

Određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji (*Salvia officinalis* L) i dubačcu (*Teucrium montanum* L) atomskom emisijskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu

Glamuzina, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:033936>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Eva Glamuzina

**Određivanje mikro- i makroelemenata u
kadulji (*Salvia officinalis* L) i dubačcu
(*Teucrium montanum* L) atomskom emisijskom
spektrometrijom uz induktivno spregnutu
plazmu**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
diplomiranog inženjera kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ive Juranović Cindrić.

Zahvale

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Juranović-Cindrić, na vremenu, savjetima i stručnom vodstvu tijekom pisanja ovog rada. Moram se zahvaliti i prof. dr. sc. Željki Soldin koja mi je u trenucima posustajanja na početku studija bila glas nade i ohrabrenja a bez toga danas ne bi bilo ni ovog rada. Od srca zahvaljujem mojoj majci Rihardi koja je zadnjom snagom omogućila moj nastavak studija, bila glas mudrosti i podrška do danas. Veliko hvala mome suprugu Kristijanu, koji je bio najveći oslonac kako u mom studiju tako i životu. Zahvaljujem i mojoj sestrični Ireni koja me podržavala tokom studija i svojim gestama zaslužila spomen u ovoj zahvali.

Ovaj rad posvetila bih sinu Grguru.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Ljekovite biljke.....	3
2.2. Kadulja.....	4
2.3. Dubačac	6
2.4. Mikro- i makroelementi u ljekovitom bilju	8
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Kemikalije.....	14
3.2. Opis instrumenata	14
3.3. Uzorkovanje.....	16
3.4. Postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje kadulje i dubačca.....	17
3.5. Postupak za pripremu čaja od kadulje i dubačca	17
3.6. Statistička analiza	17
3.7. Elementna analiza metodom ICP-AES.....	17
3.7.1. Priprava kalibracijske krivulje	17
3.7.2. Točnost metode	17
3.7.3. Preciznost metode	17
3.7.4. Detekcijske granice	18
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1. Validacija metode ICP-AES za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu	19
4.1.1. Točnost i preciznost metode za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu	19
4.1.2. Detekcijske granice elemenata metodom ICP-AES za kadulju i dubačac	24
4.1.3. Osjetljivost metode za elementnu analizu kadulje i dubačca.....	27
4.2. Postupak optimiziranja pripreme uzorka kadulje i dubačca za elementnu analizu metodom ICP-AES	27
4.2.1. Elementna analiza kadulje i dubačca metodom ICP-AES.....	28
4.2.2. Makroelementi u kadulji i dubačcu	28

4.2.3. Mikroelementi u kadulji i dubačcu.....	32
4.2.4. Toksični elementi u kadulji i dubačcu.....	35
4.3. Ekstrakcija mikro- i makroelemenata iz kadulje i dubačca.....	38
§ 5. ZAKLJUČAK.....	43
§ 6. LITERATURNI IZVORI	45
§ 7. ŽIVOTOPIS.....	L



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji (*Salvia officinalis* L) i dubačcu (*Teucrium montanum* L) atomskom emisijskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu

Eva Glamuzina

Sadržaj mikro- i makroelemenata u kadulji (*Salvia officinalis* L) i dubačcu (*Teucrium montanum* L) određen je metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Uzorci (list, cvijet i cijela biljka) su razoreni u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje, te su nakon optimiranja i validacije metode u uzorcima analizirani Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn. Točnost metode određivanja mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu određena na temelju iskoristivosti metode iznosi od 85 do 125 % za kadulju te 83 do 130 % za dubačac. Detekcijske granice elemenata su manje od $2 \mu\text{g g}^{-1}$ za mikrovalno potpomognuto razorenu kadulju i dubačac.

Esencijalni elementi Al, Cu, Fe, Mn, Ni i Zn su u cijelim biljkama i njihovim čajevima prisutni u masenim udjelima reda veličine $\mu\text{g L}^{-1}$, dok su Ca, K, Mg i Na u mg L^{-1} . U uzorcima kadulje određeno je $9,72 \text{ mg g}^{-1}$ K, $3,52 \text{ mg g}^{-1}$ Mg, $4,09 \text{ mg g}^{-1}$ Ca i $0,10 \text{ mg g}^{-1}$ Na, $94,34 \mu\text{g g}^{-1}$ Al, $109,22 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni, $94,19 \mu\text{g g}^{-1}$ Fe, $33,35 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn, $30,49 \mu\text{g g}^{-1}$ Mn, $10,68 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu i $7,79 \mu\text{g g}^{-1}$ Sr, $0,0564 \mu\text{g g}^{-1}$ Cd i $6,530 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb.

Dubačac sadrži: $6,654 \text{ mg g}^{-1}$ K, $1,488 \text{ mg g}^{-1}$ Mg, $0,081 \text{ mg g}^{-1}$ Ca i $0,057 \text{ mg g}^{-1}$ Na, $97,38 \mu\text{g g}^{-1}$ Al, $95,90 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni, $81,92 \mu\text{g g}^{-1}$ Fe, $20,52 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn, $27,50 \mu\text{g g}^{-1}$ Mn, $4,76 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu i $4,02 \mu\text{g g}^{-1}$ Sr, $0,011\text{-}0,089 \mu\text{g g}^{-1}$, Cr $0,136\text{-}0,954 \mu\text{g g}^{-1}$. Toksični elementi Cd i Pb nađeni su samo u cijeloj biljci u niskim udjelima (Co $0,010\text{-}0,231 \mu\text{g g}^{-1}$, Pb $5,681\text{-}11,394 \mu\text{g g}^{-1}$), ali nisu detektirani u čaju.

(50 stranica, 14 slika, 19 tablica, 60 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: dubačac (*Teucrium montanum* L), ICP-AES, kadulja (*Salvia officinalis* L), mikro- i makroelemeti, mikrovalno potpomognuto razaranje

Mentor: Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. Prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. Izv.prof. dr. sc. Vesna Petrović-Peroković
- Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 27. rujna 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Determination of microelements in sage (*Salvia officinalis* L) and mountain germander (*Teucrium montanum* L) by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

Eva Glamuzina

The content of minor and major elements in sage (*Salvia officinalis* L) and mountain germander (*Teucrium montanum* L) was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). The medicinal herbs samples (herbs, leaves and flowers) were digested in a microwave assisted digestion system. After optimization and validating the analytical procedure Ag, Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr and Zn, were analyzed. The accuracy of the method expressed by the recovery determined by spiking experiments for micro- and macroelements in sage and mountain germander ranged from 85 up to 125 % for sage and from 83 up to 130 % for mountain germander. The limits of detection of the elements of interest were from up to 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ for sage and mountain germander microwave digested samples.

The essential elements Al, Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn are present in the whole overground herb and infusions at concentration levels of $\mu\text{g L}^{-1}$, whereas Ca, K, Mg, and Na in mg L^{-1} . The reference ranges determined in all sage (flower and leaf) samples are from 9,72 mg g^{-1} K, 3,52 mg g^{-1} Mg, 4,09 mg g^{-1} Ca i 0,10 mg g^{-1} Na, 94,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ Al, 109,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ Ni, 94,19 $\mu\text{g g}^{-1}$ Fe, 33,35 $\mu\text{g g}^{-1}$ Zn, 30,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ Mn, 10,68 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cu i 7,79 $\mu\text{g g}^{-1}$ Sr, 0,0564 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd and 6,530 $\mu\text{g g}^{-1}$ Pb.

Element content in mountain germander are: 6,654 mg g^{-1} K, 1,488 mg g^{-1} Mg, 0,081 mg g^{-1} Ca i 0,057 mg g^{-1} Na, 97,38 $\mu\text{g g}^{-1}$ Al, 95,90 $\mu\text{g g}^{-1}$ Ni, 81,92 $\mu\text{g g}^{-1}$ Fe, 20,52 $\mu\text{g g}^{-1}$ Zn, 27,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ Mn, 4,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cu i 4,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ Sr, Cd 0,011-0,089 $\mu\text{g g}^{-1}$, Cr 0,136-0,954 $\mu\text{g g}^{-1}$, Co 0,010-0,231 $\mu\text{g g}^{-1}$, Pb 5,681-11,394 $\mu\text{g g}^{-1}$. The toxic elements Cd and Pb were found only in the whole overground herb at very low concentrations, but not in the final infusions.

(50 pages, 14 figures, 19 tables, 60 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ICP-AES, microwave assisted digestion, minor and major elements, mountain germander (*Teucrium montanum* L), sage (*Salvia officinalis* L)

Mentor: Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Full Prof.

Reviewers:

1. Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Full Prof.
2. Dr. sc. Željka Soldin, Full Prof.
3. Dr. sc. Vesna Petrović-Peroković, Assoc. Prof.

Substitute: Dr. sc. Snežana Miljanić, Assoc. Prof.

Date of exam: 27.09.2019.

§ 1. UVOD

Ljekovito bilje se koristi u službenoj ili narodnoj medicini za liječenje bolesti ili očuvanje zdravlja ljudi. Na sastav ljekovitog i aromatičnog bilja utječu klimatski uvjeti i vrsta tla određenog područja. Elementni sastav ljekovitih biljaka važan je ne samo zbog prehrambenih razloga već i zbog toksikoloških aspekata. Do zagađenja ljekovitih biljaka toksičnim metalima, osim za vrijeme uzgoja biljke, najčešće dolazi prilikom berbe ili skladištenja.

Kadulja (*Salvia officinalis* L) i dubačac (*Teucrium montanum* L) ubrajaju se u ljekovite biljke koje se u Hrvatskoj koriste kao čaj ili u velikom broju ljekovitih pripravaka. Koncentracija mikro- i makroelemenata u biljnom čaju ovisi osim o vrsti čaja i o načinu pripreme.

Cilj ovog istraživanja je određivanje makro- i mikroelemenata u kadulji i dubačcu te njihovim čajevima. Biljke su ubrane u na Velebitu (Veliko Rujno).

Razvijena je brza i jednostavna analitička metoda za određivanje Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn metodom atomske emisijske spektroskopije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Metoda se može koristiti za rutinsku analizu biljaka te kontrolu zagađenja okoliša. Poseban naglasak je na optimiziranju metode za pripravu uzorka prije spektrometrijskog mjerenja. Uzorci su razoreni pomoću uređaja za mikrovalno potpomognuto razaranje.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ljekovite biljke

Ljekovite bilje, samoniklo ili kultivirano se već tisućljećima primjenjuje u liječenju (fitoterapiji) ili pomaže očuvanju zdravlja ljudi i životinja u različitim oblicima tradicionalnog liječenja kao zamjena ili nadopuna konvencionalnoj medicini. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *The World Health Organisation*, WHO) u ljekovito bilje ubrajaju se one biljne vrste čiji jedan dio ili više dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili u kemijsko-farmaceutskoj sintezi.¹

Ljekovito bilje većinom sadrži više različitih ljekovitih sastojaka od kojih obično jedan od njih određuje ljekovita svojstva biljke i njezinu primjenu. Ljekoviti sastojci obično nisu ravnomjerno raspoređene po cijeloj biljci. Katkada ih je više u cvjetovima, a kod drugih vrsta u listovima, korijenu ili drugim biljnim organima. Osobitost ljekovitog bilja je i u tome da se kod različitih biljaka iste vrste, ljekoviti sastojci mogu naći u različitim količinama. To prije svega ovisi o staništu gdje biljke rastu, o vremenu sakupljanja kao i o daljnjem postupku obrade sakupljenih dijelova. Raznolikost sadržaja ljekovitih sastojaka se djelomično može smanjiti sakupljanjem zdravih biljaka u pravo vrijeme te ispravnim postupkom sušenja i spremanja.

Od mnogih vrsta ljekovitih biljaka, samo je nekoliko stotina zanimljivo u gospodarskom pogledu, osobito za dobivanje sirovina za farmaceutske proizvode. U posljednje vrijeme značajan je ekološki uzgoj pojedinih vrsta ljekovitih i aromatičnih biljaka čiji su biološki aktivni sastojci osnovne sirovine za proizvodnju mnogih lijekova, kozmetičkih pripravaka i aroma za prehrambene proizvode. Iskorištavanje ljekovitoga bilja u medicinske svrhe zahtijeva proizvode koji nisu zagađeni zagađivačima, primjerice pesticidima te nisu u povezani s genetski modificiranim organizmima. Iako je uporaba ljekovitog bilja veoma raširena, udio fitokemikalija i njihova biološka aktivnost sa znanstvenog stajališta je malo istražena.¹ Zbog toga i Svjetska zdravstvena organizacija naglašava važnost istraživanja biljaka, posebice onih koje se koriste u tradicionalnoj medicini (WHO, 2014).² Na temelju njihovih odredbi, ljekovito bilje i njihovi pripravci su točno definirani na temelju svojih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Svjetska zdravstvena organizacija navodi podatak da 70–80 % svjetske populacije, osobito u zemljama u razvoju, koristi nekonvencionalne

lijekove većinom ljekovito bilje, a rezultati velikog broja predkliničkih i kliničkih istraživanja, ukazuju na važnost poznavanja sastava i farmakoloških svojstava ljekovitih biljaka.³

Tradicija sakupljanja, uzgoja, prerade i upotreba ljekovitog bilja u Hrvatskoj ima bogatu i dugu tradiciju. Uzgaja se i prikuplja oko 170 vrsta ljekovitog i aromatičnoga bilja. Zbog specifičnog geografskog položaja te karakterističnih ekoloških, klimatskih i geomorfoloških uvjeta, Hrvatska ima velik broj biljnih vrsta i podvrsta ljekovitog bilja, te značajan broj endema.² Zbog ograničenih podataka o genskoj varijabilnosti vrsta česta su i pogrešna svrstavanja biljaka u zajedničke ili zasebne vrste i podvrste, a sve su dostupne *on-line* u kompletnoj bazi Flore Hrvatskog područja - *Flora Croatica Database*.² Baza daje cjelokupan popis biljnih vrsta na području Republike Hrvatske s podacima o njihovoj taksonomskoj pripadnosti, rasprostranjenosti i uporabi. Oko 735 različitih vrsta koristi se u tradicionalnoj (narodnoj) medicini i to za poboljšanje probave i smetnji mokraćnog i reproduktivnog sustava, liječenje infekcija, bolesti kože, respiratornih smetnji, ozljeda i sl.

Biljke koje se koriste u tradicionalnoj medicini najčešće pripadaju porodicama Rosaceae (54 vrste), Asteraceae (52 vrste), Lamiaceae (49 vrste), Apiaceae (36 vrsta), Ranunculaceae (34 vrsta), Fabaceae (33 vrste) i Brassicaceae (31 vrsta). U navedene porodice ubraja se 40% svih medicinskih biljaka u Hrvatskoj, no znanstveni podatci o njihovoj biološkoj aktivnosti i sastavu fitokemikalija slabo su dostupni.²

2.2. Kadulja

Vrsta kadulje ili žalfije (*Salvia officinalis* L) je trajni grm iz roda *Salviae*, porodice *Lamiaceae* – usnače. Ova izvorno mediteranska biljka, uspijeva u cijeloj Europi od Engleske i Španjolske pa do Turske, te u Aziji i sjevernoj Americi. Kadulja raste u mediteranskom području na kamenjarima, većinom na vapnenastom tlu, te sunčanim položajima i zalazi duboko u unutrašnjost kontinentalnog područja (Slika 1).



