijeva kemijske elemente čija je relativna gustoća veća od  $5 \text{ g/dm}^3$ . Dijele se na esencijalne mikroelemente u koje se ubrajaju (Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ni) i potencijalno toksične ili neesencijalne elemente u koje se ubrajaju oni metali koji nisu biogeni i djeluju isključivo toksično kao što su (Cd, Cr, Pb, Hg, As). Teški metali predstavljaju značajnu sirovinu za brojne industrijske grane, neki od njih su neophodni za žive organizme, mogu djelovati povoljno na produktivnost poljoprivrede i većina od njih je često značajan zagađivač životne sredine. Smatra se da su teški metali bio-akumulativni elementi koji čine veliku prijetnju javnom zdravlju. Ljudi su izloženi teškim metalima iz različitih izvora, no smatra se da je glavni izvor unos putem kontaminirane hrane i pića. Većina se studija bavi proučavanjem ne-esencijalnih teških metala koji su izrazito toksični pri vrlo niskim koncentracijama. Unatoč činjenici da su Zn, Fe, Cr, Ni, Cu i Mn esencijalni dio enzima koji su potrebni u normalnom

metabolizmu čovjeka, u povišenim koncentracijama mogu biti toksični za ljudski organizam (Hu i sur., 2019).

### 1.2.1. Nikal

Nikal je prirodno prisutan u Zemljinoj kori u obliku oksida i sulfida. U višim organizmima nisu pronađeni enzimi ili kofaktori koji sadrže nikal, no za arheje, bakterije, alge, biljke i primitivne eukariote takvi su enzimi od ključne važnosti (Genchi i sur., 2020). Tako primjerice patogena bakterija *Helicobacter pylori* koristi transportne sustave za nikal koji joj je determinanta virulencije zbog toga što je kofaktor važnim enzimima ureazi i [Ni-Fe]-hidrogenazi koji su prijeko potrebni za njenu kolonizaciju (Fischer i sur., 2016).

Biološka funkcija nikla još uvijek nije potpuno razjašnjena. U organizmu je pronađen u najvišim koncentracijama kod nukleinskih kiselina (pogotovo RNA) i smatra se da je na neki način uključen u strukturu i funkciju proteina kao i da sudjeluje u aktivaciji enzima koji sudjeluju u razgradnji ili iskorištavanju glukoze. Uloga nikla je i u produkciji prolaktina, čime sudjeluje u proizvodnji majčinog mlijeka, pomaže apsorpciji željeza, metabolizmu adrenalina i glukoze, pojačava čvrstoću kostiju, a sudjeluje i u stvaranju crvenih krvnih stanica (Kumar i Trivedi, 2016).

Povećana količina nikla u ljudskom organizmu može dovesti do alergijskih reakcija, kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti, fibroze pluća kao i do karcinoma pluća. Mehanizmi djelovanja nikla u patogenezi ovih bolesti još uvijek nisu u potpunosti jasni, ali smatra se da ključnu ulogu imaju oksidacijski stres i disfunkcija mitohondrija. Nadalje, brojni znanstvenici dokazali su da se nikal veže na aminokiselinske ostatke nekih enzima i tako remeti njihove normalne fiziološke funkcije (Genchi i sur., 2020).

### 1.2.2. Bakar

Bakar je kemijski element koji je u niskim koncentracijama potreban za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma te se stoga i naziva esencijalnim. Dnevna potreba bakra za zdravu odraslu osobu je 1-2 mg (Bost i sur., 2016). Bakar je redoks-aktivan element, u organizmu služi kao katalitički kofaktor i kao strukturna komponenta proteina te ima brojne uloge poput enzimske aktivnosti, prijenosa kisika i staničnog signaliziranja. Sudjeluje u sintezi vezivnog tkiva (kapilara, ožiljkastog tkiva i sl.), mišićja i kostiju kao kofaktor prolil i lizil hidroksilaze. Oni su enzimi uključeni u nastanak poprečnih vezova odgovornih za čvrstoću kolagenske uzvojnice.

Zbog toga nedostatak bakra povezuje se s povećanim rizikom od nastanka koronarnih poremećaja. Također, bakar je odgovoran za konverziju željeza u feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oblik u kojem se može transportirati organizmom. Kofaktor je tirozinaze, enzima koji sudjeluje u sintezi kožnog pigmenta melanina. Neophodan je za normalan razvoj mozga i živčanog sustava. Uključen je u nastanak mijelina kao i u sintezu neurotransmitera, a isto tako kofaktor je u mnogim redoks enzimima koji sudjeluju u oksidacijsko-redukcijskim procesima (Terres-Martos i sur., 1997).

Deficijencija bakra u dužem vremenskom periodu, a pogotovo tijekom aktivnog rasta, vodi razvoju anemije, retardacije, defektivne keratinizacije, pigmentacije kose i degenerativne promjene u elastinu aorte (Prashanth i sur., 2015). Unatoč tome što je bakar esencijalan za ljudsko zdravlje, povišene koncentracije u organizmu mogu uzrokovati ozbiljne patološke promjene. Koncentracijski raspon koji određuje esencijalnu i toksičnu koncentraciju bakra je vrlo uzak. Trovanja bakrom mogu uzrokovati promjene u regulaciji lipidnog metabolizma, ekspresiji gena, aktivnosti neurona i drugih važnih staničnih aktivnosti (Zhou i sur., 2018).

### 1.2.3. Cink

Cink je metal koji sudjeluje u raznim staničnim funkcijama uključujući sintezu i razgradnju ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Prosječna dnevna potreba za unos cinka iznosi 15-20 mg/dan (Prashanth i sur., 2015). Nužan je za normalnu funkciju imunološkog sustava, diobu stanica kao i njihov rast. Esencijalan je za normalnu spermatogenezu i sazrijevanje, integritet genoma spermija, normalnu organogenezu, funkciju neurotransmitera, razvoj timusa, epitelizaciju kod zarastanja rana i druge važne fiziološke funkcije. Sudjeluje u brojnim biokemijskim procesima poput sinteze i razgradnje nukleinskih kiselina i proteina, metabolizmu alkohola, ugljikohidrata, lipida i proteina. Cink je sastavni dio preko više od 300 enzima. Neki od najvažnijih enzima koji sadrže cink su alkalna fosfataza, alkohol dehidrogenaza, karboanhidraza, glutamat dehidrogenaza i RNA polimeraze (Prashanth i sur., 2015). Kako je ovo fiziološki izrazito bitan metal njegova deficijencija dovodi do različitih patoloških stanja. Neki od njih su smanjeni rast, kožne lezije, proljev, alopecija, smanjeni apetit, smanjeni odgovor imunološkog sustava, i drugi. Povišene koncentracije cinka su toksične, a gornja granica dnevnog unosa za odraslu osobu iznosi 45 mg/dan (Dutra i sur., 2006).



#### 1.2.4. Krom

Krom kao tranzicijski metal dolazi u oksidacijskim stanjima od +6 do -2. Najstabilniji oblici kroma su heksavalentni i trovalentni oblik. Sudjeluje u biosintezi glukoznog faktora tolerancije u organizmu (Prashanth i sur., 2015). Trovalentni krom je esencijalni element i njegova fiziološka uloga je nezamjenjiva u metabolizmu ugljikohidrata – poboljšava aktivnost inzulina tako što omogućava bolje vezivanje inzulina na inzulinske receptore te na taj način smanjuje rizik za diabetes mellitus. Uslijed deficijencije trovalentnog kroma dolazi do poremećaja metabolizma ugljikohidrata. Povišene koncentracije trovalentnog kroma su toksične unatoč tome što je ovaj element prijeko potreban za normalne fiziološke funkcije. Heksavalentni krom je najtoksičniji oblik koji može dovesti do oštećenja bubrega i jetre, respiratornih poremećaja kao i unutarnjih krvarenja. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka, spada u grupu 1 kancerogenih tvari za ljude. Na staničnoj razini heksavalentni krom utječe na stvaranje oksidacijskog stresa i oštećenja DNA. Ljudi su izloženi heksavalentnom kromu putem kontaminirane vode, hrane i zraka (Tumolo i sur., 2020). Ljudskom organizmu je potrebno prosječno 0,005 mg/dan.

#### 1.2.5. Željezo

Željezo se u ljudskom organizmu najvećim dijelom nalazi u obliku hemoglobina. Hemoglobin dolazi u obliku oksihemoglobina, deoksihemoglobina, karbaaminohemoglobina i methemoglobina. U hemoglobinu četiri dušikova atoma protoporfirinskoga prstena koordinacijski su vezana za željezo. Ukoliko se željezo nalazi u oksidacijskom stanju 2+ hemoglobin može vezati kisik, dok željezo u 3+ obliku ne može vezati kisik i nazivamo ga methemoglobin (Cruz-Landeira i sur., 2002). Nadalje, razlikuje se hemsko i nehemsko željezo. Hemsko dolazi iz hrane životinjskog podrijetla i lakše se apsorbira, dok nehemsko dolazi iz hrane biljnoga podrijetla. Apsorpcija željeza ovisi o raznim čimbenicima. Povećava se askorbinskom kiselinom (vitamin C), dok fitati smanjuju njegovu apsorpciju. Hormon koji regulira količinu željeza u organizmu je hepcidin. U normalnim okolnostima željezo je vezano za protein transferin, a vrlo malo ga se nalazi u slobodnom obliku. Slobodno željezo je pro-oksidans i uništava stanice ([www.healthline.com](http://www.healthline.com)). Manjak željeza dovodi do anemije koja može uzrokovati umor, razdražljivost, probleme s pamćenjem, srcem i mnoge druge. Kod prevelike količine željeza javlja se mučnina, povraćanje, proljev, oštećenje jetre, atrofije testisa, hiperpigmentacije i hematokromatoze. Osim toga, novija istraživanja povezuju ga s pojavom određenih malignih oboljenja (Prashanth i sur., 2015).

### 1.2.6. Mangan

Mangan je sastavni dio metaloenzima koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji, metabolizmu masnih kiselina i kolesterola. Najvećim dijelom mangan je pohranjen u kostima, a manjim dijelom nalazimo ga i u jetri, gušterači i bubrežima (Prashanth i sur., 2015). Prevelike količine mangana u organizmu mogu uzrokovati neurotoksičnost, kardiovaskularne probleme, probleme s jetrom i smrt novorođenčadi. Izlaganjem visokim količinama mangana pojavljuju se simptomi slični Parkinsonovoj bolesti. Iako utjecaj na kardiovaskularni sustav nije još dovoljno istražen prevelike doze u nekim istraživanjima ukazuju na smanjenje srčanog ritma i tlaka te povećanje P-R i QRS intervala. Jetra ima veliku ulogu u pohrani i izlučivanju mangana te stoga slabije funkcioniranje jetre može dovesti do jetrene encefalopatije koja rezultira prevelikim nakupljanjem mangana u mozgu ( O'Neal i Zheng, 2015).

### 1.2.7. Olovo

Nakon arsena olovo je najtoksičniji metal koji nema nikakvu ulogu u biološkim i metaboličkim sustavima. Olovo je kumulativni otrov koji može utjecati na brojne tjelesne sustave. Prevelike količine dovode do problema u živčanom sustavu, kome, konvulzija, a moguća je i smrt. Osim ireverzibilnih neuroloških smetnji manja izlaganja olovu uzrokuju anemiju, hipertenziju, toksičnost koja utječe na reproduktivne organe i drugo. Tijekom trudnoće pohranjeno olovo može se otpustiti u krvotok i uzrokovati trovanje fetusa. Izlaganje olovu povezano je s idiopatskim intelektualnim nedostatkom, hipertenzivnim srčanim bolestima, ishemijskim srčanim bolestima i moždanim udarom. Svjetska zdravstvena organizacija prepoznala je olovo kao jedno od deset tvari koje su najveće prijetnje javnom zdravstvu ([www.who.int](http://www.who.int)).

## 1.3 Čajne mješavine

Pripravci čajnih mješavina jedno su od najčešće konzumiranih bezalkoholnih pića u svijetu zbog svoje poželjne arome, ukusa, mirisa i raznovrsnosti. Postoje mnoge studije koje opisuju različite pozitivne utjecaje konzumiranja ovih napitaka na ljudsko zdravlje (Heiss i Heiss, 2007; McKenzie i sur., 2010; Salahinejad i Aflaki, 2010; Welna i sur., 2013; Pohl i sur., 2016). Smatra se da njihova konzumacija smanjuje koncentraciju kolesterola u serumu (Fujita i Yamaami, 2008), usporava proces starenja, smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (Sofuoglu i

Kavcar, 2008) i od različitih malignih oboljenja ( Way i sur., 2004; Siddiqui i sur, 2005; Pohl i sur., 2016).

Pripravci čajnih mješavina predmet su velikog znanstvenog interesa prvenstveno zbog njihove terapijske vrijednosti u prevenciji kao i u liječenju različitih bolesti i zdravstvenih poremećaja (Sheng, 2000). Rastuće zanimanje za pozitivne učinke konzumacije pripravaka čajnih mješavina u cijelom svijetu povezano je i s antioksidacijskim djelovanjem polifenola, biljnih sastavnica koje imaju značajnu ulogu u borbi protiv štetnog utjecaja slobodnih radikala iz okoliša (Zhu i sur., 2002; Łuczaj i Skrzydlewska, 2005; Pohl i sur., 2016). Kemijski sastav biljnih vrsta je složen. Osim što su izvor organskih spojeva, poput polifenola, flavonoida, proteina, vitamina, enzima, aminokiselina, bogat su izvor i različitih elemenata.

