

Grgo Ljubičić

**Optimizacija metode za određivanje teških metala u
uzorcima začina plamenom atomskom apsorpcijskom
spektroskopijom – kemometrijski pristup**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Jasni Jablan na pruženoj pomoći, stečenom znanju te uloženom vremenu i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada. Također, zahvaljujem se svojim roditeljima Nevenu i Stošiji koji su mi uvijek bili najveća podrška i motivacija. Zahvaljujem se sestri Kristini i zetu Ivanu, te bratu Ivanu i nevjesti Maji na pomoći, savjetima i potpori. Last but not least, zahvaljujem se prijateljima Toniju, Brani i Bruni bez kojih ovo ništa ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Minerali	2
1.2. Teški metali	2
1.2.1. Bakar	3
1.2.2. Cink	3
1.2.3. Željezo	4
1.2.4. Mangan.....	5
1.3. Začinsko bilje	5
1.4. Biljne vrste.....	6
1.4.1. Origanum vulgare L.	6
1.4.2. Petroselinum crispum (Mill.) Fuss.....	7
1.5. Atomska apsorpcijska spektroskopija.....	7
1.5.1. Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija	8
1.6. Validacija analitičke metode.....	11
2. Obrazloženje teme.....	14
3. Materijali i metode	16
3.1. Materijali.....	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Radni instrumenti i pribor	17
3.1.3. Uzorci.....	18
3.2. Metode	18
3.2.1. Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija (FAAS)	18
3.2.1.1. Priprema uzoraka za FAAS.....	19
3.2.1.2. Priprema radnih otopina.....	19
3.2.1.3. Priprema 2% dušične kiseline (HNO₃).....	19
3.2.2. Statistička analiza.....	20
4. Rezultati i rasprava	21

4.1. Validacija analitičke metode.....	22
4.2. Određivanje sadržaja teških metala u uzorcima začina	33
4.3. Kemometrijske metode obrade podataka	35
4.3.1. Multivarijantna analiza	35
5. Zaključak	39
6. Popis kratica, oznaka i simbola.....	41
7. Literatura	43
8. Sažetak/Summary.....	48
9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

1. Uvod

1.1. Minerali

Minerali imaju važnu ulogu u mnogobrojnim biološkim, kemijskim, biokemijskim, metaboličkim, i enzimatskim reakcijama u biljnim, životinjskim i ljudskim stanicama. Akumuliraju se u vitalnim ljudskim organima kroz duži vremenski period. Predložene su različite klasifikacije elemenata. Elementi koji su potrebni organizmu u količini većoj od 100 mg dnevno poput natrija(Na), kalija(K), fosfora(P), klora(Cl), magnezija(Mg), sumpora(S) i kalcija(Ca) nazivaju se makroelementima. Manjak ili nedostatak ovih elemenata u organizmu može dovesti do ozbiljnih pa čak i do smrtonosnih posljedica i komplikacija. Elementi koji su prijeko potrebni za ljudski organizam u količinama manjim od 100 mg dnevno, poznati su kao elementi u tragovima ili mikroelementi koji uključuju: željezo(Fe), bakar(Cu), mangan(Mn), jod(J), cink(Zn), kobalt(Co), selen(Se), molibden(Mo) i krom(Cr). U svim predloženim klasifikacijama i makroelementi i elementi u tragovima, smatraju se ključnim za normalan i optimalan rast i razvoj (Frieden, 1986).

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

1.2. Teški metali

Pojam teški metali odnosi se na kemijske elemente čija je relativna gustoća veća od 5 g/dm³. Dijele se na esencijalne mikroelemente u koje se ubrajaju Cu, Fe, Mn, Zn, Mo i nikal(Ni), te na potencijalno toksične ili neesencijalne elemente u koje se ubrajaju oni metali koji nisu biogeni i djeluju isključivo toksično kao što su kadmij(Cd), olovo(Pb), živa(Hg) i arsen(As). Teški metali predstavljaju važnu sirovinu za mnogobrojne industrijske grane, neki od njih su neophodni za žive organizme, mogu djelovati povoljno na produktivnost i prinos poljoprivrede, a većina njih često je značajan zagađivač životne sredine. Smatra se da su teški metali elementi koji se akumuliraju u organizmu te na taj način predstavljaju veliku prijetnju javnom zdravlju. Ljudi su izloženi teškim metalima iz različitih izvora, no smatra se da je glavni izvor unos putem kontaminirane hrane i pića. Ne-esencijalni teški metali izrazito su toksični pri vrlo niskim koncentracijama. Unatoč činjenici da su Zn, Fe, Cr, Ni, Cu i Mn esencijalni

kofaktori enzima koji su potrebni u normalnom metabolizmu ljudi, u povišenim koncentracijama mogu biti toksični za ljudski organizam (Hu i sur., 2019).

1.2.1. Bakar

Bakar je kemijski element koji je u niskim koncentracijama potreban za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma te se stoga i naziva esencijalnim. Dnevna potreba za bakrom za zdravu odraslu osobu je 1-2 mg (Bost i sur., 2016). Bakar je redoks-aktivan element, koji u organizmu služi kao katalitički kofaktor i kao strukturna komponenta proteina te ima brojne uloge poput prijenosa kisika, enzimske aktivnosti, i staničnog signaliziranja. Sudjeluje u sintezi vezivnog tkiva (kapilara, popravka ožiljaka tkiva i sl.), mišićja i kostiju kao kofaktor prolil i lizil hidroksilaze. Prolil i lizil hidroksilaze su enzimi uključeni u nastanak poprečnih veza odgovornih za čvrstoću kolagenskog heliksa. Zbog svega navedenog nedostatak bakra povezuje se s povećanim rizikom od nastanka koronarnih poremećaja i tegoba. Također, bakar je odgovoran za pretvorbu željeza u feri (Fe^{3+}) oblik u kojem se može transportirati u organizmu. Kofaktor je i tirozinaze, enzima koji sudjeluje u sintezi kožnog pigmenta melanina. Neophodan je za normalan razvoj mozga i živčanog sustava. Uključen je u nastanak mijelina kao i u sintezu neurotransmitera, a isto tako je i kofaktor u mnogim oksidacijsko-redukcijskim procesima posredovanim enzimima koji sadržavaju bakar. (Terres-Martos i sur., 1997).

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

1.2.2. Cink

Cink je metal koji sudjeluje u raznim staničnim funkcijama uključujući sintezu i razgradnju ugljikohidrata, proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Prosječna dnevna potreba za unos cinka iznosi 15-20 mg (Prashanth i sur., 2015). Nužan je za normalno funkcioniranje

imunološkog sustava, diobu stanica kao i njihov rast. Esencijalan je za normalnu spermatogenezu i sazrijevanje spermija, integritet genoma spermija, normalnu organogenezu, funkciju neurotransmitera, razvoj timusa, epitelizaciju kod zarastanja rana i druge izrazito važne fiziološke funkcije organizma. Cink je sastavni dio više od 300 enzima. Neki od najvažnijih enzima koji sadrže cink su alkalna fosfataza, alkohol dehidrogenaza, karboanhidraza, glutamat dehidrogenaza i RNA polimeraza (Prashanth i sur., 2015). Kako je cink fiziološki izrazito bitan metal njegova deficijencija dovodi do različitih patoloških stanja. Neki od njih su smanjeni rast, alopecija, kožne lezije, proljev, smanjeni apetit, smanjeni odgovor imunološkog sustava i drugi. Povišene koncentracije cinka su toksične, dok je gornja granica dnevnog unosa za odraslu osobu 45 mg (Dutra i sur., 2006).

1.2.3. Željezo

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

1.2.4. Mangan

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

1.3. Začinsko bilje

Začini su osušeni, aromatični dijelovi biljaka. Prema definiciji Food and Drug Administration (FAD) začini su: "aromatične biljne tvari, u cijelom, razbijenom ili mljevenom obliku, čija je funkcija u hrani okus, a ne prehrana" (www.fda.gov). Glavna razlika između bilja i začina je u tome što začin dolazi iz bilo kojeg dijela biljke osim lišća, dok bilje dolazi isključivo iz lišća (Embuscado, 2015). Začini obično dolaze iz osušenih dijelova biljke kao što su pupoljci, cvjetovi (klinčići, šafran); kora (cimet); korijen (đumbir, kurkuma); voće/bobice (klinčići, čili, crni papar); ili sjemenke (kumin) koje sadrže hlapljiva ulja ili aromatične mirise i okuse.

Većina poznatih bilja i začina potječe iz zemalja Mediterana, Bliskog istoka ili Azije, dok su se mnogi koristili još od starog egipatskog i rimskog doba (Peter, 2004).

Kemijski sastav biljnih vrsta je kompleksan. Osim što su izvor organskih spojeva poput polifenola, flavonoida, proteina, enzima, vitamina i aminokiselina, bogat su izvor i različitih mikro i makro elemenata.

Mješavine začina mogu predstavljati opasnost po zdravlje ljudi zbog prisutnosti toksičnih elemenata. Zbog pravilne primjene biljnih vrsta te zbog zaštite korisnika od trovanja toksičnim elementima važno je znati mineralni sastav biljnih vrsta. Poznato je da su metali poput Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se i Zn sastojci bitnih enzima ili sudionika u nizu fizioloških procesa pa ih se smatra neophodnima za pravilno funkcioniranje ljudskog

organizma. Nedovoljna opskrba tim esencijalnim mikro-elementima rezultira nizom bolesti ili stanja. Međutim, neki drugi elementi nepoželjni su ili toksični za ljudsko zdravlje poput As, Cr, Cd, Ni i Pb. Do kontaminacije biljnih vrsta može vrlo lako doći tijekom uzgoja i prerade biljaka (Basgel i Erdemoglu, 2006). Zagađenje tla teškim metalima, zagađenje voda za navodnjavanje, atmosferska prašina, industrijski i automobilski ispušni plinovi, pesticidi te gnojiva igraju važnu ulogu u kontaminaciji biljnih vrsta. Biljke su primarni primatelj elemenata iz okoliša koji se apsorbiraju putem korijenja i listova. Listovi biljaka mogu biti izvor mineralnih elemenata poput cinka, magnezija, mangana, željeza, bakra, titana(Ti), broma(Br), aluminijska(Al), stroncija(Sr), natrija, fosfora, kalija, joda i fluora(F). Učestala konzumacija različitih začina može značajno pridonijeti unosu preporučenih dnevnih doza (RDA, EFSA, 2006) nekih esencijalnih i nutritivno važnih elemenata, ali isto tako može doprinijeti unosu toksičnih elemenata i povećati rizik od trovanja njima. Naročito ako se uzme u obzir njihova sklonost nakupljanju u ljudskom organizmu. S obzirom na činjenicu da elementarni sastav utječe na farmakoterapijska svojstva biljnih vrsta, poznavanje koncentracije esencijalnih i toksičnih elemenata od iznimne je važnosti za utvrđivanje učinkovitosti biljnih vrsta u liječenju različitih bolesti te radi procjene njihove hranidbene vrijednosti (Suchacz i Wesołowski, 2006; Han i sur., 2007; Salahinejad i Aflaki, 2010).

1.4. Biljne vrste

1.4.1. *Origanum vulgare* L.

Origano je kulinarsko biljka koje potječe iz obitelji biljaka Lamiaceae, koja uz origano uključuje bosiljak, ružmarin, mentu, kadulju, lavandu, mažuran i druge.

Origano (lat. *Origanum vulgare*) autohtona je biljka zapadne i jugozapadne Euroazije i mediteranske regije. Ima aromatičan, topao i blago gorak okus. Među kemijskim spojevima koji pridonose okusu origana su karvakrol, pinen, timol, limonen, ocimen i kariofilen (Mockute i sur., 2001.). Origano također sadržava polifenole, uključujući kafeinsku, p-kumarinsku i ružmarinsku kiselinu, koji djeluju antioksidativno i sprječavaju peroksidaciju lipida (Rubio i sur., 2013.). Široko se koristi u mediteranskoj kuhinji, na Filipinima i u Latinskoj Americi.

