

Analitičke metode dokazivanja teških metala u biljnim materijalima

Radan, Anđela

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:061443>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ANALITIČKE METODE DOKAZIVANJA TEŠKIH METALA U
BILJNIM MATERIJALIMA**

ZAVRŠNI RAD

ANĐELA RADAN

Matični broj: 378

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ
KEMIJA

**ANALITIČKE METODE DOKAZIVANJA TEŠKIH METALA U
BILJNIM MATERIJALIMA**

ZAVRŠNI RAD

ANĐELA RADAN

Matični broj: 378

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
BACHELOR STUDY OF
CHEMISTRY

**ANALYTHIC METHODS OF HEAVY METALS DETERMINATION IN
PLANT MATERIALS**

BACHELOR THESIS

ANĐELA RADAN

Parent number: 378

Split, September 2020.

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Studij kemije

Znanstveno područje: kemija
Znanstveno polje: analitička kemija

Tema rada je prihvaćena na 20. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Josipa Giljanović

Pomoć pri izradi:

ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA TEŠKIH METALA U BILJNIM MATERIJALIMA

Andela Radan, 378

Sažetak:

U prirodi su prisutne veće koncentracije teških metala čiji uzrok možemo tražiti u prirodi ili antropogenom djelovanju. Teški metali su, po definiciji, elementi gustoće veće od 5 g/cm^3 . Dok neki mogu biti osnovni nutrijenti, ostali mogu biti otrovni. Oni u ljudskom organizmu izazivaju razne poremećaje karcinogene i nekarcinogene prirode, a može doći do trovanja konzumiranjem hrane biljnog podrijetla. Kroz zakonsku regulativu je propisana dozvoljena količina teških metala u istoj. Do apsorpcije i skladištenja teških metala iz tla u biljke dolazi putem niza transportnih mehanizama koji inače služe za apsorpciju mikronutrijenata. Različite biljne vrste imaju i različita apsorpcijska svojstva, radi čega je važno definirati faktor prijenosa koji označava odnos koncentracije teških metala u biljkama i one u odgovarajućem tlu. Da bi ga odredili u istraživanju je važno uzeti u obzir i analizu tla koja je, kao i analiza biljnih materijala, propisana određenim protokolima koji slijede iz zakonske regulative. Priprema uzoraka se može odvijati na dva načina: mokrim i suhim razaranjem, od kojih obje imaju svoje prednosti i nedostatke. Pripremljeni uzorci dalje se analizira različitim instrumentnim tehnikama, najčešće AAS - om, ICP - MS - om, ICP - AES - om ili HG - AFS - om.

Ključne riječi: teški metali, dozvoljene količine, ICP - MS, ICP - AES, HG - AFS, AAS

Rad sadrži: 34 stranice, 15 slika, 1 graf, 7 tabela, 32 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ante Prkić - predsjednik
2. red. prof. dr. sc. Marija Bralić - član
3. red. prof. dr. sc. Josipa Giljanović - član-mentor

Datum obrane: (23. rujna 2020.)

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Study chemistry

Scientific area: chemistry

Scientific field: analytical chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology,
session no. 20.

Mentor: PhD, full prof., Josipa Giljanović

Technical assistance:

ANALYTIC METHODS OF HEAVY METALS DETERMINATION IN PLANT MATERIALS

Andela Radan, 378

Abstract:

Higher concentrations of heavy metals are present in nature, the cause of which can be found in nature or anthropogenic activity. Heavy metals are, by definition, elements with a density greater than 5 g / cm^3 . While some can be essential nutrients, others can be toxic. They cause various disorders of carcinogenic and non-carcinogenic nature in the human body, and poisoning can occur by consuming food of plant origin. The legal regulations prescribe the permitted amount of heavy metals in it. The absorption and storage of heavy metals from the soil into plants occurs through a series of transport mechanisms that otherwise serve to absorb micronutrients. Different plant species also have different absorption properties, which is why it is important to define a transfer factor that indicates the ratio of the concentration of heavy metals in plants and those in the corresponding soil. In order to determine it, it is important to take into account the analysis of the soil, which, as well as the analysis of plant materials, is prescribed by certain protocols and the regulations. Sample preparation can be performed in two ways: wet and dry destruction, both of which have their advantages and disadvantages. The prepared samples can be analysed by different instrumental techniques such as AAS, ICP - MS, ICP - AES or HG - AFS.

Keywords: heavy metals, permitted amount, ICP - MS, ICP - AES, HG - AFS, AAS

Thesis contains: 34 pages, 15 figures, 1 graph, 7 tables, 32 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Ante Prkić - PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Marija Bralić - PhD, full prof. | member |
| 3. Josipa Giljanović - PhD, full prof. | supervisor |

Defence date: (September 23 2020)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is disposed in the library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

Završni rad je izrađen u Zavodu analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Josipa Giljanović, u razdoblju od lipnja do rujna 2020. godine

ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Josipi Giljanović na pomoći oko izrade završnog rada.
Zahvaljujem se i Sandru Radanu na korisnim uputama pri izradi.*

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada je opisati postupak uzorkovanja, obrade i analize u uzoraku biljnih materijala u svrhu određivanja teških metala raznim analitičkim metodama.

SAŽETAK

U prirodi su prisutne veće koncentracije teških metala čiji uzrok možemo tražiti u prirodi ili antropogenom djelovanju. Teški metali su, po definiciji, elementi gustoće veće od 5 g/cm^3 . Dok neki mogu biti osnovni nutrijenti, ostali mogu biti otrovni. Oni u ljudskom organizmu izazivaju razne poremećaje karcinogene i nekarcinogene prirode, a može doći do trovanja konzumiranjem hrane biljnog podrijetla. Kroz zakonsku regulativu je propisana dozvoljena količina teških metala u istoj. Do apsorpcije i skladištenja teških metala iz tla u biljke dolazi putem niza transportnih mehanizama koji inače služe za apsorpciju mikronutrijenata. Različite biljne vrste imaju i različita apsorpcijska svojstva, radi čega je važno definirati faktor prijenosa koji označava odnos koncentracije teških metala u biljkama i one u odgovarajućem tlu. Da bi ga odredili u istraživanju je važno uzeti u obzir i analizu tla koja je, kao i analiza biljnih materijala, propisana određenim protokolima prema odgovarajućoj zakonskoj regulativi. Priprema uzoraka se može odvijati na dva načina: mokrim i suhim razaranjem, od kojih obje imaju svoje prednosti i nedostatke. Pripremljeni uzorci se analiziraju različitim instrumentnim tehnikama kao što su: AAS - om, ICP - MS - om, ICP - AES - om ili HG - AFS - om.

Ključne riječi: teški metali, dozvoljene količine, ICP - MS, ICP - AES, HG - AFS, AAS

SUMMARY

Higher concentrations of heavy metals are present in nature, the cause of which can be found in nature or anthropogenic activity. Heavy metals are, by definition, elements with a density greater than 5 g / cm^3 . While some can be essential nutrients, others can be toxic. They cause various disorders of carcinogenic and non-carcinogenic nature in the human body, and poisoning can occur by consuming food of plant origin. The legal regulations prescribe the permitted amount of heavy metals in it. The absorption and storage of heavy metals from the soil into plants occurs through a series of transport mechanisms that otherwise serve to absorb micronutrients. Different plant species also have different absorption properties, which is why it is important to define a transfer factor that indicates the ratio of the concentration of heavy metals in plants and those in the corresponding soil. In order to determine it, it is important to take into account the analysis of the soil, which, as well as the analysis of plant materials, is prescribed by certain protocols and regulations. Sample preparation can be performed in two ways: wet destruction and dry destruction, both of which have their advantages and disadvantages. The prepared samples can be analysed by different instrumental techniques such as AAS, ICP - MS, ICP - AES or HG - AFS.

Keywords: heavy metals, permitted amount, ICP - MS, ICP - AES, HG - AFS, AAS

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Teški metali..... | 1 |
| 1.1.1. Arsen | 1 |
| 1.1.2. Olovo | 2 |
| 1.1.3. Živa | 3 |
| 1.2. Mehanizam apsorpcije teških metala u biljke | 3 |
| 1.3. Otrovnost..... | 5 |
| 1.4. Dozvoljenje količine | 5 |
| 1.5. Analiza uzorka..... | 7 |
| 1.5.1. Opće odredbe..... | 8 |
| 1.5.2. Metode uzorkovanja | 8 |
| 1.5.3. Uzorkovanje tla | 10 |
| 1.5.4. Sakupljanje biljnog materijala | 12 |
| 1.5.5. Priprava uzorka i analiza..... | 13 |
| 1.5.5.1. Priprava uzorka | 13 |
| 1.5.5.2. Metode analize | 13 |
| 1.5.5.3. Izvješće | 16 |
| 2. Materijali i metode..... | 17 |
| 2.1. Načini pripreme biljnih uzoraka..... | 17 |
| 2.1.1. Postupak mokrog razaranja..... | 17 |
| 2.1.2. Postupak suhog razaranja | 18 |
| 2.2. Metodologija | 19 |
| 2.2.1. Induktivno spregnuta plazma s masenim spektrometrom (ICP - MS)..... | 19 |
| 2.2.2. Induktivno spregnuta plazma s atomskom emisijskom spektroskopijom (ICP - AES) | 22 |
| 2.2.3. HG - AFS..... | 24 |
| 2.2.4. AAS | 25 |
| 3. Rezultati i rasprava..... | 30 |
| 4. Zaključak..... | 32 |
| 5. Literatura..... | 33 |

1. Uvod

Teški metali se smatraju jednim od glavnih izvora onečišćenja okoliša te znatno utječu na ekosistem. Uzroci pojavljivanja mogu biti antropogeni i prirodni. Uzrok zagađivanja okoliša teškim metalima može biti rudarstvo, operacije taljenja, ispušni plinovi iz industrija, korištenje umjetnih gnojiva, otpadne vode iz kanalizacija, prerada fosilnih ulja, proizvodnja baterija, ispušni plinovi iz automobila, aditivi za motorna goriva na bazi organskih spojeva s olovom (koji su već neko vrijeme zabranjeni), kadmij u akumulatorima i karburatorima te ostale ljudske aktivnosti. Prirodni načini onečišćenja uključuju prisustvo matičnih materijala i utjecaj topografije. Dugotrajne rudarske aktivnosti, transportiranje ruda, čestice prašine i slične aktivnosti su uzrokovale ispiranje teških metala pod određenim uvjetima. Ispiranje teških metala je uzrokovalo ozbiljno obogaćivanje obližnjih farma, tla i biljaka. Ulazak u ljudsko tijelo je posljedica konzumiranja zagađene hrane, povrća, no velikim dijelom je uzrok i udisanje zagađenog zraka.

