

Универзитет у Београду

Хемијски факултет



Јована П. Орлић

**Развијање и оптимизација методе
одређивања метала у биљним
материјалима помоћу таласно дисперзивне
рендгенско флуоресцентне спектрометрије
(*WD-XRF*) и поређење са другим
спектрометријским техникама**

Докторска дисертација

Београд 2022.

University of Belgrade

Faculty of Chemistry



Jovana P. Orlić

**Development and optimization of methods of
analysis of metals in plant materials using
wavelength dispersive X-ray fluorescence
spectrometry (WD-XRF) and comparison with
other spectrometry techniques**

Doctoral Dissertation

Belgrade 2022.

Ментори:

др Константин Илијевић, доцент
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

др Иван Гржетић, редовни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

Чланови комисије одбране:

др Александар Поповић, редовни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

др Дубравка Релић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

др Мира Аничич Урошевић, научни саветник
Институт за физику у Београду, Универзитет у Београду

Београд, 2022.

Захвалница

На самом почетку бих желела да се захвалим свом ментору, професору др Ивану Гржетићу. Професоре, хвала Вам на указаном поверењу, корисним саветима, што сте ме увели у свет науке, усмерили моје прве кораке и обезбедили све неопходне услове за мој научни рад. Захвална сам Вам на позитивном утицају на мој професионални и лични развој.

Огромну захвалност дугујем др Константину Илијевићу, још једном мом ментору. Коста, хвала ти пуно на свакодневном охрабривању, несебичној подршци и свему што си ме научио. Хвала ти за све сате проведене у дискусији, разговору и проналажењу најбољих решења. Велико ми је задовољство да будем други члан нашег малог тима.

Захвалила бих се др Мири Аничих Урошевић на свим конструктивним сугестијама и саветима током писања ове дисертације. Поред велике професионалне подршке, хвала и на пријатељским охрабрењима који су ми помогли да притисци последње фазе мог доктората буду ублажени. Хвала и што си ме упознала са Русијом на посебан начин.

Велико хвала члановима комисије др Александру Поповићу и др Дубравки Релић. Захвална сам вам на подршци, смерницама и свим драгоценим саветима које сте ми пружили током израде ове тезе, као и током мог читавог професионалног рада. Учинили сте да моје радно окружење у лабораторији 642 буде извор позитивног осећаја.

На гостопримству и великој професионалној и пријатељској подршци бих желела да се захвалим Марини Фронтасјевој, као и колегама из Франкове лабораторије за неутронску физику Обједињеног института за нуклеарна истраживања у Дубни. Боравак у Дубни и у вашој групи је за мене било посебно искуство.

Хвала мојим драгим колегама (и пријатељима) Филипу, Тијани, Гоци, Горици, Милицы, Ивану, Сањи, Слађани, као и свим колегама са Катедре за примењену хемију. Хвала што сте сате проведене на послу свакодневно чинили дивним. Свако од вас је неки моменат учинио посебним.

Хвала пуно мојим пријатељима и мојим кумама на показаном интересовању за сваки мој професионални корак и за охрабривање за сваки следећи. Јако ми је значила свака позитивна реч коју сам чула од вас претходних година.

Никола, хвала ти за последње две године. То није био једноставан период, а ти си учинио да током њега имам ослонац и осећам се посебно.

Највећу захвалност дугујем својој породици, сестрама Дамјани и Теодори, родитељима Весни и Предрагу. Ова теза је круна вишегодишњег учења, студирања и рада. Ви сте ми пружили безусловну љубав и огромну подршку сваког тренутка тог пута. Ову дисертацију посвећујем вама.

Јована П. Орлић

*Београд,
децембар 2021.*

Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (*WD-XRF*) и поређење са другим спектрометријским техникама

Сажетак

Спектрометријске технике које се конвенционално користе (*ICP-OES*, *ICP-MS*) за анализу биљака обично подразумевају захтевну процедуру припреме која укључује коришћење агресивних и токсичних хемикалија за минерализацију што узрокује повећану потребу за развијањем техника директне анализе. Основни циљ ове дисертације је био развијање методе за анализу елемената у биљном материјалу употребом целулозе као универзалног матрикса за производњу синтетичких стандарда за калибрацију. У оквиру ове дисертације оптимизовани су аналитички параметри *WD-XRF* спектрометра за анализу 20 елемената (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi) и развијене су три методе анализе, које се примењују у зависности од начина припреме пелета биљног узорка за *XRF* анализу. Метода „Целулоза“ (Ц) се примењује за анализу пелета сачињених само од биљног материјала, метода „Целулоза са воском“ (ЦВ) за анализу пелета од биљног материјала са додатком воска (везивног средства) и метода „Танак слој“ (ТС) за анализу мале количине узорка.

Испитани су основни параметри валидације развијених метода: осетљивост, линеарност, лимит детекције, лимит квантификације, прецизност (поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност) и тачност. Осим развијених метода, испитивање тачности је проширено на безстандардну методу анализе *UniQuant* (УК). Како би се сагледао потенцијал УК методе и добио оптималан пелет, испитан је утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу.

У последњем делу дисертације упоређени су резултати добијени *WD-XRF* техником (емпиријском калибрацијом и безстандардном методом) и конвенционално коришћеним техникама (*ICP-MS*, *ICP-OES* и *INAA*). У ту сврху, свим поменутих техникама је анализирано укупно 49 узорка четири врсте четинара (*Pinus nigra*, *Abies alba*, *Taxus baccata* и *Larix decidua*).

Кључне речи: мултиелементарна анализа, безстандардна анализа, целулозни стандардни, емпиријска калибрација, тачност, прецизност, тешки метали, зелена хемија, пресовани пелети, фундаментални параметри

Научна област: Хемија

Ужа научна област: Хемија животне средине

Development and optimization of analysis of metals in plant materials using wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry (WD-XRF) and comparison with other spectrometry techniques

Abstract

Conventionally used spectrometric techniques for plant analysis (ICP-OES, ICP-MS) usually involve demanding sample preparation procedure that requires the usage of aggressive and toxic chemicals for mineralization, which increases the need for the development of direct analysis techniques. The main goal of this dissertation was development of a method for analysis of elements in plant samples using cellulose as a universal matrix for the production of synthetic calibration standards. WD-XRF spectrometer analytical parameters for analysis of 20 elements (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb, and Bi) have been optimized within this dissertation. Moreover, three methods of analysis have been developed, which are applied depending on the method of preparation of the plant sample pellet for XRF analysis. Method “Pure Cellulose” is applicable for the analysis of pellets made solely from plant material, method “Cellulose with wax” for the analysis of pellets made from the plant material and wax (binder), and method “Thin layer” for the analysis of small amounts of sample.

The basic validation parameters of the developed methods were examined: sensitivity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision (repeatability and intralaboratory reproducibility), and accuracy. In addition to the developed methods, the accuracy examination has been extended to a *UniQuant* standardless method of analysis. In order to assess the potential of the *UniQuant* method and obtain the optimal pellet, the influence of variation of sample preparation parameters on the standardless method was examined.

In the last part of the dissertation, the results obtained using WD-XRF technique (empirical calibration and standardless methods) and conventionally used techniques (ICP-MS, ICP-OES и INAA) were compared. For that purpose, a total of 49 samples of four types of conifer needles were analyzed using all investigated techniques (*Pinus nigra*, *Abies alba*, *Taxus baccata* и *Larix decidua*).

Keywords: multi-elemental analysis, standardless method, cellulose standards, empirical calibration, accuracy, precision, heavy metals, green chemistry, pressed pellets, fundamental parameters

Major scientific field: Chemistry

Specific scientific field: Environmental chemistry

Садржај

1. Уводни део.....	1
2. Општи део.....	4
2.1. Значај анализе биљака	4
2.2. Биоиндикатори и биомонитори	4
2.2.1. Четинарске врсте као биомонитори.....	5
2.3. Избор аналитичке технике за анализу биљака	7
2.4. Припрема узорака.....	9
2.4.1. Минерализација узорка.....	9
2.4.2. Припрема узорака за <i>WD-XRF</i> анализу	10
2.5. Рендгенска флуоресцентна спектрометрија	16
2.5.1. Електромагнетно зрачење.....	16
2.5.1.1. Интеракција рендгенског зрачења са материјом	17
2.5.1.2. Побуђивање	19
2.5.1.3. Секундарно рендгенско зрачење	20
2.5.2. Рендгенско флуоресцентни спектрометри	23
2.5.3. Таласно дисперзивна рендгенско флуоресцентна спектрометрија (<i>WD-XRF</i>)....	23
2.5.3.1. Извори рендгенског зрачења	25
2.5.3.2. Комора спектрометра	26
2.5.3.3. Детектори.....	29
2.5.3.4. Избор аналитичких параметара при анализи	31
2.5.3.5. Ефекти матрикса	35
2.5.3.6. Ефекти изазвани физичким карактеристикама узорка.....	37
2.5.3.7. Методе калибрације.....	38
2.5.3.7.1. Математичке методе калибрације	39
2.5.3.7.2. Компаративне методе калибрације.....	40
2.6. Инструментална неутронска активациона анализа (<i>INAA</i>).....	42
2.7. Масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом (<i>ICP-MS</i>).....	47

2.8. Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом (<i>ICP-OES</i>)	52
3. Циљеви истраживања	57
4. Експериментални део	58
4.1. Припрема биљних узорака за испитивање безстандардне методе (УК)	58
4.2. Оптимизација аналитичких параметара за емпиријску калибрацију <i>WD-XRF</i> спектрометра	60
4.3. Развијање метода <i>WD-XRF</i> анализе биљног материјала	66
4.3.1. Метода „Целулоза“ (Ц)	66
4.3.2. Метода „Целулоза са воском“ (ЦВ)	66
4.3.3. Метода „Танак слој“ (ТС)	67
4.3.4. Припремање синтетичких целулозних стандарда	67
4.3.5. Параметри валидације креираних метода	69
4.3.5.1. Осетљивост	70
4.3.5.2. Линеарни опсег	70
4.3.5.3. Лимит детекције и лимит квантификације	70
4.3.5.4. Прецизност	70
4.3.5.5. Тачност	71
4.4. Припрема реалних биљних узорака	71
4.4.1. Припрема реалних биљних узорака за <i>WD-XRF</i> анализу	72
4.4.2. Припрема реалних биљних узорака за <i>INAA</i> анализу	75
4.4.3. Припрема реалних биљних узорака за <i>ICP-OES</i> анализу	77
4.4.4. Припрема реалних биљних узорака за <i>ICP-MS</i> анализу	77
4.5. Инструменталне технике	77
4.5.1. Таласно дисперзивна рендгенско флуоресцентна анализа, <i>WD-XRF</i>	78
4.5.2. Безстандардна метода <i>UniQuant</i> (УК)	78
4.5.3. Инструменлана неутронска активациона анализа, <i>INAA</i>	79
4.5.5. Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом, <i>ICP-OES</i>	83
4.5.4. Масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом, <i>ICP-MS</i>	83
5. Поставке и специфични циљеви експеримената	84

5.1. Припремање оптималног пелета и утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу (Експеримент 1).....	84
5.2. Одређивање погодних аналитичких параметара за <i>WD-XRF</i> анализу биљног матрикса (Експеримент 2)	85
5.3. Емпиријска калибрација помоћу целулозних стандарда и параметри валидације креираних метода (Експеримент 3).....	86
5.4. Анализа реалних биљних узорака и поређење са другим спектрометријским техникама (Експеримент 4).....	87
6. Резултати и дискусија.....	88
6.1. Утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу (УК)	88
6.1.1 Утицај варијације садржаја везивног средства.....	88
6.1.2. Утицај варијације масе узорка	93
6.1.3. Утицај варијације примењеног притиска пелетирања.....	97
6.1.4. Упоредивање системске и случајне грешке	98
6.2. Одређивање погодних аналитичких параметара за <i>WD-XRF</i> анализу биљног матрикса	100
6.2.1. Натријум.....	101
6.2.2. Магнезијум.....	103
6.2.3. Алуминијум.....	104
6.2.4. Калијум.....	106
6.2.5. Калцијум.....	108
6.2.6. Хром.....	110
6.2.7. Манган	112
6.2.8. Гвожђе.....	115
6.2.9. Кобалт	116
6.2.10. Никл	117
6.2.11. Бакар	119
6.2.12. Цинк	120
6.2.13. Галијум	122
6.2.14. Стронцијум.....	123
6.2.15. Сребро, кадмијум и индијум	125

6.2.16. Бизмут, олово и талијум.....	126
6.3. Емпиријска калибрација <i>WD-XRF</i> уређаја за анализу елемената у биљним узорцима помоћу синтетичких целулозних стандарда.....	129
6.3.1. Осетљивост методе.....	131
6.3.2. Опсег линеарности	132
6.3.3. Лимит детекције и лимит квантификације.....	135
6.3.4. Прецизност: Поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност (УЛР)..	137
6.3.5. Тачност	140
6.3.5.1. Карактеризација тачности на основу анализе синтетичког целулозног референтног материјала	140
6.3.5.2. Карактеризација тачности на основу линеарне регресије	142
6.3.5.3. Карактеризација тачности на основу поређења резултата <i>WD-XRF</i> и <i>ICP-OES</i>	143
6.3.5.4. Карактеризација тачности на основу мерења сертифициваног референтног материјала (СРМ).....	144
6.3.5.5. Карактеризација тачности на основу анализе реалних узорака	146
6.4. Анализа реалних биљних узорака и поређење са другим спектрометријским техникама	148
6.4.1. Поређење техника на основу релативних односа.....	149
6.4.2. Поређење техника на основу упоредног т-теста	153
6.4.3. Поређење техника на основу корелационе анализе	155
6.4.5. Поређење прецизности испитиваних техника	158
7. Закључци.....	161
7.1. Специфични закључци експеримената	161
7.1.1. Закључци експеримента 1 - Припремање оптималног пелета и утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу	161
7.1.2. Закључци експеримента 2 - Одређивање погодних аналитичких параметара за <i>WD-XRF</i> анализу биљног матрикса	162
7.1.3. Закључци експеримента 3 - Емпиријска калибрација помоћу целулозних стандарда и параметри валидације креираних метода.....	163
7.1.4. Закључци експеримента 4 - Анализа реалних биљних узорака и поређење са другим спектрометријским техникама	164
7.1. Општи закључак	166

8. Литература.....	169
Биографија аутора.....	182
Прилог 1.....	186
Прилог 2.....	187
Прилог 3.....	188

1. Уводни део

Биљке су свеprisутне у животу човека. Поред најчешће употребе у исхрани (храна и напаци), човек биљке конзумира у облику медицинских препарата и рекреационих или релаксационих производа (дуван). Од велике је важности карактеризација хемијског састава биљних производа које човек свакодневно конзумира, јер управо биљке могу садржати различите елементе у широким концентрационим опсезима. За пољопривредне биљке хемијска карактеризација даје важне информације о нутритивном статусу биљке што омогућава адекватно планирање биљне исхране. Због способности да усвајају и акумулирају метале, биљке налазе значајну примену у области заштите животне средине, користе се за биоминиторинг загађења животне средине металима и у фиторемедијацији подручја загађених тешким металима. Широка и честа примена биљка чини хемијску анализу биљака изузетно значајном.

Елементарни састав биљака се најчешће одређује употребом конвенционалних спектрометријских техника (*ICP-OES*, *ICP-MS*). Сваку од ових техника карактерише неопходна припрема узорка која подразумева хемијско разарање чврстог матрикса. Поступак разарања чврстог узорка често захтева време, додатну опрему и коришћење токсичних и агресивних хемијских агенаса, што представља главни недостатак ових техника. Развијање и употреба еколошких аналитичких процедура које дају висококвалитетне резултате, а у складу са принципима зелене хемије је велики изазов последњих година. Применом еколошких техника анализе значајно се смањује употреба концентрованих минералних киселина (HNO_3) и техничких гасова (аргон) потребних за минерализацију узорка, енергије која се утроши за рад опреме неопходне за припрему узорка (микроталасна пећница) или самих спектрометара (плазма спектрометра). Све претходно наведено даје предност аналитичким техникама које анализу обављају директно на чврстом узорку.

XRF је добро позната техника за мултиелементарну анализу најразличитијих чврстих узорка уз минималну припрему узорка, која се пак не користи у свом пуном потенцијалу при анализи биљног материјала. Ова техника је брза и једноставна, има широк опсег линеарности и ниску цену анализе. Ефикасност *XRF* технике се заснива на једноставности процедуре припреме узорка, која је обично брза и не захтева употребу агресивних хемикалија. Међутим, за адекватну калибрацију спектрометра је неопходно обезбедити одговарајући број сертифицираних референтних материјала са матриксом који одговара матриксу анализираних узорка. Често је доступност одговарајућег стандардног материјала ограничена, посебно када је биљни материјал у питању. Ипак, ово ограничење је могуће превазићи коришћењем спајковане целулозе као универзалног матрикса за припрему калибрационих узорка за емпиријску калибрацију или коришћењем безстандардне методе анализе.

Основни циљ ове дисертације је био развијање методе за анализу елемената у биљном материјалу употребом целулозе као универзалног матрикса за производњу синтетичких стандарда за емпиријску калибрацију и испитивање основних параметара валидације развијене методе (осетљивост, линеарност, лимит детекције, лимит квантификације, прецизност (поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност) и тачност). У оквиру развијања методе, циљ је била оптимизација аналитичких параметара *WD-XRF* спектрометра за анализу 20 елемената (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi). Осим емпиријске методе, циљ је био испитати безстандардну методу анализе *UniQuant* (УК). Како би се сагледао потенцијал УК методе и добио оптималан пелет, испитан је утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу. Коначно, циљ је био упоредити резултате анализе реалних узорака (иглица четинара) добијене *WD-XRF* техником (емпиријском калибрацијом и безстандардном методом) и конвенционално коришћеним техникама (*ICP-MS*, *ICP-OES* и *INAA*).

У Општем делу дисертације дате су теоријске основе како би експериментална поставка, дискусија и закључци били адекватно схваћени. Дат је осврт на значај биљака, посебно њихове примене у биомониторингу. Затим су описани конвенционални поступци хемијске инструменталне анализе биљног материјала. У даљем тексту су дати теоријски основи интеракције рендгенског зрачења са материјом и принцип рендгенске флуоресцентне анализе. Детаљно је описана конфигурација *WD-XRF* спектрометра, принцип одабира аналитичких параметара при анализи, ефекти матрикса и ефекти изазвани физичким карактеристикама узорка, као и методе калибрације *XRF* спектрометра. На крају Општег дела си дати теоријски основи осталих спектрометријских техника коришћених током израде ове дисертације (*ICP-OES*, *ICP-MS* и *INAA*).

У поглављу **Циљеви истраживања** приказани су основни циљеви ове докторске дисертације.

Експериментални део обухвата детаљне информације о поступцима припреме стандарда, пелета и реалних узорака, као и поступка оптимизације аналитичких параметара и калибрације. Дате су детаљне информације о коришћеним хемикалијама и уређајима. Темељно су описане развијене методе, као и испитивани параметри валидације метода. У овом поглављу су дати тачни параметри поставки примењених инструменталних техника.

Поглавље **Поставке и специфични циљеви експеримената** садржи наведене циљеве сваке од четири експерименталних целина, као и детаљна објашњења поставки експеримената.

Поглавље **Резултати и дискусија** је подељено на претходно дефинисане четири експерименталне целине. Прва експериментална целина садржи резултате испитивања утицаја варијације параметара припреме биљног узорка на резултате безстандардне

анализе помоћу *WD-XRF*. У другој експерименталној целини дати су резултати оптимизације аналитичких параметара анализе и предлози оптималних аналитичких параметара за све испитиване елементе. Трећа експериментална целина садржи параметре валидације развијених метода добијених коришћењем синтетичких целулозних стандарда за емпиријску калибрацију и резултате испитивања тачности поменутих метода, као и безстандардне методе. Последња експериментална целина приказује резултате поређења резултата *WD-XRF* анализе и других спектрометријских техника (*ICP-OES*, *ICP-MS* и *INAA*).