1.4.2. *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss.

Peršin (lat. *Petroselinum crispum*) je kulinarska biljka koja pripada obitelji Apiaceae. Porijeklom je iz srednjeg Mediterana. Svježi peršin ima čistu aromu sa svestranim svježim okusom koji je blago papren. Peršin je izvor nekoliko korisnih flavonoida, posebice luteolina i apigenina (Maher HM i sur., 2015; Meyer i sur., 2006). Apigenin je povezan s protuupalnim djelovanjem jer smanjuje aktivnost ili inhibira ciklooksigenoazu-2 (COX-2) (Pan MH i sur., 2010). Apigenin je također prepoznat kao potencijalno sredstvo za kemoprevenciju raka (Shukla i sur., 2010). Glavna sastavnica eteričnog ulja koje se nalazi u lišću peršina je 1,3,8-p-mentatrien, ali i druge komponente su također prisutne u manjim količinama, uključujući miristicin i limonen između ostalih (Zhang H i sur., 2006; Simon JE i sur., 1988).

1.5. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija (eng. Atomic Absorbtion Spectroscopy-AAS) je instrumentalna spektrofotometrijska analitička tehnika, temeljena na apsorpciji elektromagnetnog zračenja, koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje više od 70 elemenata. Tehnika je vrlo precizna, točna i osjetljiva te većina metala može biti dokazana i određena. Osim za određivanje i dokazivanje metala, tehnika može poslužiti i za indirektno određivanje i dokazivanje nekih nemetala.

Atomska apsorpcijska spektroskopija ima široku primjenu u određivanju metala u tragovima, toksikologiji metala te određivanju kakvoće i sadržaja ljekovitih tvari i gotovih oblika. Ovo su samo neka od područja primjene AAS-a u medicini i farmaciji.

U industrijskim procesima koristi se za ispitivanje onečišćenja međuprodukata, završnog proizvoda te otpadnih produkata neželjenim metalima. Važna primjena AAS je u analizi tla koje će se koristiti za poljoprivredu. Ispituje se prisutnost i količina esencijalnih metala, metala u tragovima te aditiva u tlu što omogućuje dobivanje tla specifičnog sastava za uspješan uzgoj željene kulture. Primjenjuje se i u ispitivanju hrane na toksične metale, ali i za analizu esencijalnih metala u tragovima, koji su neophodni za normalno funkcioniranje organizma. U sprezi s drugim analitičkim tehnikama, AAS se primjenjuje u forenzici za analizu metala u metcima, barutu, oštricama i drugim uzorcima kako bi se utvrdio njihov izvor (White, 2009).

Temelji se na svojstvu atoma da apsorbiraju zračenja na određenim valnim duljinama. Atom koji ima najnižu energiju i najstabilniju elektronsku konfiguraciju nalazi se u svom temeljnom stanju. Dovođenjem energije ona se apsorbira i atom prelazi u manje stabilnu konfiguraciju, odnosno u pobuđeno stanje. Elektroni atoma apsorbiraju točno određenu energiju, prelaze na više energetske nivoe te se zatim spontano vraćaju u osnovno stanje emitirajući fotone svjetlosti. Pri tome se emitira energija koja je jednaka prethodno apsorbiranoj energiji (Beaty i Kerber, 1993).

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

Za razliku od emisijske spektroskopije, koja mjeri emisiju zračenja kada se elektroni vraćaju iz pobuđenog u osnovno stanje, apsorpcijska spektroskopija mjeri izvorno zračenje koje apsorbiraju elektroni u osnovnom stanju. S obzirom da je većina atoma u uzorcima u osnovnom stanju, apsorpcijska mjerenja su općenito osjetljivija od emisijskih.

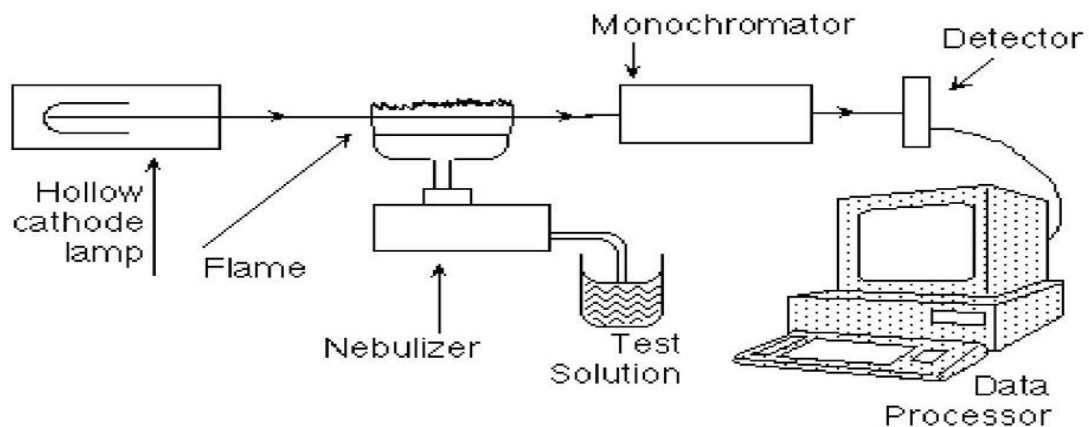
Također, atomska apsorpcijska spektroskopija pogodnija je za elemente gdje su razlike u energijama prevelike da bi se postiglo emisijsko zračenje (Jingesh i sur., 2012; Watson 1999)

1.5.1. Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija

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

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

Atomski apsorpcijski spektrofotometar sastoji se od izvora linijskog zračenja, atomizatora, monokromatora i detektora (Watson 1999).



Slika 1. Dijelovi plamenog atomskog apsorpcijskog. Preuzeto od Chemical Instrumentation-Weebly

Izvor linijskog zračenja

Kao izvor linijskog zračenja u atomskoj apsorpcijskoj spektroskopiji koristi se lampa sa šupljom katodom. Lampa sadrži cilindričnu metalnu katodu, zatvorenu u staklenu cijev i ispunjenu inertnim plinom neonom ili argonom. Primjenom napona dolazi do ionizacije neutralnog plina. Pozitivno ionizirane atome plina privlači metalna katoda i dolazi do sudara atoma plina s atomima metala na katodi i prijenosa energije. Posljedica toga je prelazak atoma metala u pobuđeno stanje. Povratkom u osnovno stanje atomi metala emitiraju zračenje točno one energije koju mogu apsorbirati atomi u ispitivanom uzorku (Jingesh i sur., 2012; White). Za svaki element potrebno je koristiti drugu lampu tj. lampu čija katoda sadrži element koji želimo ispitati. Iako je moguće napraviti višeelementne lampe od legura ili mješavina atoma, prihvatljive su samo određene kombinacije. Primjer takvih kombinacija su PerkinElmer®

Lumina Lamp Ca-Mg-Zn i PerkinElmer® Lumina Lamp Co-Cr-Cu-Fe-Mn-Ni (Arnold i sur., 2011; White 2009).

Atomizator

U atomizatoru dolazi do pretvorbe iona metala i njegovih spojeva u oblik slobodnih atoma i plinovito agregatno stanje. Najčešće se koriste plameni atomizator i grafitna peć (elektrotermalni atomizator) (Jingesh i sur., 2012).

U plamenoj apsorpcijskoj spektroskopiji (eng. Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS) tekući uzorak se dovodi u plamen putem raspršivača. U raspršivaču se uzorak prevodi u kapljice koje lako izgaraju u plamenu. Plamen služi kao izvor neutralnih atoma ili molekula, uklanja otapalo i atomizira uzorak tj. oslobađa analit iz soli ili drugih spojeva. Plamen zahtjeva oksidans i gorivo. U tu svrhu najčešće se koriste kombinacija zraka i acetilena za postizanje temperature od 2400 °C. Kombinacija dušikovog oksida i acetilena koristi se za postizanje temperature od 2800 °C i služi u analizi metala čiji su spojevi otporni na termalnu razgradnju (npr. oksidi bora, uranija i cirkonija). Prednosti plamene apsorpcijske spektroskopije su cijena (koja je relativno niska), jednostavnost upotrebe i brzina (ako je postupak automatiziran). Nasupram tome, nedostaci tehnike su to da je potrebni veliki volumeni uzorka, ograničeno je vrijeme prisutnosti atoma u plamenu zbog velike brzine izgaranja te nemogućnost analize čvrstih uzoraka (Jingesh i sur., 2012).

Iako su uzorci uglavnom u vodenim otopinama moguće je provesti analizu i iz nevodnih otapala. Najpogodnija otapala za takvu analizu su etanol i metil izobutil keton čija je viskoznost slična viskoznosti vode. Također pokazano je da uporaba organskih otapala u FAAS povećava učinkovitost atomizacije jer su viskoznost i površinska napetost uglavnom manji od onih u vodi, što dovodi do stvaranja manjih kapljica i većeg volumena uzorka u plamenu. Analiza elemenata FAAS-om u organskim otapalima obično daje rezultate jednake onima analizi u vodenim otopinama (Bader, 2011).

U grafitnoj peći atomizacija se događa u cilindričnoj grafitnoj cijevi, koja je otvorena na oba kraja i ima centralni otvor za dovod uzorka. Grijanje grafitne cijevi se postiže prolaskom električne struje. Postupak atomizacije provodi se u nekoliko koraka. Korak sušenja se provodi radi uklanjanja otapala iz uzorka, a postiže se održavanjem temperature iznad točke vrelišta otapala. U drugom koraku počinje uništavanje matriksa uzorka, to uključuje zagrijavanje grafitne cijevi na temperaturu između 350 °C i 1200 °C 45 sekundi.

Tijekom sušenja i destrukcije matriksa održava se protok dušika i argona koji uklanja vanjska onečišćenja. Podizanjem temperature između 2000 °C i 3000 °C postiže se atomizacija analita i mjeri se apsorpcija zračenja. U svrhu čišćenja instrumenta moguće je na kraju dodati još jedan korak zagrijavanja (Jingesh i sur., 2012).

Monokromator

Monokromator je uređaj koji uklanja zračenje različitih komponenti uzorka i samog plamena, dok propušta zračenje samo željene valne duljine do detektora, a postavljen je između plamena i detektora. Uređaji za atomsku apsorpcijsku spektroskopiju izrađeni su s monokromatorom koji ima jednu zraku s obzirom da bi bilo teško izraditi referentnu zraku s vlastitim raspršivačem i plamenom identičnima kao kod zrake uzorka (White 2009).

Detektor

Intenzitet odabranog svjetla, koje dolazi do detektora, najčešće se mjeri pomoću fotomultiplificirajuće cijevi. Fotomultiplificirajuća cijev detektira fotone koristeći fotoelektrični efekt i sekundarnu emisiju kako bi pretvorila svjetlost u električni signal. Na jednom kraju spojena je sa scintilatorom koji proizvodi fotone kao odgovor na dolazno zračenje. Nastali fotoni dolaze na katodu proizvodeći elektrone fotoelektričnim efektom. Multiplikaciju elektrona provodi sustav dioda-elektroda između kojih su postavljeni visoki naponi, koji dodatno ubrzavaju elektrone te u sudaru s diodama nastaju novi elektroni te se na kraju procesa dobiva pojačani električni signal na anodi. Fotomultiplificirajuća cijev se često koristi, jer može mjeriti veliki raspon valnih duljina, ima veliku dinamičnost, veliku mogućnost pojačanja signala, a malu razinu smetnji (Settle 1997; Leo 1987).

1.6. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se utvrđuje i dokumentira da je metoda prikladna za željenu namjenu. Validacija analitičke metode potvrđuje visokim stupnjem sigurnosti, da će analitička metoda davati valjane rezultate u propisanim uvjetima. Prema regulatornim zahtjevima dobre proizvođačke prakse i dobre laboratorijske prakse postupci validacije su obvezni. Validaciju treba provesti pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode,

kao i pri promjeni bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode. S obzirom da je proces validacije potvrda prikladnosti metode, s njime ne bi trebali započeti ukoliko nije siguran njegov uspješan završetak (Nigović i sur, 2014; Ahuja i Scypinski 2001).