Kod biljaka, koje rastu na tlu zagađenom teškim metalima, se javlja smanjena razina rasta kao posljedica promjena u fiziološkim i biokemijskim procesima. Time se smanjuje i godišnji prinos usjeva čime dolazi do smanjenja proizvodnje hrane^[1].

1.1. Teški metali

Velika gustoća se (gustoća veća od 5 g/cm^3) smatra osnovnim kriterijem za razlikovanje teških metala. Neki teški metali mogu biti jedni od osnovnih nutrijenata (željezo, kobalt, cink) ili relativno bezopasni (indij, srebro), ali mogu biti i otrovni (kadmij, živa, olovo). Teški metali su manje reaktivni te, u manjem omjeru, stvaraju topljive sulfide i hidrokside.

1.1.1. Arsen

Arsen (As) je srebrno - sivi lomljiva kristalična krutina atomske mase 74,9, točke taljenja $817 \text{ }^\circ\text{C}$ (pri 28 atm) i vrelišta $613 \text{ }^\circ\text{C}$. On je polumetal koji je bez mirisa i okusa, može se javljati u različitim organskim i anorganskim spojevima. U prirodi se javlja kao spoj s kisikom i s klorom, a u anorganskom obliku sa sumporom. Anorganski spojevi arsena se najčešće koriste za očuvanje drveta dok se organski spojevi upotrebljavaju kao pesticidi, najčešće za biljke pamuka. Ima 4 oksidacijska broja (-3, 0, +3, +5), te se svi nalaze u prirodnim vodama i sedimentima. Dva najčešća oblika arsena u prirodnim vodama su arsenit (AsO_3^{3-}) i anorganski arsenat (AsO_4^{3-}). S biološkog i toksikološkog gledišta, jedinice arsena

se mogu podijeliti u 3 skupine: anorganske arsenske vrste, organske arsenske vrste i plin arsin. Trovalentni arsen je dominantan u djelomično reducirajućem okolišu. Najčešći oblici trovalentnog arsena je arsen trioksid, natrijev arsenit, arsen triklorid te niz hidroksida. Arsen je jako otrovan za ljude i ostala živa bića. Njegova otrovnost ovisi o obliku u kojem se nalazi. pH, redoks uvjetima, prisutnost minerala te aktivnosti mikroorganizama utječu na oblik (anorganskih i organskih) i oksidacijsko stanje arsena. Uglavnom su anorganski spojevi arsena otrovniji od organskih, tako su i spojevi arsena gdje je arsen trovalentan otrovniji od onih gdje je peterovalentan. Ioni As^{3+} su 4 do 10 puta topljiviji u vodi nego ion As^{5+} .

Sadržaj arsena u biljkama je obično znatno niži nego u zemljištu. Njegova koncentracija u suhom uzorku biljke je u prosjeku od 1 do 7 mg/kg. Nakupljanje je veće na kiselim zemljištima (posebice ako je $\text{pH} < 5$). Njegovo prisustvo ovisi i o tipu tla pa se tako veća koncentracija nalazi u pjeskovitim nego u težim zemljištima. Adsorpcijska svojstva i osjetljivost na arsen se razlikuje među vrstama biljaka. Najosjetljivije biljke su grah, plava djetelina, a najotpornije krumpir, rajčica i mrkva.

1.1.2. Olovo

Olovo (Pb) atomske mase 207,19 je srebrno - sivi metal temperature taljenja $327,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. U prirodi postoje četiri izotopa atomskih masa 208, 206, 207 i 204. Iako ima četiri elektrona u valentnoj ljusci, njegov najčešći oksidacijski broj je +2 umjesto +4, jer se samo dva od četiri elektrona lako ioniziraju. Osim nitrata, klorata i klorida većina anorganskih soli Pb^{2+} iona je loše topljivo u vodi. Olovo se javlja u mnogim oblicima u cijelom svijetu što ga čini najraširenijim metalnim elementom u tragovima. Olovo se pokazalo akutno toksičnim za ljude kada je prisutan u većim količinama. S obzirom da ioni Pb^{2+} nisu biorazgradivi, jednom kada se tlo onečisti njima, postaje trajan izvor iona Pb^{2+} . Olovo se akumulira u gornjih 20 cm zemlje i nepokretno je. Onečišćenje olovom je dugotrajno te bez sustavnog pristupa remedijaciji tla visoke koncentracije olova u zemlji se nikada neće vratiti na normalnu razinu.

Najčešći izvor zagađenja olovom su motorna vozila. U prošlosti su se koristili razni aditivi za goriva koji su sadržavali velike količine olova. Akumulacija olova u biljkama ovisi o obliku u kojem se olovo javlja. Anorganski oblik olova se teško akumulira i transportira iz zemlje u nadzemne organe. Organski spojevi olova, se za razliku od anorganskih, jako brzo akumuliraju i transportiraju u biljnim tkivima. Olovo u većim koncentracijama inhibira rast korjena i listova te proces fotosinteze. Otkriveno je da pšenica i soja imaju relativno visoku toleranciju prema olovu, dok se špinat ubraja u osjetljive biljke. Koncentracija kod te biljne vrste je oko 10 mg/kg suhog uzorka.

1.1.3. Živa

Živa (Hg) je metal koji se prirodno pojavljuje u nekoliko oblika. Metalna živa je svjetlucava, srebrno - bijela tekućina bez mirisa. Živa reagira sa sumporom, klorom ili kisikom te formira anorganske spojeve žive ili soli koje se javljaju kao bijeli prah ili bijeli kristalići. Javlja se i u organskim spojevima kada se povezuje s ugljikom. S obzirom da je jedini tekući metal s niskom temperaturom vrelišta (357 °C) važan je materijal u kemijskoj industriji. Kao i svaki drugi metal, živa se nalazi u prirodi u više oblika. Javljaju se kao disocirani ioni ili kao topljivi kompleksi. U prirodi se nalazu 3 topljiva oblika žive, najreduciraniji ioni Hg^0 , Hg_2^{2+} i Hg^{2+} . Ion Hg^+ nije stabilna u prirodi jer se lako razdvaja na ion Hg^0 i ion Hg^{2+} . Živa je stalni onečišćivač okoliša s karakteristikom bioakumulacije u ribi, životinjama i ljudima. Soli žive i živini organometalni spojevi su jedni od najotrovnijih spojeva u prirodi, čija toksičnost ovisi o vrsti spoja i oksidacijskom stanju žive unutar spoja. Pojavljivanje u okolišu može biti posljedica industrije, gnjojiva, fungicida, ali i nekih kućanskih otpada kao što su izbjeljivač, kiselina iz baterija, toplomjeri, barometri, zubna punjenja (amalgan), pesticidi, farmaceutski proizvodi (kozmetika, proizvodi za leće za vid, nazalni sprejevi...), deterdženti, tinta...

Biljke su uglavnom otporne na štetan utjecaj žive i živinih spojeva, no njeno prisustvo utječe na fotosintezu i oksidacijski metabolizam remeteći elektronski transportni lanac u kloroplastima i mitohondriju^[2].

Svi oblici žive su izuzetno otrovni za biljke i životinje. Akumulacija žive u korijenu je dvadeset puta veća nego u nadzemnim tkivima biljaka. Koncentracije žive u biljkama su u prosjeku od 10 do 200 ng/g suhog uzorka, a u blizini nalazišta žive od 500 do 3500 ng/g. Kod žita, koncentracija žive u zrnu je 3 do 10 puta veća nego u slami. Živa negativno djeluje na građu biomembrane i utječe na rad enzima.

1.2. Mehanizam apsorpcije teških metala u biljke

Biljke su razvile visokospecifični mehanizam primanja i pohranjivanja esencijalnih mikronutrijenata iz okoliša, čak i pri niskim ppm vrijednostima. Korijenje biljke, uz biljne kelatirajuće agense i pH promjene te redoks reakcije, je sposobno otopiti i primiti vrlo niske koncentracije mikronutrijenata iz okoliša. Biljke su također razvile i mehanizam translokacije i skladištenja mikronutrijenata. Ti isti mehanizmi primanja, translociranja i skladištenja utječu i na apsorpciju otrovnih elemenata. Mehanizam transporta funkcionira po principu protonskih pumpi, antitransportera i kanala. Biljke uglavnom ne pohranjuju elemente u tragovima ispod metabolički potrebne količine (od 10 do 15 ppm). Iznimka su *hiperakumulirajuće* biljke koje mogu akumulirati otrovne metalne ione u razinama od nekoliko tisuća ppm-ova. Te biljke

izbjegavaju otrovno djelovanje metalnih iona prvenstveno pohranjujući ih u vakuolama. Pojavom kapilarnosti, voda s otopljenim nutrijentima i otrovnim metalnim ionima se prenosu iz korijena u nadzemni dio biljke^[2].

Stoga se biljke mogu koristiti i u procesu obnove onečišćenih tla u postupku poznatog pod nazivom bioobnova. Iako je to blaga metoda obnove jako je dugotrajna te klimatski i geološki uvjeti utječu na izvođenje. Taj proces ne može uzrokovati raspad teških metala već ih prenosi iz jednog organskog kompleksa u drugi ili im mijenja oksidacijsko stanje. Promjenom oksidacijskog stanja metali mogu postati manje otrovni, lako isparljivi, topljiviji u vodi ili manje topljivi u vodi. Bioobnova se može provoditi uz pomoć mikroorganizama ili biljaka, ona provedena uz pomoć biljaka se naziva fitoobnovom. Fitoobnova uključuje razne mehanizme kao što su fitoekstrakcija, fitostabilizacija, fitoisparavanje. Fitoekstrakcija se najčešće upotrebljava, gdje se teški metali akumuliraju u korijenju biljaka koje se kasnije ukloni u potpunosti i spali. Biljke koje se koriste za fitoobnovu trebaju brzo rasti, imati veliku biomasu, proširivo korijenje i mogućnost akumulacije veće količine teških metala.^[1]

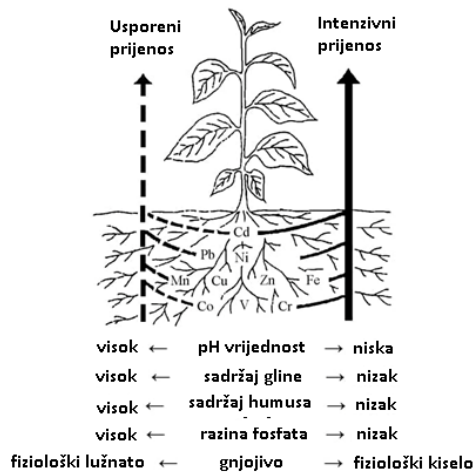
Biljke koje se koriste u svrhu fitoobnove dijele se u tri kategorije

1) Odstranjivači - vrste biljaka koje sprječavaju prijenos metala unutar korijena, koncentracija metala u nadzemnim dijelovima je manja nego u tlu

2) Akumulatori - vrste biljaka u kojima se metali akumuliraju u nadzemnim dijelovima, ne sprječavaju ulazak metala u korijen

3) Indikatori - vrste biljaka kod kojih su koncentracije metala razmjerne onima u tlu
Hiperakumulatori su biljke koje mogu akumulirati više od 1 mg/g (suhe mase) u nadzemnim organima. Danas se definiraju kao biljke koje mogu akumulirati i do 100 puta veće koncentracije teških metala od onih koje su inače prisutne u biljkama.

