

Elementna analiza cvijeta japanske trešnje (C. Yedoensis L.) atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu i spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu

Brođanac, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:734684>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana Brođanac

**ELEMENTNA ANALIZA CVIJETA
JAPANSKE TREŠNJE
(*C. Yedoensis* L.) ATOMSKOM
SPEKTROMETRIJOM UZ INDUKTIVNO
SPREGNUTU PLAZMU I
SPEKTROMETRIJOM MASA UZ
INDUKTIVNO SPREGNUTU PLAZMU**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021.

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 i stručnog savjetnika dr. sc. Ivana Nemeta.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić i neposrednom voditelju dr. sc. Ivanu Nemetu na strpljenju, razumijevanju, konstruktivnim kritikama i savjetima kojima su mi pomogli u izradi ovog diplomskog rada.

Hvala svim mojim prijateljima na ohrabrenju, odanosti i ljubavi.

Hvala mom najboljem četveronožnom priljepku ■ što je imao razumijevanja za sve one dane kada smo kasnili sa šetnjama u park zbog poslovnih i fakultetskih obaveza.

Hvala mom najvećem životnom uzoru, osobi koja na poseban način definira neke životne pojmove kao što su hrabrost, stid, ranjivost, suosjećajnost prema sebi i drugima, povezanost.. mojoj sestri.

Hvala i tebi buraz, što si najodgovornija osoba na svijetu i moja životna „ručna“!

I za kraj ništa bez njih, moja dva kamena oslonca. Hvala mojim roditeljima, Marku i Anđelki na bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Hvala što ste strpljivo čekali ovaj trenutak.

Uspjela sam...a sad napokon odoh kuhati!

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Ljekovite biljke.....	2
2.2. Japanska trešnja.....	3
2.2.1. Tradicionalna upotreba i ljekovita svojstva.....	5
2.2.2. Japanska cvjetna trešnja <i>Cerasus yedoensis Matsum.</i>	5
2.2.3. Japanska cvjetna trešnja <i>Kiku shidare zakura</i>	6
2.2.4. Japanska trešnja <i>Prunus serrulata</i>	7
2.2.5. Trešnja <i>Prunus avium</i>	8
2.2.6. Uresna japanska jabuka <i>Malus floribunda Sieb.</i>	9
2.2.7. Japanska crvenolika jabuka <i>Malus x purpurea (Barbier) Rehd.</i>	10
2.2.8. Japanski lješnjak <i>Hamamelis japonica Sieb. & Zucc.</i>	11
2.3. Kemijski elementi u biljkama	11
2.3.1. Makroelementi u biljkama	12
2.3.2. Mikroelementi u biljkama.....	13
2.3.3. Toksični elementi.....	15
2.4. Metode atomske spektrometrije	16
2.5. Mikrovalno potpomognuto razaranje	18
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Kemikalije.....	20
3.2. Uređaj za pripravu uzorka, mjerni uređaj i pribor.....	20
3.3. Uzorci	23
3.4. Postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje.....	24
3.5. Elementna analiza	25
3.5.1. Kalibracijske krivulje	25
3.5.2. Preciznost.....	25
3.5.3. Točnost.....	25
3.5.4. Detekcijske granice	26
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Validacija metode ICP – AES za elementnu analizu cvjetova japanske trešnje	27

<i>4.1.1. Detekcijske granice</i>	27
<i>4.1.2. Točnost metode ICP-AES</i>	28
<i>4.1.3. Osjetljivost metode ICP-AES</i>	30
<i>4.1.4. Preciznost metode ICP-AES</i>	30
4.2. Elementna analiza cvjetova japanske trešnje	30
<i>4.2.1. Elementna analiza cvjetova japanskih jabuka i lješnjaka</i>	35
§ 5. ZAKLJUČAK	40
§ 6. LITERATURNI IZVORI	42
§ 7. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Elementna analiza cvijeta japanske trešnje (*C. Yedoensis* L.) atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu i spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu

Ana Brođanac

U uzorcima cvjetova ljekovite biljke japanske trešnje (*C. Yedoensis* L.) provedena je elementna analiza metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) i spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS). Uzorci su prethodno razoreni u smjesi dušične kiseline i vodikovog peroksida u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje. Nakon optimiranja metode za pripremu uzorka, metodom ICP-AES i ICP-MS određen je sadržaj elemenata: Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V i Zn. Sadržaj makro- i mikroelemenata u cvjetovima japanskih trešanja razlikuje se u biljkama različite starosti i staništa.

(60 stranica, 17 slika, 10 tablica, 75 literaturnih 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: ICP-AES, ICP-MS, mikro- i makroelementi, mikrovalno potpomognuto razaranje, trešnjin cvijet,

Mentor: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
Neposredni voditelj: dr. sc. Ivan Nemet, str. savj.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. prof. dr. sc. Dubravka Matković - Čalogović
 3. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Elemental analysis of Japanese cherry blossom (*C. Yedoensis* L.) by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry

Ana Brođanac

Elemental analyses of medical plant Japanese cherry blossoms (*C. Yedoensis* L.) was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The samples were digested using a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide in a microwave digestion system. After optimizing the method, the content of elements Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V and Zn was determined. The content of macro- and microelements differs in the samples of cherry blossoms according to age and sampling place.

(60 pages, 17 figures, 10 tables, 75 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: cherry blossom, ICP-AES, ICP-MS, micro- and macroelements, microwave digestion

Mentor: dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Assistant mentor: dr. Ivan Nemet,

Supe

Reviewers:

1. dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
 2. dr. Dubravka Matković – Čalogović, Associate Professor
 3. dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
- Substitute: dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Date of exam: 25 February 2021.

§ 1. UVOD

Trešnja (*Prunus serrulata* var. *Spontanea* L.) zauzima izuzetno važno mjesto u japanskoj povijesti i kulturi, a koristi se kao ukrasno drvo i ljekovita biljka.¹ U Japanu postoji preko 600 različitih vrsta stabala trešnje, od kojih je najpoznatiji prirodni hibrid Yoshino trešnja (*C. Yedoensis* L.). Trešnjin cvijet najčešće se koristi za pripremu čaja čiji sastojci imaju antioksidativno djelovanje² te u kozmetičkim pripravcima za obnavljanje kože.³ Određivanje sadržaja prisutnih elemenata u cvjetovima japanske trešnje važno je prije svega zbog zdravstvenih razloga ali i mogućih onečišćenja toksičnim elementima opasnim za zdravlje.²

Cilj istraživanja je elementna analiza cvijeta japanskih trešanja prethodno optimiziranom metodom atomske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) i spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS). Uzorci cvjetova japanskih trešanja prije mjerenja razorit će se u uređaju za mikrovalno potpomognuto razaranje uz dodatak dušične kiseline i vodikovog peroksida.⁴

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ljekovite biljke

Fitoterapija, liječenje biljem poznato je od davnina. Ljekovite bilje sadrži farmakološki aktivne sastojke kao što su alkaloidi, glikozidi, saponini, eterična ulja, smole, sluzi i drugo, a primjenjuje se u medicini i za pripremu ljekovitih biljnih pripravaka.⁵ Još su najstarije ljudske civilizacije poznavale različite načine sakupljanja i uporabe ljekovitog bilja, a jedan od najpoznatijih zapisa sa čak 300 ljekovitih biljaka je grčkog liječnika Hipokrata.⁶ U ljekovite biljke prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *The World Health Organisation*, WHO) ubrajaju se biljne vrste koje u jednom ili više dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se koristi u kemijsko-farmaceutskoj sintezi ili u terapijske svrhe.⁷

Uzgoj, skupljanje, prerada i uporaba ljekovitog bilja u svijetu ima dugu tradiciju, a najčešće se koriste u obliku čajeva i alkoholnih otopina, tinktura. U tradicionalnoj medicini biljke koje se najčešće koriste pripadaju porodicama Rosaceae (54 vrste), Asteraceae (52 vrste), Lamiaceae (49 vrste), Apiaceae (36 vrsta), Ranunculaceae (34 vrsta), Fabaceae (33 vrste) i Brassicaceae (31 vrsta).⁸

U biljci ljekovite aktivne tvari nisu jednako raspoređene. U svakom dijelu biljke udio biološki aktivnih tvari je različita jer ovisi o nizu faktora kao što su primjerice vanjski faktori i razvojni stadiji. Zbog toga postoji točno određeno optimalno vrijeme branja pojedinih dijelova biljke. Kora (lat. *cortex*) prikuplja se u rano proljeće, kao i korijen (lat. *radix*), uvijek prije ili nakon cvatnje jer tada sadrže najviše ljekovitih aktivnih tvari. List (lat. *folium*) se bere kada je potpuno razvijen, neposredno prije cvjetanja dok se pupovi (lat. *gemmae*) beru prije listanja u rano proljeće. Cvijet (lat. *flos*) se skuplja u početku cvatnje i mora biti potpuno otvoren, dok se plod (lat. *fructus*) ili sjeme (lat. *semen*) skupljaju potpuno zreli.

U farmaceutskoj industriji bilje se koristi se kao sirovina za aktivne tvari u farmaceutskim proizvodima ili se upotrebljava kao polazna tvar za sinteze ljekovitih tvari. Biotehnologija također nudi genetsko inženjerstvo kao važnu novu tehnologiju za proizvodnju sekundarnih metabolita u biljkama s ciljem proizvodnje lijekova pomoću biljnih kultura stanice.⁸

Zbog velike primjene ljekovitog bilja važno je poznavati sastav i farmakološka svojstva ljekovitog bilja. Stoga je potrebno napraviti veliki broj istraživanja sadržaja bilja te predkliničkih i kliničkih istraživanja.

2.2. Japanska trešnja

Japanska trešnja (*Prunus serrulata* L.) ili „Sakura“ je listopadno drvo iz roda *Prunus*, a njena sistematika je dana u tablici 1.

Tablica 1. Sistematika japanske trešnje

Carstvo	Plantae
Divizija	Tracheophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Rod	<i>Prunus</i>
Vrsta	<i>P. serrulata</i> L.

Japanski botaničar Manabu Miyoshi i njegov američki kolega Ernest H. Wilson u dvije zasebne publikacije grupirali su japanske trešnje u dvije podvrste *Prunus serrulata* f. *spontanea* i *Prunus serrulata* var. *pubescens*.⁹ Danas se uzgaja preko 600 različitih vrsta trešanja neovisno o sorti. Hibridne sorte *Prunus* × *yedoensis* ili *Prunus* × *subhirtella* imaju definirano mjesto u sustavnoj klasifikaciji japanskih cvjetnih trešanja. Plodovi se kod većine sorti japanskih trešanja ne formiraju jer je stablo sterilni kultivar, iako postoje iznimke kao kod primjerice trešanja *Prunus avium* i *Prunus cerasus* koje daju jestive plodove.

U prosjeku stablo japanske trešnje može živjeti 30-40 godina, a naraste 10-25 m, dok mu je opseg krošnje 5 m. Korijenski sustav je jak i plitko se ukorjenjuje. Kora je smeđe do smeđe sive boje, a listovi su dugi 5-12 cm te široki između 2-6 cm, tamnozeleni eliptičnog oblika s

nazubljenim rubovima po kojima je i dobila ime *serrulata* što znači nazubljen. Cvijet u prosijeku sadrži od 23-28 latica u skupinama od dvije do pet latica, dvostruko su ispunjeni i vrlo nježni, a ovisno o sorti mogu biti bijeli, ružičasti ili tamno ružičasti (slika 1).



Slika 1. Japanska trešnja u Botaničkom vrtu PMF-a u Zagrebu, travanj 2020.

Potrebno joj je tlo rahle strukture, dobro prozračeno, često bogato plijesni, relativno siromašno mineralima te blago kiselo.¹⁰ Japanske trešnje svoju cvatnju započinju tek u kasnom ožujku, osim vrste kawazu koja cvate posebno rano, od početka veljače do početka ožujka. Podrijetlom dolazi iz Kine te su joj prirodna staništa zemlje istočne Azije. Trešnja sakura zauzima sveto mjesto u japanskoj povijesti i kulturi, a cvjetanje ovog stabla popraćeno je proljetnim festivalima i jedne od najvažnijih tradicija gledanja cvijeća (*hanami*). Cvijet simbolizira čistoću i novi početak i prati posebne događaje. Osim u Japanu, cvjetanje sakure se slavi i u Kanadi, Nizozemskoj, Njemačkoj, Filipinima, Južnoj Koreji, Turskoj, Velikoj Britaniji i Sjedinjenim Američkim Državama.