Čajne mješavine mogu predstavljati opasnost za zdravlje zbog prisutnosti toksičnih elemenata. Zbog pravilne primjene biljnih vrsta te zaštite korisnika od kontaminacije toksičnim elementima vrlo je važno znati sastav minerala u biljnim vrstama. Poznato je da su metali poput kobalta (Co), bakra (Cu), kroma (Cr), željeza (Fe), magnezija (Mg), mangana (Mn), molibdena (Mo), nikla (Ni), selena ( Se) i cinka (Zn) sastojci važnih enzima ili sudionika u nizu fizioloških procesa pa ih se smatra neophodnim za pravilno funkcioniranje ljudskog tijela. Nedovoljna opskrba tim mikrohranjivim sastojcima rezultira nizom bolesti ili sindroma. Međutim, neki su drugi elementi nepoželjni ili toksični za ljudsko zdravlje poput arsena (As), kroma (Cr), kadmija (Cd), nikla (Ni) i olova (Pb).

Do kontaminacije biljnih vrsta može vrlo lako doći tijekom uzgoja i prerade biljaka (Basgel i Erdemoglu, 2006). Zagađenje tla teškim metalima, zagađenje voda za navodnjavanje, atmosferska prašina, automobilski i industrijski ispušni plinovi, pesticidi i gnojiva igraju važnu ulogu u kontaminaciji biljnih vrsta. Biljke su primarni primatelj elemenata iz okoliša (tlo, zrak, voda) koji se apsorbiraju putem korijenja i listova. Listovi biljaka mogu biti izvor mineralnih elemenata poput cinka, mangana, željeza, bakra, magnezija, titana, aluminija, stroncija, broma, natrija, kalija, fosfora, joda i fluora. Redovita konzumacija čajnih mješavina može značajno pridonijeti unosu preporučenih dnevnih doza (RDA, EFSA, 2006) nekih esencijalnih, nutritivno važnih elemenata, ali isto tako može doprinijeti unosu toksičnih elemenata i povećati rizik od trovanja njima, naročito ako se uzme u obzir njihova tendencija nakupljanja u ljudskom tijelu. Uslijed činjenice da elementarni sastav utječe na farmakoterapijska svojstva biljnih vrsta, poznavanje koncentracije esencijalnih i toksičnih elemenata važno je za utvrđivanje učinkovitosti biljnih vrsta u liječenju različitih bolesti te radi procjene njihove hranjive vrijednosti (Suchacz i Wesołowski, 2006; Han i sur., 2007; Salahinejad i Aflaki, 2010). Zbog potencijalno toksičnog učinka teških metala na ljudsko

zdravlje izrazito je važno provoditi određivanja sadržaja teških metala u čajnim mješavinama koje spadaju u često konzumirane napitke (Hu i sur., 2019).

## **1.4. Biljne vrste**

### **1.4.1. *Vaccinium vitis-idaea*, L.**

*Vaccinium vitis-idaea*, L., europska brusnica sadrži fenolne glikozide (arbutin), trjeslovine, fenolne kiseline i flavonoide. List ove biljne vrste je bogat arbutinom koji djeluje kao uroantiseptik i koristi se u liječenju infekcija urinarnog trakta (Raudone i sur., 2019).

### **1.4.2. *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.**

*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., rusomača, sadrži flavonoide (kvercetin, diosmetin, kemferol, luteolin), fenolne kiseline (klorogenska, vanilinska), amine i saponine. Kao ljekoviti dio biljke sakupljaju se nadzemni dijelovi. Koristi se za simptomatsko liječenje menoragije i metroragije. Ova biljna vrsta pogodna je za biomonitoring teških metala Pb, Cd, Zn i Cu u zagađenom gradskom okolišu ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### **1.4.3. *Urtica dioica* L.**

Nadzemni dijelovi vrste *Urtica dioica* L, koprive, sadrže oko 2% flavonoida, skopoletin, sitosterol te estere kavene kiseline. Prema europskoj farmakopeji sadrži najmanje 0,3% fenolnih kiselina izraženih kao kavena kiselina. Tradicionalno se koristi kod reumatskih oboljenja zbog svog protuupalnog djelovanja te kao blagi diuretik. Korijen koprive sadrži lektin i smjesu različitih polisaharida te sitosterol i skopoletin. Koristi se kod problema s mokrenjem uzrokovanih benignom hiperplazijom prostate. U narodnoj medicini koriste se i sjemenke ove vrste koje sadrže masno ulje, tokoferol i karotenoide. U narodnoj medicini koriste se kod reumatskih oboljenja te kod problema s kožom (Wichtl, 2004).

### **1.4.4. *Juniperus communis* L.**

*Juniperus communis* L., borovica, sadrži eterično ulje (većinu sastavnica čine monoterpeni poput  $\alpha$ -pinena, limonene, mircena), trjeslovine, flavonoide, invertni šećer i organske kiseline. Sakupljaju se pseudo-plodovi biljke koji se koriste kao diuretik te kod dispepsije ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### **1.4.5. *Teucrium chamaedrys* L.**

*Teucrium chamaedrys* L., obični dubčac, koristi se u narodnoj medicini kod probavnih smetnji i različitih infekcija zbog svog antiseptičkog učinka. Sadrži eterično ulje, fenolne kiseline i flavonoide (Bagci i sur., 2010.).

#### **1.4.6. *Crataegus oxyacantha* auct.**

*Crataegus oxyacantha* auct., crveni glog, sadrži najmanje 1,5% flavonoida izraženih kao hiperozid. Ljekoviti dio biljke su listovi i cvjetovi. Osim flavonoida, sadrži triterpenske kiseline, organske kiseline i amine. Koristi se za poticanje rada oslabljenog srca te za regulaciju krvnog tlaka ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### **1.4.7. *Calendula officinalis* L.**

Ljekoviti dio vrste *Calendula officinalis* L., nevena, čine cvjetovi. Biljna vrsta sadrži najmanje 0,4% flavonoida izraženih kao hiperozid, te saponine, karotenoide i kumarine. Interno se koristi zbog protuupalnog učinka na usnu šupljinu i grlo, a eksterno za zacijeljivanje dugotrajnih rana ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### **1.4.8. *Plantago major* L.**

*Plantago major* L., širokolisni trputac, koristi se u narodnoj medicini kod kašlja i prehlade. Listovi sadrže flavonoide, polisaharide, terpene i fenolne kiseline (Najafian i sur., 2018).

#### **1.4.9. *Hypericum perforatum* L.**

*Hypericum perforatum* L., gospina trava, ljekovita je biljna vrsta koja sadrži najmanje 0,08% hipericina koji spada u naftodiantrone. Sadrži i derivate floroglucinola, flavonoide, procijanidine i eterično ulje. Ljekoviti dio biljke čine vršni djelovi u cvatu. Koristi se kod blage depresije, anksioznosti i nesаницe ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### **1.4.10. *Rosa canina* L.**

Pseudoplodovi vrste *Rosa canina* L., pasje ruže, sadrže najmanje 0,3% askorbinske kiseline te pektine, šećere, voćne kiseline i trjeslovine. Koristi se kao korigens okusa u čajnim mješavinama te za prevenciju i liječenje uobičajenih simptoma prehlade i gripe (Wichtl, 2004).

## 1.5. Analitičke tehnike za određivanje metala

Do sada su brojna istraživanja provedena s ciljem određivanja mineralnog sadržaja kod biljnih vrsta i biljnih mješavina koristeći različite analitičke tehnike. Najčešće korištene tehnike su induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (ICP-MS) (Sofuoglu i Kavcar, 2008; Tokaloğlu, 2012; Pohl i sur., 2016; Ye i sur. 2017), induktivno spregnuta plazma optička emisijska spektrometrija (ICP-OES) (Fernández i sur. 2002, Chen i sur., 2009; McKenzie i sur., 2010), plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (FAAS) (Szymczycha-Madeja i sur. 2015), grafitna atomska apsorpcijska spektrometrija (GFAAS) (Szymczycha-Madeja i sur. 2012; Ashenef 2014) i elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS) (Dash i sur., 2008). Tehnike čvrstog stanja, poput analize aktivacije neutrona (NAA) (Zhang i sur. 2011; Islam i Ebihara 2017) i energetski disperzivne rendgenske fluorescentne spektrometrije (EDXRF) (Salvador i sur. 2002; Queralt i sur. 2005) također se primjenjuju za određivanje elemenata u biljnim vrstama. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) je tehnika koja se posljednjih godina sve više primjenjuje za analizu elementarnog sastava biljnih vrsta (De La Calle i sur., 2013; Borgese i sur., 2015; Dalipi i sur., 2017). TXRF je varijacija energetski disperzivne rendgenske fluorescentne spektrometrije koja ima veću osjetljivost i poboljšane granice detekcije na razini ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  i  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Pregledom literature najčešće primjenjivane tehnike za određivanje odabranih elemenata u čajnim mješavinama prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Najčešće primjenjivane tehnike za određivanje odabranih elemenata (Ni, Cu, Zn, Cr, Fe, Mn i Pb) u različitim biljnim vrstama

Element	Tehnika	Literatura
Nikal	ICP-MS	Pilgrim i sur., 2010, Sofuoglu i Kavcar, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Moreda-Pineiro i sur., 2003, Matsuura H i sur., 2001, Moreda-Pineiro i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Odegard i Lund, 1997, Caashirns i sur., 1996

	<b>ICP-OES</b>	Lagad i sur., 2011, McKenzie i sur., 2010, Salahinejad i Aflaki, 2010, Kara, 2009, Ashraf i Mian, 2008, Malik i sur, 2008, Özcan i sur., 2008
	<b>FAAS</b>	Seenivasan i sur., 2008, Mehra i Baker, 2007, Soylak i sur., 2007, Narin i sur., 2004, Ferrara i sur., 2001, Tascioglu i Kok, 1998
	<b>XRF</b>	Salvador i sur., 2002, Xie i sur., 1998
<b>Bakar</b>	<b>ICP-MS</b>	Pilgrim i sur., 2010, Shen i Chen, 2008, Sofuoglu i Kavcar, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Moreda-Pineiro i sur., 2003, Moreda-Pineiro i sur., 2001, Odegard i Lund, 1997, Cairns i sur., 1996
	<b>ICP-OES</b>	Gorur i sur., 2011, Lagad i sur., 2011, McKenzie i sur., 2010, Salahinejad i Aflaki, 2010, Chen i sur., 2009, Kara, 2009, Ashraf i Mian, 2008, Malik i sur, 2008, Özcan i sur., 2008, Mehra i Baker, 2007, Han i sur., 2005, Fernandez i sur., 2002, Fernández-Cáceres i sur., 2001, Herrador i sur., 2001, Matsuura H i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Mierzwa i sur., 1998, Powell i sur., 1998
	<b>ETAAS</b>	Dash i sur., 2008, Jin i sur., 2008, Qin i Chen, 2007
	<b>FAAS</b>	Ipeaiyeda i sur., 2011, Danrong i sur., 2009, Yemane i sur., 2008, Seenivasan i sur., 2008, Li i sur., 2007, Soylak i sur., 2007, Gallaher i sur., 2006, Narin i sur., 2004, Ferrara i sur., 2001, Omianwa i sur., 1999, Wong i sur., 1998, Tascioglu i Kok, 1998
	<b>XRF</b>	Salvador i sur., 2002, Xie i sur., 1998

<b>Cink</b>	<b>ICP-MS</b>	Pilgrim i sur., 2010, Kara, 2009, Shen i Chen, 2008, Sofuoglu i Kavcar, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Odegard i Lund, 1997
	<b>ICP-OES</b>	Gorur i sur., 2011, Lagad i sur., 2011, McKenzie i sur., 2010, Salahinejad i Aflaki, 2010, Chen i sur., 2009, Ashraf i Mian, 2008, Dash i sur., 2008, Malik i sur, 2008, Özcan i sur., 2008, Mokgalaka i sur., 2004, Moreda-Pineiro i sur., 2003, Fernandez i sur., 2002, Fernández-Cáceres i sur., 2001, Herrador i sur., 2001, Matsuura i sur., 2001, Pineiro i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Mierzwa i sur., 1998, , Moreda- Powell i sur., 1998
	<b>FAAS</b>	Ipeaiyeda i sur., 2011, Moghaddam i sur., 2008, Yemane i sur., 2008, Han i sur., 2007, Li i sur., 2007, Pohl i sur., 2007, Soylak i sur., 2007, Gallaher i sur., 2006, Pereira i sur., 2006, Narin i sur., 2004, Ferrara i sur., 2001, Omianwa i sur., 1999, Wong i sur., 1998
	<b>XRF</b>	Salvador i sur., 2002, Xie i sur., 1998
<b>Krom</b>	<b>ICP-MS</b>	Pilgrim i sur., 2010, Kara, 2009, Shen i Chen, 2008, Sofuoglu i Kavcar, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Moreda-Pineiro i sur., 2003, Moreda-Pineiro i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Odegard i Lund, 1997
	<b>ICP-OES</b>	Lagad i sur., 2011, Salahinejad i Aflaki, 2010, Chen i sur., 2009, Ashraf i Mian, 2008, Özcan i sur., 2008, Han i sur., 2005
	<b>FAAS</b>	Mandiwana i sur., 2011, Dash i sur., 2008, Reto i sur., 2007