У поглављу **Закључци** дати су засебно специфични закључци сваке од експерименталних целина, као и општи закључци докторске дисертације.

Поглавље **Литература** садржи 175 референци које су наведене по абecedном реду.

2. Општи део

2.1. Значај анализе биљака

Човек свакодневно користи разноврсне биљке, пре свега у исхрани (храна и напаци), у облику медицинских препарата, рекреационих и релаксационих производа (дуван). Различити елементи, са широким концентрационим опсезима се могу наћи у свим поменути типовама биљних производа чијим свакодневним конзумирањем човек их може унети у организам у количинама које могу имати токсично дејство. Карактеризација хемијског састава биљних производа које човек свакодневно конзумира је од јако велике важности (Stephens и Calder, 2004, Byers *et al.*, 2019). Уколико се одређена врста биљке пољопривредно производи, хемијска анализа је изузетно значајна јер се фолијарном дијагностиком успешно може проценити нутритивни статус биљке и даље планирати њихова исхрана која би утицала на повећање приноса (значајан је садржај P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn и Zn) (Bueno Guerra *et al.*, 2013, Reidinger *et al.*, 2012, Towett *et al.*, 2016, De Carvalho *et al.*, 2018, Bado *et al.*, 2016). Како биљке показују изузетну способност усвајања и акумулирања метала, често се користе као биомонитори загађења животне средине и са тог аспекта је хемијска карактеризација биљака јако битна (Queralt *et al.*, 2005, Marguí *et al.*, 2005, Abdullah *et al.*, 2011, Anderson *et al.*, 2005). Поред биомониторинга, у области заштите животне средине, биљке налазе примену и у фиторемедијацији подручја загађених тешким металима (Nečemer *et al.*, 2008). С обзиром на широку и честу примену биљака, одабир и развијање адекватних аналитичких поступака за анализу биљака представља значајан задатак.

2.2. Биоиндикатори и биомонитори

Различите људске активности су довеле до појаве потпуно нових супстанци у животној средини или до концентровања садржаја потенцијално токсичних супстанци до количина које су биле незамисливе у прошлости. Овакве промене најчешће имају вишеструке утицаје на природне системе и утичу на саме живе организме. Сматра се да дневно на планети изумре и до 100 врста. Ипак, многе врсте успевају да се прилагоде и подигну свој ниво толеранције на одређене супстанце из животне средине. У зависности од врсте, осетљивост на спољашње утицаје може да варира. Неке врсте могу потпуно нестати у присуству одређених загађујућих супстанци (биоиндикатори), док их неке врсте могу акумулирати (биоакумулатори, биомонитори) и на тај начин се прилагодити. Различити механизми доприносе биоакумулацији, зависно од интеракције између организма и њихове биотичке и абиотичке средине (Markert *et al.*, 2011).

Биомониторинг је регулисано, системско коришћење организама како би се одредио квалитет животне средине. Биоиндикатор је организам, односно део организма

или популација, који нам може пружити информацију о квалитету животне средине или њеног дела. Са друге стране, биомонитор је организам, односно део организма или популација, који нам може пружити квантитативне информације о квалитету животне средине. Биомонитор је увек и биоиндикатор, док биоиндикатор не мора бити и биомонитор (Markert *et al.*, 2011).

Да би се нека врста могла сматрати добрим биомонитором, количина испитиване супстанце у њој мора квантитативно одражавати количину те супстанце у животној средини. Поред тога, добар биомонитор мора бити широко распрострањен, мора имати високу толеранцију на испитивано загађење, као и способност биоакumulације која одговара реалном стању у животној средини (Parma *et al.*, 2016).

Зато су предмет ове дисертације биљке као биоаккумулятори неорганских загађујућих супстанци из животне средине. Поред тога што биоаккумуляција као особина биљака може да се примени у процени стања животне средине, важно је ову особину имати на уму и када су у питању биљке које људи конзумирају. Људи свакодневно употребљавају биљке на различите начине у исхрани, у облику медицинских препарата или као лаке дроге (цигарете). Редовним конзумирањем биљних производа човек може лако бити изложен уносу различитих токсичних елемената, удисањем и кроз исхрану.

2.2.1. Четинарске врсте као биомонитори

Четинарске врсте се користе као пасивни биомонитори атмосферског загађења тешким металима и у неким земљама су од стране надлежних органа прихваћени као стандардно коришћени биоиндикатори (Ћeburnis и Steinnnes, 2000, Pietrzykowski *et al.*, 2014, Juranović Cindrić *et al.*, 2019, Kord и Kord, 2011, Sawidis *et al.*, 2011). Иглице четинара су први пут употребљене за процену стања у животној средини 1971. године када је Америчка комисија за атомску енергију (*United States Atomic Energy Commission*) анализирао садржај урана у полугодишњим иглицама из околине Оук Риџ фабрике за производњу урана процесом гасне дифузије (*Oak Ridge Gaseous Diffusion Plant*) (Bertolotti и Gialanella, 2014).

Иглице четинара испуњавају услове који су неопходни да буду задовољени како би нека врста била добар биомонитор, и то: (1) широко су распрострањени и једноставни за препознавање као врста; (2) релативно је једноставно од њих припремити репрезентативни узорак за анализу; (3) концентрација идентификоване загађујуће супстанце може бити квантитативно пропорционална њеној концентрацији у животној средини, посебно атмосфери.; (4) иглице четинара опстају две, па и више година на биљци што их чини врло стабилним биомониторима током читаве године, како лети, тако и зими.

Четинари су распрострањени широм света, посебно на северној хемисфери, док су једнако заступљени у урбаним и индустријским срединама, у природним шумама, као и на одржаваним стаништима (Al-alawi и Mandiwana, 2007, Serbula *et al.*, 2013, Parzych *et al.*,

2017), што их чини често коришћеним врстама виших биљака за биомониторинг (Ratola *et al.*, 2011, Samecka-Cymerman *et al.*, 2006, Sardans, и Peñuelas, 2005, Skonieczna *et al.*, 2014).



Слика 2.1. Грана четинара на којој се могу видети изданци и иглице старији од годину дана.

Пошто ове врсте не губе своје иглице током јесењих и зимских месеци, загађење је могуће пратити током целе године, што је посебно важно за најкритичнији период када је загађење у питању, зимски период (Bertolotti и Gialanella, 2014). Четинари добијају нове гранчице са иглицама сваке године (изданци) које другачије изгледају у односу на иглице из претходне сезоне (Слика 2.1.). Праћењем система грана и иглица, могуће је направити временску систематизацију иглица. То значи да је посматрањем једног дрвета недвосмислено могуће раздвојити четине по старости и на тај начин раздвојити загађење по годинама. Међутим, као и случају других пасивних биомонитора, четинама се могу пратити усредњене вредности концентрација током дефинисаног временског периода, односно времена излагања загађујућој супстанци. Четинари нису прави избор када се посматра кратак временски период мониторинга (краћи од пар месеци), осим у случају када се прате велики значајни догађаји као што су пожари, вулканске ерупције или догађаји који су узроковали загађење великих размера у кратком временском интервалу.

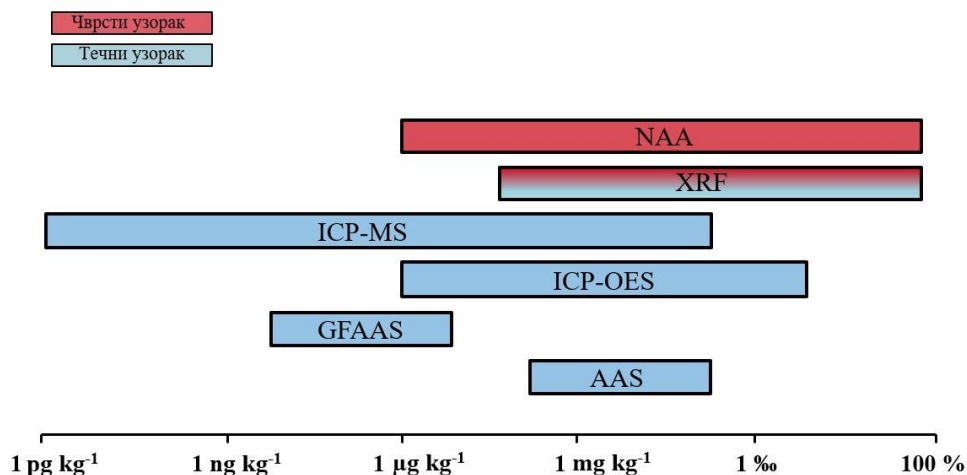
Иглице четинара су значајно ефикасније код хватања честичног загађења у односу на листове листопадног дрвећа, првенствено због своје велике додирне површине. Зимзелене врсте дрвећа апсорбују 35% више компоненти из ваздуха у односу на листопадне врсте само на основу веће додирне површине (Parzych *et al.*, 2017). Поред тога, иглице поседују дебео епикутуларни воскасти слој који успешно везује гасове и честице из атмосфере, посебно оне најситније које су највећа претња по људско здравље (Sun *et al.*, 2010.).

2.3. Избор аналитичке технике за анализу биљака

Када је елементарна анализа биљног материјала у питању, најчешће су коришћене конвенционалне спектрометријске технике као: атомска апсорпциона спектрометрија (*Atomic Absorption Spectrometry - AAS*), атомска апсорпциона спектрометрија са графитном пећи (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry - GFAAS*), индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry – ICP-OES*) и масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – ICP-MS*) (Fifield и Kealey, 1991, Stephens и Calder, 2004, Queralt *et al.*, 2005, Reidinger *et al.*, 2012). Сваку од ових техника карактерише неопходна припрема узорка која подразумева хемијско разарање чврстог матрикса (мокро-хемијски поступак). Овакав начин припреме узорка често није једноставан и захтева одређено време (Kirk *et al.*, 1991, Babos *et al.*, 2018). Биљни матрикс садржи велику количину органске супстанце, па се овакви типови узорака најчешће разарају сувим или мокрим дигестијом (дигестија помоћу јаких киселина).

Сложеност одабира и примене адекватног начина дигестије, као и потреба за употребом зелених технологија повећало је интересовање за развијањем техника које немају компликоване захтеве када је припрема узорка у питању, односно, анализа се обавља директно на чврстом узорку (Guohui и Shouzhong, 1995, Bueno Guerra *et al.*, 2014, Rouillon и Taylor, 2016). Једна таква техника је инструментална неутронска активациона анализа (*Instrumental Neutron Activation Analysis - INAA*) која омогућава директну анализу биљних узорака без претходне припреме (Djingova *et al.*, 1998, Mohammed *et al.*, 2016). Међутим, ова техника поред одличних аналитичких перформанси захтева пуно времена за анализу и приступ нуклеарном реактору, што често није могуће (Polkowska-Motrenko *et al.*, 2000).

Друга техника је рендгенска флуоресцентна спектрометрија (*X-Ray Fluorescence Spectrometry - XRF*) која је брза и једноставна аналитичка техника за мултиелементарну квалитативну, семиквантитативну и квантитативну анализу широког опсега концентрација елемената директно на чврстом матриксу (Perring *et al.*, 2017, Tezotto *et al.*, 2013, Richardson *et al.*, 1995, Blonski *et al.*, 2006, Rinaldoni *et al.*, 2009, Salvador *et al.*, 2002, Turner *et al.*, 2018). Коришћењем ове технике, превазилазе се проблеми припреме узорка, што значајно утиче на брзину анализе, као и на цену (Budak *et al.*, 2006, Ekinici *et al.*, 2004, Fittschen *et al.*, 2017, Perring *et al.* 2007). Поред наведених предности, мана ове технике би била често ниска осетљивост (из тог разлога и низак детекциони лимит) када је анализа важних загађујућих супстанци из животне средине у питању (на пример кадмијум и олово) у односу на најчешће коришћене спектрометријске технике (Mittal *et al.*, 1993, Abdullah, 2011). Ипак, ови системи се константно унапређују што резултује побољшању детекционих лимита, па је то разлог повећаном интересу да се ова техника чешће користи за елементарну анализу узорака из животне средине (Marugi *et al.*, 2009).



Слика 2.2. Шематски приказ опсега линеарности различитих аналитичких техника. у концентрационој скали (NAA, XRF, ICP-MS, ICP-OES, GFAAS).

Поред јасне разлике у начину припреме узорка поменуте технике карактеришу и разлике у аналитичким перформансама. Када је одабир адекватне аналитичке технике у питању, неопходно је дефинисати аналитичке захтеве и сагледати која би техника била у могућности да одговори на исте. То обухвата уважавање пре свега стручних, али и економских аспеката анализе. Важно је прецизирати који су елементи значајни за одређивање, у ком типу матрикса, и у којим опсезима се очекују њихове концентрације (стручни аспекти). На основу тога се бира аналитичка техника, која уз најмању цену анализе (економски аспект) може одговорити на постављене аналитичке захтеве.

AAS је техника која има релативно ниске детекционе лимите, али прилично узак аналитички опсег у односу на друге технике (слика 2.2.). Поред тога, потребна је посебна лампа са шупљом катодом за сваки елемент који се одређује, што значи да ову методу не карактерише мултиелементарност и брзина када постоје захтеви за анализом више елемената. AAS би била одабрана техника када је потребно одређивати мали број елемената у познатим концентрационим опсезима (Hill и Fisher, 2016).

GFAAS је техника коју, поред мултиелементарност, карактеришу и изузетно ниски детекциони лимити, који под одговарајућим условима достижу ниво $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppb) (Irgolic, 1992, Luque de Castro и García, 2002). Међутим, GFAAS техника има прилично узак аналитички опсег и обављање хемијске анализе је јако споро (Frech и Cedergren, 1992).

Када је неопходна анализа великог броја елемената у ширем концентрационом опсегу, ICP-OES и ICP-MS би биле одговарајуће методе. Међутим, цена анализе је значајно већа у односу на AAS и GFAAS. ICP инструменти су вишеструко скупљи, док сложеност система повећава и цену амортизације и одржавања. Поред цене, сложеност инструмента захтева и посебно обучен кадар за адекватно коришћење инструмента. Све три технике се примарно користе при анализи узорака у течном стању, па анализи

обавезно претходи мокро-хемијска припрема узорка која је иста независно од коришћеног уређаја. Припрема узорка повећава цену анализе, али и захтева употребу агресивних и токсичних агенаса, али и отвара могућност контаминације узорака у ниском концентрационом опсегу реда $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppm) и ниже.

У случају када је важно да време анализе буде што краће и да је одређивање мултиелементарно, избор једне од *ICP* техника се обавља се на основу очекиваних концентрација елемента и цене. *ICP-OES* је већ при куповини значајно јефтинија техника у односу на *ICP-MS*, па уколико очекиване концентрације одређиваних елемента нису ниже од $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ нивоа, оптичка емисиона спектрометрија је техника избора. Приликом одабира адекватне спектрометријске методе анализе, јако је важно имати на уму однос цене и квалитета добијеног резултата.

Избегавање утроска времена и финансија за припрему узорка која подразумева разарање постиже се применом једне од техника које за анализу користе чврсте узорке. Јако је ретка ситуација у којој приликом употребе свих поменутих техника није потребна сложена и дуготрајна припрема узорка која, као по правилу, увек почиње са неопходним уситњавањем и хомогенизацијом.

У случају *INAA* и *XRF* уситњен и хомогенизован узорак се даље не разара, већ пресује у пелете или стапа у дискове са литијум боратом (у случају *XRF*). Овакви начини припреме чврстог узорка су једноставни, не захтевају време и употребу додатних хемикалија.

2.4. Припрема узорака

2.4.1. Минерализација узорка

Као што је раније споменуто, припремање узорака за анализу помоћу конвенционалних техника захтева потпуну минерализацију матрикса узорка хемијским путем. Превођење чврстог узорка после уситњавања и хомогенизације у раствор је захтевно у смислу неопходног времена и хемикалија.

Постоје два основна начина минерализације чврстог узорка: сува и мокра минерализација. Сува минерализација представља суво спаљивање узорка на високим температурама и потом растварање остатка након спаљивања, док мокра минерализација подразумева директну дигестију узорка употребом киселина.

Када је мокра дигестија у питању постоје многобројне опције у зависности од тога какви су аналитички захтеви и какав се конкретно матрикс разара. Иако на први поглед делује да је биљни материјал сличног хемијског састава као и други биолошки матрикси из животне средине, као и да је њихово разарање једноставно, то најчешће није случај. Основна разлика је у томе што биљни матрикси садрже значајне концентрације

силицијума (чак до 10%) (Hoenig *et al.*, 1998). Да би се биљни узорак који садржи силицијум потпуно разорио, неопходна је употреба флуороводоничне киселине. Када се флуороводонична киселина употребљава, потребно је обезбедити посебно лабораторијско посуђе и материјал. Не постоји универзална комбинација киселина која ће успешно разарати све биљне матриксе, већ се примењена метода разарања бира на основу захтева који се поставља пред аналитичара (Nascentes *et al.*, 2001, Lavilla *et al.*, 1999, Alvarado *et al.*, 1996, Laing *et al.*, 2003, Baffi *et al.*, 2002, Polkowska-Motrenko *et al.*, 2000, Lambly *et al.*, 1995).

Дигестија у отвореном систему се користи када су једино доступни конвенционални начини загревања као што су водена и пешчана купатила (Sahuquillo *et al.*, 2003). Међутим, дигестија у отвореном систему траје дуго (и до 10 часова), користи се велика количина киселина и може доћи до губитка лако испарљивих анализата (Alvarado *et al.*, 1996). Ови проблеми се превазилазе употребом затворених система за дигестију као што је микроталасна дигестија. Применом микроталасне дигестије се скраћује време разарања, смањује се количина потребних реагенаса. Затворени систем спречава губитак лако испарљивих компоненти и онемогућава контаминацију споља (Smith and Arsenault, 1996).

Избор адекватног начина минерализације узорка не представља једноставну одлуку и потребно је за сваки специфични случај, матрикс и посматрани аналит одредити оптималну комбинацију параметара, што некада зна да буде тешко изводљиво.

2.4.2. Припрема узорака за *WD-XRF* анализу

WD-XRF техником могуће анализирати узорке у чврстом и течном стању. Уколико уређај не поседује конфигурацију за анализу течних узорака (поглавље 2.5.3.), постоје методе припреме којима је могуће течне узорке превести у квази-чврсте узорке (Van Grieken, 1982). Ипак, како су тема ове дисертације узорци у чврстом стању, о њима ће посебно бити речи.

Обезбеђивање адекватне припреме узорка је први корак ка добијању тачних и прецизних резултата. У неким случајевима је могуће потпуно избећи припрему узорка. Уколико је чврст узорак хомоген, адекватних димензија и поседује равну површину која би се изложила рендгенском зрачењу, могућа је анализа без икакве претходне припреме (Buhrke *et al.*, 1999, Gržetić *et al.*, 2016). Понекад је потребно абразивним средством исполирати површину која се анализира ради добијања глатке површине или ради уклањања површинског слоја кородираниог матрикса. Такав је случај када су у питању метали и легуре (Beckhoff, 2006).

Много је чешћи случај када су узорци хетерогени и неопходно је да прођу кроз озбиљнији поступак припреме. То су најчешће геолошки, индустријски и биолошки материјали. Тада је неопходно узорак прво уситнити до праха што мање димензије

честица, униформне величине како би се избегли ефекти који настају услед различите величине честица. Узорак, најчешће мале масе, који ће се користити за анализу, мора бити репрезентативан за цео скуп који често може износити и пар тона (слика 2.3.) (Injuk и Van Grieken, 2006).



Слика 2.3. Шематски приказ како анализирани слој треба да буде репрезентативан за цео узорак.