2.2.1. Tradicionalna upotreba i ljekovita svojstva

Trešnja sakura koristi se na različite načine. Cvjetovi i listovi sakure su jestivi i koriste se tradicionalno za pripremu ružičastog čaja „sakura-cha“, tako da se cvijet prelije s vrućom vodom, a od topline laticice se rastvore i plutaju. Potapanjem cvijeta trešnje u japanskom octu od šljive dobiva se ekstrakt sa značajnim udjelom antioksidansa kao što su cijanidni glikozidi i kavena kiselina.¹ Cvjetovi se zbog mirisa konzerviraju solju pri čemu dolazi do fermentacije i kao takvi se koriste za pripremu raznih japanskih jela. Osim laticice, lišće stabla trešnje sakura od davnina se koristi i za pripremu japanskih slatkiša „sakura-mochi“.¹¹

List stabla sakure preporuča se za jelo jer sadrži brojne biljne metabolite, uključujući glikozide izoflavona, flavonoid izokvercetin, glikozid kumarina i kumarin koji pokazuju antitumorske i sedativne učinke.^{12,14} Od davnina, ekstrakt kuhanih listova trešnje koristio se za sprečavanje hrapavosti kože zbog dokazanog protuupalnog djelovanja na kožu i inhibicije nastajanja melanina.^{3,13}

Iz kore stabljike japanske trešnje *P. grayana* (Maxim.) izoliran je derivat glukoze kofeol, a plodovi *P. yedoensis* (Matsum.) sadrže askorbinsku kiselinu i proantocijanidine. Etilni derivat kavene kiseline i 1,6-di-O-dikafeiol-β-D-glukopiranozid identificirani su u cvjetovima *P. yedoensis*, koji dokazano uništavaju stanice raka jajnika.^{15,16} Cvjetovi sakure sadrže i flavonoide, većinom različite spojeve kaempferola. Navedeni spojevi povećavaju enzimsku aktivnost i proizvodnju kolagena stanica kože, dokazano inhibiraju prekomjerno nastajanje slobodnih radikala koji nastaju pri lipidnoj peroksidaciji pa se preporučaju u borbi protiv starenja kože.¹⁷

2.2.2. Japanska cvjetna trešnja *Cerasus yedoensis* Matsum.

Najpopularnija vrsta cvjetne trešnje u Japanu je *Cerasus yedoensis* ili „somei-yoshino“ i jedna je od onih vrsta koje cvatu prije pojave lišća. Razmnožava se pomoću resica, a životni vijek joj je kratak. Stablo ima oblik kišobrana, visoko je oko 10 m. Lišće je nazubljeno i zeleno ili s blagom crvenkasto-zelenom sjenom, a pojavljuje se nakon cvatnje. Peteljke su vrlo kratke, dužine 2-2,5 cm, sa tri do četiri cvijeta. Cvjetovi u pupoljku, promjera 3-3,5 cm, nemaju izrazit miris, a sadrže pet ovalnih do jajastih laticica. Daju crne, gorke plodove. Sezona cvjetanja je prvi tjedan travnja u Tokiju, svijetlo su ružičaste boje, dok su prošireni u cvatu gotovo potpuno bijeli (slika 2).¹⁰



Slika 2. Japanska cvjetna trešnja - *Cerasus yedoensis*¹⁸

2.2.3. Japanska cvjetna trešnja Kiku shidare zakura

Vrsta japanske trešnje čiji cvjetovi nalikuju krizantemama je *Kiku shidare zakura*. Spominje se u japanskoj pjesmi Sakuragawa iz 1675. godine. Listopadno je drvo iz porodice *Rosaceae* s padajućim granama, visine i širine do 5 m. Mlado lišće ima dvostruku nazubljenost sa žlijezdama, svijetlo crvenkasto-zelene do svijetlo zelene boje. Cvat sadrži 3-5 tamno ružičastih cvjetova, promjera 3,0-3,5 cm. Cvijet se sastoji od 75-125 eliptičnih, na vrhu blago ispupčenih latica (slika 3).



Slika 3. Japanska cvjetna trešnja - *Kiku shidare zakura*¹⁹

Sezona cvatnje je početkom svibnja.

2.2.4. Japanska trešnja *Prunus serrulata*

Ukrasna japanska trešnja (*Prunus serrulata* L.) je stablo iz porodice ruža (Rosaceae). Carl Linnè je prvi upotrijebio riječ *Prunus* još 1737. godine, a dolazi od grčke riječi *proumnon* i označava stablo šljive, dok *serrulata* znači nazubljen.²⁰ *Prunus serrulata* listopadno je drvo koje može narasti od 10-25 metara. Listovi su eliptični i naizmjenični, dugi od 5-12 cm, a široki 2,5-6,5 cm, pri vrhu su ušiljeni i nazubljeni. Naličje lista je svjetlije i prekriveno dlačicama, dok je lice tamnozeleno. Peteljka je duga 2-3 cm. Cvjetovi su nježne bijele boje i skupljaju se u cvatove (slika 4).



Slika 4. Japanska trešnja – *Prunus serrulata*²¹

Ova vrsta japanske trešnje ima okrugli crni plod, velik oko 8 mm. Stablu pogoduje sunčano mjesto i drenirano vlažno tlo. Cvate početkom travnja.

2.2.5. Trešnja *Prunus avium*

Trešnja (*Prunus avium* L.) dolazi iz porodice ruža (*Rosaceae*). Ime potječe od grčke riječi *proumnon* što znači stablo šljive, dok *avium* označava pticu.²⁰ Listopadno je stablo koje raste do 30 m tvoreći visoku i raširenu krošnju. Listovi su eliptični i naizmjeničnih, nazubljenih, pilastih rubova. Mogu biti dugi od 7-14 cm, a široki od 4-7 cm. Pupovi su jajasti s crveno-smeđim ljuskama kožnatih rubova. Cvjetovi su promjera od 2,5-3,5 cm i skupljeni u 2-6 štitasta cvata. Čaška sadrži 5 dugoljastih, unazad uvinutih lapova, a vjenčić ima pet obrnutih bijelih latica promjera od 1 do 1,5 cm (slika 5).



Slika 5. Cvijet trešnje – *Prunus avium*²²

Tučak ima dva sjemena zametka, pa su cvjetovi dvospolni. *Prunus avium* daje okrugli, mesnati, jestivi, tamnocrveni plod, promjera oko 1 cm. Koštice u plodu su otrovne jer sadrže glikozid amigdalinal koji pri određenim uvjetima daje cijanovodik.²³ Biljka je rasprostranjena diljem Europe, a i zapadne Azije i sjeverne Afrike. Sezona cvatnje traje od sredine travnja do početka svibnja. Plod sazrijeva u lipnju.

2.2.6. Uresna japanska jabuka *Malus floribunda* Sieb.

Malus je rod malih listopadnih drveća iz porodice *Rosaceae*, najpoznatija od njih je domaća jabuka (*Malus domestica* Borkh.), sve ostale vrste iz ovoga roda su divlje jabuke. Uresna japanska jabuka je malo listopadno drvo ili grm visoko do 10 m, podrijetlom iz Japana. Listovi su vitki jajasti, nazubljeni i tamnozeleni. Cvjetovi su izvana ružičasti, iznutra bijeli i otvaraju se iz grimiznih pupova. Široki su od 2,5-3 cm i nalaze se na cvjetnoj stapki dugoj do 3,5 cm (slika 6).²⁵



Slika 6. Uresna japanska jabuka²⁴

U cvatu dolazi od 4-7 cvjetova. Plod je crvenožut, promjera oko 1 cm. Sezona cvatnje je krajem ožujka, početkom travnja.

2.2.7. Japanska crvenolika jabuka *Malus x purpurea* (Barbier) Rehd.

Japanska crevnilika jabuka *Malus x purpurea* je malo, uspravno listopadno drvo, visine od 2-3 metra i širine od 3-4 metra. Cvjetovi su purpurno-ružičasti, a listovi lopatasti, brončano-tamnozeleni (slika 7).



Slika 7. Japanska crevnilika jabuka²⁶

Plodovi su grimizni i mali te izgledaju poput trešanja.

2.2.8. *Japanski lješnjak Hamamelis japonica Sieb. & Zucc.*

Japanski je lješnjak veliki listopadni grm visine do 2,5 m, iz porodice *Hamamelidaceae*. Podrijetlom je iz planinskih područja Japana, a ime mu potječe od grčke riječi *hama* što znači dinja. Grančice su prekrivene gustim dlačicama, a na njima su naizmjenice smješteni polegnuti jajoliki listovi, dužine 5-10 cm. Cvijet ima četiri uske latice koje su u osnovi crvene ili ljubičaste, ponekad žute, blagog mirisa, smještene u glavatom cvatu. Časka je razdijeljena, s vanjske strane dlakava, s unutrašnje zelenkasta ili žućkasto-zelena (slika 8).



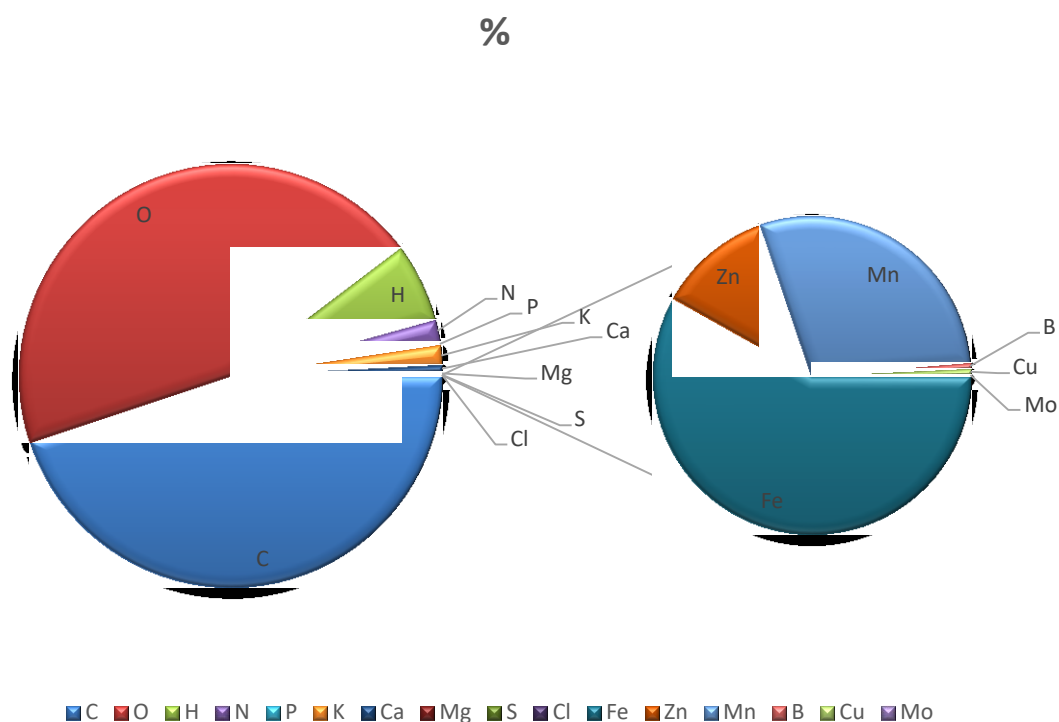
Slika 8. Cvijet japanskog lješnjaka²⁸

Iz cvjetova *Hamamelis japonice* izolirano je više fenolnih spojeva, kao što su flavonol-glikozidi i kumaroil-flavonol-glikozidi, s dokazanim citotoksičnim djelovanjem na ljudske stanice raka debelog crijeva (HCT116).²⁷ Sezona cvatnje je sredinom siječnja, početkom veljače.

2.3. Kemijski elementi u biljkama

Kemijske elemente pronađene u biljkama dijelimo na one koji su biljkama hranjive tvari neophodne za rast i korisne elemente koji nisu potrebni u cijelom životnom ciklusu biljke. Na elementni sastav ljekovitog bilja osim vrste biljke, većinom utječu klimatski uvjeti i vrsta tla.

Preko 95% suhe mase biljke s cvijetom čine tri osnovna elementa - ugljik, vodik i kisik koje biljke dobivaju iz zraka i vode. Preostalih 5 % suhe mase, biljka apsorbira iz tla. Korijen upija tvari prisutne u tlu, ali treba naglasiti kako je svega 14 elemenata potrebno za rast biljaka. Ovih 14 elemenata, zajedno s ugljikom, vodikom i kisikom čine esencijalne anorganske hranjive elemente biljaka (Prikaz 1.).^{29,30}



Prikaz 1. Udio esencijalnih elemenata u biljkama³⁰

Biljke koriste elemente u različitim količinama i ionskim oblicima, neke kao katione, druge kao anione. Elementi sudjeluju u enzimskim reakcijama (bilo kao dio enzimske strukture ili kao regulatori ili aktivatori), regulatori su protoka vode u ili izvan stanice i održavanja turgora tlaka, regulatori propusnosti membrane, strukturne komponente stanice ili elektronski receptori u elektronskom transportnom sustavu te važni u puferskim sustavima važnim za održavanje optimalnog pH stanica.²⁹

2.3.1. Makroelementi u biljkama

Makroelementi su kemijski elementi koji su biljkama potrebni u većim količinama, a koriste se za izgradnju biljke kao strukturna komponenta stanice, masti, proteina, enzima, klorofila i dr.

Najvažniji makroelementi apsorbirani iz tla su dušik, kalij, magnezij, fosfor, kalcij i sumpor.