	<b>XRF</b>	Seenivasan i sur., 2008, Narin i sur., 2004, Ferrara i sur., 2001, Omianwa i sur., 1999, Tascioglu i Kok, 1998
<b>Željezo</b>	<b>ICP-MS</b>	Shen i Chen, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Odegard i Lund, 1997
	<b>ICP-OES</b>	Gorur i sur., 2011, Lagad i sur., 2011, McKenzie i sur., 2010, Salahinejad i Aflaki, 2010, Chen i sur., 2009, Kara, 2009, Ashraf i Mian, 2008, Malik i sur, 2008, Özcan i sur., 2008, Moreda-Pineiro i sur., 2003, Fernandez i sur., 2002, Powell i sur., Matsuura H i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Fernández-Cáceres i sur., 2001, 1998, Mierzwa i sur., 1998, Moreda-Pineiro i sur., 2001
	<b>ETAAS</b>	Reto i sur., 2007
	<b>FAAS</b>	Ipeaiyeda i sur., 2011, Yemane i sur., 2008, Pohl i Prusisz, 2007, Gallaher i sur., 2006, Pereira i sur., 2006, Narin i sur., 2004, Ferrara i sur., 2001, Omianwa i sur., 1999, Tascioglu i Kok, 1998
	<b>XRF</b>	Salvador i sur., 2002, Xie i sur., 1998
<b>Mangan</b>	<b>ICP-MS</b>	Sofuoglu i Kavcar, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Odegard i Lund, 1997, Cairns i sur., 1996
	<b>ICP-OES</b>	Gorur i sur., 2011, Lagad i sur., 2011, McKenzie i sur., 2010, Salahinejad i Aflaki, 2010, Chen i sur., 2009, Kara, 2009, Ashraf i Mian, 2008, Dash i sur., 2008, Malik i sur, 2008, Özcan i sur., 2008, Mehra i Baker, 2007, Mokgalaka i sur., 2004, Moreda-

		Pineiro i sur., 2003, Costa i sur., 2002, Fernandez i sur., 2002, Fernández-Cáceres i sur., 2001, Herrador i sur., 2001, Matsuura H i sur., 2001, Moreda-Pineiro i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Powell i sur., 1998
	<b>ETAAS</b>	Reto i sur., 2007
	<b>FAAS</b>	Ipeaiyeda i sur., 2011, Yemane i sur., 2008, Han i sur., 2007, Pohl i sur., 2007, Gallaher i sur., 2006, Pereira i sur., 2006, Kumar i sur., 2005, Narin i sur., 2004, Costa i sur., 2002, Ferrara i sur., 2001, Ozdemir i Gucer, 1998
	<b>XRF</b>	Salvador i sur., 2002, Xie i sur., 1998
<b>Olovo</b>	<b>ICP-MS</b>	Pilgrim i sur., 2010, Shen i Chen, 2008, Nookabkaew i sur., 2006, Moreda-Pineiro i sur., 2003, Matsuura H i sur., 2001, Moreda-Pineiro i sur., 2001, Marcos i sur., 1998, Odegard i Lund, 1997, Cairns i sur., 1996
	<b>ICP-OES</b>	Gorur i sur., 2011, Chen i sur., 2010, Salahinejad i Aflaki, 2010, Chen i sur., 2009, Ashraf i Mian, 2008, Özcan i sur., 2008, Han i sur., 2007, Han i sur., 2006, Mierzwa i sur., 1998
	<b>ETAAS</b>	Dash i sur., 2008, Seenivasan i sur., 2008, Qin i sur., 2007, Jin, i sur., 2005
	<b>FAAS</b>	Danrong i sur., 2009, Yemane i sur., 2008, Han i sur., 2006, Ferrara i sur., 2001, Han i sur., 2006, Narin i sur., 2004, Omianwa i sur., 1999

	<b>XRF</b>	Xie i sur., 1998
--	------------	------------------

### **1.5.1. Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija**

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) je instrumentalna spektrometrijska analitička tehnika koja se koristi za kvantitativno i kvalitativno određivanje više od 70 elemenata. Temelji se na svojstvu atoma da apsorbiraju zračenja na određenim valnim duljinama.

Atom koji ima najnižu energiju i najstabilniju elektronsku konfiguraciju nalazi se u temeljnome stanju. Dovođenjem energije ona se apsorbira i atom prelazi u manje stabilnu konfiguraciju, odnosno u pobuđeno stanje. Iz ovoga stanja atom se spontano vraća u osnovno stanje najniže energije. Pri tome se emitira energija koja je jednaka prethodno apsorbiranoj energiji (Beaty i Kerber, 1993).

Valna duljina emitirane svjetlosne energije povezana je direktno s prijelazom elektrona. Svaki element ima jedinstvenu elektronsku strukturu te je zbog toga valna duljina emitirane svjetlosti jedinstvena za svaki element. Kod velikih atoma zbog kompleksne orbitalne konfiguracije može doći do više elektronskih prijelaza. Svaki prijelaz rezultira emisijom karakteristične valne duljine svjetlosti (Beaty i Kerber, 1993).

U atomskoj apsorpciji toplinskom energijom kemijski spojevi prevode se u slobodne atome. Plamena atomizacija temelji se na izgaranju vodene otopine uzorka koja se na početku raspršuje u oblik fine vodene prašine koja se miješa s plinovitim gorivom i oksidansom te uvodi u plamen gdje nastaje atomska para koja obasjana svjetlom točno određene valne duljine uzrokuje prijelaz atoma metala u pobuđeno stanje. Pritom je energija emitiranog zračenja pri vraćanju u osnovno stanje jednaka valnoj duljini apsorbiranog zračenja. Izvor zračenja je šuplja katodna žarulja čija je katoda presvučena metalom koji se analizira, tj. emisijski sustav koji emitira spektar karakterističan za element koji se određuje. Lampa emitira elektromagnetno (EM) zračenje koje prolazi kroz plamen gdje atomi apsorbiraju zračenje određene valne duljine, a pad intenziteta zračenja uslijed apsorpcije EM zračenja atoma je analitički signal. Signal se očitava pomoću detektora koji je sastavni dio uređaja (Luterotti i sur., 2013).

Najčešće smjese plinova koje se koriste su zrak-acetilen ili dušikov oksid-acetilen, ovisno o temperaturi koja je potrebna za atomizaciju. Zrak-acetilen osigurava temperatura od 2400 °C, a dušikov oksid-acetilen temperaturu od 2800 °C (Skoog i sur., 1999; Watson 1999).

### **1.5.1.1. Priprema uzorka za FAAS**

Kod FAAS da bi uzorak doveli u stanje pogodno za mjerenje moramo ga nebularizirati tj. raspršiti u plamen gdje se uzorak vaporizira i atomizira pri čemu uzorak koji se koristi mora biti u tekućem obliku i u relativno velikoj količini (~2 mL). Sama priprema uzoraka može biti relativno jednostavna. Primjerice, biološke tekućine dovoljno je samo razrijediti prikladnom otopinom, prekoncentrirati ili izvršiti djelomično ili potpuno otapanje uzorka. Većina drugih uzoraka zahtijeva složeniju pripremu (dodatak različitih reagensa, primjena dovoljne količine energije za kidanje veza i kristalnih struktura čvrstih tvari). Dva najčešće korištena postupka pripreme uzoraka su suho (eng. dry ashing) i mokro otapanje (eng. wet digestion). Oba postupka se provode s ciljem razgradnje organskog matriksa prije određivanja sadržaja metala ili za ekstrakciju metala i anorganskog matriksa što omogućuje njihovo određivanje. Procesi razgradnje provode se u i) otvorenim posudama uz dodatak kiseline, smjese kiselina ili lužina na vrućim pločama i u ii) mikrovalnim pećima u otvorenim ili zatvorenim posudama uz dodatak koncentriranih kiselina, oksidansa i zagrijavanje. Svi postupci razgradnje su dugotrajni i skloni sustavnim pogreškama (npr. gubitak analita zagrijavanjem kod otvorenog sustava kod suhog otapanja) dok se visoka cijena mikrovalne pećnice kao i razrjeđivanje uzoraka smatra glavnim nedostatkom mokrog otapanja.

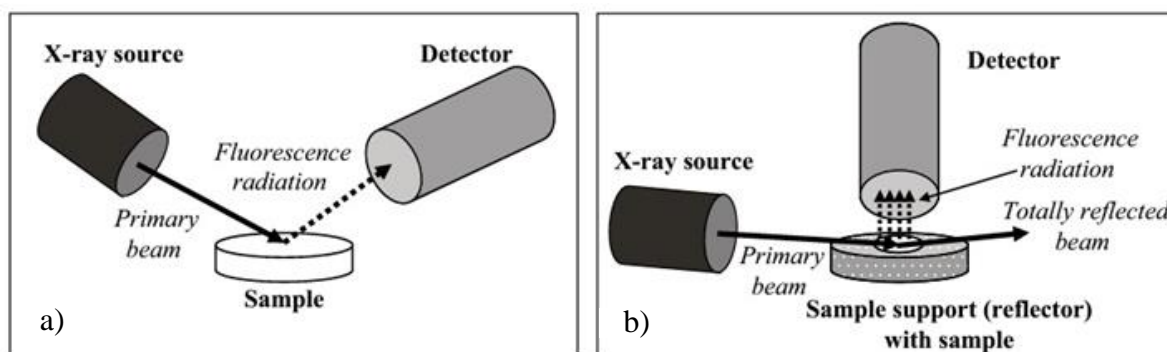
### **1.5.2. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom**

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom je instrumentalna analitička tehnika čija se mjerenja temelje na fizikalnom fenomenu totalne refleksije x-zraka kojeg je Compton otkrio 1923. godine. Ovaj fizikalni fenomen je pokazao da se reflektivnost x-zraka s ravnog materijala izrazito povećava ispod kritičnog kuta od  $0,1^\circ$  (Klockenkämper i von Bohlen, 2015).

Ovo je otkriće pomoglo unaprjeđenju već postojećih rendgenskih fluorescencijskih spektrometrijskih tehnika (XRF, eng. X-ray fluorescence spectrometry) koje se zasnivaju na svojstvu uzoraka koji su obasjani rendgenskim zračenjem da emitiraju fluorescenciju koja je karakteristična za svaki element.

TXRF se prvenstveno koristi za kemijske analize elemenata u vrlo malim količinama uzoraka. Uslijed toga, Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) klasificirala je TXRF kao metodu mikroanalize. U tu svrhu male količine, uglavnom otopine i suspenzije, stavljaju se na nosače uzoraka (tzv. reflektori) i osuše. Nakon toga uzorak se pobuđuje, a karakteristično zračenje elemenata bilježi detektorom kao energetski disperzivni spektar koji predstavlja broj

fotona ovisno o njihovoj energiji. Većina zračenja pobudne zrake se reflektira i, kao posljedica, smanjuje se spektralni šum. Nadalje, vrlo mali upadni kut omogućava postavljanje detektora vrlo blizu uzorka (~ 0,5 mm) za mjerenje fluorescentnog signala. Na taj način prinos fluorescencije je vrlo visok, a apsorpcija zrakom vrlo mala zbog kratke udaljenosti između uzorka i detektora. Iz tih razloga moguće je postići niže granice detekcije ( $10^{-7}$  do  $10^{-12}$  g) u usporedbi s onima dostupnim konvencionalnim EDXRF (Slika 1) (Klockenkämper i von Bohlen, 2015). Kod totalne refleksije X-zraka efekti matrice, poput apsorpcije i sekundarnog pobuđenja, mogu se zanemariti, a kvantifikacija se najčešće postiže dodatkom unutarnjeg standardnog analita, tzv. unutarnji standard (IS) (Bilo i sur., 2015). Pomoću TXRF tehnike svi elementi s atomskim brojem  $Z \geq 11$  mogu se istovremeno i detektirati i odrediti.



Slika 1. Shematski prikaz instrumenta (Klockenkämper i von Bohlen, 2015)

a) EDXRF

b) TXRF

Kod TXRF analize, mala količina ili volumen uzorka stavlja se na površinu nosača s velikom reflektivnošću. Nosači uzoraka su diskovi promjera 30 mm i debljine 3 mm. Izrađeni su od kvarcnog stakla, staklenog ugljika, safirnog i akrilnog stakla. Nosači uzoraka ne smiju sadržavati nečistoće, a sam materijal nosača ne smije fluorescirati. Odabir nosača ovisi o analiziranom uzorku. Prilikom provođenja TXRF analize važno je imati ispravno očišćene nosače za uzorke kako bi se uklonile sve nečistoće i izbjegle pogreške u određivanju elemenata. Kao i u svim analitičkim tehnikama za analizu elemenata u tragovima, priprema uzorka je od iznimne važnosti za kvantitativnu analizu. Kvantifikacije se uobičajeno provodi dodatkom unutarnjeg standarda. Za samu analizu potrebna je prethodna obrada uzoraka da bi se ostvarili sljedeći ciljevi: i) stvaranje tankog filma ili sloja; ii) homogena raspodjela analita i IS; i iii) uklanjanje smetajućih elemenata. Analiza se može provesti direktnom analizom uzorka kao i s minimalnom obradom (razrjeđenje, suspenzija, ekstrakcija). Tijekom pripreme uzorka, važno je izbjeći gubitke i onečišćenja koja mogu dovesti do sustavnih pogrešaka

### **1.5.2.1. Priprema čvrstih uzoraka za TXRF**

Čvrsti uzorci usitnjavaju se kako bi se dobio fini prah. Praškasti uzorak (5–100 mg) suspendira se u vodi, u razrijeđenoj dušičnoj kiselini ili nekom drugom odgovarajućem otapalu koja sadrži interni standard. Miješanjem pomoću magnetske mješalice ili ultrazvučne kupelji osigurava se homogena i stabilna suspenzija. Nakon prethodne obrade, mala količina uzorka (5 - 50 µL) treba se staviti na očišćeni nosač uzorka, osušiti na zraku, grijaćoj ploči pomoću infracrvene lampe (IR) ili pod vakuumom te nakon toga analizirati.

### **1.5.2.2. Prednosti i nedostaci TXRF tehnike**

TXRF je analitička tehnika koja se može primijeniti za različite vrste uzoraka i primjena. Služi za istovremenu multielementnu analizu (do 30 elemenata) i ima niske granice detekcije (ppb) kao i jednostavnu kvantifikaciju pomoću unutarnjeg standarda. Analiza zahtijeva vrlo malu količinu uzorka, malu količinu otapala i često je i nedestruktivna metoda. Jednostavna je za uporabu, a novi stolni sustavi ne trebaju plin ili medij za hlađenje što uveliko utječe i na samu cijenu analize. Međutim, TXRF kao i druge analitičke tehnike ima svoja ograničenja. Glavni nedostatak je mala osjetljivost za elemente s niskim atomskim brojem kao i prijelazne elemente. Ovisno o primijenjenom detektoru može se javiti i loša razlučivost, ali i preklapanje pikova u nekim slučajevima.

