

# Određivanje arsena u biljnim ekstraktima metodama ETAAS i ICP-AES

---

**Alispahić, Sanja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:498255>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Sanja Alispahić

# **Određivanje arsena u biljnim ekstraktima metodama ETAAS i ICP-AES**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Sanja Alispahić

# **Određivanje arsena u biljnim ekstraktima metodama ETAAS i ICP-AES**

## **Diplomski rad**

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

Zagreb, 2018.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom  
izv. prof. dr. sc. Sande Rončević i neposrednim voditeljstvom dipl. ing. Ivana Nemeta.



## Zahvale

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević i neposrednom voditelju izrade ovog Diplomskog rada dipl. ing. Ivanu Nemetu na ugodnoj radnoj atmosferi, stručnim savjetima, strpljivosti i pruženoj mogućnosti da upravo u njihovom vodstvu izradim ovaj Diplomski rad i steknem određena znanja i vještine koje će mi pomoći u poslovnom svijetu.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom svih 5 godina studija i na tome što su vjerovali u mene čak i onda kada ja sama nisam.*

*Veliko hvala i mojoj najboljoj prijateljici Ramoni i dečku Simonu što su uvijek uz mene kada ih najviše trebam.*





# Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT .....	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1. Arsen .....	2
2.1.1. Kemija arsena.....	2
2.1.2. Transport arsena u biljke i njegov fiziološki i biokemijski utjecaj .....	3
2.1.3. Analitičke metode određivanja arsena .....	4
2.1.4. Maksimalne dozvoljene količine arsena u ljekovitom bilju .....	5
2.2. Metode atomske spektrometrije .....	6
2.2.1. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES).....	7
2.2.1.1. Značajke instrumentne metode.....	9
2.2.2. Elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS).....	14
2.2.2.1. Analitičke značajke metode ETAAS.....	15
2.2.2.2. Instrumentacija .....	17
2.2.2.3. Tehnika HydrEA .....	19
2.3. Kratkokljuni čapljan ( <i>Erodium cicutarium</i> ) .....	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	22
3.1. Kemikalije.....	22
3.1.1. Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu .....	22
3.1.2. Certificirani referentni materijali korišteni u eksperimentalnom radu .....	22
3.1.3. Instrumentacija .....	22
3.2. Priprema uzoraka za analizu .....	23
3.2.1. Digestija uzoraka mikrovalnim zračenjem.....	23
3.2.2. Digestija uzoraka u ultrazvučnoj kupelji.....	24
3.3. Analiza uzoraka.....	25
3.3.1. Analiza uzoraka metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) .....	25
3.3.1.1. Priprema kalibracijskih otopina .....	25
3.3.1.2. Parametri metode ICP-AES .....	25
3.3.2. Analiza uzoraka metodom elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije (ETAAS).....	27
3.3.2.1. Redukcija As(V) u As(III).....	27
3.3.2.2. Priprema kalibracijskih otopina .....	27
3.3.2.3. Parametri metode HydrEA - ETAAS.....	28
3.4. Usporedba analitičkih metoda .....	30

---

<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Kontrola točnosti analitičkih postupaka i mjerenja .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Sadržaj arsena u biljnom materijalu određen metodama ICP-AES i ETAAS .....</b>	<b>33</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>37</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>38</b>
<b>§ 7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XL</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ODREĐIVANJE ARSENA U BILJNIM EKSTRAKTIMA METODAMA ETAAS I ICP-AES

**Sanja Alispahić**

Zavod za analitičku kemiju

U ovom su se radu ispitivale mogućnosti određivanja ukupnih anorganskih specija arsena iz uzoraka biljke *Erodium cicutarium* koja se koristi u tradicionalnom liječenju infekcija. Nakon primjene različitih analitičkih postupaka obrade praškastog biljnog materijala, sadržaj arsena analizirao se metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Ispitane su i mogućnosti elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije (ETAAS) u analizi pripremljenih otopina uzoraka uz postupke prethodne redukcije i generiranja hidrida. Prethodna priprema uzorka temeljila se na razgradnji proteinske matrice u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini ili u koncentriranoj dušičnoj kiselini i vodikovom peroksidu pomoću ultrazvučne kupelji ili sustava za mikrovalnu razgradnju. Kontrola točnosti analitičkih postupaka rađena je uz certificirane referentne materijale biljaka s deklariranim ukupnim sadržajem arsena (NIST CRM 1573a. i NIST CRM 1570a). Zadovoljavajuća točnost (<1.5%) postignuta je metodom ETAAS. Dobiveni podaci pokazali su pouzdanost mjerenja metodom ETAAS, dok je analiza metodom ICP-AES pokazala veliki rasap mjerenih vrijednosti. Raspon koncentracija arsena u uzorcima biljnog praha mjereno je u granicama 88-345 ng g<sup>-1</sup>.

(54 stranice, 12 slika, 7 tablica, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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: arsen, biljni ekstrakt, ETAAS, ICP-AES, usporedba metoda

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević  
Neposredni voditelj: dipl. ing. Ivan Nemet, viši str. sur.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević.
  2. doc. dr. sc. Morana Dulić
  3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: prof. dr. sc. Predrag Novak

Datum diplomskog ispita: 17. rujna 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF ARSENIC IN HERBAL EXTRACTS BY ETAAS AND ICP-AES METHODS

Sanja Alispahić

The possibilities for determination of inorganic arsenic species from samples of a plant *Erodium cicutarium*, which is used in traditional healing of infections, are described in this work. After the usage of different analytical procedures for processing powdered plant material, content of arsenic was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). The possibilities of electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) for the analysis of sample solutions together with the prior procedures of reduction and hydride generation, were also investigated. Sample preparation was performed by digestion of protein matrix in concentrated hydrochloric or nitric acid together with ultrasound bath or microwave digestion system. Accuracy of analytical procedures was controlled by the standard reference materials of plants with declared total amount of arsenic (NIST CRM 1573a. i NIST CRM 1570a). Acceptable accuracy (<1,5%) was accomplished by ETAAS in contrast to ICP-AES which has shown a very wide range of measured values. Determinated concentrations of arsenic in powdered plant materials were in the range of 88-345 ng g<sup>-1</sup>.

(54 pages, 12 figures, 7 tables, 32 references, Croatian original)

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: arsenic, herbal extracts, ETAAS, ICP-AES, method comparison

Mentor: dr. sc. Sanda Rončević, Assoc. prof.

Assistant mentor: Ivan Nemet, dipl. ing.

Reviewers:

1. Dr. sc. Sanda Rončević, Assoc. prof.
  2. Dr. sc. Biserka Purgovečki, Full. prof
  3. Dr. sc. Morana Dulić, Asst. prof
- Substitute: Dr. sc. Predrag Novak, Assoc. prof.

Date of exam: 17st September, 2018.



## § 1. UVOD

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*) većina svjetske populacije svakodnevno koristi nekonvencionalne lijekove i proizvode izvedene iz ljekovitih biljaka pa oni nalaze široku primjenu u sustavima tradicionalnog liječenja. Poznavanje sadržaja toksičnih elemenata, kao što je arsen, u biljkama i njihovim farmaceutskih formulacijama iznimno je važno za procjenu mogućih negativnih posljedica po ljudsko zdravlje. Toksičnost arsena je uglavnom povezana s anorganskim oblicima arsena, As(III) i As(V), koji mogu biti prisutni u biljnom materijalu u udjelima od 1 % do 3 % ukupnog sadržaja.

Analitički pristup određivanju arsena u uzorcima biljnih tkiva uvjetovan je raspoloživom instrumentacijom, sastavom matrice i specijama arsena prisutnim u uzorku. Analitička metodologija za kvantifikaciju organskih i anorganskih specija arsena najčešće se temelji na vezanim sustavima tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s atomskom fluorescencijskom spektrometrijom (AFS) ili spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES, ICP-MS). Međutim, podatak o ukupnom sadržaju anorganskih specija arsena moguće je osigurati pristupačnijim i brzim analitičkim metodama uz odgovarajuću prethodnu pripravu uzoraka.

U ovom su se radu ispitivale mogućnosti određivanja ukupnih anorganskih specija arsena iz uzoraka biljke *Erodium cicutarium* koja bi se potencijalno mogla koristiti u liječenju raznih infekcija. Priprema uzoraka temeljila se na razgradnji proteinske matrice u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini pomoću ultrazvučne kupelji i sustava za mikrovalnu razgradnju. Tako pripremljene otopine uzoraka koristile su se za analizu sadržaja arsena, a metode koje su se pritom koristile su atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) i elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS). U kontroli točnosti analitičkih postupaka koristili su se certificirani referentni materijali biljaka s deklariranim ukupnim sadržajem arsena. Dobiveni podaci statistički su se obradili i međusobno usporedili, a temeljem dobivenih rezultata raspravile su se prednosti i nedostaci primijenjenih metoda i postupaka. U konačnici su predloženi optimalni uvjeti za kvantitativnu analizu anorganskih vrsta arsena u uzorcima biljaka.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Arsen

Zbog svoje široke rasprostranjenosti u okolišu, arsen je sve češći predmet istraživanja znanstvenika. Oslobađa se u okoliš prirodnim (npr. vulkani) ili antropogenim procesima (npr. pesticidi). Biljke dolaze u dodir s arsenom kroz tlo i mogu ga akumulirati u različitim dijelovima, većinom u obliku arsenata.<sup>1</sup> S obzirom da se različite ljekovite biljke koriste kao dodaci prehrani i za liječenje različitih oboljenja, nužno je kontrolirati bioakumuliranu količinu teških metala kako bi se spriječili mogući negativni učinci ljekovitog bilja na zdravlje čovjeka.<sup>2</sup> Općenito, ljudi su svakodnevno izloženi arsenu preko kontaminirane vode ili preko hrane koja je uzgajana na tlu zagađenom arsenom.<sup>3</sup> Kako bi se procijenili rizici za zdravlje ljudi, potrebno je detaljno razumijeti bioakumulaciju arsena.

#### 2.1.1. Kemija arsena

U tlu i u vodenom mediju arsen može postojati u četiri različita oksidacijska stanja: As(-III), As(0), As(III) i As(V). Toksični efekti arsena ne ovise samo o njegovoj koncentraciji, već i o kemijskoj formi u kojoj je prisutan. Dominantne anorganske specije arsena su arsenit (As(III)) i arsenat (As(V)), dok su od organskih specija arsena to metilarsonat, metilarsenit, arsenobetain, arsenokolin, monometilarsenska kiselina (MA) i dimetilarsenska kiselina (DMA). As(III) je otrovniji od As(V) jer inhibira oksidacijsku fosforilaciju (važan mehanizam u opskrbi stanica energijom) uzrokujući time staničnu smrt. Toksičnost As(V) očituje se u njegovoj inhibiciji sinteze ATP-a.<sup>4</sup> As(III) u reakciji s natrijevim borhidridom stvara arsin (AsH<sub>3</sub>). Riječ je o vrlo opasnom bezbojnom plinu čije se generiranje često koristi u procesu predobrade uzorka u svrhu određivanja arsena. Anorganske specije arsena puno su opasnije i otrovnije od organskih specija za koje se smatra da se ne apsorbiraju u organizam. Čak i ako se uspiju apsorbirati, najčešće se vrlo lako izlučuju iz organizma putem urina ili fecesa pa su time i manje toksične. Anorganske specije arsena puno su toksičnije zbog svoje vrlo lake apsorpcije u organizam, oštećivanja gastrointestinalnog trakta, cirkulacije, perifernog i centralnog živčanog sustava, a smatraju se i karcinogenima za pluća, kožu, jetru i bubrege te u nekim slučajevima mogu uzrokovati i smrt.<sup>5</sup> Anorganski arsen se prema podacima USEPA-e (engl. *United States Environmental Protection Agency*) nalazi na prvom mjestu na listi

zagađivača, a spada i u prvu grupu karcinogena prema podacima ljudske epidemiologije. S druge strane, metilirane arsenove specije (monometilarsenska kiselina (MMA) ili dimetilarsenska kiselina (DMA)) su puno manje toksične, a za specije arsenovih šećera (arsenobetain, arsenokolin) smatra se da uopće nisu toksične. S obzirom na različitu toksičnost arsenovih specija, određivanjem ukupne količine arsena u realnim uzorcima ne dobiva se dovoljno informacija za procjenu sigurnosti hrane ili kontaminacije okoliša. Iz navedenog su razloga razvijene različite metode specijacijske analize arsena kojima je moguće jednoznačno utvrditi koje su specije arsena prisutne u uzorku te time i razinu toksičnosti analiziranih uzoraka.<sup>6</sup>

### **2.1.2. Transport arsena u biljke i njegov fiziološki i biokemijski utjecaj**

Izlaganje biljke arsenu čak i pri vrlo niskim koncentracijama može uzrokovati mnoge morfološke, fiziološke i biokemijske promjene u biljci. Toksičnost arsena za biljke varira ovisno o njegovoj specijaciji unutar biljke (arsenit, arsenat), o vrsti biljke i o značajkama tla koje kontroliraju akumulaciju arsena u biljkama. Različite biljne vrste imaju različite mehanizme unosa As(III) i As(V) i detoksifikacije stanica od istih.