Kalij (K) kao esencijalni element u biljkama važan je za aktivaciju enzima, regulaciju permeabilnosti membrana i osmoze te održavanja turgora stanice. Prilikom procesa fotosinteze CO₂ iz zraka biljka unosi putem lišća kroz puči, mehanizam otvaranja puči regulira kalij. Kalij utječe na procese stvaranja ATP-a, pretvaranje svjetlosne u kemijsku energiju i na metabolizam dušičnih spojeva.³² Maseni udio kalija značajno ovisi o vrsti biljke, godišnjem dobu, tlu na kojem raste i drugačiji je za sve dijelove biljke, pa neki optimalni raspon udjela K u potpuno razvijenim listovima je 25 mg K / g suhe tvari, dok u cvijetu iznosi 50-66 mg K / g suhe tvari.³⁵

Kalcij (Ca) prema Bangerthovoj podijeli³⁶ ima važnu ulogu u membranama, enzimima, staničnoj stjenki i interakciji s biljnim hormonima. Ca sudjeluje u sintezi oksalne kiseline pa je važan i za apsorpciju drugih elemenata kao što su K, Na, N, B i P. U vakuolama dio je Ca-fosfatnog puferskog sustava za neutralizaciju kiselosti stanice. Udio Ca u biljkama prosječno iznosi 0,1-0,5 % odnosno u rasponu 1-50 mg Ca/ g suhe tvari, a većina kalcija smještena je u staničnoj stjenki zbog njegove slabe pokretljivosti.³²

Magnezij (Mg) ima glavnu fiziološku i molekularnu ulogu u biljkama jer je središnji atom u molekuli klorofila, kofaktor mnogih enzimskih procesa povezanih s fosforilacijom, defosforilacijom i hidrolizom, stabilizira strukturu nukleotida, a sudjeluje i u sintezi biljnih pigmenta (karoteni i ksantofili) te drugih organskih molekula. Magnezijevi ioni potrebni su za aktivaciju ionske pumpe Na/K ATP-aze i za regulaciju staničnog pH.³⁵ Ukupni maseni udio magnezija u biljkama prosječno iznosi 0,1-1,0 %, od čega je 50 % magnezija u ionskom obliku (Mg²⁺), dok je 15-30 % povezano s molekulom klorofila.^{37,38}

Natrij (Na) se samo djelomično smatra kao biljna hranjiva tvar jer ne sudjeluje u svim životnim ciklusima biljaka. Poznata je njegova uloga u regulaciji osmoze i turgora.³²

2.3.2. Mikroelementi u biljkama

Mikroelementi su kemijski elementi koji su važni za normalan rast i razvoj biljke, ali ih biljke trebaju u manjim količinama. Mikroelementi iz tla su željezo, bor, klor, mangan, cink, bakar, molibden i nikal, a vrlo malo biljaka treba i kobalt, nikal, silicij i vanadij.³⁰

Željezo (Fe) je vrlo značajano za rast i razvoj biljaka, a do njegove apsorpcije dolazi u ionskom obliku (Fe^{3+} i Fe^{2+}) ili u obliku kelatnog kompleksa. Sudjeluje u sintezi klorofila, a nalazi se u strukturi dvije skupine proteina: hem-proteina (citokrom, CAT, peroksidaze) i Fe-S-proteina (Fe SOD, feredoksin, akonitaze). Vezanjem željeza u proteine nastali kompleksi imaju važne funkcije, primjerice hemski kompleks željezo-porfirin djeluje kao prostetička skupina citokroma. Ostali *hem* proteini su katalaza, peroksidaza i leghemoglobin. Željezo ima važnu ulogu i u Fe-S proteinima, koji sudjeluju u reakcijama fotosinteze. Feredoksin s visokim negativnim redoks potencijalom omogućuje prijenos elektrona, primjerice u fotosustavu I donor je elektrona za sintezu nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH). Željezo se pohranjuje u stromi plastida, a njegov maseni udio u biljkama je 50-300 mg/kg.³²

Mangan (Mn) je sastavni dio enzima u biljkama, aktivator je enolaza, superoksidizmutaza, dehidrogenaza, transferaza, hidroksilaza i dekarboksilaza uključenih u disanje, sintezu aminokiselina i lignina te koncentraciju hormona. Uključen je u oksidacijsko-redukcijske (redoks) reakcije unutar fotosintetskog sustava pri prijenosu elektrona u biljkama.^{39,40} Mangan nije gradivni element jer se nalazi samo u strukturi proteina manganina, a njegov maseni udio u biljci ovisi o biljnoj vrsti, ali i biljnog organa, u rasponu je 50-250 mg/kg.

Bor (B) je biogeni element, a njegova fiziološka uloga je u regulaciji meristemske aktivnosti, sintezi proteina, sintezi hormona (citoknina i auksina). Ne ulazi u sastav organske tvari niti enzima jer nema mogućnost promjene oksidacijskog stanja. Njegov nedostatak uvelike utječe na kvalitetu cvjetanja i proizvodnju sjemena. Maseni udio u biljci je 20-80 mg/kg.

Cink (Zn) se u biljke većinom apsorbira kao kation Zn^{2+} , a pri visokim vrijednostima pH kao kation ZnOH^+ .⁴² Metaboličke funkcije cinka temelje se na visokom afinitetu stvaranja tetraedarskih kompleksa s N-, O- i osobito S-ligandima, pa stoga ima katalitičku i strukturnu ulogu u enzimskim reakcijama. Cink je sastavni dio enzimskih struktura gdje ima katalitičku, koaktivnu ili strukturnu ulogu.^{42,43} Atom cinka koordiniran je u enzimima s četiri liganda, histidin je najčešći, a slijede ga glutamin i asparagin, dok je molekula vode četvrti ligand na svim katalitičkim mjestima. Strukturni atomi cinka koordinirani su sa S-skupinama od četiri ju cisteinskih ostataka, a uključuju alkohol-dehidrogenazu i proteine koji sudjeluju u

replikaciji DNA i ekspresiji gena. Značajna uloga cinka je i u biosintezi DNA i RNA (RNA-polimeraza), sintezi proteina (utjecaj na strukturu ribosoma), sintezi hormona auksina preko kojeg utječe na rast biljaka, kao i stabilizaciji membrana. Maseni udio cinka u biljkama je oko 20 mg/kg.

Bakar (Cu) biljke apsorbiraju kao ion Cu^{2+} ili u obliku kelatnih kompleksa. Najznačajnija fiziološka uloga je u aktivaciji mnogih enzima koji sudjeluju u oksidacijskim procesima, regulaciji amonijaka, sintezi nukleinskih kiselina, metabolizmu ugljikohidrata, nastajanju peludi i dr. Maseni udio bakra u biljkama je 2-20 mg/kg.³²

Molibden (Mo) je prisutan u više od 60 enzima koji kataliziraju različite redoks reakcije te u metabolizmu dušika u biljkama gdje ima važnu ulogu. U biološkim sustavima osobito su važni ioni višeg oksidacijskog stanja molibdena Mo^{4+} , Mo^{5+} i Mo^{6+} . Maseni udio molibdena u biljkama je manji od 1 mg/kg.^{32,44}

Nikal (Ni) je esencijalni element u biljkama prisutan u ionskom obliku Ni^{2+} . Njegova fiziološka uloga je značajna pri nastajanju kompleksnih spojeva s cisteinom i limunskom kiselinom, a sudjeluje i u radu enzima ureaze i nekih hidrogenaza. Značajan je i pri apsorpciji željeza. Maseni udio nikla u biljkama je oko 1-10 mg/kg.⁴⁵

Od važnih elemenata u biljkama je kobalt (Co) koji je esencijalni element za fiksaciju atmosferskog N_2 kod leguminoza, a sudjeluje i u inhibiciji sinteze biljnog hormona etilena. Maseni udio kobalta je oko 0,02-0,5 mg/kg.

2.3.3. Toksični elementi

Onečišćenja biljaka, pa tako i toksičnim elementima najčešće dolaze iz tla za vrijeme rasta ili kasnije u procesu obrade. Od navedenih onečišćenja elementima najčešća su ona teškim metalima. U Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*) dani su najveći dopušteni udjeli toksičnih teških metala u ljekovitom bilju: 5 mg/kg za olovo, 0,5 mg/kg za kadmij i 0,1 mg/kg za živu. Toksični metali u većem masenom udjelu od dopuštenog u ljudskom organizmu mogu uzrokovati kronično trovanje, a u nekim slučajevima i smrt.

Kadmij (Cd) je od 1993. godine klasificiran kao kancerogen prve skupine, ubraja se u zagađivače okoliša i nalazi se na osmom mjestu najopasnijih tvari. Utječe na proces oksidativne fosforilacije, sintezu nukleinskih kiselina, ali i inhibira brojne enzime.³² Kadmij se u prehrani gotovo ne može izbjeći, a nakuplja se u unutarnjim organima. Najviše kadmija apsorbira se kod ljudi u bubrezima, a procjena je kako ukupna količina kadmija koja se unese

za života iznosi oko 50 mg. Unosom prevelike količine kadmija dolazi do povraćanja pa se zbog toga smrtonosno trovanje rijetko događa.^{46,47}

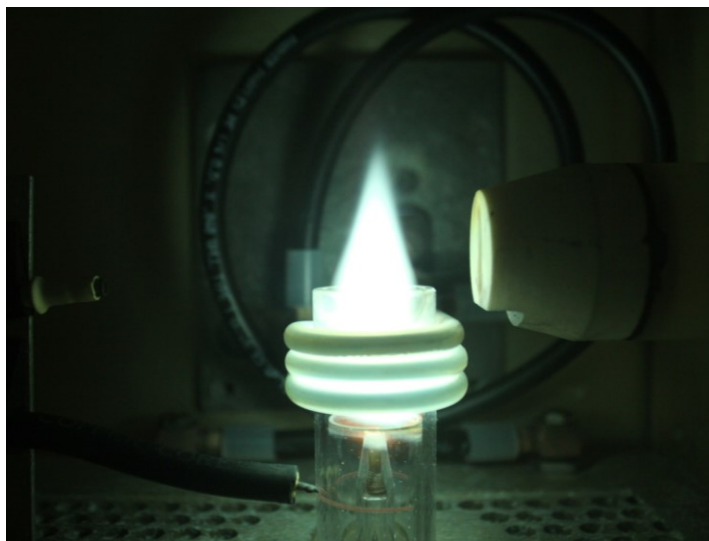
Olovo (Pb) je pri većoj izloženosti za većinu živih bića toksičan i ne postoji biološka potreba za njime. U organizam dospijeva uglavnom putem inhalacije i prehranom, a u tragovima je prisutan u gotovo svakoj namirnici. Olovo ima toksični učinak koji se povezuje s njegovim interakcijama s enzimima i to onih čija je aktivnost ovisna o prisutnosti tiolnih skupina (-SH). Olovo mijenja funkciju i strukturu kostiju, bubrega i središnjeg živčanog sustava, utječe na hematopoetski sustav te proizvodi štetne reproduktivne, histopatološke, fetotoksične, neuropsihološke, biokemijske i teratogene učinke.⁴⁷

2.4. Metode atomske spektrometrije

U okviru diplomskog rada za elementnu analizu cvjetova trešnje korištene su metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP – AES) i spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) te su u nastavku ukratko opisane.

2.4.1. Metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu

Metode atomske emisijske spektrometrije koriste se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, a temelje se na pobudi elemenata i emisiji njihovog zračenja na karakterističnim valnim duljinama. Nedostatak metoda je što ne postoji niti jedan izvor koji bi pobudio sve elemente. Induktivno spregnuta plazma (ICP) danas je najčešći izvor u atomskoj emisijskoj spektroskopiji i široko se koristi u rutinskim elementnim analizama (slika 9).

Slika 9. Induktivno spregnuta plazma⁵¹

Plazma nastaje u plameniku unutar tri koncentrične kvarcne cijevi uz protok argona između 5 i 20 L/min. Indukcijska zavojnica s dva ili tri okreta, hlađena vodom, oko plamenika za plazmu stvara jako oscilirajuće magnetsko polje putem radio-frekvencijskog (RF) generatora. Generatori RF su oscilatori koji generiraju izmjeničnu struju na željenoj frekvenciji, najčešće na 27,12 ili 40,68 MHz.⁴⁸ Sustav za regulaciju protoka argona se pali i pokreće se plazma u toroidnom području oko indukcije zavojnice. Tada se plazma održava induktivnim zagrijavanjem. Snaga isporučena plazmi će odrediti temperaturu, s većom snagom koja rezultira s višom temperaturom pobude (približno 5000-6000 K), temperaturom pobude između 6500 i 7000 K i temperaturom elektrona od oko 10000 K. Zbog visokih temperatura unutar zavojnica vrtložni protok plina prolazi između ventila i međucijevi te toplinski izolira vanjsku cijev kako bi centrirao plazmu u radijalnom smjeru. Emisija se promatra bočno kroz plazmu (*side-on*), dok aksijalnom mjerenju često smeta efekt matrice. Uzorak ulazi u plazmu kao aerosol kroz unutarnju cijev brzinom protoka od oko 1 L/min i ima vrijeme zadržavanja od oko 2 ms u plazmi pri temperaturama između 4000 i 8000 K nakon čega, iznad jezgre, ulazi u zonu promatranja.⁴⁸ Protok raspršivača ili nosača plina utječe ne samo na vrijeme zadržavanja u plazmi nego i na veličinu čestica proizvedenog aerosola. Temperature plazme znatno su više od onih u bilo kojem plamenu, a raspršivanje se događa u atmosferi inertnog plina, koje nastoji poboljšati životni vijek slobodnih atoma sprečavanjem stvaranja oksida. Pozadinski intenziteti obično su prilično niski u usporedbi s ostalim izvorima, što rezultira dobrom detekcijom u rasponu od ppm do ppb.⁴⁹

Metoda ICP-AES ima izuzetne analitičke značajke kao što su selektivnost i osjetljivost, velika preciznost, niske detekcijske granice i veliko dinamičko područje rada. Nedostaci su spektralne smetnje zbog velikog broja emisijskih linija, cijena i operativni troškovi, te činjenica da uzorci obično moraju biti u otopini i nemogućnost analize izrazito malih volumena otopine. Metoda ICP-AES primjenjuje se za kvantitativno određivanje elemenata u različitim realnim uzorcima kao što su prirodne i otpadne vode, zrak, tlo, minerali, stijene, sedimenti, padaline, biljna i životinjska tkiva, plinovi koji izgaraju, arheološki uzorci, materijali i sirovine.⁵⁰

2.4.2. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu

Metoda spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP- MS) nedvojbeno je jedna od najvažnijih metoda za elementnu analizu različitih realnih uzoraka. Ističe se vrlo niskim granicama detekcije, brzinom analize te sposobnosti mjerenja izotopa te određivanju ionskih specija. Najvažnija prednost pred većinom metoda atomske spektrometrije, uključujući i metodu ICP-AES, je mogućnost mjerenja sastava izotopa, osobito važno pri potpunoj karakterizaciji elemenata, a rezultati mjerenja se lakše analiziraju i daju jednostavniji spektar. U metodi ICP-MS kao ionizacijski izvor koristi se induktivno spregnuta plazma, a kao detektor nastalih iona spektrometar masa. Uzorak se uvodi u obliku aerosola u plazmu, a nastali ioni se kroz međusklop prenose u analizator masa. Ioni se usmjeravaju prolaskom kroz ionske leće postavljene između konusa međusklopa i spektrometra masa, zatim se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja u analizatoru te detektiraju. Analizatori masa mogu biti različiti, a najčešće se koristi kvadrupolni analizator masa. Kao detektor najviše se koristi multiplikator elektrona kod kojeg pri izlasku iona iz analizatora i njegovim udarom u diodu, dolazi do nastajanja sekundarnih elektrona. Svaki nastali ion koji izlazi iz analizatora detektira se na multiplikatoru elektrona pri čemu nastaje spektar masa na temelju proračuna ukupnog signala za svaki omjer mase i naboja.