### **1.5.2.3. Usporedba s drugim analitičkim tehnikama**

Odabir analitičke tehnike ovisi o željenim značajkama kao što su niske granice detekcije, mogućnost analize više elemenata, širok dinamički raspon, dobra preciznost i točnost, jednostavna priprema uzoraka kao i niska cijena analize.

Iako TXRF ispunjava sve navedene značajke međunarodna organizacija za normizaciju još nije standardizirala (ISO) pa se analitički rezultati dobiveni ovom metodom još uvijek moraju uspoređivati s onima dobivenim referentnim metodama kao što su ETAAS, GFAAS, FAAS, ICP-OES, ICP-MS i NAA.

U usporedbi s ostalim tehnikama koje se koriste za određivanje elemenata TXRF koristi vrlo male količine uzorka za analizu (nekoliko µL ili ng). Kvalitativna i kvantitativna analiza je brža i jednostavnija. Nadalje, uvođenje novih TXRF sustava s niskom potrošnjom energije koji su

ekonomični i ne zahtijevaju plin ili rashladne medije za rad povećalo je popularnost TXRF-a. Prednosti i nedostaci ovih tehnika sažeti su u Tablici 2.

Tablica 2. Usporedba najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje teških metala po bitnim karakteristikama koje određuju optimalnost analitičke metode

<b>Svojstvo</b>	<b>TXRF</b>	<b>AAS</b>	<b>ICP</b>
<b>količina uzorka</b>	5-50 $\mu$ L	2-5 mL	2-5 mL
<b>Kalibracija</b>	unutarnji standard za sve elemente	vanjski standard za svaki element	vanjski i unutarnji standard za svaki element
<b>Priprema uzorka</b>	otopina, suspenzija, tanki film	potpuno otopljen	potpuno otopljen
<b>Multielementna analiza</b>	da	samo sekvencijalno	da
<b>Vrijeme mjerenja</b>	300 - 1000 s	< 10 s za svaki element	< 3 min za svaki element
<b>Utjecaj matrixa</b>	ne	da	da
<b>Ograničenja</b>	Z<13 i 41<Z<45	H, C, N, O, F, P, S	H, C, N, O, F, P, S
<b>Cijena</b>	niska do srednja	srednja do visoka	visoka

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Nakon vode pripravci čajnih mješavina jedno su od najčešće konzumiranih bezalkoholnih pića u svijetu. Mnoge čajne mješavine mogu predstavljati opasnost za zdravlje zbog eventualne prisutnosti toksičnih elemenata. Budući da se svijest i zabrinutost zbog elementarnog sastava čajnih mješavina povećava iz godine u godinu elementarna analiza čajnih mješavina je od velikog značaja i postoji potreba za brzim i osjetljivim analitičkim tehnikama koje se mogu primijeniti i u rutinskim analizama. Iako je u Europskoj farmakopeji (EDQM, 2020) propisana je FAAS tehnika za određivanje sadržaja teških metala danas se posebna pažnja posvećuje primjeni analitičkih metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“, prvenstveno upotreba malih količina uzorka, male količine reagensa, kao i brz i siguran postupak. U tom smislu, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu.

Glavni cilj ovog rada je istražiti prednosti i nedostatke dvije različite analitičke tehnike za određivanje sadržaja teških metala (Zn, Cu, Mn, Ni, Pb, Fe i Cr) u sakupljenim uzorcima čajnih mješavina koji se učestalo konzumiraju prvenstveno vodeći se načelima „zelene kemije“.

Specifični ciljevi ovoga istraživanja su:

- u sakupljenim uzorcima čajnih mješavina odrediti sadržaj teških metala pomoću dvije analitičke tehnike (FAAS i TXRF) te dobivene rezultate usporediti prema sljedećim kriterijima:
  - parametri metode („zelena kemija“)
  - vrijeme potrebno za analizu
  - ekonomski kriterij
- koristeći univarijatnu i multivarijatnu statističku analizu, metodu glavnih komponentata (principal component analysis, PCA) i klustersku analizu dobiveni rezultati će se usporediti kako bi se mogla utvrditi moguća povezanost između elementnog sastava kod različitih čajnih mješavina.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

U ovome istraživanju korištene su sljedeće kemikalije:

- Standard Zn 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Cu 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Mn 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Ni 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Pb 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Fe 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Cr 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Ga 1000 µg/mL (ROMIL PrimAg, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- HNO<sub>3</sub> 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 µScm<sup>-1</sup>, pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)

##### 3.1.2. Radni instrumenti i pribor

U izradi ovog rada korišteni su sljedeći radni instrumenti i pribor:

- atomski apsorpcijski spektrometar Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD)
- Rendgenski fluorescencijski spektrometar s totalnom refleksijom S2 PICOFOX (Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Njemačka)
- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Transsonic 570 (Elma Ultrasonic, Singen, Njemačka)
- tarionik s pistilom
- mlin za usitnjavanje
- grijača ploča Cimarec 2 (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa, SAD)
- infracrvena lampa (Momert, Mađarska)
- vibracijska tresilica za određivanje veličina čestica AS 200 Basic (Retsch Mill, Düsseldorf, Njemačka)
- celulozni nitratni membranski filteri za filtraciju uzoraka veličine pora 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

- kvarcni stakleni reflektori (Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Njemačka)
- mikropipete Rainin pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- plastične epruvete od 10 mL i 50 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Staklene čaše : 50 mL
- Satno staklo

### 3.1.3. Uzorci

Tablica 3. Tablica s prikazanim oznakama koje su korištene za određenu biljnu vrstu.

OZNAKA	NAZIV BILJNE VRSTE
A	<i>Plantago major</i> (list)
B	<i>Crataegus oxycanta</i> (list)
C	<i>Urtica dioica</i> (sjemenke)
D	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (nadzemni dio)
E	<i>Hypericum perforatum</i> (nadzemni dio)
F	<i>Teucrium chamaedrys</i> (nadzemni dio)
G	<i>Calendula officinalis</i> (cvijet)
H	<i>Rosa canina</i> (plod)
I	<i>Juniperus communis</i> (plod)
J	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> (list)

## 3.2. Metode

Određivanje sadržaja metala u uzorcima biljnog materijala provedena su primjenom FAAS i TXRF tehnike.

### 3.2.1. Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (FAAS)

Mjerenja su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrometru Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine prema parametrima :

Tablica 4. Parametri mjerenja kod FAAS za određeni metal

Parametri	Zn	Cu	Mn	Ni	Pb	Fe	Cr
<i>valna duljina (nm)</i>	231,9	324,8	279,5	232,0	283,3	248,3	357,9
<i>širina pukotine (nm)</i>	0,7	0,7	0,2	0,2	0,7	0,2	0,7
<i>gorivo/oksidans</i>	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*
<i>korekcija pozadine</i>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>
<i>žarulja</i>	HCL**	HCL**	HCL**	HCL**	HCL**	HCL**	HCL**

\*Ac-acetilen; \*\*HCL- šuplja katodna lampa (eng. hollow cathode lamp)

### 3.2.1.1. Priprema uzoraka za FAAS

Uzorci čajnih mješavina (n=10) sakupljeni su u kolovozu 2019. godine na lokalnoj tržnici (Sarajevo, BiH) te pohranjeni na sobnoj temperaturi. Na zraku osušen biljni materijal različitih biljnih vrsta prvo je usitnjen u tarioniku s pistilom, a zatim samljeven u prah. Izvagana količina od 0,25 g praška prenese se u čašu te doda 10,0 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> i grije poklopljeno satnim stakalcem na grijaćoj ploči T~50°C kroz 3h (Slika 2). Dobivena otopina kvantitativno se prenese u Eppendorf epruvetu i nadopuni s ultračistom vodom do 25 g. Ovakom pripremljena otopina se prije analize filtrira kroz filtar veličine pora 0,45 µm.



Slika 2. Mokro otapanje biljnog materijala pomoću kiseline

### 3.2.1.2. Priprema radnih otopina

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

Tablica 5. Analitički uvjeti za određivanje pojedinih elemenata u biljnom materijalu

<b>Element</b>	<b>Jednadžba baždarnog pravca</b>	<b>linearni raspon (µg/mL)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD (µg/mL)</b>	<b>LOQ (µg/mL)</b>
<b>Zn</b>	$y = 0,1575x + 0,0032$	0,05 – 2	0,999	0,086	0,259
<b>Cu</b>	$y = 0,0295x + 0,0279$	2,0 – 30	0,9931	2,338	3,114
<b>Mn</b>	$y = 0,044x + 0,0344$	2,0 – 20	0,9945	2,132	6,460
<b>Ni</b>	$y = 0,0211x - 3E-05$	0,2 – 5	1	0,005	0,014
<b>Pb</b>	$y = 0,0055x + 0,0001$	0,05 – 1	0,9974	0,075	0,227
<b>Fe</b>	$y = 0,0238x - 0,0019$	0,2 - 10	0,9992	0,371	1,125
<b>Cr</b>	$y = 0,0171x - 0,0002$	0,05 - 1	0,9997	0,025	0,074

R<sup>2</sup> -koeficijent pravca

LOD-granica dokazivanja

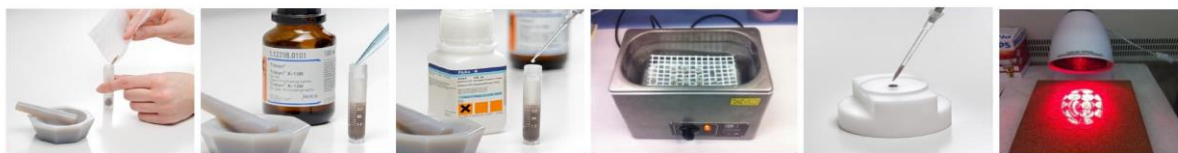
LOQ-granica određivanja

### 3.2.2. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)

TXRF analiza svih uzoraka provedena je korištenjem TXRF sustava (S2 PICOFOX, Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Njemačka) opremljenog rendgenskom cijevi od 40 W s molibdenovom (Mo) anodom i višeslojnim monokromatorom (17,5 keV). Karakteristično zračenje elemenata prisutnih u uzorku detektira se silikonskim detektorom s aktivnim područjem od 10 mm<sup>2</sup> i razlučivosti od 139,43 eV (Mn K $\alpha$ ). Mjerenja su izvršena pri 50 kV i 750 µA uz vrijeme mjerenja od 600 s.

### 3.2.2.1. Priprema uzoraka za TXRF

Na zraku osušen biljni materijal različitih biljnih vrsta (n=10) prvo je usitnjen u tarioniku s pistilom, a zatim samljeven u prah. Dobiveni prah profiltriran je kroz sito veličina pora < 100  $\mu\text{m}$ . Uzorci (veličine čestica < 100  $\mu\text{m}$ ) pripremljeni su u obliku suspenzija vaganjem 20 mg uzorka, dodavanjem 1 mL ultračiste vode i 10  $\mu\text{g}$  Ga kao unutarnjeg standarda (Slika 3). Pripremljene suspenzije se soniciraju 5 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Nakon toga, 10  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka stavljeno je na kvarcni stakleni reflektor i osušeno pomoću infracrvene lampe.



Slika 3. Priprema uzorka za TXRF mjerenje

### 3.2.3. Statistička analiza

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti 6 mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Rezultati koncentracije elemenata dobivenih pomoću dviju tehnika zbog malog broja uzoraka uspoređeni su pomoću neparametrijskog testa, Mann-Whitney U testa. Za statističku obradu podataka korišten je program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 8* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . Za univarijatnu i multivarijatnu analizu (PCA i klusterska analiza) korišten je programski paket *XLStat* (*XLStat Software, New York, SAD*).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Teški metali prisutni su u različitim koncentracijama u biljnim vrstama i njihova koncentracija ovisi prvenstveno o vrsti tla na kojem biljka raste, pH, organskim komponentama, klimatskim uvjetima i o vrsti biljke. U ovom istraživanju skupljeno je 10 različitih čajnih mješavina i određen je sadržaj Zn, Cu, Mn, Ni, Pb, Fe, Cr. Dva različita načina pripreme uzoraka su uspoređena: mokro otapanje i suspenzija čvrstih čestica u vodenoj otopini. U uzorcima pripremljenim mokrim otapanjem sadržaj elemenata određen je pomoću FAAS tehnike, a kod suspenzija pomoću TXRF tehnike. Ispitivani elementi odabrani su prema njihovoj ulozi i važnosti u mnogim biološkim mehanizmima kao i njihove potencijalno toksične uloge. Dobivene koncentracije ispitivanih elemenata i deskriptivna statistika prikazane su u Tablici 6. (rezultati dobiveni FAAS tehnikom) i u Tablici 7. (rezultati dobiveni TXRF tehnikom). Svaki rezultat je srednja vrijednost 6 mjerenja  $\pm$  standardna devijacija i izražen je prema suhom biljnom materijalu/suhoj masi biljne vrste. Primjer TXRF spektra za uzorak A prikazan je na Slici 4 (u ovom radu ostali spektri nisu prikazani).