Arsen u biljke većinom ulazi u anorganskoj formi (As(III) ili As(V)) preko transportnih proteina. Unos je vrlo vjerojatno reguliran gradijentom koncentracije arsena između tla, u kojem biljka raste, i biljnih stanica. Danas još ne postoje informacije o specifičnim transporterima arsena u biljne stanice, no ono što se zna jest da As(V), kao analog ortofosfata (Pi), koristi iste transportne proteine kao i ortofosfat za prelazak plazma membrane stanica korijena biljke. Arsen je time kompetitivni inhibitor ortofosfata te direktno interferira odvijanju raznih metaboličkih puteva za koje je ortofosfat važan. Unutar biljke, arsen ima snažan utjecaj na rast i razvoj biljke jer uzrokuje mnoštvo morfoloških, fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena. Jedna od važnijih promjena je definitivno smanjenje efikasnosti fotosinteze, a najopasniji biokemijski efekt arsena na substaničnom nivou je povećano stvaranje i sprječavanje eliminacije reaktivnih kisikovih specija (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*) kao što su superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), hidroksilni radikal (OH) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Ove su specije prilično opasne za metabolizam biljke i mogu uzrokovati nepopravljivu štetu na važnim makromolekulama kao što su lipidi, proteini, ugljikohidrati i DNA. Znanstvenici su uočili poveznicu između redukcije As(V) u As(III) i formiranja reaktivnih kisikovih specija. Biljke su razvile različite mehanizme zaštite od

oksidacijskog stresa kojeg uzrokuju reaktivne kisikove specije. Kako bi se detoksificirale od reaktivnih kisikovih specija, biljke povećavaju aktivnost antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation reduktaza (GR) i askorbat peroksidaza (APX). Osim enzimatskih antioksidansa, aminokiselina prolin se uslijed stresa uzrokovanog arsenom akumulira u velikim količinama te pomaže biljnim stanicama da zadrže minimalnu razinu hidratacije potrebnu za normalno funkcioniranje stanice. Također, prolin štiti biljne stanice od stresa posredovanog reaktivnim kisikovim specijama. Treći mehanizam detoksifikacije biljke predstavlja kompleksiranje arsena s određenim ligandima te njegovo izbacivanje iz stanice vakuolarnom kompartmentalizacijom. Do sada je poznato da peptidi bogati aminokiselinom cistein (fitokelati, metalotioneini) zahvaljujući svojim reaktivnim tiolnim skupinama mogu vezati arsen i prevesti ga u formu koja nije toksična.

Buduća istraživanja usmjerena su na potpunije razumijevanje toksičnih efekata arsena na lipide, proteine i DNA tijekom i nakon klijanja biljke te se nastoje detaljno razumjeti mehanizmi obrane biljke od stresa uzrokovanog ovim teškim metalom.<sup>7</sup>

### 2.1.3. *Analitičke metode određivanja arsena*

Kako bi se arsen mogao uspješno odrediti u različitim uzorcima, potrebno ga je separirati iz uzorka, a zatim adekvatnom tehnikom i detektirati. Tehnike separacije arsena koriste se za eliminaciju efekata matrice, za obogaćivanje (prekoncentriravanje) uzorka arsenovim specijama i za olakšavanje njihovih detekcija i identifikacija.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction (SPE)*) efikasna je tehnika predobrade uzoraka s ciljem prekoncentracije analita iz kompleksne matrice. Odlikuje ju niska cijena, smanjena potrošnja reagensa te jednostavnost izvođenja, a u kombinaciji s drugim analitičkim tehnikama primjenjiva je za *off-line* i *on-line* analize arsenovih specija. Danas se različiti materijali koriste za ekstrakciju (prekoncentraciju) arsenovih specija, pri čemu je najčešće riječ o ionsko-izmjenjivačkoj smoli, staklu ili poroznom silikagelu.<sup>6</sup>

Tehnika generiranja hidrida druga je često korištena tehnika predobrade uzorka kod koje se pomoću kalijevog jodida i askorbinske kiseline reducira As(V) u As(III), a zatim se sav As(III) prevodi u arsin ( $\text{AsH}_3$ ) reakcijom s natrijevim borhidridom.<sup>8</sup>

Osim ovih dviju navedenih tehnika za predobradu uzoraka, vrlo se često primjenjuju i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) ili kapilarna elektroforeza (CE).

Za detekciju arsenovih specija koriste se različite metode atomske apsorpcijske i emisijske spektrometrije, a najčešće korištene tehnike su elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS), atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) ili spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS). ETAAS je vrlo korisna tehnika u slučajevima kada je uzorka vrlo malo upravo zbog svojih vrlo niskih detekcijskih granica ( $< 5 \text{ mg L}^{-1}$ ), velike preciznosti (0,5-5%), točnosti i selektivnosti. Tehnike bazirane na plazma izvorima pružaju mogućnost multielementne analize te su danas sve češće primjenjivane u sprezi s HPLC-om u svrhu analize arsenovih specija.<sup>1</sup>

#### **2.1.4. Maksimalne dozvoljene količine arsena u ljekovitom bilju**

Biljni lijekovi su proizvodi dobiveni iz biljnog materijala s terapijskim ili nekim drugim zdravstvenim prednostima. Mogu sadržavati sirove ili procesirane sastojke jedne ili više biljki. Svjetska zdravstvena organizacija definira tri vrste biljnih lijekova: sirovi biljni materijal, procesirani biljni materijal i medicinski biljni proizvod. Analize sigurnosti, efikasnosti i kvalitete biljnih lijekova ograničene su njihovim kompleksnim sastavom, problemom prepoznavanja vrste biljke i nedostatkom prikladne standardizacije. Sigurnost, efikasnost i kvaliteta gotovih biljnih lijekova ovisi o kvaliteti izvornog materijala, koji može uključivati stotine prirodnih sastojaka, i načinu na koji su elementi procesirani prilikom proizvodnje lijekova.<sup>9</sup>

Svaka država ima vlastite zakone i regulativu za pripravke ljekovitog bilja temeljene na tradiciji te etnološkoj i medicinskoj povijesti.<sup>10</sup> Svjetska zdravstvena organizacija predložila je jednostavniji način definiranja kvalitete, sigurnosti primjene i efikasnosti pripravaka ljekovitog bilja pri čemu bi svaka država trebala prihvatiti opće regulative vezane uz navedene pripravke. Hrvatska se kao članica Europske unije mora pridržavati propisa unutar Europske farmakopeje koja diktira zahtjeve koji se moraju ispuniti kako bi se određeni biljni lijekovi i pripravci ljekovitog bilja mogli proglasiti kvalitetnima. Dopuštena količina arsena, propisana prema WHO, u pripravcima ljekovitog bilja iznosi  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ . Svjetska zdravstvena organizacija daje i precizne upute o načinu izvođenja analitičkih tehnika kojima se potvrđuje kvaliteta proizvoda. Za razliku od toga, Europska farmakopeja nije definirala dopuštene granice za arsen, a nije niti definirana dopuštena dnevna doza. Dopuštena tjedna doza iznosi  $15 \text{ mg kg}^{-1}$ .<sup>11</sup> Iz navedenog je vidljivo da su danas i dalje vrlo slabo definirane granice toksičnosti za arsen koji, u određenim oblicima, predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje

čovjeka. U Hrvatskoj većina suhih biljnih pripravaka i općenito pripravaka na biljnoj bazi ne zadovoljava u potpunosti sve norme propisane Europskom farmakopejom. Ne analizira se svaka serija ljekovitog bilja niti se provode sve analize propisane zahtjevima i normama. Često se, uz mikrobiološke analize, ne provedu i one koje će utvrditi količinu teških metala (As, Hg, Pb, Cr i Cd) vrlo štetnih za središnji živčani sustav, bubrege, gastrointestinalni trakt, reproduktivni sustav i zglobove. Zanimaju se i analize metala u tragovima kao što su Mn, Fe, Co, Cu, V, Zn i Mo. Kao glavni razlog tome navodi se način na koji je većina biljaka u Hrvatskoj registrirana. Naime, većina biljaka registrira se kao hrana ili dodatak prehrani pa se time ne zahtjeva analiza svake serije biljaka niti su zahtjevi jednaki kao farmakopejske norme za pripravke ljekovitog bilja.<sup>12,13</sup>

## 2.2. Metode atomske spektrometrije

Tehnike atomske spektrometrije svoju primjenu najčešće nalaze u analizama elemenata u tragovima pri kojima se uzorak razgrađuje intenzivnim zagrijavanjem u oblak vrućih plinova koji sadrži slobodne atome i ione elemenata od interesa.

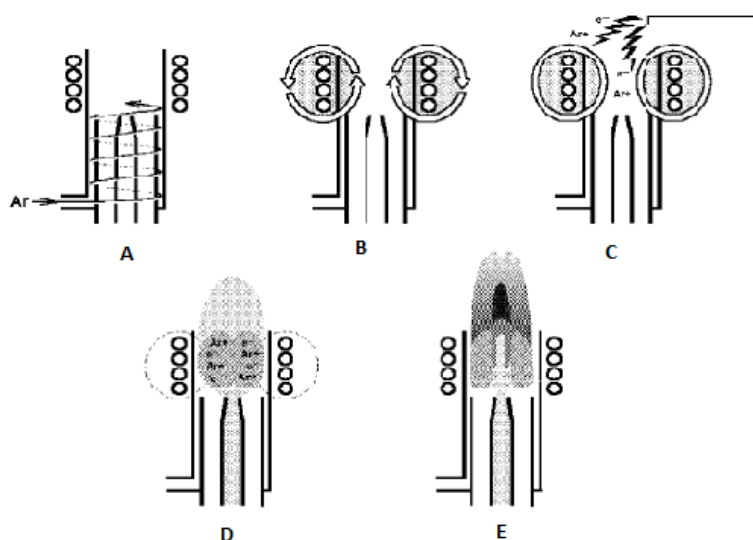
U atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji (AAS) se zračenje valne duljine karakteristične za element od interesa propušta kroz pare atoma i iona. Dio zračenja apsorbiraju atomi elementa od interesa te se ta količina apsorbiranog zračenja mjeri i koristi za određivanje koncentracije tog elementa u uzorku.