2.5. Mikrovalno potpomognuto razaranje

Metoda mikrovalno potpomognutog razaranja jest česta i brza metoda za pripravu uzorka prije elementne analize realnog uzorka metodama atomske spektrometrije. Razgradnjom organske tvari interferencije pri mjerenjima i onečišćenje uzorka svedene su na minimum, vrijeme razaranja je kratko, potrebne se male količine reagensa i samog uzorka. Učinkovitost razaranja uzorka ovisi o volumenu reagensa, temperaturi zagrijavanja uzorka i tlaku u reakcijskoj posudi. Kao reagensi za razaranja uzorka koriste se jaki oksidansi poput dušične kiseline, klorovodične ili neke druge anorganske kiseline uz čest dodatak vodikovog peroksida. Reakcijske posude za mikrovalno potpomognuto razaranje napravljene su od fluoriranog polimera (politetrafluoretilena, PTFE).

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Za pripremu uzoraka i mjerenje korištene su:

Dušična kiselina, HNO_3 , konc. *p.a.*, Kemika ($w = 65\%$)

Vodikov peroksid, H_2O_2 , *p.a.*, Kemika ($w = 30\%$)

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

Standardna multielementna otopina spektralne čistoće za ICP izvore, 1000 mg L^{-1} , Merck .

Rodij, interni standard ($1 \mu\text{g/L}$)

NIST SRM 1547 – *Peach leaves*, Sigma-Aldrich

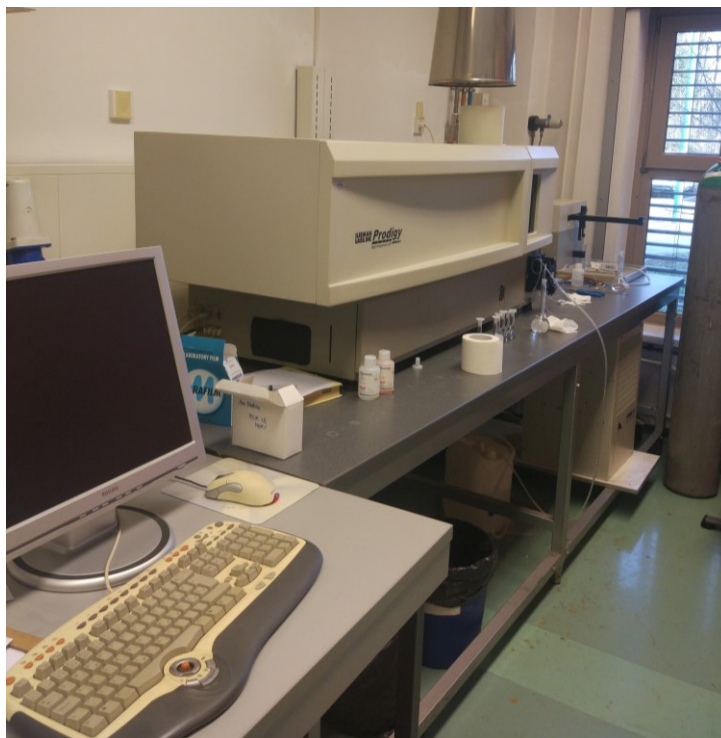
NIST SRM 1573a - *Tomato Leaves*, Sigma-Aldrich

Laboratorijsko posuđe prethodno je očišćeno dušičnom kiselinom ($10\% \text{ v/v}$).

3.2. Uređaj za pripremu uzorka, mjerni uređaj i pribor

Analitička vaga *Mettler Toledo XS205 dual range* s maksimalnim kapacitetom 220 g , očitanjem od $0,1 \text{ mg}$ te ponovljivošću $0,01 \text{ mg}$, korištena je za precizno vaganje uzoraka.

Spektrometar s induktivno spregnutom plazmom korišten je za određivanje masenog udjela elemenata u uzorcima (slika 10).



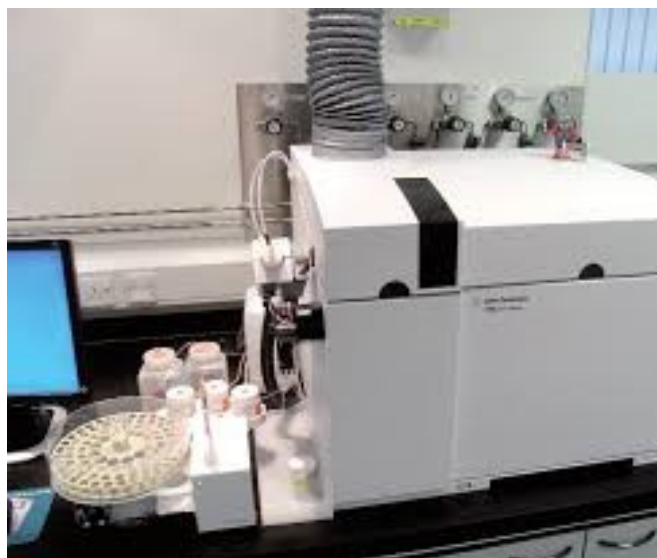
Slika 10. Laboratorij za plazma spektrometriju, ZAK, Kemijski odsjek PMF-a

Optimalni uvjeti za elementnu analizu metodom ICP-AES prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Optimalni uvjeti analize uzoraka spektrometrom ICP-AES

Instrument	<i>Prodigy High Dispersive ICP</i>
Spektrometar	Ešeletni polikromator visoke rezolucije
Radiofrekvencijski generator	<i>“free-running”</i> 40 MHz
Protok plina (Ar)	vanjski: 18 L min ⁻¹ pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ za raspršivanje: 1 L min ⁻¹
Detektor	L-PAD
Plamenik	Fasselov tip, DUAL-VIEW
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska

Za elementnu analizu metodom ICP-MS korišten je spektrometar masa uz induktivno spregnutu plazmu (*Agilent 7500cx ICP-MS*) prikazan na slici 11, a optimalni uvjeti u tablici 3.

Slika 11. Spektrometar *Agilent 7500cx ICP-MS*

Tablica 3. Radni uvjeti spektrometra ICP-MS

Optimalni uvjeti rada spektrometra ICP-MS	
RF-snaga	1500 W
Protok plina nosioca (Ar)	0,90 L/min
Dodatan protok plinske faze (Ar)	0,20 L/min
Raspršivač	<i>MicroMist</i>
Pumpa raspršivača	0,10 rps
Komora za raspršenje	<i>Scott double pass</i>
Vrijeme integracije	0,10 s
Ponovljeni uzorci	dva
Kalibracija	vanjska
Kalibracijska otopina	Multielement VI (Merck)
Izotopi	^6Li , ^7Li , ^{88}Sr , ^{24}Mg , ^{103}Rh
Unutarnji standard (10 µg/L)	-
Kolizijska komora	

Uređaj *MWS-2 Microwave System Speedweve Berghof* (slika 12) s nosačem za 10 reakcijskih posuda od politetrafluoretilena volumena 10 mL korišten je za mikrovalno potpomognuto razaranje uzoraka pri uvjetima prikazanim u tablici 4.

Slika 12. Uređaj *MWS-2 Microwave System Speedweve Berghof*

Tablica 4. Uvjeti mikrovalno potpomognutog razaranja

	t /min	P /W	T /°C
1	20	600	110
2	20	750	170
3	20	500	120

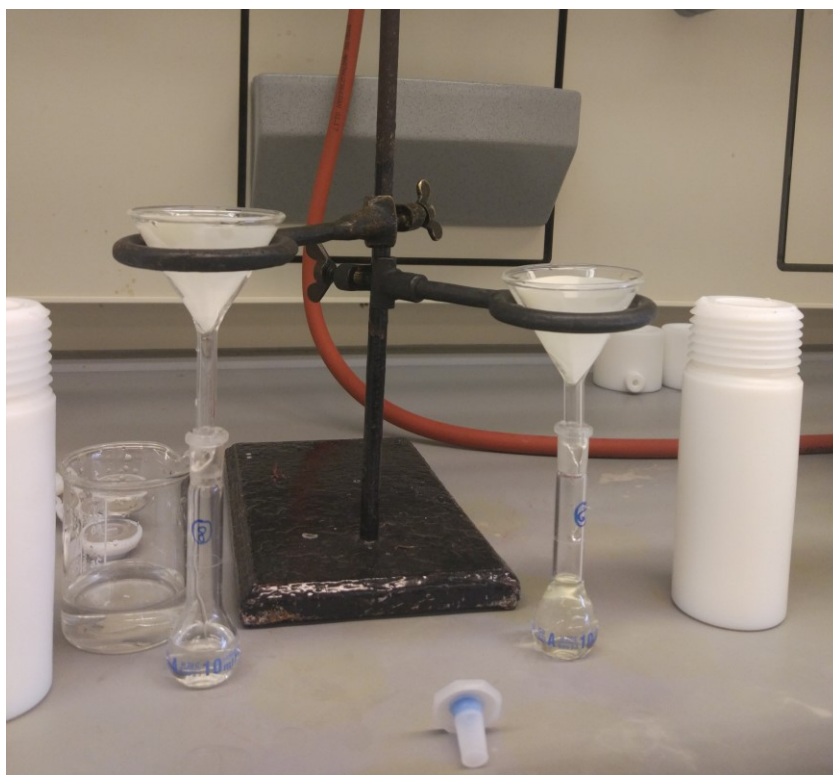
t – vrijeme, P – snaga mikrovalnog zračenja, T – zadana temperatura

3.3. Uzorci

Uzorci cvjetova japanskih trešanja *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura*, *P. serrulata*, cvijeta uresne japanske jabuke *M. floribunda*, cvijeta crvenolike japanske jabuke *M. purpurea*, cvijeta trešnje *P. avium* i cvijeta japanskog lješnjaka *H. japonica* ubrani su ručno u optimalnom vremenu, tijekom ožujka i travnja 2018. godine u Botaničkom vrtu PMF-a u Zagrebu. Uzorci su zamrznuti i liofilizirani 48h pri -80 °C i pri 0,01 mbar, nakon čega je proveden proces liofilizacije u uređaju *Christ Alpha 1-2* (Christ, Osterode am Harz, Njemačka). Liofilizirano biljno tkivo je usitnjeno u hladnom, steriliziranom tarioniku i pohranjeno na -20 °C.

3.4. Postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje

Za postupak razaranja korištene su reakcijske posude od politetrafluoretilena volumena 10 mL, koje su prethodno bile isprane s HNO_3 (10 % v/v). Izvagano je oko 200 mg usitnjenog cvijeta i dodana je smjesa dušične kiseline i vodikovog peroksida: 6,0 mL HNO_3 (50:50, v/v) + 2 mL H_2O_2 . Kako bi isparili plinovi reakcijske posude su ostavljene otvorene 10 minuta, a nakon toga čvrsto su zatvorene i stavljene u uređaj za mikrovalno potpomognuto razaranje. Razaranje je provedeno prema uvjetima navedenim u tablici 4. Mikrovalno razoreni uzorci profiltrirani su kroz filter papir i kvantitativno prebačeni u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjeni deioniziranom vodom visoke čistoće do oznake (slika 13).



Slika 13. Filtriranje uzorka

Pripremljeni uzorak razrijeđen je 10 puta, a postupak priprave istog uzorka ponavljen je najmanje 3 puta. U svakoj je seriji za analizu pripremljena i slijepa proba: 6 mL HNO_3 (50:50 v/v) + 2 mL H_2O_2 .

3.5. Elementna analiza

3.5.1. Kalibracijske krivulje

Pomoću standardne multielementne otopine spektralne čistoće za ICP izvore (1000 mg L⁻¹) razrjeđenjem s HNO₃ (2 % v/v), prema očekivanim masenim koncentracijama ispitivanih elemenata u uzorku pripravljene su standardne otopine sljedećih masenih koncentracija: 0,10; 0,20; 0,50; 1,0 i 10 mg L⁻¹ u odmjernim tikvicama volumena 10 mL. Slijepi uzorak je pripremljen na način kao i uzorci. Standardi su mjereni od manje prema većoj masenoj koncentraciji, a kalibracijska krivulja je rađena pri svakoj analizi uzorka.

