

# Određivanje sadržaja metala u cvijetu i stabljici smilja primjenom EDXRF, TXRF i ICP-MS tehnike

---

Štefanko, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:951489>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ema Štefanko**

**Određivanje sadržaja metala u cvijetu i stabljici  
smilja primjenom EDXRF, TXRF i ICP-MS  
tehnike**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Jablan. Rad je izrađen u sklopu projekta IP-2018-01-6504 koji je financirala Hrvatska zaklada za znanost.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan na velikoj pomoći, trudu i strpljenju te brojnim korisnim sugestijama tijekom izrade diplomskog rada.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na pružanoj ljubavi i podršci tijekom mog cjelokupnog školovanja.*

## SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Smilje.....	1
1.1.1. Kemijski sastav smilja.....	1
1.1.2. Upotreba smilja u terapijske svrhe .....	3
1.2. Elementi u tragovima.....	5
1.2.1. Elementi u humanom enzimskom sustavu .....	5
1.2.2. Onečišćenje biljnog materijala teškim metalima.....	7
1.3. Spektrometrijske tehnike za elementnu analizu biljnog materijala.....	8
1.3.1. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom.....	8
1.3.2. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija .....	9
1.3.2.1. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom.....	10
1.3.2.2. Prednosti i nedostaci TXRF u odnosu na EDXRF i ICP-MS.....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Kemikalije .....	13
3.1.2. Radni instrumenti i pribor .....	13
3.1.3. Uzorci .....	15
3.1.3.1. Priprema uzoraka smilja .....	15
3.2. Metode .....	16
3.2.1. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom .....	16
3.2.2. EDXRF i ICP-MS .....	17
3.2.3. Priprema uzoraka za analizu.....	19
3.2.3.1. Suspenzija.....	19
3.2.3.2. Mikrovalna digestija .....	19
3.2.3.3. Priprema peleta .....	20
3.2.4. Statistička obrada podataka .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
4.1. Optimizacija metode za pripremu uzorka metodom suspenzije.....	21
4.1.1. Učinak veličine čestica .....	25
4.2. Analiza uzoraka smilja .....	27
4.2.1. Translokacijski indeks.....	34
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>35</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	<b>36</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>37</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>41</b>

## **9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

# 1. UVOD

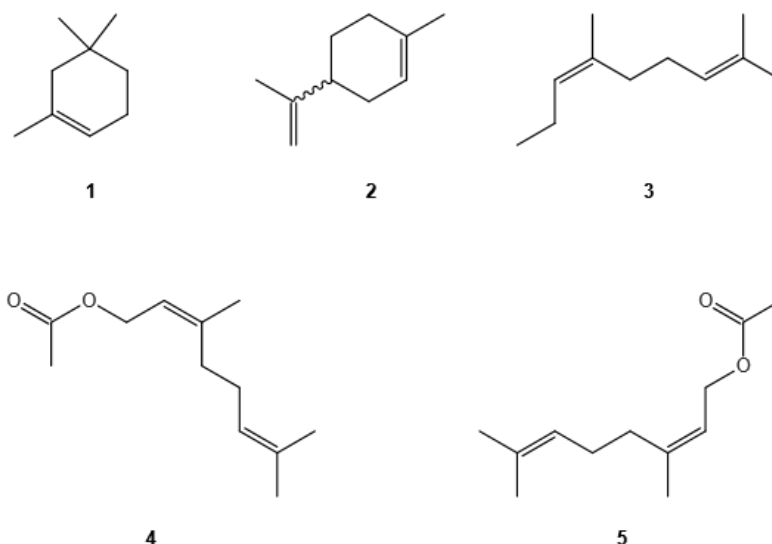
---

## 1.1. Smilje

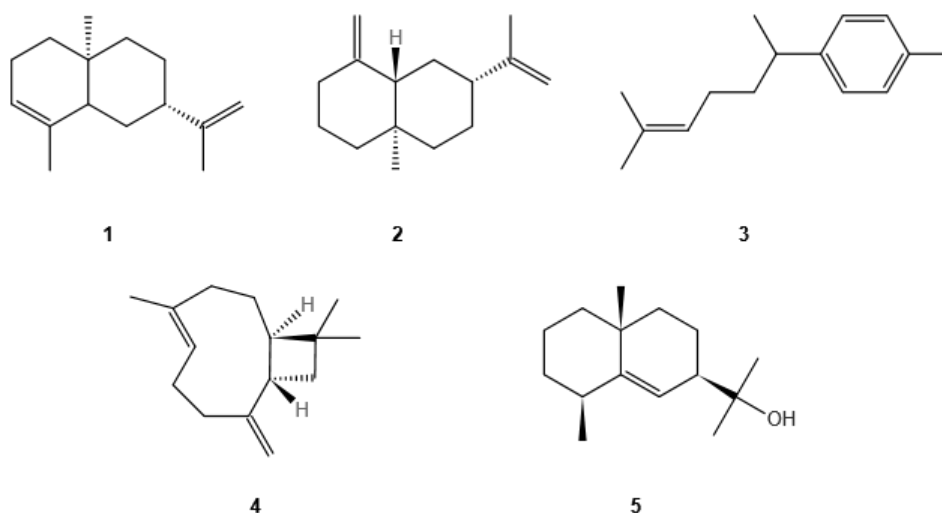
Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, Asteraceae) je drvenasti grm karakterističan za sušno i kamenito područje Mediterana. Ime roda derivirano je iz grčkih riječi "helios" i "chryos", odnosno u prijevodu, "sunce" i "zlatno" što implicira na tipičnu jarko žutu boju cvatova. Brojni *in vivo* i *in vitro* eksperimentalni modeli sugeriraju protuupalno i antioksidativno djelovanje cvjetova i vršnih dijelova biljke (Poli i sur., 2003; Sala i sur., 2002). O farmakološkim učincima vrste *H. italicum* svjedoči i tradicionalna primjena u svrhu liječenja upalnih i alergijskih stanja kao i patoloških stanja respiratornog sustava i kože. Smatra se da smilje ima moć izbrisati tragove vremena na licu, zbog čega su je Francuzi nazvali *immortelle*, što znači besmrtnost. Cvjetovi i vršni dijelovi obiluju eteričnim uljem koje se primjenjuje u aromaterapiji te u svrhu zacjeljivanja rana (Rajić i sur., 2015; Antunes Viegas i sur., 2013).

### 1.1.1. Kemijski sastav smilja

Ovisno o genetičkoj raznolikosti i varijabilnosti klime na području Mediterana moguće je razlikovati nekoliko kemotipova *H. italicum* (Maksimović i sur., 2017; Antunes Viegas i sur., 2013). Biološki aktivne molekule, u najvećoj mjeri odgovorne za terapijske učinke *H. italicum*, jesu terpeni i fenolni sekundarni metaboliti. Maksimović i sur. (2017) kao uobičajene metode dobivanja eteričnog ulja, a ujedno i izolacije terpenih metabolita, navode hidrodestilaciju te destilaciju vodenom parom, dok je destilacija superkričnim CO<sub>2</sub>, unatoč svim prednostima u odnosu na konvencionalne metode, danas rijetko zastupljena. Odjeljivanjem plinskom kromatografijom te detekcijom komponenti eteričnog ulja tehnikama poput spektrometrije masa (eng. *gass chromatography with mass spectrometry*, GC-MS) ili plamene ionizacijske detekcije (eng. *gass chromatography with flame ionization detection*, GC-FID) identificirane su najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja *H. italicum*: monoterpeni –  $\alpha$ -pinen, limonen, nerol, neril-acetat i neril propanoat (Slika 1) i seskviterpeni –  $\alpha$ - i  $\beta$ -selinen,  $\gamma$ -kurkumen, trans- $\beta$ -kariofilen i eudezm-5-en-11-ol, stereoizomer rozifoliola (Slika 2).

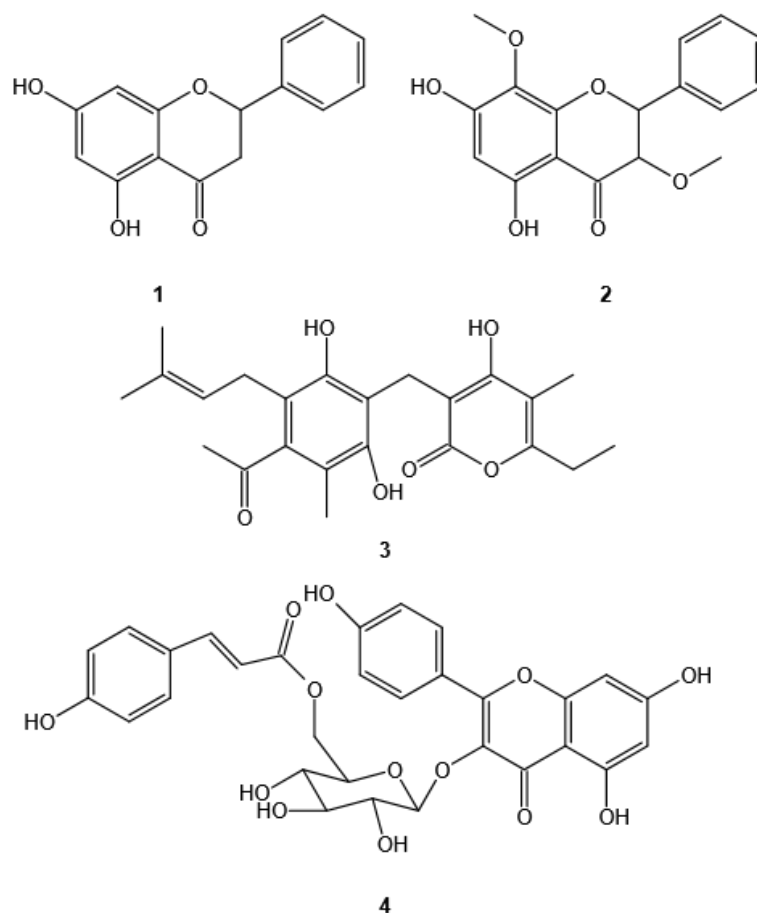


Slika 1. Kemijske strukture najčešćih monoterpena u eteričnom ulju *H. italicum*: 1 –  $\alpha$ -pinen, 2 – limonen, 3 – nerol, 4 – neril acetat, 5 – neril propanoat (KingDraw).



Slika 2. Kemijske strukture najčešćih seskviterpena u eteričnom ulju *H. italicum*: 1 –  $\alpha$ -selinen, 2 –  $\beta$ -selinen, 3 –  $\gamma$ -kurkumen, 4 – *trans*- $\beta$ -kariofilen i 5 – eudezm-5-en-11-ol (KingDraw).

Fenolne sekundarne metabolite *H. italicum* moguće je izolirati ekstrakcijom s organskim otapalima (aceton, etanol i metanol). Komponente sakupljenih frakcija odjeljuju se separacijskim metodama poput tankoslojne ili kolonske kromatografije pomoću prikladnog eluenta, te potom identificiraju različitim spektrometrijskim tehnikama. U acetonskom ekstraktu najzastupljenija komponenta je arzanol, dok se u metanolskom i etanolskom ekstraktu nalaze uglavnom flavonoidi i acetofenoni te njihovi glikozidni i glukozidni derivati (Slika 3) (Sala i sur., 2002).



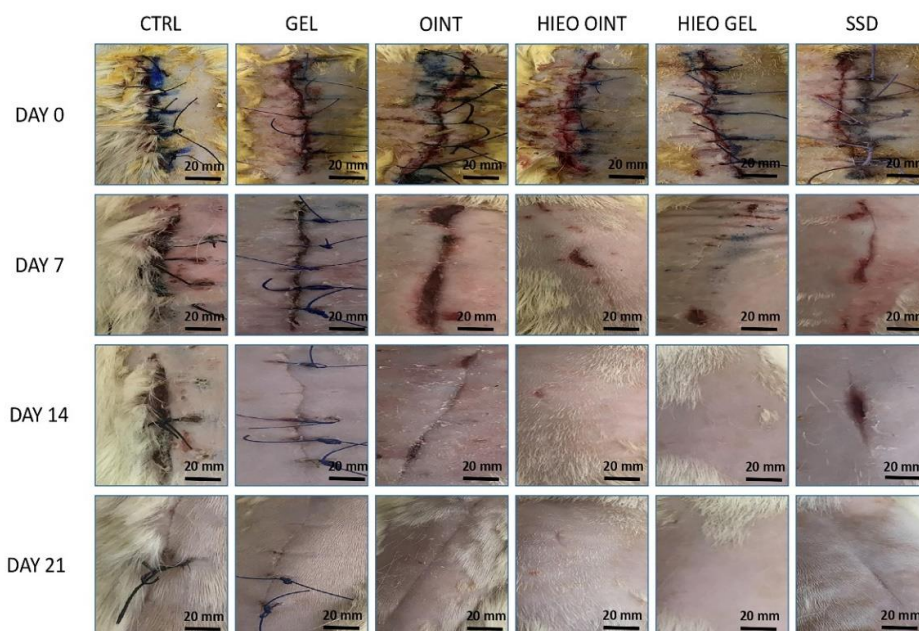
Slika 3. Kemijske strukture: 1 – gnofalin, 2 – pinocembrin, 3 – arzanol, 4 – tilirozid (KingDraw).