Обично се за уситњавање користе различити типови млинова у зависности од чврстоће материјала који се уситњава и жељене коначне величине честица. Тврди и крти узорци захтевају велики притисак и дробљење, док еластични и меки узорци захтевају уситњавање у виду сецкања.

Током процеса уситњавања јако је важно бити свестан могуће контаминације. Иако су материјали од кога су начињени млинови и блендери јако тврди и отпорни на хабање, ипак до хабања долази. Аналитичар мора водити рачуна да се узорак што мање контаминира материјалом млина. Уколико се млин користи за уситњавање већег броја узорка у кратком временском периоду, јако је важно пратити адекватну процедуру чишћења апаратуре за уситњавање како би се контаминација узорка претходним узорком свела на минимум. У табели 2.1. је приказана могућа врста контаминације у односу на то од ког је материјала начињен коришћени млин.

Табела 2.1. Приказ могућих контаминација узорка у зависности од материјала коришћеног млина. (Schramm, 2012)

Материјал уређаја за уситњавање	Могућа контаминација узорка
Волфрам карбид	Wc, Co, Ni
Цирконијум оксид	ZrO ₂ , Y ₂ O ₃
Ахат	SiO ₂
Каљени челик	Fe, Cr, Mn, C, Si
Нерђајући челик	Fe, Cr, Mo, Mn, C, Si

Након добијања уситњеног, хомогеног и репрезентативног узорка, постоје два основна начина третирања праха у циљу добијања узорка за рендгенску анализу (Rudman, 1999):

- (1) Стапање у дискове;
- (2) Пелетирање.

Стапање у дискове: Узорци који нису лако растворни, који се тешко могу изнова стапати и имају тенденцију да остану делимично хетерогени чак и након уситњавања, су погодни за припрему путем стапања у дискове. Током овог поступка се уситњен узорак меша са натријум или литијум тетраборатом у одговарајућем односу. Најчешћи однос топитеља и узорка је 4:1, што значи да узорак бива вишеструко разблажен, па постоји бојазан да ће се елементи у траговима након разблажења наћи испод детекционог лимита (Rose *et al.*, 1963). Ипак, овим начином припреме се добијају узорци коју су јако хомогени, са потпуно равном површином која се анализира и таквом структуром која искључује утицај матрикса (слика 2.4.).



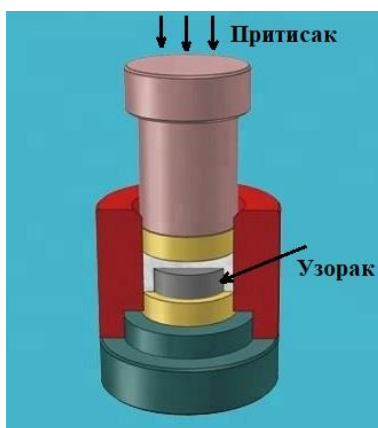
Слика 2.4. Стопљени дикови.

Након што се узорак сједини са одговарајућом количином топитеља, смешта се у тиглове који су начињени од платине, никла или кварцног стакла (Beckhoff, 2006). Неопходно је да тиглови буду од инертног материјала који остаје чврст и на јако високим температурама. Стапање се обавља на температурама од 800 до 1200 °C. Након стапања, узорак се излива у калупе истог материјала од ког су направљени тиглови. Током хлађења, материјал пролази кроз фазне прелазе и очвршћава у структуру сличној стаклу. Читав поступак захтева одређено време и улагање енергије, посебно уколико је процес мануелан. У скорије време је поступак потпуно аутоматизован, па је могуће лако контролисати услове и омогућити стапање већег броја узорака истовремено (слика 2.5.).



Слика 2.5. Приказ аутоматских система за стапање дискова.

Пелетирање: Процесом пелетирања се честице прашкастог узорка заузимају компактнију структуру. Пелетирање се примењује у случајевима када је прашкаст узорак који се анализира хомоген и униформне величине честица, као и када узорак не трпи високе температуре током припреме (Bennett и Graham, 1993). Уређаји који се притом користе су пресе које могу примењивати одговарајући притисак мануелно или аутоматски. Комерцијално доступне пресе обично имају калупе за пелете различитих пречника (од 10 до 40 mm, најчешће 32) и различитих притисака (до 30 тона) (Слика 2.6.).



Слика 2.6. Приказ калупа пресе са узорком

Притисак који се примењује на узорак и време трајања се одређују искуствено у зависности од врсте узорка. Постоје узорци који лако дају стабилне и компактне пелете. Међутим, много је учесталије да се пелет након отпуштања притиска убрзо распадне и

окруни. Из тог разлога, често се додаје везивно средство које слепљује честице узорка што резултује добијањем стабилнијег пелета који није склон ломљењу.

Везивна средства су супстанце сачињене од елемената малог атомског броја или органске материје, и то: борна киселина, восак, целулоза, уреа, итд. Везивно средство мора бити инертно, транспарентно за рендгенско зрачење и са минимално примеса. Количина везивног средства се одређује у зависности од врсте материјала и концентрације елемената који се одређују. Количина треба да буде таква да пелет који се добије буде што компактнији и стабилнији, а утицај разблажења сведен на минимум. Обично је оптимална количина везивног средства око 20 %, мада је најбоље за сваки посебан тип узорка емпиријски одредити идеалне параметре за припрему.

Поред количине везивног средства, маса узорка је јако важан параметар (Sitko, 2009). Примарно флуоресцентно рендгенско зрачење интерагује са атомима узорка и побуђује их. Током релаксације се емитује секундарно карактеристично зрачење које треба да напусти узорак на свом путу ка детектору. На одређеним дубинама, секундарно зрачење бива апсорбовано од стране атома матрикса и не успева да напусти узорак. На тој дубини није могуће одређивати садржај елемената у узорку. Она дубина са које је секундарно карактеристично зрачење у могућности да напусти узорак са 99,9 % интензитета се назива *дубина продирања* рендгенског зрачења (Eichert, 2020).

Дубина продирања се повећава са атомским бројем и не зависи од врсте рендгенске цеви, већ само од матрикса узорка. Уколико је матрикс сачињен од елемената малог атомског броја, овакав матрикс је транспарентан за рендгенско зрачење, па је дубина продирања велика. Како се повећава атомски број елемента који се одређује, његова дубина продирања се повећава у истом матриксу. Рецимо, дубина породирања зрачења за натријум у графитном матриксу би износила 16 μm , док би за баријум била 13,1 cm (табела 2.2.).

У матриксу сачињеном од елемената већег атомског броја, дубина продирања ће се и даље повећавати са повећањем атомског броја одређиваног елемента, али ће вредности бити мање у односу на дубине продирања истих елемената у лакшем матриксу. Уколико би се два елемента из претходног примера одређивали у оловном матриксу, дубина продирања за натријум би износила 0,9 μm , а за баријум 242 μm .

У табели 2.2. су приказане вредности дубина продирања за велики број елемената и четири врсте матрикса (графит, силицијум диоксид, гвожђе и олово). Може се уочити да се при одређивању прелазних метала у лакој матриксу, као што је графит, дубина продирања мери у милиметрима, док би за одређивање истих елемената у некој оловној легури дубина продирања износила свега десетак микрометара. Јако је важно водити рачуна о овим информацијама када је припрема узорка у питању како би се обезбедила већа дебљина узорка у односу на критичну дубину продирања.

Табела 2.2. Максимална дубина продирања зрачења једног елемента у различитим матриксама, за 99,9 % интензитета зрачења. Јединице за најсветлија сива поља су микрометри, нешто тамнија милиметри и најтамније су центриметри (Schramm, 2012)

Линија елемента	Графит	SiO ₂	Fe	Pb
B K α	5	1	0,3	1
F K α	5	3	4	0,7
Na K α	16	10	0,9	0,9
Mg K α	27	16	1,5	1,5
Al K α	45	26	2	2
Si K α	72	40	4	3
P K α	111	17	5	5
S K α	167	24	8	6
Cl K α	243	34	11	2
K K α	494	65	21	3
Ca K α	684	88	28	4
Ti K α	1,3	156	47	6
V K α	1,7	204	61	8
Cr K α	2,2	263	77	10
Mn K α	2,8	338	96	12
Fe K α	3,6	430	119	15
Co K α	4,5	541	146	18
Ni K α	5,7	675	23	22
Cu K α	7,1	838	28	26
W L α	8,0	949	31	29
Zn K α	8,7	1	33	32
Au L α	1,2	1,5	46	42
Ge K α	1,3	1,5	48	44
Pb L α	1,5	1,9	57	52
Zr K α	4,4	6,0	176	43
Mo K α	5,5	8,0	234	47
Rh K α	7,3	1,2	355	70
Ag K α	8,5	1,6	460	89
Ba K α	13,1	4,0	1,3	242

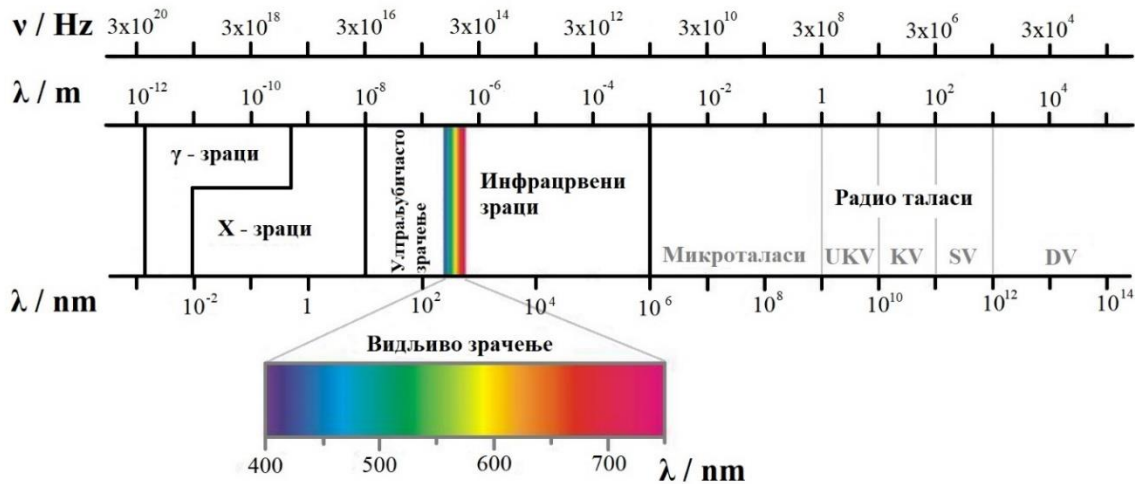
2.5. Рендгенска флуоресцентна спектрометрија

2.5.1. Електромагнетно зрачење

Електромагнетно зрачење представља комбинацију осцилујућег електричног и магнетног поља, и може се интерпретирати и као честица и као талас (Lewis и Lim, 2013). Носилац овог зрачења је честица која се назива *фотон*. Енергија фотона је директно везана за таласну дужину и учесталост (фреквенцију) таласа. Што је већа учесталост таласа, то је таласна дужина мања, а енергија електромагнетног зрачења већа. Из тога следи да је таласна дужина електромагнетног зрачења обрнуто сразмерна енергији. Једначина 2.1. описује везу између енергије и таласне дужине електромагнетног зрачења.

$$E = hc/\lambda \quad \text{или} \quad \lambda [\text{nm}] = 1,24/E[\text{keV}] \quad \text{једначина 2.1.}$$

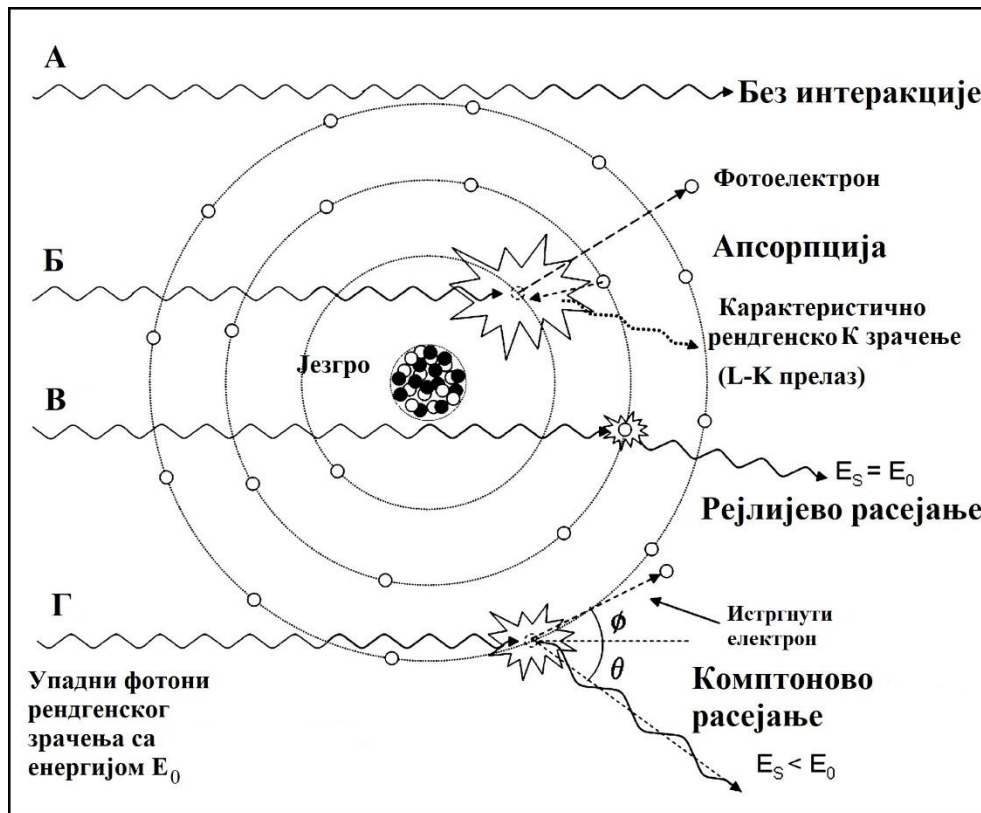
Електромагнетни спектар (слика 2.7.) се може поделити на гама, рендгенско, ултраљубичасто, видљиво, инфрацрвено, микроталасно зрачење и радиоталасе (набројано од највеће енергије ка најмањој) (Verhey и Petti, 2010). Рендгенско зрачење (X-зрачење) креће се од 10 nm таласне дужине па до гама дела спектра (0,01 до 10 nm) (Hellmut и Melba, 2020) Када су спектрометријске методе анализе у питању, део рендгенског спектра који се најчешће користи се простире између 0,02 и 1 nm (1 до 50 keV). Ове енергије се могу користити за побуђивање атома јер одговарају везивним енергијама електрона у унутрашњим њускама атома (K, L, M нивои).



Слика 2.7. Подела електромагнетног спектра (прилагођено према Electromagnetic Radiation. 25 Aug. 2020).

2.5.1.1. Интеракција рендгенског зрачења са материјом

Када рендгенско зрачење пролази кроз материју, може интераговати на више начина (слика 2.8.). Фотони могу проћи без интеракције, бити апсорбовани или расути.

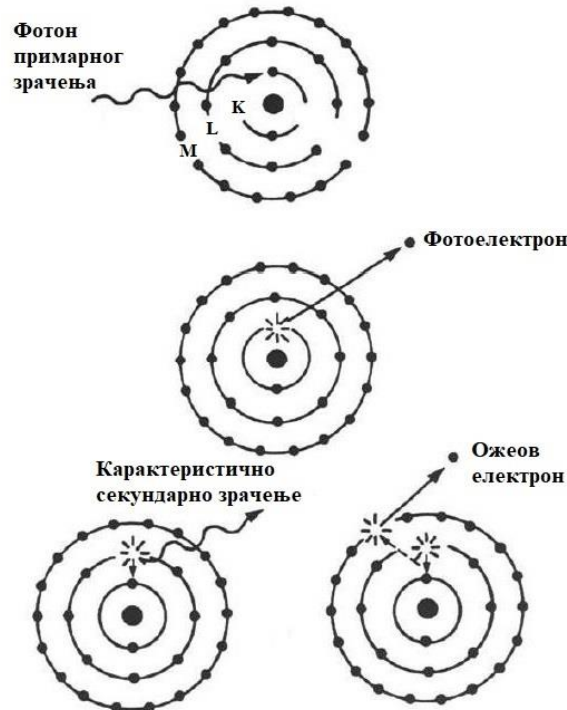


Слика 2.8. Шематски приказ могућих интеракција упадног рендгенског зрачења са материјом (атомом).

(прилагођено према Terzano, 2019)

Приликом апсорпције рендгенског зрачења, са аспекта аналитичке хемије, фотоелектрични ефекат је најзначајнији процес који се дешава. У фотоелектричном процесу, фотон рендгенског зрачења који има довољну енергију ексцитује електрон из унутрашње љуске атома. Упадни фотон део своје енергије троши на раскидање везе електрона са језгром, и та енергија је једнака везивној енергији поменутог електрона. Остатак енергије упадног фотона се предаје ексцитованом електрону у виду кинетичке енергије која је потребна како би он (*фотоелектрон*) потпуно напустио атом. Из тог разлога се овај процес назива *фотоелектрични ефекат* (слика 2.9.). Јон настао након што фотоелектрон напусти атом поседује упражњено место у унутрашњој љусци. Овакво стање је енергетски неповољно за атом који тежи да заузме стабилнију конфигурацију (Cheremisinoff, 1996). Из тог разлога, електрон са вишег енергетског нивоа прелази и заузима упражњено место при чему се емитује фотон енергије која одговара разлици енергија ова два нивоа између којих се дешава прелаз. Карактеристично зрачење које

настаје има енергију у рендгенском делу спектра и назива се *флуоресцентно зрачење* (Potts и Webb, 1992).



Слика 2.9. Шематски приказ фотоелектричног ефекта и процеса стварања Ожеовог електрона.

Пошто се приликом примене ове технике рендгенско зрачење користи и за побуђивање и за детекцију, важно је терминолошки их одвојити и адекватно дефинисати. *Примарно зрачење* је оно зрачење које настаје у рендгенској цеви или неком другом извору и користи се за побуђивање, док је карактеристично флуоресцентно зрачење које настаје током релаксације *секундарно зрачење*.

Поред флуоресцентног секундарног зрачења, дешава се и процес настајања *Ожеових електрона* (*Auger-ovih*). Ожеови електрони настају када секундарно флуоресцентно зрачење избије електрон из виших нивоа истог атома (Smallman и Ngan, 2014). Када су лакши елементи у питању, у току релаксације атома, доминантан је процес стварања Ожеових електрона у односу на рендгенску флуоресценцију. Код елемената са већим атомским бројем је вероватније је емитовање карактеристичног рендгенског зрачења.

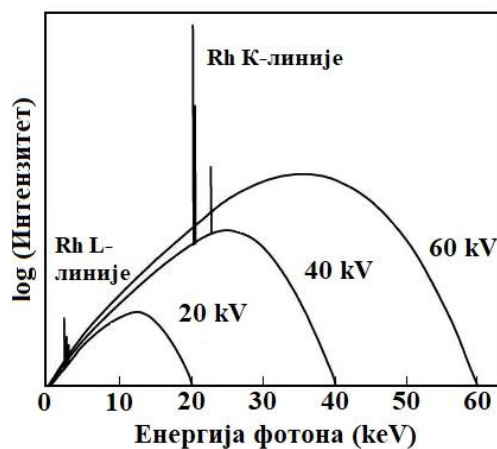
Уколико упади фотон примарног зрачења нема довољну енергију (енергија фотона не превазилази везивну енергију унутрашњих електрона), тај фотон ће бити апсорбован од стране атома и процес који се том приликом дешава се назива *фотоелектрична апсорпција*.