Opis analitičkog postupka uključuje pripravu uzoraka, poredbenih tvari i reagensa, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize, kao i primjenu formula za izračunavanje rezultata, kako bi ga svaki analitičar mogao ponoviti. Analitičke značajke koje se određuju validacijom su preciznost, specifičnost, selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost, radno područje, točnost i izdržljivost.

- *Preciznost* analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Iskazuje se kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (Nigović i sur, 2014; Ahuja i Scypinski 2001).
- *Specifičnost* analitičke metode je njezina sposobnost da razlikuje samo jednu komponentu od ostalih prisutnih u uzorku, dok je selektivnost sposobnost metode da točno odredi analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka (onečišćenja, pomoćnih tvari itd.).
- *Linearnost* predstavlja sposobnost analitičke metode, da unutar određenog intervala daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskom pravca ($k > 0,999$).
- *Radno područje* je raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljivu točnost preciznost i linearnost.
- *Točnost* analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Odstupanje se iskazuje kao analitički prinos (eng. Recovery). Određuje se nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti.
- *Granica dokazivanja* (eng. Limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati.
- *Granica određivanja* (eng. Limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analita koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.
- *Izdržljivost* analitičke metode je mjera njezine sposobnosti da pod utjecajem malih i namjernih promjena parametara ostane nepromijenjena. Izdržljivost je indikator

pouzdanosti analitičke metode tijekom normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize (Nigović i sur, 2014, Medić-Šarić, 2006).

2. Obrazložnje teme

Kulinarsko bilje i začini stoljećima se koriste i kao arome i kao konzervansi hrane. Štoviše, zbog svojih poznatih i pretpostavljenih zdravstvenih prednosti, bilje i začini koriste se u medicinskoj praksi od davnina. Neki od zdravstvenih učinaka koji se pripisuju bilju i začinima uključuju antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje, kao i potencijalnu zaštitu od kardiovaskularnih bolesti, neurodegeneracije i dijabetesa tipa 2. (Vázquez-Fresno R. i sur., 2019)

Prosječni prehrambeni unos uobičajenih začina u cijeloj populaciji znatno varira diljem svijeta. Na primjer, Europljani konzumiraju prosječno 0,5 g po osobi dnevno. Umjereni potrošači bilja i začina nalaze se na Bliskom istoku i istočnoj Aziji s dnevnom potrošnjom od 2,6 odnosno 3,1 g po osobi. Najveći potrošači bilja i začina nalaze se u Indiji, Južnoj Africi i Latinskoj Americi s prosjekom od 4,4 g/dan (www.who.int). U Indiji se procjenjuje da je potrošnja samo kurkume 1,5 g po osobi dnevno (Sharma R.A. i sur., 2001). Dok je potrošnja bilja i začina općenito veća u južnim zemljama kao što su Indija, Meksiko, Peru, Kina i Tajland, unos bilja i začina se povećava u mnogim razvijenim zemljama Sjeverne Europe i Sjeverne Amerike, zbog promjene prehrambenih navika i sve veće sklonosti prema etničkoj ili začinjenoj hrani (Williams P.G. i sur., 2006) S obzirom na raširenu upotrebu bilja i začina i s obzirom na njihove poznate (i potencijalne) zdravstvene dobrobiti, očito je potrebno bolje razumjeti obrasce konzumiranja bilja i začina.

Mnoge mješavine začina mogu predstavljati opasnost za zdravlje zbog eventualne prisutnosti toksičnih elemenata. Zbog toga elementarna analiza mješavina začina od velikog je značaja i postoji potreba za brzim i osjetljivim analitičkim tehnikama koje se mogu primijeniti i u rutinskim analizama. U Europskoj farmakopeji (EDQM, 2020) propisana je FAAS tehnika za određivanje sadržaja teških metala.

Ciljevi ovog rada bili su provesti optimizaciju i validaciju metode za kvantitativnu analizu teških metala u uzorcima začina pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije te primjena optimizirane metode za određivanje sadržaja teških metala u ispitivanim uzorcima začina. U tu svrhu ispitani su validacijski parametri kao što su linearnost, ponovljivost, LOD, LOQ te je provedena kvantitativna analiza teških metala u uzorcima origana i peršina.

Dobiveni rezultati analizirani su koristeći metodu glavnih komponenata (principal component analysis, PCA) i klustersku analizu (agglomerative hierarchical clustering, AHC) kako bi se mogla utvrditi moguća povezanost između elementnog sastava začina.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Standard Zn 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Cu 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard Mn 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standardni referentni materijal, lišće zelenog čaja (CRM, Standard Reference Material 3254, Green Tea Leaves, NIST)
- Standard Fe 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Dušična kiselina (HNO₃) 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Dušična kiselina (HNO₃) 2%
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 µScm)

3.1.2. Radni instrumenti i pribor

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

- Atomski apsorpcijski spektrometar Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD)
- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)
- Tarionik s pistilom
- Grijača ploča Cimarec 2 (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa, SAD)
- Celulozni nitratni membranski filteri za filtraciju uzoraka veličine pora 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Mikropipete Rainin pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- Nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- Plastične epruvete od 10 mL i 50 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Staklene čaše : 50 mL
- Satno staklo
- Erlenmeyerova tikvica 50 mL

3.1.3. Uzorci

Tablica 1. Tablica s ispitivanim uzorcima te pripadajućim oznakama

UZORAK	OZNAKA UZORKA	NAZIV BILJNE VRSTE
Origano Ducros	Oznaka 2(prah)	Origanum vulgare (L.)
Origano Vegeta	O/Prah 1.	Origanum vulgare (L.)
Origano Kotanyi	O/Prah 2.	Origanum vulgare (L.)
Origano Hvarski	O/Prah 3.	Origanum vulgare (L.)
Persil U	P/F2	Petroselinum crispum (Mill.) Fuss
Peršin Kotanyi	P/Prah A	Petroselinum crispum (Mill.) Fuss
Peršin Vegeta	P/Prah F	Petroselinum crispum (Mill.) Fuss
Lišće zelenog čaja	CRM	Camellia sinensis (L.)

3.2. Metode

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

3.2.1. Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija (FAAS)

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

Tablica 2. Parametri mjerenja kod FAAS za određeni metal

Parametri	Zn	Cu	Mn	Fe
<i>valna duljina (nm)</i>	231,9	324,8	279,5	248,3
<i>širina pukotine (nm)</i>	0,7	0,7	0,2	0,2
<i>gorivo/oksidans</i>	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*	zrak- Ac*
<i>korekcija pozadine</i>	D2	D2	D2	D2
<i>žarulja</i>	HCL**	HCL**	HCL**	HCL**

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

3.2.1.1. Priprema uzoraka za FAAS

Uzorci začina (n=7) kupljeni su u svibnju 2021. godine u lokalnom supermarketu (Zagreb, Hrvatska) te pohranjeni na sobnoj temperaturi. U sušioniku osušen biljni materijal različitih biljnih vrsta usitnjen je u tarioniku s pistilom i smljeven u prah. Izvagana količina od 0,25 g uzorka prenese se u staklenu čašu te doda 10,0 mL koncentrirane HNO₃ i grije se poklopljeno satnim stakalcem na grijaćoj ploči (T~50°C) kroz 3h. Dobivena otopina kvantitativno se prenese u Eppendorf epruvetu i nadopuni s ultračistom vodom do 25 g. Ovako pripremljena otopina se prije analize filtrira kroz filtar veličine pora 0,45 µm. Standardni referentni materijal pripremljen je na isti način kao i uzorci.

3.2.1.2. Priprema radnih otopina

Iz matičnih otopina Zn, Cu, Mn, Fe koncentracije 1000 µg/mL napravljena su serijska razrjeđenja standarda u odgovarajućim rasponima koncentracija s ultra čistom vodom. Tako pripremljene standardne otopine korištene su za izradu baždarnih pravaca. Korišteni analitički uvjeti pripremljenih standardnih otopina i njihove koncentracije prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Analitički uvjeti za određivanje pojedinih elemenata u biljnom materijalu

Element	Jednadžba baždarnog pravca	Linearni raspon (mg/L)	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Zn	$y = 0,1747x + 0,0027$	0,05 – 4	0,9994	0,224	0,679
Cu	$y = 0,0349x - 0,0009$	0,05 – 2	0,9994	0,062	0,188
Mn	$y = 0,0439x + 0,0265$	2,0 – 20	0,9939	2,248	6,813
Fe	$y = 0,0214x + 0,0036$	2,0 - 20	0,9996	0,574	1,739

R² - koeficijent pravca; LOD-granica dokazivanja; LOQ-granica određivanja

3.2.1.3. Priprema 2% dušične kiseline (HNO₃)

2% otopina HNO₃ pripremljena je razrjeđivanjem 20 mL koncentrirane HNO₃ u odmjernoj tikvici od 1000 mL. U tikvicu se prije kiseline doda dio ultračiste vode, zatim koncentrirana HNO₃ i na kraju se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Otopina se koristila za ispiranje instrumenta.

3.2.1.4. Određivanje sadržaja teških metala u uzorcima začina

Atomskom apsorpcijskom spektroskopijom koncentracija teških metala određuje se mjerenjem apsorpcije uzoraka začina. Uzorak se plastičnom cjevčicom unosi u instrument, teški metali se u plamenu atomiziraju i izlažu linijskom zračenju valne duljine karakteristične za pojedini metal. Promjene u intenzitetu zračenja detektiraju se fotodetektorom. Iz razlike u intenzitetu zračenja dobije se apsorpcija te se iz dobivene apsorpcije pomoću kalibracijskog pravca izračuna koncentracija metala u uzorcima.

Kalibracija instrumenta izvodi se mjerenjem koncentracije niza prethodno pripremljenih kalibracijskih otopina standarda metala. Prije početka mjerenja instrument se ispire 2%-tnom dušičnom kiselinom (HNO₃) i ultračistom vodom, kojom se ispire i nakon svakog mjerenja. Uzorci i standardi se prije mjerenja homogeniziraju protresivanjem. Uzorci i standardi mjereni su u duplikatu, te su uzete srednje vrijednosti za izradu kalibracijske krivulje.

3.2.2. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 8* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, www.graphpad.com). Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$. Za univarijatnu i multivarijatnu analizu (PCA i klusterska analiza) korišten je programski paket *XLStat* (*XLStat Software, New York, SAD*).

4. Rezultati i rasprava

Teški metali prisutni su u različitim koncentracijama u biljnim vrstama i njihova koncentracija ovisi prvenstveno o vrsti tla na kojem biljka raste, pH tla, organskim komponentama, klimatskim uvjetima i o vrsti biljke. U ovom istraživanju sakupljeno je 7 različitih začina i određen je sadržaj Zn, Cu, Mn i Fe. Ispitivani elementi odabrani su prema njihovoj ulozi i važnosti u mnogim biološkim mehanizmima.

Rezultati su dobiveni postupcima analize sadržaja teških metala u uzorcima začina tehnikom atomske apsorpcijske spektroskopije. Ispitivani su validacijski parametri metode linearnost, ponovljivost, točnost, granica dokazivanja i granica određivanja.