Slika 1. Rasprostranjenost kadulje u Hrvatskoj

Kadulja se smatra jednom od najvažnijih biljaka.^{1,2} Ime joj potječe od lat. riječi "*salvere*" što znači "biti dobroga zdravlja" i "biti spašen". Postoji preko 500 vrsta kadulje, u Hrvatskoj raste nekoliko vrsta, od kojih je najvažnija i najljekovitija mediteranska kadulja *Salvia officinalis* L.³

Kadulja raste kao zbijen, razgranat, 30 do 40 cm visoki samonikli grm na suhom, kamenitom tlu u priobalju ili se uzgaja. Vrlo je otporna na sušu. Mlada kadulja ima zeljastu stabljiku, koja kasnije pri dnu odrveni. Mladi izdanci su svijetlozeleni do ljubičasti, prekriveni rjeđim ili gušćim sivobijelim dlačicama. Listovi su svijetli, s obje strane obrasli dlačicama, jajasto do izduženo kopljastog oblika (Slika 2).



Slika 2. Kadulja (*Salvia officinalis* L)

Tamnomodro-ljubičasti cvjetovi tvore na vrhovima stabljike klasaste pršljenove. Cijela biljka ima jak, aromatičan miris, koji se ne gubi sušenjem. Koriste se list (folium) i cvijet (flos). Lišće (folia) se bere prije njegove cvatnje, u travnju i za vrijeme cvatnje u lipnju kad je najljekovitiji, a cvjetovi u svibnju i lipnju. Suši se na toplom i prozračnom mjestu. Glavni ljekoviti sastojak lista kadulje je hlapljivo mirisno eterično ulje s udjelom cineola od 1,5 do 2,5 %. Cineol uz mnogobrojne dlačice sprječava isparavanje vode, zbog čega je kadulja otporna i na najveće suše. Osim cineola, ulje kadulje sadrži humulen, kariofilen i borneol, te u manjoj mjeri kamfor i ružmarinsku kiselinu, fitoestrogene, razne tanine i flavonoide. Ulje kadulje djeluje antiseptički, pa se čaj koristi za ispiranje upaljenog grla i desni.^{1,2} Osim antibakterijskog, ima i antifungalno, antioksidacijsko i antivirusno djelovanje, pospješuje želučanu sekreciju i smanjuje znojenje.^{1,2} toksičnih ketonskih spojeva koje sadrži (tujon, kamfor), kadulja se ne smije koristiti u većim količinama i treba se koristiti s oprezom.^{1,2} Ljuta je i gorka okusa zbog tanina koji uvelike doprinose ljekovitosti lista. Kadulja sadrži vitamine A i C, vitamine B kompleksa, te znatne količine kalcija, kalija i natrija. Cijenjena je i kao začim jelima, osobito mediteranske kuhinje.

2.3. Dubaćac

Rod dubaćac (*Teucrium*) obuhvaća oko 200 biljnih vrsta rasprostranjenih većinom na sjevernoj hemisferi. U mediteranskom području registrirano je oko 140 vrsta.¹ Vrste roda *Teucrium* trajne su zeljaste biljke ili polugrmovi, često veoma aromatični. Neke od njih koriste se u narodnoj medicini za opuštanje mišića, kao diuretik, antidijabetik, analgetik, antireumatik, antiseptik, antipiretik, stimulans, protiv upala, kao i u liječenju probavnih tegoba.¹ Kremer i sur. navode osam vrsta roda *Teucrium* rasprostranjenih u Hrvatskoj i pet vrsta u Bosni i Hercegovini.¹

Dubčac (*Teucrium montanum* L) ili trava iva je višegodišnja polugranasta biljka visine 10 do 30 cm. Stabljike su pretežno uzdignute i djelimično drvenaste. Listovi su bez peteljke, dlakavi samo sa naličja, zeleni i sivobijeli. Cvjetovi se nalaze na vrhovima grančica (Slika 1).



Slika 1. Dubačac ili trava iva (*Teucrium montanum* L)

Dubačac ili trava iva pripada u najvažnije lijekovito i aromatično bilje u Hrvatskoj. Poznata je kao vrlo ljekovita biljka još iz davnina, pa je u narodu ostala uzrečica: “*Trava iva od mrtva pravi živa*”. Okus je vrlo gorak, opor i aromatičan s prepoznatljivim intenzivnim mirisom. Raste na suhim, toplim i krševitim mjestima, na nadmorskim visinama od oko 800 m i višim, uglavnom na južnim obroncima. Za vrijeme cvatnje sakuplja se nadzemni dio biljke bez korijena. Prilikom branja, režu se lisnati cvjetni vrhovi grančica, a zatim suše na prozračnom mjestu u hladu. Sadrži eterično ulje, tanin, kolin, glikozide i različite tvari koje joj daju gorak okus.

Dubačac ima antiseptičko djelovanje. Blagotvorno djeluje na crijeva i želudac i koristi se u mnogim pripravcima pri liječenju oboljenja probavnih i dišnih organa. Upotrebljava se, protiv groznica, pri liječenju šećerne bolesti, bolesti jetre i gušterače.

2.4. Mikro- i makroelementi u ljekovitom bilju

Elementni sastav ljekovitog bilja važan je ne samo zbog prehrambenih razloga već i zbog toksikoloških aspekata. Na sadržaj ljekovitog bilja, pa tako i elementni sastav, utječu klimatski uvjeti i vrsta tla određenog područja te sposobnost biljke za akumulaciju određenih elemenata. Biljke dobivaju elemente većinom iz tla kroz korijen ili iz zraka preko lista.¹²

Bioraspoloživost elemenata ovisi o njihovoj kemijskoj vezi s ostalim sastojcima tla. Do onečišćenja ljekovitog bilja najčešće dolazi iz tla za vrijeme rasta biljke ali i u kasnijem procesu obrade. Određivanjem udjela metala u biljci može se pratiti onečišćenje okoliša teškim metalima, olovom, kadmijem, aluminijem, živom i kromom. U dokumentu *European Pharmacopoeia* dane su najveće dopuštene koncentracije toksičnih elemenata u ljekovitom bilju 5 mg kg^{-1} za olovo, $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ za kadmij i $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ za živu.¹²

Elementi su u biljkama najčešće prisutni kao soli organskih i anorganskih kiselina ili u obliku kompleksnih organometalnih spojeva (najčešće s klorofilom ili lecitinom). Neki elementi su neophodni za biljke, imaju različite uloge u fiziološkim procesima biljaka koji jako ovise o njihovoj koncentraciji, pa u visokim koncentracijama mogu imati štetne učinke. Biljke ponekad sadrže i velike koncentracije neesencijalnih elemenata od kojih neki mogu biti toksični (Al, Ni i Se).

Kemijski elementi ulaze u sastav našeg organizma i u organizmu se nalaze u vrlo malim količinama. Iako čine svega 4–6 % tjelesne mase, neophodni za normalno odvijanje metaboličkih procesa, a njihov manjak dovodi do poremećaja u organizmu. Elementi nakon apsorpcije ulaze u sastav stanica, enzima, hormona, mišića, krvi i kostiju. Nužni su za održavanje optimalne koncentracije tekućine u organizmu. Svakodnevno se znojenjem i probavom izlučuju iz organizma te ih je potrebno nadoknaditi. Elemente dijelimo u dvije skupine: makroelementi koje trebamo u većim količinama (natrij, kalij, kalcij, magnezij, fosfor, klor i sumpor) i mikroelementi ili minerali u tragovima (cink, željezo, fluor, bakar, mangan, krom, selen, jod, molibden, bor) koji su nam potrebni u količinama manjim od 100 mg na dan.¹² Također, potvrđena je važnost u prehrani nikla, kositra, vanadija, a još uvijek se istražuje uloga aluminijskog oksida, arsena, barija, bizmuta, broma, kadmija, germanija, zlata, olova, litija, žive, rubidija, srebra, stroncija, titana i cirkonija.¹

Zbog svoje važnosti u ljudskoj prehrani koncentracije za unos i korisnih i štetnih elemenata dobro su opisane i dane u nekoliko važnih dokumenata. Referentne vrijednosti

pojedinih elemenata preporuča Američka agencija za zaštitu okoliša (engl. *The US Environmental Protection Agency*), a preporučene dnevne količine elemenata objavile su Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *The US Food and Drug Administration*) i dr. Preporučena dnevna količina elemenata (eng. *Recommended Daily or Dietary Amount or Allowance*, RDA) je prosječna preporučena dnevna količina pojedinih elemenata za unos utemeljena na studijama različitih znanstvenih i stručnih časopisa. Ukoliko za unos pojedinog elementa nema dostatnih znanstvenih podataka, koristi se odgovarajući unos elemenata (engl. *Adequate intake*, AI) i vrijednosti za prosječni dnevni unos (engl. *Average daily dietary intake*, ADDIs).¹ U Tablici 1 prikazane su preporučene količine toksičnih i esencijalnih elemenata koje je potrebno dnevno unositi u tijelo (RDA) te odgovarajući unos elemenata (AI).

Tablica 1. Preporučene dnevne količine (RDA) za unos pojedinih elemenata¹

ELEMENT	Muškarci	Muškarci	Žene	Žene
	19-50 god	>50 god	19-50 god	>50 god
Ca	1000 mg	1200 mg	1000 mg	1200 mg
Cr	35 µg	30 µg	25 µg	20 µg
Cu	900 µg	900 µg	900 µg	900 µg
Fe	8 mg	8 mg	18 mg	8 mg
Mg	400 mg	420 mg	310 mg	320 mg
Mn	2,3 mg	2,3 mg	1,8 mg	1,8 mg
Mo	45 µg	45 µg	45 µg	45 µg
Zn	11 mg	11 mg	8 mg	8 mg
K	4,7 g	4,7 g	4,7 g	4,7 g
Na	1,5 g	1,3 g	1,5 g	1,3 g

Kalijevi ioni važni su za niz fizioloških funkcija u organizmu, kao što su prijenos živčanih impulsa, mišićnih kontrakcija, kontrola krvnog tlaka, aktivacija nekih hormona, razvoja embrija, dioba stanica i drugo, te zajedno s natrijem sudjeluje u regulaciji kiselo-bazne ravnoteže. Natrij je najvažniji izvanstanični kation, jer utječe na količinu vode u stanici i regulira razinu izvanstanične tekućine u tijelu. Bez natrija nema ulaska hranjivih tvari (npr. glukoze) u stanicu i nema rada srčane pumpe. Kalcij je rasprostranjen element u prirodi, a ljudskom tijelu je potreban kao dio strukture u kostima, pri djelovanju enzima (zgrušavanje krvi) i hormona, prijenosa impulsa, mišićne kontrakcije, regulacije srčanih otkucaja,

kontrakcije krvnih žila kao i u mnogim drugim fiziološkim funkcijama.¹ Najzastupljeniji je u tijelu (1,5 - 2,0 % tjelesne težine), a većina se nalazi u kostima i zubima.^{14,15}

Magnezij je široko rasprostranjen mineral u prirodi, a četvrti je najzastupljeniji element u ljudskom tijelu. Gotovo polovica magnezija u tijelu je u kostima, ostatak u tkivima i organima, a samo 1 % u krvi. Magnezij je uključen u približno 300 procesa u ljudskom organizmu poput kontrakcije i opuštanja mišića, proizvodnje energije te funkcije enzima.

Mikroelementi i elementi u tragovima u biljkama povezani su s makromolekularnim spojevima kao što su proteini, lipidi i ugljikohidrati te njihovi učinci na organizam mogu biti značajno različiti.¹⁴ Većina od njih poput Cu i Zn neophodni su i vrlo važani za normalan metabolizam, rast i razvoj.¹⁴ Njihov nedostatak prouzroči poremećaje u cijelom fiziološkom sustavu. Željezo sudjeluje u svim staničnim procesima uključujući: disanje, redoks procese, energiju metabolizma, DNK sintezu i regulaciju gena.¹⁴

Mangan je važan za kosti, hrskavice i vezivo tkiva, u sintezi proteina, zgrušavanju krvi, pretvorbi energije iz hrane, metabolizmu glukoze, djelovanju vitamina B1 a djeluje kao antioksidans te je povezan s funkcijom RNA. U tijelu ga ima oko 12 mg, najviše u krvi i kostima.¹⁴ Aluminij stimulira rast i razvoj tkiva - kosti, vezivnog i epitela; pridonosi procesima oporavka i regeneracije; utječe na aktivnost enzima i probavnih žlijezda. Pored male akutne otrovnosti, utjecaj aluminija na zdravlje ljudi važan je zbog njegove masovne uporabe. U tijelu aluminij se nalazi u različitim količinama, a najviše se akumulira u jetri, kostima i mozgu.³¹

2.5. Metode atomske spektrometrije za određivanje elemenata u ljekovitom bilju

Metode atomske spektrometrije se primjenjuju za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elementa. Osnovni cilj ovih metoda je identifikacija elemenata i određivanje njihovih koncentracija u različitim realnim uzorcima. Prednosti tih metoda su brzina, prikladnost, uglavnom visoka selektivnost te umjerene cijene instrumenata.^{1,15} Najčešće metode koje se koriste su atomska apsorpcijska spektrometrija uz grafitnu peć (engl. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, GFAAS)¹⁵., spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *Mass spectroscopy inductively coupled plasma*, ICP-MS) te atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, ICP-AES).^{37,35,36} atomskom apsorpcijskom spektrometrijom uz grafitnu peć provedena je elementna analiza ljekovitih biljaka *Teucrium*

(*Lamiaceae*) koje su dobro rasprostranjene u Hrvatskoj: *T. arduini* L., *T. chamaedrys* L., *T. flavum* L., *T. montanum* L., *T. polium* L. i *T. scordium* L. Od mikroelemenata uzorci *T. montanum* sadrže Cu 44,60-51,20 mg kg⁻¹; Co 3,07-4,31 mg kg⁻¹ i Ni 7,23-9,65 mg kg⁻¹, a u većim koncentracijama određeni su Ca 23,31-26,03 g kg⁻¹, Fe 3,50-4,03 g kg⁻¹, K 3,55-4,36 g kg⁻¹, Mg 3,83-6,75 g kg⁻¹, Mn 0,089-0,121 g kg⁻¹ i Zn 0,09-0,131 g kg⁻¹. Uspoređene su vrijednosti za uzgojene i samonikle biljke. Osim za dubačac (*T. montanum*) u većini uzgojenih biljaka pronađene su veći udio elemenata u usporedbi s udjelom elemenata u samoniklim biljkama.^{37,38}

Arceusz i suradnici su metodom atomske apsorpcijske spektrometrije nakon mikrovalno potpomognutog razaranja sa smjesom HNO₃ i H₂O₂ odredili Mg, Fe i Zn, a K, Na i Ca atomskom emisijskom spektrometrijom. Udio makroelemenata u ljekovitim biljkama botaničke obitelji *Lamiaceae* je u rasponu (u mg g⁻¹): 3,57-35,2 K, 30,7-93,8 Na, 1,16-7,78 Mg i 12,1-34,3 Ca. Od mikroelemenata izmjereno je 35,2-275 mg g⁻¹ Fe i 83,4 mg g⁻¹ Zn.³⁹

Primjer elementne analize s metodom plamenom spektrometrijom je određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji (mg kg⁻¹): 4,9 Cu, 12,6 Zn, 52 Mn, 450 Fe, 0,1 Co, 2,2 Cr, 5,6 Ni, 0,5 Pb.⁴⁰

2.5.1. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) jedna je od najvažnijih instrumentnih metoda atomske spektrometrije za elementnu analizu realnih uzoraka. U usporedbi s plamenom spektrometrijom, ima manje kemijskih interferencija i niske detekcijske granice (µg L⁻¹). Koristi se za kvantitativnu analizu uzoraka biljaka, uključujući ljekovite, začinske i aromatične biljke.⁴¹⁻⁴⁶

Maseni udio mikro- i makroelemenata određen je ICP-AES metodom u 31 ljekovitoj i aromatičnoj biljci uključujući i kadulju (*Salvia aucheri* L i *Salvia fruticosa* L). Za elementnu analizu korišteni su različiti dijelovi biljke: list, cvijet i korijen. U analiziranim uzorcima određeni su: Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, P i Zn, u rasponu masenih udjela: 57,70–2962,74 mg kg⁻¹ Al, 1160,04–16452,88 mg kg⁻¹ Ca, 44,83–1799,5 mg kg⁻¹ Fe, 3570,73–27669,72 mg kg⁻¹ K.