Расипање (ресејање) је други могући начин интеракције рендгенског зрачења са материјом које настаје када упадни фотон промени правац кретања (Darvell, 2018). У

зависности од тога да ли се енергија фотона након интеракције са материјом мења, разликујемо два типа расејања, *еластично* и *нееластично*. Еластично или *Рејлијево расејање* (*Rayleigh scattering*) настаје након интеракције фотона и електрона, при чему фотон мења само правац, али не и енергију. Нееластично или *Комптоново расејање* (*Compton scattering*) настаје када електрон након интеракције са материјом мења свој правац, али и губи део своје енергије, па се енергије упадног и емитованог фотона разликују, иако је то у суштини исти фотон (Gržetić 1997).

2.5.1.2. Побуђивање

Горе споменути начин побуђивања атома фотонима рендгенског зрачења се назива *таласно побуђивање*. Осим електромагнетним зрачењем, побуђивање се може дешавати и уз помоћ честица и то је онда *корпускуларно побуђивање*. Управо корпускуларно побуђивање се најчешће користи за добијање примарног рендгенског зрачења у рендгенској цеви. Сноп електрона бива убрзан у пољу високог напона и након удара у одређени материјал емитује се широк спектар фотона различитих таласних дужина у рендгенском делу електромагнетног спектра. Електрони који су усмерени ка материјалу бивају нагло успорени и резултат њихове интеракције са електронима из омотача атома материјала је такозвани *кочни спектар* (*Bremsstrahlung*) (Jenkins, 1999). Емитује се континуални спектар који садржи фотоне различитих таласних дужина и дискретне суперпониране карактеристичне линије атома материјала са којим електрони интерагују (слика 2.10.). Повећање напона примењеног напона помера максимум континуума ка нижим таласном дужинама (већим енергијама).



Слика 2.10. Приказ зависности облика кочног спектра у односу на примењен напон. На слици су приказане суперпониране карактеристичне линије материјала аноде (Rh - родијум).

2.5.1.3. Секундарно рендгенско зрачење

Као што је раније споменуто, карактеристично секундарно зрачење настаје након што се избаци електрон из унутрашње љуске атома и електрон са вишег енергетског нивоа заузме упражњено место. Сваки атом периодног система елемента има различити број протона у језгру, па је сваки електрон у атому везан карактеристичном везивном енергијом у зависности од елемента и енергетског нивоа. На основу тога знамо да су разлике у енергији различитих енергетских нивоа карактеристичне за сваки елемент периодног система (Jenkins, 1999). Из тог разлога, ако смо у могућности да одредимо енергију емитованог секундарног флуоресцентног фотона, бићемо у могућности да квалитативно одредимо садржај елемента. Међутим, након излагања елемента примарном зрачењу, не дешава се само један прелаз и ослобађање само једног фотона секундарног карактеристичног зрачења. Напротив, дешава се ослобађање читавог спектра прелаза и линија карактеристичних за одређени елемент (Elam *et al.*, 2002).

Уколико се прелаз дешава са L љуске на K љуску, такав прелаз ће се називати K прелаз. Док уколико имамо $M - L$ прелаз, називаћемо га L прелаз. У табели 2.3. приказани су могући прелази и њихова *IUPAC* (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - Међународна унија за чисту и примењену хемију) и *Siegbahn* имена. Осим енергије, односно таласне дужине, за све прелазе је карактеристичан и њихов релативни однос.

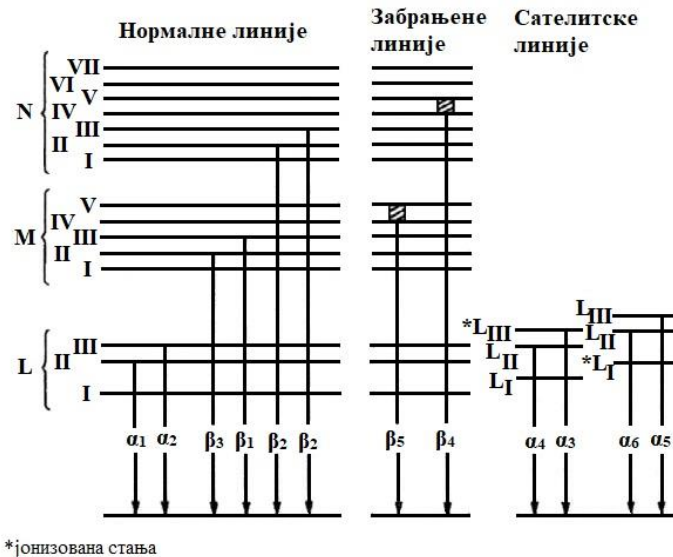
Табела 2.3. *IUPAC* и *Siegbahn* имена могућих прелаза.

<i>Серије</i>	<i>IUPAC</i> номенклатура	<i>Siegbahn</i> номенклатура	<i>Релативни интензитети</i>
<i>K</i> - линије	K-L ₃	Kα ₁	100
	K-L ₂	Kα ₂	~50
	K-M ₃	Kβ ₁	~17
	K-M ₂	Kβ ₃	~8
<i>L₃</i> - линије	L ₃ -M ₅	Lα ₁	100
	L ₃ -M ₄	Lα ₂	~10
	L ₃ -M _{4,5}	Lβ _{2,15}	~25
	L ₃ -M ₁	Lγ	~5
	L ₃ -N ₁	Lβ ₆	~1
<i>L₂</i> - линије	L ₂ -M ₄	Lβ ₁	100
	L ₂ -N ₄	Lγ ₁	~20
	L ₂ -M ₁	Lη	~3
	L ₂ -O ₁	Lγ ₆	~3
<i>L₁</i> - линије	L ₁ -M ₃	Lβ ₃	100
	L ₁ -M ₂	Lβ ₄	~70
	L ₁ -N ₃	Lβ ₃	~30
	L ₁ -N ₂	Lβ ₂	~30
<i>M</i> - линије	M ₅ -N ₇	Mα ₁	
	M ₅ -N ₆	Mβ ₁	
	M ₅ -N ₆	Mβ ₂	

IUPAC називи приказују између којих се нивоа и поднивоа дешавају прелазима електрона, док *Siegbahn* називи поједностављују *IUPAC* називе. По *Siegbahn* нумерклатури се одређеном прелазу додељује име тако што се пре свега означи слово нивоа на којем електрон попуњава упражњено место. Па тако, при $K-L_3$ или $K-M_3$ прелазима ће прво слово бити K јер електрони у оба случаја прелазе на K ниво. У случају L_3-M_5 или L_2-N_4 би прво слово прелазу било L , јер се попуњава упражњено место на L љусци. На основу под нивоа између којих се дешавају прелазима, додељује се индекс у виду слова грчког алфавета и броја ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_3, \gamma_1$) (Jenkins, 1991).

Сваки атом има велики број електрона који могу бити ексцитовани, и велики број могућих начина релаксације. Током озрачивања је јако велики број атома је укључен у ексцитацију, на тај начин и велики број електрона. У сваком тренутку дешава се изразито велики број деексцитација. Сви могући начини релаксације се могу описати одређеним селекционим правилима и могу се поделити на нормалне, забрањене и сателитске прелазе (слика 2.11.) (Agarwal, 1991).

Већина прелазу је нормална, док се они прелазу који не подлежу основним селекционим правилима називају забрањени прелазу. Ови прелазу се дешавају на спољним љускама на којима разлика у енергијама орбитала није тако оштра (β_4 и β_5). Сателитске линије настају услед прелазу током кратких двоструких јонизација, које трају довољно дуго да мењају везивне енергије електрона, па на тај начин и прелазу (Edwards, 1970). На пример, уместо емитовања пара линија $K\alpha_1$ и $K\alpha_2$, двоструко јонизовани атом може потенцијално да емитује пар линија $K\alpha_3$ и $K\alpha_4$.



Слика 2.11. Шематски приказ нормалних, забрањених и сателитских линија.

2.5.2. Рендгенско флуоресцентни спектрометри

Код рендгенске флуоресцентне анализе могуће је направити грубу поделу спектрометара и то на:

- (1) Таласно дисперзивне, *WD (Waveleinght Dispersive)*;
- (2) Енергетско дисперзивне, *ED (Energy Dispersive)*;
- (3) Преносне *PXRF (Portable)*.

Сви споменути *XRF* уређаји раде по принципу истих физичких закона интеракције рендгенског зрачења са материјом (Jenkins, 1999). Разлике настају у конфигурацији уређаја (Marguí и Van Grieken, 2013). Сва три типа уређаја се састоје из извора зрачења и спектралног дела уређаја. Пре свега, поменуте *XRF* технике се разликују на основу извора зрачења. Преносни уређаји најчешће имају радиоактивни извор зрачења или минијатурне цеви мале снаге. *ED* и *WD* уређаји користе рендгенску цев као извор примарног зрачења које се разликују по снази и материјалу од ког је сачињена анода. Таласно дисперзивни системи имају снажније цеви у односу на енергетско дисперзивне системе. Са повећањем снаге цеви, повећава се моћ побуђивања спектрометра.

Када је спектрални део уређаја у питању, осим димензија, *ED* и преносни системи се готово не разликују. Након релаксације, добијено секундарно карактеристично рендгенско зрачење доспева до детектора, најчешће до полупроводничког детектора (често Si(Li) детектори). Када је таласно дисперзивни систем у питању, спектрални део је нешто сложенији (Kirkbride, 2000). Како је *WD* спектрометар предмет ове дисертације, он ће детаљније бити описан у даљем тексту.

2.5.3. Таласно дисперзивна рендгенско флуоресцентна спектрометрија (*WD-XRF*)

Таласно дисперзивни рендгенско флуоресцентни спектрометар се састоји од (слика 2.12.):

- (1) Извора рендгенског зрачења;
- (2) Коморе спектрометра;
- (3) Тандема детектора.



Слика 2.12. Шематски прилаз таласно дисперзивно рендгенско флуоресцентног спектрометра. (прилагођено према Gauglitz и Vo-Dinh, 2003)

WD-XRF се најчешће користи за анализу узорка у чврстом стању. Примарно зрачење настаје у рендгенској цеви, доспева до елемената узорка, који бивају побуђени. Након релаксације, емитовано секундарно карактеристично зрачење доспева у комору спектрометра. У комори спектрометра се налазе примарни колиматори који само паралелне рендгенске зраке усмеравају на дифракциони кристал. На кристалу се дешава дифракција након које само зрачење одређене таласне дужине бива усмерено преко секундарних колиматора до једног од два детектора. Сви поменути делови уређаја и процеси који се на њима дешавају ће бити детаљније описану у даљем тексту.

Унутар самог уређаја је обично вакуум јер се на тај начин обезбеђују високе перформансе анализе. Могуће је радити у атмосфери ваздуха или хелијума, али би у том случају и примарно и секундарно рендгенско зрачење интераговало са атомима из ваздуха, односно инертног гаса. Вакуум пумпе обезбеђују притисак мањи од 10 Pa унутар спектрометра. Упркос вакууму, примена уређаја није ограничена само на чврсте узорке. Уколико се обавља анализа прахова или течности, унутар спектрометра се обезбеђује

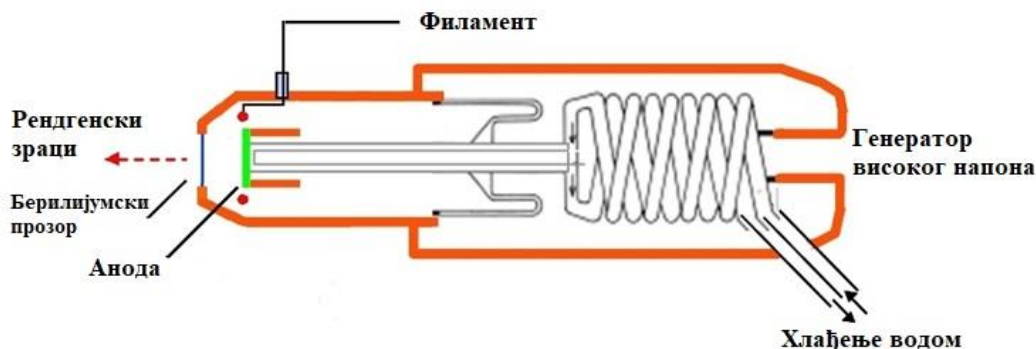
атмосферски притисак увођењем инертног гаса, најчешће хелијума. Хелијум је елемент који није могуће одређивати овом техником, па из тог разлога не интерагује са рендгенским зрачењем у значајној мери. Ипак, приликом коришћења хелијума, резултати се коригују за одређени фактор.

Узорак се прво уводи у предкомору у којој се примарно постиже вакуум, тек се након тога убацује у спектрометар и поставља у позицију изнад цеви. *WD-XRF* спектрометри најчешће имају такву геометрију да је цев постављена испод узорка, мада постоје и уређаји са обрнутом геометријом (цев је изнад узорка).

2.5.3.1. Извори рендгенског зрачења

Током примене рендгенске флуоресцентне анализе постоје четири основна извора рендгенског зрачења, и то:

- (1) Затворене рендгенске цеви;
- (2) Радиоактивни извори;
- (3) Ротирајуће рендгенске цеви;
- (4) Синхротроно зрачење.



Слика 2.13. Приказ попречног пресека затворене рендгенске цеви.

Најчешће коришћени извори рендгенског зрачења су затворене рендгенске цеви, и одмах затим радиоактивни извори (Janssens, 2004, Mairinger, 2004). Рендгенска цев је обично цилиндричног облика и садржи волфрамово влакно (слика 2.13.). Влакно се загрева пропуштањем струје и термојонском емисијом отпушта електроне у вакууму. Унутар цилиндра је поље високог напона и услед деловања овог поља електрони бивају убрзани ка аноди (корпускуларно побуђивање). Анода је слој метала високе чистоће и најчешће је начињена од једног од метала: хрома, родијума, волфрама, молибдена, палладијума и других елемената. Након судара усмерених електрона са анодом, генерише се кочни спектар са суперпонираним карактеристичним рендген-емисионим линијама анодног материјала. Настали кочни спектар се састоји од зрачења широког опсега

таласних дужина, али је он по интензитету далеко слабији од суперпонираних рендген-емисионих линија. Кочни спектар се уједно доста апсорбује током проласка кроз берилијумов прозор којим је катодна цев одвојена од спектрометарске коморе тако да се из катодне цеви добија скоро монохроматско енергетско зрачење високе енергије (Ка линије тешког метала) па је њиме могуће ексцитовати елементе најразличитијих атомских маса у узорку. Како би се добио интензивнији сноп зрачења, потребно је користити аноду од метала што већег атомског броја.

Када су рендгенске цеви намењене за таласно дисперзивни уређај у питању, најчешће се користе оне са снагом око 3 kW. Дефинисана снага се постиже подешавањем напона (10-80 kV) и струје (30-120 mA).

Интересантно је напоменути да је ефикасност рендгенске цеви јако мала и само 1 до 2 % уложене енергије бива конвертован у рендгенско зрачење. Остатак од 98 % бива емитован у виду топлотне енергије. Огромна количина ослобођене топлотне енергије је довољна да истопи материјал аноде. Из тог разлога се у неким случајевима користе цеви са ротирајућом анодом. На тај начин сноп електрона увек бива усмерен ка новој површини аноде која не стигне да се прегреје. У случају затворене рендгенске цеви, неопходан је систем који константним протоком воде хлади аноду. Овакав вид хлађења цеви није неопходан код цеви мањих снага (до 1000 W) које се често налазе у енергетско дисперзивним уређајима.

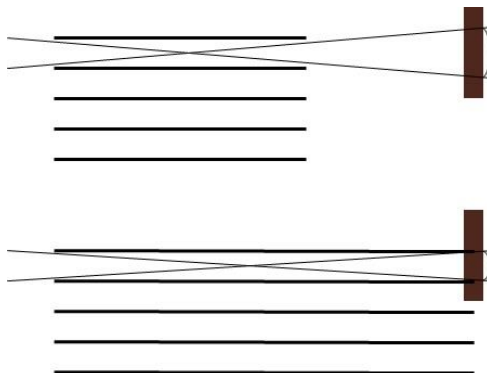
Као што је раније поменуто, примарно рендгенско зрачење се састоји из кочног спектра и суперпонираних карактеристичних линија материјала аноде. Карактеристично зрачење елемената материјала аноде може ометати одређивање елемената чије се карактеристичне линије налазе у и истом делу спектра. Из тог разлога између узорка и цеви обично постоје филтери примарног зрачења који се користе у случају када је потребно одређивати елементе које омета присуство карактеристичних линија анодног материјала у примарном рендгенском снопу.

2.5.3.2. Комора спектрометра

Сноп примарног рендгенског зрачења из цеви доспева на површину узорка. У атомима узорка се дешавају раније поменути процеси као последица њихове интеракције са рендгенским зрачењем. Са аналитичке тачке гледишта, важан је фотоелектрични ефекат и ослобађање секундарног карактеристичног рендгенског зрачења.

Секундарно карактеристично зрачење даље улази у комору спектрометра. У комори спектрометра секундарно зрачење прво наилази на примарни сет колиматора. Колиimator је сет паралелних плоча дефинисаног размака и дужине (слика 2.14.). Колиmатори служе да спрече ширење снопа зрачења (Haschke и Boehm, 2017). Што су плоче колиmатора на већој раздаљини, то је мања селективност и већи интензитет зрачења

које долази са колиматора. Што су плоче колиматора дуже, то је добијени сноп мање расејан. Утицај карактеристика колиматора је објашњен у поглављу 2.5.3.4. Секундарни колиматор се налази између кристала и детектора. За разлику од примарног сета колиматора, постоји само један секундарни колиматор.



Слика 2.14. Шематски приказ колиматора.

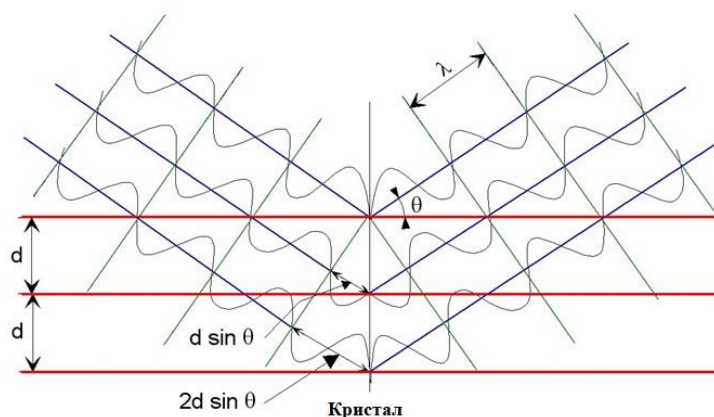
Након колиматора, само сноп са паралелним зрацима наставља пут ка детекторском систему. Детекторски систем у таласно-дисперзивном спектрометру се састоји од дифракционог кристала и самог детектора који су покретни и функционално повезани.

Рендгенски зраци који се емитију са површине узорка су полихроматски (воде порекло од свих елемената који се налазе у узорку) падају на кристал којим желимо да окарактеришемо пристигло зрачење.

Кристал представља уређену структуру која има дефинисан распоред хемијских врста у простору. Основна величина која дефинише кристал је интерпланарно растојање d (слика 2.15.). Када полихроматско зрачење доспе на површину кристала дефинисаног растојања d , свака таласна дужина λ ће се дифрактовати под одређеним углом θ . Дифракција је описана Браговим (*Bragg*) законом и једначином 2.2 (Kramar, 1999):

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

једначина 2.2.