### 1.1.2. Upotreba smilja u terapijske svrhe

Tradicionalnom uporabom dokazana protuupalna i antioksidativna svojstva bude interes za detaljnijom analizom mehanizama djelovanja bioaktivnih molekula i širenjem indikacijskog područja primjene *H. italicum* (Antunes Viegas i sur., 2013; Poli i sur., 2003; Sala., 2002). U području kozmetologije primjenjuju se raznovrsne metode ekstrakcije aktivnih sastojaka iz cvjetnih glavica sakupljenih i sušenih odmah nakon cvatnje. Takvi su ekstrakti često komponente parfema ili formulacija namijenjenih za njegu delikatne kože sklone iritacijama. Smatra se da su za blagotvorne učinke kozmetičkih proizvoda obogaćenih eteričnim uljem *H. italicum* odgovorne značajne količine polifenola, posebno flavonoida, za koje je poznato da štite od štetnih učinaka oksidansa (Poli i sur., 2003). Antioksidacijsku i protuupalnu aktivnost pokazuju inhibicijom enzima koji sudjeluju u sintezi superoksid aniona, keliranjem metala uključenih u reakcije nastanka slobodnih radikala te prevencijom peroksidacije (Rajić i sur., 2015). Flavonoidi gnofalin i pinocembrin inhibiraju enzim 5-LOX zadužen za proizvodnju leukotriena B4 i enzime uključene u proces lipidne peroksidacije, dok tilirozid ima sposobnost



hvatanja slobodnih radikala i supresije otpuštanja histamina i drugih upalnih medijatora iz mastocita inhibirajući komponente C3a i C5a sustava komplementa. Smatra se ipak da je najvažnija protuupalna komponenta izolirana iz *H. italicum* arzanol koji snažno inhibira nuklearni faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), ključan faktor regulacije transkripcije gena za proinflamatorne citokine i enzime poput COX-2 (Bilandžija i sur., 2022). Andjić i sur. (2021) pokazali su potencijal eteričnog ulja *H. italicum*, pripremljenog u obliku masti i gela, za ubrzavanje procesa cijeljenja rana na životinjskom modelu štakora s dijabetesom uzrokovanim streptozotocinom. Kronične rane posljedica su mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa odnosno neučinkovitog procesa cijeljenja rana koji se sastoji od četiri faze – hemostaze, upale, proliferacije i remodelacije. Adstringentni i antimikrobni učinci terpena pomažu kontrakciju te olakšavaju epitelizaciju rane, dok  $\alpha$ -pinen omogućava formiranje ožiljka veće vlačne čvrstoće te doprinosi odlaganju kolagena. Uspješna terapija kroničnih rana mogla bi smanjiti potrebu za amputacijom, značajno povećati kvalitetu života te smanjiti smrtnost dijabetičara (Slika 4). Nostro i sur. (2001) utvrdili su inhibitorno djelovanje ekstrakta *H. italicum* na rast bakterije *Staphylococcus aureus* te na aktivnost enzima poput koagulaze, DNAaze, termonukleaze i lipaze.



Slika 4. Učinak topikalnih pripravaka koji sadrže eterično ulje *H. italicum* na cijeljenje rana životinjskih modela na različite dane (0, 7, 14, 21). Štakori dijabetičari podijeljeni su u šest skupina: CTRL – negativna kontrola; GEL – gel podloga; OINT – masna podloga; HIEO OINT – eterično ulje *H. italicum* u masnoj podlozi; HIEO GEL – eterično ulje *H. italicum* u gel podlozi; SSD – 1% sulfadiazin srebrno (Andjić i sur., 2021).

## **1.2. Elementi u tragovima**

Elementi u tragovima u fiziološkim uvjetima u organizmu prisutni su u malim količinama. Iako čine tek 0,02 % odnosno 8,6 g tjelesne mase prosječnog čovjeka sudjeluju kao kofaktori u brojnim biokemijskim reakcijama, dok njihova akumulacija ili deficijencija može biti etiološkim čimbenikom patogeneze. Elementi u tragovima su esencijalni kada njihova dnevna potreba iznosi manje od 100 mg. Esencijalni su stoga metali bakar, željezo, cink, krom, kobalt, mangan, molibden, selen te nemetal jod. Elementi čija prisutnost u organizmu već u niskim koncentracijama može ozbiljno ugroziti zdravlje jesu arsen, kadmij, živa i olovo. U kategoriju teških metala, odnosno onih čija je gustoća veća od  $5 \text{ g/cm}^3$ , ubraja se približno četrdeset kemijskih elemenata. Iako su određeni teški metali esencijalni u malim količinama, općenito su smatrani polutantima budući da akumulacijom u živim organizmima ostvaruju toksične učinke (Sharma i sur., 2004).

### **1.2.1. Elementi u humanom enzimskom sustavu**

Bakar se otapa u kiselom mediju ionizacijom te tako ulazi u hranidbeni lanac. Apсорbira se primarno putem gastrointestinalnog sustava, a izlučuje putem žuči i bubrega dok dnevna potreba odraslog čovjeka iznosi 1-2 mg. U krvnoj plazmi transport bakra odvija se pomoću ceruloplazmina. U eritrocitima, 60 % bakra pojavljuje se u obliku bakar-cink metaloenzima superoksid dismutaze. Dugotrajna deficijencija, osobito u razdoblju aktivnog rasta, rezultira anemijom, defektima u keratinizaciji i pigmentaciji kose, hipotermijom, mentalnom retardacijom, promjenama u skeletnom sustavu te degenerativnim promjenama u elastinu aorte. S druge strane, trovanje bakrom očituje se iritacijom i korozijom sluznica, plavozelenom dijarejom, oštećenjem krvnih žila, jetre i bubrega te središnjeg živčanog sustava (Prashanth i sur., 2015).

Željezo se, kao i bakar, bolje otapa u kiselom mediju, tvoreći katione feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) i fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Hemoglobin i mioglobin, citokromi 450, katalaza, peroksidaza i mnogi drugi enzimi sadrže prostetsku skupinu hem, izgrađenu od porfirinskog prstena i heksakoordiniranog željeza. Transportni oblik željeza je transferin, a skladišni feritin i hemosiderin. Prehranom je potrebno unositi približno 20 mg željeza dnevno dok deficijencija rezultira sideropeničnom anemijom. Akutno trovanje željezom očituje se mučninom, povraćanjem i proljevom, a kronično hiperpigmentacijom, cirozom jetre, kardiomiopatijom, dijabetesom, artritismom i perifernom neuropatijom (Prashanth i sur., 2015; Polin i sur., 2013).

Cink je amfoteran, stoga reagira kao kiselina ili baza ovisno o pH medija. Dnevna potreba iznosi 15-20 mg/dan. Izlučuje se primarno putem gušterače i crijeva, a manje putem proksimalnih tubula bubrega i znojnih žlijezdi. Razina cinka u plazmi snižena je u trudnoći, nadalje uslijed dehidracije, krvarenja, primjene oralnih kontraceptiva, akutnog infarkta miokarda, infekcija i malignih bolesti. Cink je nužan za aktivnost metaboličkih enzima koji sudjeluju u sintezi i degradaciji nukleinskih kiselina i proteina te metabolizmu alkohola, ugljikohidrata i lipida. Simptomi deficijencije su alopecija, dermatitis, disfunkcija imunološkog sustava, usporeni rast, smanjena aktivnost reproduktivnog sustava i spermatogeneze, poremećaj okusa i usporeno zacjeljivanje rana (Vuković i sur., 2022; Prashanth i sur., 2015).

Uloga kroma u metabolizmu ljudi odvija se preko biološki aktivnog spoja nazvanog glukoza tolerantni faktor (eng. *glucose tolerance factor*, GTF) koji je kationski krom ( $\text{Cr}^{3+}$ ) kompleks esencijalan za aktivnost inzulina i adekvatan metabolizam ugljikohidrata. Dnevno je potrebno unositi oko 0,005 mg kroma. Deficijencija rezultira poremećajem tolerancije glukoze, a intoksikacija zatajenjem bubrega, ulceracijama kože i mukoznih membrana, kontaktnim dermatitisom i karcinogenezom. Nekoliko tipova tumora pluća, gastrointestinalnog sustava, središnjeg živčanog sustava i kože povezano je s kroničnom ekspozicijom visokim koncentracijama heksavalentnog kroma ( $\text{Cr}^{6+}$ ) (Anderson i sur., 1977).

Kobalt je komponenta vitamina B<sub>12</sub> (cijanokobalamina). Poželjno je prehranom unositi 3 µg vitamina B<sub>12</sub> dnevno, što odgovara 0,012 µg kobalta. Apsorpcija kobalta odvija se putem kože te gastrointestinalnog i respiratornog sustava. Kobalt inducira eritropoezu, a blokira unos joda u štitnjaču. Simptomi deficijencije su kardiomiopatija, kongestivno zatajenje srca, policitemija i hipertrofija štitnjače, a budući da deficijencija kobalta vodi do smanjene dostupnosti vitamina B<sub>12</sub>, javljaju se simptomi poput perniciozne anemije i neuropatije (Prashanth i sur., 2015).

Mangan sudjeluje kao kofaktor, odnosno gradi metaloenzime koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji, metabolizmu kolesterola i masnih kiselina te ciklusu ureje. Mangan se u organizmu ponajprije skladišti u kristalima hidroksiapatita u kostima. Deficijencija rezultira povećanom sklonosti krvarenju uslijed produženog protrombinskog vremena dok akumulacija tijekom dužeg vremenskog perioda rezultira anoreksijom, apatijom, glavoboljama, grčevima u ekstremitetima, poremećajem govora te sindromima sličnim encefalitisu i parkinsonizmu (Prashanth i sur., 2015).

Deficijencija selena povezuje se s oslabljenim imunološkim odgovorom i povećanom sklonosti infekcijama. Oksidativni stres prouzrokovan takvom nutritivnom deficijencijom doprinosi mutacijama u genomu bezopasnog soja koksaki (*coxsaekie*) virusa u sojeve koji uzrokuju miokarditis (A. Beck i sur., 2003).

### **1.2.2. Onečišćenje biljnog materijala teškim metalima**

Aktivnosti u industrijskom sektoru krajem 20. stoljeća, ponajprije rudarenje i metalurgija, ali i proizvodnja i uporaba umjetnih gnojiva rezultirale su zagađenjem okoliša teškim metalima na globalnoj razini. Biljne vrste akumuliraju teške metale primarno iz kontaminiranog tla te vode i zraka. Smatra se da akumulacija teških metala ovisi o biljnoj vrsti i genotipu, no ona uvijek korelira s razinom kontaminacije tla. Također, zabilježene su varijacije koncentracija teških metala u različitim organima i tkivima iste biljne vrste. Nadalje, sadržaj teških metala ovisi o regulatornim mehanizmima kojima se biljni organizmi nastoje obraniti od toksičnih učinaka. Lišajevi i mahovine su iznimno osjetljivi bioindikator, odnosno pokazatelji onečišćenja okoliša budući da reagiraju već na niske razine teških metala prisutnih u atmosferi. Određivanje mikronutrijenata te metala i metaloida u biljnim sirovinama relevantno je s nutricionističkog stajališta ali i u smislu procjene potencijalnog odnosa koristi i rizika od njihove konzumacije. U svakom slučaju biljne vrste namijenjene za farmaceutsku i kozmetičku primjenu trebale bi biti kultivirane i sakupljane na kontroliranim, odnosno nekontaminiranim područjima (Kočevar Glavač i sur., 2017; Martin-Domingo i sur., 2017; Margui i Voutchkov, 2017; Ražić i sur., 2005; Baffi i sur., 2002).

### **1.3. Spektrometrijske tehnike za elementnu analizu biljnog materijala**

Najčešće primjenjivane tehnike za elementnu analizu biljnih materijala jesu induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS), induktivno spregnuta plazma optička emisijska spektrometrija (eng. *inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, ICP-OES), plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. *flame atomic absorption spectrometry*, FAAS) i grafitna atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. *graphite furnace atomic absorption spectrometry*, GFAAS). Navedene tehnike često su skupe i dugotrajne zbog potrebe za prethodnom obradom biljnog materijala (kompleksnost matriksa). Tehnike čvrstog stanja, poput analize aktivacije neutrona (eng. *neutron activation analysis*, NAA) i energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije (eng. *energy dispersive x-ray fluorescence*, EDXRF) također se primjenjuju za analizu elementarnog sastava biljnih materijala. Posljednjih godina rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (eng. *total x-ray fluorescence spectrometry*, TXRF) postaje sve češćom metodom izbora u svrhu simultane multielementne analize biljnih materijala zahvaljujući prednostima poput veće osjetljivosti i niže granice detekcije u odnosu na EDXRF. Također, prednosti ove tehnike su i potrošnja malih količina reagensa te niski operativni troškovi budući da TXRF sustav za rad ne zahtijeva rashladni medij niti plin što je uvelike povećalo popularnost TXRF-a (Margui i Voutchkov, 2017; Bilo i sur., 2015).