Ukupno postoji preko 500 vrsta hiperakumulirajućih biljaka iz oko 101 roda biljaka uključujući *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Cunouniaceae*, *Fabaceae*, *Flacourtiaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Violaceae* i *Euphobiaceae*. Najpoznatija hiperakumulirajuća biljka je *Thlaspi caerulescens* koja akumulira velike količine Zn (39600 mg/kg) i Cd (1800 mg/kg) bez vidljivih oštećenja^[3].



Slika 1. Prijenos teških metala iz tla u biljku^[4]

1.3. Otrovnost

Glavnom prijetnjom teških metala ljudskom zdravlju se smatra izlaganje olovu, kadmiju i živi. Kadmij može uzrokovati oštećenje bubrega te frakture kostiju^[5]. Metil živa je visokotoksičan za živčane stanice te se njegov utjecaj može uočiti u raznim organskim sustavima tokom životnog vijeka. Dugotrajno izlaganje olovu može uzrokovati pogoršanje pamćenja, produžiti trajanje biokemijskih reakcija i smanjiti sposobnost razumijevanja.

Kod biljaka prisustvo teških metala utječe na sadržaj klorofila, relativni sadržaj vode, karotenoida, askorbinske kiseline i pH^[6].

1.4. Dozvoljenje količine

Na tržište se ne smije postavljati hrana koja sadrži neprihvatljivu odnosno štetnu količinu kontaminata u hrani. Kontaminati su svaka tvar u hrani koja nije namjerno dodana već je rezultat antropogenog utjecaja na hranu u raznim fazama (onečišćenje okoliša, priprema, proizvodnja, obrada, skladištenje...). U ovom slučaju kontaminatima se smatraju samo metali, nitrati, metaloidi, mikotoksini. Hrana mora sadržavati što manju moguću količinu kontaminata. Na tržištu Republike Hrvatske zabranjeno je stavljati hranu koja sadrži veću količinu kontaminata od one najveće dozvoljene. Najveće dopuštene količine kontaminata se odnose samo na jestivi dio hrane. Dozvoljene količine kontaminata u hrani variraju s agregatnim stanjem i podrijetlom hrane. Najveće dopuštene količine teških metala u hrani biljnog podrijetla prikazane su u tabeli 1.^[7]

Tabela 1. Najveće dopuštene količine teških metala u hrani biljnog podrijetla^[7]

| Hrana | Najveće dopuštene količine (mg/kg mokre težine) |
|--|--|
| Olovo | |
| žitarice, mahunarke i zrna mahunarki | 0,20 |
| povrće, osim kupusnjača, lisnatog povrća, svježeg bilja i svježih gljiva. Krumpir (najveće količine odnose se na oguljeni krumpir) | 0,10 |
| kupusnjače, lisnato povrće i sljedeće gljive Agaricus bisporus (zajednička gljiva), Pleurotus ostreatus (bukovača), Lentinula edodes (Shiitake gljiva) | 0,30 |
| voće, osim bobičastog i sitnog voća | 0,10 |
| bobičasto i sitno voće | 0,20 |
| Kadmij | |
| žitarice, osim mekinja, klica, pšenice i riže | 0,10 |
| mekinje, klice, pšenica i riža | 0,20 |
| soja | 0,20 |
| povrće i voće, osim lisnatog povrća, svježe začinsko bilje, gljiva, stabljičastog povrća, korjenastog povrća i krumpira | 0,050 |
| stabljičasto povrće, korjenasto povrće i krumpir, osim celera, krumpir (najveće dopuštene količine odnose se na oguljeni krumpir) | 0,10 |
| lisnato povrće, svježe bilje, celer i sljedeće gljive: Agaricus bisporus (common mushroom – uobičajena gljiva); Pleurotus ostreatus (bukovača), Lentinula edodes (Shiitake gljiva) | 0,20 |
| gljive, osim navedenih | 1,0 |
| Arsen | |
| čaj (Tea sinensis) i domaći čaj | 1,0 |
| svježe i prerađene gljive (samonikle i uzgojene) | 0,3 |
| suhe samonikle i uzgojene gljive | 1,0 |
| voće i povrće | 0,3 |
| sušeno voće | 0,5 |
| sušeno povrće i koncentrat rajčice | 1,0 |
| žitarice i proizvodi | 0,5 |

1.5. Analiza uzorka

Kod analize nekog realnog uzorka potreban nam je određeni protokol rada koji se sastoji od nekoliko glavnih stavki kao što su uzorkovanje, priprema uzorka te odabir metodologije.

Za početak je potrebno definirati problem, tj. odrediti zanima li nas kvalitativna ili kvantitativna informacija. Ako nas zanima identifikacija sastojka nekog uzorka potrebna nam je neka metoda kvalitativne analize dok nam je za mjerenje količine i koncentracije analita potrebna neka metoda kvantitativne analize. Na odabir metode utječe tip uzorka, tj. agregatno stanje u kojem se dati uzorak nalazi, veličina uzorka, potrebna i moguća priprema uzorka te potrebna osjetljivost.

Kod uzorkovanja je potrebno izabrati *reprezentativan uzorak* koji mora biti što sličnijih svojstava cjelokupne količine uzorka. Ako se radi o velikom uzorku potrebno je izvršiti redukciju po količini i veličini, tada se koristi tehnika poduzorkovanja ili četvrtanja gdje je cilj dobiti prikladnu količinu uzorka koja je dovoljno reprezentabilna za dati uzorak. Neki načini uzorkovanja su: sustavno uzorkovanje, nasumično, prosudbeno, slojevito, slučajno, neprestano uzorkovanje...

Kod pripreme uzorka potrebno je uočiti interferencije te ih ukloniti ili maskirati. Daljnja priprema uzorka ponovno ovisi o agregatnom stanju uzorka te fizikalnim i kemijskim svojstvima uzorka. Za analizu potrebno je i podešavanje uvjeta kao što su pH vrijednost, temperatura i otapala/reagensi.

I na poslijetku je potrebna obrada podataka tj. statistička obrada te usporedba sa standardnim količinama traženog analita u toj danoj vrsti uzorka. Pri statističkoj obradi su važni faktori raspon rezultata, aritmetička srednja vrijednost, medijan (vrijednost koja odvaja gornju i donju polovicu uzorka), mod (vrijednost koja se pojavljuje s najvećom frekvencijom) i preciznost koja se određuje odstupanjem (standardna devijacija, relativno standardno odstupanje, varijanca).

U Republici Hrvatskoj postoji pravilnik, pod nazivom *Pravilnik o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina olova, kadmija, žive, anorganskog kositra, 3-monoklorpropandiola i benzo(a)pirena u hrani*, kojim se propisuju metode uzorkovanja i analize olova, kadmija, žive i anorganskog kositra^[8].

1.5.1. Opće odredbe

1.5.1.1. Materijal koji se uzorkuje

Svaka serija (količina hrane koja ima određene zajedničke karakteristike poput podrijetla, vrste pakiranja, oblika pakiranja, količine pakiranja, osobe koja pakira, dobavljača) ili podserija predviđena za ispitivanje uzorkuje se zasebno.

1.5.1.2. Mjere opreza

Za vrijeme uzorkovanja i pripreme uzorka treba obratiti pozornost na mjere opreza kojima se osigurava da sastav i količine ispitivanih analita ostaju nepromijenjene.

1.5.1.3. Pojedinačni uzorci

Pojedinačni uzorci se po mogućnosti uzimaju s različitih mjesta u seriji ili podseriji.

1.5.1.4. Priprava skupnog uzorka

Skupini uzorak se dobiva povezivanjem pojedinačnih uzoraka.

1.5.1.5. Ponovljeni uzorci

Ponovljeni uzorci koji služe u svrhu provjere moraju se uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka.

1.5.1.6. Pakiranje i prijenos uzorka

Svaki uzorak zasebno se pakira u čisti, trajni spremnik čije komponente ne reagiraju sa samim uzorkom. Pakiranje osigurava zaštitu od kontaminacije uzorka, gubitka analita te sigurnost pri transportu.

1.5.1.7. Zatvaranje i označavanje uzorka

Svaki uzorak se mora službeno zatvoriti (zapečatiti) na mjestu uzorkovanja i obilježiti. Na pakiranju uzorka je potrebno označiti seriju uzorka, vrijeme i mjesto uzorkovanja, ime sorte, način proizvodnje, naziv proizvođača.

1.5.2. Metode uzorkovanja

Velike serije uzoraka se nužno dijele na podserije. Za podijelu serija proizvoda, koji se nalazu u rasutim pošiljkama (žitarice), na podserije primjenjuje se postupak podijele u tabeli 2., a za ostale proizvode postupak podijele u tabeli 3.^[8]

Tabela 2. Podjela serija na podserije za proizvode koji se prodaju u rasutim pošiljkama^[8]

| *Masa serije (tona) | Masa ili broj podserije |
|----------------------------|--------------------------------|
| ≥ 1500 | 500 t |
| > 300 i < 1500 | 3 pošiljke |
| ≥ 100 i ≤ 300 | 100 t |
| < 100 | - |

Tabela 3. Podjela serija na podserije za ostale proizvode^[8]

| *Masa serije (tona) | Masa ili broj podserije |
|----------------------------|--------------------------------|
| ≥ 15 | 15 - 30 t |
| < 15 | - |

*Masa serije ne predstavlja nužno točan umnožak mase i broja uzoraka iz podserije, masa podserije može odstupati najviše ± 20%

Skupni uzorak mora težiti barem 1 kg ili 1 l, osim u iznimnim slučajevima kada nam se ukupni uzorak sastoji od jednog pakiranja.