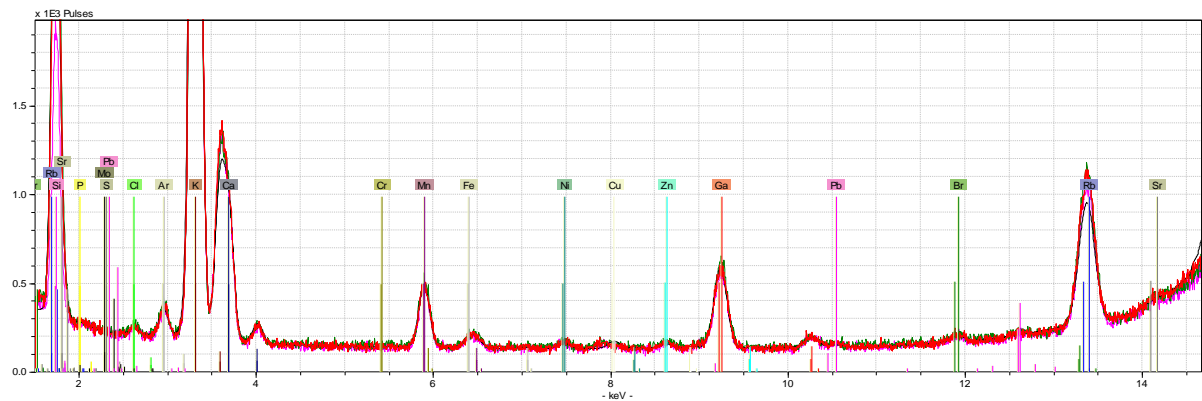
Tablica 6. Koncentracija elemenata (mg/kg) u različitim biljnim vrstama (n=10) dobiveni analitičkom tehnikom FAAS.

koncentracija elemenata dobivenih FAAS (mg/kg)							
UZORCI	Zn	Cu	Mn	Ni	Pb	Fe	Cr
A	34,39 ± 0,7	10,55 ± 0,31	47,43 ± 1	2,85 ± 0,5	1,32 ± 0,08	283,50 ± 23,5	0,23 ± 0,03
B	33,23 ± 0,6	13,94 ± 0,6	20,92 ± 3,2	1,66 ± 0,02	1,44 ± 0,23	93,00 ± 11,3	2,22 ± 0,21
C	33,67 ± 0,8	9,67 ± 0,035	32,10 ± 2,2	1,23 ± 0,14	2,54 ± 0,12	81,95 ± 13	0,24 ± 0,05
D	72,97 ± 1,1	49,29 ± 0,32	48,69 ± 3	2,23 ± 0,23	0,96 ± 0,03	559,98 ± 22,3	2,54 ± 0,15
E	78,73 ± 1	13,62 ± 0,72	73,15 ± 4,5	2,20 ± 0,33	0,82 ± 0,02	136,52 ± 12,6	2,73 ± 0,35
F	41,87 ± 1,7	7,78 ± 0,04	27,91 ± 1	2,27 ± 0,65	1,39 ± 0,15	208,74 ± 13,8	2,63 ± 0,63
G	37,69 ± 0,3	9,15 ± 0,32	76,12 ± 1,5	5,15 ± 1,13	1,43 ± 0,23	465,58 ± 22,1	9,28 ± 1,13
H	21,69 ± 0,9	6,65 ± 0,25	39,08 ± 2,3	2,80 ± 0,05	1,09 ± 0,06	40,87 ± 11,2	2,90 ± 0,33
I	17,89 ± 0,3	6,04 ± 0,38	30,52 ± 3,1	1,75 ± 0,35	1,08 ± 0,02	24,97 ± 5,6	1,75 ± 0,57
J	26,46 ± 1,2	7,36 ± 0,33	1378,48 ± 23	2,86 ± 0,11	1,37 ± 0,16	190,76 ± 12,2	9,04 ± 2,68
srednja vrijednost	39,86	15,41	177,4	2,501	1,344	208,6	3,357
SD	20,33	19,13	422,4	1,079	0,4726	180,1	3,206
min	17,89	6,045	20,92	1,226	0,8193	24,97	0,2301
max	78,73	69,32	1378	5,153	2,542	560	9,284

Tablica 7. Koncentracija elemenata (mg/kg) u različitim biljnim vrstama (n=10) dobiveni analitičkom tehnikom TXRF .

koncentracija elemenata dobivenih TXRF (mg/kg)							
UZORCI	Zn	Cu	Mn	Ni	Pb	Fe	Cr
A	29,17 ± 4,42	9,46 ± 1,46	44,3 ± 8,07	1,42 ± 0,38	0,95 ± 0,38	285,7 ± 118,95	nd
B	11,65 ± 0,24	4,8 ± 0,17	9,95 ± 0,66	0,35 ± 0,25	0,34 ± 0,09	33,12 ± 1,48	1,01 ± 0,47
C	18,62 ± 1,07	5,96 ± 0,55	22,39 ± 2,14	0,56 ± 0	1,22 ± 0,22	55,14 ± 8,83	nd
D	45 ± 1,49	25,98 ± 1,63	44,26 ± 3,86	1,49 ± 0,02	0,47 ± 0,04	356,09 ± 102,86	1,67 ± 0,32
E	71,96 ± 6,7	11,4 ± 1,23	73,73 ± 8,92	1,6 ± 0,36	0,53 ± 0,12	93,65 ± 15,52	1,07 ± 0,29
F	35,04 ± 2,21	5,8 ± 0,5	25,9 ± 1,87	1,25 ± 0,14	0,79 ± 0,35	172,13 ± 20,94	1,36 ± 0,46
G	36,85 ± 4,91	8,2 ± 1,68	71,62 ± 10,87	4,23 ± 1,02	0,66 ± 0,09	402,62 ± 73,07	8,83 ± 3,2
H	16,76 ± 2,09	4,62 ± 0,69	38,56 ± 5,7	1,12 ± 0,17	0,99 ± 0,21	35,03 ± 4,95	2,15 ± 0,3
I	12,77 ± 0,65	2,06 ± 0,21	30,65 ± 3,39	0,78 ± 0,2	0,5 ± 0,03	15,33 ± 1,97	1,05 ± 0,33
J	23,67 ± 1,17	3,64 ± 0,27	1326,62 ± 138,09	2,42 ± 1,04	1,44 ± 0,64	222,85 ± 14,17	8,45 ± 2,73
srednja							
vrijednost	30,15	8,192	168,8	1,522	0,789	169,2	3,199
SD	18,37	6,844	407,3	1,118	0,3569	143,3	3,382
min	11,65	2,06	9,95	0,35	0,34	15,33	1,01
max	71,96	25,98	1327	4,23	1,44	402,6	8,83





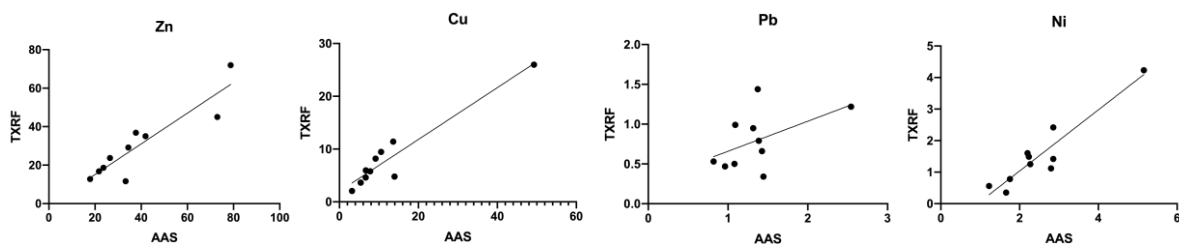
Slika 4. TXRF spektar uzorka A

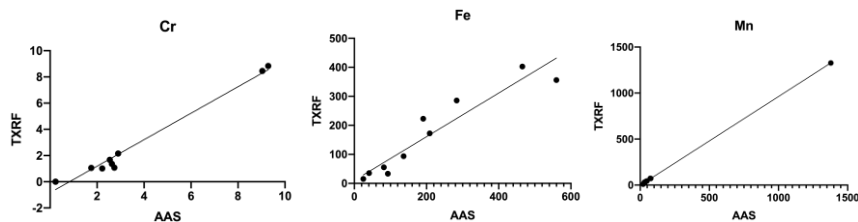
Dobivena koncentracija elemenata s FAAS smanjuje se kako slijedi: Fe > Mn > Zn > Cu > Cr > Ni > Pb dok kod TXRF: Mn > Fe > Zn > Cu > Cr > Ni > Pb.

Sve čajne mješavine sadrže značajne koncentracije esencijalnih elemenata (Cu, Zn, Fe i Mn). Međutim, sadržaj svih ispitivanih elemenata značajno se razlikuju među ispitivanim biljnim vrstama. Dobivene razlike u koncentracijama mogu se objasniti različitim biljnim vrstama odnosno njihovoj botaničkoj strukturi, mobilnosti elemenata unutar biljke, mineralnom sastavu tla na kojem su uzgajane, sposobnosti apsorpcije kao i nekim drugim antropogenim izvorima onečišćenja. Mn i Fe su elementi prisutni u najvećim koncentracijama i njihove vrijednosti variraju. Sadržaj Mn varira od 20,92 mg/kg do 1378,48 mg/kg (FAAS) odnosno 9,95 mg/kg do 1326,62 mg/kg (TXRF) dok sadržaj Fe od 24,97 mg/kg do 559,98 mg/kg (FAAS) odnosno 15,33 mg/kg do 402,62 mg/kg (TXRF) što je u skladu s literaturnim podacima (Łozak i sur., 2002; Fernandez-Caceres i sur., 2001; Fernandez i sur. 2002; Nookabkaew i sur. 2006; Basgel i sur. 2006). Visok sadržaj Mn može biti posljedica korištenih pesticida za tretiranje tla na kojem biljka uspijeva kao i posljedica uzgoja biljaka na industrijskim i stambenim lokacijama bogatim Mn zbog njegove upotrebe kao dodatka gorivu. S obzirom na važnu ulogu Mn na endokrini, živčani i enzimski sustav konzumacija čajnih mješavina bogatim Mn može utjecati na normalan metabolizam kod ljudi. Kao esencijalni elementi, cink i bakar sastavni su dio mnogih enzima kao što su superoksid dismutaza, lizil oksidaza i ceruloplazmin koji imaju značajnu ulogu u antioksidacijskoj obrani. Dobivene koncentracije Cu i Zn su u rasponu od 6,04 mg/kg do 49,286 mg/kg (FAAS) odnosno 2,06 – 25,98 mg/kg (TXRF) za Cu i 17,89 –

78,73 mg/kg (FAAS) odnosno 11,65 – 71,96 mg/kg (TXRF) za Zn. Prosječna dobivena koncentracija cinka je oko 3 puta veća od dobivene prosječne koncentracije bakra što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Fernandez-Caceres i sur., 2001; Fernandez i sur. 2002; Maiga i sur., 2005; Garg i sur. 2007; Fei i sur., 2010). Cr je element važan za iskorištenje glukoze. Aktivira enzim fosfoglukomutazu te dovodi do povećanja aktivnosti inzulina. Nedostatak Cr može dovesti do smanjenja tolerancije za glukoza i do povećanja rizika od kardiovaskularnih oboljenja. Dobivene koncentracije Cr u ispitivanim biljnim vrstama također su varirale i u skladu su s literaturnim podacima (Abou-Arab i Donia, 2000; Garg i sur., 2007; Fei i sur., 2010). Najveća koncentracija Ni u ispitivanim uzorcima dobivena je u cvijetu nevena. Ni je esencijalan element za rast biljke i mobilan je unutar same biljke. Uslijed toga, najveća koncentracija Ni se može naći u cvijetu što je u skladu s dobivenim rezultatom. Sadržaj ispitivanog toksičnog elementa, Pb, u ispitivanim uzorcima je ispod maksimalno dozvoljene vrijednosti (MAC) u biljnom materijalu (MAC za Pb u suhom biljnom materijalu iznosi 5 mg/kg) prema Europskoj komisiji (EC, 2006).

Dobivene koncentracije svih ispitivanih elemenata s FAAS i TXRF tehnikom uspoređene su (Slika 5) i nisu pokazale statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ). Dobro slaganje između dobivenih rezultata ukazuje da u ovom slučaju postupak pripreme uzorka ne utječe značajno na rezultate mjerenja što TXRF tehniku čini potencijalno korisnom za „screening“ test. Male razlike u dobivenim koncentracijama s ove dvije tehnike mogu se pripisati nehomogenosti suspendiranih čestica. Uzimajući u obzir vrijeme potrebno za određivanje 7 elemenata kod 10 uzoraka može se zaključiti da je TXRF tehnika više puta brža od FAAS s obzirom da se radi o multielementnoj metodi. Vrijeme potrebno za pripremu uzoraka za FAAS je oko 15h dok priprema uzoraka za TXRF traje oko 3h. Gledano s ekonomskog aspekta, TXRF također ima prednost jer osim IS ne koristi druge reagense za pripremu uzoraka i sama tehnika ne zahtijeva korištenje plinova za razliku od FAAS kod kojeg se koristi kiselina za razaranje uzorka, a plin acetilen za atomizaciju.