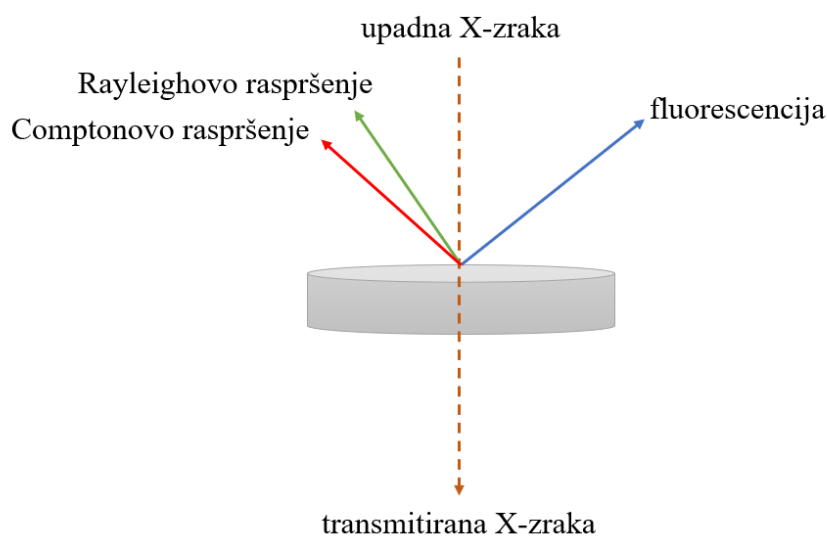
#### **1.3.1. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom**

Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS) je čvrsta ionizacijska tehnika koja se temelji na djelovanju plina, najčešće argona ili helija, koji se na vrlo visokoj temperaturi (10 000 K) ionizira i pretvara u plazmu. Nastali kationi argona i elektroni ubrzano se gibaju pod utjecajem elektromagnetskog polja te dolazi do velikog broja sudara iona plina što rezultira visokom energijom ionizacije. Nastala energija ionizacije dovoljna je za kidanje kemijskih veza između atoma molekula u uzorku, odnosno za atomizaciju molekula elemenata u tragovima. Većina atoma periodnog sustava elemenata ima nižu prvu energiju ionizacije od prve energije ionizacije plina (argona ili helija), stoga se efikasno ioniziraju pod utjecajem visoke temperature plazme i ioniziranog plina. Ioni se potom odvajaju pomoću masene spektrometrije, najčešće pomoću kvadrupola filtera masa, na temelju omjera mase i naboja. Odvojeni ioni dolaze do detektora te nastaje signal koji detektirane ione obilježava u jedinicama po sekundi (eng. *counts per second*, CPS) koje se odnose na broj iona koji detektor zabilježi u

jednoj sekundi. CPS vrijednost prevodi se u jedinicu koncentracije pomoću kalibracijske krivulje ovisnosti CPS o koncentraciji pojedinih elemenata u uzorku (Vuković i sur., 2022; Wilschefski i Baxter, 2019).

### 1.3.2. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija (XRF) je analitička tehnika za jednostavno određivanje kemijskog sastava materijala. Kada se snop X-zraka izvora (rendgenska cijev) usmjeri prema uzorku jedan se dio tog zračenja transmitira kroz uzorak, dok ostatak interagira s uzorkom na jedan od tri moguća načina: fluorescencijom, Comptonovim ili Rayleightovim raspršenjem (Slika 5). Elementi prisutni u uzorku emitiraju karakteristično fluorescentno zračenje prelaskom iz pobuđenog u osnovno stanje. Detektor energetski disperzivnog rendgenskog fluorescentnog spektrometra (EDXRF) razlučuje (dispergira) ukupno zračenje kojeg emitira uzorak na specifična zračenja pojedinih elemenata u uzorku – multielementna analiza. Rezultat analize je energetski disperzivni spektar ovisnosti broja fotona o njihovoj energiji (Klockenkämper i von Bohlen, 2015; Brouwer, 2006).

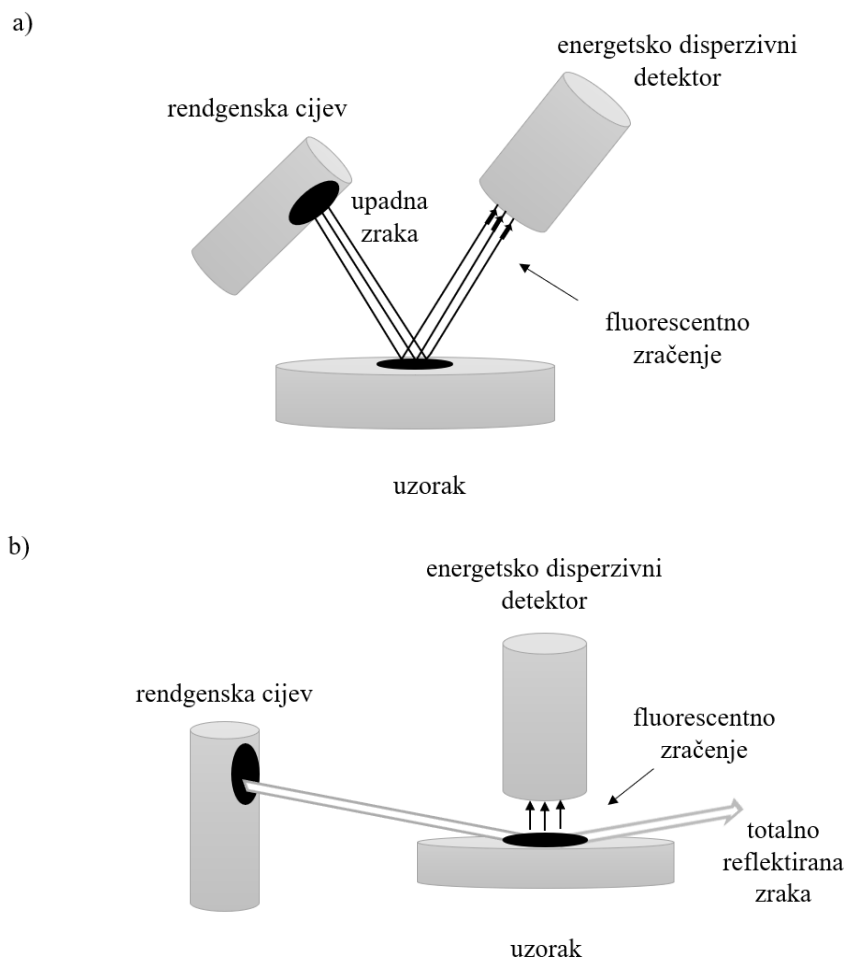


Slika 5. Tri glavne interakcije X-zraka s tvari.

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

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) je instrumentalna analitička tehnika koja se temelji na fizikalnom fenomenu totalne refleksije uskog kolimiranog snopa X-zraka s ravne površine kada je upadni kut manji od kritičnog kuta od  $0,1^\circ$ . TXRF je osjetljiva tehnika prikladna za analizu mikroelemenata i elemenata u tragovima. Budući da se većina zračenja pobudne zrake reflektira, smanjen je spektralni šum te je granica detekcije snižena s  $10^{-7}$  na  $10^{-12}$  g u odnosu na konvencionalnu EDXRF. Također, mali upadni kut omogućava postavljanje detektora fluorescencije vrlo blizu uzorka (0,5 mm). Pritom je prinos fluorescencije vrlo visok, a apsorpcija zrakom vrlo mala zbog kratke udaljenosti između uzorka i detektora (Slika 6) (Klockenkämper i von Bohlen, 2015; Wobrauschek, 2007).

Budući da priprema uzorka u tankom filmu isključuje efekte matrice, kao što su apsorpcija i sekundarna ekscitacija, kvantifikacija je vrlo jednostavna te se u većini slučajeva postiže dodatkom unutarnjeg standardnog elementa, tzv. unutarnji standard (eng. *internal standard*, IS). Kao unutarnji standard koristi se element koji nije prisutan u ispitivanom uzorku (Dalipi i sur. 2017).



Slika 6. Shematski prikaz instrumenta: a) konvencionalni EDXRF i b) TXRF.

### 1.3.2.2. Prednosti i nedostaci TXRF u odnosu na EDXRF i ICP-MS

U odnosu na ostale spektrometrijske tehnike TXRF zahtjeva vrlo malu količinu uzorka za analizu, omogućava brzu multielementnu analizu i jednostavnu kvantifikaciju niskih koncentracija (ppb) pomoću unutarnjeg standarda. Prednost je i potrošnja malih količina reagensa te niski operativni troškovi budući da ne zahtijeva plin ili medij za hlađenje.

Dodatna prednost TXRF tehnike je mogućnost analize kompleksnih tekućih i čvrstih uzoraka koristeći isključivo jednostavne postupke pripreme uzorka za analizu poput otapanja i suspendiranja što je u skladu s zahtjevima zelene kemije. Svaka analitička tehnika, pa tako i TXRF, ima svoje nedostatke, a to je ponajprije mala osjetljivost za elemente s niskim atomskim brojem i prijelazne elemente (Margui i sur., 2022; Dalipi i sur., 2017; Gallardo i sur., 2016; Bilo i sur., 2015).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

---

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je mediteranska biljka iz porodice Asteraceae koja se zbog svojih aromatičnih i ljekovitih svojstava od davnina primjenjuje u tradicionalnoj medicini. Eterično ulje i ostali ekstrakti *H. italicum* obiluju bioaktivnim sekundarnim metabolitima s antioksidativnim, protuupalnim i antimikrobnim svojstvima zbog čega se uz uobičajene indikacije kao što su patološka stanja respiratornog, gastrointestinalnog sustava i kože sve češće primjenjuju u području kozmetologije. Kako bi se osigurala kvaliteta farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka *H. italicum* nužna je procjena čistoće sirovina koje se koriste za njihovu izradu. Biljke mogu akumulirati hranjive tvari iz tla, vode i zraka stoga predstavljaju izvor esencijalnih elemenata, no ponekad i toksičnih teških metala ukoliko je primjerice tlo na kojem rastu kontaminirano. Multielementna analiza biljnih sirovina esencijalna je za procjenu odnosa rizika i koristi njihove konzumacije. Za sada ne postoji međunarodni konsenzus niti regulativa Europske unije koja propisuje dozvoljene granice metala u kozmetičkim proizvodima kao ni obveza o izvještavanju o prisutnosti istih.

Glavni cilj ovog diplomskog rada je usporediti rezultate sadržaja elemenata prisutnih u uzorcima smilja primjenjujući različite analitičke metode pripreme uzoraka, uključujući suspenziju, mikrovalnu digestiju i pelete. Analiza je provedena koristeći EDXRF, TXRF te najčešće korištenu spektrometrijsku tehniku u području biljnih analiza kao što je ICP-MS. Dobiveni rezultati će se usporediti prema sljedećim kriterijima: načela „zelene kemije“, vrijeme potrebno za analizu te ekonomski kriteriji.

### 3. MATERIJALI I METODE

---

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- Standard galij (Ga) 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standard bakar (Cu) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard željezo (Fe) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard mangan (Mn) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard cink (Zn) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard titanij (Ti) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard krom (Cr) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard nikal (Ni) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard olovo (Pb) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard selen (Se) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard brom (Br) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard rubidij (Rb) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard stroncij (Sr) 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- 65 % dušična kiselina (HNO<sub>3</sub>) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Standardna poredbena tvar, lišće rajčice (eng. *Certified Reference Material NIST Tomato leaves 1573a*, NIST, Sigma Aldrich, Njemačka)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 µScm<sup>-1</sup>, pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)

Sve korištene kemikalije su *pro analysi* čistoće.

##### 3.1.2. Radni instrumenti i pribor

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)
- Rendgenski fluorescencijski spektrometar s totalnom refleksijom (Horizon, G. N. R., Italija)
- Energetsko disperzivni rendgenski fluorescencijski spektrometar S2 RANGER (Bruker AXS, GmbH, Karlsruhe, Njemačka)

- ICP-MS spektrometar Agilent 7500c (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- Ultrazvučna kupelj Transsonic 570 (Elma Ultrasonic, Singen, Njemačka)
- Vortex mješalica
- Kuglični mlin
- Vibracijska tresilica za određivanje veličina čestica AS 200 Basic ( Retsch Mill, Düsseldorf, Njemačka)
- Grijača ploča
- Kvarcni stakleni reflektori
- Automatske mikropipete volumena 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Kivete
- Mikrovalna peć (Speedwave XPERT, Berghof instruments, Eningen, Njemačka)
- Laboratorijska preša za pelete
- Politetrafluoroetilenske (PTFE) posude (Fisherbrand, Göteborg, Švedska)

### 3.1.3. Uzorci

Za potrebe ove analize prikupljeni su uzorci smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) na lokaciji u središnjoj Dalmaciji u blizini Biograda na moru. Uzorci su prikupljeni u lipnju 2021. godine kada je biljna vrsta bila u punom cvatu. Osim navedenih uzoraka, rabljen je i certificirani referentni materijal (CRM) lista rajčice (NIST 1573a) u svrhu optimizacije metode.

#### 3.1.3.1. Priprema uzoraka smilja

Svježi biljni materijal prvotno je razvrstan na zasebne uzorke cvijeta i stabljike koji su potom pojedinačno samljeveni u fini homogeni prašak primjenom kugličnog mlina gdje su i posuda i kuglice bile od ahata. Dobiveni prah i cvijeta i stabljike podijeljen je u dvije skupine prosijevanjem na vibracijskom situ temeljem veličine čestica (Slika 7, Tablica 1) (De Almeida i sur., 2020; Gallardo i sur., 2016).



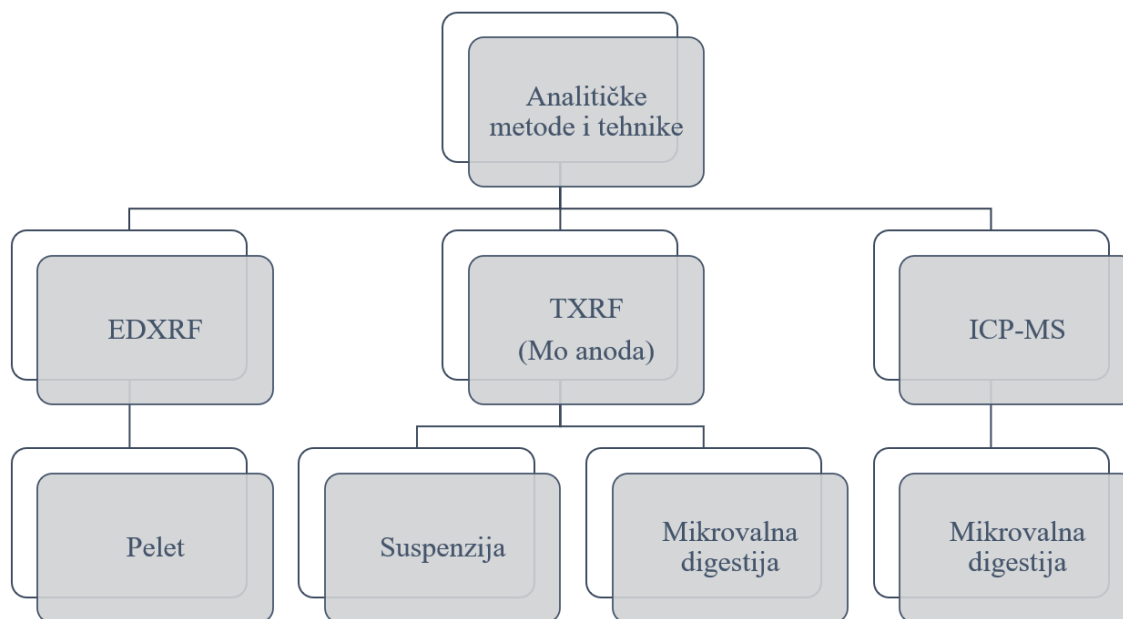
Slika 7. Postupak pripreme uzoraka smilja.