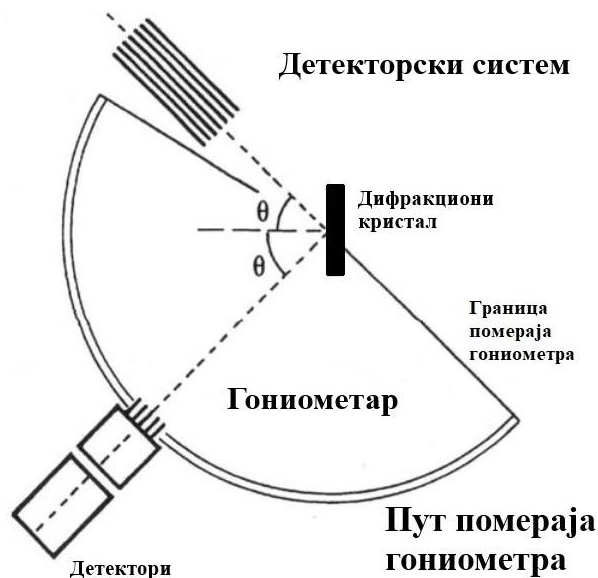
Слика 2.15. Приказ дифракције рендгенског зрачења на кристалу.

Затим, угаона дисперзија зрачења је описана следећом једначином:

$$d\theta/d\lambda = n/2d \cos \theta \quad \text{једначина 2.3.}$$

Из једначине 2.3. се може уочити да је угаона дисперзија обрнуто пропорционална растојању d . Да би се издвојио зрак одређене таласне дужине, кристал се позиционира у односу на упадни зрак под углом θ , док детектор заузима угао 2θ .

Како би се обезбедио неопходан положај углова θ и 2θ користи се *гониометар* (слика 2.16.). Гониометар је кружна покретна осовина која омогућава позиционирање кристала и детектора под одређеним дефинисаним угловима у односу на упадно зрачење (Potts, 2005).



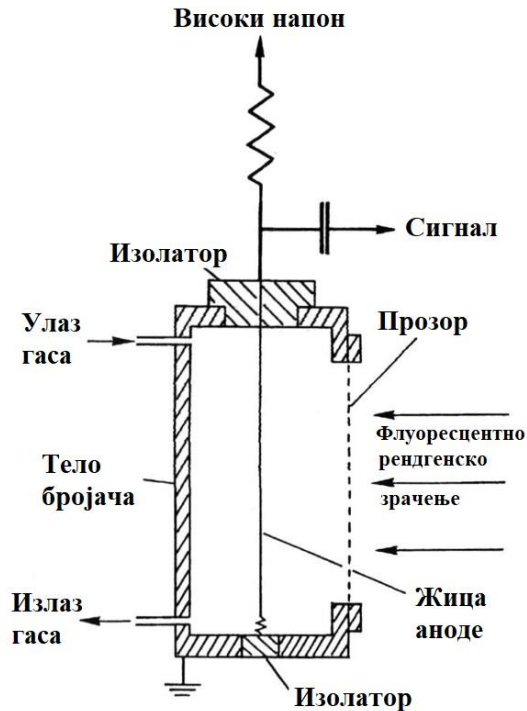
Слика 2.16. Шематски приказ гониометра. (прилагођено према Gauglitz и Vo-Dinh, 2003).

Један кристал дефинисаног растојања d не може да задовољи опсег таласних дужина које би одговарале карактеристичним линијама свих елемената периодног система. Зато је неопходно користити више од једног кристала како би се обезбедила дифракција одговарајућих опсега таласних дужина. Најчешће коришћени кристали су литијум флуорид са различитим посматраним равнима кристала ($LiF200$, $LiF220$), пентаеритрол (PET), кисели талијум фталат (TAP), слојевита синтетичка микроструктура (*layered synthetic microstructure LSM*), и други. Адекватним позиционирањем кристала, односно постављањем кристала под одређен угао у односу на упадни сноп зрачења, бива издвојен сноп зрачења жељене таласне дужине. Монохроматски зрак даље пада на одговарајући детектор. Сваки елемент Периодног система елемената има своје карактеристично рендген-емисионо зрачење тако да подаци са спектрометра недвосмислено указују на присуство сваког елемента чије је емисионо зрачење идентификовано.

2.5.3.3. Детектори

Таласно дисперзивни тип уређаја је најчешће опремљен сетом од два детектора:

- (1) Сцинтилациони;
- (2) Гасно-пропорционално проточни бројачи.

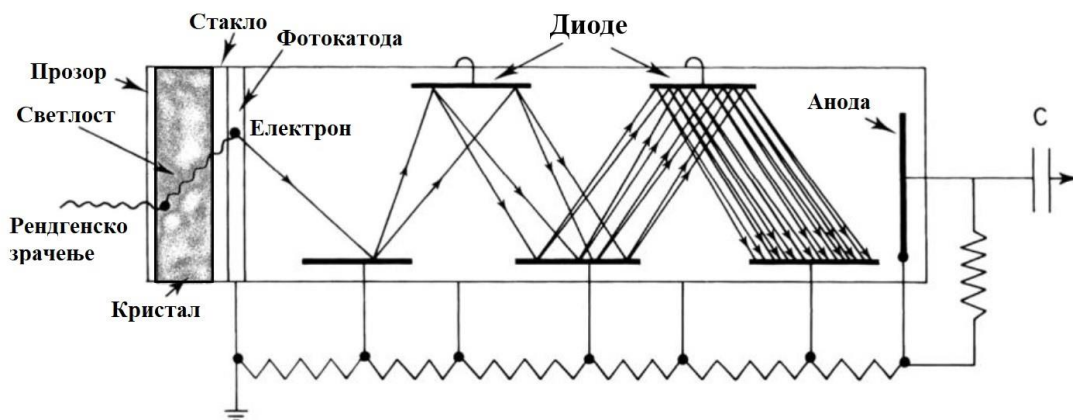


Слика 2.17. Приказ гасно-пропорционално проточног детектора (бројача). (прилагођено према Gauglitz и Vo-Dinh, 2003).

Гасно-пропорционално проточни бројач обично има облик цилиндричне цеви која са своје једне стране има танак прозор кроз који улази карактеристично секундарно зрачење (слика 2.17.) (Conde, 1981). Унутрашњост детектора је испуњена мешавином инертног гаса и гаса који спречава електрично пражњење (најчешће је то мешавина 90% аргона и 10% метана). Кроз средишњи део бројача протеже се жица под напоном (пар стотина до хиљаду волти). Када фотон рендгенског зрачења уђе у детектор он јонизује одговарајући број атома аргона стварајући при томе парове, јон аргона и електрон. Број произведених јонских парова зависиће од енергије упадног фотона. Након јонизације, парови позитивно наелектрисаног јона аргона и негативног електрона почињу да се крећу у супротним смеровима. Јону ударају у зид детектора, док се електрони крећу ка жици под напоном. Дуж пута ка жици, електрони буду убрзани и на тај начин су у могућности да јонизују нове атоме аргона. Новим сударима се ствара лавина парова електрона и јона аргона. На жицу напослетку доспева значајно већи број електрона од оног која је настала иницијално уласком фотона рендгенског зрачења у бројач. На жици се детектује

електрични импулс. Енергија електричног импулса на жици је пропорционална енергији упадног фотона рендгенског зрачења. Овај детектор се користи код мерења фотона мање енергије, тј. већих таласних дужина, најчешће елемената мањих атомских бројева.

За детекцију елемената већег атомског броја користи се сцинтилациони детектор (слика 2.18.). Основни делови овог детектора су сцинтилатор и фотомултипликатор (Potts, 2005). Сцинтилатор се састоји из кристала који упадне фотоне рендгенског дела спектра преводи у фотоне видљивог дела спектра, обично плаве боје (око 410 nm таласне дужине). Кристал који се најчешће користи у ту сврху је натријум-јодид који је допуњен одређеном количином талијума као активатора.



Слика 2.18. Приказ сцинтилационог детектора. (Gauglitz и Vo-Dinh, 2003).

Број насталих фотона видљивог дела спектра је пропорционалан енергији упадног рендгенског фотона. Настали фотони видљивог дела спектра интерагују са фотокаатодом. При интеракцији са површином фотокатоде, фотони видљивог дела спектра узрокују емитовање електрона. Број електрона се потом умножава унутар фотомултипликатора на динодама. На тај начин један емитовани електрон са фотокатоде бива умножен чак и до милион пута након интеракције са последњом динодом. Струја произведена на крају бива детектована као напонски импулс и пропорционална је енергији упадног фотона рендгенског зрачења. Принцип рада фотомултипликатора ће детаљније бити описан у наредном поглављу (поглавље 2.8.).

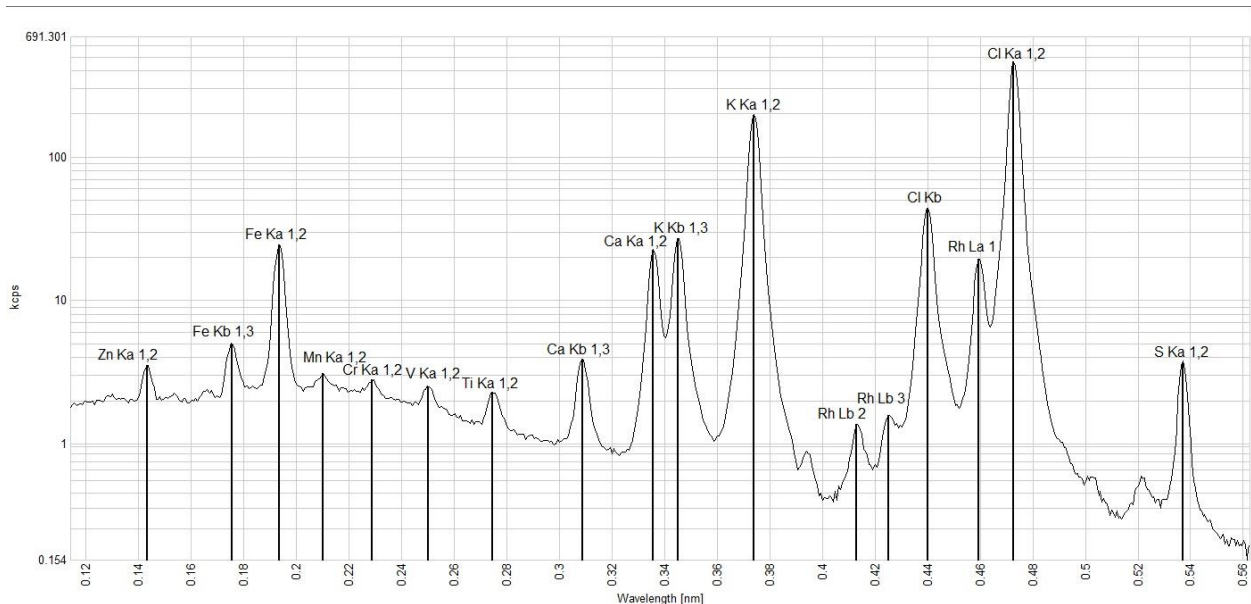
Резолуција сцинтилационог детектора је мања од резолуције гасно-пропорционално проточног детектора. У случају оба детектора број импулса се мери током одређеног временског периода и резултат се извештава у јединици број импулса по јединици времена (најчешће *kcps* - *kilo counst per second*). Детектор није у могућности да све време мери енергију упадних фотона. Након мерења енергије једног фотона, детектор је неактиван одређени временски период и тек након истека тог времена је поново у могућности да прими следећи фотон. Време у коме је детектор неактиван се назива *мртво*

време бројача и најчешће код оваквих детектора износи 200 до 300 ns након сваког упадног фотона.

2.5.3.4. Избор аналитичких параметара при анализи

Када је рендгенска флуоресцентна анализа у питању, многобројни су аналитички параметри које треба подесити пре саме анализе. У случају квалитативне анализе, у зависности од жељених елемената, бира се кристал и опсег углова θ који пристају одговарајућим таласним дужинама. Одабиром кристала дефинисани су елементи које је могуће њиме анализирати, па на тај начин аналитичар даље одређује и остале аналитичке параметре.

Код квалитативне анализе је јако важна резолуција спектра коју аналитичар такође одређује дефинисањем величине помераја (корака) угла гониометра и временом скенирања сваког помераја. Што је време скенирања веће, то се добија прецизнији спектар са мањим шумом, а што је померај угла мањи, то је резолуција спектра већа. Са одговарајућим временом анализе и бројем помераја, могуће је раздвојити и јако проблематична преклапања рендген емисионих линија. Током квалитативне анализе, гониометар помера положај одабраног кристала и детектора за дефинисану вредност помераја (тј. корака) у одговарајућем опсегу таласних дужина. Типичан квалитативни спектар таласно дисперзивног спектрометра приказан је на слици 2.19.



Слика 2.19. WDXRF квалитативни спектар.

Подешавање ових параметара зависи од процене аналитичара у зависности од материјала матрикса, елемената који се анализирају и њиховог концентрационог нивоа. За разлику од квалитативне анализе при којој се анализира читав опсег таласних дужина, код квантитативне анализе одређује се интензитет зрачења само карактеристичних таласних

дужина. Па тако обично анализирамо онолико позиција гониометра колико елемената одређујемо. Најчешће се поред карактеристичних линија одређују интензитети и позиције позадине, као и алтернативне карактеристичне линије уколико постоје интерференце.

Поред положаја гониометра, за сваку карактеристичну линију важно је дефинисати многобројне параметре. Први параметри у низу које је потребно дефинисати су јачина струје и напон на катодној цеви. Вредности јачине струје и напона примењени на рендгенску цев одређују изглед континуума примарног зрачења, који је важан за ефикасност екситације. Па тако већи напон помера максимум континуума ка нижим таласним дужинама што погодује одређивању елемената са већим атомским бројем. За одређивање мањих атомских бројева погодније би било користити ниже вредности напона, како су карактеристичне линије тих елемената на вишим таласним дужинама. Јачина струје одређује интензитет континуума, па уколико желимо да довољно побудимо елементе нижих концентрација, неопходно је применити веће вредности јачине струје.

Након што дефинишемо снагу рендгенске цеви, потребно је проценити да ли је неопходно применити филтер примарног зрачења између узорка и рендгенске цеви. Филтери се употребљавају уколико неке линије примарног снопа зрачења ометају одређивање анализата од интереса. Промер отвора на чашици узорка се одређује на основу величине узорка и може износити од 10 до 40 mm. Што је већа површина коју анализирамо, то су подаци тачнији и прецизнији. Током трајања анализе, узорак се изнад цеви константно ротира дефинисаном брзином. На тај начин се избегавају потенцијалне грешке настале услед хетерогености узорка.

Пошто смо дефинисањем претходно описаних параметара добили примарно зрачење које ће након екситације произвести оптимално секундарно карактеристично зрачење (са највећим приносом фотоелектричног ефекта), следи дефинисање аналитичких параметара унутар коморе спектрометра. Одабир адекватног колиматора се обавља на основу атомског броја елемента који се одређује и његове очекиване концентрације. Што је већа таласна дужина секундарног зрачења (мањи атомски број) користи се колиматор већег размака. Овакви колиматори имају јако високу осетљивост, али јако ниску резолуцију. Па тако најшири колиматор (2,6 mm) се користи само при одређивању парних елемената (од Ве до N). Како се смањује ширина између плоча колиматора, тако се смањује и осетљивост, али се повећава резолуција и опсег елемената који се одређују.

Након колиматора, потребно је одабрати одговарајући кристал. Сваки кристал има дефинисани опсег таласних дужина у оквиру којих се примењује. Фабричком калибрацијом се свакој таласној дужини додељују углови θ и 2θ гониометра и они су специфични за сваки спектрометар посебно. Када су лаки елементи у питању, употребом једног кристала обухваћене су карактеристичне линије пар елемената, а понекад се један кристал примењује само за одређивање једног елемента (AX16 приликом одређивања угљеника). Међутим, често је један елемент могуће одређивати уз помоћ више кристала. У

том случају аналитичар на основу резолуције и осетљивости бира кристал који највише одговара тренутном аналитичком задатку. У табели 2.4. су приказани кристали, опсег елемената који је њима могуће одредити, као и њихова осетљивост и резолуција. У зависности од матрикса узорка и елемента, аналитичар бира одговарајући кристал.

На самом крају дефинише се детектор. Гасно пропорционално проточни детектор се користи за анализу елемената са мањим атомским бројем, тачније до цинка. Уколико се прелазни метали четврте периоде налазе у високим концентрацијама, за њихово одређивање је погодно користити сцинтилациони детектор. Сцинтилациони детектор се користи приликом анализе свих елемената са атомским бројем већим од кобалта.

Табела 2.4. Приказ карактеристика аналитичких параметара: кристала, колиматора и детектора

Одлика	Осетљивост	Резолуција	Елементи												
			Be	B	C	N	O-F-Na	Mg	Al	Si	P-S-Cl	K	Ca-Fe	Co-Sn	
<i>K</i> линија															
<i>L</i> линија												Sn-Yb	Hf-U		
Колиматор															
Јако груб 2,6	Јако висока	Ниска													
Груб 0,6	Висока	Задовољавајућа													
Средњи 0,25	Добра	Добра													
Фини 0,15	Ниска	Висока													
Кристал															
<i>AXBeB</i>	Висока	Ниска	Be												
<i>AX20</i>	Добра	Ниска		B											
<i>AX16</i>	Висока	Ниска			C										
<i>AX09</i>	Добра	Ниска				N									
<i>AX06</i>	Висока	Ниска					O								
<i>AX03</i>	Добра	Добра					O								
<i>TAP</i>	Добра	Добра					O								
<i>ADP</i>	Ниска	Висока						Mg							
<i>PET</i>	Добра	Задовољавајућа							Al						
<i>InSb</i>	Висока	Висока								Si					
<i>Ge111</i>	Добра	Висока									P				
<i>LiF200</i>	Добра	Добра										K			
<i>LiF220</i>	Задовољавајућа	Висока											Ti		
<i>LiF420</i>	Ниска	Јако висока													
Детектор															
<i>FPC</i>														Zn	
<i>SC</i>															

2.5.3.5. Ефекти матрикса

Матриksom се сматрају сви атоми узорка осим самог анализата који се у том тренутку посматра. У том смислу је матрикс мултиелементарни систем који је различит за сваки анализат понаособ и сваки анализат садржи део матрикса другог анализата (Mahapatra, 1987). Ефекат матрикса на интензитет линије анализата се може поделити на две основне групе (Bertin, 1978):

- (1) Ефекти који потичу од хемијског састава матрикса (апсорпциони и емисиони - ефекти повећања);
- (2) Ефекти који проистичу од физичких карактеристика узорка (структура површине узорка, величина честице, ефекти хетерогености).

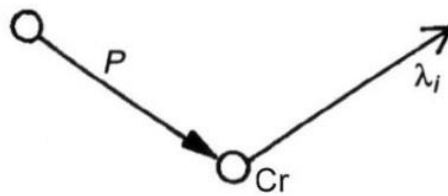
Апсорпциони и ефекти повећања проистичу из пар основних феномена (Bertin, 1978), и то:

(1) *Примарна апсорпција*. Сви атоми који сачињавају узорак бивају изложени примарном рендгенском зрачењу, међутим сваки елемент има различити апсорпциони коефицијент, па из тог разлога настаје одређена расподела фотона примарног зрачења. Начин дистрибуције континуума примарног зрачења ка анализу је измењен под утицајем других атома матрикса. Како примарно зрачење продире у узорак, мења се његов интензитет и дистрибуција енергија фотона услед интеракције са површинским слојевима матрикса узорка и ова појава се назива *каљење примарног снопа*. Каљењем снопа, у плићим слојевима узорка бивају апсорбовани фотони мањих таласних дужина, док до дубљих слојева доспева зрачење већих таласних дужина.

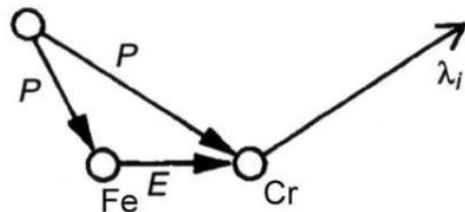
(2) *Секундарна апсорпција*. Секундарно карактеристично зрачење често може имати довољну енергију да побуди друге атоме унутар узорка. Након што је емитовано, на свом путу кроз узорак, карактеристично секундарно зрачење може бити апсорбовано од стране елемената матрикса. У којој количини ће ово зрачење бити апсорбовано зависи од апсорпционих коефицијената свих елемената које сачињавају матрикс.