Tekući proizvodi u rasutoj pošiljci se neposredno prije uzorkovanja serija moraju homogenizirati, ručno ili mehanički do mjere do koje se ne mijenjaju njena svojstva ili do koje dolazi do gubitka analita. Zbog homogeniziranja uzorka dovoljno je uzeti samo tri pojedinačna uzorka. Pojedinačni uzorci moraju biti što sličniji i podjednake mase koja ne smije biti ispod 100 g ili 100 ml.

Tabela 4. Najmanji broj podjedinica uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije^[8]

| Masa ili volumen serije/podserije (u kg ili l) | Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje treba uzeti |
|---|--|
| < 50 | 3 |
| ≥ 50 i ≤ 500 | 5 |
| > 500 | 10 |

Tabela 5. Broj pakiranja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koji se uzorkuju za skupni uzorak, kad se serija sastoji od pojedinačnih pakovanja ili jedinica^[8]

| Broj pakiranja ili jedinica u seriji/podseriji | Broj pakiranja ili jedinica koje treba uzeti |
|---|---|
| ≤ 25 | Najmanje 1 pakiranje ili jedinica |
| 26 do 100 | Oko 5 %, a najmane 2 pakiranja ili jedinice |
| > 100 | Oko 5 %, a najviše 10 pakiranja ili jedinica |

1.5.3. Uzorkovanje tla

Kao važan faktor kod određivanja prisutnosti teških metala u biljkama je i njihova koncentracija u odgovarajućem tlu. Da bi došli do faktora prijenosa, koji označava prelazak tvari iz tla u biljku raznim transportnim mehanizmima, trebamo usporediti njihovu koncentraciju u tlu s onom u biljkama.

Osnovni uvjet za uspješno analiziranje tla je dobivanje *prosječnog uzorka tla* koji predstavlja homogenu smjesu tla, sastavljenu od većeg broja pojedinačnih uzoraka (20 - 25). Broj pojedinačnih uzoraka ovisi o vrsti tla, odnosno koliko je homogeno. Ako je tlo dovoljno homogeno broj potrebnih poduzoraka može biti manji. Važan faktor je definiranje pojma *analitička jedinica*, koja predstavlja površinu jednog prosječnog uzorka tla. Njihova veličina varira s heterogenosti tla i cilju istrživanja. Najveća analitička jedinica je ona na ratarskim površinama i kreće se u rasponu od 3,0 do 5,0 ha. Veličina analitičke jedinice za tla voćnjaka je manja od one namijenjene za ratarske proizvode, dok je ona na površinama koje se koriste za uzgoj povrtnih kultura različita ovisno o načinu uzgoja. Površina minimalne analitičke jedinice se određuje računski. U proračunu se uzima u obzir razmak između bušotina, tip tla, mikroreljef i mehanički sustav.

$$S = X^2$$

$$X = a(n - 1) + 2b$$

S - ukupna površina analitičke jedinice (m²)

X - duljina stranica analitičke jedinice (m)

a - minimalna udaljenost bušotine (m)

n - broj bušotina

b - izolacijsko područje za svaku bušotinu (0,5 m)



Slika 2. Gnojidbeni mikro poljski pokusi^[9]

Načini uzorkovanja tla se međusobno razlikuju u manjoj ili većoj mjeri. Način uzimanja uzorka ovisi o cilju i vrsti analitičkog istraživanja. Pojam uzorkovanja ne obuhvaća samo sakupljanje uzorka već i njegovo označavanje (vrijeme uzorkovanja, područja sa kojeg je uzet uzorak, način uzorkovanja...), pakiranje i transport.

Prethodno uzorkovanju potrebno je pripremiti sve katarske planove, karte zemljišta, alat za rad na terenu te dnevnik za vođenje evidencije uzimanja uzorka i posebna zapažanja. Uz sve dosad navedeno, za uzimanje reprezentativnog uzorka tla potrebno je uzeti u obzir reljef sa kojeg se uzima uzorak jer različiti reljefi ne omogućavaju iste uvjete za rast biljaka.

Uzorci tla se mogu uzimati ručno ili uz pomoć strojeva. Strojno uzorkovanje tla je prihvatljivo samo na većim homogenim površinama.



Slika 3. Uzorkovanje tla^[9]

Za ručno uzorkovanje se koriste razni alati koji moraju biti sačinjeni od nehrđajućeg čelika. To su svrdla raznih izvedbi, sonde, štihljači i pedološki nož.

Postoji više načina uzorkovanja koji ovisu o veličini i obliku površine te o cilju analize. Najčešći načini prostornog rasporeda uzorkovanja su:

- 1) Nesustavno statističko uzorkovanje (uglavnom na manjim homogenim površinama)
- 2) Kružno uzorkovanje (primjenjuje se na većim površinama)
- 3) Sustavno statističko uzorkovanje (temelji se na postavljanju kvadratne mreže preko područja koje se analizira)
- 4) Nasumično slučajno uzorkovanje (kada je raspored prisustva onečišćenja nepravilan)
- 5) Stratificirano nasumično uzorkovanje

Uzorci tla se uzimaju iz dva sloja dubine (0 - 30 i 30 - 60 cm). Odabrana dubina ovisi o biljnoj vrsti, podlozi i mehaničkom sustavu tla. Uzorci tla bobičastog voća uzimaju se na dubini od 0 - 20 i 20 - 40 cm dubine, a za ostale voćne vrste na dubini od 0 - 30 i 30 - 60 cm.



Slika 4. Dubina korijena^[10]

Masa prosječnog uzorka tla ovisi o vrsti analize i broju potrebnih analiza, seže od 0,5 do 3,0 kg. Neovisno o načinu uzorkovanja, potrebna masa prosječnog uzorka tla dobiva se usitnjavanjem, miješanjem i homogeniziranjem pojedinačnih uzoraka metodom *četvrtanja*.

Uzorci tla se pakiraju u plastičnim vrećicama volumena 3,0 do 5,0 litara. Sve potrebne oznake i opažanja se označavaju na etiketu vrećice^[9].

1.5.4. Sakupljanje biljnog materijala

Kod sakupljanja biljaka se uzima nadzemni dio biljke u razini otkosa. Nakon uzorkovanja svaki uzorak se usitni i zasebno važe na tehničkoj vagi s točnošću od 0,01 g. Uzorci se podijele na poduzorke korijena, cvijeta, ploda i lista. Poslije vaganja uzorci se stavljaju na sušenje koje traje otprilike jedan mjesec na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja uzorak se ponovno važe na tehničkoj vagi i skladišti.

Fitoakumuacijski faktor je odnos između koncentracije teških metala u biljkama i u odgovarajućem tlu^[11].

$$FAF = \frac{c_{biljka}}{c_{tlo}}$$

FAF - fitoakumulacijski faktor

c_{biljka} - koncentracija teških metala u osušenom uzorku biljke

c_{tlo} - koncentracija teških metala u osušenom uzorku tla

1.5.5. Priprava uzorka i analiza

1.5.5.1. Priprava uzorka

1.5.5.1.1. Mjere opreza

Glavni zahtjev za pripremu reprezentativnog uzorka je da se ne uzrokuju sekundarne kontaminacije uzoraka. Ukupna količina sakupljenog uzorka se koristi za pripremu reprezentativnog uzorka. Dobiveni rezultati količina kontaminata se na poslijetku uspoređuje s propisanim najvišim dopuštenim koncentracijama iz pravilnika.

1.5.5.1.2. Specifični postupci za pripremu uzorka

Aparatura i oprema ne smije sadržavati kontaminacije metala koji se određuju. Sav pribor mora biti čist i inertan prema analitima koji se određuju. Posuđe prije korištenja čisti kiselinom. U slučaju anorganskog kositra, sav uzorak treba biti u potpunosti otopljen jer može doći do gubitka analita uslijed hidrolize netopivog oblika Sn(IV) oksida.

1.5.5.1.3. Priprava uzorka

Priprava uzorka je specifična za svaki analit zasebno. Kod priprave ne smije doći do gubitka ili mijenjanja analita te je potrebno u potpunosti homogenizirati uzorak.

1.5.5.1.4. Ponovljeni uzorci

Ponovljeni uzorci u svrhu provjere se moraju uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka.

1.5.5.2. Metode analize

$$r = 2,8 \times s_r$$

r - ponovljivost (za apsolutnu vrijednost razlike dvaju rezultata dobivenih u istim uvjetima)

s_r - standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u ponovljenim uvjetima

RSD_r - relativna standardna devijacija (iz rezultata dobivenih u ponovljenim uvjetima)

$$RSD_r = \frac{s_r}{x} \times 100$$

R - obnovljivost (za apsolutnu vrijednost razlike između pojedinačnih rezultata dobivenih u obnovljivim uvjetima)

$$R = 2,8 \times s_R$$

s_R - standardna devijacija rezultata dobivenih u obnovljivim uvjetima

RSD_R - relativna standardna devijacija dobivena iz rezultata u obnovljivim uvjetima

$$RSD_R = \frac{s_R}{x} \times 100$$

LOD - granica detekcije (najmanja količina analita u uzorku koju je moguće dokazati)

LOQ - granica određivanja (najmanja količina analita u uzorku koju je moguće odrediti)

$HORRAT_r$ - Izračunata vrijednost RSD_r podijeljena s vrijednošću RSD_r koja je dobivena na temelju Horwitzove jednadžbe, polazeći od pretpostavke da $r = 0,66R$

$HORRAT_R$ - Izračunata vrijednost RSD_R podijeljena s vrijednošću RSD_R dobivena na temelju Horwitzove jednadžbe

u - standardna mjerna nesigurnost

U - prosječna mjerna nesigurnost

U_f - najveća standardna mjerna nesigurnost

Tabela 6. Izvedbeni kriterij za metode analize za olovo, kadmij, živu i anorganski kositar^[8]

| Parametar | Vrijednost |
|---------------|---|
| Primjenjivost | Hrana određena pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama kontaminata u hrani |
| LOD | Za anorganski kositar < 5 mg/kg Za ostale elemente < 1/10 najviše dopuštene količine propisane pravilnikom |
| LOQ | Za anorganski kositar < 10 mg/kg Za ostale elemente < 1/5 najviše dopuštene količine propisane pravilnikom |
| Preciznost | HORRAT _T ili HORRAT _R < 2 |
| Iskorištenje | Prethodne jednadžbe |
| Specifičnost | Bez spektralnih interferencija ili utjecaja matrice |

Kako bi se procjenila valjanost metode, u slučaju malog broja priznatih metoda analize, koristi se pristup *prikladnosti za svrhu*.

$$Uf = \sqrt{\frac{LOD}{2}} \times 2 + (aC) \times 2$$

Uf - najveća standardna mjerna nesigurnost (μg/kg)

LOD - granica detekcije (μg/kg)

C - relativna koncentracija (μg/kg)

a - konstante koja se mijenjaju s obzirom na vrijednosti *C* (tabela 7.)