Tablica 1. Tablica s oznakama uzoraka koje su korištene za određenu veličinu čestica.

Uzorak (oznaka)	Veličina čestica
Cvijet (C)	< 63 μm
Cvijet (C*)	< 125 μm
Stabljika (S)	< 63 μm
Stabljika (S*)	< 125 μm

## 3.2. Metode

U svrhu određivanja sadržaja elemenata ali i dobivanja uvida u prednosti i nedostatke TXRF tehnike, uzorci smilja podvrgnuti su analizi različitim analitičkim tehnikama uz primijenjene različite metode pripreme uzoraka uključujući: suspenzija + TXRF, mikrovalna digestija + TXRF i ICP-MS, pelet + EDXRF. ICP-MS i EDXRF mjerenja provedena su radi usporedbe (Slika 8).



Slika 8. Primijenjene analitičke tehnike i metode pripreme uzorka za analizu.

### 3.2.1. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom

Multielementna analiza svih uzoraka provedena je korištenjem samostojećeg TXRF spektrometra (Horizon, G. N. R., Italija). Uređaj je opremljen rendgenskom cijevi od 600 W s molibdenovom anodom (Mo). Karakteristično zračenje elemenata prisutnih u uzorku detektirano je silikonskim detektorom (Ketek AXAS-D 2.0 SDD) s aktivnim područjem od 40 mm<sup>2</sup> i rezolucijom <133 eV (Mn-K $\alpha$ ). Mjerenja su izvršena pri 40 kV i 15 mA uz vrijeme mjerenja od 900 s.

Koncentracije odabranih analita izračunate su primjenom jednadžbe uz pomoć unutarnjeg standarda:

$$c_{analit} = \frac{c_{IS} \times N_{analit} \times S_{IS}}{N_{IS} \times S_{analit}}$$

gdje je:

$c_{analit}$  – koncentracija analita

$c_{IS}$  – koncentracija unutarnjeg standarda

$N_{analit}$  – površina pika analita

$S_{IS}$  – osjetljivost instrumenta za IS

$N_{IS}$  – površina pika IS

$S_{analit}$  – osjetljivost instrumenta za analit

Tablica 2. Instrumentalni parametri i uvjeti mjerenja TXRF sustava.

<b>TXRF spektrometar (Horizon, G. N. R., Italija)</b>	
<b>Rendgenska cijev</b>	Mo, 600 W
<b>Napon</b>	40 kV
<b>Struja</b>	15 mA
<b>Rezolucija detektora (SDD)</b>	<133 eV pri Mn-K $\alpha$ (5,9 keV)
<b>Radno okruženje</b>	Zrak
<b>Vrijeme mjerenja</b>	900 s

### 3.2.2. EDXRF i ICP-MS

Usporedbe radi sadržaj elemenata u uzorcima određen je primjenom Agilent 7500c ICP-MS spektrometra (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) i EDXRF spektrometra (S2 RANGER, Bruker AXS GmbH, Berlin, Njemačka). Tehničke specifikacije ovih instrumenata sažete su u Tablici 3 i Tablici 4 (instrumentalni parametri i uvjeti mjerenja). Kod EDXRF tehnike korištena je vanjska kalibracija dobivena analizom 10 certificiranih referentnih materijala biljne matrice. Koncentracijski intervali za elemente bili su sljedeći: Na: 0,002-1,960 %; Mg: 0,224-0,8531 %; Al: 0,015-0,3 %; P: 0,100-0,660 %; S: 0,247-1,000 %; Cl: 0,008-3,540 %; K: 0,92-4,75 %; Ca: 0,15-4,00 %; Ti: 0,0009-0,0095 %; Cr: 0-0,0006 %; Mn: 0-0,1570 %; Fe: 0,0139-0,1490 %; Ni: 0,0001-0,008 %; Zn: 0,0013-0,0055 %; As: 0,0000-

0,0036 %; Br: 0-0,0087 %; Rb: 0,0004-0,0082 % ; Sr: 0,0010-0,1470 %; Ba: 0,0003-0,0067 %; Pb: 0-0,0047 %.

Kod ICP-MS tehnike korištena je vanjska kalibracija na način da su iz pojedinačnih matičnih otopina ispitivanih elemenata koncentracije 1000 µg/mL napravljena serijska razrjeđenja standarda u odgovarajućim rasponima koncentracija s ultra čistom vodom. Tako pripremljene standardne otopine korištene su za izradu baždarnih pravaca.

Tablica 3. *Karakteristike ICP-MS sustava.*

<b>Agilent 7500c ICP-MS spektrometar (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)</b>	
<b>RF snaga</b>	1500 W
<b>Brzina protoka plazme</b>	15 L min <sup>-1</sup>
<b>Brzina protoka plina nebulizatora</b>	1,2 L min <sup>-1</sup>
<b>Konus za uzorkovanje</b>	Ni, promjer otvora – 1 mm
<b>Skimer konus</b>	Ni, promjer otvora – 0,4 mm
<b>Vrijeme integracije za svaki izotop</b>	0,1 s
<b>Očitanje po uzorku</b>	3
<b>Uvjeti</b>	<b>Izotopi</b>
<b>Bez plina</b>	<sup>137</sup> Ba, <sup>205</sup> Tl, <sup>208</sup> Pb, <sup>103</sup> Rh (IS)
<b>H<sub>2</sub> 3 mL min<sup>-1</sup> + He 0,5 mL min<sup>-1</sup></b>	<sup>75</sup> As, <sup>78</sup> Se, <sup>103</sup> Rh (IS)
<b>He 2 mL min<sup>-1</sup></b>	<sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>79</sup> Br, <sup>81</sup> Br, <sup>85</sup> Rb, <sup>88</sup> Sr, <sup>103</sup> Rh (IS)

Tablica 4. *Karakteristike EDXRF sustava.*

<b>S2 RANGER EDXRF sustav (Bruker AXS, GmbH, Berlin, Njemačka)</b>	
<b>Rendgenska cijev</b>	Pd, 50 W
<b>Napon</b>	40 kV
<b>Struja</b>	15 mA
<b>Rezolucija detektora (SDD)</b>	129 eV (Mn-K $\alpha$ )
<b>Uvjeti mjerenja</b>	10 kV, bez filtera, 200s: Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca 40 kV, 200s: ostali element 50kV, Cu 100µm, 200s: As, Rb

### 3.2.3. Priprema uzoraka za analizu

#### 3.2.3.1. Suspenzija

Uzorci za analizu pripremljeni su u obliku suspenzija prema propisu opisanom u radu Dalipi i sur., (2017). Izvaganjaj količini od približno 20 mg praškastog materijala doda se otopina unutarnjeg standarda Ga u koncentraciji od oko 20 mg/kg u odnosu na masu praha te ultračiste vode i HNO<sub>3</sub>. Faktor razrjeđenja iznosi 62. Konačna koncentracija HNO<sub>3</sub> je 0,46 M. Pripremljena suspenzija se sonicira u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15 min pri temperaturi od 30 °C te se potom uzorci homogeniziraju i vortex miješalicom tijekom 30 s. 8 µL alikvota pipetirano je na silikonizirani kvarcni stakleni reflektor te osušeno na grijačkoj ploči na temperaturi od približno 80 °C. Ovako pripremljeni uzorci podvrgnu se TXRF analizi (Slika 9).



Slika 9. Priprema uzoraka suspendiranjem.

#### 3.2.3.2. Mikrovalna digestija

Metoda mikrovalne digestije temeljena na metodi 3052 prihvaćenoj od strane US Environmental Protection Agency (EPA) primijenjena je u svrhu pripreme uzoraka za ICP-MS i TXRF analizu. U PTFE posude odvažuje se 250 mg usitnjenog biljnog materijala te se doda 9 mL HNO<sub>3</sub> i 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posude se zatvore i zagrijavaju u mikrovalnoj peći prvo 5 minuta do postizanja temperature od 180 °C, a zatim još 10 minuta na 180 °C. Nakon hlađenja, otopine uzoraka prenesu se u epruvete volumena 25 mL te nadopune do oznake ultračistom vodom. Volumen alikvota i postupak sušenja u svrhu TXRF analize jednaki su kao i za uzorke pripremljene suspendiranjem.

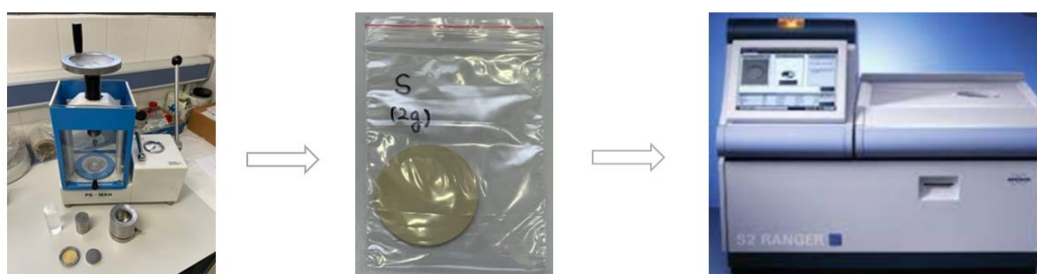




Slika 10. Priprema uzoraka mikrovalnom digestijom (EPA 3052).

### 3.2.3.3. Priprema peleta

Uzorci cvijeta i stabljike smilja pripreme se za EDXRF analizu komprimiranjem 2 g praškastog materijala u pelete bez dodatka veziva pri čemu je konačni promjer uzorka 2,8 cm. Peleti se pripreme prešanjem uzorka pomoću ručne preše tijekom 2 minute na 10 Tm (Slika 11).



Slika 11. Priprema uzoraka komprimiranjem u pelete.

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu prikupljenih podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Svi pripremljeni uzorci podvrgnuti su analizi pomoću ICP-MS, TXRF i EDXRF tehnike, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Analiza statističke značajnosti rezultata rađena je u programu GraphPad Prisma 9.0 uz nivo značajnosti  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

---

### 4.1. Optimizacija metode za pripremu uzorka metodom suspenzije

U ovom istraživanju primijenjene su tri različite analitičke tehnike (TXRF, EDXRF i ICP-MS) za ispitivanje sadržaja elemenata u biljnom materijalu. Za analizu EDXRF tehnikom uzorci su pripremljeni kao peleti dok su za analizu TXRF tehnikom dva različita načina pripreme uzoraka uspoređena: suspenzija čvrstih čestica u odgovarajućem otapalu i mikrovalna digestija. U uzorcima pripremljenima mikrovalnom digestijom sadržaj elemenata određen je i ICP-MS tehnikom (Slika 8).