3.5.2. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka je prema dogovoru odstupanje rezultata dobivenih ponavljanjem eksperimenta više puta pri zadanim uvjetima. Iskazuje se kao standardno odstupanje ili relativno standardno odstupanje (% RSD). Relativno standardno odstupanje najčešće koristi za provjeru je li postignuta zadana preciznost i tada se rezultati prikazuju kao srednja vrijednost rezultata uz relativno standardno odstupanje (% RSD).

3.5.3. Točnost

Točnost metode prikazana je kroz udio izmjenenog analita prema stvarnoj količini istoga, a izražava se kao postotak iskoristivosti (eng. *Recovery*). Za dokazivanje točnosti metode, određena je iskoristivost uz pomoć udjela izmjenenog analita i stvarne količine analita u uzorku.

Iskoristivost metode (%) izračunata je prema izrazu: $\frac{\text{izmjerena količina analita}}{\text{stvarna količina analita}} \times 100 \%$.

Iskoristivost metode kod određivanja elemenata u uzorcima određena je dodatkom standarda dviju poznatih masenih koncentracija, a koje su prije i nakon mikrovalno potpomognutog razaranja iznosile 2,0 i 5,0 mg L⁻¹. Elementi su mjereni metodama ICP-MS i ICP- AES.

3.5.4. Detekcijske granice

Detekcijske granice (eng. *Limit of Detection*, LOD) analitičkog postupka su najmanja količina analita u uzorku koja se može otkriti, ali ne nužno kvantificirati kao točna vrijednost. Detekcijske granice određuju se analizom uzoraka s poznatim masenim koncentracijama analita i utvrđivanjem minimalne razine na kojoj se analit može pouzdano otkriti. Za određivanje detekcijskih granica mikro- i makroelemenata u uzorcima japanskih cvjetova korištena je Baumansova metoda (LOD, 3σ). Na temelju odnosa signala i šuma napravljena je usporedba izmjerenih signala iz uzoraka s poznatim niskim masenim koncentracijama analita u tri ponavljanja, s onima u slijepim uzorcima u deset ponavljanja. Za svaki element u svakoj vrsti japanskog cvijeta izračunato je standardno odstupanje po izrazu: $\mu_L = \gamma + 3\sigma$, gdje μ_L (LOD) označava detekcijsku granicu izraženu u μgL^{-1} , γ predstavlja srednju vrijednost masene koncentracije deset slijepih proba izražene u μgL^{-1} , a σ standardno odstupanje.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cvjetovi japanskih trešanja najviše se koriste za pripremu čaja, a imaju veliku primjenu i u raznim biljnim pripravcima. Kako bi bili sigurni za kemijsko-farmaceutsku uporabu važno je odrediti njihov kemijski sastav. U ovom radu je metodom ICP-AES određen sastav makro- i mikroelemenata u cvjetovima trešanja *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura*, *P. serrulata*, cvijeta uresne japanske jabuke *M. floribunda*, cvijeta crvenolike japanske jabuke *M. purpurea*, cvijeta trešnje *P. avium* i cvijeta japanskog lješnjaka *H. japonica*. Prikazani su rezultati dobiveni metodama ICP-AES i ICP-MS, nakon mikrovalno potpomognutog razaranja. Određene su detekcijske granice, preciznost i točnost za metodu ICP-AES. Rezultati elementne analize uspoređene su s rezultatima dobivenim metodom ICP-MS te malim brojem literaturnih podataka za elementnu analizu botanički slični biljaka provedenim različitim spektroskopskim metodama. Primjerice jedini dostupni literaturni podatak za elementnu analizu stabla *C. Yedoensis* L. dobiven je uz pomoć energijski razlučujuće rendgenske spektrometrije (engl. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*, EDS) Vrijednosti rezultata za masene udjele dobivene metodama ICP-AES i ICP-MS za većinu elemenata bile su podjednake. Samo metodom ICP-MS određeni su Cr, Co i Ni prisutni u vrlo niskim masenim udjelima, dok su svi ostali elementi određeni s obje metode ICP-AES i ICP-MS te su dane srednje vrijednosti rezultata.

4.1. Validacija metode ICP – AES za elementnu analizu cvjetova japanske trešnje

4.1.1. Detekcijske granice

Prema Baumansovoj metodi izračunate su detekcijske granice (LOD) za svaki element izmjeren metodom ICP – AES. U tablici 5 prikazane su vrijednosti detekcijskih granica elemenata na odgovarajućim valnim duljinama pri kojima je provedeno mjerenje za uzorke cvjetova japanske trešnje, nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uz smjesu HNO₃ i H₂O₂.

Tablica 5. Detekcijske granice metode ICP – AES i valne duljine elemenata u uzorcima cvjetova japanske trešnje.

Element	λ / nm	Detekcijska granica / $\mu\text{g L}^{-1}$
Ag	328,068	1,04
Al	396,152	1,10
Ba	493,409	0,15
Ca	422,673	1,70
Cd	214,441	0,59
Co	228,615	0,67
Cr	267,716	0,60
Cu	324,754	0,51
Fe	238,204	0,56
K	766,491	2,10
Li	670,784	2,41
Mg	285,213	0,09
Mn	259,372	0,37
Na	589,592	0,29
Ni	221,648	13,4
Pb	220,353	3,18
Zn	213,856	0,34

Za cvjetove japanske trešanje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja sa smjesom reagensa HNO_3 (50:50, v/v) i H_2O_2 dobivene su detekcijske granice u rasponu masenih udjela 0,50-2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ za Ag, Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu i Fe, dok su detekcijske granice manje od 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ za elemente Ba, Mg, Na, Mn, Sr, Zn, a za K, Ni i Pb detekcijske granice više od 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na temelju rezultata za LOD prikazanih u tablici 5 može se zaključiti kako je za elemente s detekcijskim granicama većim od 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ potrebno bolje optimizirati analitički postupak pripreve uzorka prije elemente analize metodom ICP-AES jer je navedena vrijednost LOD previsoka za rutinska određivanja uzorka cvjetova japanske trešnje.

4.1.2. Točnost metode ICP-AES

Na temelju podataka o iskoristivosti metode određena je točnost metode ICP-AES za elementnu analizu cvjetova japanskih trešanja. Iskoristivost metode je izražena u obliku postotnog udjela (%). Osim o točnosti metode iskoristivost ukazuje na moguću pogrešku samog eksperimenta. Sljedivost je dobivena mjerenjem masenog udjela referentnog

certificiranog materijala (CRM) pri mikrovalno potpomognutom razaranju sa smjesom HNO_3 (50:50 v/v) + H_2O_2 . Vrijednosti iskoristivosti metode ICP-AES za elementnu analizu cvjetova japanske trešnje dana je u tablici 6.

Tablica 6. Iskorištenje metode ICP-AES za mikrovalno potpomognute uzorke cvjetova japanske trešnje

$w / \text{mg kg}^{-1}$						
Element	SRM 1547		SRM 1573a			
	Certificirani podatci	Rezultati dobiveni mjerenjem	Iskoristivost (%)	Certificirani podatci	Rezultati dobiveni mjerenjem	Iskoristivost (%)
Ag	-	1,160	-	0,017	0,020	85,0
Al	248,9 ± 6,5	268,2	92,8	598,4 ± 7,1	640,8	107,1
Ba	123,7 ± 5,5	110,8	89,6	-	26,47	-
Ca	15590 ± 160	16100	103,3	50450 ± 550	51014	101,1
Cd	0,0261 ± 0,0022	0,024	92,0	1,517 ± 0,027	1,488	98,1
Co	0,07	0,105	150,0	0,5773 ± 0,0071	0,596	103,2
Cr	1	1,213	121,3	1,988 ± 0,034	2,120	106,6
Cu	3,75 ± 0,37	3,436	91,6	4,70 ± 0,14	4,620	98,3
Fe	219,8 ± 6,8	212,7	96,8	367,5 ± 4,3	377,9	102,8
K	24330 ± 380	23241	95,5	26760 ± 480	22001	82,2
Mg	4320 ± 150	4148,1	96,0	12000	11408	95,1
Mn	97,8 ± 1,8	95,40	97,6	246,3 ± 7,1	240,3	98,0
Mo	0,0603 ± 0,0068	0,070	116,1	0,460	0,400	87,0
Na	23,8 ± 1,6	28,99	121,8	136,1 ± 3,7	150,4	110,5
Ni	0,689 ± 0,095	1,048	152,1	1,582 ± 0,041	1,201	75,9
Pb	0,869 ± 0,018	1,054	121,3	-	1,123	-
V	0,367 ± 0,038	0,342	93,2	0,835 ± 0,034	0,704	84,3
Zn	17,97 ± 0,53	16,78	93,4	30,94 ± 0,55	31,08	100,5

Iz tablice 6 vidi se kako je najbolja iskoristivost za elemente Ca i Fe, a najmanja za Mn što ukazuje kako je točnost metode ICP-AES za elementnu analizu cvjetova japanskih trešanja unutar prihvatljivih granica za većinu određivanih elemenata.

4.1.3. Osjetljivost metode ICP-AES

Za metodu ICP-AES koja se koristi za elementnu analizu cvjetova japanske trešnje osjetljivost metode je izražena kao nagib kalibracijske krivulje pomoću korelacijskog koeficijenta koji je pri valnim duljinama određivanja elemenata za sve kalibracijske krivulje veći od 0,9992, što ukazuje na dobru osjetljivost metode ICP-AES nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka cvjetova japanske trešnje.

4.1.4. Preciznost metode ICP-AES

Preciznost metode je podudaranje izmjerenih vrijednosti tri paralelna mjerenja uzorka i iskazana je relativnim standardnim odstupanjem RSO %. Za sve mjerene elemente u uzorcima cvjetova japanske trešnje prilikom ponavljanja mjerenja tijekom jednog dana RSO je manja od 19% što ukazuje na dobro podudaranje rezultata. Međudnevna preciznost metode ICP-AES provjerena je mjerenjem uzorka nakon nekoliko tjedana, a za elementnu analizu uzorka cvjetova japanske trešnje iznosila je manje od 2,6 %. Niti nakon duljeg vremenskog razdoblja nije dolazilo do promjene vrijednosti masenog udjela elemenata pa se može zaključiti da su svi parametri optimiziranja uvjeta mjerenja metode ICP-AES i mikrovalno potpomognutog razaranja za navedene uzorke prije mjerenja bili dobro postavljani.

4.2. Elementna analiza cvjetova japanske trešnje

Elementna analiza uzoraka cvjetova japanskih trešanja metodom ICP-AES provedena je uz prethodno mikrovalno potpomognuto razaranja smjesom dušične kiseline i vodikovog peroksida. Srednje vrijednosti masenih udjela elemenata u uzorku cvjetova japanskih trešanja dane su u tablicama 7 i 8. U tablici 7 je uz makroelemente koji su očekivano bili u većim masenim udjelima dana i vrijednost za maseni udio olova koji je bio veći od očekivanog u uzorcima japanskih trešanja.

Tablica 7. Maseni udio makroelemenata i olova nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka cvjetova japanskih trešanja

Element	$w / \text{mg kg}^{-1}$			
	<i>C. yedoensis</i>	<i>Kiku shidare zakura</i>	<i>P. serrulata</i>	<i>P. avium</i>
Ca	51,5	64,9	66,6	128
K	38,9	127	112	134
Mg	5,01	14,0	15,3	17,9
Na	0,264	0,506	0,308	0,739
Pb	5,05	13,9	15,1	18,6

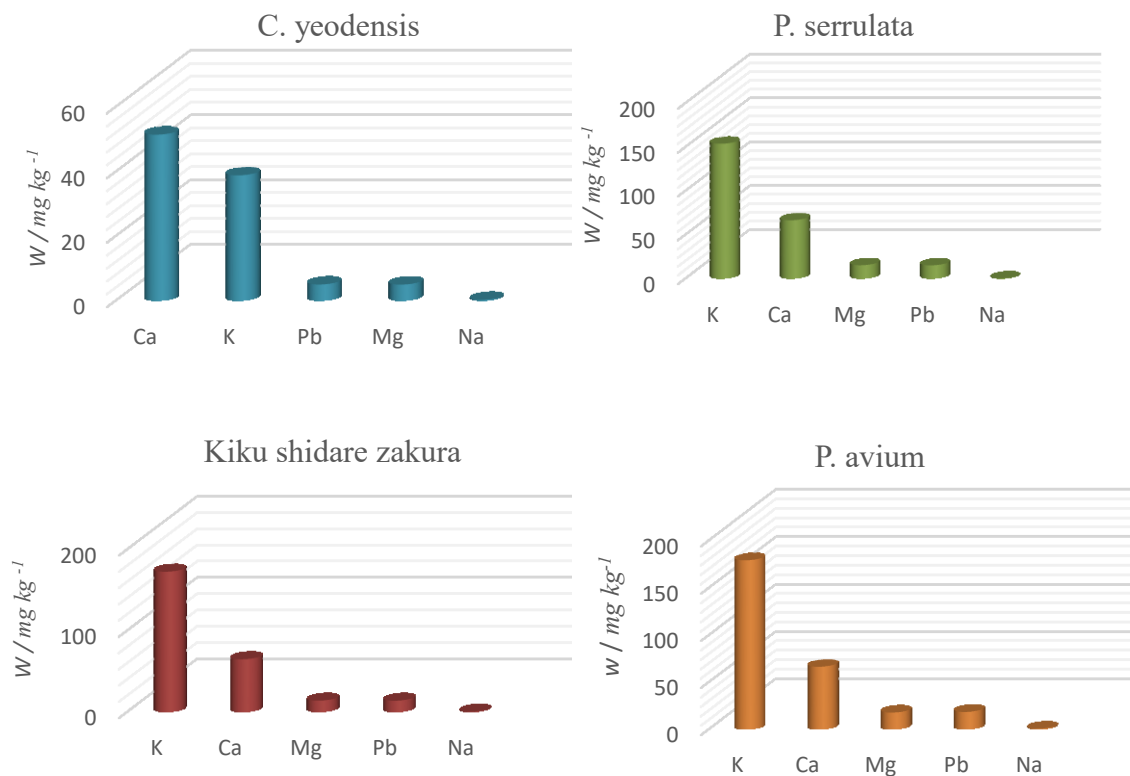
Tablica 8. Maseni udio mikroelemenata nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka cvjetova japanskih trešanja