4.1. Validacija analitičke metode

Linearnost

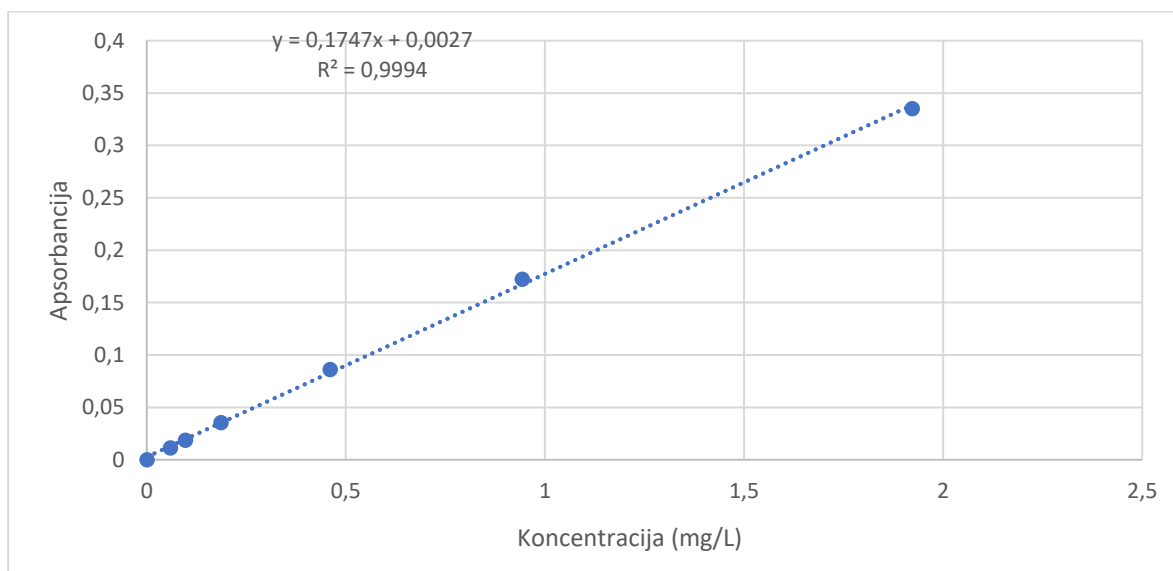
Linearnost analitičke metode je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se tako da se napravi koncentracijski niz otopina standarda te se izvrši tri do šest mjerenja najmanje pet različitih koncentracija. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca (Nigović i sur, 2014, Medić-Šarić, 2006).

Linearnost Zn

Za provjeru linearnosti izrađene su otopine koncentracije 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L i 4mg/L. Iz dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca $y = 0,1747x + 0,0027$ i koeficijent korelacije $R^2 = 0,9994$. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu linearnost za određivanje cinka u uzorcima začina.

Tablica 4. Izmjerene apsorbancije otopina za izradu kalibracijske krivulje

Koncentracija standarda (mg/L)	Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L)	Analitički signal (apsorbancija)
0	0	0
0,05	0,059	0,0113
0,1	0,097	0,0186
0,2	0,186	0,0355
0,5	0,46	0,0862
1,0	0,943	0,1724
2,0	1,922	0,3354
4,0	4,173	0,6703



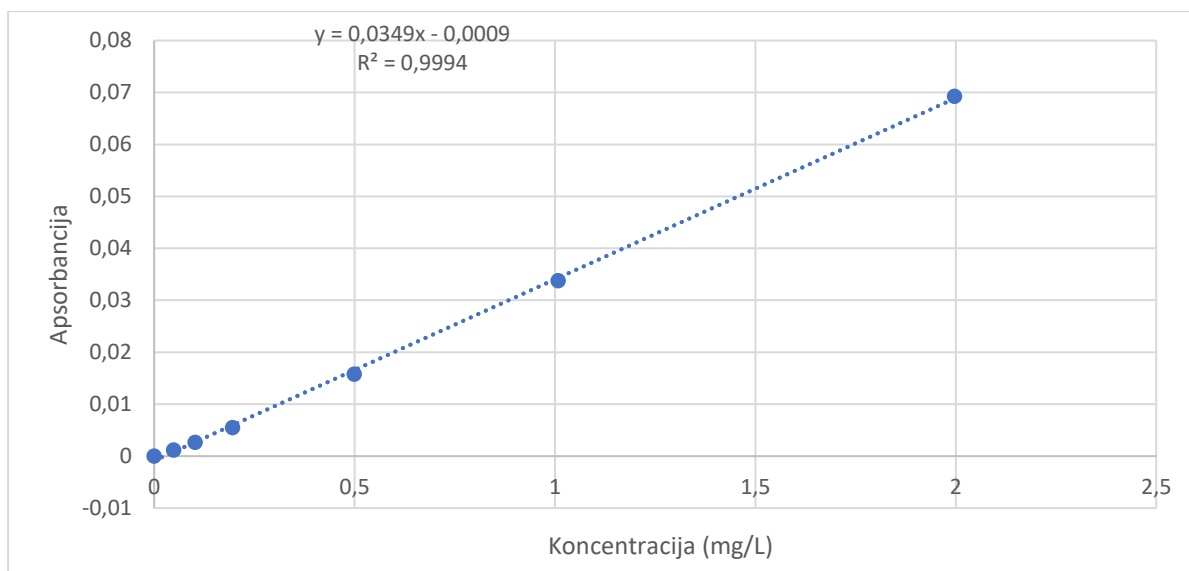
Slika 2. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije standardnih otopina cinka i apsorbancije

Linearnost Cu

Za provjeru linearnosti izrađene su otopine koncentracije 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L i 2 mg/L. Iz dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca $y = 0,0349x - 0,0009$ i koeficijent korelacije $R^2 = 0,9994$. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu linearnost za određivanje bakra u uzorcima začina.

Tablica 5. Izmjerene apsorbancije otopina za izradu kalibracijske krivulje

Koncentracija standarda (mg/L)	Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L)	Analitički signal (apsorbancija)
0	0	0
0,05	0,049	0,0012
0,1	0,102	0,0027
0,2	0,196	0,0055
0,5	0,499	0,0158
1,0	1,008	0,0338
2,0	1,997	0,0693



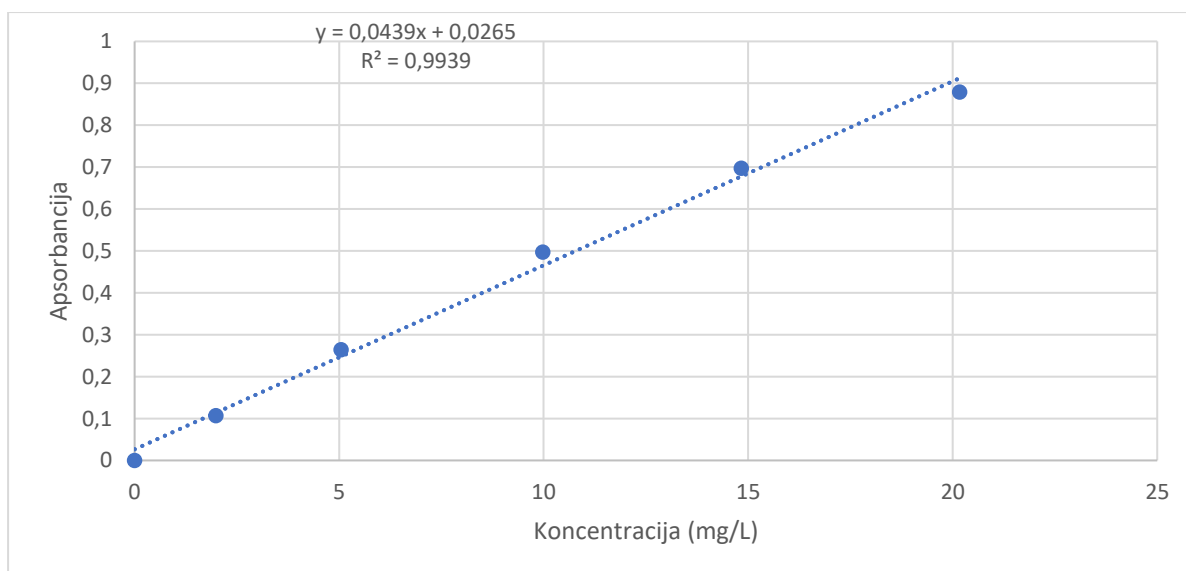
Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije standardnih otopina bakra i apsorbancije

Linearnost Mn

Za provjeru linearnosti izrađene su otopine koncentracije 2,0 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L i 20,0 mg/L.. Iz dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca $y = 0,0439x + 0,0265$ i koeficijent korelacije $R^2 = 0,9939$. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu linearnost za određivanje mangana u uzorcima začina.

Tablica 6. Izmjerene apsorbancije otopina za izradu kalibracijske krivulje

Koncentracija standarda (mg/L)	Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L)	Analitički signal (apsorbancija)
0	0	0
2,0	1,990	0,1064
5,0	5,050	0,2637
10,0	9,982	0,4973
15,0	14,83	0,6975
20,0	20,173	0,8786



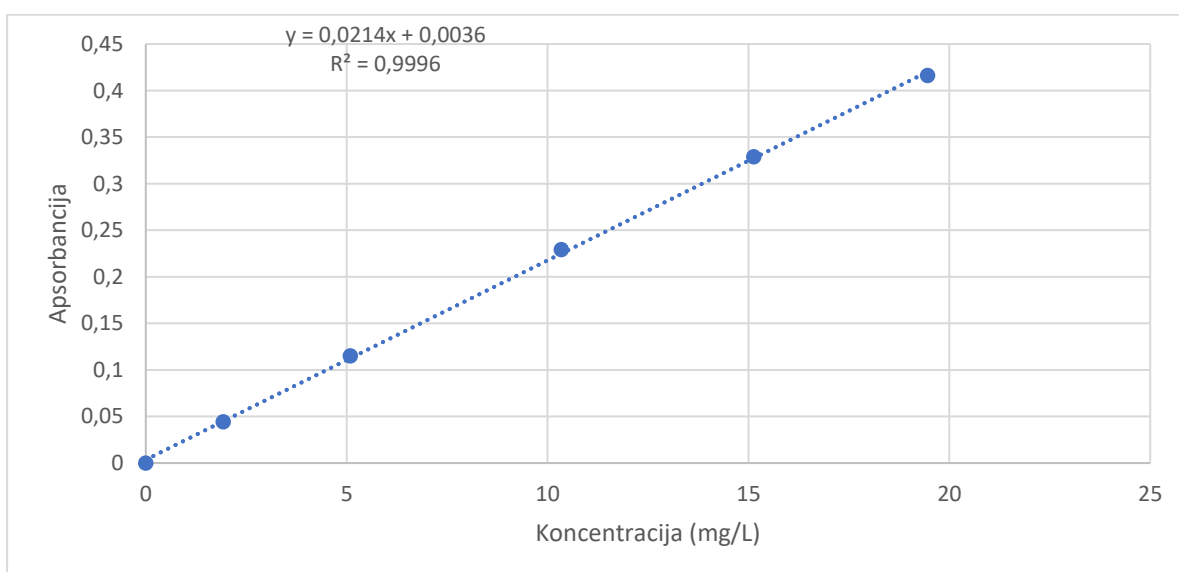
Slika 4. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije standardnih otopina mangana i apsorbancije

Linearnost Fe

Za provjeru linearnosti izrađene su otopine koncentracije 2,0mg/L, 5,0mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L i 20,0 mg/L. Iz dobivenih rezultata dobivena je jednačba pravca $y = 0,0214x + 0,0036$ i koeficijent korelacije $R^2 = 0,9996$. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu linearnost za određivanje željeza u uzorcima začina.

Tablica 7. Izmjerene apsorbancije otopina za izradu kalibracijske krivulje

Koncentracija standarda (mg/L)	Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L)	Analitički signal (apsorbancija)
0	0	0
2,0	1,928	0,0442
5,0	5,085	0,115
10,0	10,341	0,2291
15,0	15,129	0,3289
20,0	19,454	0,416



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije standardnih otopina željeza i apsorbancije

Preciznost

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Iskazuje se kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (Nigović i sur., 2014).

Ponovljivost pokazuje podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju. Srednja preciznost pokazuje odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, različiti analitičari itd.) (Nigović i sur., 2014). Izražava se vrijednostima kao što su relativno standardno odstupanje (RSD, %) ili standardno odstupanje (SD).