U atomskoj emisijskoj spektrometriji (AES) uzorak je izložen temperaturama dovoljno visokim da se uzrokuje disocijacija uzorka na atome i ione, a zatim i njihova međusobna sudaranja koja dovode do ekscitacije atoma i iona. Pobuđeni atomi i ioni se emisijom zračenja vraćaju u osnovno stanje, a mjerenjem intenziteta zračenja, emitiranog pri specifičnim valnim duljinama, može se odrediti koncentracija elemenata od interesa.<sup>14</sup>

### 2.2.1. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES)

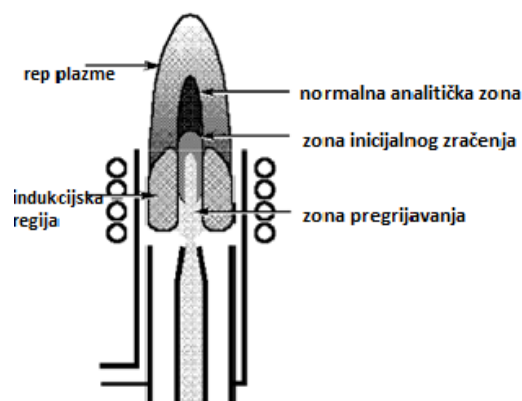
Plazma je ionizirani plin koji se razmatra kao posebno stanje materije, a sastoji se od smjese neutralnih i pozitivno nabijenih čestica i elektrona. Riječ je o električki vodljivoj plinskoj smjesi koja sadrži znatnu količinu kationa i elektrona, a čiji je ukupan naboj nula.

Plin je najčešće argon te su argonovi ioni i elektroni glavne vodljive čestice. U malim količinama prisutni su i kationi iz uzorka. Proces generiranja plazme prikazan je na slici 1.



Slika 1: Generiranje plazme u pet koraka: protjecanje argona (A), formiranje izmjeničnog elektromagnetskog polja (B), iskrenje (C), ionizacija argona (D) i formiranje plazme (E).<sup>15</sup>

Nakon što argon krene protjecati kroz plamenik, zavojnica pri vrhu plamenika priključuje se na radiofrekvencijski generator te dolazi do formiranja izmjeničnog elektromagnetskog polja. Iskrenjem se dalje potiče izbacivanje elektrona iz atoma argona čime se generiraju slobodni elektroni. Ti slobodni elektroni zatim bivaju „uhvaćeni“ u magnetskom polju zbog čega dolazi do njihovog ubrzavanja koje uzrokuje daljnju ionizaciju argona i formiranje plazme. Taj efekt dodavanja (izmjene) energije zavojnice naziva se induktivno sprezanje. Plazmu čini nekoliko zona (slika 2), a to su rep plazme, normalna analitička zona, zona inicijalnog zračenja, jezgra plazme i zona pregrijavanja.

Slika 2: Zone plazme<sup>15</sup>

Glavni dijelovi ICP izvora su plazma plamenik, indukcijska zavojnica, sustav za regulaciju protoka argona i radiofrekvencijski generator. Plazma plamenik čine tri koncentrične kvarcne cijevi kroz koje protječe argon različitim brzinama. Indukcijska se zavojnica sastoji od 2-5 namotaja bakrene cijevi (pozlaćene ili posrebrene), a hladjena je vodom ili zrakom i smještena pri vrhu plamenika. ICP izvor postiže temperature od 6000-10000 K i omogućuje efikasnu ekscitaciju i ionizaciju analita.<sup>15</sup>

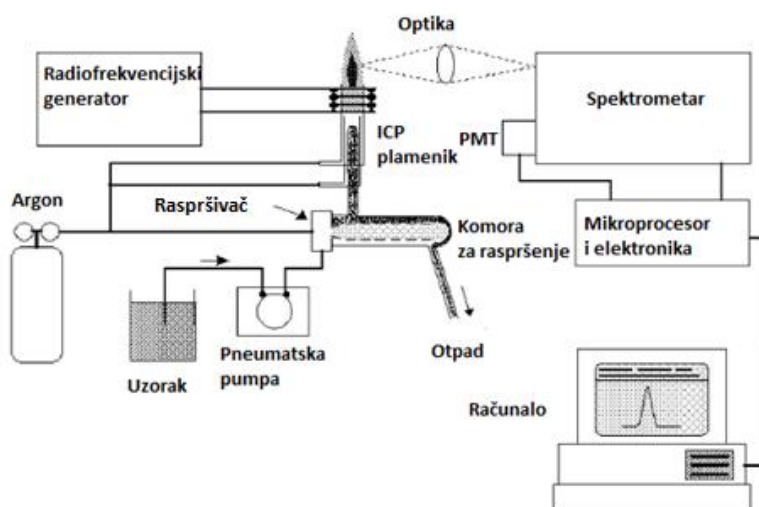
Osnovno stanje atoma predstavlja stanje najniže energije te se tada vanjski elektroni nalaze u orbitalama koje su najbliže jezgri. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja dolazi do pobuđivanja atoma koji zatim prelazi u jedno od pobuđenih stanja. Taj proces se naziva ekscitacija. Novonastalo stanje atoma nestabilnije je od osnovnog stanja pa se atom iz navedenog razloga relaksira natrag u osnovno stanje emisijom fotona. Ukoliko je primijenjena energija dovoljno visoka, elektron može u potpunosti napustiti atom pa dolazi do generiranja iona. Navedeni proces naziva se ionizacija, a energija potrebna za njegovo odvijanje naziva se ionizacijski potencijal. Svaki pojedini element ima karakteristični ionizacijski potencijal pa se ta činjenica iskoristila u tehnikama njihovih detekcija.<sup>16</sup>

Korištenjem plazme kao emisijskog izvora pobuđuju se elektroni atoma i jednoatomnih iona te oni prilikom vraćanja u osnovno stanje emitiraju zračenje karakterističnih valnih duljina koje su određene razlikom energija između više i niže energijske razine.<sup>16</sup>

Svaki element ima svoj set karakterističnih energijskih razina pa time i karakteristični set apsorpcijskih i emisijskih valnih duljina. Upravo ovo svojstvo čini atomsku spektrometriju korisnom za provođenje element-specifičnih analiza.<sup>16</sup> Općenito je potrebno mjeriti barem tri spektralne linije pojedinog elementa kako bi se on sa sigurnošću mogao identificirati u uzorku. Za potrebe kvantitativne analize ICP-AES-om potrebno je pripremiti otopine s poznatim koncentracijama elementa od interesa (standardne otopine) te izmjeriti intenzitete karakterističnih emisijskih linija za taj element pri svakoj od poznatih koncentracija. Ti se intenziteti prikazuju u ovisnosti o poznatim koncentracijama odredivanog elementa te se time formira kalibracijska krivulja za element od interesa. Snimanjem intenziteta emisije elementa od interesa, u uzorcima u kojima njegova količina nije poznata i treba se odrediti, intenzitet se unosi u kalibracijsku krivulju te se interpolacijom određuje koncentracija koja odgovara tom intenzitetu.<sup>17</sup>

#### 2.2.1.1. Značajke instrumentne metode

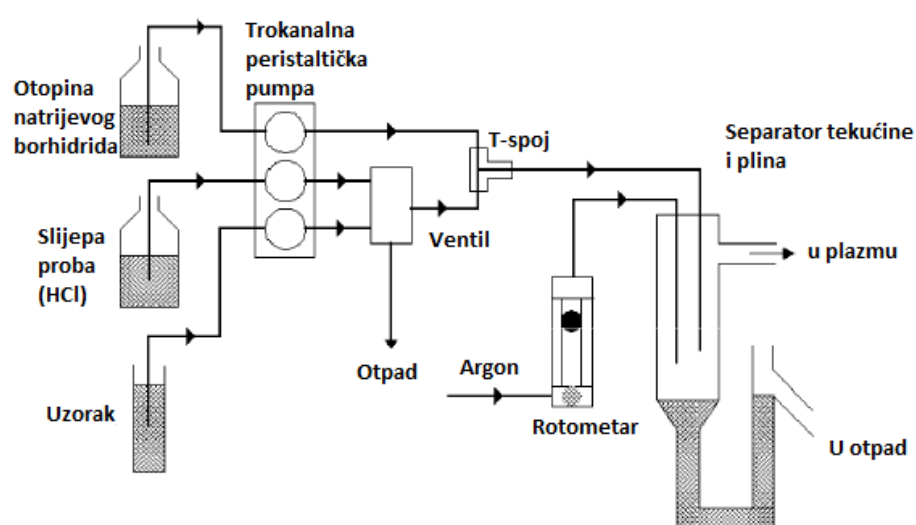
Unutar ICP-AES instrumenta tekući uzorak se prevodi u aerosol procesom koji se naziva raspršenje. Aerosol uzorka zatim se dovodi u plazmu gdje se desolvatizira, vaporizira, atomizira i pobudi i/ili ionizira. Pobuđeni atomi i ioni emitiraju karakteristično zračenje koje se prikuplja određenim selektorom valnih duljina (monokromator ili polikromator). Detektirano zračenje prevodi se u elektroničke signale koji se zatim prevode u informacije o koncentraciji analita. Shematski prikaz osnovnih komponenti ICP-AES instrumenta prikazan je na slici 3.



Slika 3: Osnovni dijelovi ICP-AES instrumenta.<sup>18</sup>



Uzorak se uvodi peristaltičkom pumpom koja regulira njegov protok i sprječava odlazak prevelike količine uzorka u raspršivač. Raspršivači su dijelovi instrumenta koji prevode tekući uzorak u aerosol koji se zatim može izložiti plazmi bez narušavanja njezine stabilnosti. Najčešće se koriste pneumatski ili ultrazvučni raspršivači. Postoje i alternativni načini uvođenja uzorka u plazmu, a vrlo često korištena je tehnika generiranja hidrida. Shematski prikaz navedenog instrumenta prikazan je na slici 4.

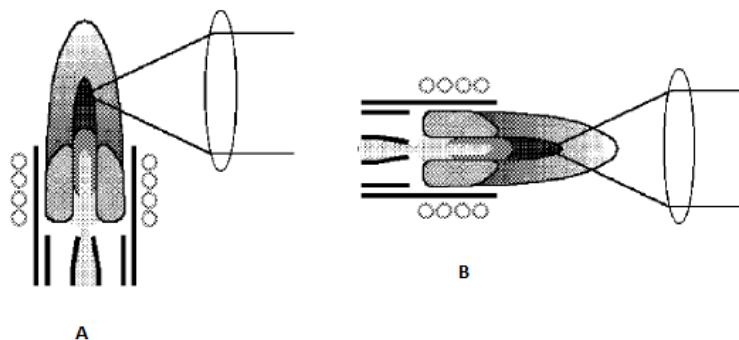


Slika 4: ICP-AES instrumentacija s tehnikom generiranja hidrida.<sup>18</sup>

Ovom se tehnikom uzorak otopljen u kiselini miješa s redukcijским sredstvom, obično otopinom natrijevog borhidrida u razrijeđenoj otopini natrijevog hidroksida. Reakcijom natrijevog borhidrida s kiselinom stvaraju se atomi vodika koji zatim reagiraju s različitim elementima u uzorku (Hg, Sb, As, Bi, Ge, Pb, Se, Te i Sn) pri čemu nastaju hlapljivi hidridi navedenih elemenata. Plinoviti hidridi zatim se odvajaju od ostatka reakcijske smjese i uvode u plazmu.

Sama plazma se generira u plamenicima koji mogu biti u dva položaja: radijalnom (engl. *side-on viewing*) i aksijalnom (engl. *end-on viewing*), a njihov shematski prikaz nalazi se na slici 5. U slučaju radijalnog plamenika signal se sakuplja iz čitave normalne analitičke zone. Takav plamenik kod složenih matrica (alkalijske i organske) pokazuje bolje detekcijske granice od aksijalnog plamenika. Također, velika mu je prednost primjenjivost na različite

matrice, dulji vijek trajanja i manja potrošnja argona. Aksijalni plamenici pak daju veće vrijednosti intenziteta, a u jednostavnim matricama pokazuju bolje detekcijske granice od radijalnih plamenika.