Tabela 7. Numeričke vrijednosti za konstantu *a*, ovisno o koncentraciji *C*^[8]

| <i>C</i> (μg/kg) | <i>a</i> |
|------------------|----------|
| ≤ 50 | 0,2 |
| 51 do 500 | 0,18 |
| 501 do 1000 | 0,15 |
| 1001 do 10000 | 0,12 |
| > 10000 | 0,1 |

1.5.5.3. Izvješće

1.5.5.3.1. Izražavanje rezultata

Dobivene vrijednosti se moraju izražavati u istim jedinicama i s istim brojem decimalnih mjesta kao i dane vrijednosti propisane pravilnikom za najveću dopuštenu količinu određenih kontaminata.

1.5.5.3.2. Izračuni iskorištenja

Ako se za pripremu i predobradu uzorka koristi ekstrakcija mora se uzimati u obzir korekcija postotkom iskorištenja. No u slučaju analize analita metalnog podrijetla ekstrakcija se ne primjenjuje u predobradi uzorka, pa se rezultat ne mora korigirati ako se koristio prikladni referentni uzorak.

1.5.5.3.3. Mjerna nesigurnost

Rezultat se prikazuje kao $x \pm U$ gdje je x dobivena vrijednost analizom, a U proširena mjerna nesigurnost. Dodatkom faktora 2 dobiva se razina pouzdanosti od oko 95 %^[8]

$$U = 2u$$

2. Materijali i metode

Kod odabira metode i materijala važne su karakteristike uzorka te njegova fizikalna i kemijska svojstva. Za analizu metala u tlu, biljkama i povrću moguće je upotrijebiti više metoda i načina sakupljanja uzoraka. Neke od mogućih metoda su induktivno spregnuta plazma s masenim spektrometrom (ICP - MS), dvokanalni spektrometar atomske fluorescencije, induktivno spregnuta plazma s atomskom emisijskom spektroskopijom (ICP - AES), atomska fluorescencijska spektroskopija s generatorom hidrida (HG-AFS) i atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS).

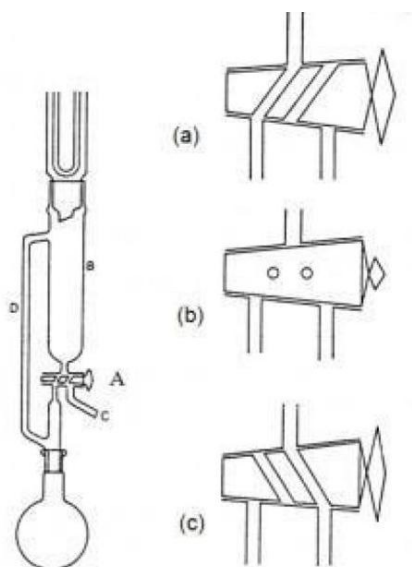
2.1. Načini pripreme biljnih uzoraka

Dva su glavna načina pripreme biljnih uzoraka za analizu, moguće ih je pripremiti postupkom *mokrog razaranja* ili postupkom *suhog razaranja*.

2.1.1. Postupak mokrog razaranja

Postupak mokrog razaranja je jako poželjan kod istraživanja nove vrste uzorka jer ne ovisi toliko o svojstvima uzorka. Dodavanjem velike količine reagensa smanjuje se utjecaj raznolikosti sastava.

Kod ovog postupka se koristi Kjeldhal boca za spaljivanje s dugačkim grlom, no dolje prikazana aparatura ima više prednosti nad tradicionalnom Kjeldhal bocom. Glavna prednost prikazane aparature je pipac koji se može postaviti u 3 različita položaja s različitim učincima. U položaju *a* omogućava refluks, u položaju *b* destilaciju, a u položaju *c* uklanjanje destilata. Promjenom položaja pipca mijenja se oksidacijski potencijal sustava. Pri položaju *a* oksidacijski sustav se stabilizira, pri *b* se pospešuje, a zatim se ponovno stabilizira u položaju *c*. Ako je potrebno mjeriti temperaturu, da bi se bolje kontroliralo trajanje pojedinih stupnjeva procesa, moguće je koristiti bocu s 2 otvora gdje se kroz jedan postavlja termometar.



Slika 5. Aparatura za kontrolirano razaranje organskih materijala^[3]

Postoji više smjesa koje se mogu koristiti za razaranje, npr. smjesa dušične i sumporne kiseline te smjesa sa perklornom kiselinom.

Smjesa dušične kiseline se koristi za dobivanje svih elemenata osim selenija, rutenija i osmija, iz gotovo svih vrsta uzoraka, osim eventualno onih koji sadrže kovalentni klorom. Takav klor može stvarati poteškoće kod određivanja arsena ili germanija zbog formiranja isparljivih klorida. Još jedna moguća interferencija se javlja kod uzoraka s kalcijem zbog taloženja kalcijevog sulfata.

Smjesa perklorne kiseline se koristi samo kao dodatak u postupku koji se bazira na drugim oksidansima. Perklorna kiselina kao sredstvo razaranja je učinkovitija u kombinaciji s dušičnom kiselinom jer nije toliko učinkovita u razaranju uzorka pri nižim temperaturama. Zagrijavanjem se povećava oksidacijska snaga perklorne kiseline.

2.1.2. Postupak suhog razaranja

Kod suhog razaranja je nedostatak to što se treba, mijenjanjem različitih varijabli, prilagođavati postupak za svaki uzorak zasebno. Baza ovog postupka je razaranje organskih komponenti atmosferskim kisikom. No taj postupak ima i svoje prednosti kao što je rad s velikim uzorcima jer se dodaje mala količina reagensa koji ponekad čak nije ni potreban. Ipak taj proces je dugotrajniji, cijena aparature je veća i može doći do gubitka uslijed velikih procesnih temperatura^[3].

Procesom sagorjevanja dobiva se pepeo koji je potpuno oslobođen od organske materije. Pepeo koji se dobije sagorijevanjem se otopi kiselinom, filtrira i razrijedi^[12].

2.2. Metodologija

2.2.1. Induktivno spregnuta plazma s masenim spektrometrom (ICP - MS)

ICP - MS je vrsta plazme induktivno spojene na maseni spektrometar. Plazma ionizira uzorak. Atomizira uzorak i stvara atomske i poliatomske ione koji se detektiraju masenim spektrometrom. Koristi se za detekciju metala i nekoliko nemetala u vodenim otopinama niske koncentracije. Može detektirati različite izotope istog elementa. U usporedbi s AAS-om ICP - MS je brži, precizniji i osjetljiviji, no ima i poneku manu kao što je pojava interferirajućih vrsta. Te interferirajuće vrste mogu biti argon iz plazme, propuštanje zraka kroz konusne otvore i onečišćenja na staklenom posuđu i samom aparatu.

Moguće je izvoditi višeelementarne analize. Izuzetno brzo i lako se može dobiti veliki broj rezultata, može se koristiti istovremeno za određivanje koncentracije elemenata u veoma širokom intervalu (1 - 100 mg/l). Uzorak se može razrijediti čime se znatno pojednostavljuje analiza, pri tome se svi elementi prevode u isti kemijski oblik. Pri maloj količini razrjeđenja za analizu je potrebna mala količina uzorka^[12].



Slika 6. ICP - MS^[13]

2.2.1.1. Komponente

Induktivno sparena plazma je plazma ionizirana induktivnim grijanjem plina elektromagnetnom zavojnicom. Plazme su uglavnom električno neutralne, gdje je svaki pozitivno nabijeni ion neutraliziran slobodnim elektronom.

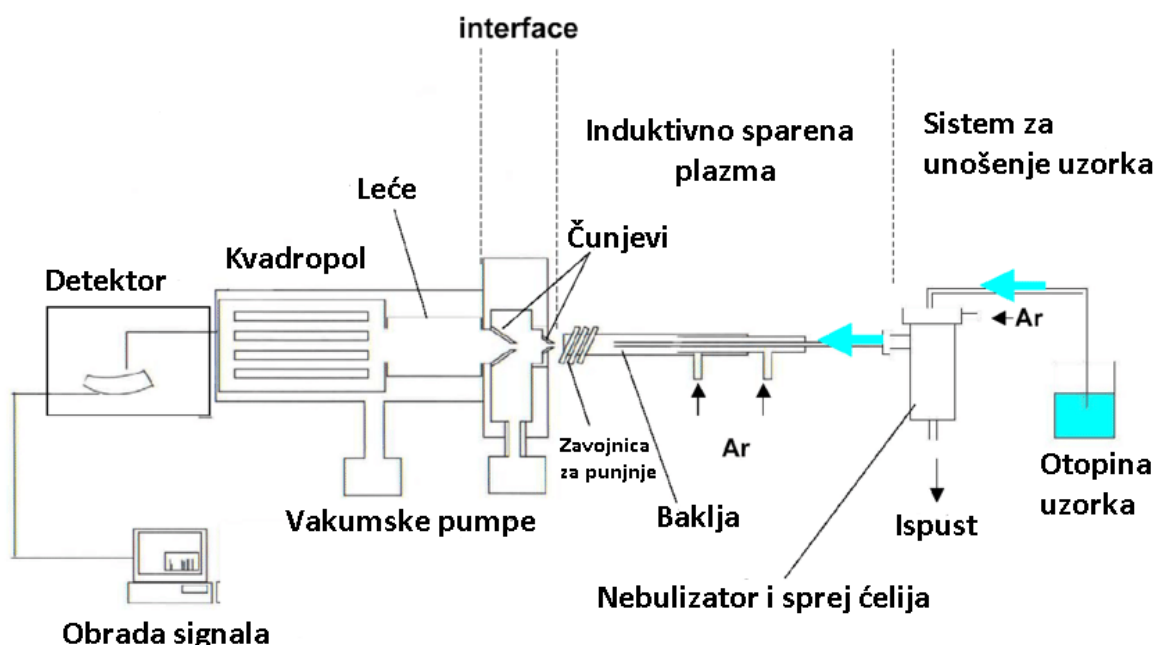
ICP - MS posjeduje mogućnost da kontinuirano analizira analit. Analiza uzorka se odrađuje pri atmosferskom tlaku. Uz pomoć raznih pumpi i vakumskih razina

razdvojenih podjedinicama (rupama) aparature, ioni stvoreni pod utjecajem plazme argona, prenosu se kroz maseni analizator do detektora.