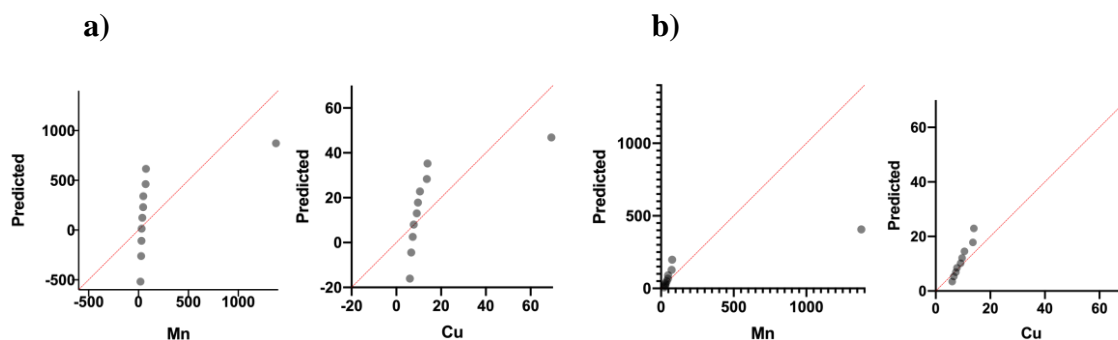
Slika 5. Usporedba sadržaja Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Fe i Mn određenih FAAS i TXRF tehnikama. Sve vrijednosti izražene su u mg/kg

#### 4.1. Kemometrijske metode obrade podataka

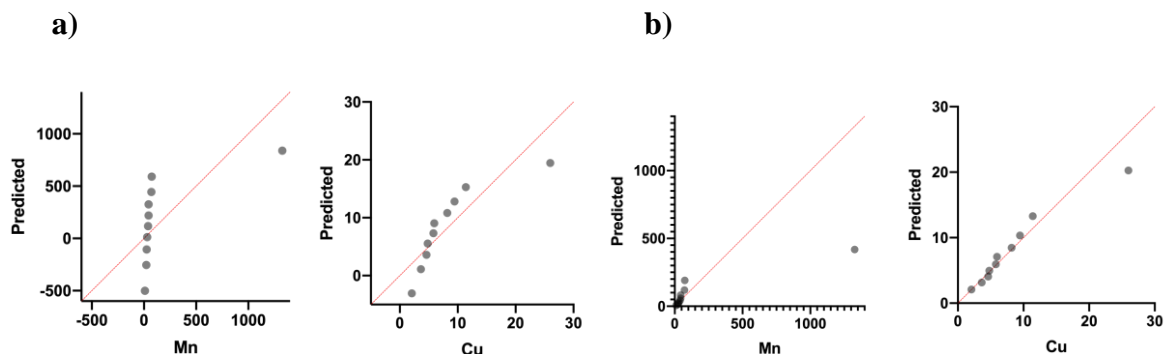
Srednja vrijednost i standardno odstupanje koncentracije elemenata dobivenih u ovom istraživanju pokazali su velike varijacije u sadržaju ispitivanih elemenata kod različitih biljnih vrsta. Kako bi se dobio što bolji uvid u sadržaj određivanih elemenata kod ispitivanog biljnog materijala dobiveni podaci podvrgnuti su kemometrijskim metodama analize.

##### 4.1.1. Univarijatna analiza

Svi dobiveni podaci prvo su analizirani na tip distribucije. Kako parametrijski statistički testovi zahtijevaju normalnu raspodjelu podataka prvo je primijenjen Shapiro-Wilk's test (Shapiro i Wilk, 1965) za ispitivanje distribucije elemenata u ispitivanim uzorcima ( $P < 0,05$ ). Statistička obrada rezultata pokazala je da postoji relativno veliko odstupanje od normalne distribucije za sve dobivene koncentracije elemenata. Koeficijent korelacije značajno se poboljšao primjenom logaritamski transformiranih podataka što je u skladu s literaturnim podacima (Maiz i sur., 2000). Slike 6 i 7 prikazuju graf raspodjele za dobivene podatke i distribuciju logaritamski transformiranih podataka za Mn i Cu. Dobiveni rezultati ovih elemenata pokazali su najveće odstupanje kod obje primjenjene tehnike.



Slika 6. FAAS: a) graf raspodjele za Mn i Cu (dobivene vrijednosti) b) graf raspodjele za Mn i Cu (logaritamski transformirani podaci)



Slika 7. TXRF: a) graf raspodjele za Mn i Cu (dobivene vrijednosti) b) graf raspodjele za Mn i Cu (logaritamski transformirani podaci)

Grubbsov test se primijenio radi otkrivanja dobivenih sumnjivih vrijednosti koje se mogu odbaciti ili ne (eng. outliers,  $\alpha = 0,05$ ,  $n = 10$ ). Rezultati dobiveni s FAAS pokazali su 4 sumnjive vrijednosti i to za Cu kod D (49,286 mg/kg), Mn kod J (1378,478 mg/kg), Ni kod G (5,153 mg/kg) i Pb kod C (2,542 mg/kg), dok kod rezultata dobivenih TXRF tri sumnjive vrijednosti su detektirane u istim biljnim vrstama : Cu kod D (25,98 mg/kg), Mn kod J (1326,62 mg/kg) i Ni kod C(4,23 mg/kg). Sve sumnjive vrijednosti su bile više u odnosu na ostale. Detektirane sumnjive vrijednosti mogu se odbaciti ili zadržati. U slučaju kada se koristi robustna analitička tehnika koja pretpostavlja da podaci ne slijede Gaussovu razdiobu sumnjive vrijednosti se mogu zadržati. Odlučili smo odbaciti sumnjive vrijednosti u daljnim postupcima multivarijatne obrade podataka jer one mogu imati negativan učinak na kemometrijsku analizu.

Nakon odbacivanja sumnjivih vrijednosti primjenjena je korelacijska analiza (Pearson's correlations) između elemenata. Ispitivane su vrijednosti korelacijskih koeficijenata s nivoom značajnosti od 95 %. Rezultati su prikazani u Tablici 8 i 9. Što je koeficijent korelacije bliži 1 to je veća povezanost među varijablama. Dobiveni rezultati FAAS-om pokazali su da Zn-Cu (0,698), Zn – Fe (0,508), Cu-Fe (0,705), Mn-Cr (0,643), Ni-Fe (0,558) i Ni-Cr (0,475) pokazuju najveću pozitivnu korelaciju (označene vrijednosti u tablicama) dok kod ostalih varijabilni nije uočena značajna korelacija. Vrlo slična zapažanja primijećena su i kod rezultata za korelaciju dobivenih TXRF analizom. Veća korelacija upućuje na pretpostavku o sličnom porijeklo metala u ispitivanim uzorcima.

Tablica 8. Korelacijska matrica ispitivanih elemenata (rezultati dobiveni s FAAS)

Varijable	Zn	Cu	Mn	Ni	Pb	Fe	Cr
Zn	<b>1</b>						
Cu	<b>0,698</b>	<b>1</b>					
Mn	-0,208	-0,184	<b>1</b>				
Ni	-0,045	-0,075	0,146	<b>1</b>			
Pb	-0,359	-0,320	0,007	-0,223	<b>1</b>		
Fe	<b>0,508</b>	<b>0,705</b>	-0,012	<b>0,558</b>	-0,196	<b>1</b>	
Cr	-0,092	-0,123	<b>0,643</b>	<b>0,745</b>	-0,144	0,355	<b>1</b>

Tablica 9. Korelacijska matrica ispitivanih elemenata (rezultati dobiveni s TXRF)

Varijable	Zn	Cu	Mn	Ni	Pb	Fe	Cr
Zn	<b>1</b>						
Cu	<b>0,581</b>	<b>1</b>					
Mn	-0,086	-0,216	<b>1</b>				
Ni	0,351	0,120	0,319	<b>1</b>			
Pb	-0,256	-0,348	<b>0,636</b>	0,126	<b>1</b>		
Fe	<b>0,381</b>	<b>0,580</b>	0,163	<b>0,758</b>	0,028	<b>1</b>	
Cr	0,028	-0,129	<b>0,653</b>	<b>0,861</b>	0,307	0,525	<b>1</b>

#### 4.1.2 Multivarijatna analiza

Multivarijatna analiza je korisna statistička tehnika za identifikaciju obrasca ponašanja u distribuciji podataka kao i za olakšavanje interpretacije velikog broja podataka. Dobiveni podaci analizirani su PCA i klusterskom analizom. PCA je najčešće primjenjivan postupak koji se koristi u svrhu klasifikacije ispitivanih varijabli. Koristi se za ispitivanje veza između različitih varijabli, detektiranje i interpretiranje ponašanja unutar uzorka npr grupiranje, sličnost ili razlike ispitivanih elemenata. PCA je primjenjena na sve podatke. Jedan od osnovnih ciljeva PCA analize je da identificira faktore od iznimne važnosti iz skupa podataka. Osnovna statistika faktorske analize prikazana je u Tablici 10. za FAAS i Tablici 11 za TXRF. S ciljem dobivanja što manjeg broja faktora koji mogu utjecati na interpretaciju rezultata PC ekstrahira vrijednosti

iz korelacijske matrice. U Tablici 12 i 13 prikazan je maksimalan broj komponenti koje imaju utjecaj među dobivenim podacima i on iznosi 5. Odabrani faktori povezani su s porijeklom elemenata u ispitivanim uzorcima.

Tablica 10. Faktorska analiza korelacijske matrice (FAAS)

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
vrijednost							
faktora	2,588	2,223	0,880	0,830	0,343	0,108	0,027
varijanca (%)	36,973	31,758	12,569	11,858	4,904	1,547	0,390
zajednička							
varijanca							
(%)	36,973	68,732	81,301	93,160	98,063	99,610	100,000

Tablica 11. Faktorska analiza korelacijske matrice (TXRF)

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
vrijednost							
faktora	2,901	2,299	0,778	0,550	0,373	0,093	0,00
varijanca (%)	41,447	32,836	11,108	7,860	5,333	1,322	0,09
zajednička							
varijanca (%)	41,447	74,283	85,391	93,251	98,584	99,907	100,00

Tablica 12. Korelacija između varijabli i faktora (FAAS)

	F1	F2	F3	F4	F5
Zn	<b>0,484</b>	0,254	0,025	0,019	0,218
Cu	<b>0,565</b>	0,265	0,001	0,077	0,070
Mn	0,001	<b>0,491</b>	0,229	0,258	0,003
Ni	0,281	<b>0,451</b>	0,123	0,128	0,003
Pb	0,282	0,003	<b>0,380</b>	0,318	0,016
Fe	<b>0,808</b>	0,001	0,119	0,026	0,022
Cr	0,168	<b>0,759</b>	0,003	0,005	0,012

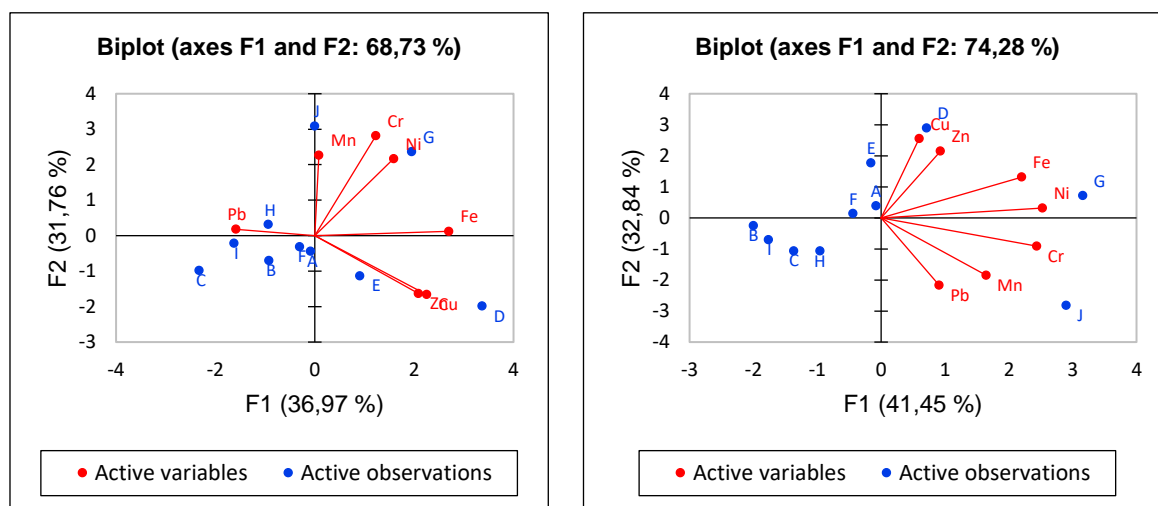
Tablica 13. Korelacija između varijabli i faktora (TXRF)

	F1	F2	F3	F4	F5
Zn	0,114	<b>0,484</b>	0,084	0,301	0,016
Cu	0,047	<b>0,686</b>	0,136	0,071	0,035

Mn	<b>0,358</b>	<b>0,357</b>	0,120	0,017	0,139
Ni	<b>0,845</b>	0,011	0,103	0,006	0,031
Pb	0,109	<b>0,494</b>	0,251	0,015	0,126
Fe	<b>0,642</b>	0,181	0,000	0,136	0,007
Cr	<b>0,785</b>	0,087	0,083	0,005	0,020

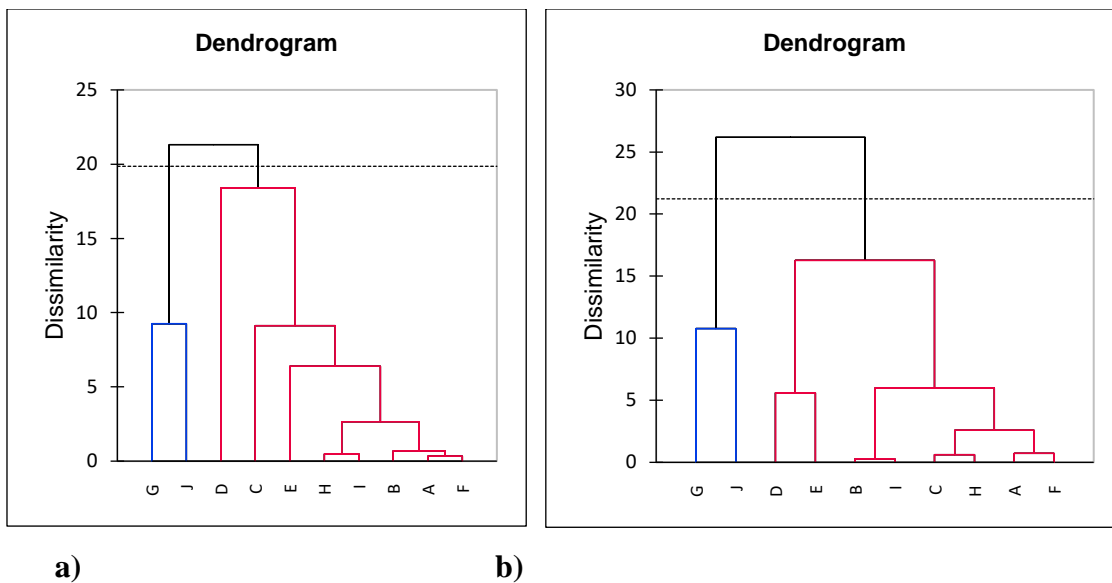
Dobiveni podaci pokazali su da je prvih pet komponenti (faktora) odgovorno za oko 98,01 % varijacija među svim podacima kod FAAS odnosno 98,6 % kod TXRF. Prva komponenta pokazuje najveću varijaciju podataka i sadrži Zn, Cu i Fe kod FAAS odnosno Mn, Ni, Fe i Cr kod TXRF.