Slika 5: Radijalni (A) i aksijalni (B) plamenik<sup>18</sup>

Danas postoje i tzv. “*dual-view*” plamenici koji omogućuju istovremeno praćenje i radijalnog i aksijalnog moda.

Svo generirano zračenje prikuplja se konveksnim lećama ili konkavnim zrcalom te se usmjerava u spektrometar. Funkcija spektrometra je primanje bijele svjetlosti ili polikromatskog zračenja i njegovo dispergiranje u monokromatsko zračenje nakon čega se koristi jedna ili više izlaznih pukotina na izlaznoj ravnini ili kružnici kako bi se omogućio prolazak samo određenih valnih duljina do detektora, a blokirao prolazak ostalih. Spektrometar kod kojeg se koristi mnoštvo izlaznih pukotina i detektora naziva se polikromator, a ukoliko spektrometar sadrži samo jednu izlaznu pukotinu i detektor, tada je riječ o monokromatoru. Najčešće korišteni polikromator je *Paschen-Runge-ov*, a od monokromatora često se primjenjuju *Czerny-Turner-ov* i *Ebert-ov*. Polikromatori omogućuju mjerenje više elemenata istovremeno, dok monokromatori “skeniraju” jednu po jednu emisijsku liniju. Zračenje nakon prolaska kroz izlaznu pukotinu dolazi do detektora, a najčešće korišteni detektori su fotomultiplikator i CCD detektor.<sup>18</sup>

Uzorci koji se analiziraju metodom ICP-AES su vodene otopine koje se uvode u plazmu kao aerosoli. Za multielementnu analizu potrebno je 2-5 mL proporcionalno broju određivanih elemenata, a posebnim raspršivačkim sustavom moguće je uvoditi i mikrolitarske uzorke.

ICP-AES omogućava brzu simultanu analizu većeg broja elemenata korištenjem kompromisnog sustava multielementne analize. Navedeni sustav podrazumijeva korištenje multielementnih standarda koji sadrže soli svih elemenata koji se analiziraju. Standardne otopine mogu se pripremati u rasponu koncentracija od šest redova veličine pa se kalibracijski pravac može koristiti za različita koncentracijska područja i omogućava simultano određivanje glavnih elemenata i elemenata u tragovima.

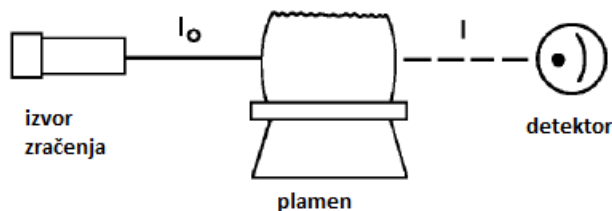
Prilikom određivanja velikog broja elemenata detekcijske se granice kreću u području  $1 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Općenito, detekcijske granice ovise o tipu plazma izvora, raspršivača i spektrometra te o vrsti analita. Za potrebe grubih kvantitativnih analiza nužno je da koncentracija analita bude barem pet puta veća od same detekcijske granice. U slučaju kvantitativnih analiza, koje moraju pokazati visoku točnost, koncentracija analita mora biti 10 puta veća. Visoka temperatura i dugo zadržavanje uzorka (2-3 ms) omogućavaju vrlo niske detekcijske granice. Detekcijska granica se prema IUPAC-u postavlja definiranjem omjera signala i šuma gdje signal mora biti tri puta veći od šuma i tada se u šumove mogu ubrojiti sve smetnje koje utječu na intenzitet linije analita. Ukupni intenzitet šuma određuje se analizom slijepe probe (kompletna matrica bez analita, odnosno elementa od interesa). Ukoliko je koncentracija nekih elemenata u uzorku niža od detekcijske granice, za njihovo je određivanje nužno prije analize uzorak podvrgnuti postupku prekoncentriranja.

Točnost opisuje slaganje između dobivenih rezultata i stvarne vrijednosti, a ovisi o sličnosti kalibracijskih standarda i uzorka. Tako se za vodene otopine s velikim variranjem u sastavu doseže točnost od 10 %. Preciznost opisuje slaganje između mjerenja izvedenih na jednak način. Za koncentracije analita 100 puta veće od detekcijske granice preciznost mjerenja, izražena kroz relativnu standardnu devijaciju (RSD %), kreće se u rasponu od 0,1 do 2,0 %.

Uzroci najvećih pogrešaka prilikom mjerenja su spektralne interferencije. Visoka temperatura pobuđuje velik broj elemenata te je tada ukupno zračenje, koje pada na detektor, puno veće, a spektri time sadrže velik broj linija koje se međusobno preklapaju. Spektralne je interferencije moguće smanjiti odabirom pogodnih emisijskih linija za svaki element, većom rezolucijom spektrometra te korekcijom pozadinskog šuma. Kemijske interferencije općenito nastaju reakcijom elemenata prisutnih u uzorku, no ovdje su one reducirane visokom temperaturom i inertnom atmosferom te ne predstavljaju problem. Fizikalne interferencije posljedica su promjene fizikalnih svojstava analita, a mogu se smanjiti izborom adekvatnog raspršivača, korištenjem peristaltičke pumpe, razrjeđenjem otopina i korištenjem unutarnjeg standarda. Ukoliko se sustav ne ispiri sa slijepom probom prije svakog sljedećeg uzorka, problem mogu stvarati memorijske interferencije. U tom slučaju će doći do pojačanja signala zbog analita koji je prethodno mjeren.<sup>19</sup>

### 2.2.2. Elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (ETAAS)

Kada zračenje određene valne duljine i intenziteta dođe u plamen, koji sadrži atome od interesa u osnovnom stanju, atomi apsorbiraju zračenje i prelaze u pobuđeno stanje, a time se smanjuje intenzitet upadnog zračenja. Detektor bilježi zračenje onoliko smanjenog intenziteta kolika je koncentracija određivanih atoma u plamenu. Količina apsorbiranog zračenja određuje se usporedbom upadnog i izlaznog zračenja. Na slici 6 shematski je prikazana izvedba tehnike atomske apsorpcije.



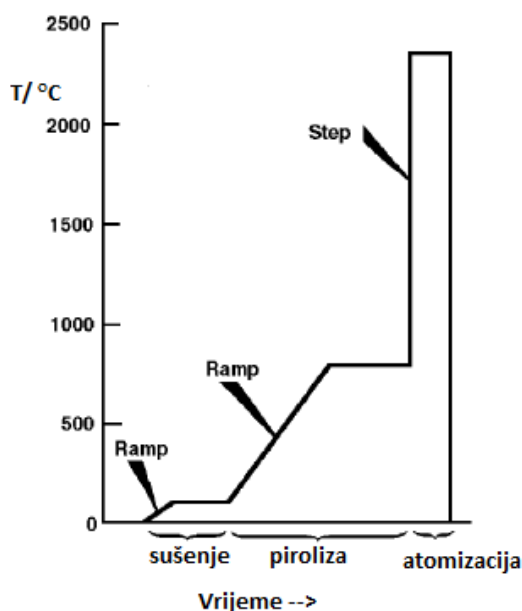
Slika 6: Nacrt izvedbe tehnike plamene atomske apsorpcije.<sup>20</sup>

Postoji nekoliko načina kako se definira količina apsorbiranog zračenja. U apsorpcijskoj se spektrometriji najčešće apsorbancijom određuje količina apsorbiranog zračenja upravo zbog njezine linearne ovisnosti o koncentraciji određivanog analita.<sup>20</sup>

U apsorpcijskoj spektrometriji problem mogu stvarati interferencije uzrokovane matricom i spektralne interferencije. Navede interferencije mogu se ukloniti. Ukoliko matrica uzorka uzrokuje interferencije, može se pristupiti metodi dodatka standarda ili se može promijeniti matrica uzorka, a ukoliko problem stvara pozadinska apsorpcija, tada se provodi  $D_2$ -korekcija ili korekcija temeljena na Zeemanovom efektu.<sup>19</sup>

### 2.2.2.1. Analitičke značajke metode ETAAS

Analiza tehnikom ETAAS obuhvaća mjerenje količine analita u poznatom volumenu uzorka u grafitnoj kiveti kroz proces od više temperaturnih koraka. U trenutku kada temperatura dovoljno naraste da uzrokuje atomizaciju uzorka, mjeri se apsorpcija analita. Varijable unutar samog procesa analize su volumen analiziranog uzorka te parametri zagrijavanja za svaki korak. Navedeni parametri uključuju krajnju temperaturu koja se postiže u pojedinom koraku, tzv. *ramp time* koji predstavlja vrijeme unutar kojeg se temperatura povećava, tzv. *hold time* ili vrijeme trajanja održavanja konačne temperature i tip i brzina protoka unutarnjeg plina. Tipični program zagrijavanja uključuje korake sušenja, pirolize i atomizacije te je prikazan na slici 7.



Slika 7: Program zagrijavanja u analizi tehnikom ETAAS.<sup>21</sup>

Koraci zagrijavanja u metodi ETAAS:Korak 1: sušenje uzorka

Nakon što se uzorak smjesti u grafitnu kivetu, potrebno ga je osušiti. Za vodene otopine se temperature sušenja najčešće kreću između 100 i 120 °C. Vrijeme potrebno za postizanje temperature sušenja (engl. *ramp time*) može se podešavati prema potrebi pa tako dulje vrijeme postepenog rasta temperature omogućuje sporije zagrijavanje sustava. Nakon postizanja temperature sušenja provodi se proces sušenja uzorka u trajanju kraćem od minute (engl. *hold time*). Unutarnji protok plina se za vrijeme trajanja sušenja ostavlja na svojoj maksimalnoj vrijednosti (250-300 mL u minuti) kako bi se uspješno istisnulo evaporirano otapalo iz kivete.

Korak 2: piroliza

Svrha pirolize jest selektivna volatilizacija organskih i anorganskih komponenti iz uzorka pri čemu analit zaostaje u manje kompleksnoj matrici pogodnijoj za analizu. U ovom je koraku potrebno podesiti temperaturu dovoljno visoko da volatilizira željene komponente, ali da pritom ne uzrokuje gubitak analita. Odabir temperature ovisi o vrsti analita te o sastavu same matrice, a unutarnji protok plina i dalje je isti kao i u prethodnom koraku kako bi istisnuo volatilizirane komponente iz kivete. Dodatno, u svrhu dekompozicije uzorka moguće je korišteni plin zamijeniti sa zrakom ili kisikom.

Korak 3: atomizacija

Ovim se korakom stvaraju pare atoma jednog ili više elementa od interesa čime se omogućuje mjerenje atomske apsorpcije. Temperatura, pri kojoj se odvija atomizacija, je karakteristika svakog pojedinog elementa, a njezino se postizanje treba provesti u što kraćem vremenskom periodu. Za dodatno povećanje osjetljivosti i smanjenje mogućih interferencija potrebno je pare atoma što dulje zadržati u grafitnoj peći u kojoj se mjeri apsorpcija. Kako bi se to postiglo, smanjuje se ili u potpunosti gasi protok unutarnjeg plina. Čim ovaj korak započne, spektrometar kreće mjeriti apsorpciju zračenja.