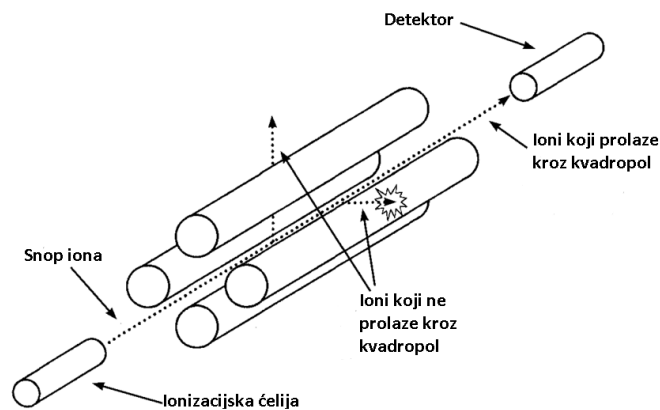
Induktivno sparena plazma se održaje bakljom sastavljenom od tri koncentrične, obično kvarcne, cijevi. Kraj baklje je smješten unutar indukcijske zavojnice opremljene električnom strujom radio - frekvencije. Struja plinovitog argona ulazi između dvije vanjske cijevi baklje. Električna iskra uzrokuje pojavu slobodnih elektrona u struji plina. Ti elektroni uzajamno djeluju s radio - frekvencijom magnetnog polja induktivne zavojnice te ih ubrzavaju u jednom smjeru, a zatim u drugom s promjenom polja.

Temperatura plazme je 10 000K i emitira UV svjetlo. Da bi se postigla maksimalna temperatura plazme u središnjoj cijevi se dovodi što manje otapala pri konstantnom veličinom kapljica. Za tekuće uzorke se može koristiti nebulizator da bi ispario većinu otapala prije nego što dođe do baklje. Kruti uzorci se mogu uvesti laserskom ablacijom. Uzorak se unosi u središnji kanal ICP-a, ispari, molekule se raspadnu pa se sastavni atomi ioniziraju.

Da bi se spojili na MS, ioni plazme se izdvajaju preko serije cijevi u maseni spektrometar, koji je obično kvadropol. Ioni se razdvajaju na osnovi razlike u omjeru masa/naboj.



Slika 7. Shema ICP - MS-a^[14]



Slika 8. Shema kvadropola^[15]

2.2.1.2. Primjena

Najčešća uporaba ICP - MS-a je u medicini, forenzici, preciznije toksikologija. Ovisno o specifičnim parametrima uzorci mogu biti krv, urin, plazma, serum, nabijene krvne stanice. Može se koristiti i u istraživanju okoliša, testiranje vode, otpada i uzoraka tla. U forenzici se upotrebljava za analizu stakla. U industrijama u kojima se javlja opasnost od trovanja teškim metalima upotrebljava se za redovito testiranje krvi ili urina radnika. Ima uporabnu svrhu i u geokemiji za radiometrijsko prikupljanje podataka, u kojima se analizira obilje različitih izotopa unutar rude urana i olova.

Služi za određivanje oksidacijskog stanja određenih metala kao što su krom i arsen. Može se upotrebljavati i u području biokemije kod kvantifikacije proteina i biomolekula.

Omogućava određivanje elemenata sa atomskim masama od 7 do 250 (Li do U), a ponekad i više, no postoje mase koje se ne mogu odrediti zbog smetnje argona i spojeva argona, pri masama od 40, 56 i 80. Za razliku od AAS-a, ICP - MS može istovremeno analizirati više uzoraka i može snimiti cijeli analitički spektar od litija do urana.^[16]

2.2.1.3. Aparatura

Za održavanje plazme je potrebno prisustvo plina nosioca, koji je najčešće čisti argon, te povećava potrošnju energije instrumenta. Kada dodatni troškovi uporabe instrumenta nisu opravdani, plazma i većina pomoćnih dijelova aparature se mogu ugasiti. U *standby mode*-u, samo pumpe radu da bi održale ispravno usisavanje u maseni spektrometar.

Unošenje uzorka u aparaturu se provodi preko analitičkog nebulizatora. On prevodi tekućine u aerosol koji se unosi u plazmu te se kroz nju ionizira. Ta metoda se

koristi za jednostavne tekućine, ali se pokazalo da je moguća i analiza kompleksnijih materijala kao što su suspenzije. Različiti nebulizatori se mogu spariti s ICP - MS-om, a najčešći su pneumatski, *cross - flow*, Babington, ultrazvučni i desolvacijski.

Osim nebulizatora se može koristiti i laserska aberacija. U toj metodi se pulsirajući

UV laser fokusira na uzorak te stvara sloj oštećenog materijala čije čestice putuju dalje u plazmu. Najčešća uporaba je u geokemiji kod istraživanja kamenja. Malo rjeđe upotrebljavane metode su elektrotermalni uparivač i uparavanje bakljom što se koristi na vrućim površinama (grafit, metal) za uparivanje uzorka. Baklja plazme služi za djelomičnu ionizaciju plinovitog argona ($\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + \text{e}^-$). Nakon injektiranja uzorka, visoka temperatura plazme uzrokuje razdvajanje uzorka na pojedine atome, zatim plazma ionizira te atome ($\text{M} \rightarrow \text{M}^+ + \text{e}^-$) tako da mogu biti detektirani masenim spektrometrom. Argon, kao plin nosioc, je najisplativiji element - ima ga u izobilju pa je i jeftiniji od ostalih plemenitih plinova. Argon također ima i višu prvu energiju ionizacije od svih ostalih elemenata (osim He i Ne). Zbog više energije ionizacije reakcija ($\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + \text{e}^-$) je energetski povoljnija od reakcije ($\text{M} \rightarrow \text{M}^+ + \text{e}^-$), što omogućava da uzorak ostane ioniziran (M^+)^[17].

2.2.2. Induktivno spregnuta plazma s atomskom emisijskom spektroskopijom (ICP - AES)

2.2.2.1. Mehanizam

ICP - AES se sastoji od dva dijela: ICP i optički spektrometar.

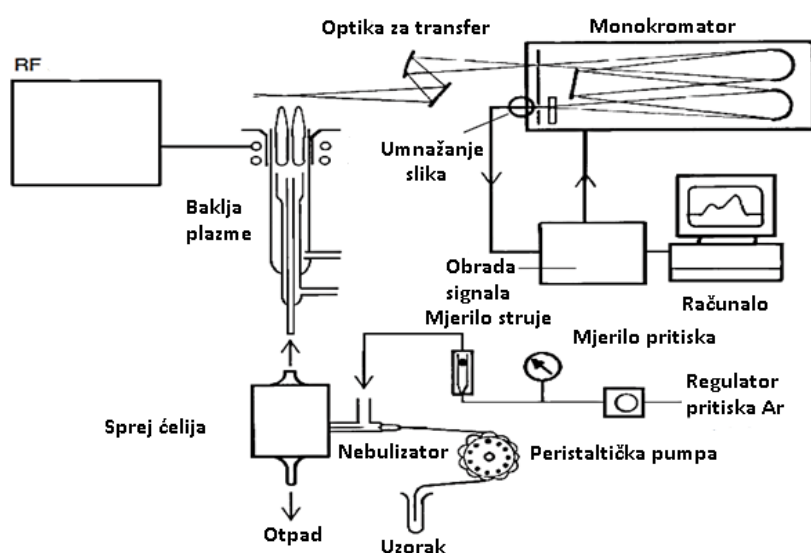
ICP baklja se sastoji od triju koncentričnih cijevi od kvarcnog stakla. Radna zavojnica generatora radio - frekvencije okružuje dio kvarcne baklje. Argon se koristi za stvaranje plazme. Uobičajno instrumenti rade na 27 ili 40MHz. Peristaltička pumpa dovodi vodeni ili organski uzorak u nebulizator gdje se pretvara u paru i uvodi direktno u plazmu. Uzorak instantno reagira s elektronima i nabijenim ionima iz plazme raspadajući se na ione. U nekim izdanjima se koristi plin (dušik ili kompresirani zrak) koji "reže" plazmu na specifičnim mjestima. Nakon toga se koriste jedna ili dvije leće da bi usmjerile emitiranu svjetlost na difrakcijsku rešetku, gdje se svjetlost rastavlja na komponente u optičkom spektrometru. U drugim izdanjima plazma udara točno nad optičkim *interface*-om koji uzrokuje skretanje plazme i omogućava hlađenje dok istovremeno dopušta emitiranoj svjetlosti da uđe u optičku ćeliju^{[18],[19]}.

U optičkoj ćeliji se, nakon raspada svjetlosti, mjeri intenzitet svjetla

fotomultiplikacijskom cijevi, pružajući mogućnost analize svih valnih duljina istovremeno.



Slika 9. ICP - AES^[20]



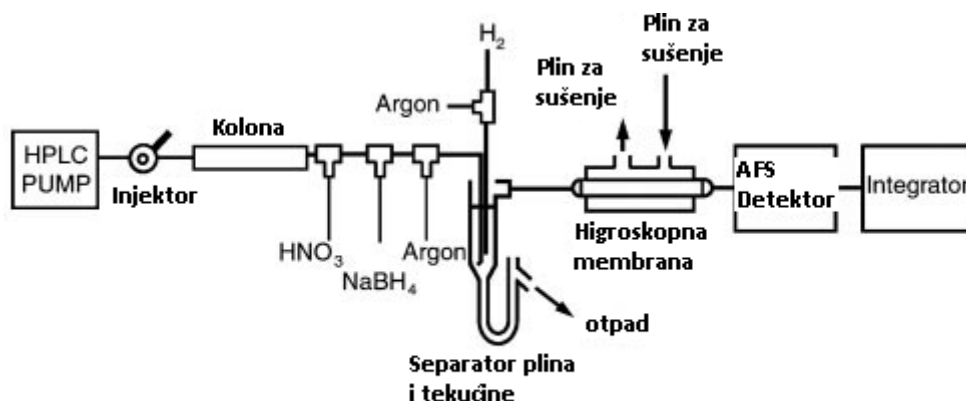
Slika 10. Shema ICP - AES - a^[21]

2.2.2.2. *Primjena*

Najčešće područje analize ICP - AES-om je u određivanju metala u vinu^[22], arsena u hrani^[23] i elemenata u tragovima spojenih na proteine^[24]. Najčešće se koristi u forenzici u analizi tla, no sve češće se počinje koristiti i u određivanja nutritivne vrijednosti poljoprivredne zemlje^[6].