Element	$w / \text{mg g}^{-1}$			
	<i>C. yedoensis</i>	<i>Kiku shidare zakura</i>	<i>P. serrulata</i>	<i>P. avium</i>
Ag	73,6	2,85	2,81	5,49
Al	34,9	59,9	52,4	156
B	37,8	48,2	38,8	96,7
Ba	10,1	17,7	15,6	37,9
Co	1,95	4,63	4,94	11,5
Cr	0,258	0,051	<LOD	2,05
Cu	10,2	23,6	19,4	32,0
Fe	34,5	53,9	53,3	112
Li	17,4	30,5	28,0	66,5
Mn	<LOD	<LOD	2,37	4,96
Ni	36,16	59,7	58,9	125
V	23,9	18,6	16,8	42,0
Zn	7,17	29,6	27,2	24,6

Makroelementi koji su važni za čovjekovo zdravlje su Ca, K, Mg i Na. Najzastupljeniji element u većini uzoraka cvjetova japanskih trešanja je K, u rasponu masenih udjela 38,9-134 mg kg^{-1} , nakon kojeg slijedi Ca s rasponom vrijednosti od 51,5-128 mg kg^{-1} , a zatim Mg i Na u rasponu 0,264-17,9 mg kg^{-1} . U svim uzorcima su veće količine Pb koji je toksičan i to

u rasponu od 5,05-18,6 mg kg⁻¹ dok je najveći dopušteni maseni udio Pb u ljekovitom bilju prema WHO oko 10 mg kg⁻¹.⁶⁷

U uzorku *C. yedoensis* su veće vrijednosti za Ag u iznosu od 73,6 mg g⁻¹ od masenih udjela dobivenih u ostalim uzorcima, dok u *P. avium* su vidljive velike vrijednosti Al i Ni usporedno s drugim uzorcima. Kod ljudi, ali i kod biljaka kalcij je uključen u regulaciju mnogih procesa tijekom rasta i starenja. U uzorku cvijeta *C. yedoensis* kalcija ima najviše (51,5 mg kg⁻¹) u usporedbi s drugim uzorcima cvjetova što je prikazano na slici 14.



Slika 14. Raspodjela makroelemenata i olova (mg kg⁻¹) u uzorcima japanskih trešanja *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura*, *P. serrulata* i *P. avium* nakon mikrovalno potpomognutog razaranja

U uzorku cvijeta *Kiku shidare zakura* udio Ca je 64,9 mg kg⁻¹, a *P. serrulate* 66,6 mg kg⁻¹. Shahin Aziz i sur. istom su metodom u srodnoj ljekovitoj biljci s antikancerogenim djelovanjem *C. roseus* izmjerili prosječni maseni udio Ca od 0,0362 mg kg⁻¹ za lišće i 0,00605 mg kg⁻¹ za cvjetove. Sahito i sur. su izmjerili udio Ca u cvijetu od 0,0014 mg kg⁻¹ što su puno manje vrijednosti udjela Ca u odnosu na uzorak cvijeta *Kiku shidare zakura*.^{68,69} Katsuki i sur. su metodom ICP-AES u laticama *C. yedoensis* izmjerili viši maseni udio kalcija (2530 mg kg⁻¹) usporedno s vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju.⁷⁰

Kalij u biljkama ima značajnu ulogu regulaciji staničnih membrana i u aktivaciji enzima, zbog čega je jedan od najvažnijih esencijalnih elemenata. U uzorcima cvjetova japanskih trešanja *Kiku shidare zakura* i *P. serrulata* kalij ima najveći maseni udio od 127 mg kg⁻¹ u vrsti *Kiku shidare zakura*, a 112 mg kg⁻¹ u *P. serrulata*. Kalij je drugi najzastupljeniji element u uzorku cvijeta *C. yedoensis* i njegov maseni udio iznosi 38,9 mg kg⁻¹, što je značajno manja vrijednost nego što su izmjerili Katsuki i sur. (19200 mg kg⁻¹).⁷⁰ Shahin Aziz i sur. odredili su maseni udio K u srodnoj biljci *C. roseus* od 0,0231 mg kg⁻¹ za lišće i 0,0234 mg kg⁻¹ za cvijet, Singh i sur. 0,00665 mg kg⁻¹ K u lišću, te Sahito i sur. 0,0019 mg kg⁻¹ K u lišću i 0,00176 mg g⁻¹ u cvijetu što su puno manje vrijednosti od dobivenih u ovom istraživanju.^{68,69}

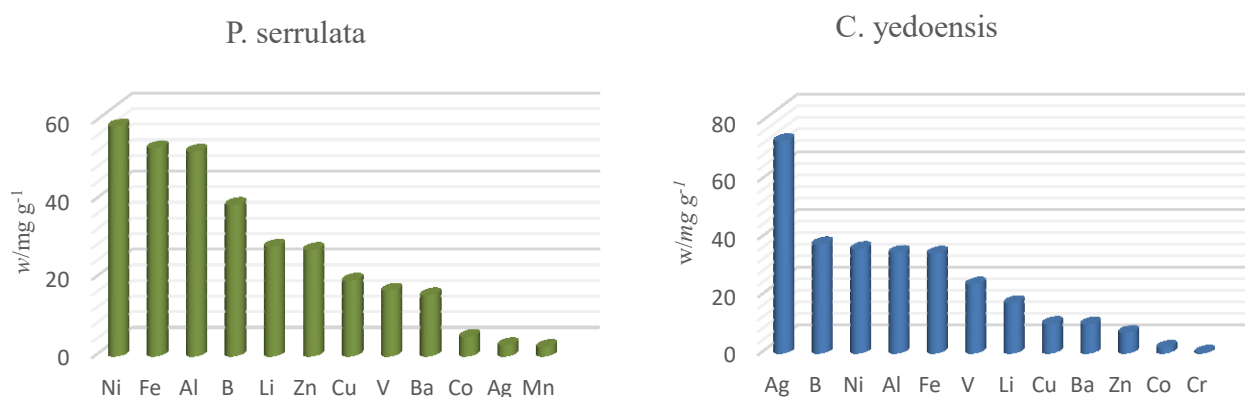
Magnezija u uzorcima cvjetova je dvostruko manje od kalcija. Razlog tome može biti i taj što je magneziji element koji je poznat po svojoj pokretljivosti zbog koje se nalazi u svim dijelovima biljke. U cvjetovima japanske trešnje *C. Yedoensis* maseni udio Mg je 5,01 mg kg⁻¹, 14,0 mg kg⁻¹ u *Kiku shidare zakura*, a 15,3 mg kg⁻¹ u *P. serrulata*. Katsuki i sur. odredili su značajno više Mg u laticama *C. Yedoensis* (1170 mg kg⁻¹).⁷⁰ Shahin Aziz i sur. odredili su maseni udio Mg u lišću *C. roseus* od 0,00513 mg kg⁻¹ i cvijetu 0,00175 mg kg⁻¹, dok su Sahito i sur. odredili niži maseni udio Mg 0,00141 mg kg⁻¹ u lišću i 0,00085 mg kg⁻¹ u cvijetu.^{68,69}

U uzorcima cvjetova određeni su maseni udjeli Na: u *C. yeodensis* 0,264 mg kg⁻¹, u *Kiku shidare zakura* 0,506 mg kg⁻¹, te u *P. serrulata* 0,308 mg kg⁻¹. Katsuki i sur. izmjerili su višu vrijednost masenog udjela Na od 69,8 mg kg⁻¹.⁷⁰

U japanskoj trešnji *P. avium* maseni udio elemenata je viši i drugačije raspoređen u usporedbi s uzorcima drugih vrsta cvjetova trešanja. Kalij i kod ovog cvijeta trešnje ima najveći maseni udio (179 mg kg⁻¹). Kalcija s udjelom od 128 mg kg⁻¹ je čak dvostruko više nego u drugim uzorcima cvjetova trešanja. Jiménez i sur. izračunali su da je udio Ca u lišću trešnje 3,1 % suhe tvari, a u cvijetu je 0,38 % suhe tvari, udio Mg u lišću trešnje je 0,73 %, a u cvijetu 0,205 %. Sve vrijednosti su dobivene mjerenjem metodom atomske apsorpcijske spektroskopije. Vrijednosti Ca i Mg u cvijetu *P. avium* su veće u ovom istraživanju i iznose 12,8 % i 1,79 %.^{71,72}

U uzorku cvjetova *C. yedoensis* prisutan je relativno velik maseni udio Pb od 5,05 mg kg⁻¹, u *Kiku shidare zakura* čak 13,9 mg kg⁻¹, dok je u *P. serrulata* 15,1 mg kg⁻¹ Pb, što je nešto viša vrijednost od najvećeg dopuštenog masenog udjela u ljekovitom bilju prema WHO koja iznosi 10 mg kg⁻¹.⁶⁷ Katsuki i sur. izmjerili su niži maseni udio Pb 0,969 mg kg⁻¹.⁷⁰ Sahito i sur. odredili su maseni udio Pb u lišću 0,004 mg g⁻¹ i cvijetu 0,001 mg g⁻¹.⁶⁹ Ovako velike vrijednosti olova u cvijetu japanskih trešanja je vjerojatno što stabla rastu u užem

centru glavnog grada gdje je zagađenost vode, tla i zraka daleko veća od staništa gdje rastu biljke iz literaturnih podataka s čijim vrijednostima su uspoređeni rezultati dobiveni u okviru



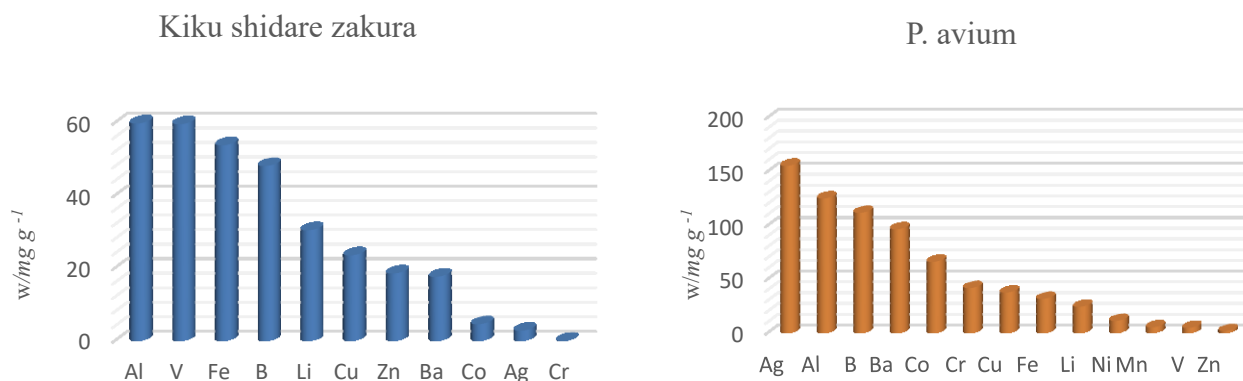
ovog rada.

Maseni udio toksičnog olova u trešnji *P. avium* najviša je od svih uzoraka cvjetova trešanja i iznosi 18,6 mg kg⁻¹ što je skoro dvostruko više od dopuštenog udjela za ljudski organizam.

Od mikroelemenata u uzorcima cvijeta *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura*, *P. serrulata* i *P. avium* određeni su: Al, Ag, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, V i Zn, a vrijednosti masenih udjela prikazane su u tablici 8. Zbog bolje preglednosti vrijednosti masenih udjela mikroelemenata za *C. yedoensis* i *P. avium* prikazane su i na slici 15.

Iako Ag nema značajniju funkciju u ljudskom organizmu u uzorcima cvjetova trešanja ima ga u relativno visokom udjelu. U uzorcima *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura* i *P. avium* B i Al su u masenim udjelima u rasponu 34,9-156 mg g⁻¹. Katsuki i sur. za navedene kemijske elemente u cvjetovima *C. yedoensis* izmjerili su udjele za Al 179 mg kg⁻¹, B 31,4 mg kg⁻¹, dok za udio Ag nema podatka.⁷⁰ U nešto većim masenim udjelima za uzorke cvjetova trešanja prisutan je Fe u rasponu od 34,5-112 mg g⁻¹, što je puno niže od udjela Fe koju su dobili Katsuki i sur. od 115 mg kg⁻¹.