### Generiranje signala

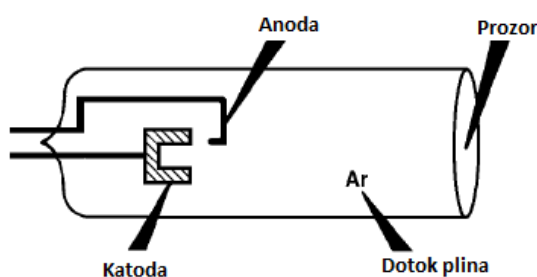
Generirani atomi izlaze iz grafitne kivete pa u cijelom procesu dolazi do porasta (prilikom generiranja atoma) i pada (izlaženjem atoma iz grafitne peći) količine apsorbiranog zračenja pa se signal bilježi u obliku pika. U svrhu dobivanja kvantitativne informacije računa se visina pika ili površina ispod pika. Signal, koji se dobiva ovom tehnikom, ovisi o masi analita pa se korištenjem većih volumena uzoraka postižu jači signali. Analitički se raspon tako može kontrolirati variranjem volumena uzorka. Za vrlo niske koncentracije analita koristi se najveći mogući volumen uzorka, dok je za veće koncentracije analita moguće smanjiti volumen uzorka. U svakom slučaju, za većinu analiza primjenjuje se volumen uzorka od 20  $\mu\text{L}$ .<sup>21</sup>

#### 2.2.2.2. Instrumentacija

##### a) Izvor zračenja

Atom apsorbira zračenje pri određenim valnim duljinama. Kako bi se mogla izmjeriti apsorpcija zračenja uz maksimalnu osjetljivost, koriste se linijski izvori koji emitiraju zračenje specifične valne duljine. Navedeni izvor zračenja čini atomsku apsorpciju specifičnom tehnikom sa samo nekoliko spektralnih interferencija.

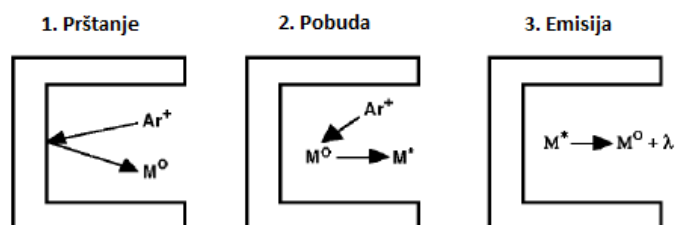
Šuplja katodna lampa (slika 8) je linijski izvor zračenja koji emitira specifične linije elementa nanešenog na unutrašnjost katode. Ograničavajuće svojstvo ovog izvora zračenja leži u nepogodnosti nekih metala za nanošenje na katodu zbog njihove hlapljivosti ili vodičkih svojstava.



Slika 8: Šuplja katodna lampa.<sup>22</sup>



Anoda i katoda nalaze se u staklenom cilindru koji je obično punjen s neonom ili argonom pri niskom tlaku, a na samom kraju staklenog cilindra nalazi se prozor kroz koji prolazi emitirano zračenje. Emisijski proces ilustriran je na slici 9.



Slika 9: Emisijski proces u šupljoj katodnoj lampi.<sup>22</sup>

Primjenom električnog potencijala između katode i anode dolazi do ionizacije nekolicine atoma plina koji se nalaze u šupljoj katodnoj lampi. Pozitivno nabijeni ioni plina ubrzavaju u električnom polju, sudaraju se s negativno nabijenom katodom te time izbijaju atome metala (prštanje). Izbijeni metalni atomi zatim se pobuđuju prijenosom kinetičke energije iona plina te u konačnici emitiraju zračenje koje se dovodi do uzorka i koje analit apsorbira.<sup>22</sup>

#### b) Grafitna peć

Grafitna se peć sastoji od triju dijelova: grafitne kivete, grafitne elektrode i plašta. Grafitna kiveta načinjena je od grafita velike gustoće te je presvučena slojem pirolitičkog grafita. Grafitne elektrode spojene su na izvor struje velike jakosti (500 A), a malog napona (10 V) što omogućuje mijenjanje snage i temperature. Plašt čine dvije stijenke između kojih protječe voda koja služi za brzo hlađenje kivete prije unošenja uzorka. Dodatno, propuhivanjem argonom ili dušikom zaštićuju se kiveta i uzorak od oksidacije.<sup>19</sup>

#### c) Spektrometar

Općenito se u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji primjenjuju fotometri, a riječ je o spektrometrima koji prenose zračenje iz izvora do monokromatora (najčešće *Czerny-Turner*-ov) koji ga zatim dalje usmjerava prema detektoru. Koriste se tri tipa fotometra: jednosnopni, dvosnopni i pseudodvosnopni fotometar.<sup>19</sup>

### 2.2.2.3. Tehnika HydrEA

Sve je jača potreba za sustavima koji će omogućiti provođenje automatiziranih mjerenja visoke osjetljivosti za određivanje elemenata u tragovima, a pritom biti neosjetljivi na moguće interferencije. Problem se općenito javlja prilikom određivanja elemenata kao što su arsen, selenij ili antimon jer je njih obično vrlo malo u uzorcima, a samom tehnikom generiranja hidrida nije moguće dovoljno prekoncentrirati uzorke prije provođenja analize.

Spregom tehnike generiranja hidrida s elektrotermalnom atomizacijom u grafitnoj peći rješava se gore navedeni problem. Kombiniranjem prednosti obje tehnike dolazi do poboljšanja detekcijskih granica. Prvi korak analize tehnikom HydrEA jest generiranje hidrida u tzv. hidridnoj jedinici koji se zatim u struji argona dovode u grafitnu kivetu obloženu iridijem koji na sebe veže metalne hidride. Drugi korak analize jednak je kao u slučaju elektrotermalne atomizacije. Osim boljih detekcijskih granica, ostale prednosti tehnike HydrEA su i automatiziranost cijele analize i minimizirana prisutnost interferencija. Slika 10 prikazuje instrument za provođenje tehnike HydrEA.



Slika 10: Instrumentacija tehnike HydrEA<sup>23</sup>

Detekcijske granice za određivanje arsena tehnikom HydrEA iznose  $0,012 \mu\text{g L}^{-1}$  za emisijsku liniju pri 193,7 nm. Kada se ove detekcijske granice usporede s onima u tradicionalnoj tehnici generiranja hidrida, uočava se poboljšanje za faktor 4,5.<sup>23</sup>

### 2.3. Kratkokljuni čapljan (*Erodium cicutarium*)

*Erodium cicutarium* (L.) L'Her., (hrv. Kratkokljuni čapljan) je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka koja raste u mediteranskim područjima Europe, Azije i Sjeverne Afrike, a spada u razred Magnoliopsida, red Geraniales te obitelj Geraniaceae. S vremenom se rasprostranila i u Sjevernoj Americi, Australiji, Novom Zelandu, Japanu, Čileu, Azorskim otocima i dalekom istoku Rusije vrlo vjerojatno preko krzna ili perja životinja ili preko ptica koje jedu sjeme i preko malih sisavaca. Prirodno stanište *Erodium cicutarium* su travnjaci i šume te topli i suha područja. Jednom kada se ova biljka nastani na određeno područje, njezino gusto raslinje eliminira nativnu vegetaciju. Ono što *Erodium cicutarium* čini opasnom za prirodnu vegetaciju čini njezina tolerancija na velik raspon tipova tla, od onih kiselih pa sve do alkalnih. Iako je ova biljka relativno kratkoživuća, njezino sjeme može preživjeti čak pet godina nakon što se zakopa u tlo. *Erodium cicutarium* lako se može prepoznati po svojim karakterističnim plodovima s bodljikama koje se spiralno namotaju u suhim uvjetima te se odmotaju kada su uvjeti vlažni. Na taj se način olakšava pomicanje sjemena po površini tla te ukopavanje sjemenki u tlo. Ova biljka važna je hrana za stoku, konje, ovce, neke vrste ptica i kлокane, a zbog svojih antioksidativnih svojstava sve se više ispituju mogućnosti njezine medicinske primjene.<sup>24</sup> Slika 11 prikazuje *Erodium cicutarium*.



Slika 11: *Erodium cicutarium*.<sup>25</sup>

Stabljika *Erodium cicutarium* je polegnuta ili uzlazeća, na osnovi razgranata, a naraste 10-40 cm u visinu. Listovi su izduženi i ovalni te dvostruko perasto urezani s duljinama od 3-16 cm. Cvjetovi su dvospolni, a na pojedinom dršku ih ima do sedam. Vjenčić je građen od pet svjetlocrvenih ili ljubičastocrvenih latica. Ovu biljku oprašuju pčele, leptiri i kornjaši, a cvjeta od travnja do lipnja, ponekad i do jeseni. Plod ove biljke je tobolac s dugim kljunom koji se raspada na pet dijelova od kojih svaki nosi po jednu svjetlosmeđu sjemenku dugu oko 3 mm.<sup>25</sup>

Što se tiče kemijskog sastava, *Erodium cicutarium* sadrži tanine, katekine, galnu kiselinu, elaginsku kiselinu, šećere (glukozu, galaktozu i fruktozu), aminokiseline (glicin, alanin, prolin, histidin, triptofan, tirozin, glutaminsku kiselinu), vitamine K i C i velik broj esencijalnih i eteričnih ulja. Iz navedenog je kemijskog sastava lako za pretpostaviti da bi ova biljka mogla imati mnoštvo farmakoloških efekata, a novija istraživanja to i potvrđuju. *Erodium cicutarium* tako pokazuje antibakterijska, antigljivična, antivirusna, antioksidativna i analgetska svojstva. Cijela se biljka potencijalno može koristiti za zaustavljanje unutarnjeg krvarenja, a ekstrakti biljke mogli bi naći svoju primjenu u tradicionalnoj medicini u obliku lijekova za želučane tegobe i hemoroide, dok bi se čaj od listova biljke mogao koristiti kao diuretik. Primjenom biljke na površini kože mogle bi se tretirati različite kožne infekcije. Prema nekim istraživanjima listovi *Erodium cicutarium* pokazuju i djelotvornost u liječenju reumatizma ukoliko ih se namoči u vodu za kupanje. Iz navedenog je vidljivo da ova biljka ima obećavajuća svojstva te bi se u skorije vrijeme mogla početi aktivno primjenjivati za poboljšanje zdravlja pojedinca.<sup>26</sup>

U dosadašnjim istraživanjima znanstvenici su prvenstveno bili usmjereni na određivanje antioksidativnih svojstava, a podaci o elementnom sastavu su ograničeni na zastupljenost esencijalnih elemenata kao što su Ca, Fe, i K. Određivala se prisutnost i količina esencijalnih ulja, flavonoida i tanina, no da bi se utvrdila sigurnost primjene ove biljke u medicinske svrhe, potrebno je provoditi i analize zastupljenosti teških metala.<sup>27,28</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

#### 3.1.1. Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu

- Destilirana deionizirana voda, Mili-Q Element 18 System (Milipore, USA)
- Dušična kiselina, HNO<sub>3</sub> for trace analysis 70% (Fluka, Germany)
- Vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% (Kemika, Zagreb, Croatia)
- Klorovodična kiselina, HCl for ultratrace analysis 30-35 % (Fluka, Canada)
- Klorovodična kiselina, HCl for ultratrace analysis, 37 % (Scharlau)
- Jednoelementna standardna otopina arsena (As), 1001 ± 5 µg mL<sup>-1</sup> (Inorganic Ventures)
- Natrijev borhidrid, NaBH<sub>4</sub>, prah (Scharlau)
- Natrijev hidroksid, NaOH, peleti (Carlo Erba)
- Kalijev jodid, KI, (Scharlau)
- L(+) - askorbinska kiselina, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, (Merck, Germany)

#### 3.1.2. Certificirani referentni materijali korišteni u eksperimentalnom radu

- CRM 1573a (*eng. Tomato leaves*), uzorak listova rajčice, Standard reference material, National Institute of Standards & Technology
- CRM 1570a (*eng. Spinach leaves*), uzorak listova špinata, Standard reference material, National Institute of Standards and Technology

#### 3.1.3. Instrumentacija

- Mikrovalna pećnica za digestiju uzoraka, MWS-2 *Microwave System Speedware* (Berghof, Eningen, Germany)
- Optički plazma spektrometar, Prodigy High Dispersion *ICP-OES* (Teledyne Leeman Labs, Hudson, NH, USA)
- Ultrazvučna kupelj
- Atomska apsorpcijski spektrometar sa grafitnom kivetom (ETAAS), *ZEE nit 700P*, (analytikjena)

### 3.2. Priprema uzoraka za analizu

Uzorci za analizu dobavljeni su zahvaljujući susretljivosti magistre farmacije Vanje Ljoljić Bilić, asistentice na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pripremane su tri serije uzoraka za analizu. Razgradnja uzoraka odvijala se u kiselom mediju (dušična kiselina i vodikov peroksid ili klorovodična kiselina) primjenom mikrovalnog zračenja ili stavljanjem uzoraka u ultrazvučnu kupelj.