Dobivaju se od biljnih dijelova kao što je list, cvijet ili cijeli nadzemni dio zeljaste biljke. Sastav listića i cvijetova ljekovitog bilja koje se koriste za pripremu čaja je raznolik i najviše ovisi o vrsti čaja. Većina čajeva sadrži flavonole, alkaloidne, proteine i aminokiseline, enzime, tvari koje daju aromu, vitamine i mikro- i makroelemente. Mikro- i makroelementi u

čaju predstavljaju značajan izvor minerala u prehrani, a njihova koncentracija u čaju ovisi o vrsti čaja i načinu pripreve.²⁵ Učinkovitost ekstrakcije elemenata iz čaja ovisi o hidrofilnim svojstvima prisutnih elemenata, duljini miješanja i temperaturi vode. Bioraspoloživost elemenata iz listića čaja ne može se sa sigurnošću utvrditi. Primjerice, na temelju dosadašnjih istraživanja dokazano je da pijenje čaja povećava zalihe elemenata u jetri, poboljšava apsorpciju bakra u crijevima, ali ujedno i inhibira apsorpciju cinka i željeza u crijevima. Čaj sadrži željezo u vrlo malim količinama, a neka istraživanja ukazuju na njegovu smanjenu apsorpciju u crijevima. Slaba bioraspoloživost dokazana je i za aluminij. Navedena slaba apsorpcija željeza i aluminijska povezuje se s polifenolima prisutnim u čaju a koji dobro vežu trovalentne ione metala (Fe^{3+} i Al^{3+}). Nastali kompleksi pokazuju slabu apsorpciju u crijevima.³⁶

Na temelju literaturnih podataka može se zaključiti da postoje razlike u koncentraciji i sastavu mikro- i makroelemenata u čaju, ovisno o vrsti čaja, porijeklu i načinu berbe i pripreve. Od makroelemenata (mg g^{-1}) u čaju ima Ca, Na, K, Mg i Mn, a od mikroelemenata Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn i Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$). Također, dokazana je prisutnost (ng g^{-1}) i elemenata rijetkih zemalja. U listićima čaja nađeno je 350–900 $\mu\text{g g}^{-1}$ mangana, koji je esencijalni element za biljke, mikroorganizme i čovjeka. Preporučeni dnevni unos mangana je 2–5 mg, pa se jednom šalicom čaja može unjeti i do 40 % preporučenog dnevnog unosa mangana.²⁵

Općenito, čaj je dobar izvor K i Na. Najmanji preporučeni unos za K i Na je 2,4 g i 3,5 g. Elementnom analizom metodom ICP-AES u kadulji (*S. aucheri*) određena je koncentracija Cd (16668 mg kg^{-1}), K (13570 mg kg^{-1}), a u pripravcima čaja: Ni ($0,05273 \text{ mg kg}^{-1}$) i K ($196,25 \text{ mg kg}^{-1}$).²²

Basgel i suradnici (2006) priopćili su preporučeni dnevni unos elemenata dobivenih iz čaja za osobu od 70 kg: 500 mg Ca, 300 mg Mg, 15 mg Fe, 5 mg Al, 2,8 mg Mn, 15 mg Zn, 2,5 mg Cu, 1,6 mg Sr, 1,1 mg Ba, 0,025 mg Ni, 0,05–0,2 mg Cr, 0,04 mg Co, 0,415 mg Pb i 0.057 mg Cd.²⁵

Mikro- i makroelementi određeni su metodom s ICP-AES u cijeloj biljci (list i cvijet) i čaju kadulje (*Salvia fruticosa* L.). Koncentracije elemenata su (mg kg^{-1}): Al 547,8 B 46,7 Ba 7,98, Ca 7159,8 Cd 0,41, Co 0,28, Cr 2,77, Cu 2,83, Fe 352,2, K 10965,3, Li 1,68, Mg 2391,0. Najveći udio Ag, B, Cu, Co, Fe, In i Zn u čaju dobiven je nakon 10-minutne ekstrakcije, a nakon 20-minutne ekstrakcije najveća koncentracija Ag, B, Cu, Co, In, Fe i K.²⁵

Osim esencijalnih elemenata važnih u prehrani ljudi u čaju se mogu naći i elementi koji mogu biti štetni za ljudsko zdravlje. U kineskom čaju metodom ICP-AES pronađene su znatne količine Zn, Mn, Ca, Cu, Ni, Al, K, Mg, Cd, Pb, Na, Co i Sc.¹⁵

Na temelju literaturnih podataka izračunati su rasponi udjela metala izmjerenih u različitim vrstama čaja: 0,06–16,82 mg L⁻¹ Al, 1,53 µg L⁻¹ As, 0,79 µg L⁻¹ Cd, dok su koncentracije Cr, Cu, F, Mn, i Ni bile ispod detekcijskih granica: 43,2 µg L⁻¹, 0,02–40,0 mg L⁻¹, 0,2–4,54 mg L⁻¹, 0,1–250 mg L⁻¹ i 0,16 mg L⁻¹.¹⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Dušična kiselina, HNO₃, p.a., Kemika ($w = 65\%$)

Vodikov peroksid, H₂O₂, p.a., Kemika ($w = 30\%$)

Standardna multielementna otopina spektralne čistoće za ICP izvore, 1000 mg L⁻¹, Merck

Standardni referentni uzorak lišća jagoda LGC7162

Standardni referentni uzorak za vodu NIST 1643e (elementi u tragovima u prirodnim vodama)

Standardni referentni uzorak za vodu NIST 1640 (elementi u tragovima u vodama)

Deionizirana voda visoke čistoće, specifičnog otpora $\geq 18\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$

Laboratorijsko posuđe prethodno je očišćeno dušičnom kiselinom (10 % v/v).

3.2. Opis instrumenata

Za elementnu analizu korišten je induktivno spregnuta plazma spektrometar (Prodigy High Dispersive ICP spektrometar). Optimalni uvjeti rada dani su u Tablici 2.

Tablica 2. Optimalni uvjeti rada ICP-AES spektrometra

Instrument	Prodigy High Dispersive ICP
Spektrometar	Ešeletnog tipa
RF-Generator	“free-running” 40 MHz
Protok plina (Argon)	vanjski: 18 L min ⁻¹ pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ za raspršivanje: 1 L min ⁻¹
Plamenik	Fasselov tip, DUAL-VIEW
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska

Tablica 3. Valne duljina određivanja elemenata metodom ICP-AES

Element	Valna duljina određivanja / nm
Al	396,152
B	249,677
Ba	455,403
Ca	393,366
Cd	214,441
Co	228,615
Cr	267,716
Cu	224,700
Fe	238,204
K	769,897
Mg	285,213
Mn	259,372
Na	589,592
Ni	231,604
Pb	220,353
Sr	460,733
Zn	213,856

Za mikrovalno potpomognuto razaranje uzoraka ljekovitog bilja korišten je uređaj *MWS-2 Microwave System Speedweve Berghof* prema programu prikazanom u Tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti mikrovalnog razaranja

	<i>t</i> /min	<i>P</i> / W	<i>T</i>₁ /°C	<i>T</i>₂ /°C	<i>p</i> /bar
1	10	65 %	160	70	100
2	5	75 %	170	70	100
3	15	40 %	190	70	120

3.3. Uzorkovanje

Kadulja (*Salvia officinalis* L) i dubačac (*Teucrium montanum* L) ubrane su ručno u optimalnom vremenu za branje, tijekom svibnja i lipnja 2010. na Velebitu (Veliko Rujno) (N 44,37° - E 15,42°; A 900 m). Ljekovito bilje istog stupnja rasta je osušeno pri sobnoj temperaturi i spremljeno u papirnate vrećice. Prije razaranja biljke su usitnjene u tarioniku i spremljene na suho, hladno i tamno mjesto.

3.4. Postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje kadulje i dubačca

U svim postupcima razaranja korištene su reakcijske posude od teflona. Prije svakog razaranja reakcijska posuda je isprana s HNO₃ (10% v/v). Za mikrovalno potpomognuto razaranje izvagano je 0,25 g biljke (listići i cvjetovi) te su dodane tri različite smjese dušične kiseline i vodikovog peroksida. Smjesa I sadržavala je 5 mL HNO₃ (50:50 v/v) + 1,0 mL H₂O₂ (1 mol L⁻¹), smjesa II 5 mL HNO₃ (25:75 v/v) + 1,0 mL H₂O₂ (1 mol L⁻¹), a smjesa III 5 mL HNO₃ (25:75 v/v) + 1,0 mL H₂O₂ (1 mol L⁻¹). Nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka bistra otopina je kvantitativno prebačena u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjena s ultračistom vodom do oznake. Za isti uzorak postupak je ponovljen najmanje tri puta.

3.5. Postupak za pripremu čaja od kadulje i dubačca

Za pripremu čaja od kadulje i dubačca 0,500 g biljke provedena je s vodom (10 ili 20 mL) pri temperaturi 80, 90 ili 100 °C kroz 1,5; 3; 5 ili 10 minuta. Uzorci su profiltrirani kroz filter papir (*Whatman 541*) i nadopunjeni s ultračistom vodom na 25 mL.

3.6. Statistička analiza

U statističkoj obradi rezultata korišten je statistički program *Statistica*[®] 6.1 (StatSoft[®], Tulsa, SAD). Koncentracije elemenata izražene su kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje.

3.7. Elementna analiza metodom ICP-AES

3.7.1. Priprava kalibracijske krivulje

Standardne otopine pripravljene su razrjeđenjem multielementnog standarda (1000 mg L⁻¹) s HNO₃ (2 % v/v) kako bi se postigle sljedeće koncentracije u mg L⁻¹: 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 15 i 20. Raspon koncentracija je izabran prema očekivanim koncentracijama ispitivanih elemenata u uzorku. Kalibracijska krivulja je rađena prilikom svake analize uzorka, a radni standardi pripravljani su neposredno prije mjerenja. Također,

standardi su mjereni na početku i na kraju mjerenja i periodički za vrijeme duljih serija mjerenja, od manje prema većoj koncentraciji. Slijepi uzorak je pripremljen na podjednaki način kao i uzorci.

3.7.2. Točnost metode

Točnost analitičke metode izražava podudaranje prosjeka dobivenih rezultata s vrijednostima referentnog uzorka (pravom ili stvarnom vrijednošću) dobivenih primjenom analitičkog postupka određeni broj puta, a izražava se kao postotak iskorištenja (eng. *Recovery*). U svrhu procijene točnosti metode određena je iskoristivost metode i iskazana kao udio izmjenog analita prema njegovoj stvarnoj količini u uzorku. Točnost je određena na tri koncentracijske točke unutar radnog područja (1,0, 2,0 i 5,0 mg L⁻¹) uz najmanje tri ponovljena mjerenja svakog uzorka određene koncentracije. Odstupanja od stvarne vrijednosti iskazana su kao postotak iskorištenja (*R*):

$$R = c_{\text{exp}} / c_{\text{std}} \times 100 \%,$$

gdje su c_{exp} i c_{std} izmjerena i stvarna količina analita u uzorku

Točnost mjernog postupka određena je usporedbom rezultata mjerenja sa standardnim referencijskim uzorkom lišća jagoda (LGC7162) pripremljenog na jednak način kao i uzorci ljekovitog bilja uz mikrovalno potpomognuto razaranje s HNO₃ (50:50 v/v) + 1,0 mL H₂O₂ (1 mol L⁻¹).

Ispravnost (točnost) instrumenta određena je sa standardnim referentnim uzorcima NIST 1643e (za elemente u tragovima u prirodnim vodama) i NIST 1640 (za elemente u tragovima u vodama).

Za određivanje točnosti metode elementne analize čaja rezultati analize su uspoređeni s certificiranim vrijednostima koncentracija u standardnim referentnim uzorcima za vodu (NIST 1643e i NIST 1640).

3.7.3. Preciznost metode

Analitička metoda je precizna ukoliko je podudaranje rezultata iz istog homogenog uzorka prema propisanom analitičkom propisu dobro i nema raspršenja oko aritmetičke sredine. Ako se taj postupak ponovi nekoliko puta unutar istog dana, tada govorimo o dnevnoj preciznosti ili preciznosti unutar dana, odnosno ako se postupak ponavlja nekoliko dana

uzastopno tada govorimo o međudnevnoj preciznosti. Preciznost je iskazana kao standardno odstupanje ili relativno standardno odstupanje (RSO%). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost rezultata uz relativno standardno odstupanje (RSO).

3.7.4. Detekcijske granice

Detekcijske granice su najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Baumansovom metodom određene su detekcijske granice metode (LOD, 3σ) za elementnu analizu kadulje i dubačca. Standardni uzorci pripremljeni su razrjeđenjem ishodne otopine standarda s ultračistom vodom i izmjereni su tri puta, a slijepi uzorak deset puta. Za svaki pojedini element izračunato je standardno odstupanje.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija metode ICP-AES za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu

U ovom diplomskom radu opisan je postupak razrade metode za elementnu analizu uzoraka kadulje i dubačca metodom ICP-AES. Optimiziran je postupak pripreve uzorka kadulje i dubačca uz mikrovalno potpomognuto razaranje uz dodatak različitih smjesa reagensa, a rezultati su uspoređeni Studentovim testom. Provedena je elementna analiza pojedinih dijelova ljekovitog bilja (cvijet i list). Metoda ICP-AES za elementnu analizu kadulje i dubačca te njihovog čaja je validirana. Na temelju preciznosti, osjetljivosti, točnosti i detekcijskih granica utvrđeno je da li metoda odgovara za analitičku primjenu. Maseni udjeli elemenata u uzorcima kadulje i dubačca uspoređeni su sa koncentracijama elemenata u čaju i izračunata je učinkovitost ekstrakcije.

4.1.1. Točnost i preciznost metode za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu

Točnost instrumenta (spektrometra za ICP-AES) određena je usporedbom izmjerenih rezultata sa certificiranim vrijednostima istih elemenata standardnih referentnih uzoraka NIST 1643e i NIST 1640 (Tablica 5).

Tablica 5. Koncentracije elemenata izmjerene u standardnim referentnim uzorcima NIST 1643e i NIST 1640 na spektrometru za ICP-AES analizu

Element	NIST 1640 Certificirano	Izmjereno	Mjerna jedinica	NIST 1643e Certificirano	Izmjereno	Mjerna jedinica
Al	0,052	0,0501	μgL^{-1}	0,141	0,138	μgL^{-1}
Ca	7,045	6,98	μgL^{-1}	32,3	33,8	μgL^{-1}
Cd	0,022	0,0212	μgL^{-1}	0,006	0,0071	μgL^{-1}
Co	0,020	0,183	μgL^{-1}	0,027	0,0261	μgL^{-1}
Cr	0,038	0,0394	μgL^{-1}	0,020	0,0187	μgL^{-1}
Cu	0,085	0,0814	μgL^{-1}	0,022	0,0201	μgL^{-1}
Fe	0,034	0,0352	μgL^{-1}	0,098	0,104	μgL^{-1}
K	0,994	1,05	μgL^{-1}	2,034	1,96	μgL^{-1}
Mg	5,819	6,02	μgL^{-1}	8,037	8,23	μgL^{-1}
Mn	0,121	0,119	μgL^{-1}	0,038	0,0372	μgL^{-1}
Na	29,35	27,1	μgL^{-1}	20,74	19,3	μgL^{-1}
Ni	0,027	0,0248	μgL^{-1}	0,062	0,607	μgL^{-1}
P	0,028	0,0274	μgL^{-1}	0,020	0,0186	μgL^{-1}
Sr	0,124	0,123	μgL^{-1}	0,323	0,314	μgL^{-1}
Zn	0,053	0,0547	μgL^{-1}	0,079	0,0823	μgL^{-1}

Usporedbom nađenih i referentnih vrijednosti koncentracija istih elemenata izmjerenih u standardnim referentnim uzorcima NIST 1643e i NIST 1640 (Tablica 6) pri kalibraciji u dva različita dana utvrđeno je da je instrument točan uz relativno standardno odstupanje < 6,1%.