2.2.3. Atomska fluorescencijska spektroskopija s generatorom hidrida (HG - AFS)

Metoda se zasniva na određivanju ukupnog antimona naspram antimona(V), za istovremeno razdvajanje i procjenjivanje antimona(III) i antimona(V). Granica detekcije mu je u području od 0,02 do 0,1 ng (ili manje od 0,1 ng/ml). Moguće je određivati pojedini element ili više elemenata istovremeno. Za elemente koji stvaraju hidride se koristi nedisperzivni AFS. Taj pristup nudi niz prednosti za elemente koji stvaraju hidride u UV području. Odvajanje analita iz matriksa generacijom hidrida smanjuje kompleksnost spektra. Naknadno je dodan i sustav za protočno injektiranje za analizu As, Sb, Se i Te.



Slika 11. Shema HG - AFS^[25]

2.2.3.1. Aparatura

HPLC sistem se sastoji od dvije pumpe i injektora s petljom za uzorak volumena 200 μ l. Generator hidrida hlapljivih stibina je proveden *on-line* dodatkom otopina HNO₃ i NaBH₄ s dvije peristaltičke pumpe. Argon se koristi kao plin nosioc, prethodno osušen preko higroskopne membrane cijevi za sušenje. Kao komponenta za sušenje se koristi zrak pri brzini od 2,51 min⁻¹. Stibin se detektira AFS detektorom opremljenim sa šupljom katodom koja potiče pražnjenje antimona. Mjerenja se odrađuju pri različitim rezonirajućim valnim dujinama.

2.2.3.2. Primjena

Uzorak volumena 200 μ l se injektira u HPLC sistem. *On-line* generacija hidrida se odvija uz dodatak 0,69 ml/min 3% - tnog NaBH₄ (stabiliziran s 1% - tnim NaOH) i 2 mol/l HNO₃ preko peristaltičke pumpe. Uzorak se prenese na tekućinski separator odakle ga struja argona nosi do detektora. Prije detekcije je potrebno je

osušiti argon. Zatim se struja vodika uvodi u separator plina i tekućine da bi se održavao difuzijski plamen argona i vodika^[25].

2.2.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS)

AAS je spektroanalitička procedura za kvantitativno određivanje kemijskih elemenata koristeći apsorpciju optičke radijacije (svjetlosti) slobodnih atoma u plinovitom stanju. Atomska apsorpcijska spektroskopija se temelji na slobodnim metalnim ionima koji apsorbiraju svjetlost. Može se koristiti za određivanje i do 70 različitih elemenata u otopini ili iz krutih uzoraka preko elektrotermalnog isparavanja. Može se koristiti u raznim područjima kemije kao što su klinička analiza metala u biološkim tekućinama i tkivima (krv, plazma, urin, slina, tkivo mozga, kosa, mišićna tkiva). Služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Za analizu otopina nepoznate koncentracije su potrebni standardi poznatih koncentracija da bi se preko Beer - Lambertova zakona mogla odrediti koncentracija u nepoznatoj otopini^[26].

$$I_t = I_0 \times 10^{-\varepsilon l N_0}$$

ε - molarni apsorpcijski koeficijent

l - debljina sloja atomske pare uzorka

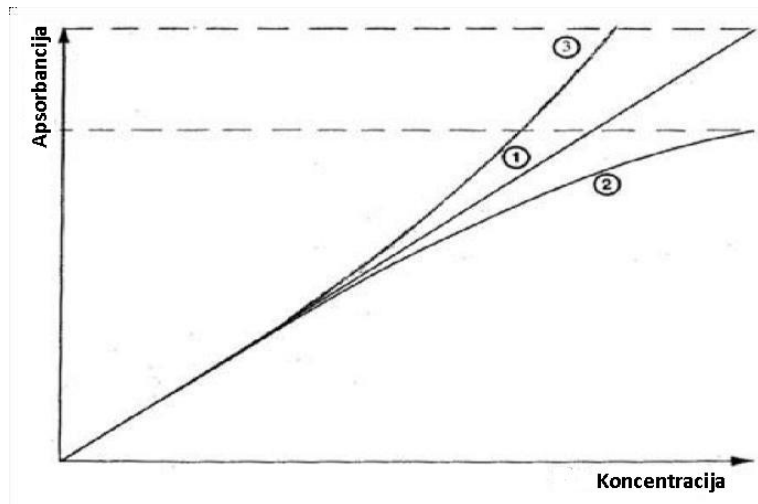
N_0 - broj atoma u osnovnom stanju koji mogu apsorbirati zračenje

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = k \times c \times l$$

Ako se uzme da je dužina apsorpcijskog sloja konstantna:

$$A = \left(\frac{I_0}{I}\right) = k \times c$$

Kod rezultata atomske apsorpcijske spektroskopije javlja se linearnost samo pri nižim vrijednostima apsorpcije (do $A < 0,2$). Najčešće odstupanje od linearnosti se događa prema osi koncentracije (normalna zakrivljenost), a rjeđe prema osi apsorpcije (obrnuta zakrivljenost).



Graf 1. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji, 1 - linearno, 2 - normalna zakrivljenost, 3 - obrnuta zakrivljenost^[3]

Primjenjuju se dvije metode kalibracije ovisno o prirodi uzorka i analita.

1) direktna kalibracije (određivanje metalnog analita u jednostavnoj matrici)

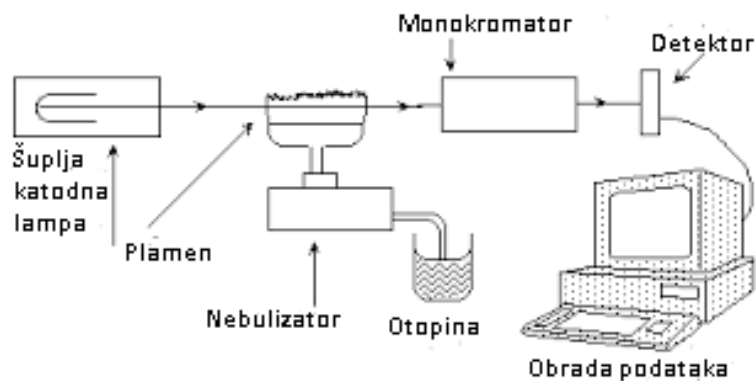
Daje veću točnost određivanja u širokom spektru apsorbancija.

2) kalibracija standardnim dodavanjem (kod složenog ili nepoznatog sastava matrice)

Određuje se u uskom području apsorbancije zbog prisutnosti linearnog odnosa samo u dijelu rezultata^[3].



Slika 12. AAS^[27]



Slika 13. Shema AAS-a^[28]

2.2.4.1. Aparatura

Da bi mogli analizirati uzorak on mora biti atomiziran. Najčešći atomizatori su plameni i elektrotermalni (grafitni) atomizator. Atomi se ozračuju optičkim zračenjem. Izvor zračenja može biti određene valne duljine, specifično samo za jedan element ili kontinuirano zračenje. Zračenje tada prolazi kroz monokromator da bi se odvojila valna duljina specifična za element od svih ostalih valnih duljina proizašlih iz izvora zračenja. To specifično zračenje dalje odlazi na detektor.

Najstariji tip atomizatora je plameni atomizator koji upotrebljava zrak - acetilen plamen. Taj plamen stvara reduciraniju sredinu to je prikladno za analite visokog afiniteta prema kisiku. On je najprikladniji za tekuće ili otopljene uzorke, koji se u nebulizatoru prevode u aerosol i dalje idu u sprej komoru, gdje se miješa s plinovima plamena pod određenim uvjetima koji dopuštaju da se samo najfinije (< 10 μm) kapljice miješaju s plamenom. Takvo postavljanje uvjeta smanjuje moguće interferencije, ali zbog toga samo oko 5% otopine dolazi do plamena. Prilagođavanjem veličine plamena i snopa zračenja može se utjecati na koncentraciju nastalih atoma i osjetljivost.



Slika 14. Plameni fotometar^[29]

Elektrotermalni atomizator koristi grafitne kivete u koje se postavlja uzorak pod određenim temperaturnim programom koji se većinski sastoji od nekoliko faza (sušenje, piroliza, atomizacija i čišćenje). Komponente uzorka se razdvajaju pod utjecajem temperaturnih promjena. Kivete se mogu grijati transversalno ili longitudinalno. Prednosti ove metode su to što se svaki uzorak, bio tekući, kruti ili plinoviti, može neposredno biti određen. Osjetljivost joj je veća dva do tri reda veličine od one kod plamene AAS, pa je određivanje u niskim razinama $\mu\text{g/l}$ i ng/g izvedivo^[26].



Slika 15. Grafitna kiveta^[30]

Postoje još mnoge metode atomizacije kao što su *glow - discharge* atomizacija, atomizacija hidridom i atomizacija hladnom parom^[31].

Izvori zračenja mogu biti linijski i kontinuirani. Linijski izvori zračenja emitiraju spektar analita u obliku linija užih od onih apsorbiranih. Kod izvora zračenja kontinuiranog spektra prednost je ta što su primjereni za svaki tip analita, no tada je potreban visokorezolucijski monokromator. Kod visokorezolucijskih monokromatora, za održavanje osjetljivosti, rezolucija mora biti jednaka ili bolja od polovice širine atomske apsorpcijske linije.

Neki od izvora zračenja mogu biti šuplja katodna lampa, žarulja bez elektroda, deuterijska lampa.

Spektrometar sadrži i monokromator i detektor^[32].

3. Rezultati i rasprava

Teški metali iz industrije i ostalih ljudskih aktivnosti dolazu do tla i tu se nakupljaju. Biljke svojim apsorpcijskim svojstvima transportiraju teške metale iz tla u svoja tkiva. Takve biljke pokazuju smanjenu stopu rasta zbog promjene u njihovim fiziološkim i biokemijskim aktivnostima^[1].

Biljke za svoj rast trebaju makrohranjiva i mikrohranjiva. Osnovna razlika je u količini potrebnoj za razvoj biljke. Ukoliko se radi o većoj količini radi se o makrohranjivima, a ako su ti biogeni elementi potrebni u manjoj količini riječ je o mikrohranjivima. U makrohranjiva se ubrajaju dušik, fosfor, kalij, kalcij, sumpor, magnezij, natrij, a u mikrohranjiva bor, klor, mangan, željezo, cink, bakar, molibden, nikal, kobalt. Prema dosadašnjim istraživanjima u nekoliko posljednjih desetljeća godišnje se širom svijeta unosi 22 000 tona kadmija, 939 000 tona bakra, 783 000 tona olova i 1 350 000 tona cinka u okoliš^[33].

Trovanje ljudi teškim metalima je najčešće posljedica korištenje kontaminiranih biljaka u prehrani, najopasniji za ljudsko zdravlje su olovo, kadmij, živa i arsen. Prisutnost tih metala u ljudskom tijelu mogu izazvati razne poteškoće većinski u obliku oštećenja bubrega i fraktura kostiju.