Dobiveni rezultati ukazuju da elementi mogu potjecati iz raznih izvora. Primjerice, okoliš može biti potencijalno izvor Mn dok Fe najčešće potječe iz tla. Cu je esencijalan element, sastavni dio koenzima važnih za život biljke. Kod treće komponente velika vrijednost Pb ukazuje da je biljka uzgajana u blizini ceste jer je Pb najčešći marker ispušnih plinova automobila. Neki elementi pokazuju višu vrijednosti kod dvije komponente (npr. Za Mn) što ukazuje da mogu potjecati iz više izvora. Pomoću PCA analize identificirani su elementima s najvećim značajem za ispitivani biljni materijal Slika 8.



**a)** graf dobivenih podataka za elemente u ispitivanim uzorcima (FAAS)  
**b)** graf dobivenih podataka za elementa u ispitivanim uzorcima (TXRF)

Klasterska analiza se često koristi u kemometriji s ciljem pojašnjenja veze između uzoraka bez prethodnih informacija o toj vezi. Uzorci će se grupirati u klustere prema njihovoj sličnosti. U ovom istraživanju primjenjena je Ward's metoda za hierarhijsku klustersku analizu.. Dobiveni rezultati prikazani su pomoću dendograma i za rezultate dobivene FAAS i TXRF tehnikom (Slika 9). Iz prikazanih dendograma vidljiva je podjela na 2 osnovne grupe za rezultate dobivene s obje tehnike. Dobivene grupe pokazuju sličnost između biljnih materijala na osnovu sadržaja ispitivanih elemenata. Mala razlika je prisutna najvjerojatnije uslijed nehomogenosti suspendiranih čestica prilikom usitnjavanja uzoraka. Ovakvo grupiranje u skladu je s dobivenim rezultatima sadržaja elemenata u pojedinom biljnom materijalu.



Slika 9. Dendrogram klusterske analize za 7 varijabli i 10 biljnih vrsti

a)rezultati dobiveni FAAS tehnikom

b)rezultati dobiveni TXRF tehnikom



## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu predložena je TXRF tehnika kao metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu biljnog materijala. Postupak pripreme uzoraka kao i sama metoda temelji se na načelima zelene kemije. U radu se naglašene prednosti TXRF u odnosu na FAAS: jednostavna priprema uzorka, mogućnost primjene iste metode za različite vrste uzoraka (otopine, suspenzije), mala količina uzorka kao i reagensa, multielementna metoda, jednostavna kvantifikacija, brza i jeftina što ju čini pogodnom za primjenu u rutinskim analizama.

FAAS i TXRF tehnike primijenjene su za određivanje koncentracije Zn, Cu, Mn, Fe, Ni, Pb i Cr u 10 različitih biljnih vrsta. Dobiveni rezultati pokazali su kako obje primijenjene tehnike, kao i različiti načini pripreme uzoraka daju slične rezultate odnosno jednako su učinkovite.

Imajući u vidu kompleksnost biljnog materijala kao i različit tip uzorka (cvijet, list, sjeme) primijenjen je kemometrijski pristup za obradu eksperimentalno dobivenih podataka. PCA i klasteraska analiza pokazale su moguću korelaciju između ispitivanih elemenata i određeni obrazac ponašanja je definiran. Nadalje, elementni sastav zajedno s analizom glavnih komponenata omogućio je grupiranje u skupine uzoraka biljnih vrsta i pokazao je potencijalne izvore metala u samom materijalu. Ovo istraživanje jasno je pokazalo da različite biljne vrste mogu biti grupirane prema sadržaju elemenata u njima što može biti od velike koristi pri analizi kontrole kvalitete. Kako se sadržaj elemenata može mijenjati s vremenom uslijed različitih utjecaja okoliša daljnja istraživanja usmjerit će se na ispitivanje utjecaj različitih vanjskih izvora na sadržaj elemenata u biljnim vrstama (npr. tip tla, godišnje doba i sl.). Stalni monitoring sadržaja elemenata u biljnom materijalu od iznimne je važnosti naročito zbog njenog utjecaja na zdravlje ljudi.

## **6. ZAHVALE**

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Jasni Jablan na vodstvu pri izradi ovog rada, naučenim vještinama pisanja znanstvenog rada, prenesenome znanju i velikoj podršci.

Zahvaljujemo se i doc. dr. sc. Maji Bival Štefan na poticanju interesa ka farmakognoziji, mnoštvu korisnih savjeta, uloženome trudu i vremenu.

Također, hvala i tehničkoj suradnici Nensi Cicvara na pomoći i podršci u laboratoriju.

Zahvaljujemo se prof. dr. sc. Mariu Jugu i Zavodu za farmaceutsku tehnologiju na ustupljenoj vibracijskoj tresilici za određivanje veličina čestica AS 200 Basic.

Zahvaljujemo se dr. sc. Rogerti Dalipi i dr. sc. Emanuele Sangiorgi iz Laboratorija za primjenjenu kemiju u prehrambenoj tehnologiji na Zavodu za kemiju prehrane i stočne hrane na Institutu Lombardije i Emilie Romagne za istraživanje zdravlja životinja i sigurnost hrane.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Abugassa IO, Bashir AT, Doubali K, Etwir RH, Abu-Enawel M, Abugassa SO. Characterization of trace elements in medicinal herbs by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2008, 278(3), 559.
2. Ashenef A. Essential and toxic metals in tea (*Camellia sinensis*) imported and produced in Ethiopia. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2014, 7(1), 30-36.
3. Ashraf W, Mian AA. Levels of selected heavy metals in black tea varieties consumed in Saudi Arabia. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2008, 81(1), 101-104.
4. ASSESSMENT REPORT ON HYPERICUM PERFORATUM L., HERBA, 2009.  
www.ema.europa.eu, pristupljeno 11.08.2020.
5. Bagci E, Yazgin A, Hayta S, Cakilcioglu U. Composition of the essential Oil of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol, 2010, 4(23), 2588-2590.
6. Başgel S, Erdemoglu S. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *The Science of the total environment*, 2006, 359. 82-9.
7. Beatty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, U.S.A, 1993, 1-94.
8. Bilo F, Borgese L, Lodolo M, , Bosio A, Benassi L, Depero LE Bontempi E. Evaluation of heavy metals contamination from environment to food matrix by TXRF: the case of rice and rice husk. *Journal of Chemistry*, 2015.
9. Borgese L, Bilo F, Bontempi E, Seralessandri L, Cinosi A, Siviero G, Depero LE. Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF) spectroscopy for environmental and biological analysis. International Congress of Metrology, 2013.
10. Borgese L, Bilo F, Dalipi R, Bontempi E, Depero LE. Total reflection X-ray fluorescence as a tool for food screening. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2015, 113, 10-15.
11. Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2016, 35, 107-115.
12. Cairns WR, Hill SJ, Ebdon L. Directly coupled high performance liquid chromatography—inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of organometallic species in tea. *Microchemical journal*, 1996, 54(2), 88-110.

13. Calendulae flos, 2018. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), pristupljeno 11.08.2020.
14. Chen Y, Xu J, Yu M, Chen X, Shi J. Lead contamination in different varieties of tea plant (*Camellia sinensis* L.) and factors affecting lead bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(9), 1501-1507.
15. Chen Y, Yu M, Xu J, Chen X, Shi J. Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(14), 2350-2355.
16. Community herbal monograph on Capsella bursa-pastoris (L.) Medikus, herba, 2010. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), pristupljeno 11.08.2020.
17. Costa LM, Gouveia ST, Nobrega JA. Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. *Analytical sciences*, 2002, 18(3), 313-318.
18. Cruz-Landeira, A., Bal, M.J., Quintela, O., López-Rivadulla, M. Determination of methemoglobin and total hemoglobin in toxicological studies by derivative spectrophotometry. *Journal of analytical toxicology*, 2002, 26(2), 67-72.
19. Dalipi R, Marguá E, Borgese L, Depero LE. Multi-element analysis of vegetal foodstuff by means of low power total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry, *Food Chemistry*, 2017, 218, 348-355.
20. Danrong Z, Yuqiong C, Dejiang N. Effect of water quality on the nutritional components and antioxidant activity of green tea extracts. *Food Chemistry*, 2009, 113(1), 110-114.
21. Dash K, Ranjit M, Thangavel S. UV photolysis-assisted digestion of tea (*Camellia sinensis*) and tulsi (*Ocimum sanctum*) and their infusions: Comparison of available trace elements. *Atomic Spectroscopy*, 2008, 29, 56-62.
22. De La Calle I, Costas M, Cabaleiro N, Lavilla I, Bendicho C. Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Food chemistry*, 2013, 138(1), 234-241.
23. Dutra RL, Cantos GA, Carasek E. Analysis of zinc in biological samples by flame atomic absorption spectrometry: use of addition calibration technique. *Biological Trace Element Research*, 2006, 111, 265-279.
24. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 10. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2020, str. 158-160.
25. EFSA (European Food Safety Authority). Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals by the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies (NDA) and Scientific Committee on Food (SCF), 2006.

26. European Commission (EC) Commission regulation (EC) No1881/2006 of December 2006 setting maximum levels certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance) (OJL 364, 20.12.2006; p.5).
27. European Union herbal monograph on *Crataegus* spp., folium cum flore , 2016.  
www.ema.europa.eu, pristupljeno 11.08.2020.
28. Feng H, Wang T, Li SFY. Sensitive determination of trace-metal elements in tea with capillary electrophoresis by using chelating agent 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR). *Food Chemistry*, 2003, 81(4), 607-611.
29. Fernandez PL, Pablos F, Martín MJ, Gonzalez AG. Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 2002, 76(4), 483-489.
30. Fernández-Cáceres PL, Martín MJ, Pablos F, González AG. Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(10), 4775-4779.
31. Ferrara L, Montesano D, Senatore A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Il farmaco*, 2001, 56(5-7), 397-401.
32. Fischer F, Robbe-Saule M, Turlin E. Characterization in *Helicobacter pylori* of a Nickel Transporter Essential for Colonization That Was Acquired during Evolution by Gastric *Helicobacter* Species. *PLoS Pathogens* 2016, 12(12), e1006018.
33. Frieden E. Perspectives on copper biochemistry. *Clinical physiology and biochemistry*, 1986, 4(1), 11.
34. Fujita H, Yamagami T. Antihypercholesterolemic effect of Chinese black tea extract in human subjects with borderline hypercholesterolemia. *Nutrition research*, 2008, 28(7), 450-456.
35. Gallaher RN. Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19. 10.1016/j.jfca.2006.02.006.
36. Genchi G, Carocci A, Lauria G. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(3), 679.
37. Gorur FK, Keser R, Akcay N, Dizman S, Okumusoglu NT. Radionuclides and heavy metals concentrations in Turkish market tea. *Food Control*, 2011, 22, 2065-2070.
38. Han SP, Gan WE, Su QD. On-line sample digestion using an electromagnetic heating column for the determination of zinc and manganese in tea leaf by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2007 , 72(4), 1481-1486.

39. Han WY, Shi YZ, Ma LF, Ruan JY, Zhao, F-J. Effect of liming and seasonal variation on lead concentration of tea plant (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze). *Chemosphere*, 2007, 66, 84-90.
40. Han WY, Shi YZ, Ma LF, Ruan JY. Arsenic, cadmium, chromium, cobalt, & copper in different types of Chinese tea. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 2005, 75, 272-277.
41. Han WY, Zhao FJ, Shi YZ, Ma LF, Ruan JY. Scale and causes of lead contamination in Chinese tea. *Environmental Pollution*, 2006, 139(1), 125-132.
42. Heiss ML, Heiss RJ. The story of tea: a cultural history and drinking guide, 2007. *Random House Digital, Inc.*
43. Herrador MA, Gonzalez AG. Pattern recognition procedures for differentiation of green, black and oolong teas according to their metal content from inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 2001, 53(6), 1249-1257.
44. Hu Y, Zhou J, Du B. Health risks to local residents from the exposure of heavy metals around the largest copper smelter in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171, 329-336.
45. Ipeaiyeda, Ayodele, Dawodu, M. Leaching of manganese, iron, copper and zinc from tea (*Camellia sinensis*) in tea mugs. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 10, 2240-2247.
46. Islam MA, Ebihara M. Elemental characterization of Japanese green tea leaves and tea infusion residue by neutron-induced prompt and delayed gamma-ray analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10, S677-S682.
47. Jin CW, Du ST, Zhang K, Lin XY. Factors determining copper concentration in tea leaves produced at Yuyao County, China. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2008 , 46(6), 2054-2061.
48. Jin CW, He YF, Zhang K, Di Zhou G, Shi JL, Zheng SJ. Lead contamination in tea leaves and non-edaphic factors affecting it. *Chemosphere*, 2005, 61(5), 726-732.
49. Juniperi pseudo-fructus, 2007. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), pristupljeno 11.08.2020.
50. Kara D. Evaluation of trace metal concentration in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry* , 2009, 114, 347-354.
51. Klockenkämper R, von Bohlen A. FUNDAMENTALS OF X-RAY FLUORESCENCE, 2015.
52. Kumar A, Nair AGC, Reddy AVR, Garg AN. Availability of essential elements in Indian and US tea brands. *Food Chemistry*, 2005,89(3),441-448.