Nakon što je utvrđeno da je instrument točan, određena je točnost same analitičke metode ICP-AES za elementnu analizu kadulje i dubačca. Analitička metoda je točna ukoliko se njome mogu dobiti precizni rezultati bez sustavne pogreške. Točnost, odnosno stupanj podudaranja prosjeka mjerenih rezultata s pravom vrijednošću procjenjena je na temelju iskoristivosti metode i određena pomoću standardnog referentnog uzoraka. Točnost metode određena je usporedbom izmjerenih i certificiranih vrijednosti za standardni referentni uzorak lišća jagoda (LGC7162). Referentni uzorak je pripremljen i analiziran u istim uvjetima kao i uzorci ljekovitog bilja nakon mikrovalno potpomognuto razaranja s HNO_3 (50:50 v/v) (Tablica 6).


Tablica 6. Udjeli elemenata izmjereni u standardnom referentnom uzorku lišća jagoda (LGC7162) metodom ICP-AES nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (50:50 v/v)

Element	Certificirano	Izmjereno	Mjerna jedinica
Al	-	-	-
Ca	15,3	14,9	g kg ⁻¹
Cd	0,17	0,157	μg g ⁻¹
Co	0,47	0,436	μg g ⁻¹
Cr	2,15	2,09	μg g ⁻¹
Cu	-	-	-
Fe	818	842	μg g ⁻¹
K	19,6	17,9	g kg ⁻¹
Mg	3,77	4,01	g kg ⁻¹
Mn	171	165	μg g ⁻¹
Na	-	-	-
Ni	3,6	3,45	μg g ⁻¹
Pb	1,8	1,67	μg g ⁻¹
Sr	64	62,3	μg g ⁻¹
Zn	24	25,1	μg g ⁻¹

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 6 može se zaključiti da se izmjerene koncentracije elemenata slažu s certificiranim vrijednostima koncentracija u standardnom referentnom uzorku.

Dodatkom multielementnog standarda poznate koncentracije određena je iskoristivost metode ICP-AES za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu i iskazana je kao udio izmjenjenog analita prema njegovoj stvarnoj količini u uzorku ljekovitog bilja. U Tablici 7 dane su vrijednosti za iskoristivost metode ICP-AES za pojedinačne elemente iskazane kao udio izmjenjenog analita prema njegovoj stvarnoj količini u mikrovalno potpomognuto razorenim uzorcima kadulje.

Tablica 7. Iskoristivost metode ICP-AES- iskazana kao udio izmjereneog elementa prema njegovoj stvarnoj količini u uzorku kadulje

							
		Kadulja					
		Iskoristivost metode ICP-AES / %					
		list			cvijet		
Element	HNO ₃ (50:50 v/v)	HNO ₃ (25:75 v/v)	HNO ₃ (25:75 v/v)+H ₂ O ₂	HNO ₃ (50:50 v/v)	HNO ₃ (25:75 v/v)	HNO ₃ (25:75 v/v)+H ₂ O ₂	
Al	96,5	101	99,1	104	104	105	
Ca	128	14,3	33,2	101	31	30	
Cd	101	100	101	121	95,1	121	
Co	111	126	109	132	142	127	
Cr	105	120	100	126	136	122	
Cu	109	86,6	101	95,7	101	95,1	
Fe	91,8	110	94,2	105	109	108	
K	89,1	145	101	85,2	97,4	66,2	
Mg	146	106	117	118	89,1	126	
Mn	93,7	98,8	104	97,4	104	99,4	
Na	118	106	119	122	91,7	123	
Ni	109	93,6	112	122	86,5	112	
Pb	94,2	106	94,3	113	123	112	
Sr	125	106	96,5	108	123	113	
Zn	117	111	98,0	105	117	106	
Najmanja vrijednost	89,1	14,3	33,2	85,2	30,6	30,0	
Najveća vrijednost	12,5	144,8	119,1	137,7	147,4	135,6	

Kao što je prikazano u Tablici 7, najbolja iskoristivost metode ICP-AES od 85 do 125 % dobivena je za sve elemente nakon mikrovalno potpomognutog razaranja lista i cvijeta

kadulje s HNO_3 (50:50 v/v). Osim za Cr, Ca, Cd i Co, nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka s razrijeđenom HNO_3 (25:75 v/v) za većinu elemenata dobivena je dobra iskoristivost (medijan 106 %). Sa smjesom III uz dodatak H_2O_2 dobivena manja iskoristivost za Cu, Ca i Mg u lišću, a za Ca, Cd, Co, Cr, K, Mg i Na u cvjetićima kadulje.

U Tablici 8 dane su vrijednosti za iskoristivost metode ICP-AES za pojedinačne elemente iskazane kao udio izmjerenog analita prema njegovoj stvarnoj količini u mikrovalno potpomognuto razorenim uzorcima dubačca.

Tablica 8. Iskoristivost metode ICP-AES iskazana kao udio izmjerenog elementa prema njegovoj stvarnoj količini u uzorcima dubačca

	Dubačac							
	Iskoristivost metode ICP-AES / %							
	cijela biljka			list			cvijet	
	HNO_3 (50:50 v/v)	HNO_3 (25:75 v/v)	$\text{HNO}_3(25:7$ $5 \text{ v/v})+\text{H}_2\text{O}_2$	HNO_3 (50:50 v/v)	HNO_3 (25:75 v/v)	$\text{HNO}_3(25:75$ $v/v)+\text{H}_2\text{O}_2$	HNO_3 (50:50 v/v)	HNO_3 (25:75 v/v)
Al	117	156	118	101	98,2	109	98,0	102
Ca	86,9	106	63,1	107	76,5	95,4	80,2	82
Cd	101	107	108	114	86,7	115	83,1	114
Co	101	106	112	115	107	117	92,4	123
Cr	101	106	109	111	107	91,6	91,1	120
Cu	103	112	132	109	106	117	99,1	131
Fe	116	139	125	92,7	89	109	96,7	106
K	107	114	143	114	128	136	115	118
Mg	128	137	111	120	106	134	130	118
Mn	105	109	111	92,1	87,2	93,2	86,0	97,1
Na	107	106	118	109	108	111	83,1	104
Ni	119	144	138	111	107	91,8	112	121
Pb	105	113	112	104	96,2	106	91,3	112
Sr	101	106	66	88,6	76,1	116	83,3	57,6
Zn	101	106	120	107	84,6	109	89,3	103
Najmanja vrijednost	77	106	13	37	79	76	92	68
Najveća vrijednost	128	156	145	197	160	128	136	130

Najbolja iskoristivost ICP-AES metode od 83 do 130 % dobivena je za sve elemente nakon mikrovalno potpomognutog razaranja lista i cvijeta dubačca s HNO_3 (50:50 v/v). Slabija iskoristivost metode dobivena je nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka s razrijeđenom HNO_3 (25:75 v/v) za Al i Ca ili smjesom III razrijeđene HNO_3 (25:75 v/v) uz dodatak H_2O_2 za Ca i Sr u cijeloj biljci 63 % i 66 %, te u cvijetu 80 % i 57 %. Osim za

navedene elemente, za većinu ostalih elementa s razrijeđenom dušičnom kiselinom (25:75 v/v) dobivena je dobra iskoristivost metode s medijanom od 116%.

Na temelju točnosti metode zaključeno je da ne postoji sustavna pogreška pri elementnoj analizi metodom ICP-AES nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (50:50 v/v) te je navedena smjesa I je odbrana za daljnju pripravu uzorka ljekovitog bilja.

Za sve elemente u uzorcima kadulje i dubačca preciznost metode iskazana je relativnim standardnim odstupanjem RSO %, kojim je dano prosječno odstupanje rezultata oko granične vrijednosti. Preciznost metode unutar dana za sve elemente u uzorcima lista i cvijeta te cijele kadulje i dubačca je u rasponu od 0,6 do 5,2 %. Male vrijednosti relativnog standardnog odstupanja upućuju na dobru preciznost mjernog postupka bez slučajne pogreške.

Replikabilnost metode (međudnevna preciznost) podrazumjeva podudaranje rezultata u identičnim uvjetima. Za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu metodom ICP-AES međudnevna preciznost određena je kako bi se utvrdila varijabilnost rezultata elementne analize uzoraka unutar laboratorija za dva različita dana. Međudnevna preciznost metode za elementnu analizu kadulje i dubačca iznosila je manje od 2,2 %.

Promjena u koncentraciji elemenata nije uočena niti nakon duljeg vremenskog razdoblja pa se može zaključiti da su svi parametri optimiranja uvjeta mikrovalno potpomognutog razaranja i mjerenja ICP-AES za navedene uzorke prije mjerenja bili dobro izabrani.

4.1.2. Detekcijske granice elemenata metodom ICP-AES za kadulju i dubačac

Detekcijske granice (engl. *Limit of Detection*, LOD) je najmanja količina analita koja se u ispitivanom uzorku može kvantitativno odrediti. Mjerenja su provedena aksijalnom orijentacijom plazme kojom se postižu bolje detekcijske granice u usporedbi s radijalnom orijentacijom. Aksijalna orijentacija se koristi za istovremeno određivanje većeg broja elemenata,²³ a za pojedine elemente prisutne u malim koncentracijama u uzorcima kao što su dubačac i kadulja niže detekcijske granice (bolja osjetljivost) mogu se postići radijalnom orijentacijom. Osjetljivost metode za rutinske analize procijenjena je na temelju određivanja detekcijskih granica za svaki pojedinačni element prema Boumansovoj metodi na temelju 3σ opisanoj u poglavlju 3.7.4. Brojčano je detekcijska granica jednaka trostrukom standardnom odstupanju srednje vrijednosti dobivene za slijepu probu.

Metodom ICP-AES određene su detekcijske granice elemenata (LOD, 3σ) za uzorke kadulje i dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja, uz preciznost metode iskazane

kao relativno standardno odstupanje (RSO) za sve elemente u rasponu od 1 do 6 %. Izračunata standardna odstupanja temelje se na mjerenju tri paralelna uzorka. U Tablici 9 prikazane su vrijednosti detekcijskih granica za uzorke kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s različitim smjesama reagensa.

Tablica 9. Detekcije granice (LOD, 3σ) elemenata metodom ICP-AES za uzorke kadulje

Element	Kadulja					
	LOD / $\mu\text{g g}^{-1}$					
	list			cvijet		
	HNO ₃ 50:50 v/v	HNO ₃ 25:75 v/v	HNO ₃ (25:75 v/v)+H ₂ O ₂	HNO ₃ 50:50 v/v	HNO ₃ 25:75 v/v	HNO ₃ (25:75 v/v)+H ₂ O ₂
Al	0,899	0,390	8,32	0,505	0,258	0,259
Ca	0,128	0,128	2,94	0,0964	0,000771	0,00354
Cd	0,0142	0,0109	0,0119	0,153	0,0110	0,0675
Co	0,123	0,0357	0,0778	0,0919	0,0794	0,00737
Cr	0,262	0,0612	0,115	0,286	0,0257	0,0108
Cu	0,256	0,0161	0,444	0,177	0,00580	0,0438
Fe	0,253	0,196	0,0916	0,221	0,0466	0,0342
K	0,468	0,558	3,41	0,392	0,530	0,091
Mg	0,118	1,31	0,889	0,121	0,466	1,28
Mn	0,0840	0,0359	2,97	0,0645	0,00784	0,00783
Na	0,252	0,121	3,14	0,278	0,0213	0,20
Ni	0,337	0,0436	0,0929	0,350	0,0535	0,130
Pb	0,254	0,0908	1,10	0,189	0,254	0,367
Sr	0,163	0,146	0,325	0,217	0,131	0,132
Zn	0,285	0,432	0,0455	0,143	0,0162	0,0513

Detekcije granice elemenata za uzorke cvijeta i lista kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (50:50 v/v) su: $< 2 \mu\text{g g}^{-1}$ za Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Na, Pb, Sr i Zn. Nešto više detekcijske granice izmjerene su nakon mikrovalno potpomognutog razaranja lista kadulje sa smjesom HNO₃ (25:75 v/v) i H₂O₂, za Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb, Sr i Zn, a srednje vrijednosti od 2 do $10 \mu\text{g g}^{-1}$ za Al, Ca, K, Mn i Na. Pri istim uvjetima razaranja cvijeta kadulje uzorka sa smjesom HNO₃ (25:75 v/v) i H₂O₂, za sve ispitivane elemente detekcijske granice su manje od $2 \mu\text{g g}^{-1}$. U Tablici 10 dane su detekcijske granice za elemente u uzorcima dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s različitim smjesama reagensa.

Tablica 10. Detekcije granice (LOD, 3σ) elemenata metodom ICP-AES za uzorke dubačca

Dubačac				
LOD / $\mu\text{g g}^{-1}$				
	list		cvijet	cijela biljka
	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 50:50 v/v
Al	0,836	0,209	1,42	1,02
Ca	0,0851	0,0651	0,0926	0,113
Cd	0,202	0,0252	0,0111	0,0126
Co	0,106	0,0106	0,103	0,0930
Cr	0,176	0,0176	0,0866	0,247
Cu	0,243	0,0543	0,423	0,380
Fe	0,319	0,139	0,517	0,464
K	0,313	0,393	0,416	0,529
Mg	0,0932	0,932	0,0847	0,0928
Mn	0,0759	0,0759	0,151	0,143
Na	0,152	0,251	0,292	0,128
Ni	0,234	0,117	0,408	0,605
Pb	0,543	0,544	0,256	0,718
Sr	0,0547	0,0547	0,329	0,574
Zn	0,108	0,0120	0,128	0,120

Detekcije granice za elemente u uzorcima cvijeta i lista dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 ili smjesom HNO_3 i H_2O_2 su: $< 2 \mu\text{g g}^{-1}$ za sve ispitivane elemente.

Detekcije granice za elemente određene u čaju kadulje i dubačca nakon 10 minuta pripreve čaja dane su u Tablici 11.

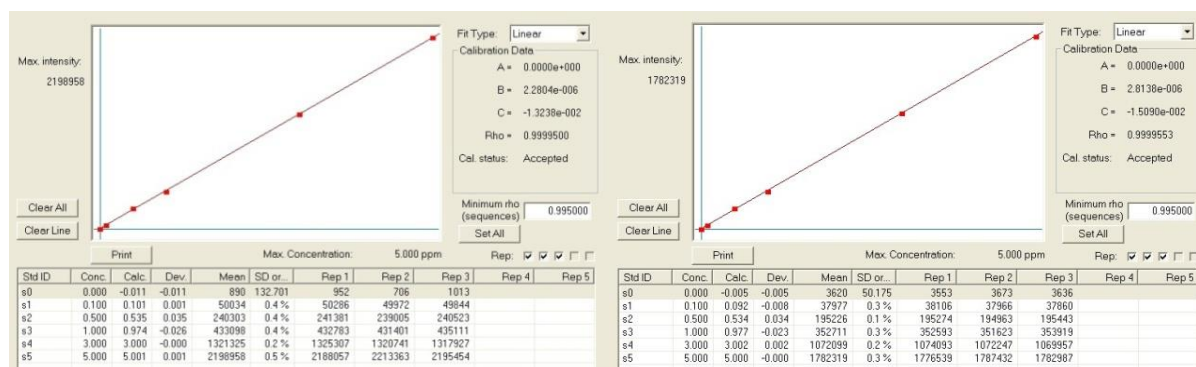
Tablica 11. Detekcije granice (LOD, 3σ) elemenata metodom ICP-AES za uzorke čaja od kadulje i dubačca

Element	LOD / mg L^{-1}				LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$								
	K	Mg	Ca	Na	Zn	Mn	Ni	Fe	Cu	Sr	Pb	Cr	Al
LOD	0,11	0,073	0,064	0,14	0,12	0,062	0,021	0,18	0,06	0,04	0,18	0,11	0,22

Rezultati za LOD u rasponu od $0,073 - 0,14 \text{ mgL}^{-1}$ za makroelemente i $0,021-0,22 \mu\text{gL}^{-1}$ za mikroelemente pokazuju dobru osjetljivost metode za elementnu analizu čaja od kadulje i dubačca.