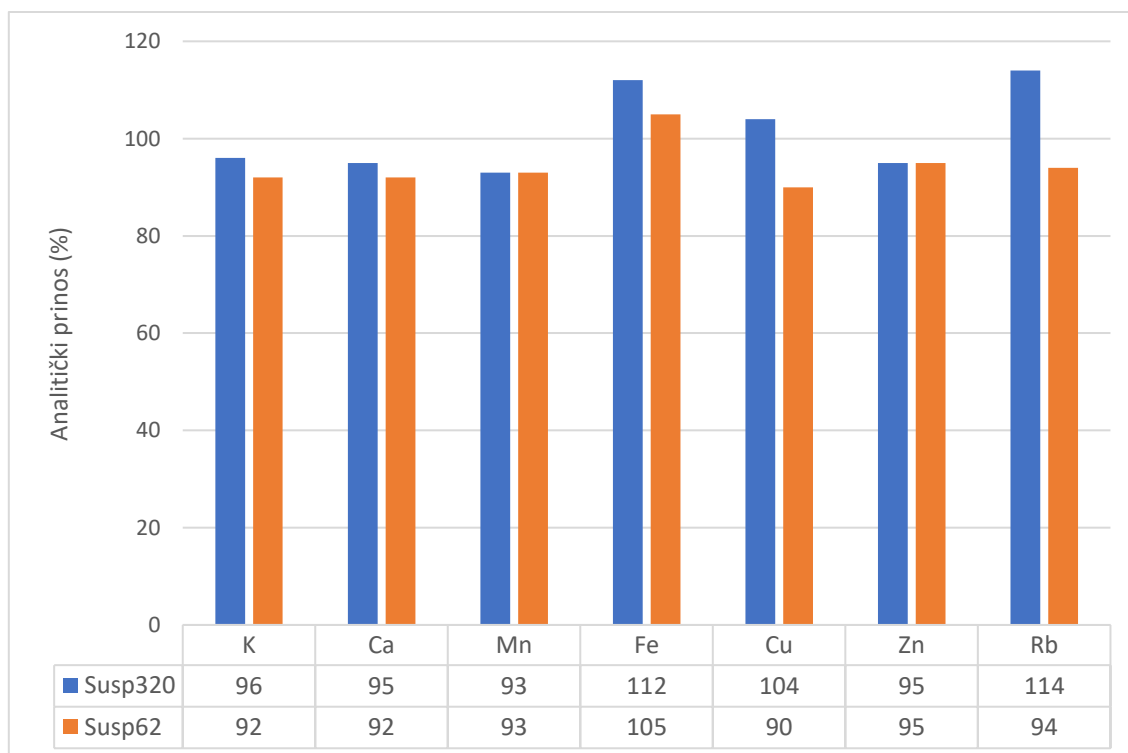
Prvo se u svrhu pronalaska najbolje strategije pripreme uzoraka u obliku suspenzije provela analiza certificiranog referentnog materijala (CRM) lista rajčice (NIST 1573a), odabranog na temelju sličnosti matriksa s ispitivanim uzorcima. Pripremljene su dvije suspenzije CRM različitih faktora razrjeđenja – 62 i 320 kako bi se procijenio utjecaj mase uzorka nanesenog na reflektor na analitički prinos (%) i granicu detekcije (mg/kg). Kako za potrebe analize u uvjetima totalne refleksije uzorak mora biti nanesen u vrlo tankom sloju na reflektivnom nosaču, debljina sloja uzorka smatra se kritičnim parametrom koji može značajno utjecati na određivanje elemenata. Dobiveni rezultati za ispitivani CRM te za pripremljene suspenzije prikazani su u Tablici 5 gdje je standardna devijacija za eksperimentalne koncentracije procijenjena prikupljanjem spektara na 90, 180 i 270 stupnjeva. Ovisnost analitičkog prinosa (%) elemenata o faktoru razrjeđenja prikazana je na Slici 12. Primijećena je veća disperzija rezultata kod većeg faktora razrjeđenja (320), osobito za elemente prisutne u niskim koncentracijama (Cu i Rb), u odnosu na dobivene vrijednosti kod manjeg faktora razrjeđenja (62). Na Slici 13 prikazana je ovisnost granice detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) elemenata o faktoru razrjeđenja pripremljene suspenzije. LOD je procijenjen kao 3 puta standardna devijacija pozadinskog šuma (pod pretpostavkom Poissonove statistike). Usporedbom dobivenih vrijednosti elemenata i LOD značajno je spomenuti da u slučaju suspenzije s faktorom razrjeđenja 62 dobivena vrijednost za Cr je samo malo iznad vrijednosti LOD. Drugi problem je u slučaju Ni čija dobivena vrijednost nije sigurna zbog blizine  $K\alpha$  linije Ca ( $2 \times 3.691$  keV) pa može doći do preklapanja signala ova dva elementa. Nadalje, pretpostavlja se da veliki signali K i Ca čine šum te bi u njihovom slučaju za točnu kvantifikaciju trebalo primijeniti vanjsku kalibraciju.

Uzevši u obzir dobivene rezultate, s obzirom na veću točnost i niže granice detekcije, u daljnjim ispitivanjima korištena je priprema suspenzija s faktorom razrjeđenja 62.

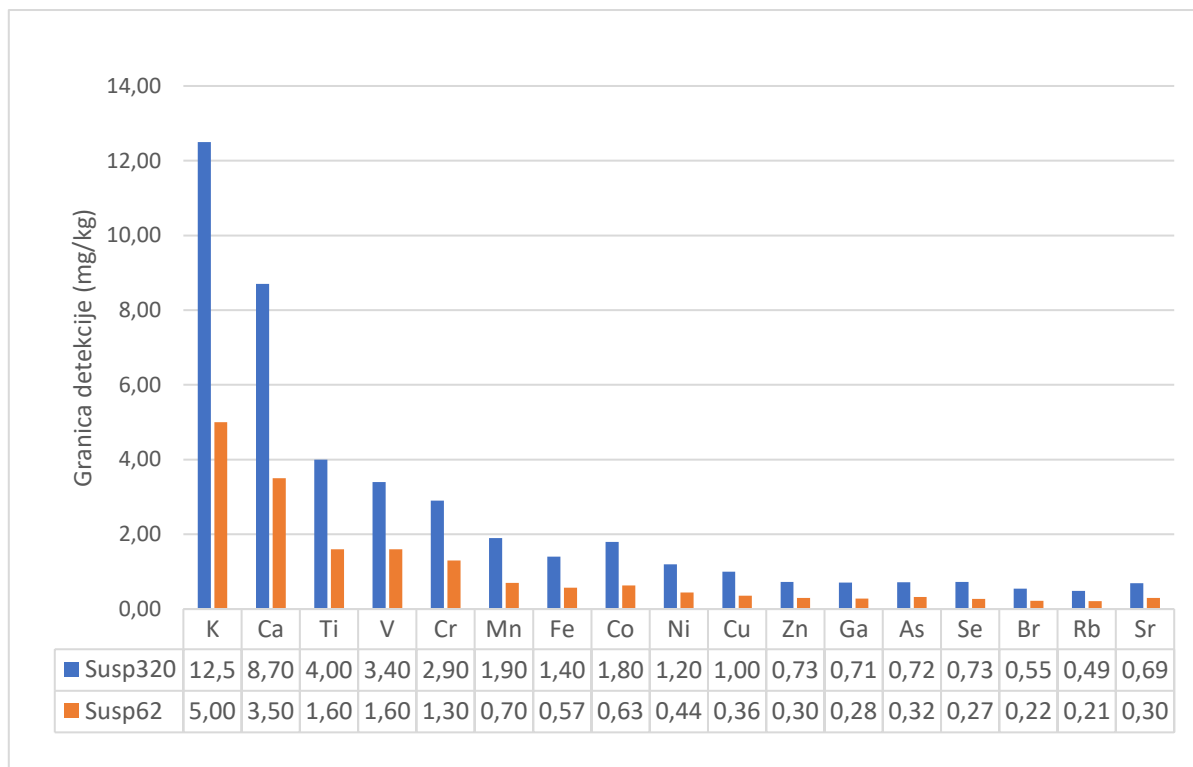
Tablica 5. Usporedba certificiranih koncentracija (mg/kg) elemenata s izmjerenim vrijednostima u dvjema suspenzijama različitih faktora razrjeđenja (62 i 320). Analizirani uzorak: CRM1573a. Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

Element	(mg/kg)		
	CRM $\pm$ SD	Susp62 $\pm$ SD	Susp320 $\pm$ SD
<b>P</b>	2161 $\pm$ 28	NA	NA
<b>K</b>	26760 $\pm$ 480	24644 $\pm$ 497	25658 $\pm$ 539
<b>Ca</b>	50450 $\pm$ 550	46401 $\pm$ 621	47854 $\pm$ 2520
<b>V</b>	0,835 $\pm$ 0,034	<1,6	<3,4
<b>Cr</b>	1,988 $\pm$ 0,034	1,68 $\pm$ 0,2	<2,9
<b>Mn</b>	246,3 $\pm$ 7,1	229,6 $\pm$ 4,5	230,1 $\pm$ 8,1
<b>Fe</b>	367,5 $\pm$ 4,3	385,0 $\pm$ 18,9	411,6 $\pm$ 19,9
<b>Co</b>	0,5773 $\pm$ 0,0071	<0,6	<1,8
<b>Ni</b>	1,582 $\pm$ 0,041	1,1 $\pm$ 0,2	<1,1
<b>Cu</b>	4,7 $\pm$ 0,14	4,2 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 1,0
<b>Zn</b>	30,94 $\pm$ 0,55	29,5 $\pm$ 0,3	29,3 $\pm$ 1,5
<b>As</b>	0,1126 $\pm$ 0,0024	<0,33	<0,72
<b>Se</b>	0,0543 $\pm$ 0,002	<0,27	<0,73
<b>Rb</b>	14,83 $\pm$ 0,31	14,00 $\pm$ 0,1	16,80 $\pm$ 3,9

NA – nije detektirano



Slika 12. Učinak faktora razrjeđenja (320 i 62) na analitički prinos (%) elemenata.



Slika 13. Učinak faktora razrjeđenja (320 i 62) na granice detekcije (mg/kg) elemenata.

Tablica 6. Usporedba rezultata TXRF i ICP-MS analize CRM1573a pripremljenog mikrovalnom digestijom. Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

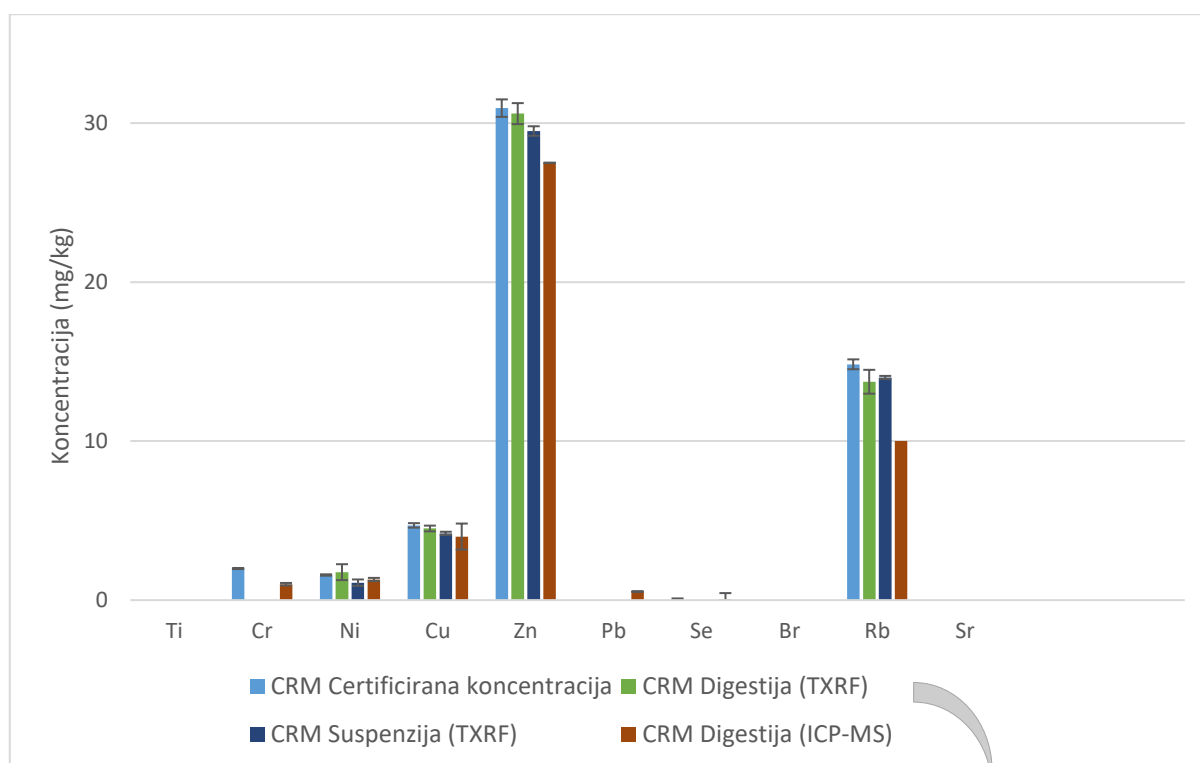
Element	(mg/kg)				
	CRM $\pm$ SD	TXRF $\pm$ SD	LOD	Analitički prinos (%)	ICP-MS $\pm$ SD
<b>P</b>	2161 $\pm$ 28	NA	NA	NA	NA
<b>K</b>	26760 $\pm$ 480	20185 $\pm$ 2777	3,9	75	NA
<b>Ca</b>	50450 $\pm$ 550	39080 $\pm$ 4525	2,7	77	NA
<b>V</b>	0,835 $\pm$ 0,034	NA	1,2	0	NA
<b>Cr</b>	1,988 $\pm$ 0,034	NA	0,92	0	1,000 $\pm$ 0,200
<b>Mn</b>	246,3 $\pm$ 7,1	201,6 $\pm$ 8,3	0,66	82	270,0 $\pm$ 30,0
<b>Fe</b>	367,5 $\pm$ 4,3	292,5 $\pm$ 0,7	0,55	80	330 $\pm$ 30,0
<b>Co</b>	0,5773 $\pm$ 0,0071	NA	0,44	0	NA
<b>Ni</b>	1,582 $\pm$ 0,041	1,76 $\pm$ 0,5	0,36	111	1,30 $\pm$ 0,08
<b>Cu</b>	4,7 $\pm$ 0,14	4,51 $\pm$ 0,18	0,25	96	4,00 $\pm$ 0,10
<b>Zn</b>	30,94 $\pm$ 0,55	30,60 $\pm$ 0,66	0,23	99	27,5 $\pm$ 0,8
<b>As</b>	0,1126 $\pm$ 0,0024	NA	0,19	0	0,124 $\pm$ 0,0020
<b>Se</b>	0,0543 $\pm$ 0,002	NA	0,18	0	0,044 $\pm$ 0,014
<b>Rb</b>	14,83 $\pm$ 0,31	13,73 $\pm$ 0,75	0,25	93	10,00 $\pm$ 0,40

NA – nije detektirano

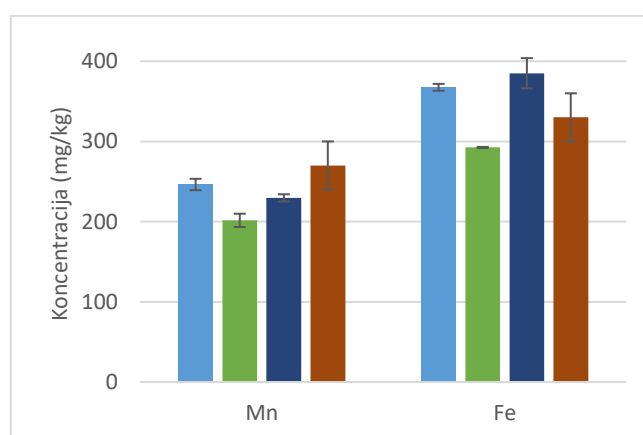
Nadalje, CRM 1573a pripremljen je postupkom mikrovalne digestije te analiziran TXRF i ICP-MS tehnikom. Dobivene vrijednosti ispitivanih elemenata s TXRF i ICP-MS tehnikom uspoređene su (Tablica 6) i nisu pokazale statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ). Dobro slaganje između dobivenih rezultata ukazuje da se u ovom slučaju TXRF tehnika može smatrati pouzdanom i točnom tehnikom te se može primijeniti za analizu prikupljenih uzoraka smilja. Prednosti mikrovalne digestije kao metode pripreme uzorka za TXRF analizu jesu manja pozadinska smetnja uslijed razgradnje matriksa kiselinama te mogućnost formiranja homogenijeg sloja na samom nosaču. S druge strane neki od nedostataka jesu potreba za većom količinom uzorka, generiranje ostataka kao i visoka cijena analize.