53. Kumar S, Trivedi AV. A Review on Role of Nickel in the Biological System. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2016, 5(3),719-727.
54. Lagad R, Devanathan A, Gurav. Elemental Profiling of Indian Tea by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). *Atomic Spectroscopy*, 2011, 32. 168-174.
55. Lead poisoning and health, 2019. [www.who.int](http://www.who.int) , pristupljeno 11.08.2020.
56. Li T, Yu LJ, Li MT, Li W. Comparative studies on the qualities of green teas in Karst and non-Karst areas of Yichang, Hubei Province, PR China. *Food chemistry*, 2007, 103(1), 71-74.
57. Łozak A, Sołtyk K, Ostapczuk P, Fijałek Z. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. *Science of the Total Environment*, 2002, 289(1-3), 33-40.
58. Łuczaj W, Skrzydlewska E. Antioxidative properties of black tea. *Preventive medicine*, 2005, 40(6), 910-918.
59. Luterotti S, Bićanić D. Odabrane teme iz bioanalitike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2013, str. 1-12.
60. Maiz I, Arambarri I, Garcia R, Millan E. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental pollution*, 2000, 110(1), 3-9.
61. Malik J, Szakova J, Drabek O, Balik J, Kokoska L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. *Food chemistry*, 2008, 111(2), 520-525.
62. Mandiwana KL, Panichev N, Panicheva S. Determination of chromium (VI) in black, green and herbal teas. *Food Chemistry*, 2011, 129(4), 1839-1843.
63. Marcos A, Fisher A, Rea G, Hill SJ. Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998,13, 521-525.
64. Matsuura H. Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography. *Analytical Sciences*, 2001;17(3),391-398.
65. McKenzie, J.S., Jurado, J.M., De Pablos, F. Characterisation of tea leaves according to their total mineral content by means of probabilistic neural networks. *Food Chemistry*, 2010, 123(3), 859-864.
66. Mehra A, Baker CL. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 2007, 100(4), 1456-1463.

67. Mierzwa J, Sun YC, Chung YT, Yang MH. Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 1998, 47(5), 1263-1270
68. Moghaddam MA, Mahvi AH, Asgari AR, Yonesian M. Determination of aluminum and zinc in Iranian consumed tea. *Environmental monitoring and assessment*, 2008, 144(1-3), 23-30.
69. Mokgalaka NS, McCrindle RI, Botha BM. Multielement analysis of tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using slurry nebulisation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004,19, 1375-1378.
70. Moreda-Pineiro A, Fisher A, Hill SJ. The classification of tea according to region of origin using pattern recognition techniques and trace metal data. *Journal of Food Composition and analysis*, 2003, 16(2), 195-211.
71. Moreda-Pineiro A, Marcos A, Fisher A, Hill SJ. Evaluation of the effect of data pre-treatment procedures on classical pattern recognition and principal components analysis: A case study for the geographical classification of tea. *Journal of Environmental Monitoring*, 2001,3, 352-360.
72. Najafian Y, Hamed SS, Farshchi MK. Plantago major in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electronic Physician Journal*, 2018, 10(2), 6390-6399.
73. Narin I, Colak H, Turkoglu O. Heavy Metals in Black Tea Samples Produced in Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 72, 844–849.
74. Nookabkaew S, Rangkadilok N, Satayavivad J. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(18), 6939-6944.
75. Odegard KE, Lund W. Multi-element Speciation of Tea Infusion Using Cation-exchange Separation and Size-exclusion Chromatography in Combination with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997,12, 403-408.
76. O'Neal SL, Zheng W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*, 2015, 2(3), 315-328.
77. Özcan MM, Ünver A, Uçar T, Arslan D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chemistry*, 2008, 106(3), 1120-1127.
78. Ozdemir Y, Gucer S. Speciation of manganese in tea leaves and tea infusions. *Food Chemistry*, 1998, 61, 313-317.
79. Pereira FMV, Filho ERP, Bueno MIMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 16, 5723–5730.



80. Pilgrim T, Watling J, Grice K. Application of trace element and stable isotope signatures to determine the provenance of tea (*Camellia sinensis*) samples. *Food Chemistry*, 2010, 118, 921-926.
81. Pohl P, Prusisz B. Fractionation analysis of manganese and zinc in tea infusions by two-column solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 2007, 102, 1415-1424.
82. Pohl P, Prusisz B. Simple and versatile operational fractionation of Fe and Zn in dietary products by solid phase extraction on ion exchange resins. *Talanta*, 2007, 71, 411-418.
83. Powell JJ, Burden TJ, Thompson RP. In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese. *Analyst*, 1998, 123(8), 1721-1724.
84. Prashanth L, Kumar Kattapagari K, Chitturi RT, Reddy Baddam VR, Prasad LK. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci*, 2015, 4, 75-85.
85. Qin F, Chen W. Lead and copper levels in tea samples marketed in Beijing, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 79, 247.
86. Queralt I, Ovejero M, Carvalho ML, Marques AF, Llabrés JM. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques. *X-Ray Spectrometry: An International Journal*, 2005, 34(3), 213-217.
87. Raudone L, Vilkickyte G, Pitkauskaitė L, Raudonis R, Vainoriene R, Motiekaityte V. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within Cultivars and Their Phenolic Compounds. *Molecules*, 2019, 24(5), 844.
88. Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Almeida CM. Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2007, 62(4), 139-144.
89. Salahinejad M, Aflaki F. Toxic and essential mineral elements content of black tea leaves and their tea infusions consumed in Iran. *Biological Trace Element Research*, 2010, 134(1), 109-117.
90. Salvador MJ, Lopes GN, Nascimento Filho VF, Zucchi OL. Quality control of commercial tea by x-ray fluorescence. *X-Ray Spectrometry: An International Journal*, 2002, 31(2), 141-144.
91. Seenivasan S, Manikandan N, Muraleedharan NN, Selvasundaram R. Heavy Metal Content of Black Teas from South India. *Food Control*, 2008, 19, 746-749.
92. Shen FM, Chen HW. Element composition of tea leaves and tea infusions and its impact on health. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80(3), 300-304.

93. Sheng. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chemical research in toxicology*, 2000, 13(3), 177-184.
94. Siddiqui R, Slivova V, Zaloga G, DeMichele SJ, Mukerji P, Huang YS i sur. Green tea polyphenols modulate secretion of urokinase plasminogen activator (uPA) and inhibit invasive behavior of breast cancer cells. *Nutrition and cancer*, 2005, 52(1), 66-73.
95. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 493-498, 542-554, 596-614.
96. Sofuoglu, S.C., Kavcar, P. An exposure and risk assessment for fluoride and trace metals in black tea. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 158(2-3), 392-400.
97. Soylak M, Tuzen M, Souza AS, das Graças Andrade Korn M, Ferreira SL. Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 149(2), 264-268.
98. Suchacz B, Wesołowski M. The recognition of similarities in trace elements content in medicinal plants using MLP and RBF neural networks. *Talanta*, 2006, 69(1), 37-42.
99. Szymczycha-Madeja A, Welna M, Pohl P. Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified–multivariate classification of different tea products. *Microchemical Journal*, 2015, 121, 122-129.
100. Szymczycha-Madeja A, Welna M, Pohl P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. *TrAC trends in analytical chemistry*, 2012, 35, 165-181.
101. Tascioglu S, Kok E. Temperature dependence of copper, iron, nickel and chromium transfers into various black and green tea infusions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 76, 200-208.
102. Terres-Martos C, Navarro-Alarcon M, Martin-Lagos F, De la Serrana HLG, Lopez-Martinez MC. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Science of the Total Environment*, 1997, 198, 97-103.
103. The Dark Side of Iron - Why Too Much is Harmful, 2017. [www.healthline.com](http://www.healthline.com), pristupljeno 11.08.2020.
104. Tokaloğlu Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chemistry*, 2012, 134(4), 2504-2508.
105. Tumolo M, Ancona V, De Paola D et al. Chromium Pollution in European Water, Sources, Health Risk, and Remediation Strategies: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17, 5438.

106. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 145-151.
107. Way TD, Lee HH, Kao MC, Lin JK. Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu-transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression. *European Journal of Cancer*, 2004, 40(14), 2165-2174.
108. Welna M, Szymczycha-Madeja A, Pohl P. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. *Food research international*, 2013, 53(2), 922-930.
109. Wichtl M. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C., 2004. str 617-625 , 519-521.
110. Wong MH, Hang ZQ, Wong JWC, Lan CY. Trace metal contents (Al, Cu and Zn) of tea: Tea and soil from two tea plantations, and tea products from different provinces of China. *Environmental Geochemistry and Health*, 1998, 20(2), 87-94.
111. World Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials*. World Health Organization, 1998.
112. Xie M, Von Bohlen A, Klockenkämper R, Jian X, Günther K. Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1998, 207(1), 31-38.
113. Ye X, Jin S, Wang D, Zhao F, Yu Y, Zheng D, Ye N. Identification of the origin of white tea based on mineral element content. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(1), 191-199.
114. Yemane M, Chandravanshi BS, Wondimu T. (2008). Levels of essential and non-essential metals in leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.) and soil of Wushwush farms, Ethiopia. *Food Chemistry*, 2008, 107, 1236-1243.
115. Zhang HQ, Ni BF, Tian WZ, Zhang GY, Huang DH, Liu CX i sur. Correction factors for the gamma attenuation effects in large sample neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2011, 287(2), 513-517.
116. Zhou J, Liang J, Hu Y, et al. Exposure risk of local residents to copper near the largest flash copper smelter in China. *Sci Total Environ*, 2018, 630, 453-461.
117. Zhu QY, Hackman RM, Ensunsa JL, Holt RR, Keen CL. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(23), 6929-6934.

## 8. SAŽETAK

### **Usporedba plamene atomske apsorpcijske spektrometrije i rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za određivanje sadržaja teških metala u realnim uzorcima - kemometrijski pristup**

Vanessa Vana Rogga i Katarina Sladonja

Mnoge čajne mješavine mogu predstavljati opasnost za zdravlje zbog eventualne prisutnosti teških metala. Smatra se da su teški metali bio-akumulativni elementi koji čine veliku prijetnju javnom zdravlju. Budući da se svijest i zabrinutost zbog elementarnog sastava čajnih mješavina povećava iz godine u godinu elementarna analiza čajnih mješavina je od velikog značaja i postoji potreba za brzim i osjetljivim analitičkim tehnikama koje se mogu primijeniti i u rutinskim analizama. Nadalje, posebna pažnja se posvećuje primjeni analitičkih metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“ prvenstveno upotreba malih količina uzorka, male količine reagensa, brz i siguran postupak. U tom smislu TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu.

Glavni cilj ovog rada je istražiti prednosti i nedostatke dvije različite analitičke tehnike (FAAS i TXRF) za određivanje sadržaja teških metala (Zn, Cu, Mn, Ni, Pb, Fe i Cr) u sakupljenim uzorcima čajnih mješavina koji se učestalo konzumiraju prvenstveno vodeći se načelima „zelene kemije“. Kako bismo utvrdili moguću povezanost između elementnog sastava kod različitih čajnih mješavina koristili smo multivarijatnu statističku analizu (PCA i klaster analizu). Dobiveni rezultati pokazali su kako obje primijenjene tehnike kao i različiti načini pripreme uzoraka daju slične rezultate odnosno jednako su učinkovite. Također, rezultati našeg istraživanja pokazali su da različite biljne vrste mogu biti grupirane prema sadržaju elemenata u njima što može biti od velike koristi pri analizi kontrole kvalitete. Daljna istraživanja usmjerit će se na ispitivanje utjecaj različitih vanjskih izvora na sadržaj elemenata u biljnim vrstama (npr. tip tla, godišnje doba i sl.).

**KLJUČNE RIJEČI: TXRF, FAAS, TEŠKI METALI, BILJKE, KEMOMETRIJA**

## **9. SUMMARY**

### **Comparison of flame atomic absorption spectrometry and total x-ray fluorescence spectrometry for determination of heavy metal content in real samples – a chemometric approach**

Vanessa Vana Rogga i Katarina Sladonja

Many tea mixtures can be a threat to health because of the possible presence of heavy metals. It is considered that heavy metals are bioaccumulative elements of high risk to public health. Since the awareness and concern about the elemental composition are growing from year to year, elemental analysis is becoming more important. Therefore new analytical methods that are fast and sensitive and possible to use in the routine analysis are becoming required. Furthermore, special interests have been dedicated to using analytical methods that are following the principles of „green chemistry“, especially to using small sample and reagent amounts, as to have a fast and safe analytical method. In this context, TXRF is becoming an important tool for both qualitative and quantitative elemental analysis.

The main goal of this paper is to seek the advantages and disadvantages of two different analytical methods (FAAS and TXRF) for determination of heavy metals (Zn, Cu, Mn, Ni, Pb, Fe and Cr) content in collected tea mixtures which are frequently used, following the principles of „green chemistry“. To determine the possible connection between elemental composition in different tea mixtures, we used multivariate statistical analysis (PCA and cluster analysis). The results given have shown that both techniques and different sample preparations have given similar results. That means both methods are very efficient. Furthermore, the results of our research showed that different plant species can be grouped by their elemental composition which can be very useful in quality analysis control. Further research will be directed towards examination of the influence of outer sources on elemental composition in plant species (ex. Soil type, season, etc.).

**KEYWORDS: TXRF, FAAS, HEAVY METALS, PLANTS, CHEMOMETRICS**