4.1.3. Osjetljivost metode za elementnu analizu kadulje i dubačca

Osjetljivost metode ICP-AES za uzorke kadulje i dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja sa smjesom I s obzirom na svaki element određena je iz nagiba kalibracijske krivulje. Korelacijski koeficijent za sve kalibracijske krivulje pri svim valnim duljinama određivanja elemenata je veći od 0,9996 i ukazuje na dobru osjetljivost metode ICP-AES. Jednako dobra osjetljivost postignuta je za mikrovalno razorene uzorke ljekovitog bilja i za uzorke čaja nakon ekstrakcije s vodom. Na Slici 4 prikazani su primjeri kalibracijskih krivulja za makro- i mikroelemente prisutne u masenim udjelima reda veličine mg g⁻¹ (Ca) i µg g⁻¹ (Zn).



Slika 4. Kalibracijske krivulje za elemente a) Ca i b) Zn

4.2. Postupak optimiziranja pripreve uzorka kadulje i dubačca za elementnu analizu metodom ICP-AES

U postupku razrade metode za elementnu analizu kadulje i dubačca metodom ICP-AES optimiziran je postupak pripreve uzorka uz mikrovalno potpomognuto razaranje. Nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka samo s razrijeđenom HNO₃ (25:75 v/v) za Al i Ca dobivena je slabija iskoristivost metode (Tablice 7 i 8) pa je radi poboljšanja svojstava razrijeđene dušične kiseline (25:75 v/v) dodan H₂O₂ kao pomoćni oksidans. Dodatkom vodikovog peroksida, odnosno razarnjem uzorka sa smjesom III dobivena je slabija iskoristivost metode za Ca i Sr bez obzira na vrstu uzorka (cvjetići ili listići).

Nadalje, rezultati za sve elemente uspoređeni su Studentovim testom. Pretpostavka da nema značajne razlike između srednjih vrijednosti je ispitana na nivou značajnosti od 0,01. Studentov test korišten je da bi se utvrdilo da li postoje značajne razlike u koncentraciji elemenata za mikrovalno potpomognuto razorene uzorke kadulje i dubačca uz dodatak

dušične kiseline i smjese dušične kiseline i H₂O₂, a rezultati za određivanje mikro- i makroelemenata su prikazani u Tablicama 8 i 9.

Na temelju Studentova testa uz razinu značajnosti od 0,01 uočeno je da nema značajnih razlika u dobivenim koncentracijama za većinu mikro- i makroelementa u uzorcima kadulje i dubačca nakon mikrovalnog razaranja sa smjesama reagensa I-III. Na temelju rezultata može se zaključiti da se osim za Ca, Al i Sr sadržaj analiziranih elemenata ne razlikuje značajno s obzirom na način pripreme uzorka prije ICP-AES određivanja. Na temelju podatka o točnosti određivanja iz iskoristivosti metode zaključeno je da ne postoji sustavna pogreška pri elementnoj analizi metodom ICP-AES nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (50:50 v/v) te je navedena smjesa I je odabrana kao najbolji reagens za pripravu uzorka ljekovitog bilja uz primjenu mikrovalova prije mjerenja metodom ICP-AES.

4.2.1. Elementna analiza kadulje i dubačca metodom ICP-AES




U okviru ovog diplomskog rada provedena je elementna analiza kadulje i dubačca metodom ICP-AES nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka s HNO₃ (50:50 v/v).

Radi nedostupnosti literaturnih podataka za istu vrstu biljke, rezultati su uspoređeni s dostupnom literaturom za elementnu analizu ljekovitog bilja iste botaničke porodice i roda. Primjerice, za usporedbu rezultata elementne analize vrste kadulje *Salvia officinalis* nisu pronađeni podaci te su dobivene vrijednosti uspoređene s literaturnim podacima za uzorke kadulje druge vrste.

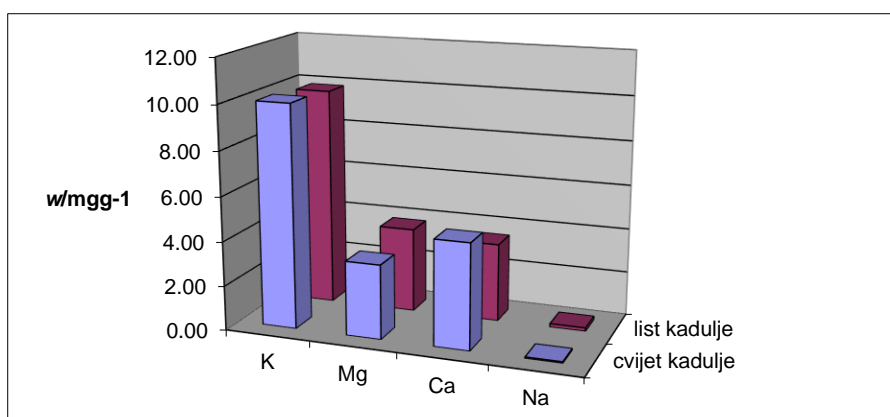
4.2.2. Makroelemenati u kadulji i dubačcu

Maseni udjeli makroelemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO₃ (25:75 v/v) i H₂O₂ prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Maseni udio makroelemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2

		Kadulja					
		w/mg g ⁻¹					
	cijela kadulja 	list 			cvijet 		
reagens	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 (50:50 v/v)	HNO_3 (25:75 v/v)	HNO_3 + H_2O_2 (25:75 v/v)	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 (25:75 v/v)	HNO_3 (25:75 v/v)+ H_2O_2
K	8,42	9,44	9,80	10,3	9,02	9,86	11,2
Mg	3,20	4,01	3,54	3,88	3,02	3,44	3,56
Ca	3,89	3,78	3,14	3,64	4,76	4,67	4,77
Na	0,038	0,091	0,278	0,084	0,056	0,057	0,074

Na Slici 5 prikazan je maseni udio makroelemenata u cvijetu i listu kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v) izračunat prema Tablici 12.



Slika 5. Maseni udio makroelemenata u cvijetu i listu kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v). Maseni udjeli u uzorcima su dani u mg g⁻¹

Prema rezultatima elementne analize najveći udio makroelemenata u listu i cvijetu kadulje čini K zatim Mg, Ca, te Na, s rasponom masenog udjela 8,42–9,44 mg g⁻¹ za K, te 3,02–4,01 mg g⁻¹ za Mg, 3,78–4,76 mg g⁻¹ za Ca i 0,038–0,056 mg g⁻¹ za Na. Srednja

vrijednost masenih udjela je $9,72 \text{ mg g}^{-1}$ K, $3,52 \text{ mg g}^{-1}$ Mg, $4,09 \text{ mg g}^{-1}$ Ca i $0,10 \text{ mg g}^{-1}$ Na. Dobiveni rezultati podjednaki su literaturnim podacima Arceussza i sur. za udjele makroelemenata u uzorcima bilja botaničke obitelji *Lamiaceae* vrste *Salvia folium*.²⁶

U radu Zimne i sur. u listu kadulje određen je podjednak maseni udio Mg ($4,1 \text{ mg g}^{-1}$), nešto veći maseni udio K ($14,9 \text{ mg g}^{-1}$) te niži udio Ca ($10,1 \text{ mg g}^{-1}$) i Na ($0,091 \text{ mg g}^{-1}$).⁴¹ Nešto niži udio Mg i Ca određen je u uzorku cijele kadulje $2,1 \text{ mg g}^{-1}$ i 23 mg g^{-1} .¹⁵ Ozcan i sur. su odredili u listu *Salvia fruticose* i *Salvia aucheri* podjednaki udio K ($6,6 \pm 0,9 \text{ mg g}^{-1}$ i $11,1 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$), veći udio Ca ($6,0 \pm 1,5 \text{ mg g}^{-1}$ i $8,4 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$) i niži udio Na ($2,5 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$ i $2,0 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$) i Mg ($1,7 \pm 0,3$ i $2,5 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$).¹⁶

Maseni udio izmjerenih makroelemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2 prikazan je u Tablici 13.

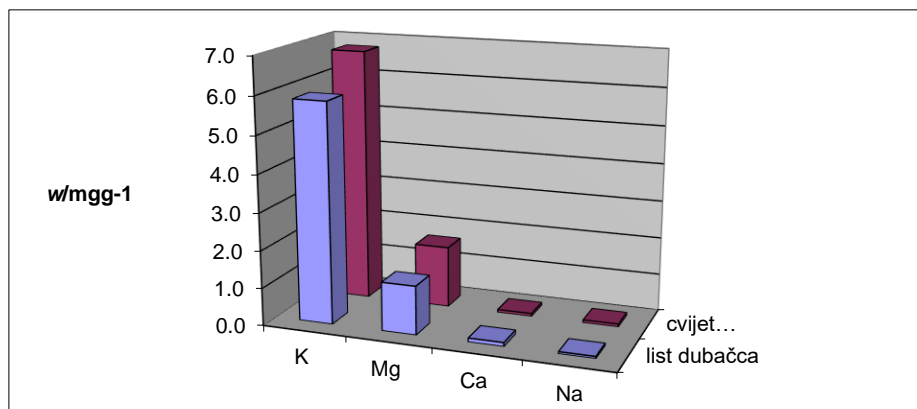
Tablica 13. Maseni udio makroelemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2

		Dubačac								
		w/mg g ⁻¹								
		cijela biljka			list			cvijet		
mg g ⁻¹		50:50 HNO_3 v/v	25:75 HNO_3 v/v	25:75 HNO_3+ H_2O_2	50:50 HNO_3 v/v	25:75 HNO_3 v/v	25:75 HNO_3+ H_2O_2	50:50 HNO_3 v/v	25:75 HNO_3 v/v	25:75 HNO_3+ H_2O_2
K		6,47	6,87	7,09	5,92	5,27	6,36	6,75	8,81	6,36
Mg		1,43	1,496	1,646	1,32	1,11	1,47	1,47	1,98	1,47
Ca		0,058	0,064	0,074	0,066	0,18	0,06	0,081	0,07	0,06
Na		0,018	0,064	0,051	0,054	0,05	0,06	0,030	0,13	0,06

Najveći udio makroelemenata u listu i cvijetu dubačca čini K zatim Mg, Ca, te Na.

U literaturi nisu pronađeni podaci za usporedbu elementnog sastava različitih dijelova dubačca (cvijeta i lista). Usporedbom literaturnih rezultata može se zaključiti da su dobiveni podjednaki udjeli za K ($3,55$ - $4,36 \text{ g kg}^{-1}$), niži za Mg ($3,83$ - $6,75 \text{ g kg}^{-1}$) i Ca ($23,31$ - $26,03 \text{ g kg}^{-1}$). Za Na nisu pronađeni literaturnih podaci za usporedbu.

Maseni udio makroelemenata u listu i cvijetu dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v) izračunatih prema Tablici 13 prikazane su na Slici 6.



Slika 6. Maseni udio makroelemenata u listu i cvijetu dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v). Maseni udjeli u uzorcima su dani u mg g^{-1}

4.2.3. Mikroelemenati u kadulji i dubačcu

Maseni udio mikroelemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja sa smjesama I-III izmjeren je metodom ICP-AES i prikazan je u Tablici 14.

Tablica 14. Maseni udio mikroelemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO₃ (25:75 v/v) i H₂O₂

	Kadulja						
	w/μg g ⁻¹						
	cijela kadulja		list			cvijet	
	HNO ₃ (50:50 v/v)	HNO ₃ 50:50 v/v)	HNO ₃ 25:75 v/v	HNO ₃ 25:75 v/v +H ₂ O ₂	HNO ₃ 50:50 v/v	HNO ₃ 25:75 v/v	HNO ₃ 25:75 v/v +H ₂ O ₂
Al	102,8	134,4	113,6	126,8	57,16	60,03	65,60
Ni	110,7	147,8	125,9	134,3	74,48	84,45	86,94
Fe	96,65	126,2	107,9	116,1	64,03	73,18	75,29
Zn	27,05	39,42	39,12	29,79	27,82	29,48	40,76
Mn	29,66	39,06	31,13	34,31	24,49	26,46	28,30
Cu	7,181	10,46	9,311	10,41	11,44	12,26	13,68
Sr	7,810	9,25	8,172	9,42	5,768	6,764	7,379

Udjeli Co su ispod detekcijskih granica u svim ispitivanim uzorcima cijele kadulje i cvijetovima kadulje (LOD: 0,123 i 0,0919 μg g⁻¹) te Cr u cijeloj kadulji (LOD: 0.262 μg g⁻¹).

Radi lakše usporedbe rezultata s literaturnim podacima izračunate su srednje vrijednosti udjela elemenata. Srednje vrijednost udjela mikroelemenata u cvijetu i listu, te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ su: 94,34 μg g⁻¹ Al, 109,22 μg g⁻¹ Ni, 94,19 μg g⁻¹ Fe, 33,35 μg g⁻¹ Zn, 30,49 μg g⁻¹ Mn, 10,68 μg g⁻¹ Cu i 7,79 μg g⁻¹ Sr.