#### 3.2.1. Digestija uzoraka mikrovalnim zračenjem

##### a) U mediju dušične kiseline i vodikovog peroksida

Izvagani su uzorci suhih ekstrakata biljke *Erodium cicutarium* te uzorci certificiranih referentnih materijala. Točne odvage praškastih uzoraka biljnog materijala kretale su se u rasponu od 200 mg za certificirane referentne materijale do 500 mg za uzorke biljke *Erodium cicutarium*. Uzorci su se prebacili u teflonske posude te je u svaki od njih dodano 8 mL dušične kiseline te 3 mL vodikovog peroksida. Uzorci su zatim podvrgnuti mikrovalno potpomognutoj razgradnji u zatvorenom sustavu uređaja MWS-2 *Microwave System Speedware*. Mikrovalno potpomognuto razaranje uzoraka odvijalo se u tri koraka pri čemu se koraci mogu razlikovati u primijenjenoj temperaturi, vremenu trajanja i snazi zračenja. Program razgradnje uzoraka primijenjen u ovoj analizi prikazan je u tablici 1. Uzorci su nakon digestije profiltrirani u tikvice od 25 mL te nadopunjeni destiliranom deioniziranom vodom (Mili-Q) do oznake.

Tablica 1: Program mikrovalnog razaranja uzoraka

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme / min	Snaga / %
1	120	15	60
2	160	15	40
3	100	10	40

*b) U mediju klorovodične kiseline*

Izvagani su uzorci suhih ekstrakata biljke *Erodium cicutarium* te uzorci certificiranih referentnih materijala. Točne odvage praškastih uzoraka biljnog materijala kretale su se u rasponu od 200 mg za certificirane referentne materijale do 500 mg za uzorke biljke *Erodium cicutarium*. Uzorci su se prebacili u teflonske posude te je u svaki od njih dodano 8 mL klorovodične kiseline. Mikrovalno potpomognuta razgradnja uzoraka odvijala se u zatvorenom sustavu uređaja MWS-2 *Microwave System Speedware* čiji je program razgradnje prikazan u tablici 2. Uzorci su nakon razgradnje profiltrirani u tikvice od 25 mL te nadopunjeni destiliranom deioniziranom vodom (Mili-Q) do oznake.

Tablica 2: Program mikrovalnog razaranja uzoraka

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme / min	Snaga / %
1	75	15	50
2	75	15	60
3	75	15	40

**3.2.2. Digestija uzoraka u ultrazvučnoj kupelji**

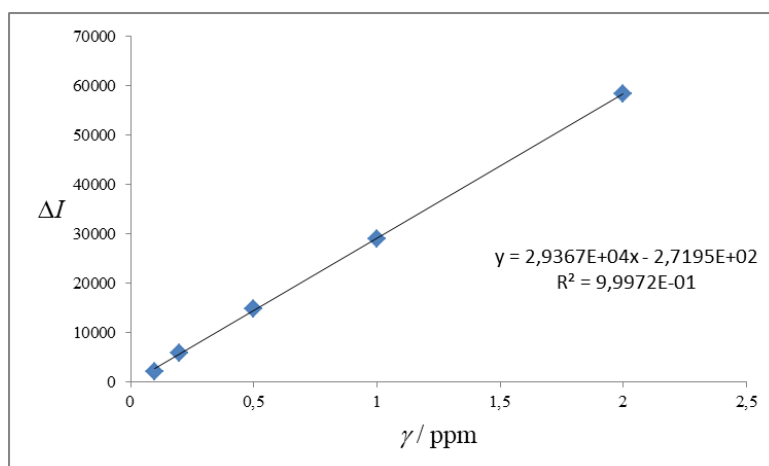
Izvagani su uzorci suhih ekstrakata biljke *Erodium cicutarium* te uzorci certificiranih referentnih materijala. Točne odvage praškastih uzoraka biljnog materijala kretale su se u rasponu od 200 mg za certificirane referentne materijale do 500 mg za uzorke biljke *Erodium cicutarium*. Uzorci su se prebacili u staklene epruvete te je u svaki od njih dodano 10 mL klorovodične kiseline. Tako pripremljeni uzorci stavljeni su u ultrazvučnu kupelj na tri sata, a zatim profiltrirani u tikvice od 25 mL i nadopunjeni destiliranom deioniziranom vodom (Mili-Q) do oznake.

### 3.3. Analiza uzoraka

#### 3.3.1. Analiza uzoraka metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES)

##### 3.3.1.1. Priprema kalibracijskih otopina

Za pripremu otopina za kalibraciju koristila se jednoelementna standardna otopina arsena koncentracije  $1001 \pm 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Razrijeđivanjem navedene otopine s 10%-tnom klorovodičnom kiselinom u tikvicama od 10 mL priredile su se kalibracijske otopine koncentracija 0,1, 0,2, 0,5, 1 i 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kalibracijski dijagram dobiven iz ovisnosti izmjerenih intenziteta zračenja pri 193,7 nm o navedenim koncentracijama prikazan je na slici 12.



Slika 12: Kalibracijski dijagram za metodu ICP-OES

##### 3.3.1.2. Parametri metode ICP-AES

U svrhu kvantitativnog određivanja arsena u suhim ekstraktima biljke *Erodium cicutarium* korišten je atomski emisijski spektrometar uz induktivno spregnutu plazmu (Prodigy High Dispersion ICP-AES). Radni parametri navedenog instrumenta prikazani su u tablici 3. Vrijeme integracije postavilo se na 5 sekundi, a signal se prikupljao iz aksijalnog smjera, odnosno položaja plamenika. Za svaku se otopinu snimanje ponavljalo tri puta.



Tablica 3: Radni parametri za ICP-AES eksperiment

<b>Spektrometar</b>	Ešeletni spektrometar visoke rezolucije L-PAD detektor
<b>Raspršivač</b>	Pneumatski (stakleni)
<b>Komora za raspršivanje</b>	Ciklonska (stakleni)
<b>Položaj plamenika</b>	Aksijalni
<b>RF generator</b>	40 MHz
<b>Snaga generatora</b>	1,3 Kw
<b>Protok argona</b>	Glavni 18 L min <sup>-1</sup> Pomoćni 0,8 L min <sup>-1</sup> Raspršivanje 1 L min <sup>-1</sup>
<b>Peristaltička pumpa</b>	0,9 mL min <sup>-1</sup>
<b>Odgoda unosa uzorka</b>	20 sekundi

### 3.3.2. *Analiza uzoraka metodom elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije (ETAAS)*

#### 3.3.2.1. Redukcija As(V) u As(III)

Uzorci pripremljeni prethodno opisanim postupkom koristili su se i za analizu elektrotermičkom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Međutim, bilo je potrebno provesti prereduciju tih uzoraka pri čemu se As(V) prevodio u As(III). U navedenu svrhu koristila se 5% - tna otopina kalijevog jodida i askorbinske kiseline.

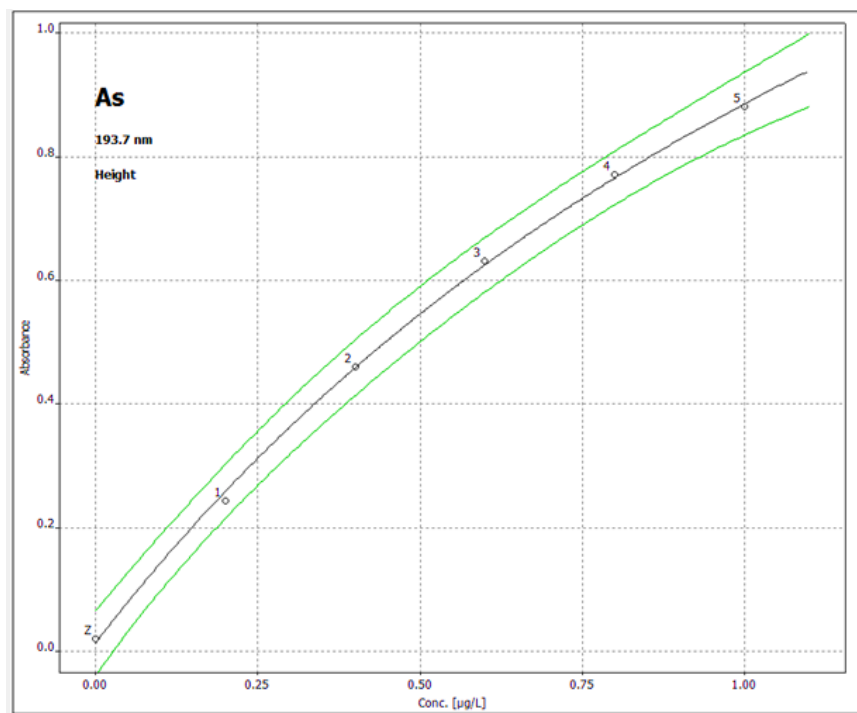
U epruvetu za mjerenje dodalo se redom:

- 6 mL destilirane deionizirane vode (Mili-Q)
- 12 mL koncentrirane klorovodične kiseline (HCl)
- 6 mL uzorka
- 5 kapi 10 %-tne aminosulfonske kiseline ( $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$ )
- 6 mL 5%-tne otopine kalijevog jodida i askorbinske kiseline

Tako pripremljene otopine morale su odstajati 30 minuta kako bi se redukcija uspješno provela, a uzorci bili spremni za analizu.

#### 3.3.2.2. Priprema kalibracijskih otopina

Za pripremu otopina za kalibraciju koristila se jednoelementna standardna otopina arsena (V) koncentracije  $1001 \pm 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . U tikvice od 50 mL dodano je 20 mL 6 M klorovodične kiseline, 10 mL 5 %-tne otopine kalijevog jodida i askorbinske kiseline te odgovarajući volumen standarda arsena kako bi se priredile kalibracijske otopine s koncentracijama arsena od 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tikvice su se zatim nadopunile destiliranom deioniziranom vodom (Mili-Q) do oznake. Kalibracijski dijagram dobiven iz ovisnosti izmjerenih apsorbanacija pri valnoj duljini 193,7 nm o koncentracijama kalibracijskih otopina prikazan je na slici 13.



Slika 13: Kalibracijski dijagram za metodu HydrEA

### 3.3.2.3. Parametri metode HydrEA - ETAAS

U svrhu kvantitativnog određivanja ukupnog arsena u suhim ekstraktima biljke *Erodium cicutarium* korišten je uređaj za elektrotermičku atomsku apsorpcijsku spektrometriju (ZEEnit 700P). Taj je uređaj u sprezi sa sustavom za generiranje hidrida pa se takva hibridna tehnika zove HydrEA. Radni parametri navedene tehnike prikazani su u tablici 4. Korištena je arsenova šuplja katodna lampa, a izbor linije na monokromatoru ugođen je na 193,7 nm. Za generiranje hidrida prije unošenja uzorka u grafitnu kivetu korištena je 0,3%-tna otopina natrijevog borhidrida. Apsorbancija analita, kojom se analit kvantificirao, određivala se prema položaju vrha pika dobivenog apsorpcijskog signala. Za uklanjanje spektralnih interferencija koristila se deuterijeva lampa (tzv. D<sub>2</sub> korekcija).