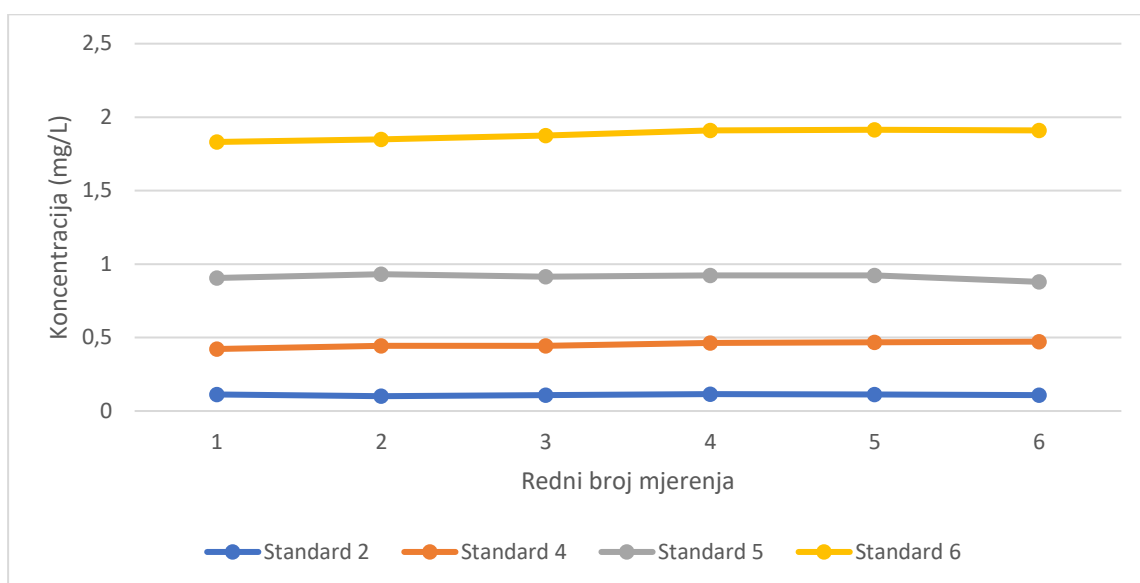
Ponovljivost

Ponovljivost analitičke metode ispitana je provođenjem šest mjerenja za četiri različite koncentracija standardnih otopina u kratkom vremenskom periodu unutar istog dana. Dobivene vrijednosti za sve elemente prikazane su u tablicama 8, 9, 10 i 11 te grafički (Slika 6, 7, 8 i 9). Dobivene vrijednosti ponovljivosti u danu za sve ispitivane elemente, izražene kao RSD, bile su unutar prihvatljivih granica što ukazuju na zadovoljavajuću ponovljivost metode. Jedino veća vrijednost RSD ($RSD < 11\%$) dobivena je za standard Cu najniže koncentracije što se može objasniti manjom stabilnošću tog standarda.

Ponovljivost Zn

Tablica 8. Ponovljivost unutar jednog dana

Numerička oznaka korištenog standarda	2	4	5	6
Koncentracija standarda (mg/L)	0,1	0,5	1	2
Izmjerene koncentracije (mg/L)	0,112	0,422	0,905	1,831
	0,101	0,443	0,931	1,849
	0,108	0,443	0,915	1,874
	0,115	0,463	0,922	1,909
	0,112	0,467	0,923	1,914
	0,109	0,472	0,879	1,909
Srednja vrijednost (mg/L)	0,101	0,452	0,913	1,881
Standardna devijacija (SD)	0,005	0,019	0,019	0,035
Relativna standardna devijacija (RSD %)	4,43	4,21	2,04	1,88

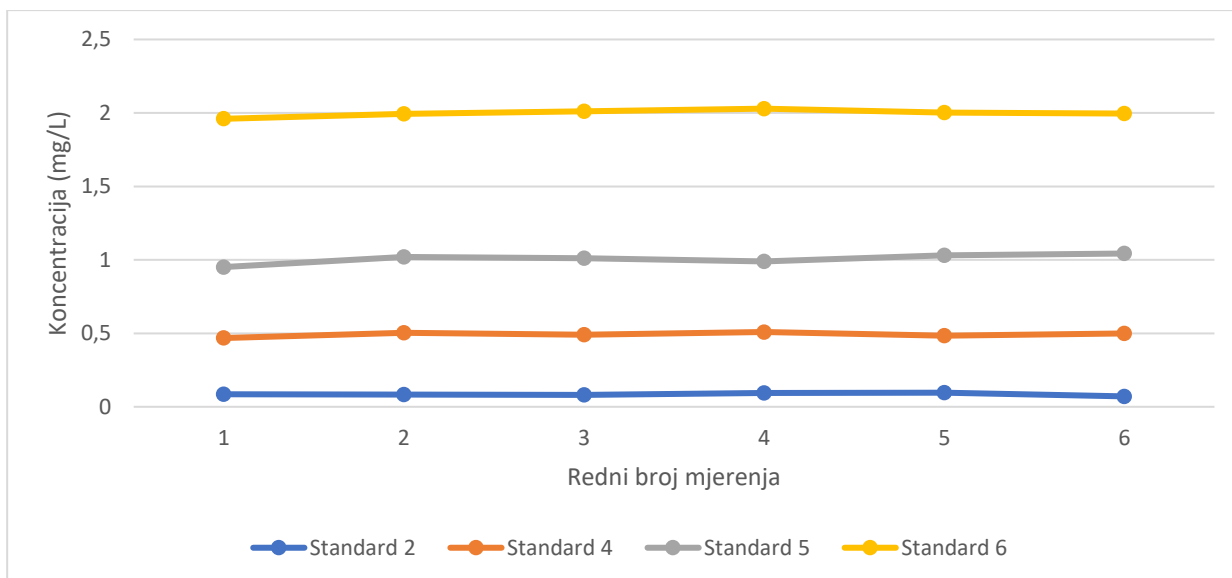


Slika 6. Grafički prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja u jednom danu (n=6)

Ponovljivost Cu

Tablica 9. Ponovljivost unutar jednog dana

Numerička oznaka korištenog standarda	2	4	5	6
Koncentracija standarda (mg/L)	0,1	0,5	1	2
Izmjerene koncentracije (mg/L)	0,085	0,468	0,951	1,96
	0,083	0,504	1,019	1,994
	0,082	0,490	1,012	2,012
	0,093	0,509	0,989	2,029
	0,096	0,485	1,03	2,002
	0,071	0,500	1,043	1,995
Srednja vrijednost (mg/L)	0,009	0,015	0,033	0,023
Standardna devijacija (SD)	0,005	0,019	0,019	0,035
Relativna standardna devijacija (RSD %)	10,44	3,042	3,28	1,15

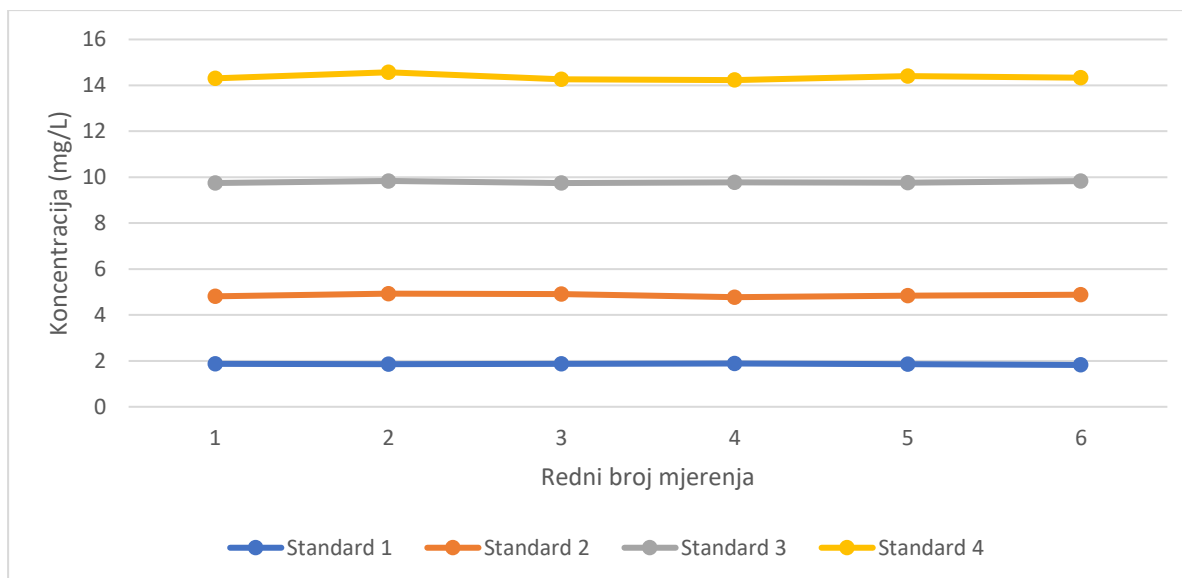


Slika 7. Grafički prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja u jednom danu (n=6)

Ponovljivost Mn

Tablica 10. Ponovljivost unutar jednog dana

Numerička oznaka korištenog standarda	1	2	3	4
Koncentracija standarda (mg/L)	2	5	10	15
Izmjerene koncentracije (mg/L)	1,866	4,816	9,747	14,300
	1,861	4,928	9,837	14,570
	1,864	4,912	9,745	14,270
	1,886	4,775	9,778	14,230
	1,858	4,838	9,763	14,400
	1,822	4,876	9,825	14,330
Srednja vrijednost (mg/L)	1,860	4,858	9,783	14,350
Standardna devijacija (SD)	0,021	0,059	0,040	0,122
Relativna standardna devijacija (RSD %)	1,12	1,21	0,41	0,85

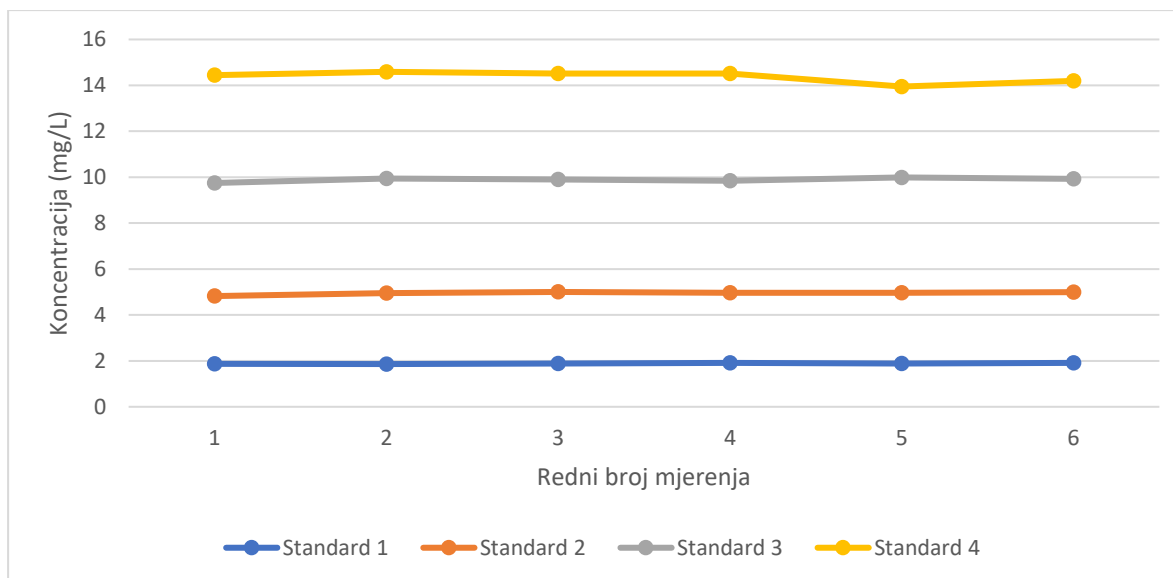


Slika 8. Grafički prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja u jednom danu (n=6)

Ponovljivost Fe

Tablica 11. Ponovljivost unutar jednog dana

Numerička oznaka korištenog standarda	1	2	3	4
Koncentracija standarda (mg/L)	2	5	10	15
Izmjerene koncentracije (mg/L)	1,869	4,823	9,749	14,440
	1,861	4,948	9,937	14,590
	1,888	5,002	9,895	14,520
	1,910	4,972	9,839	14,520
	1,889	4,964	9,990	13,950
	1,912	4,996	9,933	14,200
Srednja vrijednost (mg/L)	1,888	4,951	9,891	14,370
Standardna devijacija (SD)	0,021	0,066	0,086	0,246
Relativna standardna devijacija (RSD %)	1,10	1,33	0,86	1,71



Slika 9. Grafički prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja u jednom danu (n=6)

Točnost

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Točnost se iskazuje kao analitički prinos (eng. recovery), i pokazuje odstupanja od prihvaćene referentne vrijednosti (Nigović i sur., 2014). Računa se prema izrazu:

$$R = \frac{\bar{X}}{X} \times 100,$$

Gdje je \bar{X} srednja izmjerena vrijednost, a X stvarna vrijednost analita u uzorku.