Za mikroelemenata u cvijetu kadulje vrste *Salvia officinalis* nisu pronađeni literaturni podaci. Od ljekovitih biljaka iz porodice Lamiaceae roda *Salvia* uz vrstu *Salvia officinalis* istraženu u okviru ovog rada, najčešće su istražene i vrste kadulje koje se koriste u ljekovite svrhe *S. fruticosa*, *S. Aucheri*, te muškatna kadulja (*Salvia sclarea*). Usporedbom rezultata dobivenih u okviru ovog rada i literaturnog podataka za list kadulje može se zaključiti da je dobiven podjednak udio Fe (98,8±3,62 μg g⁻¹).¹⁶ Literaturni rezultati za maseni udio Fe razlikuju se ovisno o vrsti unutar porodice Lamiaceae. Maseni udio Fe (96,65 μg g⁻¹) za cijelu kadulju usporediv je s literaturnim podatkom Arceusza i sur.²⁶ za udio Fe u ljekovitim biljkama iz botaničke porodice Lamiaceae (32,5-275 μg g⁻¹), ali je manji u usporedbi s literaturnim podacima Basgela i sur.¹⁵ u kadulji iste vrste *Salvia officinalis* koji su odredili

udio Fe $267,4 \mu\text{g g}^{-1}$. Stef i sur.²⁷ su u vrsti *Salvia officinalis* odredili puno veći udio Fe ($450 \mu\text{g g}^{-1}$). U listu kadulje vrste *S. fruticase* udio Fe iznosio je $330,44 \pm 19,88 \mu\text{g g}^{-1}$,¹⁶ a u muškatnoj kadulji vrste *Salvia sclarea* $289,3 \pm 23 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶

Maseni udio Zn u cijeloj kadulji ($27,05 \mu\text{g g}^{-1}$) manji je od rezultata Basgel i sur.¹⁶ ($48,4 \mu\text{g g}^{-1}$), ali veći od rezultata Stefa i sur.²⁷ ($12,6 \mu\text{g g}^{-1}$). Manji udio Zn izmjeren je u cijeloj muškatnoj kadulji vrste *Salvia sclarea* $19,2 \pm 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶ U listu kadulje udio Zn ($9,4 \mu\text{g g}^{-1}$) je također manji od literaturnih podataka $145 \mu\text{g g}^{-1}$. U listu kadulje vrste *S. fruticase* udio Zn iznosio je $18,68 \pm 2,67 \mu\text{g g}^{-1}$,¹⁶ u *S. Aucheri* $16,58 \pm 2,68 \mu\text{g g}^{-1}$.¹⁶

U usporedbi s literaturnim podacima izmjeren udio Cu $7,18 \mu\text{g g}^{-1}$ u cijeloj kadulji je manji $35,8 \pm 4,2 \mu\text{g g}^{-1}$,¹⁵ odnosno veći $4,9 \mu\text{g g}^{-1}$ od literaturnih podataka.²⁷ U listu kadulje udio Cu je podjednak literaturnom podatku $6,9 \mu\text{g g}^{-1}$,⁴⁰ te u cijeloj biljci muškatne kadulje vrste *Salvia sclarea* $7,1 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶ U listu kadulje maseni udio vrste *S. fruticase* udio Cu iznosio je $0,27 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$, a u *S. Aucheri* $3,11 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1}$.¹⁶

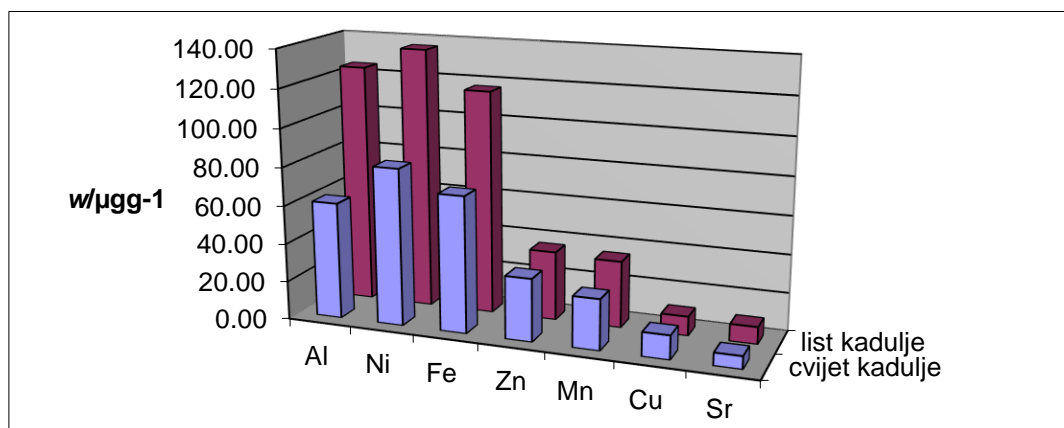
Rezultati dobiveni za Al u listu ($134,4 \mu\text{g g}^{-1}$) i cijeloj kadulji ($102,7 \mu\text{g g}^{-1}$) manji su od masenih udjela danih u literaturi. U cijeloj biljci kadulje iste vrste *Salvia officinalis* izmjeren je nešto veći udio Al ($178 \pm 12,0 \mu\text{g g}^{-1}$), također i u cijeloj biljci muškatne kadulje vrste *Salvia sclarea* $174,2 \pm 5,6 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶ U listu drugih vrsta ljekovitih kadulja udio Al je znatno veći: u vrsti *S. fruticase* udio Al iznosio je $547,8 \pm 162,8 \mu\text{g g}^{-1}$, a u *S. Aucheri* $200,48 \pm 28,74 \mu\text{g g}^{-1}$.¹⁶

Udio Mn ($29,6 \mu\text{g g}^{-1}$) u cijeloj kadulji je manji u usporedbi s rezultatom Basgela i sur.¹⁵ $32,6 \pm 3,15 \mu\text{g g}^{-1}$ i Stefa i sur.²⁷ $52 \mu\text{g g}^{-1}$. U listu kadulje vrste *S. fruticase* udio Mn iznosilo je $21,16 \pm 3,32 \mu\text{g g}^{-1}$, a u vrsti *S. Aucheri* $6,47 \pm 0,52 \mu\text{g g}^{-1}$,¹⁶ te u cijeloj muškatnoj kadulji (*Salvia sclarea* L) $14,2 \pm 0,56 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶

Rezultati dobiveni za maseni udio Sr u svim uzorcima kadulje niži su u usporedbi s literaturnim podacima. U cijeloj biljci vrste *Salvia officinalis* određeno je $17,5 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$,¹⁵ dok je u ostalim vrstama kadulje izmjereno $19,03 \pm 3,46 \mu\text{g g}^{-1}$ (*S. Aucheri*) te $15,93 \pm 0,52 \mu\text{g g}^{-1}$ (*S. fruticase*)¹⁶.

Maseni udio Ni u listu i cijeloj kadulji značajno je veći u usporedbi s udjelom u cijeloj kadulji izmjerenim od Basgela i sur. ($2,90 \pm 0,09 \mu\text{g g}^{-1}$)¹⁵ te Stefa i sur. ($5,6 \mu\text{g g}^{-1}$)²⁷. Niži udjeli Ni izmjereni su i ostalim vrstama kadulje. U listu kadulje vrste *S. Aucheri* udio Ni je $3,30 \pm 0,27 \mu\text{g g}^{-1}$, u *S. fruticase* $4,69 \pm 0,90 \mu\text{g g}^{-1}$,¹⁵ dok je u cijeloj muškatnoj kadulji (*Salvia sclarea* L) izmjereno Ni $1,30 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$.³⁶

Udio mikroelemenata u listu i cvijetu kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v) izračunatih prema Tablici 14 uspoređene su na Slici 7.



Slika 7. Maseni udio mikroelemenata u cvijetu i listu kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v). Maseni udjeli u uzorcima su dani u $\mu\text{g g}^{-1}$

Udio mikroelemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2 izmjerene su metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) i prikazane su u Tablici 15.

Tablica 15. Maseni udio mikroelemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2

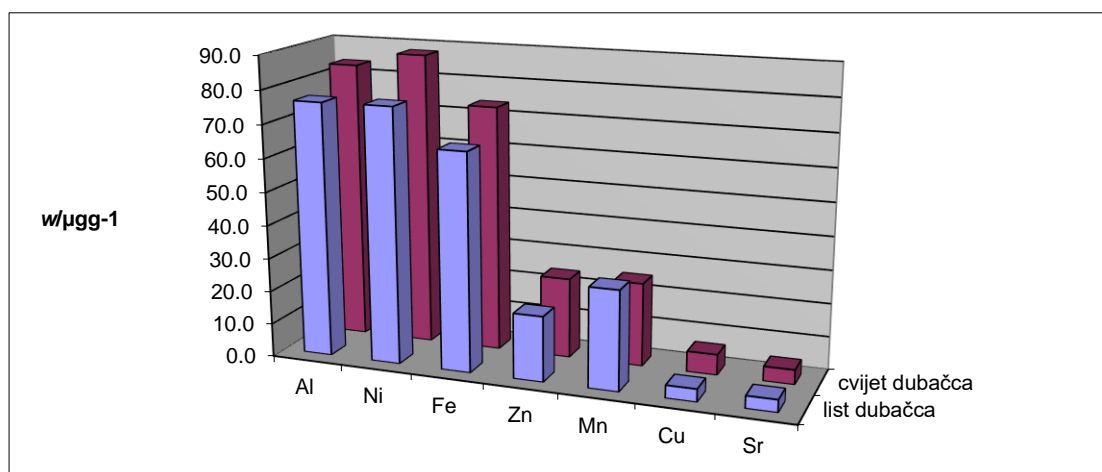
	Dubačac								
	$w/\mu\text{g g}^{-1}$								
	cijela biljka			list			cvijet		
	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 + H_2O_2 25:75	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 + H_2O_2 25:75	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 + H_2O_2 25:75
Al	133,1	116,2	147,2	85,6	58,8	84,5	62,6	103,9	84,5
Ni	124,5	112,2	133,5	81,6	58,5	89,4	71,5	102,5	89,4
Fe	107,3	96,8	116,2	69,8	48,7	77,2	59,9	84,2	77,2
Zn	14,9	19,2	19,7	22,4	17,4	18,8	23,9	29,6	18,8
Mn	25,9	27,2	30,0	32,8	27,9	28,5	21,8	24,9	28,5
Cu	3,60	4,6	4,63	3,67	3,49	4,29	6,72	7,58	4,29
Sr	3,77	4,0	4,10	3,89	3,45	3,82	4,27	5,10	3,82

Srednje vrijednosti koncentracija mikroelemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 su: $97,38 \mu\text{g g}^{-1}$ Al, $95,90 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni, $81,92 \mu\text{g g}^{-1}$ Fe, $20,52 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn, $27,50 \mu\text{g g}^{-1}$ Mn, $4,76 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu i $4,02 \mu\text{g g}^{-1}$ Sr.

Za udio mikroelemenata u cvijetu i listu dubačca nisu pronađeni literaturni podaci za usporedbu. Na temelju literaturnih podataka u cijelom dubačcu udio Cu iznosi $44,60\text{--}51,20 \mu\text{g g}^{-1}$, u većim udjelima određeni su Fe $350\text{--}403 \mu\text{g g}^{-1}$, Mn $89\text{--}121 \mu\text{g g}^{-1}$, Zn $90\text{--}131 \mu\text{g g}^{-1}$.^{24,25} Udio izmjeren za sve mikroelemente u okviru ovog rada je manji u usporedbi s jedinim literaturnim podatkom za elementnu analizu cijelog dubačca.

Udio Cd u cijelom dubačcu te listićima i cvjetovima dubačca (LOD: $0,0126$, $0,0202$ i $0,011 \mu\text{g g}^{-1}$) bile su ispod detekcijskih granica. Također udio Co u listićima dubačca je manji od detekcijske granice za Co (LOD: $0,106 \mu\text{g g}^{-1}$).

Maseni udio mikroelemenata u listu i cvijetu dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 ($50:50 v/v$) izračunatih prema Tablici 15 uspoređene su na Slici 8.



Slika 8. Maseni udio mikroelemenata u cvijetu i listu dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 ($50:50 v/v$), dani u $\mu\text{g g}^{-1}$

4.2.4. Toksični elementi u kadulji i dubačcu

Maseni udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 ($25:75 v/v$ i $50:50 v/v$) i smjesom HNO_3 ($25:75 v/v$) i H_2O_2 izmjereni su metodom ICP-AES i prikazane su u Tablici 16.

Tablica 16. Maseni udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO₃ (25:75 v/v) i H₂O₂

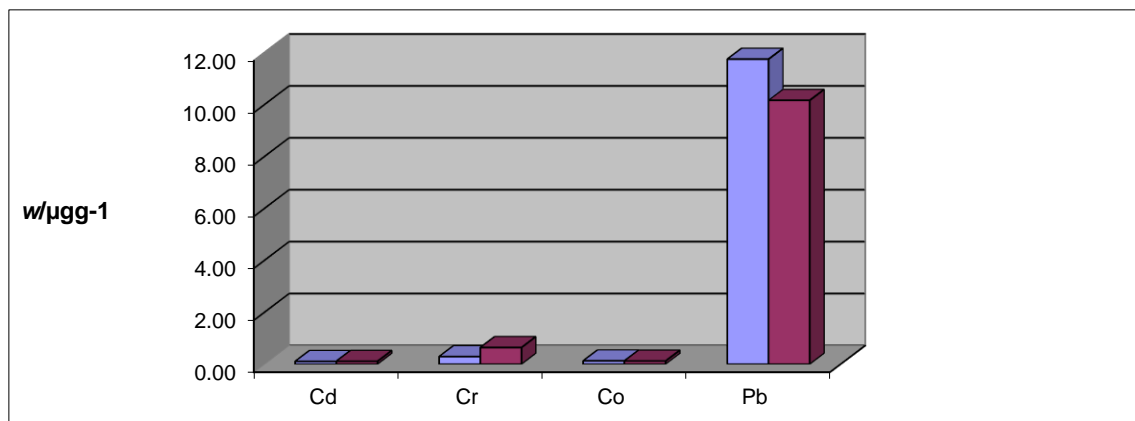
Kadulja							
w/μg g ⁻¹							
	cijela biljka	list			cvijet		
	50:50 HNO ₃ v/v	50:50 HNO ₃ v/v	25:75 HNO ₃ v/v	25:75 HNO ₃ +H ₂ O ₂	50:50 HNO ₃ v/v	25:75 HNO ₃ v/v	25:75 HNO ₃ +H ₂ O ₂
Cd	0,056	0,103	0,064	0,168	0,045	0,028	0,247
Cr	<LOD*	0,855	<LOD*	0,430	0,300	0,282	<LOD*
Co	<LOD*	0,056	<LOD*	0,186	<LOD*	0,010	0,244
Pb	6,53	10,1	8,80	11,5	10,3	11,7	13,2

*<LOD – koncentracija ispod detekcijskih granice

Prema Tablici 16 detekcijske granice Cr i Co nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ su u rasponu od 0,0108- 0,1153 μg g⁻¹ za Cr i 0,00232- 0,09192 μg g⁻¹ za Co. U cijeloj kadulji udio Cr i Co je manji od detekcijskih granica, a izmjereno je 0,0564 μg g⁻¹ Cd i 6,530 μg g⁻¹ Pb. Basgel i sur.¹⁵ te Stef i sur.²⁷ su u cijeloj kadulji (*Salvia officinalis*) odredili manji udio Pb (1,14±0,28 μg g⁻¹) te (0,5 μg g⁻¹), ali veći udio Cr (2,12±0,40 μg g⁻¹) te (2,2 μg g⁻¹) i Co (0,34±0,09 μg g⁻¹) te (0,1 μg g⁻¹).

U listu i cvijetu kadulje udio Cr i Co je ispod detekcijskih granica za mikrovalno potpomognuto razorene uzorke lista s HNO₃ (25:75 v/v) te cvijeta s HNO₃ (50:50 v/v) za Co i s HNO₃ (25:75 HNO₃+H₂O₂) za Cr. U svim uzorcima kadulje udio Cd je u rasponu 0,0280 - 0,2470 μg g⁻¹, Cr 0,283-0,855 μg g⁻¹, Co 0,0103 -0,2438 μg g⁻¹ i Pb 6,530-13,198 μg g⁻¹. U listu kadulje vrste *S. Aucherii* udio Pb je 1,24±0,22 μg g⁻¹, a Cd 0,79±0,44 μg g⁻¹.¹⁵ U listu kadulje vrste *S. fruticase* izmjereno udio Pb iznosio je 0,46±0,14 μg g⁻¹, Cd 0,61±0,10 μg g⁻¹,¹⁵ dok je cijeloj biljci izmjereno Cd 0,41±0,10 μg g⁻¹, Co 0,28±0,21 i Cr 2,77±0,17.¹⁶ U cijeloj muškatoj kadulji (*Salvia sclarea* L) određeno je Pb 1,91±0,13 μg g⁻¹ i Cr 0,31±0,11 μg g⁻¹.³⁶

Na temelju rezultata iz Tablice 16 izračunate su srednje vrijednosti masenih udjela toksičnih elemenata u listu i cvijetu kadulje (Slika 9).



Slika 9. Maseni udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu kadulje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v). Maseni udjeli u uzorcima su dani u $\mu\text{g g}^{-1}$

Udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2 izmjeren je metodom ICP-AES i prikazane su u Tablici 17.