Cilj ove optimizacije bio je pronaći pouzdanu metodu pripreme suspenzije uzorka za TXRF analizu, stoga su rezultati mjerenja uspoređeni s rezultatima TXRF i ICP-MS analize CRM 1573a pripremljenog postupkom mikrovalne digestije (Slika 14a). Zbog visokog sadržaja u odnosu na ostale elemente, dobivene vrijednosti za Mn i Fe prikazane su odvojeno (Slika 14b). Svaki rezultat je srednja vrijednost 3 mjerenja  $\pm$  standardna devijacija i izražen je prema suhom biljnom materijalu/suhoj masi biljne vrste. Dobivene koncentracije svih ispitivanih elemenata s TXRF i ICP-MS tehnikom uspoređene su (Slika 14a i 14b) i nisu pokazale statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ). Dobro slaganje između dobivenih rezultata ukazuje da u ovom slučaju postupak pripreme uzorka ne utječe značajno na rezultate. Male razlike u dobivenim koncentracijama s ove dvije tehnike kod različitih metoda pripreme uzorka mogu se pripisati nehomogenosti suspendiranih čestica.

a)



b)



Slika 14. a) usporedba sadržaja elemenata CRM 1573a određenog primjenom različitih metoda pripreme uzoraka i analitičkih tehnika ( $n = 3$ ); b) rezultati kvantifikacije Mn i Fe. Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

#### 4.1.1. Učinak veličine čestica

Izuzev faktora razrjeđenja te vrste disperzivnog sredstva koje će se primijeniti za pripremu uzorka u obliku suspenzije, na homogenost uzorka utječe i veličina čestica usitnjenog biljnog materijala. Sklonost čestica da uslijed elektrostatskih interakcija stvaraju mikroskopske

aglomerate može rezultirati velikim odstupanjima izmjerenih od stvarnih vrijednosti. Za većinu bioloških uzoraka prihvatljiva homogenost postiže se usitnjavanjem uzorka na čestice veličine manje od 75  $\mu\text{m}$  (Dalipi i sur., 2017).

Zbog gore navedenog razloga u ovom radu ispitan je i utjecaj veličine čestica na sadržaj elemenata u ispitivanom biljnom materijalu. Biljni materijal prvotno je obrađen kako je opisano u poglavlju 3.1.3.1. te su dobivena četiri uzorka smilja (cvijet i stabljika) različitih veličina čestica koji su potom pripremljeni u obliku suspenzija prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.1. Ispitivani elementi odabrani su temeljem njihove važnosti i uloge u biološkim mehanizmima ili potencijalne toksičnosti prilikom ekspozicije putem kozmetičkih pripravaka. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 7 gdje je učinak veličine čestica na sadržaj elemenata izražen kao omjer određene koncentracije za obje veličine čestica cvijeta i stabljike smilja. Skoro za sve ispitivane elemente, i kod uzoraka cvijeta i kod uzoraka stabljike, dobivene vrijednosti pokazuju da u ovom slučaju veličina čestica nema veći utjecaj na rezultat. Jedino veće odstupanje uočeno je u slučaju Pb i Ba što se može pripisati dobivenim vrijednostima nižim od vrijednosti LOD. Nadalje su se u ovom istraživanju koristili uzorci s veličinom čestica manjom od 63  $\mu\text{m}$ .

Tablica 7. Učinak veličine čestica uzorka cvijeta i stabljike smilja na sadržaj elemenata.

<b>Element</b>	<b>63 <math>\mu\text{m}</math>/125 <math>\mu\text{m}</math> Cvijet (C/C*)</b>	<b>63 <math>\mu\text{m}</math>/125 <math>\mu\text{m}</math> Stabljika (S/S*)</b>
[Se] ng/g	0,9091	0,8889
[As] ng/g	<50	<50
[Cr] $\mu\text{g/g}$	1	0,6842
[Mn] $\mu\text{g/g}$	0,9739	1,0395
[Ni] $\mu\text{g/g}$	1,0018	1,2001
[Fe] $\mu\text{g/g}$	0,9425	0,9500
[Cu] $\mu\text{g/g}$	0,9155	1,0488
[Zn] $\mu\text{g/g}$	0,9706	0,9048
[Rb] $\mu\text{g/g}$	0,9783	1,1140
[Sr] $\mu\text{g/g}$	1,0544	1,0407
[Ba] $\mu\text{g/g}$	0,9126	0,5789
[Pb] $\mu\text{g/g}$	0,2333	0,4643

## 4.2. Analiza uzoraka smilja

Brojne makromolekule koje grade i/ili sudjeluju u biokemijskim procesima biljnih organizama u svojoj strukturi sadrže metale. Biljne vrste također akumuliraju metale iz tla, vode i zraka. Toksični teški metali mogu ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje stoga je određivanje sadržaja elemenata u biljnim vrstama i njihovim iscrpinama vrlo važno.

Jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bilo je ispitati različite načine pripreme uzoraka biljnog materijala te odrediti sadržaj elemenata različitim tehnikama. Nakon što su provedena preliminarna ispitivanja pomoću CRM uzorci smilja su pripremljeni primjenom različitih metoda pripreme uzoraka te analizirani pomoću različitih analitičkih tehnika kako slijedi: i) suspenzija + TXRF (samo za uzorke cvijeta); ii) mikrovalna digestija + ICP-MS; iii) mikrovalna digestija + TXRF; iv) pelet + EDXRF. Određen je sadržaj sljedećih elemenata: Fe, Mn, Ti, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Se, Rb i Sr koji su odabrani temeljem njihove važnosti i uloge u biološkim mehanizmima ili potencijalne toksičnosti prilikom ekspozicije putem kozmetičkih pripravaka. Dobivene koncentracije ispitivanih elemenata prikazane su u Tablici 8 (uzorci cvijeta smilja) i Tablici 9 (uzorci stabljike smilja). Svaki rezultat je srednja vrijednost 3 mjerenja  $\pm$  standardna devijacija te je izražen prema masi biljnog materijala (mg/kg).



Tablica 8. Koncentracije elemenata (mg/kg) u uzorcima cvijeta smilja određene različitim analitičkim tehnikama (TXRF, ICP-MS, EDXRF) i metodama pripreme uzoraka za analizu. Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

(mg/kg)				
Element	TXRF		ICP-MS	EDXRF
	C – digestija	C – suspenzija	C - digestija	Pelet
<b>Ti</b>	2,08 $\pm$ 0,67	3,74 $\pm$ 0,03	NA	NA
<b>Cr</b>	1,96 $\pm$ 1,25	2,90 $\pm$ 1	1,60 $\pm$ 0,60	NA
<b>Mn</b>	94,02 $\pm$ 6,06	98,60 $\pm$ 1,9	112,00 $\pm$ 6,00	101,50 $\pm$ 0,70
<b>Fe</b>	69,80 $\pm$ 2,72	80,60 $\pm$ 2,9	82,00 $\pm$ 3,00	85,00 $\pm$ 4,00
<b>Ni</b>	1,97 $\pm$ 0,61	2,62 $\pm$ 0,46	1,90 $\pm$ 0,30	NA
<b>Cu</b>	11,95 $\pm$ 1,47	12,06 $\pm$ 0,23	13,00 $\pm$ 2,00	4,00 $\pm$ 0,00
<b>Zn</b>	36,21 $\pm$ 2,20	33,91 $\pm$ 0,94	33,00 $\pm$ 1,00	34,00 $\pm$ 0,00
<b>Pb</b>	0,77 $\pm$ 0,68	NA	0,07 $\pm$ 0,01	NA
<b>Se</b>	0,15 $\pm$ 0,04	NA	0,10 $\pm$ 0,10	NA
<b>Br</b>	2,57 $\pm$ 1,51	5,44 $\pm$ 0,3	NA	11,00 $\pm$ 1,00
<b>Rb</b>	24,23 $\pm$ 2,59	22,59 $\pm$ 0,44	18,00 $\pm$ 1,00	22,00 $\pm$ 1,00
<b>Sr</b>	1,82 $\pm$ 0,23	1,87 $\pm$ 0,16	2,10 $\pm$ 0,10	NA

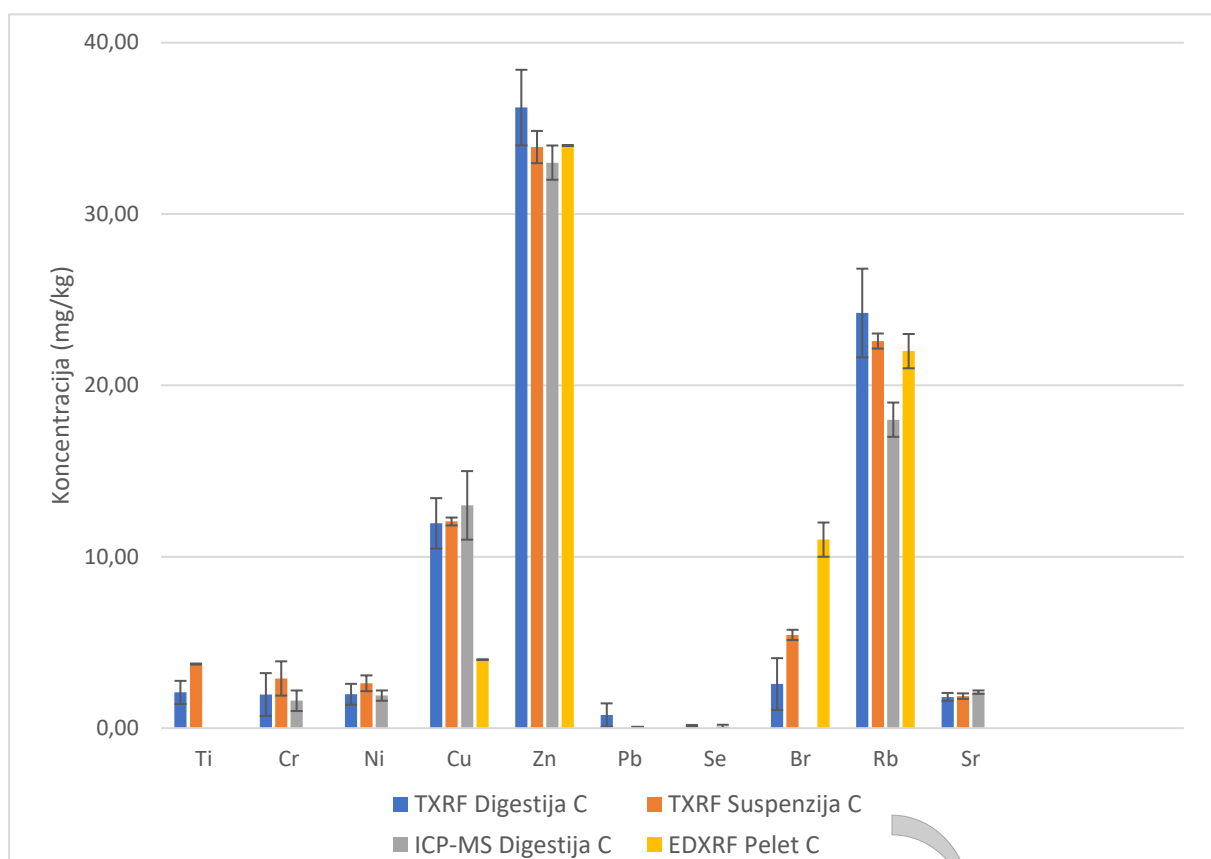
NA – nije detektirano

Tablica 9. Koncentracije elemenata (mg/kg) u uzorcima stabljike smilja određene različitim analitičkim tehnikama (TXRF, ICP-MS, EDXRF) i metodama pripreme uzoraka za analizu. Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

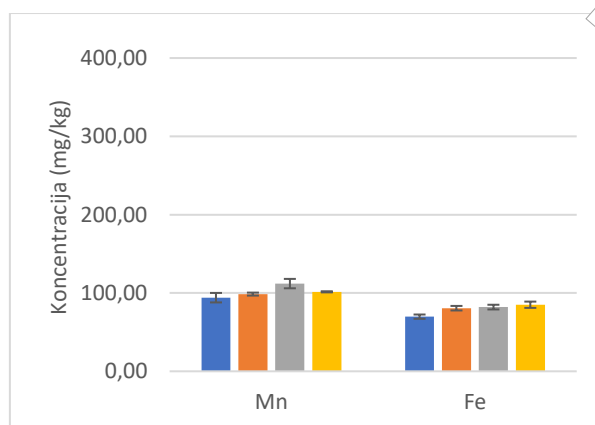
(mg/kg)			
Element	TXRF	ICP-MS	EDXRF
	S – digestija	S – digestija	Pelet
<b>Ti</b>	1,40 $\pm$ 0,60	NA	NA
<b>Cr</b>	1,40 $\pm$ 0,23	1,30 $\pm$ 0,20	5,00 $\pm$ 7,10
<b>Mn</b>	63,34 $\pm$ 1,14	79,00 $\pm$ 1,00	71,00 $\pm$ 0,00
<b>Fe</b>	53,29 $\pm$ 2,94	57,00 $\pm$ 5,00	78,50 $\pm$ 0,70
<b>Ni</b>	1,64 $\pm$ 0,59	1,10 $\pm$ 0,10	NA
<b>Cu</b>	7,60 $\pm$ 0,47	8,60 $\pm$ 0,20	3,50 $\pm$ 2,10
<b>Zn</b>	22,94 $\pm$ 0,36	19,00 $\pm$ 1,00	23,00 $\pm$ 1,00
<b>Pb</b>	0,33 $\pm$ 0, 10	0,13 $\pm$ 0,02	NA
<b>Se</b>	0,09 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,01	NA
<b>Br</b>	0,70 $\pm$ 0,19	NA	10 $\pm$ 0,00
<b>Rb</b>	4,50 $\pm$ 0,19	2,02 $\pm$ 0,08	5,00 $\pm$ 0,00
<b>Sr</b>	3,36 $\pm$ 0,01	4,30 $\pm$ 0,10	NA

NA – nije detektirano

a)



b)



Slika 15. a) usporedba sadržaja elemenata (mg/kg) u uzorcima cvijeta određenog primjenom različitih metoda pripreme uzorka i analitičkih tehnika; b) rezultati kvantifikacije Mn i Fe.

Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

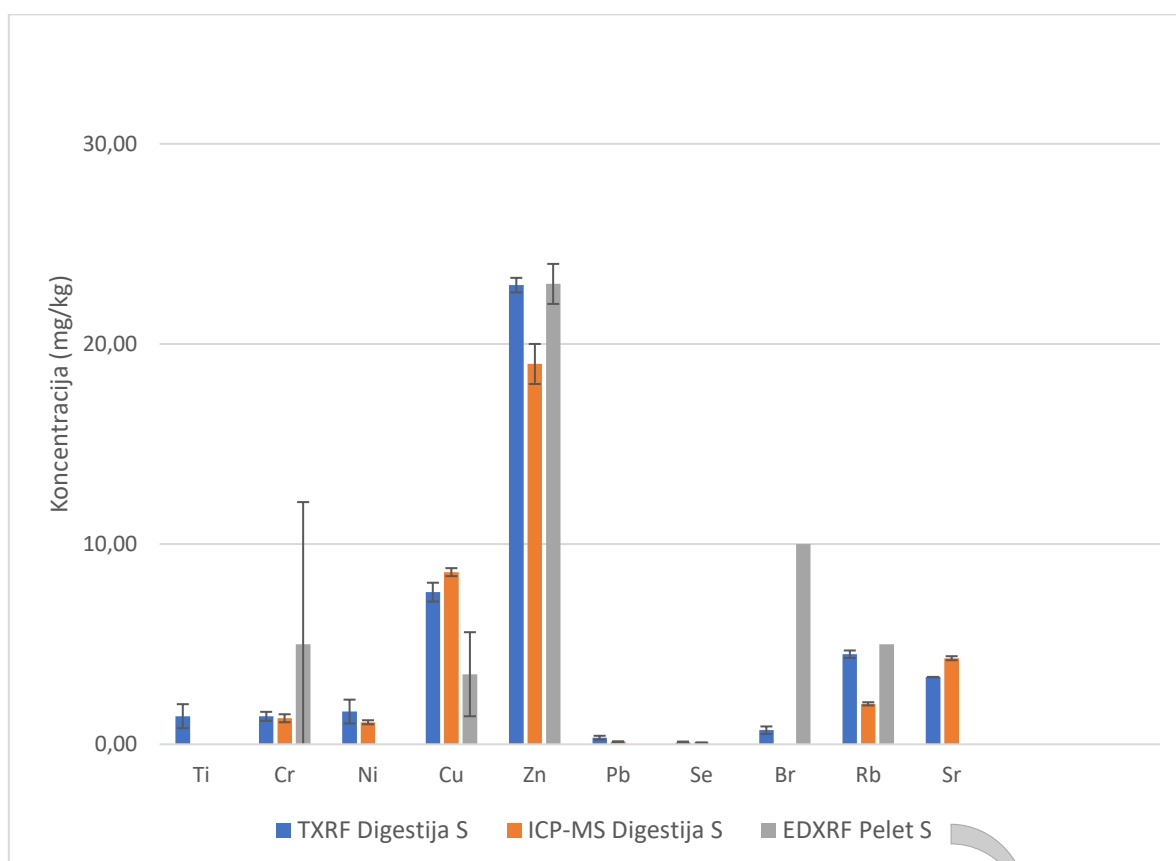
Grafički prikazi usporedbe koncentracija elemenata (mg/kg) u uzorcima cvijeta i stabljike smilja određenih primjenom različitih analitičkih tehnika prikazani su na Slici 15 (cvijet) i Slici 16 (stabljika) te kod većine ispitivanih elemenata nisu uočena statistički značajna odstupanja. Dobivene razlike u koncentracijama elemenata mogu se objasniti u različitoj mobilnosti elemenata unutar biljke, mineralnom sastavu tla na kojem je uzgajana, sposobnosti apsorpcije kao i nekim drugim antropogenim izvorima onečišćenja. Esencijalni elementi Mn i Fe prisutni su u najvećim koncentracijama u ispitivanim uzorcima što je u skladu s literaturnim podacima (Margui i sur., 2022; Kočevar Glavač i sur., 2017; Martin-Domingo i sur., 2017; Dalipi i sur., 2017; Ražić i sur., 2007; Ražić i sur. 2003). Apsorpcija elemenata putem korijenja ovisi o brojnim parametrima poput klimatskih uvjeta, kompleksnosti organskog matriksa biljne vrste te vrsti i kiselosti tla. U većem dijelu Dalmacije tlo je kiselo ( $\text{pH} < 5,5$ ), te su analogno tome u ispitivanim uzorcima pronađene visoke koncentracije esencijalnih elemenata koji su bolje topivi u kiselom mediju (Fe, Mn, Cu i Zn). Primjena biljnog materijala s visokim sadržajem Fe u izradi kozmetičkih pripravaka može imati dualni učinak. Poželjni učinci Fe u kozmetičkim pripravcima jesu protuupalno djelovanje, poticanje maturacije kolagena i ubrzanje procesa zacjeljivanja rana, no Fe kao i ostali teški metali može destabilizirati kozmetički pripravak što može dovesti do skraćivanja roka trajanja (Coger i sur., 2019). Frakcija određenog Mn vrlo je vjerojatno endogenog podrijetla budući da Mn sudjeluje u fotosintezi, ali visoka koncentracija također može biti posljedica primjene pesticida ili kontaminacije tla pogonskim gorivima (Kočevar Glavač i sur., 2017). Sadržaj Cu u biljnom materijalu značajno ovisi o koncentraciji u tlu, a njegova translokacija iz korijena u druge biljne organe regulirana je endogenim transportnim mehanizmima. Optimalan unos Zn i Cu pridonosi održavanju integriteta cjelokupnog imunskog sustava te obrani organizma od slobodnih radikala (Vuković i sur., 2022). Kozmetički pripravci temeljeni na djelovanju Cu i Zn već su godinama prisutni na tržištu te se primjenjuju u svrhu liječenja kožnih infekcija i upala, a prisutnost ovih metala u smilju vrlo je interesantna u smislu postizanja sinergističkog antioksidativnog učinka sa sastavnicama eteričnog ulja i flavonoidima. Kvantitativna analiza uzoraka cvijeta pokazala je prisutnost Rb u koncentraciji  $> 20 \text{ mg/kg}$  (TXRF i EDXRF) što je očekivano s obzirom na to da je Rb esencijalan za biljne organizme. U uzorcima stabljike koncentracija Rb bila je  $< 5 \text{ mg/kg}$ . Esencijalnost Rb u ljudi nije dokazana, kao ni potencijalna toksičnost uslijed akumulacije u tkivima. U uzorcima cvijeta i stabljike dokazana je prisutnost Br, Sr, Cr i Ni.

Dobiveni rezultati pokazali su dobro slaganje te ukazuje da u ovom slučaju postupak pripreme uzorka ne utječe značajno na rezultate mjerenja kao ni primijenjena tehnika. Male razlike u izmjerenim koncentracijama najvjerojatnije je moguće pripisati nehomogenosti suspendiranih

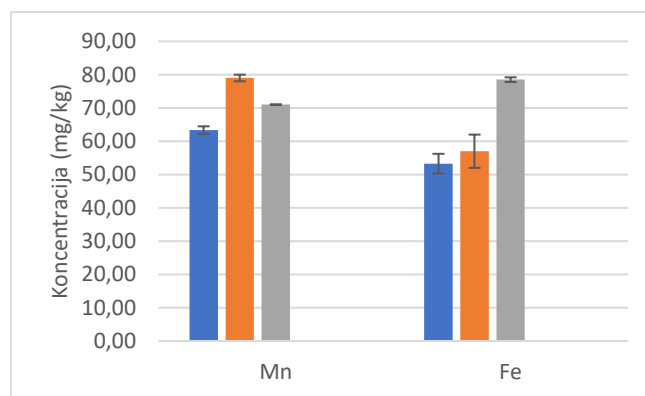
čestica te različitoj osjetljivosti analitičkih tehnika za pojedini element. Najveća odstupanja primijećena su u rezultatima EDXRF analize što je očekivano s obzirom na manju osjetljivost i selektivnost u odnosu na sofisticiranije tehnike (TXRF i ICP-MS). Rezultati ove analize pokazuju veliki potencijal multielementne TXRF analize uzoraka kompleksnog matriksa bez prethodne složene kemijske obrade. Za pripremu uzoraka metodom suspenzije potrebno je kraće vrijeme, manja količina uzorka te manja potrošnja reagensa. Mikrovalna digestija omogućava u potpunosti razaranje organskog matriksa, ali glavni nedostatak ovog načina pripreme uzorka je velika potrošnja koncentriranih kiselina te dugotrajniji postupak. Također, TXRF tehnika ne zahtjeva primjenu plinova niti sustava za hlađenje za razliku od ICP-MS što je čini ekonomski i ekološki isplativijom metodom. Glavni nedostatak ove metode pripreme uzorka je što se teško postiže tanak sloj na nosaču uzorka što je vrlo važan parametar TXRF analize.

Analiza EDXRF i TXRF tehnikom provodi se u skladu s načelima „zelene kemije“ – prevenira nastanak kemijskog otpada, ne koristi kemikalije štetne za okoliš, smanjuje uporabu tvari koje mogu imati štetne posljedice kako za okoliš tako i za ljude.

a)



b)



Slika 16. a) usporedba sadržaja elemenata (mg/kg) u uzorcima stabljike određenog primjenom različitih metoda pripreme uzorka i analitičkih tehnika; b) rezultati kvantifikacije Mn i Fe. Svaki rezultat je srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD.

### 4.2.1. Translokacijski indeks

Indeks translokacije, Ti, mjera je sposobnosti fitoekstrakcije biljaka koja prvenstveno ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama biljaka što može pogodovati procesu bioadsorpcije i također na njihova biološka svojstva kao što su mehanizmi transporta metala i tolerancija na toksične metale koji su uključeni u proces bioakumulacije. Vrijednost Ti ukazuje na mogućnost translokacije metala od korijena do nadzemnih dijelova biljaka pri čemu stupanj translokacije metala ovisi prvenstveno o vrsti metala kao i tlu na kojem raste biljka.

U ovom radu prikazan je Ti koji ukazuje na mogućnost translokacije elemenata iz stabljike u cvijet smilja. Dobiveni rezultati Ti za ispitivane metale prikazani su u Tablici 10. Svi ispitivani metali imaju nizak Ti osim Rb što je u skladu i s rezultatima bioakumulacijskog faktora (rezultati nisu prikazani u ovom radu). Rezultati ispitivanja jasno pokazuju da količine metala koji prelaze sa stabljike na cvijet nisu značajne.

Tablica 10. *Translokacijski indeks(%) pojedinih metala iz stabljike u cvijet smilja.*

<b>Element</b>	<b>Translokacijski indeks (%) Cvijet/stabljika (63 µm)</b>
[Se] ng/g	NA
[As] ng/g	1,25
[Ti] ng/g	<24
[Cr] µg/g	1,2307
[Mn] µg/g	1,4177
[Ni] µg/g	1,7272
[Fe] µg/g	1,4386
[Cu] µg/g	1,5116
[Zn] µg/g	1,7368
[Rb] µg/g	8,9077
[Sr] µg/g	0,4884
[Ba] µg/g	0,5134
[Pb] µg/g	0,5385

NA – nije detektirano

## 5. ZAKLJUČCI

---

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je aromatična cvjetnica koja uspijeva na sušnom i kamenitom području Mediterana te kao takva obiluje eteričnim uljem i sekundarnim metabolitima s antimikrobnim, protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem. Zbog navedenih ljekovitih karakteristika smilje se od davnina primjenjuje u terapijske svrhe stoga je monitoring sadržaja elemenata u biljnom materijalu i njegovim derivatima vrlo važan za očuvanje zdravlja ljudi.