Točnost metode ispitana je pomoću standardnog referentnog materijala, lišće zelenog čaja (CRM). CRM je pripremljen na isti način kao uzorci te je mjereno pod istim uvjetima. Dobivene vrijednosti su izražene su kao % prinosa te su bile u rasponu od 92,4 % do 109,2 % što ukazuje na zadovoljavajuću točnost metode.

Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (eng. limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita, koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode.

Granica određivanja (eng. limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analitau uzorku

koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1, LOQ=10:1) ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

Gdje je σ standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib regresijskog pravca.

Granica dokazivanja i granica određivanja Zn

Određen je nagib kalibracijskog pravca $a = 0,1747$ i standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca $\sigma = 0,010956$ te su izračunati LOD i LOQ:

$$LOD = 0,2069 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 0,6271 \text{ mg/L}$$

Granica dokazivanja i granica određivanja Cu

Određen je nagib kalibracijskog pravca $a = 0,03489$ i standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca $\sigma = 0,000655$ te su izračunati LOD i LOQ:

$$LOD = 0,0619 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 0,1878 \text{ mg/L}$$

Granica dokazivanja i granica određivanja Mn

Određen je nagib kalibracijskog pravca $a = 0,04391$ i standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca $\sigma = 0,02992$ te su izračunati LOD i LOQ:

$$LOD = 2,2484 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 6,8134 \text{ mg/L}$$

Granica dokazivanja i granica određivanja Fe

Određen je nagib kalibracijskog pravca $a = 0,021404$ i standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca $\sigma = 0,0003722$ te su izračunati LOD i LOQ:

$$LOD = 0,5738 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 1,7389 \text{ mg/L}$$

4.2. Određivanje sadržaja teških metala u uzorcima začina

Nakon što je metoda validirana, pripremljeni su uzorci u duplikatu kako je opisano u poglavlju materijali i metode, te je svaki pripremljeni uzorak mjeren šest puta. Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost i standardna devijacija u tablici (Tablica 12.) u nastavku teksta.

Tablica 12. Izmjerene koncentracije teških metala u uzorcima začina

Začinsko bilje	Uzorak	Oznaka uzorka	Koncentracija Zn \pm SD (mg/kg)	Koncentracija Cu \pm SD (mg/kg)	Koncentracija Fe \pm SD (mg/kg)	Koncentracija Mn \pm SD (mg/kg)
Origano	Origano Ducros	Oznaka2(prah)	34,58 \pm 0,8	8,45 \pm 0,1	189,14 \pm 15	63,59 \pm 5,6
	Origano Vegeta	O/Prah 1.	27,10 \pm 0,5	9,73 \pm 0,1	447,76 \pm 20	46,80 \pm 3,2
	Origano Kotanyi	O/Prah 2.	26,25 \pm 0,7	8,62 \pm 0,3	258,71 \pm 16,2	40,82 \pm 4,3
	Origano Hvarski	O/Prah 3.	18,71 \pm 0,3	22,71 \pm 0,6	252,83 \pm 21,3	40,97 \pm 3,5
Peršin	Persil U	P/F2	45,67 \pm 1,2	8,79 \pm 0,1	180,97 \pm 12	101,39 \pm 8,2
	Peršin Kotanyi	P/Prah A	51,49 \pm 1,5	10,51 \pm 0,2	249,47 \pm 15,5	136,08 \pm 8,6
	Peršin Vegeta	P/Prah F	35,05 \pm 0,9	20,46 \pm 0,4	207,44 \pm 18,3	45,91 \pm 2,2
Biljni standard	Lišće zelenog čaja	CRM	24,78 \pm 0,3	11,89 \pm 0,6	297,91 \pm 17	871,03 \pm 33

Dobivena koncentracija elemenata s FAAS smanjuje se kako slijedi: Fe > Mn > Zn > Cu. Osim kod uzoraka O/Prah 3. gdje je redoslijed Fe > Mn > Cu > Zn, te kod uzorka CRM gdje je redoslijed sljedeći: Mn > Fe > Cu > Zn.

Svi začini sadrže značajne koncentracije esencijalnih elemenata (Cu, Zn, Fe i Mn). Međutim, sadržaj svih ispitivanih elemenata značajno se razlikuju među ispitivanim biljnim vrstama. Dobivene razlike u koncentracijama mogu se objasniti različitim biljnim vrstama odnosno njihovoj botaničkoj strukturi, mobilnosti elemenata unutar biljke, mineralnom sastavu tla na kojem su uzgajane, sposobnosti apsorpcije kao i nekim drugim antropogenim izvorima onečišćenja. Mn i Fe su elementi prisutni u najvećim koncentracijama i njihove vrijednosti variraju. Sadržaj Mn varira od 40,8 mg/kg do 871,1 mg/kg, dok sadržaj Fe od 180,1 mg/kg do 447,8 mg/kg. Visok sadržaj Mn može biti posljedica korištenih pesticida za tretiranje tla na kojem biljka uspijeva kao i posljedica uzgoja biljaka na industrijskim i stambenim lokacijama bogatim Mn zbog njegove upotrebe kao dodatka gorivu. S obzirom na važnu ulogu Mn na endokrini, živčani i enzimski sustav konzumacija začina bogatih Mn može utjecati na normalan metabolizam kod ljudi. . Kao esencijalni elementi, cink i bakar sastavni su dio mnogih enzima kao što su superoksid dismutaza, lizil oksidaza i ceruloplazmin koji imaju značajnu ulogu u antioksidacijskoj obrani. Dobivene koncentracije Cu i Zn su u rasponu od 8,5 mg/kg do 22,7 mg/kg za Cu odnosno od 18,7 mg/kg do 51,5 mg/kg za Zn.

4.3. Kemometrijske metode obrade podataka

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

4.3.1. Multivarijantna analiza

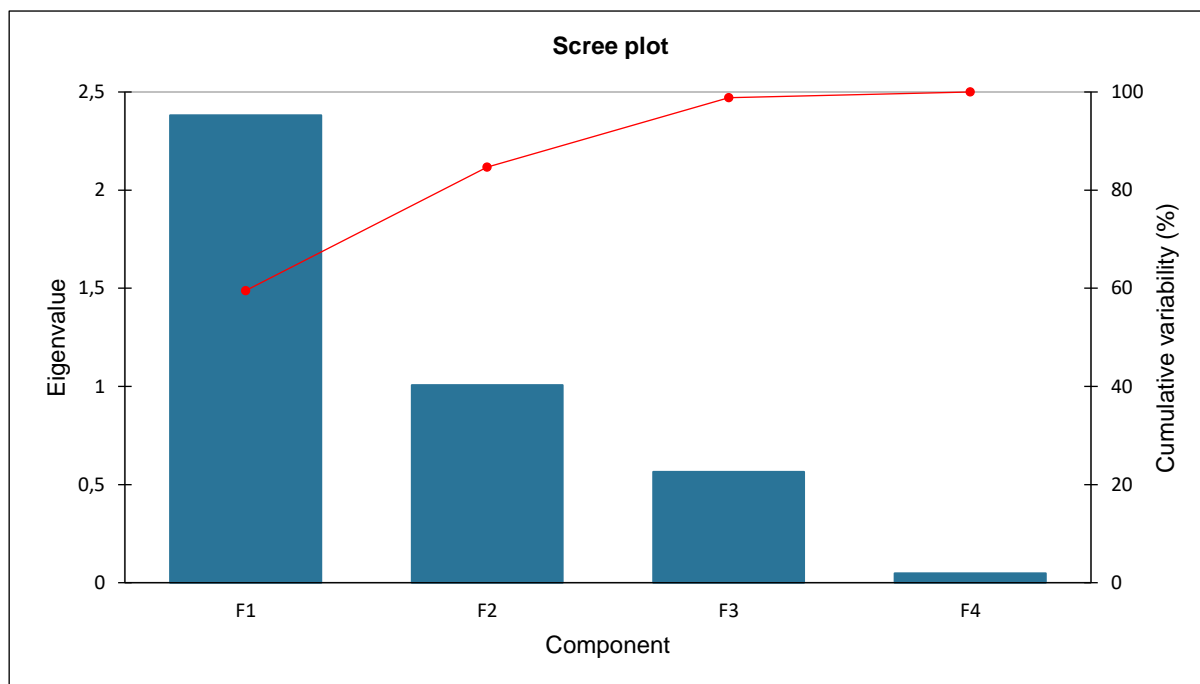
Multivarijantna analiza je korisna statistička tehnika za identifikaciju obrasca ponašanja u distribuciji podataka kao i za olakšavanje interpretacije velikog broja podataka. Dobiveni podaci analizirani su analizom glavnih komponenata-PCA (eng. Principal component analysis) i klusterskom analizom. PCA je najčešće primjenjivan postupak koji se koristi u svrhu

klasifikacije ispitivanih varijabli. Koristi se za ispitivanje veza između različitih varijabli, detektiranje i interpretiranje ponašanja unutar uzorka npr. grupiranje, sličnost ili razlike ispitivanih elemenata.

PCA je primjenjena na sve podatke. Jedan od osnovnih ciljeva PCA analize je da identificira faktore od iznimne važnosti iz skupa podataka. Analiza glavne komponente provedena je uzimajući u obzir standardizirane podatke, što znači da su početne varijable transformirane tako da budu centrirane i imaju jedinstvenu disperziju. Osnovna statistika eigen analize prikazana je u Tablici 13. Prve dvije komponente čine 84,68 % varijabilnosti ispitivane serije: F1(PC1) čini 59,52 % i F2 (PC2) 25,164 %.