(3) *Директно повећање* (утицај другог елемента). У одређеним случајевима, енергија секундарног карактеристичног зрачења неког елемента ($Ni K\alpha$ има енергију 7,47 KeV) је одмах изнад границе апсорпције неког другог елемента (граница апсорпције за Fe износи 7,11 KeV). Фотон карактеристичног зрачења никла бива апсорбован од стране атома гвожђа. На тај начин интензитет карактеристичног зрачења никла бива умањено за онај удео за који је интензитет карактеристичног зрачења гвожђа увећан. Ово се често дешава у вишекомпонентним легурама сачињеним од елемената блиских атомских бројева.

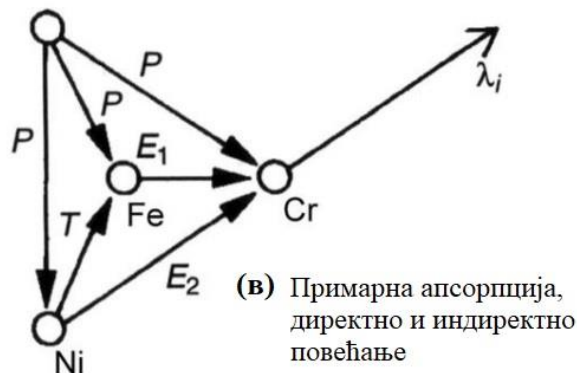
(4) *Индиректно повећање* (утицај трећег елемента). За овај феномен је потребан најмање трокомпонентни систем као што је пример матрикс нерђајућег челика (хром-гвожђе-никал систем). Карактеристично зрачење никла има довољну енергију да побуди атоме хрома и гвожђа, док карактеристично зрачење гвожђа има довољну енергију да побуди атом хрома. У коначном збиру, карактеристично зрачење никла је умањено због екситације атома гвожђа и хрома. Карактеристично зрачење гвожђа је, са једне стране увећано под утицајем карактеристичног зрачења никла, али је са друге стране умањено услед апсорпције од стране хрома. Хром на крају има увећан интензитет карактеристичног зрачења услед могућности екситације помоћу карактеристичних зрачења гвожђа и никла.



(а) Примарна апсорпција



(б) Примарна апсорпција и ефекат повећања



(в) Примарна апсорпција, директно и индиректно повећање

Слика 2.20. Шематски приказ следећих процеса: (а) примарне апсорпције, (б) ефекта повећања и (в) директног и индиректног повећања.

На слици 2.20. шематски су приказани претходно објашњени феномени који изазивају одређене матрикс ефекте. На делу слике (а) приказано је примарно зрачење (P) које побуђује атом хрома који приликом релаксације емитује карактеристично секундарно зрачење (λ_i), што представља директно побуђивање. Кад у систем матрикса уведемо још један елемент, атом гвожђа као што је приказано на делу слике (б), дешава се и додатно побуђивање. Примарно зрачење (P) истовремено побуђује и хром и гвожђе у складу са

њиховим апсорпционим коефицијентима. Енергија секундарног карактеристичног зрачења гвожђа (E) је изнад апсорпционе границе хрома, тако да је хром побуђен од стране примарног зрачења и од стране секундарног карактеристичног зрачења гвожђа што представља горе поменуто директно повећање интензитета карактеристичног зрачења хрома под утицајем другог елемента, односно гвожђа. Уколико се матрикс састоји из три различита елемента, хрома, никла и гвожђа (део слике (в)), примарно зрачење побуђује сва три елемента у зависности од њихових апсорпционих коефицијената. Након релаксације, сва три елемента емитују одговарајуће секундарно карактеристично зрачење. Међутим, секундарно зрачење гвожђа додатно побуђује атом хрома (E_1). Никал као трећи елемент, својим секундарним зрачењем побуђује атоме и хрома (E_2) и гвожђа (Т). Овај феномен узрокује индиректно повећање интензитета карактеристичног зрачења хрома, као и секундарног зрачења гвожђа. Самим тим су интензитети хрома и гвожђа увећани.

2.5.3.6. Ефекти изазвани физичким карактеристикама узорка

Ефекти који утичу на интензитет секундарног карактеристичног зрачења могу потицати од физичких карактеристика узорка, и то:

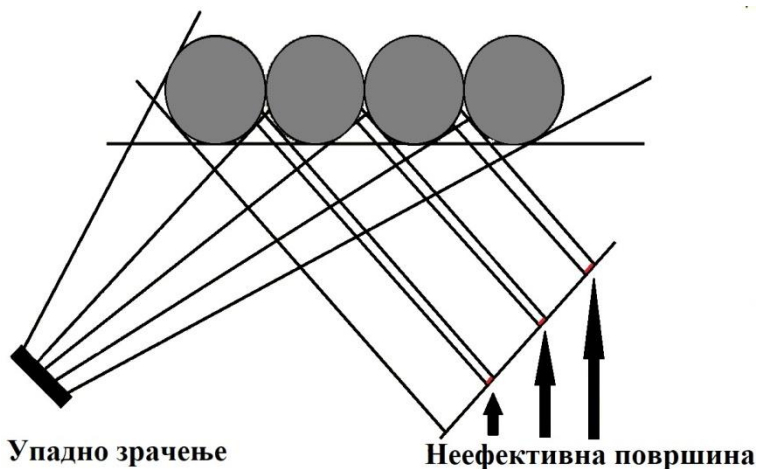
- (1) Утицај структуре површине узорка;
- (2) Величина честице;
- (3) Ефекти хетерогености.

Током анализе, јако танак површински слој је онај који емитује карактеристично рендгенско зрачење и потребно је да представља концентрациони однос елемената целог узорка. Из тог разлога је важно обезбедити да управо тај површински слој узорка буде хомоген и са равном додирном површином. У зависности од тога да ли честице имају исти хемијски састав као и цео узорак или се честице међусобно разликују по хемијском саставу можемо рећи да ли је неки материјал хомоген или хетероген. Уколико је неки материјал састављен од честица исте величине, сматра се да тај материјал има униформну дистрибуцију величине честица. Мерени интензитет аналитичких линија може бити измењен чак иако анализирани узорак има и хомогену структуру и униформну дистрибуцију величине честице. На резултат мерења, поред неравнина површине, утиче и оријентација структуре честице, као и евентуални зарези настали након пелетирања, стапања или полирања.

Структура површине узорка може да на пар начина утиче на мерени интензитет, и то:

- (1) Дужина пута који примарно или секундарно зрачење пређе пре него што доспе до атома узорка може да варира услед неравне површине. На тај начин неравна површина директно утиче на мерени интензитет аналитичких линија.

(2) Уколико је површина узорка неравна, структура неравнина може спречавати примарни сноп да озрачи заклоњене делове узорка или секундарно зрачење да напусти узорак. Овај феномен се назива *ефекат сенке* (Shadow effect) (слика 2.21.).



Слика 2.21. Приказ ефекта сенке.

2.5.3.7. Методе калибрације

За рендгенско флуоресцентну квантитативну анализу се може рећи да је под утицајем два фактора. Први фактор подразумева припрему узорка која претходи инструменталној анализи, док се други фактор односи на одређивање концентрације елемента на основу измереног интензитета карактеристичног секундарног зрачења.

Као што је у претходним поглављима поменуто, приликом избора адекватне аналитичке технике за хемијску анализу, јако су важне хемијске и физичке карактеристике материјала који се анализира. Па тако припрема узорка игра јако значајну улогу током одабира адекватне методе калибрације.

Код XRF технике, карактеристично зрачење које се односи на један одређивани елемент и његову концентрацију у узорку зависи од садржаја свих осталих елемената у узорку. У претходном поглављу су детаљније описани могући интерелементарни ефекти који настају под утицајем материјала матрикса и физичких законитости по којима атоми интерагују са рендгенским зрачењем. Уколико искључимо из разматрања интерелементарне ефекте, директно одређена концентрација се може од праве концентрације разликовати за пар редова величина под утицајем различитог матрикса, док утицај трећег елемента узрокује разлике веће од 10 % (Tertian и Claisse, 1982). Зато је важно сагледати све потенцијале утицаје приликом креирања адекватне методе за квантитативну анализу.

Интензитет карактеристичног секундарног рендгенског зрачења такође зависи од карактеристика коришћеног спектрометра и дистрибуције и облика континуума примарног

снопа зрачења. Уколико познајемо и дефинишемо процесе који се тичу односа измереног интензитета рендгенског зрачења и концентрације, могуће је наћи адекватан начин да што је тачније могуће пажљиво преведемо измерени интензитет секундарног рендгенског зрачења у концентрацију одређиваног елемента. Постоји много начина које повезују ове две величине у рендгенској флуоресцентној анализи, али се свакако могу сврстати у две основне групе, и то:

- (1) Математичке методе (углавном теоријски прерачунавају интерелементарне ефекте);
- (2) Компаративне методе (углавном су интерелементарни ефекти емпиријски компензовани).

2.5.3.7.1. Математичке методе калибрације

Математичке методе су најчешће скрининг методе (screanning), односно једном анализом се одређује садржај свих елемената који се у узорку налазе, а могуће је их одредити употребљеном техником (Tertian и Claisse, 1982). Свакако, они елементи који се налазе у траговима и испод детекционог лимита употребљене технике не би били одређени на овај начин. Понекад, уколико су познате неке физичко-хемијске карактеристике узорка и иако није обављено неко директно мерење у односу на тај конкретан елемент, могуће је садржај неких елемената претпоставити или одредити из разлике. Главни проблем је то што се интерелементарне корекције често изводе на мереним концентрацијама, које су као такве непознате или одређене са великом несигурношћу (Bowers, 2019, Vamford *et al.*, 2004). На срећу, данашњи компјутерски системи су у могућности да употребе компликоване алгоритме и корективне једначине.

Математички поступци калибрације се могу поделити на два основна система, *фундаменталне параметре* и *кофицијенте утицаја*. Значајна разлика између ове две методе је то што је метод фундаменталних параметара потпуно теоријски, док је метод коефицијената утицаја и теоријски и емпиријски.

Математички поступци квантитативне анализе су довели до развијања такозваних безстандардних метода анализе који се данас све чешће употребљавају (Fiamegos *et al.*, 2018, Kallithrakas-Kontos *et al.*, 2016, Han *et al.*, 2006, Muia и Van Grieken, 1991, Shaltout *et al.*, 2012). На овај начин се на основу одређених стандардна обавља фабричка предклабирација, чији се резултати, уз мерени интензитет непознатих узорака уврштавају у математичке алгоритме ради добијања коначне концентрације. Данас постоје модерни софтверски пакети који користе комбинацију оба математичка поступка, фундаменталних параметара и коефицијената утицаја. Па тако поред познатих физичких законитости и коефицијената који су везани за интеракцију са рендгенским зрачењем, у математичке једначине по којима софтвери раде, су уврштене и неке емпиријски одређене величине. Поред измереног интензитета карактеристичних линија одређиваних елемената и интензитета позадинских позиција (што је све унапред дефинисано за сваки елемент и

само коришћени спектрометар), у софтвер се уносе додатни подаци везани за узорак. То су најчешће: маса, димензије пелета или диска, врста и количина везивног средства, претпостављена хемија узорка (оксидни, карбонатни или елементарни састав материјала, итд.). Тек након што прикупи све набројане информације, софтвер је у могућности да предвиди све физичке и хемијске утицаје и испоручи резултат у виду концентрације елемената анализираниог узорка. Међутим, управо тачност безстандардне методе често ставља овај начин анализе на границу између квантитативне и семиквантитативне анализе. Из ових разлога постоји потреба за унапређивањем, испитивањем и оптимизацијом безстандардних метода за најразличитије типове матрикса.

2.5.3.7.2. *Компаративне методе калибрације*

Компаративне методе анализе, за разлику од математичких метода, су често прилагођене за анализу само одабраних елемената и не могу се применити универзално за било који матрикс (Tertian and Claisse, 1982, Rousseau *et al.*, 1996). Уколико се анализира одређени елемент, матрикс и интерелементарни ефекти се узимају у обзир за сваки тип узорка понаособ. За то постоји пар начина калибрације, и то су најчешће:

(1) *Екстерна калибрација* подразумева коришћење интензитета карактеристичног рендгенског зрачења елемената стандарда познате концентрације за креирање калибрационе криве. Пошто се калибрациона крива примењује на читаву групу узорака, неопходно је да матрикс стандарда буде истоветан матриксу реалних узорака који ће бити анализирани.

(2) *Интерна калибрација* се примењује на различитим врстама матрикса. Позната концентрације одабраног елемента, који има сличне карактеристике као и елемент који ће се одређивати, се додаје узорку. Однос интензитета одређиваног елемента и интерног стандарда је у том случају независан од матрикса и пропорционалан је концентрацији одређиваног елемента у узорку.

(3) *Стандардни додатак* (спајковање, spiking) представља поступак при ком се позната количина одређиваног елемента додаје узорку, а поређењем интензитета зрачења пре и после додавања могуће је на одређеном нивоу компензовати утицај матрикса.

(4) *Двоструко разблажење* је поступак који се примењује коришћењем два различита разблажења узорка и поређењем добијених интензитета карактеристичног зрачења аналита. На овај начин је ефекат матрикса адекватно компензован.

Метода екстерне калибрације се најчешће користи у XRF спектрометрији. У односу на математичке методе квантитативне анализе, емпиријска метода екстерне калибрације показује значајнију тачност и боље перформансе. Разлог за то је управо то што се за креирање калибрационих криви користе стандарди готово истих матрикса као и анализирани узорци. На тај начин су и детекциони и квантификациони лимити обично

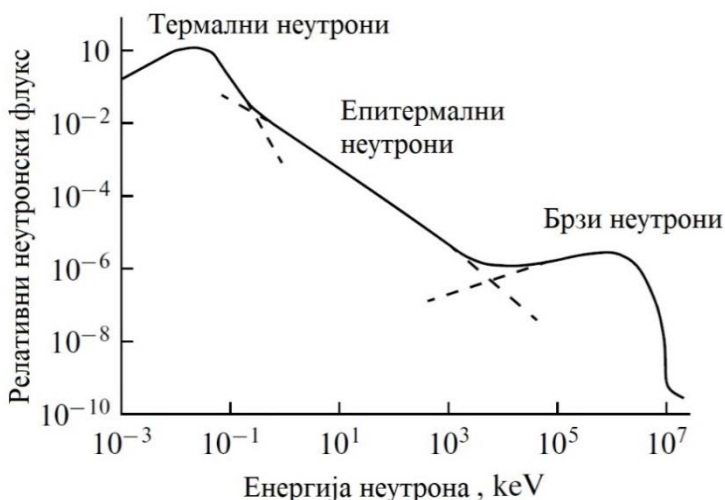
нижи у односу на безстандардне методе. За разлику од математичких метода, најчешће се не одређује садржај свих елемената у узорку, већ само оних који се налазе у стандардима коришћеним за калибрацију. Међутим, овај вид калибрације није једноставно извести. Јако је тешко за сваки тип матрикса обезбедити довољан број калибрационих стандарда који имају задовољавајући број елемената у одговарајућим концентрационим опсезима. Чак иако би стандарди били задовољавајући и у довољном броју, неопходно би било применити додатне интерелементарне корекције. И поред тога, добијене калибрационе криве би биле примењиве само на специфичном типу матрикса.

2.6. Инструментална неутронска активациона анализа (INAA)

Активационе методе (*Activation Analysis - AA*) су засноване на мерењу радиоактивног зрачења које је настало у узорку након излагања снопу неутрона или других наелектрисаних честица, као што су водоник, деутеријум или хелијум. Овим методама се може одредити садржај елемената у траговима у испитиваном узорку (Skoog *et al.*, 1998).

Инструментална неутронска активациона анализа (*Instrumental Neutron Activation Analysis - INAA*) је осетљива аналитичка техника за квалитативно и квантитативно симултано одређивање садржаја макро, микро и елемената у траговима. Једна је од водећих метода активационе анализе, а за активацију узорака се користе неутрони.

Неутрон је елементарна честица која улази у састав језгра и нема наелектрисање (Nesvizhevsky и Villain, 2017). За потребе INAA производе се неутрони високе енергије у рангу мега електронволти (*MeV*) (Слика 2.22.). Произведени неутрони се обично пропуштају кроз модерирајући материјал који смањује њихову енергију. Проласком кроз модерирајући материјал, неутрони предају своју кинетичку енергију околини и бивају охлађени на температуру која одговара температури околине. Неутрони који имају енергију око $0,04 \text{ eV}$ се називају *термални неутрони*, док је процес модерирања високоенергетских неутрона до термалних назива *термализација*¹ (Squires, 2012). Као модерирајуће супстанце, најчешће се користе оне са малим просечним атомским бројем као што су вода, деутеријум-оксид или парафин. Нуклеарни реактори се најчешће користе за добијање термалних неутрона, па су из тог разлога најчешће коришћени извор неутрона.



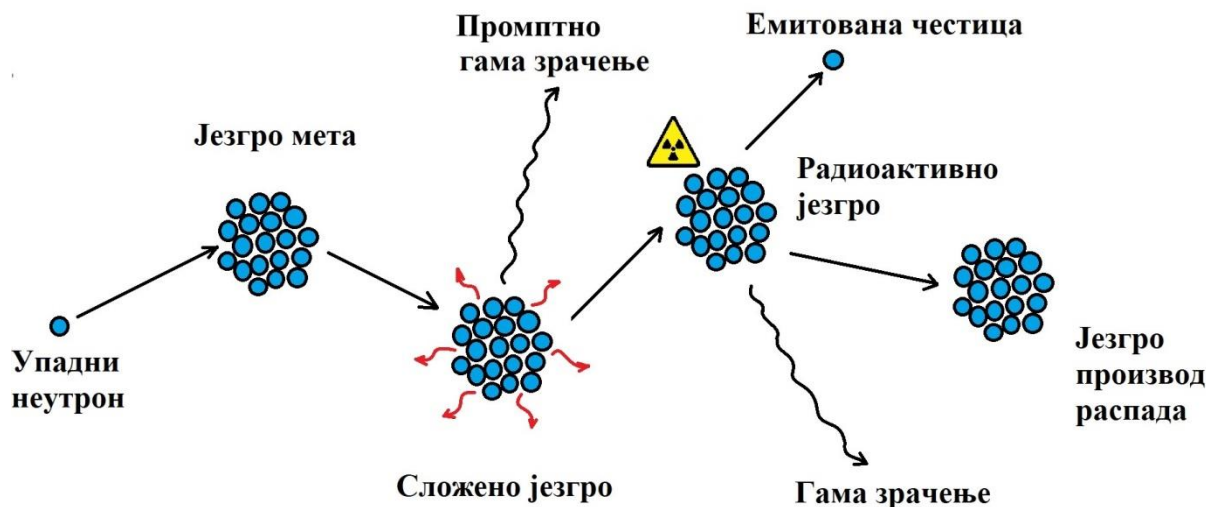
Слика 2.22. Шематски приказ неутронског спектра који потиче из нуклеарног реактора (прилагођено према Frontasyeva, 2011).

¹ Термални неутрони имају кинетичку енергију од око $0,025 \text{ eV}$ или око $4,0 \cdot 10^{-21} \text{ J}$, или брзину од $2,2 \text{ km/s}$. Неутрони ослобођени реакцијом фисије имају средњу енергију од 2 MeV , или $20\,000 \text{ km/s}$.

Већина активационих метода је заснована на употреби термалних неутрона који имају својство да ефикасно реагују са језгрима већине елемената који су значајни са аналитичког становишта. Неки лаки елементи, као што су азот, кисеоник, флуор и силицијум се могу одређивати, али тек када се употребе брзи неутрони са енергијом од 14 MeV или више.