Ostali mikroelemenati u cvijetu *C. yedoensis* i *P. avium* prisutni u nižem masenom udjelu u odnosu na Ag, a to su: Ba, Co, Cr, Cu, Li, V i Zn. Esencijalni mikroelementi Cu i Zn nužni su za normalno funkcioniranje brojnih enzima i prisutni su u *C. yedoensis* u udjelu od 10,2 mg g⁻¹ za Cu i 7,17 mg g⁻¹ za Zn, u *Kiku shidare zakura* 23,6 mg g⁻¹ za Cu i 29,6 mg g⁻¹ za Zn, u *P. avium* 32,0 mg g⁻¹ za Cu i 24,6 mg g⁻¹ za Zn. Dobivene su niže vrijednosti od literaturnih podataka za cvijet *C. yedoensis* (7,1 mg kg⁻¹ za Cu i 22,7 mg kg⁻¹ za Zn).⁷⁰



Slika 15. Raspodjela mikroelemenata (mg g^{-1}) u uzorcima cvjetova japanskih trešnja *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura*, *P. serrulata* i *P. avium* nakon mikrovalno potpomognutog razaranja

Vrijednosti Zn, Co i Cr u uzorcima *C. yedoensis*, *Kiku shidare zakura* i *P. avium* su vrlo niske, iako Cr pripada u esencijalne mikroelemente raspon njegovog udjela je od 0,051-2,05 mg g^{-1} . Po novijim istraživanjima Ni se smatra esencijalnim elementom jer je funkcionalni element za djelovanje enzima ureaze. Najveći udio Ni izmjerili smo u uzorku *P. serrulata* (125 mg g^{-1}) dok su Katsuki i sur. izmjerili u *C. yedoensis* 1600 mg g^{-1} .⁷⁰ Mn je izmjeren u vrlo niskim udjelima samo u uzorcima *P. serrulata* i *P. avium*, dok su Katsuki i sur. izmjerili u *C. yedoensis* udio Mn od čak 76,7 mg kg^{-1} .⁷⁰

Usporedno s literaturnim podacima prisutne su velike razlike koje mogu biti pokazatelj drugačijeg sastava tla na kojem se uzgajaju biljke, starost biljke, vrijeme branja cvijeta, utjecaj zagađenja te same opreme za analizu.

4.2.1. Elementna analiza cvjetova japanskih jabuka i lješnjaka

Nakon validacije metode ICP-AES za uzorke cvjetova japanske trešnje nakon mikrovalno potpomognutog razaranja provedena je elementna analiza i uzoraka cvjetova japanskih jabuka i lješnjaka. Za razgradnju uzorka korištena je jednaka smjesa reagensa dušične kiseline s dodatkom vodikovog peroksida i to u omjeru 6,0 mL HNO_3 (50:50, v/v) + 2 mL H_2O_2 , a rezultati masenih udjela elemenata su prikazani u tablici 9 i 10.

Tablica 9. Maseni udio makroelemenata i olova nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka cvjetova japanskih trešanja

Element	$w / \text{mg kg}^{-1}$		
	<i>M. floribunda</i>	<i>M. purpurea</i>	<i>H. japonica</i>
Ca	111	115	57
K	86,1	121	110
Mg	13,4	17,7	16,0
Na	5,33	0,653	5,16
Pb	13,1	18,2	15,6

Vrijednosti masenih udjela iz tablice 9 prikazane su radi bolje preglednosti na slici 16.

Tablica 10. Maseni udjeli mikroelemenata nakon mikrovalno potpomognutog razaranja uzorka cvjetova japanskih jabuka i lješnjaka

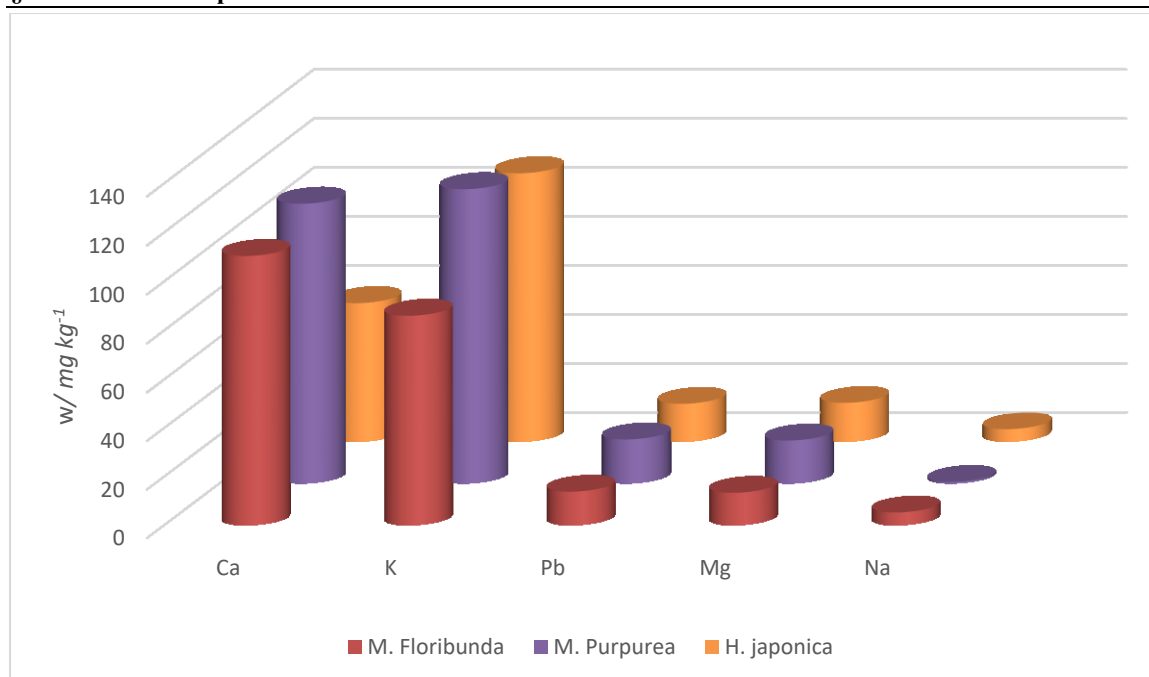
Element	$w / \text{mg g}^{-1}$		
	<i>M. floribunda</i>	<i>M. purpurea</i>	<i>H. japonica</i>
Ag	2,88	6,87	2,70
Al	61,5	173	54,0
B	78,6	106	67,5
Ba	23,9	53,2	15,7
Co	4,55	12,5	4,24

Cr	-	2,22	-
Cu	18,2	271	29,2
Fe	78,6	217	52,8
Li	37,5	81,4	26,5
Mn	6,79	13,4	4,68
Ni	82,5	226	55,8
V	24,0	69,0	29,4
Zn	27,3	288	48,2

Za uzorke biljaka *M. purpurea* i *H. japonica* nisu pronađeni literaturni podaci elementne analize za usporedbu rezultata dobivenih u okviru ovog diplomskog rada.

Cvijet uresne japanske jabuke (*Malus floribunda*) sadrži najveći udio Ca (111 mg kg⁻¹), što je ujedno i najveći izmjereni udio kalcija u svim analiziranim cvjetovima.

Udio K i Mg, je 86,1 mg kg⁻¹ i 13,4 mg kg⁻¹, a Pb 13,1 mg kg⁻¹. U literaturi za cvjetove jabuka *M. floribunda* i *M. purpurea*, te japanskog lješnjaka *H. japonica* ne postoje podaci masenih udjela za usporedbu. Jedini dostupan podatak je za koru uzorka *Malus floribunda* u istraživanju Yigit gdje je određena vrijednost Pb od 0,0509 mg kg⁻¹ što upućuje akumulaciju olova.⁷⁴ Tošić i suradnici su izmjerili udio Pb u korijenu jabuke *Malus spp.* 25,5 mg kg⁻¹, u granama 53,9 mg kg⁻¹ i u lišću 47,1 mg kg⁻¹.⁷⁵ Natrij se nalazi u masenom udjelu od 5,33 mg kg⁻¹, a u kori uzorka *Malus floribunda* 352,3 mg kg⁻¹.⁷⁴

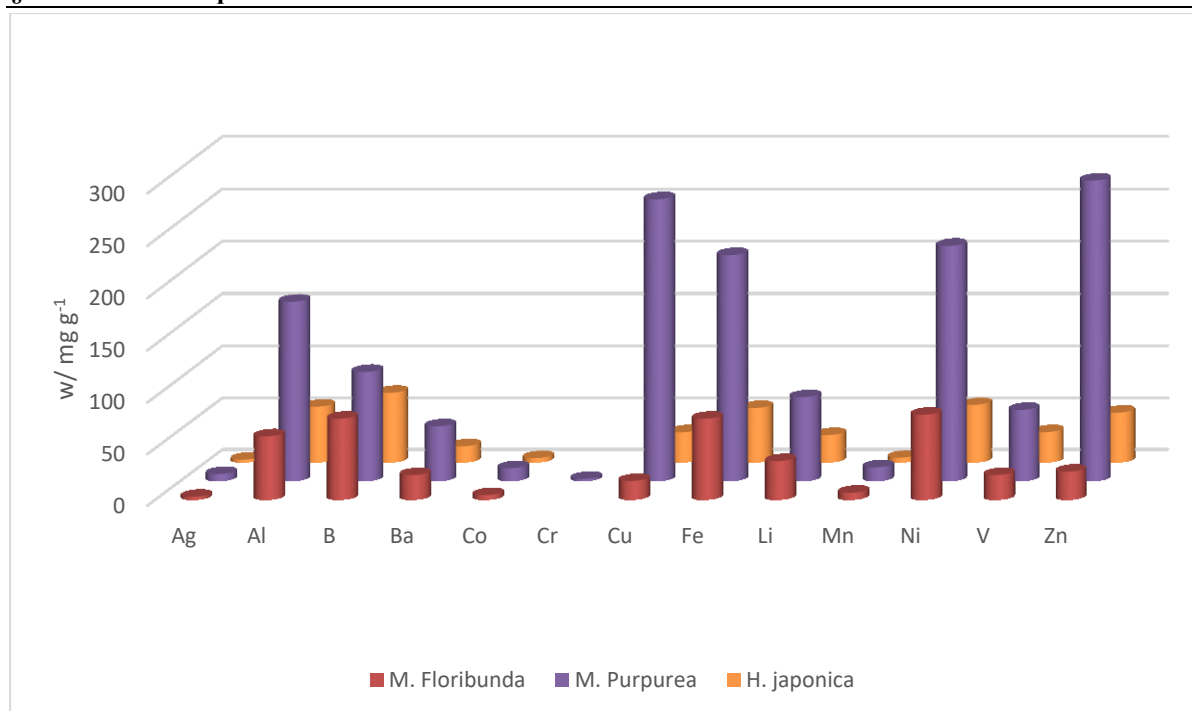


Slika 16. Raspodjela makroelemenata i olova u uzorcima japanskih jabuka *M. floribunda* i *M. purpurea*, te japanskog lješnjaka *H. japonica* nakon mikrovalno potpomognutog razaranja.

U cvijetu crvenolike japanske jabuke (*Malus x purpurea*) najveći maseni udio ima K (121 mg kg⁻¹), te Ca s 115 mg kg⁻¹. Olovo je i u ovom uzorku prisutan u visokom udjelu od 18,2 mg kg⁻¹, dok su za Mg i Na izmjerene vrijednosti od 17,7 mg kg⁻¹ i 0,653 mg kg⁻¹.

U Japanskom lješnjaku (*Hamamelis japonica*) u najvećem masenom udjelu u cvijetu je K (110 mg kg⁻¹) i Ca (56,8 mg kg⁻¹). Magneziji se nalazi u masenom udjelu od 16,0 mg kg⁻¹, dok je Na manje 5,16 mg kg⁻¹.

Mikroelemenati Zn, Cu, Ni i Al u uzorku cvijeta *M. purpurea* prisutni su u višem masenom udjelu u odnosu na ostale elemente što je prikazano na slici 17.



Slika 17. Raspodjela mikroelemenata u uzorcima japanskih jabuka *M. Floribunda* i *M. Purpurea*, te japanskog lješnjaka *H. japonica* nakon mikrovalno potpomognutog razaranja

Cink se u uzorku cvijeta *M. purpurea* nalazi u najvišem udjelu od 288 mg g⁻¹, u *M. floribunda* 27,3 mg g⁻¹, a u *H. japonica* 48,2 mg g⁻¹. Jedini podaci za maseni udio u navedenim biljkama su od Yigit u kori *M. floribunda* gdje je određena vrijednost Zn od 0,0752 mg g⁻¹, dok su Tošić i suradnici u *M. floribunda* izmjerili udio Zn u korijenu od 65,4 mg kg⁻¹, granama 71 mg kg⁻¹ i listu od 125 mg kg⁻¹.^{74,75} Bakar se u cvijetu *M. floribunda* nalazi u masenom udjelu od 18,2 mg g⁻¹, u *H. japonica* od 29,2 mg g⁻¹, a u *M. purpurea* u značajno višem udjelu u usporedbi s drugim uzorcima (270 mg g⁻¹). Bakar se u kori *M. floribunda* nalazi u vrlo niskom udjelu od 0,0356 mg g⁻¹, dok je u korijenu, granama i listu sadržan u visokim vrijednostima (291-429 mg kg⁻¹).^{74,75} Al u najvećem udjelu ima u *M. purpurea*, 173 mg g⁻¹, a Ni u istoj biljci u 226 mg g⁻¹. Željeza u cvijetu *M. purpurea* ima u visokom masenom udjelu za razliku od ostalih ispitivanih uzoraka (217 mg g⁻¹), Cr ima samo kod *M. purpurea* u masenom udjelu od 2,22 mg g⁻¹. Ostali mikroelementi su u nižim masenim udjelima od 106 mg g⁻¹ su: Ag, B, Ba, Co, Mn i V.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru diplomskog rada provedena je elementna analiza cvjetova japanskih trešnja, jabuka i lješnjaka metodom ICP-AES i spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS).