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave u ovom istraživanju doneseni su sljedeći zaključci:

- EDXRF i TXRF su jednostavne, pouzdane i brze analitičke tehnike za određivanje sadržaja metala u biljnom materijalu.
- Priprema uzorka u obliku suspenzije u odnosu na mikrovalnu digestiju je više u skladu s načelima zelene kemije. Metoda suspenzije je brža i jeftinija, potrebna je manja količina uzorka te manja potrošnja reagensa, a dobiveni rezultati analize uzoraka nisu se značajno razlikovali od uzoraka pripremljenih mikrovalnom digestijom. Glavni nedostatak ove metode pripreme uzorka je što se teško postiže tanak sloj na nosaču uzorka što je vrlo važan parametar TXRF analize.
- TXRF se pokazala kao dobra komplementarna i/ili alternativna analitička tehnika uobičajenim tehnikama analize koje zahtijevaju prethodnu digestiju uzorka.
- Dobiveni rezultati pokazali su dobro slaganje što dovodi do zaključka da u ovom slučaju postupak pripreme uzorka ni primijenjena tehnika ne utječe značajno na rezultate mjerenja.
- Određeni Ti pokazao je malu translokaciju metala iz stabljike u cvijet osim u slučaju Rb.



## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

---

**CPS** (eng. counts per second) – jedinice po sekundi

**CRM** (eng. certified reference material) – certificirani referentni materijal

**EDXRF** (eng. energy dispersive X-ray fluorescence) – Energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija

**FAAS** (eng. flame atomic absorption spectrometry) – Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija

**GFAAS** (eng. graphite furnace atomic absorption spectrometry) – Grafitna atomska apsorpcijska spektrometrija

**GTF** (eng. glucose tolerance factor) – faktor tolerancije glukoze

**ICP-MS** (eng. inductively coupled plasma mass spectrometry) – Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom

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

**IS** (eng. internal standard) – unutarnji standard

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

**NAA** (eng. neutron activation analysis) – Analiza aktivacije neutrona

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

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

## 7. LITERATURA

---

Anderson RA, Mertz W. Glucose tolerance factor: an essential dietary agent. *Trends Biochem Sci*, 1977, 2(12), 277-279.

Andjić M, Božin B, Draginić N, Kočović A, Jeremić JN, Tomović M, Bradić JV. Formulation and evaluation of helichrysum italicum essential oil-based topical formulations for wound healing in diabetic rats. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8), 813.

Baffi C, Bettinelli M, Beone GM, Spezia S. Comparison of different analytical procedures in the determination of trace elements in lichens. *Chemosphere*, 2002, 48(3), 299-306.

Beck MA, Levander OA, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr*, 2003, 133(5), 1463S-1467S.

Bilandžija L, Bilandžija B, Pollak L, Inić S. Kemijski sastav, biološka aktivnost i primjena smilja u medicini i farmaciji. *Farm Glas*, 2022, 78(5-6), 229-248.

Bilo F, Borgese L, Zacco A, Lazo P, Zoani C. Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy to Evaluate Heavy Metals Accumulation in Legumes by HPTLC Method. *J Anal Bioanal Tech*, 2015, 7(292), 2.

Brouwer P. Theory of XRF. Almelo, Netherlands: PANalytical BV, 2006, str. 7.

Coger V, Million N, Rehbock C, Sures B, Nachev M, Barcikowski S, Vogt PM. Tissue concentrations of zinc, iron, copper, and magnesium during the phases of full thickness wound healing in a rodent model. *Biol Trace Elem Res*, 2019, 191(1), 167-176.

Dalipi R, Marguí E, Borgese L, Depero LE. Multi-element analysis of vegetal foodstuff by means of low power total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Food Chem*, 2017, 218, 348-355.

de Almeida E, Montanha GS, de Carvalho HWP, Marguí E. Evaluation of energy dispersive X-ray fluorescence and total reflection X-ray fluorescence spectrometry for vegetal mass-limited sample analysis: Application to soybean root and shoots. *Spectrochim Acta Part B*, 2020, 170, 105915.

Fernández-Ruiz R. Three empirical cases of the deposition morphology influence in the analytical quality of direct solid suspension measurements by total-reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim Acta Part B*, 2009, 64(7), 672-678.

Gallardo H, Queralt I, Tapias J, Candela L, Margui E. Bromine and bromide content in soils: Analytical approach from total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Chemosphere*, 2016, 156, 294-301.

Kladar NV, Anačkov GT, Rat MM, Srđenović BU, Grujić NN, Šefer EI, Božin BN. Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chem Biodiversity*, 2015, 12(3), 419-431.

Klockenkämper R, von Bohlen A. Fundamentals of X-ray fluorescence, New Jersey, John Wiley & Sons, 2015, str. 13.

Kočevar Glavač N, Djogo S, Ražić S, Kreft S, Veber M. Accumulation of heavy metals from soil in medicinal plants. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2017, 68(3), 236-244.

Kramberger K, Kenig S, Jenko Pražnikar Z, Kočevar Glavač N, Barlič-Maganja D. A Review and Evaluation of the Data Supporting Internal Use of *Helichrysum italicum*. *Plants*, 2021, 10, 1738.

Maksimovic S, Tadic V, Skala D, Zizovic I. Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry*, 2017, 138, 9-28.

Marguí E, Dalipi R, Sangiorgi E, Bival Štefan M, Sladonja K, Rogga V, Jablan J. Determination of essential elements (Mn, Fe, Cu and Zn) in herbal teas by TXRF, FAAS and ICP-OES. *Xray Spectrom*, 2022, 51(3), 204-213.

Marguí E, Jablan J, Queralt I, Bilo F, Borgese L. Potential of total-reflection X-ray spectrometry for multielement analysis of biological samples using dilution or suspension sample preparation techniques. *Xray Spectrom*, 2022, 51(3), 230-240.

Marguí E, Voutchkov M. Multielement analysis of tea and mint infusions by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Food Anal Methods*, 2018, 11(1), 282-291.

Martín-Domingo MC, Pla A, Hernández AF, Olmedo P, Navas-Acien A, Lozano-Paniagua D, Gil F. Determination of metalloid, metallic and mineral elements in herbal teas. Risk assessment for the consumers. *J Food Compos Anal*, 2017, 60, 81-89.

Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 17(6), 517-520.

Poli F, Muzzoli M, Sacchetti G, Tassinato G, Lazzarin R, Bruni A. Antioxidant activity of supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Helichrysum italicum*. *Pharm Biol*, 2003, 41(5), 379-383.

Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooge M, Abitbol V, Leblanc S, Prat F, Chaussade S. Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis*, 2013, 45, 803-809.

Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, 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.

Rajić M, Bilić M, Aladić K, Šimunović D, Pavković T, Jokić S. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja. *Glas Zašt Bilja*, 2015, 38(6), 16-26.

Ražić S, Đogo S, Slavković L. Investigation on bioavailability of some essential and toxic elements in medicinal herbs. *J Nat Med*, 2008, 62(3), 340-344.

Ražić S, Onjia A, Đogo S, Slavković L, Popović A. Determination of metal content in some herbal drugs – Empirical and chemometric approach. *Talanta*, 2005, 67(1), 233-239.

Ražić, S, Onjia A, Potkonjak B. Trace elements analysis of *Echinacea purpurea* – herbal medicinal. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(4), 845-850.

Sharma RK, Agrawal M. Biological effects of heavy metals: an overview. *J Environ Biol*, 2005, 26(2), 301-313.

Usuda K, Kono R, Ueno T, Ito Y, Dote T, Yokoyama H, Tamaki, J. Risk assessment visualization of rubidium compounds: comparison of renal and hepatic toxicities, in vivo. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 159(1), 263-268.

Viegas DA, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1), 54-65.

Vuković L, Maleš Ž, Barišić K, Ilijaš A, Verbanac D. Određivanje cinka, bakra i selena u pseudožitaricama metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom. *Farm Glas*, 2022, 78(5-6), 219-227.

Wilschefski SC, Baxter MR. Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects. *Clin Biochem Rev*, 2019, 40(3), 115.

Wobrauschek P. Total reflection x-ray fluorescence analysis – a review. *Xray Spectrom*, 2007, 36(5), 289-300.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

---

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je mediteranska cvjetnica koja se zbog svojih ljekovitih i aromatičnih svojstava koristi za izradu farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka. Razvoj brze i osjetljive tehnike elementne analize biljnog materijala mogao bi značajno doprinijeti kakvoći i stabilnosti pripravaka te smanjiti nepotrebno izlaganje potencijalno toksičnim teškim metalima. Konvencionalne tehnike elementne analize skupe su, dugotrajne i zahtijevaju prethodnu razgradnju složenog biljnog matriksa. TXRF je mlada analitička tehnika koja vodi brigu o načelima „zelene kemije“, zahtjeva male količine uzorka i reagensa, a omogućava brzu i osjetljivu analizu stoga bi se mogla primjenjivati i u rutinskim analizama. Cilj ovog rada bila je usporedba rezultata dobivenih određivanjem sadržaja elemenata (Fe, Mn, Ti, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Se, Rb i Sr) prisutnih u uzorcima smilja primjenjujući različite analitičke metode pripreme uzoraka (suspenzija, mikrovalna digestija i pelet) i analitičke tehnike (TXRF, EDXRF i ICP-MS). Dobiveni rezultati pokazali su kako primijenjene tehnike kao ni različite metode pripreme uzoraka ne utječu značajno na rezultate analize. Pritom se TXRF pokazala kao dobra alternativna analitička tehnika budući da omogućava identifikaciju i kvantifikaciju vrlo niskih koncentracija elemenata prisutnih u uzorku bez prethodne složene kemijske obrade.

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) is a Mediterranean flowering plant that, due to its medicinal and aromatic properties, is used to make pharmaceutical and cosmetic preparations. The development of a fast and sensitive technique for elemental analysis of plant material could contribute significantly to the quality and stability of preparations and reduce unnecessary exposure to potentially toxic heavy metals. Conventional elemental analysis techniques are expensive, time-consuming and require prior decomposition of the complex plant matrix. TXRF is a young analytical technique that incorporates the principles of "green chemistry", requires small amounts of samples and reagents, and provides fast and sensitive analysis, so that it could be used in routine analyses.

The aim of this work was to compare the results obtained by determining the content of elements (Fe, Mn, Ti, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Se, Rb and Sr) present in immortelle samples using different analytical methods of sample preparation (suspension, microwave digestion and pellet) and analytical techniques (TXRF, EDXRF and ICP-MS). The obtained results showed that the techniques used as well as the different sample preparation methods did not significantly affect the analytical results. Thus, TXRF proved to be a good alternative analytical technique, since it allows the identification and quantification of very low concentrations of the elements present in the sample without prior complex chemical processing.

## **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

### ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA U CVIJETU I STABLJICI SMILJA PRIMJENOM EDXRF, TXRF I ICP-MS TEHNIKE

**EMA ŠTEFANKO**

#### SAŽETAK

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je mediteranska cvjetnica koja se zbog svojih ljekovitih i aromatičnih svojstava koristi za izradu farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka. Razvoj brze i osjetljive tehnike elementne analize biljnog materijala mogao bi značajno doprinijeti kakvoći i stabilnosti pripravaka te smanjiti nepotrebno izlaganje potencijalno toksičnim teškim metalima. Konvencionalne tehnike elementne analize skupe su, dugotrajne i zahtijevaju prethodnu razgradnju složenog biljnog matriksa. TXRF je mlada analitička tehnika koja vodi brigu o načelima „zelene kemije“, zahtjeva male količine uzorka i reagensa, a omogućava brzu i osjetljivu analizu stoga bi se mogla primjenjivati i u rutinskim analizama. Cilj ovog rada bila je usporedba rezultata dobivenih određivanjem sadržaja elemenata (Fe, Mn, Ti, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Se, Rb i Sr) prisutnih u uzorcima smilja primjenjujući različite analitičke metode pripreme uzoraka (suspenzija, mikrovalna digestija i pelet) i analitičke tehnike (TXRF, EDXRF i ICP-MS). Dobiveni rezultati pokazali su kako primijenjene tehnike kao ni različite metode pripreme uzoraka ne utječu značajno na rezultate analize. Pritom se TXRF pokazala kao dobra alternativna analitička tehnika budući da omogućava identifikaciju i kvantifikaciju vrlo niskih koncentracija elemenata prisutnih u uzorku bez prethodne složene kemijske obrade.

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

Rad sadrži: 42 stranica, 16 grafičkih prikaza, 10 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: smilje, TXRF, EDXRF, ICP-MS

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Jerka Dumić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 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

### DETERMINATION OF METAL CONTENT IN IMMORTELLE FLOWER AND STEM USING EDXRF, TXRF AND ICP-MS TECHNIQUES

**Emma Štefanko**

#### SUMMARY

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) is a Mediterranean flowering plant that, due to its medicinal and aromatic properties, is used to make pharmaceutical and cosmetic preparations. The development of a fast and sensitive technique for elemental analysis of plant material could contribute significantly to the quality and stability of preparations and reduce unnecessary exposure to potentially toxic heavy metals. Conventional elemental analysis techniques are expensive, time-consuming and require prior decomposition of the complex plant matrix. TXRF is a young analytical technique that incorporates the principles of "green chemistry", requires small amounts of samples and reagents, and provides fast and sensitive analysis, so that it could be used in routine analyses. The aim of this work was to compare the results obtained by determining the content of elements (Fe, Mn, Ti, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Se, Rb and Sr) present in immortelle samples using different analytical methods of sample preparation (suspension, microwave digestion and pellet) and analytical techniques (TXRF, EDXRF and ICP-MS). The obtained results showed that the techniques used as well as the different sample preparation methods did not significantly affect the analytical results. Thus, TXRF proved to be a good alternative analytical technique, since it allows the identification and quantification of very low concentrations of the elements present in the sample without prior complex chemical processing.

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

Thesis includes: 42 pages, 16 figures, 10 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: immortelle, TXRF, EDXRF, ICP-MS

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

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jerka Dumić, Ph.D.** *Full 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: August 2022.