Слободни неутрони су јако нестабилни и њихово време полураспада износи око 10,3 минута, након чега се распадају на протон и електрон. Најчешће се поменути распад и не деси јер слободни неутрони имају велику тенденцију да интерагују са околном материјом. Њихова велика реактивност произилази из њиховог нултог наелектрисања што им омогућава да приђу наелектрисаним језгрима без икаквих интерференција.

Неутронски захват је најзначајнија реакција када су активационе методе у питању. Неутрон бива захваћен од стране језгра анализата што проузрокује добијање такозваног *сложеног језгра*, односно изотопа истог атомског броја и масеног броја увећаног за један (Gibson, 2004). Сложено језгро се налази у побуђеном стању, што је енергетски неповољно стање за атом. Вишак енергије бива емитован путем промтног гама зрачења (Слика 2.23.). Промтно гама зрачење које настаје из неутронског захвата није од великог аналитичког интереса колико радиоизотоп који настаје. Настали радиоизотоп након отпуштања промтног гама зрачења се даље распада и при томе отпушта нови фотон гама зрачења. Поменуто гама зрачење има енергију која је карактеристична за сваки изотоп, или неке друге честице из језгра (неутрон, протон или алфа честица). Дакле, сваки радиоизотоп има карактеристичан спектар гама зрачења. Мерењем енергије гама зрачења могуће је идентификовати елемент у озраченом узорку, док интензитет поменутог зрачења даје информацију о количини анализираниог елемента (L'Annunziata, 2007).



Слика 2.23. Шематски приказ принципа неутронске активационе анализе.

Да би неки елемент био погодан за анализу применом инструменталне неутронске активационе анализе, неопходно је да буду задовољени следећи услови:

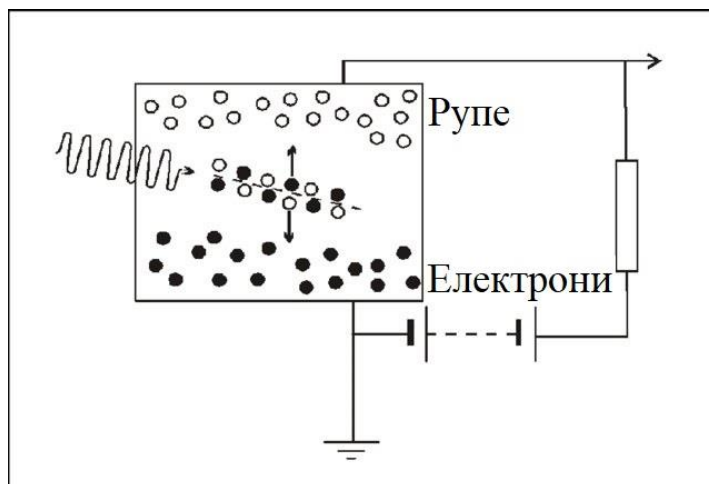
- (1) Продукт нуклеарне реакције мора бити радиоактиван;
- (2) Време полураспада радиоизотопа који настаје нуклеарном реакцијом мора бити довољно дуго како би се обавило мерење;
- (3) Радиоактивни распад радиоизотопа мора ослобађати гама зрачење довољног интензитета;
- (4) Принос нуклеарне реакције мора бити довољно висок.

Узорци и стандарди се најчешће смештају у мале полиетиленске контејнере. Јако је важно обратити пажњу да узорци и стандарди буду изложени истом неутронском флуксу. Из тог разлога се унутар једног контејнера смешта одређен број узорака и стандарда истовремено. Време озрачивања зависи од много фактора и најчешће се одређује емпиријски. Као време озрачивања се обично узима троструко до петоструко време полуживота радиоизотопа анализата, што је обично време од пар минута до пар сати.

Након озрачивања, узорци и стандарди бивају остављени да се „охладе“ одређени период, који може бити од пар минута до пар дана. Током такозваног хлађења, краткоживећи изотопи се распадају и на тај начин се избегавају интерференције које би овим путем евентуално настале. Поред тога, хлађење узорка умањује негативне утицаје које зрачење може да има по људско здравље.

Када је детекција емитованог зрачења радиоизотопа који настају овим путем у питању, гама зрачење може пружити највише информација. Сваки изотоп даје спектре који имају карактеристичне линије (карактеристичне енергије). На основу анализе гама спектра могуће је узорак квалитативно и квантитативно окарактерисати.

Детекција гама зрачења се обавља помоћу полупроводничких детектора (Casten и Beausang, 2003). Полупроводници су материјали који имају вредност проводљивости између проводника и изолатора. Најчешће коришћени полупроводнички материјали за електронске уређаје су кристални силицијум и германијум (Kramar, 1999). Пошто спадају у IV групу периодног система, имају четири електрона у валентном слоју. У кристалној структури је сваки електрон везан ковалентном везом за други електрон из истоветног атома. Из тог разлога не постоје слободни електрони и за такав материјал би се очекивало да је понаша као изолатор. Међутим, адекватном топлотном интеракцијом, везани електрони могу прећи у стање у ком се могу слободно кретати кроз решетку кристала и на тај начин слободно проводити струју. Овим прелазом, електрон оставља позитивно наелектрисану шупљину која је попут електрона мобилна и на тај начин такође доприноси проводљивости кристала. Механизам кретања је такав да се шупљина и термални електрони крећу у супротним правцима (Слика 2.24.). Мерењем промене електричне енергије, могуће је одредити енергију зрачења које доспева на кристал.



Слика 2.24. Шемиатски приказ принципа рада полупроводничког детектора.

Германијумски детектори се користе за детекцију фотона електромагнетног зрачења у подручју од 3 keV до 3 MeV . Савремени типови германијумских детектора су најчешће израђени од германијума високе чистоће (нечистоће се налазе у односима $1:10^{12}$). Дебљина детектора одређује њихову осетљивост и цену. Приликом употребе ових детектора важно је обезбедити ефикасно хлађење јер загревањем до собне температуре, кристали детектора бивају оштећени и губе своје перформансе.

Неутронска активациона анализа има пар погодности, као што су висока осетљивост, минимални захтеви припреме узорка, једноставна калибрација, најчешће је недеструктивна анализа. Највећа мана ове методе је потреба за великом и јако скупом опремом (извор неутрона, заштитни слојеви) која захтева посебне просторије за коришћење, као и посебно складиштење радиоактивног отпада. Само руковање опремом захтева посебно обучен кадар. Поред тога, време потребно за анализу је прилично дуго. Посебно када је анализа дугоживећих радионуклида у питању, мерења могу трајати и пар недеља.

INAA методом је потенцијално могуће одредити 69 елемената периодног система (Guinn и Lukens, 1965) (Слика 2.25.). Кисеоник, азот и итријум се могу активирати, али тек употребом брзих неутрона. Када је тип материјала који се може анализирати овом методом у питању, то је широка листа: метали, легуре, археолошки узорци, полупроводници, биолошки узорци, земљиште, стене, минерали, као и водени раствори.

Грешке које могу настати током анализе најчешће су узроковане неједнаким неутронским флуksom којем може бити изложен узорак и стандард, мерном несигурности приликом бројања, као и грешкама које настају приликом одбијања, апсорпције и разлике у геометрији узорка и стандарда. Решавањем ових проблема, грешке могу бити значајно смањене, и то на око 10 %. Лимити детекције ове методе су јако ниски и њеном применом могуће је одређивати елементе у концентрацијама нижим од $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ нивоа.

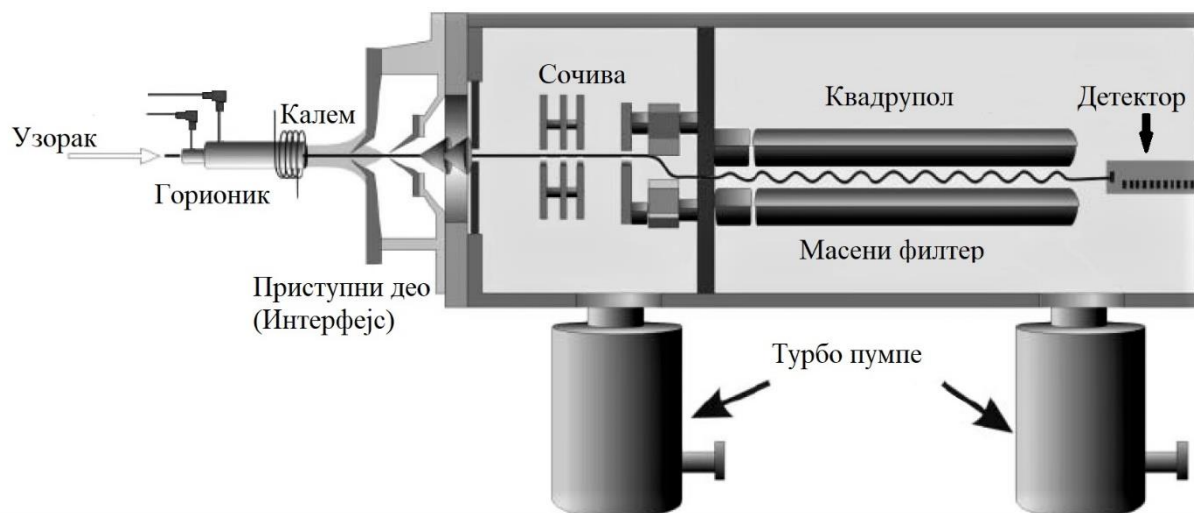
2.7. Масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом (ICP-MS)

Масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – ICP-MS*) је почетком осамдесетих година прошлог века постала једна од најзначајнијих техника за елементарну хемијску анализу. Разлог су ниски детекциони лимити при одређивању већине елемената, висока осетљивост, јако добра тачност и прецизност. Комерцијалне варијанте овог уређаја су доступне још од 1983. године (Trueman, 2005).

ICP-MS се користи за квалитативно, семиквантитативно и квантитативно одређивање једног или више елемената у узорцима (Dean, 2019). Ова техника је мултиелементарна и из тог разлога се користи за брзу карактеризацију и семиквантитативну анализу различитих типова природних и комплексних синтетичких материјала (техника која омогућава симултану анализу више елемената истовремено). Током кратког временског периода ова техника нуди могућност анализе јако великог броја узорака (Mermet, 2006). Са друге стране, инструмент је прилично скуп и само коришћење може изискивати прилична новчана средства. Из тог разлога је погодан за коришћење у лабораторијама које имају јако велики број анализа и/или посебне аналитичке захтеве.

Типичан комерцијални ICP-MS уређај има шест основних компоненти (Слика 2.26.) (Wilschefski и Вахтер, 2019):

- (1) Систем за увођење узорка;
- (2) Индуктивно спрегнуту плазму;
- (3) Интерфејс (приступни део);
- (4) Оптички део;
- (5) Масени спектрометар;
- (6) Детектор.



Слика 2.26. Шематски приказ ICP-MS уређаја (прилагођено према Wilschefski и Вахтер, 2019).

Течни узорак се прво распршује у систем за увођење узорка стварајући фини аеросол који се даље уводи аргонску плазму. Високотемпературна плазма атомизује и јонизује хемијске врсте у узорку, генеришући јоне који се упућују до спојног дела и сета електростатичких сочива који се називају јонска оптика. Јонска оптика фокусира и наводи снап јона на квадрупол масеног анализера. Масени анализер раздваја јоне на основу њиховог односа масе и наелектрисања (m/z) и ови јони бивају мерени помоћу детектора (Dean, 2005).

Пре уласка у индуктивно спрегнуту плазму, течни узорак се најпре распршује до аеросола помоћу распршивача. Квалитет корака увођења узорка у плазму значајно утиче на осетљивост, као и на интерференце изазване утицајем матрикса. Током трајања читаве анализе, морамо бити сигурни да распршивач уводи узорак у уједначеном протоку и потпуно хомогено. Најчешће комерцијално коришћени распршивачи су пнеуматски, код којих постоји пар типова. Одабир најпогоднијег распршивача се обавља на основу потребе и намене конкретног уређаја.

Пре него што ће бити претворен у аеросол, узорак бива усисан у спреј комору која има улогу да селективно филтрира велике капи аеросола који се генеришу. Разлог је плазма, којој опада ефикасност приликом дисоцијације капљица већих од 10 μm у дијаметру. Обично само 1 до 2 % узорка доспе до плазме, док остатак завршава у отпаду. Из тог разлога, јако мале промене на систему увођења узорка могу имати значајне ефекте на крајње резултате анализе.

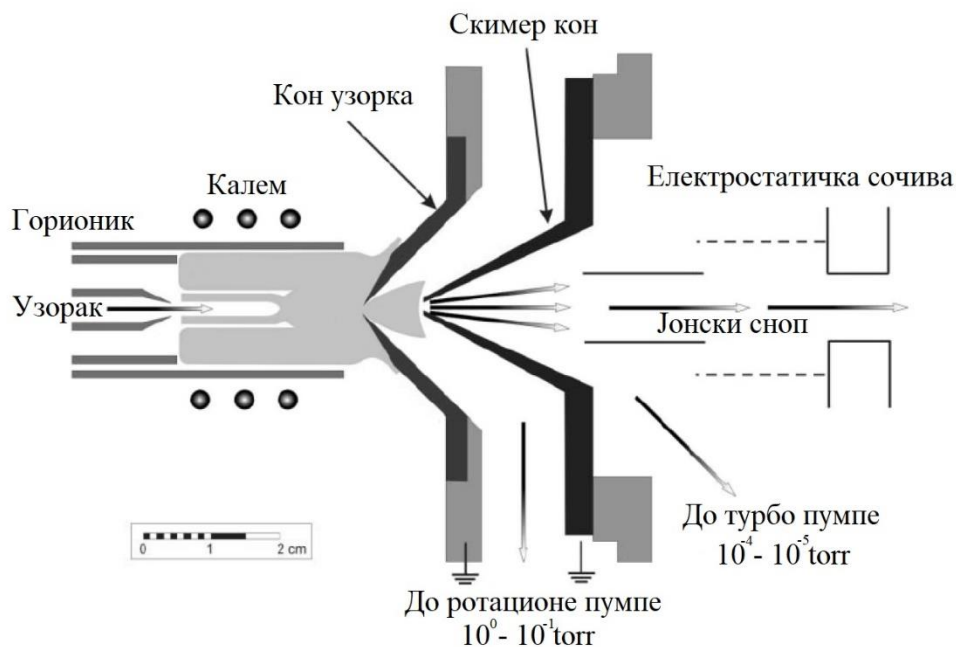
Плазма је јонизован гас који садржи позитивно наелектрисане јоне и слободне електроне. Улога плазме у *ICP-MS* систему је да јонизује аналит из узорка. Индуктивно спрегнута плазма се сматра „тврдом“ јонизујућом техником јер је јонизација узорка комплетна, за разлику од „меких“ јонизујућих техника што би био електроспреј. Плазма настаје на крају три концентричне кварцне цеви које свеукупно називају горионик. Гас аргон пролази кроз све три цеви, док се кроз средишњу цев, која се назива ињектор, аеросол узорка и гаса аргона уводе у плазму (Thomas, 2004).

Приликом паљења плазме, уз проток аргона кроз горионик, примењује се високонапонско пражњење (Теслина варница) које има довољну енергију да јонизује део атома аргона, који на тај начин генеришу парове јона аргона и електрона. Настали парови јона аргона и електрона се налазе под утицајем електромагнетног поља које их убрзава. Тако убрзани парови се сударају са другим атомима аргона. Приликом ових колизија које имају довољну енергију, додатни атоми аргона се јонизују и формирају се нови парови јона и електрона, који даље постају лавине. Кретање електрона и јона кроз горионик генерише огромну количину топлоте. Резултат ових процеса је индуктивно спрегнута плазма која може да достигне температуру до 10 000 К, што је температура више него температура на површини Сунца.

Након распршивања, фини аеросол узорка бива убачен у струју гаса аргона, која даље путује до ињектора и затим до плазме. Након што достигне високу температуру

плазме, узорак испарава, атомизује се и коначно јонизује. Већина елемената формира позитивно наелектрисане јоне, мада неке врсте могу формирати и мали удео двоструко наелектрисаних јона. Степен јонизације неког елемента зависи од температуре плазме и јонизационог потенцијала елемента. На срећу, већина елемената има прву енергију јонизације значајно мању од енергије јонизације аргона што доприноси великој ефикасности јонизације у плазми. Ова особина плазме чини *ICP-MS* технику погодном за анализу готово целог периодног система елемента, што је значајна предност у односу на остале најчешће коришћене спектрометријске технике.

Приступни део (интерфејс) представља јако важан део уређаја и састоји се од пар конуса са малим отворима (конова) од никла (или платине) који одвајају плазму од коморе масеног спектрометра који је под вакуумом (притисак мањи од $0,1 Pa$) (Слика 2.27.). Конови представљају фокусирајућу оптику уређаја и то су пресеци јако малих димензија. Први кон је у контакту са плазмом и назива се кон узорка, док се други назива скимер. Јони, фотони, неутрални атоми или молекули се екстракују из плазме у приступни део кроз мали отвор кона узорка (дијаметар око 1 милиметар). Како јони улазе у приступни део, велико смањење притиска изазива драматично ширење јона. Јони затим пролазе кроз још мањи отвор скимер кона (конус који уклања, тј. скида вишак јона, $0,45 mm$) и затим улазе у главну комору спектрометра која је под вакуумом. При овако ниском притиску, јони се лако маневришу у простору употребом наелектрисаних површина, односно електростатичким сочивима.



Слика 2.27. Шематски приказ приступног дела (прилагођено према Wilschefski и Baxter, 2019).

Сет електростатичких сочива који се налазе иза скимер кона се збирно називају јонском оптиком. Главна улога јонске оптике је да усмерава јонски сноп ка масеном спектрометру и да спречи да фотони и друге неутралне врсте дођу до детектора. Након проласка кроз јонски оптички систем, јони доспевају до масеног спектрометра.

Пар различитих масених спектрометара је комерцијално у употреби за потребе *ICP-MS* уређаја, и то: квадрупол, двоструко фокусирајући магнетни сектори и време лета (*time-of-flight - TOF*) (Jeffries, 2004). Како је квадрупол масени спектрометар коришћен током израде ове дисертације, о њему ће бити више речи у даљем тексту.

Квадрупол је масени спектрометар који одваја јоне на основу њиховог односа масе и наелектрисања, односно m/z односа. Састоји се из четири паралелне цилиндричне металне шипке (15-20 cm дугачке) квадратно распоређене. Кроз шипке се пропушта радиофреквентна наизменична и једносмерна струја, тако да се у простору између шипки генерише временски варирајуће електрично поље и управо туда пролазе јони. За јон одређеног m/z односа постојаће одговарајуће комбинације наизменичне и једносмерне струје чији ће потенцијал резултовати стабилним проласком јона кроз квадрупол до детектора. Сви јони којима задати потенцијал не одговара ће завршавати на шипкама и неће доспевати до детектора. Напони на шипкама се могу мењати јако брзо, што омогућава да велики опсег маса буде анализиран у делићима секунде. Код модерних уређаја је могућа и симултана анализе више елемента.

Најчешће коришћени детектори код *ICP-MS* система су електрон-мултипликатори. Позитивно наелектрисани јони ударају у прву диоду детектора која представља аноду. Јони ударцем у диоду проузрокују емисију пар електрона са површине, који затим ударају у следећу диоду, мултиплицирају се и даље ударима у нове диоде изазивајући ослобађање нових електрона. Ланчани судари са диодама и емисија електрона узрокује генерисање каскаде електрона који на крају бивају измерени као промена у електричној енергији/потенцијалу. На овај начин детектор образује мерљиви сигнал који је резултат удара само једног јона, што је разлог јако високе осетљивости уређаја.