Tablica 17. Udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (25:75 v/v i 50:50 v/v) i smjesom HNO_3 (25:75 v/v) i H_2O_2

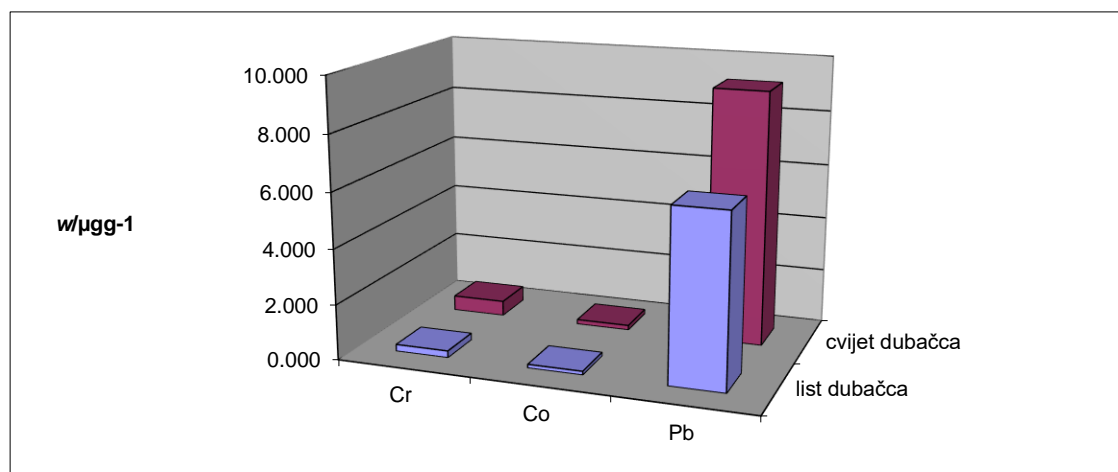
	Dubačac $w/\mu\text{g g}^{-1}$								
	cijela biljka			list			cvijet		
	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 + H_2O_2 25:75	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 + H_2O_2 25:75	HNO_3 50:50 v/v	HNO_3 25:75 v/v	HNO_3 + H_2O_2 25:75
Cd	0,070	0,073	0,089	<LOD*	0,015	0,020	0,012	0,011	0,020
Cr	0,386	0,359	0,330	0,263	0,136	0,339	0,356	0,954	0,339
Co	0,070	0,076	0,106	0,046	0,010	0,132	0,231	0,143	0,132
Pb	6,022	8,207	7,63	6,188	5,681	6,736	9,447	11,3	6,73

*<LOD – udio ispod detekcijskih granice

Maseni udjeli toksičnih elemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 su u rasponu Cd 0,011-0,089 $\mu\text{g g}^{-1}$, Cr 0,136-0,954 $\mu\text{g g}^{-1}$, Co 0,010-0,231 $\mu\text{g g}^{-1}$, Pb 5,681-11,394 $\mu\text{g g}^{-1}$. U literaturi je pronađen podatak

samo za udio Co 3,07-4,31 $\mu\text{g g}^{-1}$ u cijelom dubačcu, dok za ostale toksične elemente nisu nađene vrijednosti za usporedbu.

Na temelju rezultata iz Tablice 17 izračunate su srednje vrijednosti masenih udjela toksičnih elemenata u listu i cvijetu dubačca (Slika 10).

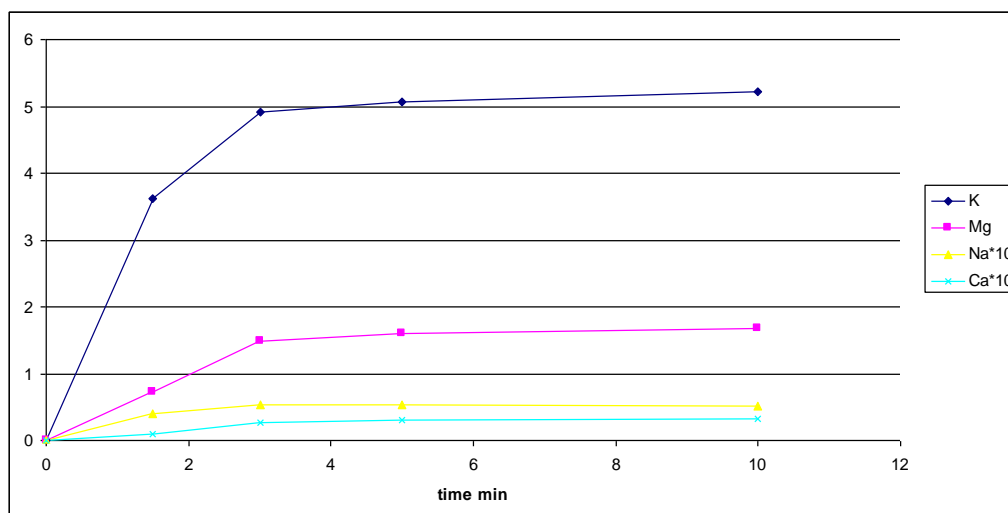


Slika 10. Maseni udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 (50:50 v/v), dane u $\mu\text{g g}^{-1}$

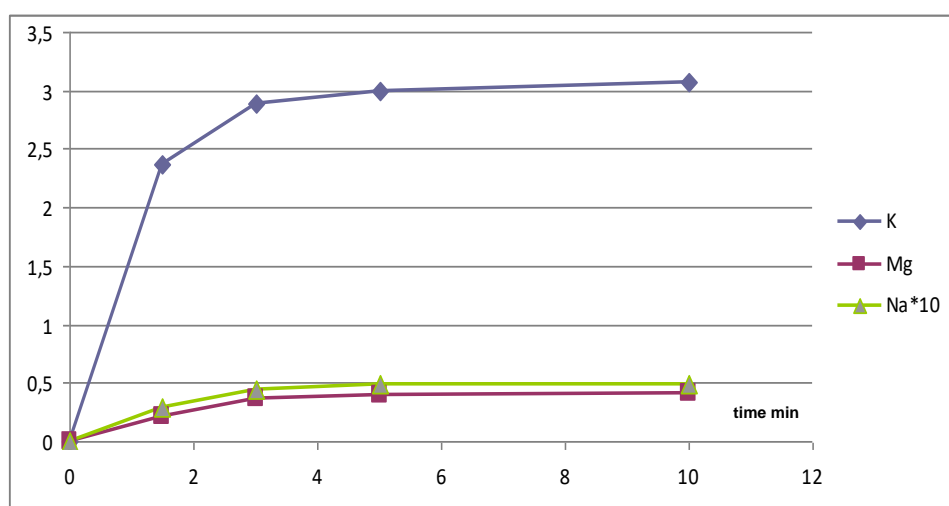
4.3. Ekstrakcija mikro- i makroelemenata iz kadulje i dubačca

Za spektrometrijska mjerenja koncentracije mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu metodom ICP-AES korišteni su ekstrakti biljaka nakon ekstrakcije s vodom zagrijane na 90 °C. U ovom radu korištena je voda kao ekstraktant budući da je čaj najčešći način konzumiranja ljekovitih biljaka. Priprava uzorka opisana je u eksperimentalnom dijelu 3.5. Na temelju rezultata mjerenja izračunata je učinkovitost ekstrakcije. Radi postizanja kvantitativne ekstrakcije, postupak ekstrakcije mikro- i makroelemenata za uzorke kadulje i dubačca je optimiran. Uvjeti ekstrakcije uključivali su: različito vrijeme ekstrakcije (3, 5, 10 i 30 min) i različiti volumen vode (10 i 20 mL) koji su korišteni za čaj.

Ekstrakcija mikro- i makroelemenata iz uzorka kadulje i dubačca s vodom (10 mL) zagrijanom na 90 °C je provedena pri različitim vremenima ekstrakcije (1,5; 3; 5 i 10 minuta). Rezultati su prikazani na Slikama 11 i 12.



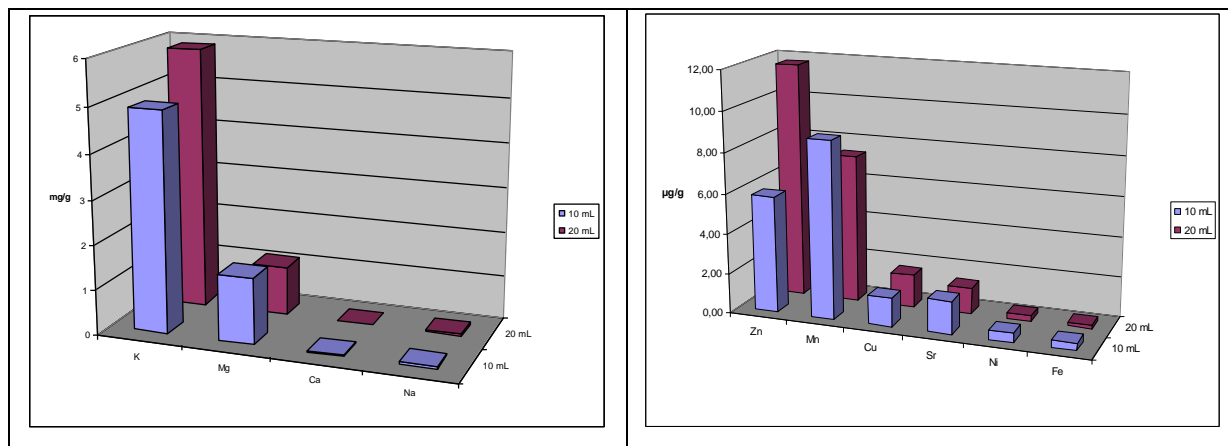
Slika 11. Utjecaj vremena na koncentraciju makroelemenata pri ekstrakciji vodom (zagrijanom na 90 °C) iz kadulje



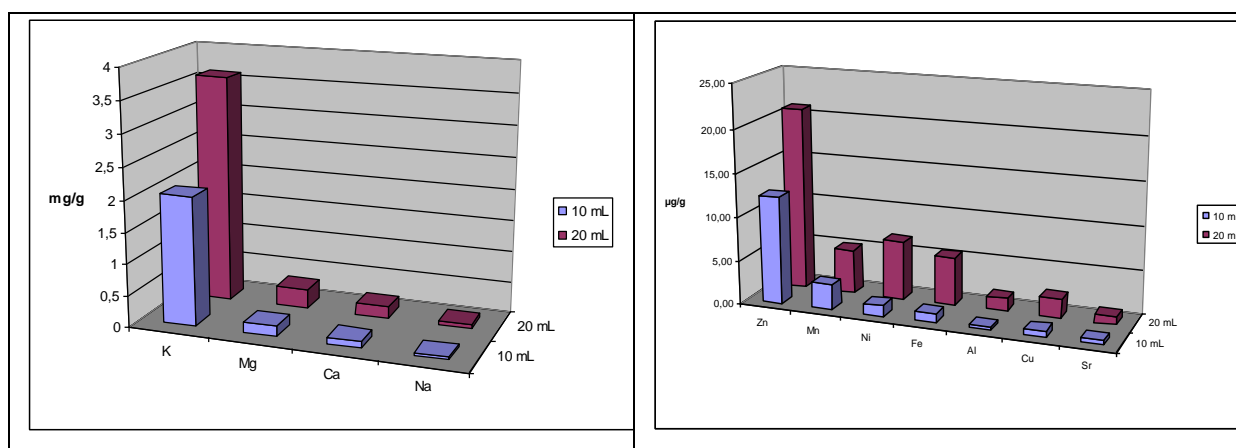
Slika 12. Utjecaj vremena na koncentraciju makroelemenata pri ekstrakciji vodom (zagrijanom na 90 °C) iz dubačca

Na temelju Slika 11 i 12 može se zaključiti da se potpuna i učinkovita ekstrakcija (85-95%) makroelemenata iz kadulje i dubačca postiže već nakon 3 minute ekstrakcije s vodom zagrijanom na 90 °C.

Utjecaj volumena vode zagrijanoj na 90 °C i nakon 3 minute ekstrakcije na koncentraciju mikro- i makroelemenata u ekstraktu kadulje i dubačca prikazan je na Slikama 13 i 14.



Slika 13. Utjecaj volumena vode (zagrijanoj na 90 °C i nakon 3 min) na koncentraciju mikro- i makroelemenata pri ekstrakciji vodom iz kadulje



Slika 14. Utjecaj volumena vode (zagrijanoj na 90 °C i nakon 3 min) na koncentraciju mikro- i makroelemenata pri ekstrakciji vodom iz dubačca

Kao najučinkovitiji volumen vode za ekstrakciju mikro- i makroelemenata iz dubačca pokazao se volumen od 20 mL. Osim za K različiti volumeni vode nisu značajno utjecali na učinkovitost ekstrakcije makroelemenata iz kadulje uz standardno odstupanje < 2,3.

Koncentracije mikro- i makroelemenata u ekstraktima kadulje i dubačca uspoređene su s koncentracijama dobivenim nakon mikrovalno potpomognutog razaranja cijele biljke. Iz koncentracije mikro- i makroelemenata u ekstraktu biljke i koncentracije u cijeloj biljci nakon mikrovalno potpomognutog razaranja izračunata je učinkovitost ekstrakcije. Rezultati su prikazani u Tablicama 18 i 19.

Tablica 18. Koncentracije mikro- i makroelemenata u ekstraktu od kadulje i udio elemenata (%) u ekstraktu

	c / mg L ⁻¹			c / µg L ⁻¹		
	ekstrakt kadulje	%		ekstrakt kadulje	%	
K	5,87	52,1	Mn	7,37	22,6	12,15
Mg	1,11	37,0	Zn	11,7	14,7	13,8
Na	0,053	58,7	Pb	2,99	23,9	
Ca	0,013	46,4	Sr	1,31	17,6	2,45
			Cu	1,63	23,4	2,70
			Ni	0,260	0,32	0,85
			Fe	0,177	0,29	107,4

Tablica 19. Koncentracije mikro- i makroelemenata u ekstraktu dubačca i udio elemenata (%) u ekstraktu

	c / mg L ⁻¹			c / µg L ⁻¹		
	ekstrakt dubačca	%		ekstrakt dubačca	%	
K	3,62	33,0	Zn	21,0	7,15	
Ca	0,186	17,3	Al	1,53	-	
Mg	0,315	12,5	Mn	5,05	35,8	
Na	0,066	24,5	Cu	2,16	5,43	
			Sr	0,964	50,8	
			Ni	6,07	10,2	
			Fe	5,52	6,43	
			Pb	3,52	33,9	
			Cr	1,23	-	

Treba napomenuti da se ljekovite biljke većinom koriste za pripremu ekstrakta (čaja). Koncentracije elemenata u čaju manje su u usporedbi s koncentracijama u cijeloj biljci. Postotak ekstrahiranih elemenata izračunat je iz podataka prema Tablicama 16 i 17 i dan u Tablicama 18 i 19 kao udio elemenata (%) u čaju. Udio elemenata u čaju od dubačca je veći samo za Sr (90,8 %) dok je za ostale elemente u rasponu od 5,4-35 %. Za kadulju, udio elemenata u ekstraktu je veći za Fe (107 %), Na (58,7 %), K (52,1 %), Ca (46,4 %) i Mg (37,0 %) dok je za ostale elemente u rasponu od 0,85-13 %.

Koncentracije Cr, Cd i Co štetnih za ljudsko zdravlje u ekstraktima kadulje i čaja su ispod detekcijskih granica metode (0,0109 i 0,0126 µg L⁻¹ za Cd, 0,002 i 0,0106 µg L⁻¹ za Co te 1,0108 i 0,247 µg L⁻¹ za Cr). Od toksičnih elemenata određeno je samo olovo u ekstraktu kadulje (2,43 µg g⁻¹) i dubačca (2,79 µg g⁻¹). Ljekovite biljke na tržištu obično dolaze u

vrećicama od 2 g. Prosječni unos za odraslu osobu ADDI za Pb je 0,415 mg/dan. Na temelju navedenih podataka izračunata ADDI vrijednost za Pb je 1 %. Može se zaključiti da konzumiranjem čaja pripremljenog od kadulje i dubačca nema opasnosti za ljudsko zdravlje od trovanja olovom. Na temelju rezultata određivanja mikro- i makroelemenata u čaju kadulje i dubačca može izračunati su vrijednosti (RDA) za 2 g ljekovite biljke kolika je masa vrećice čaja i manji su od 1 %.