Tablica 13. Eigen analiza

	F1	F2	F3	F4
Eigen vrijednosti	2,381	1,007	0,565	0,048
Varijabilnost(%)	59,517	25,164	14,129	1,189
Kumulativna vrijednost (%)	59,517	84,681	98,811	100,000

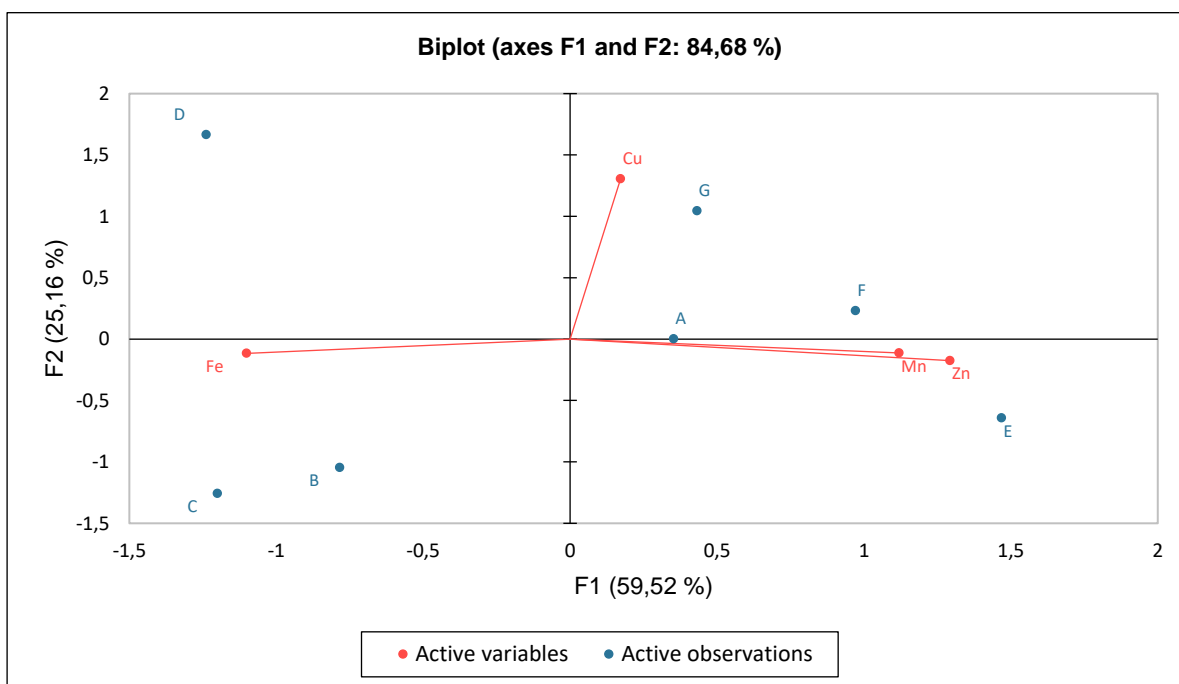


Slika 10. Doprinos glavnih komponenata varijabilnosti analiziranih podataka

Prva PCA komponenta (F1) je najvažnija i pokazuje jaku povezanost s vrijednostima cinka, mangana i željeza (40,107%, 30,091% i 29,093 %). Bakar je dominantna komponenta za drugu PCA komponentu (F2) s vrijednosti od čak 96,776%. (Tablica 14).

Tablica 14. Doprinos varijabli

	F1	F2	F3	F4
Zn(%)	40,107	1,739	0,000	58,153
Cu(%)	0,709	96,776	1,513	1,003
Fe(%)	29,093	0,766	51,450	18,691
Mn(%)	30,091	0,719	47,037	22,153



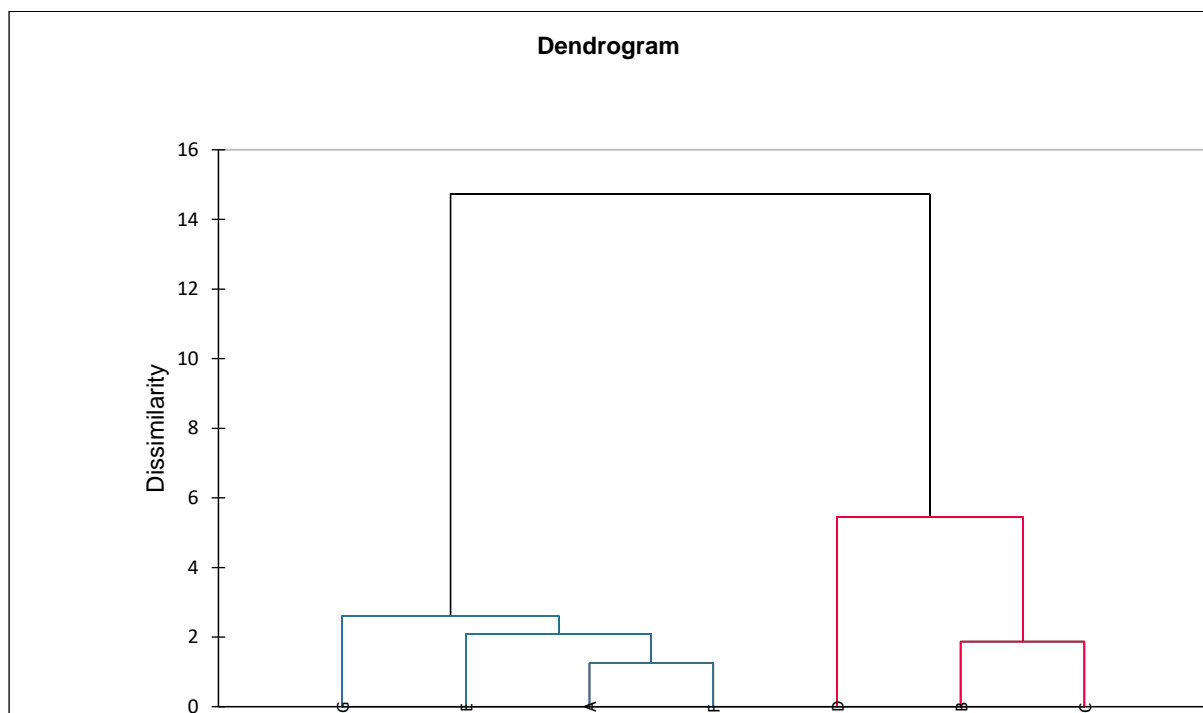
Slika 11. Graf dobivenih podataka za teške metale u ispitivanim uzorcima

Dobiveni rezultati ukazuju da elementi mogu potjecati iz raznih izvora. Primjerice, okoliš može biti potencijalno izvor Mn dok Fe najčešće potječe iz tla. Cu je esencijalan element, sastavni

dio koenzima važnih za život biljke. Pomoću PCA analize identificirani su elementima s najvećim značajem za ispitivani biljni materijal (Slika 11.).

Klasterska analiza često se koristi u kemometriji i to s ciljem pojašnjenja veze između uzoraka bez prethodnih informacija o toj vezi. Uzorci bivaju grupirani u klastere prema njihovoj sličnosti odnosno u ovom slučaju prema sadržaju teških metala u ispitivanim uzorcima začina.

U ovom istraživanju primjenjena je Ward's metoda za hierarhijsku klasterSKU analizu. Dobiveni rezultati prikazani su pomoću dendograma (Slika 12). Iz prikazanog dendograma vidljiva je podjela na 2 osnovne grupe za rezultate dobivene FAAS tehnikom. Dobivene grupe rezultata pokazuju sličnost između začina na osnovu sadržaja ispitivanih teških metala. Ovakvo grupiranje u skladu je s dobivenim rezultatima sadržaja teških u pojedinom uzorku začina.



Slika 12. Dendrogram klasterSKU analize za 4 varijable i 7 uzoraka

5. Zaključak

Teški metali predstavljaju značajnu sirovinu za brojne industrijske grane, neki od njih su neophodni za žive organizme, mogu djelovati povoljno na produktivnost poljoprivrede, ali i većina njih često je značajan zagađivač životne sredine. Smatra se da su teški metali bio-akumulativni elementi koji čine veliku prijetnju javnom zdravlju. Ljudi su izloženi teškim metalima iz različitih izvora, no smatra se da je glavni izvor unos putem kontaminirane hrane i pića.

U ovom radu analizirano je 6 uzoraka začina origana i peršina na prisutnost teških metala korištenjem plamene atomske apsorpcijske spektroskopije. U navedenim uzorcima određene su koncentracije cinka, bakra, mangana i željeza. Dobiveni rezultati pokazali su sljedeće:

- Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija prikladna je metoda za određivanje i dokazivanje teških metala u uzorcima začina.
- Predložena metoda validirana je prema važećim smjernicama, a dobiveni rezultati pokazali su da je metoda linearna, precizna, točna i brza.
- Sama predložena metoda ne zahtjeva dugotrajnu pripremu uzoraka, a sam postupak mjerenja može biti i brži, ukoliko je automatiziran.

Imajući u vidu kompleksnost biljnog materijala kao i različitost porijekla primijenjen je kemometrijski pristup za obradu eksperimentalno dobivenih podataka. Iako je potrebno analizirati puno veći broj uzoraka, PCA i klasterska analiza pokazale su moguću korelaciju između ispitivanih elemenata i određeni obrazac ponašanja je definiran. Nadalje, analizom glavnih komponenata omogućeno je grupiranje uzoraka začina u skupine i pokazani su potencijalni izvori metala u samom materijalu. Ovo istraživanje pokazalo je da različiti začini mogu biti grupirani prema sadržaju elemenata u njima što može biti od velike koristi pri analizi kontrole kvalitete.

Začini dostupni na tržištu sadrže određenu količinu teških metala korisnih u ljudskom organizmu, ali koja je relativno mala pa općenito ne mogu biti zamjena zdravoj i uravnoteženoj prehrani te farmaceutskim pripravcima za suplementaciju.

Nadzor teških metala u biljnom materijalu od velike je važnosti naročito zbog njihovih utjecaja na zdravlje ljudi i raširenosti primjene.

6. Popis kratica, oznaka i simbola

AAS (eng. Atomic absorption spectroscopy) - Atomska apsorpcijska spektroskopija

AHC (eng. Agglomerative Hierarchical Clustering) - Aglomerativno hijerarhijsko grupiranje

FAAS (eng. Flame atomic absorption spectroscopy) - Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija

FDA (eng. Food and Drug Administration) - Američka Agencija za hranu i lijekove

LOD (eng. Limit of detection) - Granica dokazivanja

LOQ (eng. Limit of quantification) - Granica određivanja

PCA (eng. Principal Component Analysis) - Analiza glavnih komponentata

7. Literatura

- Abugassa IO, Bashir AT, Doubali K, Etwir RH, Abu-Enawel M, Abugassa SO. Characterization of trace elements in medicinal herbs by instrumental neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem*, 2008, 278, 559.
- Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. San Diego, Academic Press, 2001, str. 415-419.
- Bader NB. Sample preparation for flame atomic absorption spectroscopy: An overview. *Rasayan J Chem*, 2011, 49-55.
- Başgel S, Erdemoglu S. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Sci Total Environ*, 2006, 359, 82-89.
- Beaty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin-Elmer Corporation, 1993, str. 1-94.
- Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016, 35, 107-115.
- Code of Hygienic Practices for Spices and Dried Aromatic Plants, 1995., <https://www.fao.org>, pristupljeno 27.2.2022.
- Cruz-Landeira, A., Bal, M.J., Quintela, O., López-Rivadulla, M. Determination of methemoglobin and total hemoglobin in toxicological studies by derivative spectrophotometry. *J Anal Toxicol*, 2002, 26, 67-72.
- Dutra RL, Cantos GA, Carasek E. Analysis of zinc in biological samples by flame atomic absorption spectrometry: use of addition calibration technique. *Biol Trace Elem Res*, 2006, 111, 265-279.
- Earl LW. Molecular Fluorescence and Phosphorescence Spectrometry. U: Instrumental techniques for analytical chemistry, Frank Settle, urednik, New Jersey, Prantice Hall PTR, 1997, 507-531.
- Embuscado ME. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. *J Funct Foods*, 2015, 811–819.
- European Pharmacopeia, 10. izd., Strasbourg, Council of Europe, 2020, str. 158-160.
- Feng H, Wang T, Li SFY. Sensitive determination of trace-metal elements in tea with capillary electrophoresis by using chelating agent 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR). *Food Chem*, 2003, 81, 607-611.
- Flame-AAS, <http://chemicalinstrumentation.weebly.com>, pristupljeno 8. 3. 2022.

- Food consumption Database, 2020., <https://www.who.int>, pristupljeno 7.3.2022.
- Food Contamination Monitoring and Assessment Programme, 2020., <https://www.who.int>, pristupljeno 8.3.2022.
- Frieden E. Perspectives on copper biochemistry. *Clin Physiol Biochem*, 1986, 4, 11.
- Han WY, Shi YZ, Ma LF, Ruan JY, Zhao, FJ. Effect of liming and seasonal variation on lead concentration of tea plant (*Camillia sinensis* L. O. Kuntze). *Chemosphere*, 2007, 66, 84-90.
- Han WY, Shi YZ, Ma LF, Ruan JY. Arsenic, cadmium, chromium, cobalt, & copper in different types of Chinese tea. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2005, 75, 272-277.
- Hu Y, Zhou J, Du B. Health risks to local residents from the exposure of heavy metals around the largest copper smelter in China. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 171, 329-336.
- Jignesh S, Vineeta K, Abhay S, Vilasrao K. Analytical Methods for Estimation of Metals. *Int J Res Pharm Chem*, 2012, 146- 163.
- Leo W. R. Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments, Springer, 1987, str. 169-189.
- Luterotti S, Bićanić D. Odabrane teme iz bioanalitike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 1-12.
- Maher HM, Al-Zoman NZ, Al-Shehri MM, Al-Showiman H, Al-Taweel AM, Fawzy GA, Perveen S. Determination of Luteolin and Apigenin in herbs by capillary electrophoresis with diode Array detection. *Instrum Sci Technol.*, 2015, 436, 611–625.
- Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. *Farm Glas*, 2006, 1-7.
- Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Ann Nutr Metab.*, 2006, 503, 167–172.
- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania) *Phytochemistry*, 2001, 65–69.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum: Validacija analitičkog postupka. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135-137.
- O'Neal SL, Zheng W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Curr Environ Health Rep*, 2015, 2, 315-328.

- Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct*, 2010, 11, 15–31.
- Peter KV. Handbook of herbs and spices: *CRC Press*, 2004.
- Prashanth L, Kumar Kattapagari K, Chitturi RT, Reddy Baddam VR, Prasad LK. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci*, 2015, 4, 75-85.
- Randy AJ, Brett A, Blaser E, Blosser C, Caulton D, Chung WS, Fiorenza G, Heath W, Jacobs A, Kahng E, Koh E, Le T, Mandla K, McCory C, Newman L, Pithadia A, Reckelhoff A, Rheinhardt J, Skljarevski S, Stuart J, Taylor C, Thomas S, Tse K, Wall R, Warkentien C. Overcoming Matrix Effects in a Complex Sample: Analysis of Multiple Elements in Multivitamins by Atomic Absorption Spectroscopy. *J Chem Educ*, 2011, 484-487.
- Rubio L, Motilva MJ, Romero MP. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2013, 539, 943–953.
- Salahinejad WY, Shi YZ, Ma LF, Ruan JY, Zhao, F-J. Effect of liming and seasonal variation on lead concentration of tea plant (*Camillia sinensis* L. O. Kuntze). *Chemosphere*, 2007, 66, 84-90.
- Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward WP. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2001, 77, 18-94.
- Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res*, 2010, 276, 962–978.
- Simon JE, Quinn J. Characterization of essential oil of parsley. *J Agric Food Chem*, 1988, 363, 467–472.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 493-498, 542-554, 596-614.
- Spices – Definitions, 1980., <https://www.fda.gov>, pristupljeno 7.3. 2022.
- Suchacz B, Wesołowski M. The recognition of similarities in trace elements content in medicinal plants using MLP and RBF neural networks. *Talanta*, 2006, 69, 37-42.

- Terres-Martos C, Navarro-Alarcon M, Martin-Lagos F, De la Serrana HLG, Lopez-Martinez MC. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ*, 1997, 198 , 97-103.
- The Dark Side of Iron - Why Too Much is Harmful, 2017., www.healthline.com, pristupljeno 7.3.2022.
- The spices and herbs market in the EU, a survey of the Netherlands and other major markets in the European Union, 2009., <https://www.cbi.eu>, pristupljeno 7.3.2022.
- Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals by the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies (NDA) and Scientific Committee on Food (SCF), 2006., <https://www.efsa.europa.eu>, pristupljeno 6.3.2022.
- Vázquez-Fresno R, Remus A, Rosana R, Sajed T, Onookome-Okome T, Wishart NA, Wishart DS, Herbs and Spices- Biomarkers of Intake Based on Human Intervention Studies – A Systematic Review. *Genes Nutr*, 2019, 14-18.
- Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 145-151.
- White C. Collection of Laboratory Activities: Atomic Absorption Determination of Zinc and Copper in a Multivitamin, Athens, Athens Technical College, 2009, 1-7.
- Williams PG. Health benefits of herbs and spices. *Health Med J*, 2006, 18-26.
- Zhang H, Chen F, Wang X, Yao H-Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Res Int*, 2006, 398, 833–839.
- Zhou J, Liang J, Hu Y, et al. Exposure risk of local residents to copper near the largest flash copper smelter in China. *Sci Total Environ*, 2018, 453-461.

8. Sažetak/Summary

Teški metali predstavljaju značajnu sirovinu za brojne industrijske grane, neki od njih su neophodni za žive organizme, za produktivnost poljoprivrede, dok su neki od njih zagađivači životne sredine.

Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za kvantitativnu analizu teških metala iz uzoraka začina pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije. U tu svrhu ispitani su validacijski parametri kao što su linearnost, ponovljivost, LOD, LOQ te je optimiziranom metodom provedena kvantitativna analiza teških metala u uzorcima origana i peršina.

Provedeno ispitivanje pokazalo je da u ispitivanom području metoda ima prihvatljivu linearnost, $(Zn)R^2 = 0,9994$, $(Cu)R^2 = 0,9994$, $(Mn)R^2 = 0,9939$, $(Fe)R^2 = 0,9996$. Ponovljivost metode izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je u rasponu od 0,86 % do 1,72% za Fe, od 0,41% do 1,21% za Mn, od 1,15% do 10,44% za Cu i od 1,88% do 4,43% za Zn, što ukazuje na prihvatljivu ponovljivost. Dobiveni analitički prinos bio je u rasponu od 92,4% do 109,2% što ukazuje ne zadovoljavajuću točnost metode. Najniža granica dokazivanja (LOD) iznosila je 0,0619 mg/L za Cu, dok je najviša LOD iznosila 2,2484 mg/L za Mn. Najniža granica određivanja (LOQ) iznosila je 0,1878 mg/L za Cu, dok je najviša LOQ iznosila = 6,8134 mg/L za Mn. Iz navedenih podataka može se zaključiti da validirana metoda ima zadovoljavajuću selektivnost i osjetljivost. Nakon optimizacije metode, izmjerene su koncentracije teških metala u uzorcima. PCA i klusterska analiza pokazale su moguću korelaciju između ispitivanih elemenata i istaknuti su potencijalni izvori metala u ispitivanom materijalu. Ovo istraživanje pokazalo je da se različiti začini mogu grupirati prema sadržaju elemenata u njima što može biti od velike koristi pri analizi kontrole kvalitete.

Heavy metals are an important raw material for many industries, some of them are necessary for living organisms, others for agricultural productivity, while some of them are environmental pollutants.

The aim of this work was to validate the method for quantitative analysis of heavy metals from spice samples using flame atomic absorption spectroscopy. For this purpose, validation parameters such as linearity, repeatability, LOD, LOQ were examined, and a quantitative analysis of heavy metals in oregano and parsley samples was performed using an optimized method.

The performed study showed that the method has acceptable linearity in studied range, (Zn) $R^2 = 0.9994$, (Cu) $R^2 = 0.9994$, (Mn) $R^2 = 0.9939$, (Fe) $R^2 = 0.9996$. Method repeatability expressed as relative standard deviation (RSD) ranged from 0.86% to 1.72% for Fe, from 0.41% to 1.21% for Mn, from 1.15% to 10.44% for Cu and from 1.88% to 4.43% for Zn, indicating acceptable repeatability. Recovery results between 92.4% and 109.2% show acceptable accuracy of the method. The lowest limit of detection (LOD) was 0.0619 mg/L for Cu, while the highest LOD was 2.2484 mg/L for Mn. The lowest limit of quantification (LOQ) was 0.1878 mg/L for Cu, while the highest LOQ was 6.8134 mg/L for Mn. After optimization of the method, the concentrations of heavy metals in the samples were measured. PCA and cluster analysis showed a possible correlation between the tested elements and possible sources of metals in the material were highlighted. This study showed that different spices can be grouped according to their content of elements, which can be very useful for quality control analysis.

9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

OPTIMIZACIJA METODA ZA ODREĐIVANJE TEŠKIH METALA U UZORCIMA ZAČINA PLAMENOM ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROSKOPIJOM – KEMOMETRIJSKI PRISTUP

Grgo Ljubičić

SAŽETAK

Teški metali predstavljaju značajnu sirovinu za brojne industrijske grane, neki od njih su neophodni za žive organizme, za produktivnost poljoprivrede, dok su neki od njih zagađivači životne sredine.

Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za kvantitativnu analizu teških metala iz uzoraka začina pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije. U tu svrhu ispitani su validacijski parametri kao što su linearnost, ponovljivost, LOD, LOQ te je optimiziranom metodom provedena kvantitativna analiza teških metala u uzorcima origana i peršina.

Provedeno ispitivanje pokazalo je da u ispitivanom području metoda ima prihvatljivu linearnost, $(Zn)R^2 = 0,9994$, $(Cu)R^2 = 0,9994$, $(Mn)R^2 = 0,9939$, $(Fe)R^2 = 0,9996$. Ponovljivost metode izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je u rasponu od 0,86 % do 1,72% za Fe, od 0,41% do 1,21% za Mn, od 1,15% do 10,44% za Cu i od 1,88% do 4,43% za Zn, što ukazuje na prihvatljivu ponovljivost. Dobiveni analitički prinos bio je u rasponu od 92,4% do 109,2% što ukazuje na zadovoljavajuću točnost metode. Najniža granica dokazivanja (LOD) iznosila je 0,0619 mg/L za Cu, dok je najviša LOD iznosila 2,2484 mg/L za Mn. Najniža granica određivanja (LOQ) iznosila je 0,1878 mg/L za Cu, dok je najviša LOQ iznosila = 6,8134 mg/L za Mn. Iz navedenih podataka može se zaključiti da validirana metoda ima zadovoljavajuću selektivnost i osjetljivost. Nakon optimizacije metode, izmjerene su koncentracije teških metala u uzorcima. PCA i klusterska analiza pokazale su moguću korelaciju između ispitivanih elemenata i istaknuti su potencijalni izvori metala u ispitivanom materijalu. Ovo istraživanje pokazalo je da se različiti začini mogu grupirati prema sadržaju elemenata u njima što može biti od velike koristi pri analizi kontrole kvalitete.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 51 stranicu, 12 grafičkih prikaza, 14 tablica i 51 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Teški metali, atomska apsorpcijska spektroskopija, začini, optimizacija metode

Mentor: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Davor Šakić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Bival Štefan, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of analytical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

METHOD OPTIMISATION FOR DETERMINING HEAVY METALS IN SAMPLES OF SPICES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

Grgo Ljubičić

SUMMARY

Heavy metals are an important raw material for many industries, some of them are necessary for living organisms, others for agricultural productivity, while some of them are environmental pollutants.

The aim of this work was to validate the method for quantitative analysis of heavy metals from spice samples using flame atomic absorption spectroscopy. For this purpose, validation parameters such as linearity, repeatability, LOD, LOQ were examined, and a quantitative analysis of heavy metals in oregano and parsley samples was performed using an optimized method.

The performed study showed that the method has acceptable linearity in studied range, (Zn) $R^2 = 0.9994$, (Cu) $R^2 = 0.9994$, (Mn) $R^2 = 0.9939$, (Fe) $R^2 = 0.9996$. Method repeatability expressed as relative standard deviation (RSD) ranged from 0.86% to 1.72% for Fe, from 0.41% to 1.21% for Mn, from 1.15% to 10.44% for Cu and from 1.88% to 4.43% for Zn, indicating acceptable repeatability. Recovery results between 92.4% and 109.2% show acceptable accuracy of the method. The lowest limit of detection (LOD) was 0.0619 mg/L for Cu, while the highest LOD was 2.2484 mg/L for Mn. The lowest limit of quantification (LOQ) was 0.1878 mg/L for Cu, while the highest LOQ was 6.8134 mg/L for Mn. After optimization of the method, the concentrations of heavy metals in the samples were measured. PCA and cluster analysis showed a possible correlation between the tested elements and possible sources of metals in the material were highlighted. This study showed that different spices can be grouped according to their content of elements, which can be very useful for quality control analysis.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 51 pages, 12 figures, 14 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Heavy metals, atomic absorption spectroscopy, spices, method optimization

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Šakić, Ph.D. Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2022.