Tablica 4: Radni parametri metode HydrEA - ETAAS

Korak	Naziv	Temperatura / °C	Temperaturni skok °C s <sup>-1</sup>	Zadržavanje / s	Vrijeme trajanja /s	Protok plina unutarnji/vanjski
1	Sušenje	300	300	2	2,9	Stop stop
2	Piroliza	305	50	20	20,1	Max stop
3	Interna kalibracija	305	0	6	6,0	Stop stop
4	Atomizacija	2100	1000	5	6,8	Stop stop
5	Čišćenje	2200	500	4	4,2	Max stop

### 3.4. Usporedba analitičkih metoda

Analitičke metode određivanja arsena (ICP-AES i ETAAS) statistički su uspoređene testiranjem značajnosti pomoću sparenog Studentovog  $t$ -testa. Također je korišten i ne-parametarski Tukey box plot prikaz. Rezultati su prikazani dijagramom s pravokutnikom (engl. *box and whisker plot*). Dijagram s pravokutnikom je jednostavan grafički prikaz rezultata kojim se očitava srednja vrijednost (medijan) i raspon vrijednosti varijable. Sastoji se od pravokutnika koji prikazuje podatke od donjeg do gornjeg kvartila. Crta u sredini pravokutnika označava medijan. Donje i gornje horizontalne linije (engl. *whisker*), mogu se različito definirati, ali najčešće predstavljaju najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1,5 interkvartilnog raspona (gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila). Sve točke izvan te granice crtaju se posebno i smatraju vrijednostima koje odudaraju od očekivanih vrijednosti (engl. *outliers*). Izgled dijagrama *b-w* ukazuje na stupanj raspršenosti i asimetričnosti (engl. *skewness*).

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kontrola točnosti analitičkih postupaka i mjerenja

Certificirani referentni materijali koriste se za utvrđivanje točnosti analitičkog postupka, a odabiru se na temelju sličnosti s elementnim sastavom uzorka. U svrhu ovog istraživanja korišteni su referentni materijali listova rajčice i listova špinata (CRM 1573a *Tomato leaves* i CRM 1570a *Spinach leaves*). Tablica 5 prikazuje izmjerene količine arsena u certificiranim referentnim materijalima i odstupanje dobivene vrijednosti od stvarne vrijednosti.

Tablica 5: Izmjerene količine arsena u certificiranim referentnim materijalima metodama ICP-AES i ETAAS

CRM	Certificirana vrijednost $\pm \sigma$	Mjereno ICP-AES-om	Odstupanje / %	Mjereno HydrEA-ETAAS	Odstupanje / %
	$\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1}$	$\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1}$			
<b>Listovi rajčice</b> (engl. <i>Tomato leaves</i> )	112 $\pm$ 4	HCl + ultrazvuk 444,14	296,6 %	<b>HCl + ultrazvuk</b> <b>113,38</b>	<b>1,232 %</b>
		HCl + MW 273,22	143,9 %	HCl + MW 27,07	75,83 %
		3. HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 373,67	233,6 %	HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Neuspješno mjerjenje	-
<b>Listovi špinata</b> (engl. <i>Spinach leaves</i> )	68 $\pm$ 12	HCl + ultrazvuk 297,27	337,2 %	HCl + ultrazvuk 43,85	21,70 %
		HCl + MW 718,78	957,0 %	HCl + MW Neuspješno mjerjenje	-
		HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 199,03	192,7 %	HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Neuspješno mjerjenje	-

Analiza ICP-AES-om nije pokazala zadovoljavajuće rezultate. Za oba se referentna materijala dobivene vrijednosti drastično razlikuju od certificiranih vrijednosti. Različit način ekstrakcije arsena također nije dao bolje rezultate. Razlog ovako velikih odstupanja leži u mnoštvu generiranih signala u plazmi od kojih su neki vrlo bliski signalima arsena te time prividno daju jači odziv i veću koncentraciju. Iz navedenog su se razloga uzorci analizirali i tehnikom ETAAS, odnosno HydrEA, koja pokazuje bolju osjetljivost i razlučivanje signala, a korištenjem katodne lampe s arsenovom linijom spektralne su interferencije svedene na minimum.

Analiza tehnikom ETAAS dala je zadovoljavajuće rezultate u slučaju certificiranog referentnog materijala *Tomato leaves*, dok je u slučaju *Spinach leaves* relativna standardna devijacija ipak veća. Razlog tomu može biti njegoa poprilično različita matrica od matrice uzoraka, ali i sama kvaliteta referentnog materijala. *Tomato leaves* tako je pokazao bolju kvalitetu i pouzdanost kao certificirani referentni materijal. Metoda ETAAS uz prethodnu ekstrakciju arsena u klorovodičnoj kiselini u ultrazvučnoj kupelji prihvaća se za analizu arsena u uzorcima biljke *Erodium cicutarium*, a dobiveni rezultati uzimaju se kao pouzdani i točni. Ostali načini ekstrakcije arsena nisu niti korištenjem tehnike ETAAS pokazali zadovoljavajuće rezultate.

## 4.2. Sadržaj arsena u biljnom materijalu određen metodama ICP-AES i ETAAS

Arsen je u biljkama prisutan u niskim koncentracijama te je za njegovo određivanje nužno imati tehniku koju karakteriziraju niske detekcijske granice. ICP-AES metoda, unatoč svojim niskim detekcijskim granicama, nije omogućila uspješno određivanje arsena, a tablica 6 prikazuje koncentracije arsena dobivene ovom metodom.

Tablica 6: Koncentracije arsena u biljnim ekstraktima *Erodium cicutarium* određene metodom ICP-AES

Uzorak	Ekstrakcija u	MW	MW ekstrakcija u
	HCl + ultrazvuk	ekstrakcija u HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HCl
	$\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1} \pm \sigma$	$\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1} \pm \sigma$	$\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1} \pm \sigma$
<b>1</b>	408,3 ± 6,125	-	419,5 ± 6,293
<b>2</b>	523,8 ± 7,857	-	443,8 ± 6,657
<b>3</b>	747,6 ± 11,21	517,4 ± 7,761	1516 ± 22,74
<b>4</b>	323,9 ± 4,859	159,2 ± 2,388	-
<b>5</b>	613,1 ± 9,197	339,7 ± 5,096	478,6 ± 7,179
<b>6</b>	379,0 ± 5,685	-	369,0 ± 5,535
<b>7</b>	219,3 ± 3,290	267,9 ± 4,019	334,6 ± 5,019
<b>8</b>	998,5 ± 14,98	667,6 ± 10,01	-
<b>9</b>	109,6 ± 1,644	349,0 ± 5,235	-
<b>10</b>	109,5 ± 1,643	188,6 ± 2,819	293,5 ± 4,403

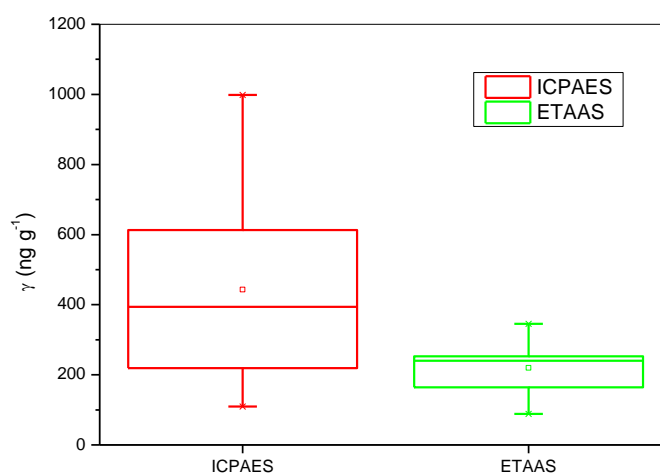
Metodom ETAAS (HydrEA) uspješno su se odredile koncentracije arsena u biljnim ekstraktima *Erodium cicutarium*. Kontrolom točnosti analitičkog postupka ekstrakcija arsena u klorovodičnoj kiselini i u ultrazvučnoj kupelji pokazala se adekvatnom pa su te koncentracije prihvaćene kao točne. Tablica 7 prikazuje koncentracije arsena dobivene tehnikom HydrEA nakon provođenja triju različitih ekstrakcijskih postupaka. Uzorci pripremljeni u mediju dušične kiseline i vodikovog peroksida nisu se mogli analizirati ovom metodom jer su se pretjerano pjenili prilikom pokušaja analize.



Tablica 7: Koncentracije arsena u biljnim ekstraktima *Erodium cicutarium* određene metodom HydrEA

Uzorak	Ekstrakcija u HCl + ultrazvuk $\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1} \pm \sigma$	MW ekstrakcija u $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ $\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1} \pm \sigma$	MW ekstrakcija u HCl $\gamma(\text{As}) / \text{ng g}^{-1} \pm \sigma$
1	205,8 ± 3,087	-	55,38 ± 0,8307
2	242,6 ± 3,639	-	192,0 ± 2,880
3	305,9 ± 4,589	-	174,9 ± 2,624
4	253,0 ± 3,795	-	-
5	248,4 ± 3,726	-	390,8 ± 5,862
6	237,9 ± 3,569	-	216,1 ± 3,242
7	164,2 ± 2,463	-	237,6 ± 3,564
8	345,4 ± 5,181	-	-
9	88,60 ± 1,329	-	-
10	109,3 ± 1,640	-	221,1 ± 3,317

Uspoređene su analitičke metode određivanja arsena (ICP-AES i ETAAS) neparametrijskim Tukey box testom i rezultati usporedbe prikazani su na slici 12.



Slika 12. Box-plot dijagram za set određivanja arsena metodama ICP-AES i ETAAS

Rezultati prikazani grafički na slici 12 pokazuju specifične karakteristike pojedine varijable u skupu podataka. U metodi dijagrama s pravokutnikom (*b-w*) svaki pravokutnik sadrži vrijednost medijana, 25° i 75° percentila i horizontalne linije (engl. *whiskers*), koje predstavljaju najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1,5 interkvartilnog raspona gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila. Iz slike je vidljiv veliki rasap mjerenih rezultata metodom ICP-AES u odnosu na rezultate mjerene tehnikom ETAAS. Parametrijski Studentov *t*-test proveden na mjerenim podacima iz obje metode kao dva mala nezavisna uzorka pri stupnju značajnosti  $P = 0.05$  dao je sljedeće rezultate: izračunata *t*-vrijednost od 3,326 je veća od kritične vrijednosti  $t_c = 2,262$  što upućuje na statistički značajne razlike rezultata dobivenih u usporedbi metoda.