Izlaganje kadmiju može uzrokovati oštećenja bubrega, znak oštećenja je obično disfunkcija tubula koja je ireverzibilna pojava. Dokazano je da dolazi do oštećenja bubrega i pri relativno niskim koncentracijama kadmija u urinu (2 - 3 µg kadmija/g kreatinina). Kasnija istraživanja su pokazala da može doći i do nakupljanja bubrežnog kamenca uzrokovano tubularnom disfunkcijom. Dugotrajna izloženost kadmiju može uzrokovati i oštećenje skeleta. Kod oštećenja karcinogene prirode javlja se rak pluća i rak prostate. Stoga je maksimalna dozvoljena koncentracija kadmija u hrani jednaka 0,00002% težine svježeg proizvoda^[5]. Kadmij se jako brzo transportira iz zemljišta u biljku. Njegova apsorpcija u biljke najviše ovisi o pH vrijednosti i prisustvu ostalih kationa, pa tako kalcij i cink smanjuju sposobnost apsorpcije kadmija. Istraživanja su pokazala da 30 - 60 % kadmija u biljkama dolazi iz atmosfere, a 40 - 60 % iz zemljišta. Kadmij transportiran iz tla se u najvećoj količini zadržaje u korijenu. Njegova koncentracija je u listu i ostalim nadzemnim djelovima približno ista, ali primjetno manja nego ona u korijenu^[12].

Dugotrajnije izlaganje živi u anorganskom obliku može izazvati oštećenje pluća. Trovanje se dijagnosticira neurološkim i psihološkim simptomima kao što su promjene u osobnosti, umor, tjeskoba, poremećaji u spavanju i depresija. Ti simptomi su reverzibilni i prestaju nakon uklanjanja uzroka. Dok simptomi trovanja žive organskog podrijetla mogu biti parestezija i utrnulost ruku i stopala, može uzrokovati i srčane i koronarne bolesti^[5].

Tokom prošlog stoljeća, preko 50 % prisutnog olova je uzrok ispušnih plinova iz prometa. Simptomi akutnog trovanja olovom su glavobolje, iziritiranost, bol u abdomenu i razni simptomi povezani s živčanim sustavom. Olovo u tijelu uzrokuje nesanicu i nemir, a u djece može doći do poteškoćama u koncentraciji i učenju. Ostale posljedice mogu biti pojava psihoze, dezorijentacija, smanjena svijest... Stoga je maksimalna dozvoljena koncentracija olova u hrani jednaka 0,00002% težine svježeg proizvoda^[5]. Istraživanja su pokazala da je najveća koncentracija olova u biljkama u korijenu. U anorganskom obliku biljke slabo apsorbiraju olovo i slabo ga transportiraju u nadzemne dijelove biljke osim na kiselim zemljištima. Dok se organski spojevi olova lako apsorbiraju i transportiraju u različite djelove biljke. Olovo u visokim koncentracijama inhibira rast lišća i korijena, proces fotosinteze te utječe na morfološku i anatomsku građu biljaka^[12].

Anorganski arsen je akutno otrovan i izaziva gastrointestinalne simptome, poteškoće u kardiovaskularnom i živčanom sustavu te u konačnici smrt. Postoji i povećan rizik od raka bubrega, mjehura i kože. Ljudi koji su izloženi arsenu udisanjem mogu dobiti rak pluća. Rizik trovanja arsenom se povećava izlaganjem izvoru trovanja. Razine arsena koje vodu do ozbiljnih posljedica su u opsegu od 50 - 100 µg/l. Stoga je maksimalna dozvoljena količina arsena u hrani jednaka 0,0001 %^[5]. Arsen(V) se lako apsorbira i transportira kroz transportne kanale fosfata. Zbog njihove kemijske sličnosti dolazi do nadmetanja u procesu apsorpcije između arsena(V) i fosfata^[3].

4. Zaključak

Teški metali se u prirodi javljaju putem raznih ljudskih i prirodnih utjecaja. Ispiranje teških metala je uzrokovalo ozbiljno obogaćivanje obližnjih tla. Biljke svojim apsorpcijskim svojstvima transportiraju teške metale iz tla u svoja tkiva. Takve biljke pokazuju smanjenu stopu rasta zbog promjene u njihovim fiziološkim i biokemijskim aktivnostima. Ovisno o vrsti biljaka, njenim apsorpcijskim svojstvima i o obliku u kojem se teški metal apsorbira, javlja se različiti stupanj transporta teških metala u različita biljna tkiva. Ulazak u ljudsko tijelo je posljedica konzumiranja zagađene hrane, povrća, no velikim dijelom je uzrok i udisanje zagađenog zraka. Kod ljudi prisustvo teških metala u tijelu izaziva razne karcinogene i nekarcinogene pojave. Neke se mogu ukloniti uklanjanjem uzroka poremećaja dok neke ostaju kao stalno stanje u organizmu.

5. Literatura

- [1] G. U. Chibuike and S. C. Obiora, "Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods," *Appl. Environ. Soil Sci.*, vol. 2014, 2014.
- [2] B. V. Tangahu, S. R. Sheikh Abdullah, H. Basri, M. Idris, N. Anuar, and M. Mukhlisin, "A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation," *Int. J. Chem. Eng.*, vol. 2011, 2011.
- [3] A. Malovac, "Bioakumulacija teških metala u biljci hiperakumulatoru *Pistia stratiotes*," 2017.
- [4] A. Kalač, "Teški metali," Podgorica, 2019.
- [5] L. Järup, "Hazards of heavy metal contamination," *Br. Med. Bull.*, vol. 68, pp. 167–182, 2003.
- [6] R. A. Meyers, *Encyclopedia of analytical chemistry*. Wiley, 2000.
- [7] NN 145, "PRAVILNIK O NAJVEĆIM DOPUŠTENIM KOLIČINAMA ODREĐENIH KONTAMINANATA U HRANI," 2008. [Online]. Available: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_12_154_4198.html. (pristupljeno 20.08.2020.)
- [8] NN 45, "PRAVILNIK O PLANU UZORKOVANJA I METODAMA ANALIZA ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINA OLOVA, KADMIJA, ŽIVE, ANORGANSKOG KOSITRA, 3-MONOKLORPROPANDIOLA I BENZO(A)PIRENA U HRANI," 2008. [Online]. Available: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_04_45_1531.html. (pristupljeno 20.08.2020.)
- [9] L. Čoga and S. Slunjski, *Dijagnostika tla u ishrani bilja*. 2018.
- [10] J. López-Bucio, A. Cruz-Ramírez, and L. Herrera-Estrella, "The role of nutrient availability in regulating root architecture," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 280–287, 2003.
- [11] N. Habulan, "Određivanje mase teških metala koju je moguće ukloniti fitoremedijacijom pomoću čestih samoniklih biljaka sa zelenih površina grada Varaždina," 2016.
- [12] G. Grozdić, "Određivanje sadržaja metala u biljnim vrstama *Seseli rigidum* i *Seseli pallasii*," 2015.
- [13] K. Jakubec, "Analytical instrument ICP-MS from Varian company production," 2016. [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ICP-MS.jpg#/media/File:ICP-MS.jpg>. (pristupljeno 20.08.2020.)
- [14] R. Gilstrap, "A colloidal nanoparticle form of indium tin oxide : system development and characterization SYSTEM DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION Presented to The Academic Faculty by Richard Allen Gilstrap Jr . In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree," no. January 2009, 2009.
- [15] J. W. Honour, "Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 40, no. 6, pp. 628–638, 2003.
- [16] S. Greenfield, "Inductively coupled plasmas in atomic fluorescence spectrometry: A review," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 9, no. 5, pp. 565–592, 1994.
- [17] S. H. Nam, W. R. L. Masamba, and A. Montaser, "Investigation of Helium Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for the Detection of Metals and Nonmetals in Aqueous Solutions," *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 20, pp. 2784–2790, 1993.
- [18] D. M. McClenathan, W. C. Wetzel, S. E. Lorge, and G. M. Hieftje, "Effect of the plasma operating frequency on the figures of merit of an inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 21, no. 2, pp. 160–167, 2006.
- [19] R. Rezaaiyaan, G. M. Hieftje, H. Anderson, H. Kaiser, and B. Meddings, "Design and Construction of a Low-Flow, Low-Power Torch for Inductively Coupled Plasma Spectrometry.," *Appl. Spectrosc.*, vol. 36, no. 6, pp. 627–631, 1982.

- [20] K. Jakubec, "ICP atomic emission spectrometer," 2006. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Inductively_coupled_plasma_atomic_emission_spectroscopy#/media/File:Spectrometer_ICP-OES.jpg. (pristupljeno 23.08.2020.)
- [21] Agilent technologies, "ICP - AES," 1999. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/> (pristupljeno 23.08.2020.)
- [22] M. Aceto, O. Abollino, M. C. Bruzzoniti, E. Mentasti, C. Sarzanini, and M. Malandrino, "Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review," *Food Addit. Contam.*, vol. 19, no. 2, pp. 126–133, 2002.
- [23] L. Benramdane, F. Bressolle, and J. J. Vallon, "Arsenic speciation in humans and food products: A review," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 37, no. 9, pp. 330–344, 1999.
- [24] R. Ma, C. W. McLeod, K. Tomlinson, and R. K. Poole, "Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 15, pp. 2469–2477, 2004.
- [25] A. Sayago, R. Bcltrân, and J. L. Gómez-Ariza, "Hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) as a sensitive detector for Sb(in) and Sb(v) speciation in water," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 15, no. 4, pp. 423–428, 2000.
- [26] S. R. Koirtiyohann, "a History of Atomic Absorption Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 21, pp. 1024A-1031A, 1991.
- [27] J. Gubler, "Flame atomic absorption spectroscopy instrument," 2005. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_absorption_spectroscopy#/media/File:FlammenAAS.jpg. (pristupljeno 23.08.2020.)
- [28] D. Khadka, "Basic Principles of the Different Instruments Used in Soil Science Laboratory," no. March, 2015.
- [29] A.KRÜSS Optronic, "Flame Photometers." [Online]. Available: <https://www.kruess.com/en/produkt-kategorie/flame-photometers/>. (pristupljeno 29.08.2020.)
- [30] Virial, "Graphite AAS tubes." [Online]. Available: <http://www.virial.ru/en/> (pristupljeno 29.08.2020.)
- [31] D. Harvey, *Analytical chemistry*, 3rd ed. Open Education Resource (OER) LibreTexts Project, 2017.
- [32] Maryville University, "Atomic Absorption Spectroscopy Learnin Module." [Online]. Available: <https://blogs.maryville.edu/aas/>.
- [33] T. Kozina, "Određivanje teških metala u korabi," Split, 2017.