Rezultati elementne analize metodom ICP-AES i ICP-MS pokazuju analizu 18 elemenata u uzorcima cvjetova koji su prethodno podvrgnuti mikrovalno potpomognutim razaranjem u otopini HNO₃ (50:50 v/v) i H₂O₂ (1 mol L⁻¹).

Za validaciju metode ICP-AES određene su točnost koja je izražena preko iskoristivosti (75,9-150,0 %) i detekcijske granice < 2 µg g⁻¹.

Najzastupljeniji makroelement važan za ljudsko zdravlje je K s najvećim udjelom u uzorku cvijeta trešnje (*P. avium*), 134 mg kg⁻¹, dok je Na najmanje zastupljen u uzorku japanske cvjetne trešnje (*C. yedoensis*), 0,264 mg kg⁻¹.

Od esencijalnih elemenata važnih za ljudski organizam u uzorcima cvjetova prisutnih u većim masenim udjelima su Ca i Mg u rasponu od 5,01-128 mg kg⁻¹, dok se Ag i Al ističu među mikroelementima prisutnima u višim masenim udjelima u rasponu od 2,70-173 mg g⁻¹.

Toksičan element Cd nije pronađen ni u jednom uzorku cvjetova japanskih trešanja, jabuka i lješnjaka. Pb se jedino u uzorku *C. yedoensis* nalazi u dopuštenom masenom udjelu od 5,05 mg kg⁻¹ dok svi ostali uzorci cvjetova sadrže više od 10 mg kg⁻¹ Pb.

Dobiveni maseni udjeli elemenata potvrdili su da cvjetovi japanskih trešanja, jabuka i lješnjaka sadrže važne esencijalne kemijske elemente, a ne sadrže značajan udio toksičnih elemenata pa su sigurni za upotrebu.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. R. Matsuura, H. Moriyama, N. Takeda, K. Yamamoto, Y. Morita, T. Shimamura, H. Ukeda, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2007) 544-549.
 2. B. B. Lee, M.-R. Cha, S.-Y. Kim, E. Park, H.-R. Park, S. Lee, *Plant Foods Hum. Nutr.* **62** (2007) 79-84.
 3. Y. Q. Zhang, L. Guan, Z. Y. Zhong, M. Chang, D. K. Zhang, H. Li, W. Lai, *J. Cosmet. Sci.* **36** (2014) 527-530.
 4. K. J. Lamble, S. J. Hill, *Analyst* **123** (1998) 103R-133R.
 5. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=37707> (datum pristupa 5.1.2021.)
 6. N. Parađiković, *Ljekovito i začinsko bilje*, Nastavni materijal, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, 2014., str. 23.
 7. Svjetska zdravstvena organizacija, *World Health Organization, Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*, (1991), Geneva.
 8. R. Verpoorte, *J. Pharm. Pharmacol.* **52** (2000) 253-262.
 9. E. H. Wilson, *The cherries of Japan*, Printed at the University Press, Cambridge, 1916, str. 15-43.
 10. W. Kuitert, A. Peterse, *Japanese Flowering Cherries*, Timber Press Inc., Portland, 1999, str. 23-422.
 11. J. Shibato, F. Takenoya, T. Hirabayashi, A. Kimura, Y. Iwasaki, Y. Toyoda, S. Shioda, *Plant Signal Behav.* **14** (2019) 1-8.
 12. K. Takahashi, Y. Tsutsumi, H. Ohtani, T. Katsuki, *Biochem. Syst. Ecol.* **34** (2006) 127-135.
 13. H. Shimoda, S. Nakamura, M. Morioka, J. Tanaka, H. Matsuda, M. Yoshikawa, *Phytother. Res.* **25** (2011) 1329-1335.
 14. M. E. Marshall, K. Kervin, C. Benefield, A. Umerani, S. Albainy-Jenei, Q. Zhao, M. B. Khazaeli, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** (1994) S3-S10.
 15. H. N. Lee, J.-K. Kim, J. H. Kim, S.-J. Lee, E. K. Ahn, J. S. Oh, D.-W. Seo, *Chem.-Biol. Interact.* **219** (2014) 151-158.
-

16. H. Shimoda, S. Nakamura, M. Morioka, J. Tanaka, H. Matsuda, M. Yoshikawa, *Phytother. Res.* **25** (2011) 1328-1335.
 17. Y. Wang, W. Li, S. Xu, R. Hu, Q. Zeng, Q. Liu, Li. Shan, H. Lee, M. Chang, L. Guan, *Cytotechnology* **71** (2019) 75-487.
 18. <https://savvytokyo.scdn3.secure.raxcdn.com/app/uploads/2016/03/somei-yoshino-by-coniferconifer-cropped.jpg> (datum pristupa 10.1.2021.)
 19. <https://www.living4media.com/images/12211022-Prunus-serrulata-Kiku-Shidare-Zakura> (datum pristupa 13.1.2021.)
 20. U. Quattrocchi, *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants* 1st Edition, CRC Press, New York, 2012, str. 908.
 21. <https://www.plantea.com.hr/japanska-tresnja/> (datum pristupa 13.1.2021.)
 22. [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/tresnja_\(prunus_avium\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/tresnja_(prunus_avium)) (datum pristupa 13.1.2021.)
 23. Lj. Grlić, *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja*, Ex Libris, Rijeka, 2005, str. 26-27
 24. <https://www.rhs.org.uk/plants/10771/Malus-floribunda/Details> (datum pristupa 13.1.2021.)
 25. E. F. Gilman, D. G. Watson, *Malus floribunda, Japanese Flowering Crabapple*, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1994, str.1-3.
 26. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c8/Malus_x_purpurea_var_Lemoinei_RB2.JPG/1200px-Malus_x_purpurea_var_Lemoinei_RB2.JPG (datum pristupa 13.1.2021.)
 27. S.-H. Yim, Y. J. Lee, K.D. Park, I.-S. Lee, B. A. Shin, D. W. Jung, D. Williams, H. J. Kim, *Nat. Prod. Sci.* **21** (2015) 162-169.
 28. https://www.baumschule-horstmann.de/bilder/popup/japanische-zaubernuss-m053351_h_0.jpg (datum pristupa 13.1.2021.)
 29. P. J. Rand, *Cliffs Quick Review Plant Biology*, IDG Books Worldwide Inc., New York, 2001, str. 107-113.
 30. T. L. Provin, M. L. McFarland, *Essential Nutrients for Plants*, Texas A&M AgriLife Extension Service, U. S. Department of Agriculture, **ESC-009**
 31. https://biocyclopedia.com/index/plant_nutrition/essential_elements_macronutrients/nitrogen/nitrogen_metabolism_and_nitrogenous_constituents_in_plants.php (datum pristupa 15.1.2021.)
-

32. A. V. Barker, D. J. Pilbeam, *Handbook of plant nutrition 15th ed.*, Boca Raton, CRC/Taylor & Francis, Chicago, 2007, str. 20-665.
 33. M. R. Broadley, H. C. Bowen, H. L. Cotterill, J. P. Hammond, M. C. Meacham, A. Mead, P. J. White, *J. Exp. Bot.* **55** (2004) 321–336.
 34. A. R. Lucheta, M. R. Lambis, *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **36** (2012) 1369-1379.
 35. W. Bergmann, *Nutritional disorders of plants*, Gustav Fischer, New York, 1993, 384-394.
 36. F. Bangerth, *Annu. Rev. Phytopathol.* **17** (1979) 97-122.
 37. D. T. Clarkson, J. B. Hanson, *Annu. Rev. Phytopathol.* **31** (1980) 239-298.
 38. T. F. Neales, *Nature* **177** (1956) 388-389.
 39. J. Amesz, *Biochim. Biophys. Acta* **726** (1993) 1–12.
 40. R. D. Graham, R. J. Hannam, N. C. Uren, *Manganese in Soils and Plants*, Springer, The University of Adelaide, Glen Osmond, (1988), str. 125-137.
 41. N. Terry, *Plant Physiol.* **60** (1977) 69-75.
 42. B. L. Vallee, D. S. Auld, *Biochemistry* **29** (1990) 5647-5659.
 43. B. L. Vallee, K. H. Falchuk, *Physiol. Rev.* **73** (1993) 79-118.
 44. R. R. Mendel, G. Schwarz, *Crit. Rev. Plant Sci.* **18** (1999) 33-69.
 45. V. Vukadinović, *Ishrana bilja 3.izdanje*, "Zebra", Vinkovci, 2011, str. 161-247.
 46. D. Drčić, *Ekotoksikologija kadmija*, Završni rad, Zavod za primijenjenu kemiju, Zagreb (2014) 66-75.
 47. M. Sedak, N. Bilandžić, B. Čalopek, M. Đokić, B. S. Kolanović, I. Varenina, Đ. Božić, I. Varga, B. Šimić, M. Đuras, T. Gomerčić, *Veterinarska stanica* **46** (2015), 467-480.
 48. G. Gauglitz, T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003, str. 466-493.
 49. D. Skoog, F. J. Holler, T. Nieman. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Edition, Saunders Collage Publishing, 1998, str. 115-299.
 50. S. Rončević, L. Pitarević Svedružić, *Atomska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu u analizi vode*, Zagreb, 2007, Zbornik radova i sažetaka Znanstveno-educativnog projekta Studentskog odsjeka HGD-a "VODA I MI II.", Hrvatsko geološko društvo, str. 17-18
 51. https://en.wikipedia.org/wiki/Inductively_coupled_plasma#/media/File:Inductively_Coupled_Plasma.jpg (preuzeto 15.1.2021.)
-

52. Y. Ohashi, H. Kawakami, Y. Shigeta, H. Ikeda, N. Yamamoto, *Int. J. Biometeorol.* **56** (2012) 903-14.
53. E. Altuntas, N. Karaosman, *Agricultural Engineering International* **17** (2015) 264-272.
54. S. Takehara, Y. Takaku, H. Suzuki, I. Ohta, M. Shimomura, T. Hariyama, *Sci. Rep.* **8** (2018) 1685.
55. H. A. Jung, H. Y. Chung, S. S. Kang, S. K. Hyun, H. S. Kang, J. S. Choi, *Arch. Pharm. Res.* **28** (2005) 1127.
56. M. Petek, N. Toth, M. Pecina, T. Karažija, M. Herak Ćustić, *Agric. Conspec. Sci.* **81** (2016) 173-179.
57. R. Sakurai, S. K. Jacobson, H. Kobori, R. Primack, K. Oka, N. Komatsu, R. Machida, *Biol. Conserv.* **144** (2011) 654-658.
58. M. Ayala, P. Bañados, M. Thielemann, R. Toro, *Cien. Inv. Agr.* **41** (2014) 71-80.
59. K. Dziadek, A. Kopeć, S. Czaplicki, *Eur. Food Res. Technol.* **244** (2018) 1415-1426.
60. S. H. Yim, Y. J. Lee, K. D. Park, I. S. Lee, B. A. Shin, D. W. Jung, D. R. Williams, H. J. Kim, *Natural Product Sci.* **21** (2015) 162-169.
61. M. Zeiner, I. Juranović Cindrić, *Toxics* **6** (2018) 31-41.
62. M. Zeiner, I. Juranović Cindrić, *Anal. Methods* **9** (2018) 1550-1574.
63. I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, E. Glamuzina, G. Stingeder, *Microchem. J.* **107** (2013) 185-189.
64. I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, D. Mihajlov-Konanov, G. Stingeder, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **14** (2017) 539.
65. A. Sekiguchi, S. I. Motegi, C. Fujiwara, S. Yamazaki, Y. Inoue, A. Uchiyama, R. Akai, T. Iwawaki, O. Ishikawa, *J. Dermatol. Sci.* **9** (2018) 68-17.
66. Y. Kurosawa, N. Sakagami, M. Watanabe, *Geographical Reports of Tokyo Metropolitan University* **48** (2013) 25-35.
67. WHO (1998) *Quality control methods for medicinal plant materials*, Geneva.
68. N. K. S. Singh, C. B. Devi, T. S. Singh, N. R. Singh, *Indian J. Nat. Prod. Resour.* **1** (2010) 227-31.
69. S. Aziz, K. Saha, N. Sultana, H. Parvin Nur, M. A. Ahsan, S. Ahmed, M. K. Hossain, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **6** (2016) 50-54
-

-
70. F. Katsuki, A. Hokura, D. Iwahata, T. Ikuma, S. Oguri, H. Haraguchi, *Bunseki Kagaku* **47** (2018) 835–844.
71. S. Jiménez, A. Garín, Y. Gogorcena, J. A. Betrán, M. A. Moreno, *J. Plant Nutr.* **27** (2004) 701-712.
72. D. Yigit, E. Baydas, M. Guleryuz, *Asian J. Chem.* **4** (2009) 2935-2942.
73. M. Stochl, B. Krska, P. Pilarova, *Acta Agric. Serb.* **26** (2008)
74. N. Yigit *Determination of heavy metal accumulation in air through annual rings: The case of Malus floribunda species*, *Appl. Ecol. Environ. Res.* **17** (2019) 2755-2764
75. S. Tošić, S. Alagić, M. Dimitrijević, A. Pavlović, M. Nujkić, *Ambio* **45** (2015) 501–512.
-

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ana Brođanac

Datum rođenja: 12.07.1993.

Mjesto rođenja: Osijek

Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola Josipa Antuna Čolnića, Đakovo

2008.–2012. Medicinska škola Osijek - smjer farmaceutski tehničar, Osijek

2013.–2017. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

2017.–2021. Diplomski sveučilišni studij kemije, smjer: istraživački, grane: Analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