Uzrok toliko različitih rezultata ovisno o primijenjenoj metodi i načinu ekstrakcije leži u kemiji arsenovih specija koja je vrlo kompleksna te je teško predvidjeti ponašanje raznolikih arsenovih specija u uvjetima ekstrahiranja. Efikasnost ekstrakcije ovisi o različitim parametrima: matrici uzorka, tipu korištenog otapala, specijama koje se ekstrahiraju, vremenu trajanja ekstrakcije i temperaturi zagrijavanja.<sup>29</sup>

Ekstrakcija u dušičnoj kiselini i vodikovom peroksidu uz mikrovalno potpomognuto razaranje u teoriji omogućava ekstrakciju ukupne količine arsenovih specija iz uzorka. Riječ je o metodi ekstrakcije u kojoj se uzorak stavlja u jaku oksidirajuću kiselinu, a dodatak vodikovog peroksida dodatno pojačava oksidacijsku moć.<sup>30</sup> S obzirom da su se uzorci izlagali natrijevom borhidridu, u svrhu generiranja arsenovih hidrida, ključna zadaća ove tehnike ekstrakcije jest prevesti arsenove specije, koje nisu reducibilne, u formu koja će moći generirati hidride i biti kvantificirana. Neke od organskih specija arsena spadaju u te nereducibilne specije pa je njih potrebno u potpunosti razoriti tako da se prevedu u anorganske specije. Mikrovalna digestija uzorka omogućuje efikasno razaranje zbog istovremene primjene kiselih uvjeta, zagrijavanja, mikrovalnog zračenja i tlaka. No, glavni nedostatak ovog načina ekstrakcije jest nemogućnost kontrole temperature i tlaka. U dušičnoj kiselini dolazi do formiranja arsenatne kiseline ( $H_3AsO_4$ ) koja se nekontroliranim zagrijavanjem i variranjem tlaka pri visokoj temperaturi raspada na arsenov (V) oksid ( $As_4O_{10}$ ) koji se može raspasti na arsenov (III) oksid ( $As_2O_3$ ) i kisik ( $O_2$ ) ili može doći do njegove volatilizacije. Time je detektirana količina arsena u konačnici manja od stvarne. Dodatnim modifikacijama ove metode, u smislu bolje kontrole temperature i tlaka, ovaj način

ekstrakcije mogao bi biti efikasna metoda određivanja ukupne količine arsena u uzorcima biljnih ekstrakata.<sup>30,31,32</sup>

Ekstrakcija arsenovih specija u klorovodičnoj kiselini uz pomoć mikrovalnog razaranja uzorka također nije uspješno provedena iz jednakog razloga kao što je opisano u slučaju mikrovalne razgradnje u dušičnoj kiselini. Slaba kontrola uvjeta i u ovom je slučaju bila presudna i uzrokovala pogrešne rezultate.

Treći način ekstrakcije, onaj u klorovodičnoj kiselini i u ultrazvučnoj kupelji, uspješno je razorio uzorak i ekstrahirao arsenove specije. Ultrazvučna kupelj povećava efikasnost ekstrakcije na način da narušava stabilnost staničnih stijenki. Uzorak se prilikom ultrazvučne ekstrakcije nalazi u kiselim uvjetima, a prisutnost  $H^+$  iona u tekućoj fazi može izvući arsenove specije iz uzorka u čvrstom stanju i prevesti ih u tekuću fazu u obliku anorganskih specija (arsenit i arsenat).<sup>30</sup> S obzirom da klorovodična kiselina nije oksidirajuća kiselina, ovaj način ekstrakcije omogućio je kvantitativno određivanje anorganskih specija arsena. Da je ekstrakcija u oksidirajućim uvjetima bila uspješna, vrlo bi se lako iz razlike ukupne količine arsena i količine anorganskog arsena došlo do količine organskog arsena.

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovom se radu razvojem različitih metodologija i njihovim međusobnim uspoređivanjem uspješno odredila količina anorganskog arsena u suhim ekstraktima biljke *Erodium cicutarium* i u konačnici predložila adekvatna metodologija za analizu.

Uzorci su se pripremali mikrovalnom digestijom (u mediju dušične kiseline i vodikovog peroksida i u mediju klorovodične kiseline) i ultrazvučnom digestijom (u mediju klorovodične kiseline) kako bi se iz njih ekstrahirao arsen. Efikasnost ekstrakcije arsena ovisi o matrici uzorka, tipu korištenog otapala, specijama koje se ekstrahiraju, vremenu trajanja ekstrakcije i temperaturi zagrijavanja. Mikrovalna digestija se, unatoč svojoj mogućnosti efikasne razgradnje istovremenom primjenom kiselih uvjeta, zagrijavanja i mikrovalnog zračenja, pokazala kao neadekvatna metoda ekstrakcije arsena zbog nemogućnosti kontrole temperature i tlaka. Ultrazvučnom digestijom u klorovodičnoj kiselini, koja nije oksidirajuća kiselina, uspješno je provedena ekstrakcija anorganskih specija arsena iz uzoraka. Ultrazvučna kupelj povećala je efikasnost ekstrakcije narušavanjem stabilnosti staničnih stijenki.

Analiza uzoraka provodila se tehnikama ICP-AES i ETAAS (HydrEA). Mnoštvo signala generiranih u plazmi, od kojih su neki bili vrlo bliski signalima arsena, onemogućilo je dobivanje zadovoljavajućih rezultata metodom ICP-AES. Pojava spektralnih interferencija uzrokovala je prividno veći odziv, a time i veće koncentracije arsena od onih realnih. Tehnikom ETAAS u sprezi s tehnikom generiranja hidrida postigla se bolja osjetljivost i razlučivanje signala, a korištenjem katodne lampe s arsenovom linijom spektralne su se interferencije svele na minimum.

Metoda HydrEA uz prethodnu ekstrakciju arsena u klorovodičnoj kiselini u ultrazvučnoj kupelji pokazala se uspješnom u kvantitativnoj analizi anorganskih specija arsena u uzorcima suhih ekstrakata biljke *Erodium cicutarium*. Količine anorganskog arsena određene ovom metodom kreću se između 88 i 350 ng g<sup>-1</sup>. Različite koncentracije arsena između analiziranih uzoraka mogle bi biti posljedica različitih uvjeta rasta iste biljke, odnosno, ovisno o lokaciji, njezine različite izloženosti arsenovim specijama i njihove bioakumulacije.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. P. Smichowski, A. Londonio, The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review, *Microchem. J.* (2016).
2. A. Filipiak – Szok, M. Kurzawa, E. Szlyk, Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements, *J Trace Elem Med Biol* (2014).
3. N. Thaharn, S. Techawongstien, S. Chanthai, *ScienceAsia* **40** (2014) 53-59.
4. A. Benutić, *Determination of inorganic arsenic species in food by in situ iridium trapping ETAAS method*, 25<sup>th</sup> Croatian meeting of chemists and chemical engineers, Poreč, 2017.
5. C. Locatelli, D. Melucci, M. Locatelli, *Current Bioactive Compounds* **10** (2014) 181-188.
6. M. Chen, L. Ma, X. Chen, *Talanta* **125** (2014) 78-86
7. G. Abbas, B. Murtaza, I. Bibi, M. Shahid, N. K. Niazi, M. I. Khan, M. Amjad, M. Hussain, Natasha, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **15** (2018) 1-45
8. *Determination of inorganic arsenic by MAE-SPE-HG-AAS – a simple and inexpensive speciation alternative*, National Food Institute, Technical University of Denmark, Denmark, 2013.
9. N. Verma, Current regulatory challenged and approaches in the registration of herbal drugs in Europe, *Clinical Research and Regulatory Affairs*, **33** (2016) 9-24.
10. G. Benzi, A. Ceci, *Herbal Medicines in European Regulation*, *Pharmacol. Res.* **35** (1997) 355-362.
11. H. Sarma, S. Deka, H. Deka, R.R. Saikia, Accumulation of Heavy Metals in Selected Medicinal Plants, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **214** (2011) 63-86.
12. <http://plantagea.hr/fitoterapija1/kontrola-kvalitete-2/vaznije-farmakopejske-norme/> (preuzeto 09. kolovoza 2018.)
13. A. P. Gupta, S. Gupta, *Elemental Profiling: Its Role and Regulations*, *Atomic Absorption Spectroscopy*, Dr. Muhammad Akhyar Farrukh (Ed.) ISBN: 978-953-307-817-5
14. C. Boss, K. Fredeen, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin – Elmer, USA, 1997, str. 5.

15. C. Boss, K. Fredeen, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin – Elmer, USA, 1997, str. 12-15.
16. C. Boss, K. Fredeen, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin – Elmer, USA, 1997, str. 2-4.
17. C. Boss, K. Fredeen, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin – Elmer, USA, 1997, str. 18.
18. C. Boss, K. Fredeen, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin – Elmer, USA, 1997, str. 24-40.
19. S. Rončević, *Predavanja iz kolegija Instrumentna analitika I* (radni materijali), Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2017.
20. R. Beaty, J. Kerber, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, Perkin – Elmer, USA, 1993, str. 4-6.
21. R. Beaty, J. Kerber, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, Perkin – Elmer, USA, 1993, str. 55-63.
22. R. Beaty, J. Kerber, Concepts, *Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, Perkin – Elmer, USA, 1993, str. 10,11.
23. [http://web.inycom.es/phocadownload/analitica/publicaciones\\_analitica/fl\\_hydra\\_e\\_2005\\_-03-18.pdf](http://web.inycom.es/phocadownload/analitica/publicaciones_analitica/fl_hydra_e_2005_-03-18.pdf) (datum pristupa 10. lipnja 2018.)
24. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21843> (datum pristupa 12. kolovoza 2018.)
25. <https://www.plantea.com.hr/kratkokljuni-capljan/> (datum pristupa 15. lipnja 2018.)
26. Ali Esmail Al-Snafi, *Indo Am. J. P. Sci.* **4** (2017) 110-116.
27. Z. Stojanović-Radić, Lj. Čomić, N. Radulović, M. Dekić, V. Ranđelović, O. Stefanović *Chemical Papers* **64** (2010) 368–377
28. I. Fecka, W. Cisowski, *Z. Naturforsch.* **60b** (2005) 555 – 560
29. E. Mohammed, T. Mohammed, A. Mohammed, *MethodX* **4** (2017) 513-523
30. S. Phongsirirux, P. Sricharoen, N. Limchoowong, S. Chanthai, *Orient.j.chem* **33** (2017) 2347-2355
31. H. M. Anawar, *Talanta* **88** (2012) 30-42
32. T. Narukawa, T. Kuroiwa, K. Inagaki, A. Takatsu, K. Chiba, *Appl. Organometal. Chem.* **19** (2005) 239-245

## § 7. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

*Ime i prezime:* Sanja Alispahić

*Datum rođenja:* 3. travnja 1994.

*Mjesto rođenja:* Zagreb

### **Obrazovanje:**

2001.-2009. Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb, Republika Hrvatska

2009.-2013. Gimnazija Tituša Brezovačkog, opća gimnazija, Zagreb, Republika Hrvatska

2013.-2016. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Republika Hrvatska

2016. Sveučilišna prvostupnica kemije (*univ. bacc. chem.*) s Završnim radom na temu *Određivanje sulfonamida u površinskim vodama metodama tekućinske kromatografije* izrađenim na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nives Galić

2016.-2018. Diplomski studij – istraživački smjer (smjer analitička kemija i biokemija), Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Republika Hrvatska

Diplomski rad s temom *Određivanje arsena u biljnim ekstraktima metodama ETAAS i ICP-AES* izradio se na Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sande Rončević i neposrednim vodstvom dipl. ing. Ivana Nemeta

### **Radno iskustvo i popularizacija znanosti:**

travanj, 2016. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

15. kolovoza – 30. rujna 2016. Ljetni studentski posao u kozmetičkoj tvrtki Magdis d.o.o. (Biobaza) – rad u analitičkom laboratoriju za kontrolu kvalitete kozmetičkih proizvoda (određivanje organoleptičkih svojstava, praćenje stabilnosti proizvoda, rad na UV-ViS spektrofotometru)

siječanj 2018. – ožujak 2018. Zamjena za profesoricu kemije u Osnovnoj školi Silvija Strahimira Kranjčevića

travanj 2018. Otvoreni dani Kemijskog odsjeka – dio grupe koja je vodila radionicu iz mehanokemije za osnovne i srednje škole

ožujak – kolovoz 2018. PLIVA HRVATSKA d.o.o. – rad u analitičkom laboratoriju za elementnu analizu (ICP-OES, ICP-MS)