§ 5. ZAKLJUČAK

Postupak pripreve uzorka kadulje i dubačca prije elementne analize metodom ICP-AES je optimiziran. Metoda ICP-AES za određivanje elemenata u kadulji i dubačcu je validirana i na temelju analitičkih parametara za validaciju odabrani su optimalni uvjeti za rutinsku analizu.

Kao najbolji reagens za mikrovalno potpomognuto razaranje pokazala se razrijeđena dušična kiselina (50:50 v/v). Točnost metode ICP-AES za određivanje mikro- i makroelemenata u kadulji i dubačcu određena je na temelju iskoristivosti metode. Najbolja iskoristivost metode ICP-AES od 85 do 125 % dobivena je za sve elemente nakon mikrovalno potpomognutog razaranja lista i cvijeta kadulje odnosno dubačca od 83 do 130 % s HNO₃ (50:50 v/v). Nakon mikrovalno potpomognutog razaranja kadulje s razrijeđenom HNO₃ (25:75 v/v) ili smjesom razrijeđene HNO₃ i H₂O₂ za Ca je dobivena manja iskoristivost (< 33 %) ICP-AES metode, a za dubačac je manja nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka s razrijeđenom HNO₃ (25:75 v/v) ili smjesom razrijeđene HNO₃ (25:75 v/v) i H₂O₂ za Ca i Sr u cijeloj biljci 63 % i 66 %, a u cvijetu 80 % i 57 %.

Detekcije granice elementnu analizu uzorka cvijeta i lista kadulje i dubačca nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO₃ ili smjesom su: < 2 µg g⁻¹ za većinu elemenata (Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Na, Pb, Sr i Zn). Detekcijske granice za elemente u čaju su manje od 0,2 µg L⁻¹.

Osjetljivost metode za uzorke kadulje i dubačca s obzirom na svaki element određena je iz nagiba kalibracijske krivulje. Korelacijski koeficijent za sve kalibracijske krivulje pri svim valnim duljinama određivanja elemenata je veći od 0,9996.

Preciznost metode unutar dana je iskazana relativnim standardnim odstupanjem RSO % za određivanje elemenata u svim uzorcima kadulje i dubačca. Za sve elemente u uzorcima lista i cvijeta te cijele kadulje i dubačca RSO je u rasponu od 0,6 do 5,2 %.

Međudnevna preciznost metode za elementnu analizu uzorka lista i cvijeta te cijele kadulje i dubačca iznosila je < 2,2 %.

Najveći maseni udio makroelemenata u listu i cvijetu kadulje te u listu i cvijetu dubačca čini K > Mg > Ca > Na s koncentracijama: 9,72 mg g⁻¹ K, 3,52 mg g⁻¹ Mg, 4,09 mg g⁻¹ Ca i 0,10 mg

g^{-1} Na u kadulji, odnosno u dubačcu: $6,654 \text{ mg g}^{-1}$ K, $1,488 \text{ mg g}^{-1}$ Mg, $0,081 \text{ mg g}^{-1}$ Ca i $0,057 \text{ mg g}^{-1}$ Na.

Srednje vrijednosti masenih udjela mikroelemenata u cvijetu i listu te cijeloj kadulji nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 su: $94,34 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Al, $109,22 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Ni, $94,19 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Fe, $33,35 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Zn, $30,49 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Mn, $10,68 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Cu i $7,79 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Sr, a vrijednosti koncentracija mikroelemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 su: $97,38 \mu\text{g g}^{-1}$ Al, $95,90 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni, $81,92 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Fe, $20,52 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Zn, $27,50 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Mn, $4,76 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Cu i $4,02 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Sr.

U cijeloj kadulji koncentracije Cr i Co su bile ispod detekcijskih granica, a izmjereno je $0,0564 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Cd i $6,530 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Pb.

Maseni udio toksičnih elemenata u cvijetu i listu te cijelom dubačcu nakon mikrovalno potpomognutog razaranja s HNO_3 su u rasponu Cd $0,011\text{-}0,089 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, Cr $0,136\text{-}0,954 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, Co $0,010\text{-}0,231 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, Pb $5,681\text{-}11,394 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

Za ekstrakciju mikro i makroelemenata iz kadulje i dubačca najučinkovitiji volumen vode zagrijane na $90 \text{ } ^\circ\text{C}$ nakon 3 minute je 20 mL.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. WHO (1991) *Guidelines for assessment of herbal medicines*, Geneva.
2. R. Verpoorte, Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology, *Journal of pharmacy and pharmacology* **52** (2000) 253–262.
3. WHO *traditional medicine strategy: 2014-2023*, WHO Press, Geneva, Switzerland.
4. J. Radović, K. Čivić, R. Topić, V. Posavec Vukelić, *Biološka raznolikost Hrvatske*, (drugo izdanje), Državni zavod za zaštitu prirode, 2009, Ministarstvo kulture Republike Hrvatske, Zagreb, Hrvatska.
5. T. Nikolić, K. Fertalj, Helman T, Mornar V, Kalpić, CROFlora, a database application to handle the Croatian vascular flora, *Acta Botanica Croatica* **60** (2001) 31-48.
6. T. Nikolić, I. Rešetnik, Plant uses in Croatia, *Phytologia Balcanica* **13** (2007) 229–238.
7. M. Jakovljević, S. Jokić, M. Molnar, M. Jašić, J. Babić, H. Jukć, I. Banjari, *Plants* **55(8)** (2019)1-30.
8. A. Ghorbania, M. Esmaeilzadeh, Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **7(4)** (2017) 433–440.
9. D. Stešević, M. Ristić, V. Nikolić, M. Nedović, D. Caković, Z. Šatović, Chemotype diversity of indigenous Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) populations in Montenegro, *Chemistry & Biodiversity* **11(1)** (2014)101-14.
10. S. Bouajaj, A. Benyamna, H. Bouamama, A. Romane, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco, *Natural Products Research* **27(18)** (2013) 1673-1676.
11. B. Traykova, M. Stanilova, M. Nikolova, S. Berkov, Growth and Essential Oils of *Salvia officinalis* Plants Derived from Conventional or Aeroponic Produced Seedlings, *Agriculturae Conspectus Scientificus* **84(1)** (2019) 77-81.
12. K. Miura, H. Kikuzaki, N. Nakatani, Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the

- Oil Stability Index Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50(7)** (2002) 1845-1851.
13. C. F. Lima, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. Fernandes-Ferreira, The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats, C. Pereira-Wilson, *Journal of Ethnopharmacology* **97** (2005) 383–389.
14. S. Damyanova, S. Mollova, A. Stoyanova, O. Gubenia, Chemical composition of *Salvia officinalis* l. essential oil from Bulgaria, *Ukrainian Food Journal* **5(4)** (2016) 695-700.
15. J. D. Craft, P. Satyal, W. N. Setzer, The Chemotaxonomy of Common Sage (*Salvia officinalis*) Based on the Volatile Constituents, *Medicines (Basel)* **4(3)** (2017) 47.
16. T. Wielgorskaya, Dictionary of generic names of seed plants, 1995, Columbia University Press, New York, SAD.
17. D. Šamec, J. Gruz, M. Strnad, D. Kremer, I. Kosalec, R. Jurišić Grubešić, K. Karlović, A. Lucic, J. Piljac-Žegarac, Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L.) antioxidant capacity, *Food and Chemical Toxicology* **48** (2010) 113–119.
18. D. Kremer, E. Stabentheiner, R. Jurišić Grubešić, A. Oberländer, S. Vladimir-Knežević, I. Kosalec, D. Ballian, A morphological and chemotaxonomic study of *Teucrium arduini* L. in Croatia and Bosnia and Herzegovina, *Plant Biosystems*, **146** (2011) 1-11.
19. K. Chan, Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines, *Chemosphere* **52** (2003) 1361–1371.
20. I. Kosalec, J. Cvek, S. Tomić, Contaminants of medicinal herbs and herbal products, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **60** (2009) 485-501.
21. P. Apostoli, Elements in environmental and occupational medicine- Review, *Journal of Chromatography B* **778** (2002) 63–97.
22. M. Ozcan, Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey, *Food Chemistry* **84** (2004) 437–440.
23. S. B. Goldhaber, Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **38** (2003) 232–242.
24. J. M. Man, *Principles Food Chemistry*, 3rd Edition, 1999, Aspen publisher, SAD.

25. M. H. Stipanuck, ed. *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*, 2000, WB Saunders Company, Philadelphia, SAD, 686-710.
26. Z. Kroner, *Vitamins and minerals*, ABC-CLIO, LLC, 2011, California, SAD.
27. M. L. Brown, Present knowledge in nutrition, DC: International Life Science Institute – Nutrition Foundation, Washington, SAD, 1990, 212-223.
28. M. E. Merdivan, C. Yilmaz, R. Hamamci, S. Aygun, Basic nutrients and element contents of white cheese of diyarbakır in Turkey, *Food Chemistry* **87** (2004) 163–171.
29. R. Stawarz, G. Formicki, P. Massanyi, Daily fluctuations and distribution of xenobiotics, nutritional and biogenic elements in human milk in Southern Poland, *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances* **42** (2007) 1169–1175.
30. S. C. Andrews, Iron storage in bacteria, *Advances in Microbial Physiology* **40** (1998) 281–351.
31. F. S. Sizer, E. Whitney, *Nutrition: Concepts and Controversies*, 11th Edition, 2008, Thomson Wadsworth, SAD,
32. D. A. Skoog, D. M. Westif, J. Holler, *Onove analitičke kemije*, Škola knjiga, Zagreb, 1999.
33. C. B. Boss, K. J. Fredeen, *Concepts, Instrumentation and Tehniques in Inductievly Coupled Plasma Optical Emisssion Spectrometry*, 2nd Edition, Perkin Elmer Corporation, 1999.
34. H. Sun, F. Qiao, R. Suo, L. Li, S. Liang, Simultaneous determination of trace arsenic(III), antimony(III), total arsenic and antimony in Chinese medicinal herbs by hydride generation-double channel atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **505** (2004) 255– 261.
35. A. Kumar, A. G. C. Nair, A. V. R. Reddy, A. N. Garg, Availability of essential elements in Indian and US tea brands, *Food Chemistry* **89** (2005) 441–448.
36. J. J. Powell, T. J. Burden, R. P. H. Thompson, In vitro mineral availability from digested tea: a richdietary source of manganese, *Analyst* **123** (1998) 1721–1724.
37. S. Basgel, S. B. Erdemoglu, Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey, *Science of the Total Environment* **359** (2006) 82-89

38. M. M. Ozcan, A. Unver, T. Ucar, D. Arslan, Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction, *Food Chemistry* **106** (2008) 1120–1127.
39. C. F. Wang, C. H. Ke, J. Y. Yang, Determination of trace elements in drinking tea by various analytical techniques, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **173** (1993) 195–203.
40. T. Karak, R. M. Bhagat, Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review, *Food Research International* **43** (2010) 2234–2252.
41. D. Zimna, J. Grzybowski, R. Piekos, Extraction of some essential elements from the leaves of sage (*Salvia officinalis* L.), *Scientia Pharmaceutica* **52** (1984) 131–141.
42. J. Malik, J. Szakova, O. Drabek, J. Balik, L. Kokoska, Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions, *Food Chemistry* **111** (2008) 520–525.
43. G. F. Scarpa, Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco, *Journal of Ethnopharmacology* **91** (2004) 115–135.
44. A. A. K. Abou-Arab, M. Soliman Kawther, M. E. El Tantawy, R. Ismail Badea, N. Khayri, Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market, *Food Chemistry* **67** (1999) 357–363.
45. E. Lemberkovics, E. Czinner, K. Szentmihalyi, A. Balazs, E. Szoke, Comparative evaluation of Helichrysi flos herbal extracts as dietary sources of plant polyphenols, and macro- and microelements, *Food Chemistry* **78** (2002) 119–127.
46. A. Łozak, K. Sołtyk, P. Ostapczuk, Z. Fijałek, Determination of selected trace elements in herbs and their infusions, *The Science of the Total Environment* **289** (2002) 33–40.
47. S. Ražić, A. Onjia, B. Potkonjak, Trace elements analysis of Echinacea purpurea-herbal medicinal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **33** (2003) 845–850.
48. M. M. Ozcan, M. Akbulut, Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea, *Food Chemistry* **106** (2007) 852–858.
49. S. Ražić, S. Đogo, L. Slavković, A. Popović, Inorganic analysis of herbal drugs. Part I. Metal determination in herbal drugs originating from medicinal plants of the family Lamiaceae, *Journal of Serbian Chemical Society* **70(11)** (2005) 1347–1355.

50. K. Szentmihályi, É. Héthelyi, V. Virág, M. Then, Mineral elements in muscat sage plant (*Salvia sclarea* L.) and essential oil, *Acta Biologica Szegediensis* **53** (2009)
51. W. A. Simpkins, H. Louie, M. Wu, M. Harrison, D. Goldberg, Trace elements in Australian orange juice and other products, *Food Chemistry* **71** (2000) 423-433.
52. A. Arceusz, I. Radecka, M. Wesolowski, Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families, *Food Chemistry* **120** (2010) 52–58.
53. A. Lesniewicz, K. Jaworska, W. Zyrnicki, Macro- and micro-nutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments, *Food Chemistry* **99** (2006) 670–679.
- 54.A. Kumar, A. G. C. Nair, A. V. R. Reddy, A. N. Garg, Availability of essential elements in Indian and US tea brands, *Food Chemistry* **89** (2005) 441–448.
55. J. J. Powell, T. J. Burden, R. P. H. Thompson, In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese, *Analyst* **123** (1998) 1721–1724.
56. S. Basgel, S. B. Erdemoglu, Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey, *Science of the Total Environment* **359** (2006) 82-89
57. M. M. Ozcan, A. Unver, T. Ucar, D. Arslan, Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction, *Food Chemistry* **106** (2008) 1120–1127.
58. C. F. Wang, C. H. Ke, J. Y. Yang, Determination of trace elements in drinking tea by various analytical techniques, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **173** (1993) 195–203.
59. T. Karak, R. M. Bhagat, Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review, *Food Research International* **43** (2010) 2234–2252.
60. D. Zimna, J. Grzybowski, R. Piekos, Extraction of some essential elements from the leaves of sage (*Salvia officinalis* L.), *Scientia Pharmaceutica* **52** (1984) 131–141.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Eva Glamuzina

Datum rođenja: 1. veljače 1983.

Mjesto rođenja: Metković

Obrazovanje

1989.–1998. Osnovna škola Vladimira Nazora , Ploče

1998.–2001. Srednja škola Fra Andrije Kačića Miošića, Ploče

2004.–2019. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. I. Juranović Cindrić, **E. Glamuzina**, M. Zeiner i G. Stingeder, „Study of the mineral content of infusion obtained from the medical plant *Teucrium montanum*”, 7th *International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, 20. - 23. 09. 2011., str. 123, Opatija, Hrvatska.

2. M. Zeiner, I. Juranović Cindrić, **E. Glamuzina** i G. Stingeder, „Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L and *Teucrium montanum* L grown in Croatia”, *XIV. Italian-Hungarian Symposium on Spectrochemistry*, 05. - 07. 10. 2011., str. 39, Suemeg, Mađarska.

Publikacija

I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, **E. Glamuzina** i G. Stingeder, „Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia“, *Microchem. J.* **107** (2013) 185-189.