Типичне комерцијално доступне конфигурације спектрометара имају такве спектралне перформансе које омогућавају детекцију преко 90% периодног система елемената. Време мерења обично износи 10 секунди по елементу са детекционим лимитима од 0,1 до 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppb). Приликом одређивања елемената у концентрацијама у средишњем концентрационом делу калибрационих линија, просечне релативне стандардне девијације су између 2 и 4 %. Осетљивост неког анализита при коришћењу *ICP-MS* технике пре свега зависи од јонизације као и од заступљености мереног изотопа.

Предност употребе масене спектрометрије са индуктивно спрегнутом плазмом је у томе што је масени спектар једноставнији за интерпретацију у односу на оптичке спектре. Ова особина је посебно важна када је одређивање елемената ретких земаља у питању, управо због њихових многобројних емисионих линија. Оптички емисиони спектри узорака са оваквим анализитима могу бити изузетно комплексни и интерпретација може бити јако тешка и захтева време, док у неким случајевима може бити чак и немогућа.

Спектралне интерференце које настају када јон анализита и јонске врсте из плазме имају исти m/z однос се могу сврати у следеће групе (Skoog *et al.*, 1998):

(1) *Изобарски јони* - два елемента чији изотопи имају исту масу. За атомску масену спектрометрију са квадруполом, изобарске врсте су изотопи чија маса се разликује за једну јединицу. Код инструмената са бољом резолуцијом и мање разлике се могу толерисати. Сваки елемент може имати и пар изотопа који се изобарски преклапају.

(2) *Полиатомске јонске интерференце* – проблем који је озбиљнији од изобарског и проистичу од полиатомских врста које потичу из интеракција између врста у плазми и матриксу или атмосфери. Као последица настају молекулске јонске форме које интерферирају, обично са m/z односом испод 82.

(3) *Интерференце оксидних и хидроксидних врста* – можда и најозбиљнија врста интерференци код *ICP-MS* која настаје формирањем оксида и хидроксида анализата, матрикса, растварача или гаса плазме. Проблем настаје када се маса добијеног јона оксида или хидроксида поклопи са масом изотопа другог анализата. Један резултат бива лажно увећан, док други бива лажно умањен.

Када је *ICP-MS* у питању, матрикс ефекти долазе до изражаја код концентрација већих од 500 или 1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ најчешће резултујући смањењем сигнала анализата, мада у посебним случајевима може доћи и до супротног ефекта.

Детекциони лимити *ICP-MS* технике су нижи у односу на оптичке емисионе методе. Најчешћи начин калибрације се обавља применом калибрационих стандарда за добијање калибрационе праве. Једноставни водени раствори стандарда су обично направљени тако да се концентрације елемената подударају са концентрацијама у матриксу.

Садржај тотално растворених супстанци (*TDS – Total dissolved solids*) не би требало да прелази 0,2 % како би се избегли утицаји матрикса и евентуално физичко блокирање распршивача. Иако је припрема узорака за *ICP-MS* је релативно једноставна, претходно напоменути захтев је компликује.

ICP-MS уређаји су примарно дизајнирани за анализу течних узорака. Међутим, могућа је директна анализа чврстих узорака употребом електротермалног испаравања или ласерске десорпције/јонизације.

2.8. Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом (ICP-OES)

Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry – ICP-OES*) је јако моћна и често комерцијално коришћена аналитичка техника да одређивање елемената у траговима у најразличитијим типовима узорака (Skoog *et al.*, 1998).

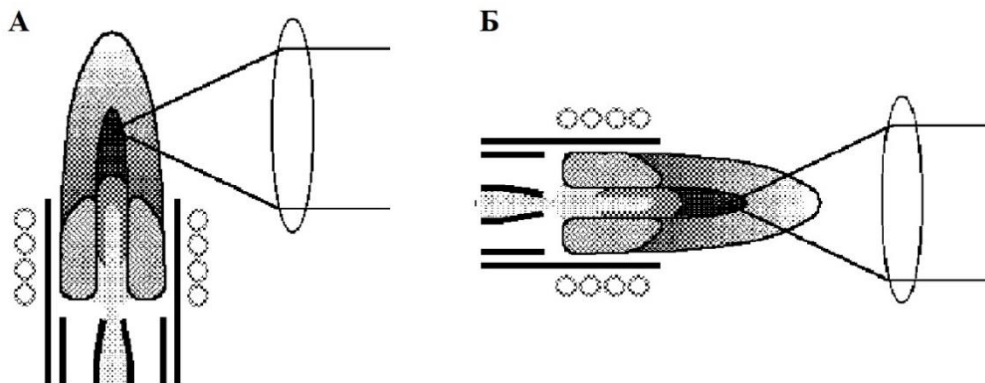
Узорци у гасовитом или течном стању се могу директно убризгавати у инструмент. Свакако је могућа и анализа чврстих узорака, али је неопходно узорак претходно превести у течну стању киселом дигестијом или екстракцијом. Посебно дизајнираним системом за увођење, течни узорак се преводи у аеросол који се даље директно убризгава у централни део језгра плазме. Улога плазме је двојака, да атомизује узорак, а затим да добијене атоме ексцитује. На високим температурама на којима се налази плазма, узорак моментално испарава и елементи одређиваних анализата се ослобађају као слободни атоми у гасовитом стању, односно, атомизују се (Charles и Fredeen, 2004).

Даљим боравком унутар плазме, атоми анализата добијају додатну енергију која је довољна да их доведе у ексцитовано стање. Најчешће постоји довољна количина енергије која атоме примарно јонизује, а затим додатна количина енергије доводи јоне у ексцитовано стање. Из оба побуђена стања, јони и атоми се релаксирају до основног стања отпуштањем фотона. Емитовани фотони имају карактеристичну енергију која је дефинисана енергијама унутар љуски атома или јона, другим речима сваки атом има своје карактеристичне оптичке емисионе спектре. Из тога произилази да мерењем таласне дужине емитованог фотона идентификујемо елемент из ког фотон потиче. Пребројавањем фотона одређене таласне дужине могућа је квантификација анализата из ког су фотони емитовани.

ICP-OES инструмент је релативно једноставан систем. Фотони који се емитују из индуктивно спрегнуте плазме се прикупљају уз помоћ сочива или конкавног огледала. Фокусирајућа оптика шаље слику која долази из плазме на монохроматор, који сигнал раздваја на основу различитих таласних дужина. Даље, издвојени сноп фотона одређене таласне дужине са монохроматора бива усмерен на фотодетектор који га преводи у електрични сигнал. Сигнал се појачава и процесуира унутар електронике детектора и приказује се као препознатљив спектар на рачунару.

Када су у питању систем за увођење узорка и индуктивно спрегнута плазма, не постоји разлика између *ICP-OES* и *ICP-MS* техника. Код обе технике се најчешће течни узорак помоћу распршивача преводи у аеросол који се даље убризгава у централни део језгра плазме. У оба случаја анализат под високом температуром плазме прво испарава, затим се атомизује и крајње јонизује. Тек од тренутка када се анализат у плазми налази у облику јона настају разлике између ове две технике. Када је *ICP-MS* техника у питању, јони анализата су ти који се даље усмеравају на масени спектрометар где се раздвајају на

основу разлике у односу масе и наелектрисања. Код *ICP-OES* технике, посматра се и анализира спектар који побуђени јони анализита емитују приликом релаксације до основног стања. Како су систем за увођење узорка и индуктивно спрегнута плазма описани претходно, само делови који се разликују ће бити обрађени у даљем тексту.



Слика 2.28. Приказ две могуће конфигурације индуктивно спрегнуте плазме код *ICP-OES* технике: (А) радијална и (Б) аксијална (прилагођено према Boss и Kenneth, 2004).

Током посматрања атомске емисије из плазме постоје две могуће конфигурације: радијална (поглед са стране) и аксијална (поглед спреда, директан поглед) (слика 2.28.) (Boss и Kenneth, 2004). Постоји и трећи случај комбинованог посматрања. Када је комерцијална употреба у питању, оба типа посматрања имају своје предности и мане.

Радијална конфигурација се најчешће користи уколико се анализирају узорци са високим концентрацијама елемената. Оваквим посматрањем је ограничен пут светлости као и осетљивост, али и матрикс и спектралне сметње.

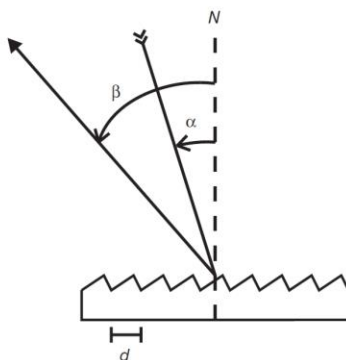
Када је аксијални начин посматрања у питању достижу се нижи детекциони лимити и већа осетљивост у односу на радијално посматрање. Аксијалним посматрањем, већа је могућност појављивања спектралних сметњи и сметњи које произилазе из матрикса. Пошто се посматрање обавља кроз знатно хладнији реп плазме, може доћи до самоапсорпције. У случају када се анализирају јако компликовани матрикси са јако широким концентрационим опсегом елемента, аксијални начин посматрања је неприхватљив. Комерцијални уређаји најчешће комбинују аксијални и радијални начин посматрања у зависности од конкретних аналитичких захтева. Могуће је прикупљати информације о емитованим сигнаlima из обе оријентације. Повећавањем оваквих могућности одређеног инструмента, повећава се време анализе и умањује се пропусност технике.

ICP-OES технику карактерише изузетно велики број емисионих спектралних линија. Рецимо, при одређивању 70 елемената овом техником у опсегу од 200 до 600 nm може се детектовати око 70 000 емисионих линија. С обзиром на овако велики број спектралних линија у јако малом опсегу таласних дужина од технике се захтева висока

резолюција и велика моћ раздвајања. Сметње настају чак и при јако ниским концентрацијама пратећих елемената у узорку.

Раздвајање емитованог зрачења на основу таласних дужина се може обављати на више начина. Најчешће се користи раздвајање помоћу дифракционе решетке, док се у неким случајевима могу користити и призме, филтери и интерферометри.

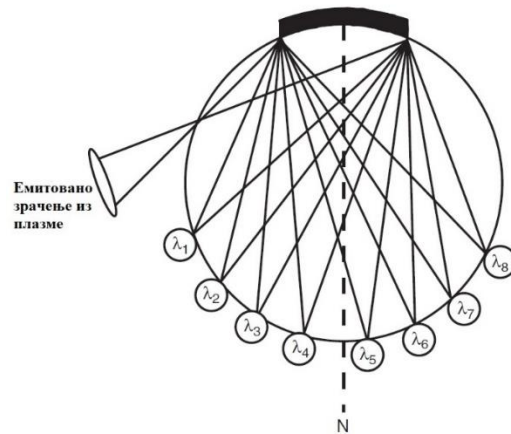
Већина *ICP-OES* инструмената поседује решетке са зарезима или жљебовима, густине од 600 до 4200 зареза по милиметру (Слика 2.29.) (Нон *et al.*, 2016). Када зрачење доспе до такве решетке, дифракциони угао зависи од таласне дужине зрачења и густине зареза на решетки. Што је већа таласна дужина и већа густина зареза, већи ће бити и угао дифракције.



Слика 2.29. Приказ равне решетке са зарезима. N је нормална оса у односу на површину решетке. α и β су углови упадног зрачења у односу на осу N . d је ширина једног зареза (Нон *et al.*, 2016).

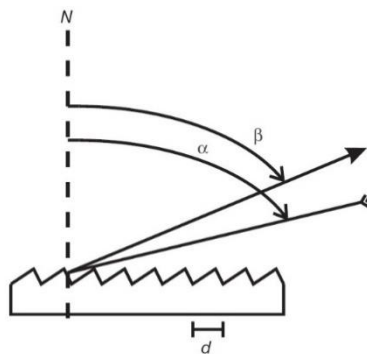
Још једна могућност је решетка на сферичном огледалу од легуре бакра и калаја. Најзначајнија карактеристика такве конкавне решетке је да су решетка и извор зрачења смештени на обиму круга који има дијаметар једнак радијусу закривљења решетке и на тај начин се зрачење увек фокусира у кругу. Упадни отвор је смештен тако да се кроз њега уводи зрачење, а многобројни излазни отвори могу бити смештени дуж круга на местима где „излази“ фотон таласне дужине од аналитичког интереса. Овакав систем је погодан за мултиелементарне *ICP-OES* конфигурације уређаја. Код оваквог система нема потребе за колиматорима или другом фокусирајућом оптиком или огледалима.

Руландова (*Rowland*) кружна решетка, са истим бројем зареза као у случају равне решетке обезбеђује сличну пропусност, али са значајно ширим спектралним прозором. Комерцијално оптимизована верзија је приказана на слици 2.30.



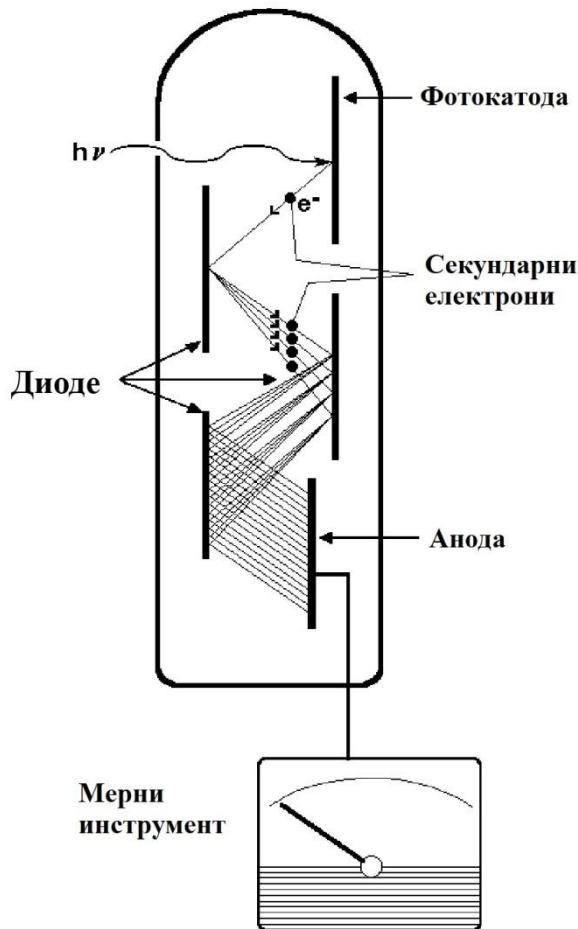
Слика 2.30. Приказ конкавне решетке код ICP-OES система (прилагођено према Hou *et al.*, 2016).

Конфигурација која обезбеђује највишу резолуцију за мултиелементарну анализу је заснована на равном кристалу са зарезима, али са значајно оштријим упадним углом (Слика 2.31.). Најчешће је густина зареза јако велика, и до 70 зареза по милиметру ($d=0,014 \text{ mm}$). Повећавање броја зареза повећава резолуцију и омогућава раздвајање зрачења са оштријим упадним угловима.



Слика 2.31. Приказ решетке на равном кристалу са зарезима и значајно оштријим упадним углом. N је нормална оса у односу на површину решетке. α је угао упадног зрачења, β је угао дифрактованог зрачења у односу на осу N . d је ширина једног зареза (Hou *et al.*, 2016).

Након издвајања у спектрометру, одговарајуће емисиона линија бива даље усмерена на детектор и мерни уређај који одређују интензитет доспелог зрачења. Најчешће коришћени тип детектора је фотомултипликатор (слика 2.32.).



Слика 2.32. Шематски приказ фотомултипликатора (прилагођено према Boss и Kenneth, 2004).

Фотомултипликатор је цев под вакуумом која садржи фотосензитивни материјал који се назива фотокатода. Фотокатода има својство да емитује електроне када се изложи снопу фотона одређеног дела електромагнетног спектра. Емитовани електрони бивају убрзани ка диоди у чију површину ударају. Након судара, диода емитује два до пет пута више секундарних електрона у односу на примарно емитоване које су ударили у површину. Секундарни електрони бивају даље усмерени на следећу диоду са којом се сударају и њихов број бива вишеструко умножен. Најчешће, фотомултипликатор садржи 9 до 16 диода и након сваког удара електрони бивају мултиплицирани. Последњи корак је сакупљање електрона од стране анода са последње диоде у низу. Након удара само једног фотона у фотокатоду, након мултипликације чак 10^6 електрона може доспети до аноде ако се користи низ од 9 диода. Електрична струја која се измери на аноди пропорционална је интензитету зрачења које доспе на фотокатоду, односно фотомултипликатор. Овакав тип детектора се може користити за мерење јако широког опсега таласних дужина и има могућност појачавања слабих емисионих сигнала (Boss и Kenneth, 2004).

3. Циљеви истраживања

Основни циљеви ове докторске дисертације су:

- а) Развој и оптимизација методе анализе елемената у биљним узорцима употребом *WD-XRF* спектрометрије;
- б) Испитивање потенцијала целулозе као универзалног матрикса за производњу синтетичких стандарда за калибрацију *WD-XRF* уређаја за анализу елемената у биљном материјалу;
- в) Испитивање безстандардне методе анализе садржаја метала у биљним матриксама помоћу *UniQuant* софтверског пакета и упоређивање са резултатима *XRF* добијених емпиријском калибрацијом;
- г) Упоређивање резултата реалних узорака добијених помоћу *WD-XRF* и *ICP-MS*, *ICP-OES* и *INAA* техника;
- д) Оптимизација рутинске анализе биљног узорка помоћу *WD-XRF* спектрометрије.

4. Експериментални део

4.1. Припрема биљних узорка за испитивање безстандардне методе (УК)

За потребе овог експеримента припремљена су три основна сета узорка како би се испитали утицаји варијације три параметра припреме узорка на безстандардну методу: (1) варијација масе узорка; (2) варијација примењеног притисака пелетирања; (3) варијација односа масе узорка и везивног средства (воска).

Биљни узорци црног бора (*Pinus nigra*) и беле јеле (*Abies alba*) су прикупљени у јесен 2017. године у подручју централне Србије. Након одвајања од грана, иглице су остављене на ваздуху како би се сушиле на собној температури током периода од пар дана (слика 4.1).



Слика 4.1 Приказ биљног узорка иглица јеле пре и после одвајања од гране.

Након сушења на ваздуху, иглице су даље сушене у сушници на температури од 60 ± 2 °C током 24 сата. Након истека времена, иглице су уситњене помоћу блендера. Уситњени узорци су затим враћени у сушницу и сушење је настављено до постизања константне масе. Приказ процеса добијања хомогеног и осушеног узорка приказан је на слици 4.2.



Слика 4.2 Приказ узорка иглица бора током процеса сушења, уситњавања и хомогенизације.

Осушени, уситњени и хомогенизовани узорци у виду композита су даље коришћени за припрему пелета за XRF анализу. Како је безстандардна метода захтевала

унос податка о садржају органске супстанце, претпостављено је да губитак масе при жарењу на 500 °C представља садржај органске супстанце. Иглице су загреване на 500 °C до постизања константне масе.

Композитни узорци, који су представљали уситњене и осушене иглице су пресовани помоћу *Retsch PP25* хидрауличне пресе са пречником пелета 32 mm (слика 4.3).



Слика 4.3 Retsch PP25 хидраулична преса.

Како би се испитао утицај промене масе узорка, направљено је неколико серија узорака које су садржале по пет пелета, од 1 до 5 g. Две серије пелета од иглица бора су садржале по 15 и 20 % везивног средства, док су две серије пелета од иглица јеле садржале по 10 и 20 % везивног средства.

Утицај различитих примењених притисака током пелетирања је испитан помоћу пелета коју су направљени од 4 g узорка (посебан сет за иглице бора, посебан сет за иглице јеле) и 20 % везивног средства. На пелете обе серије је примењен различит притисак, и то 10, 15, 20 и 25 тона.

Утицај промене односа везивног средства и узорка је испитан помоћу пелета чија је маса увек била 4 g, али се повећавао проценат садржаја везивног средства, и то од 0 % до 5, 10, 15, 20 и 25 %. Као везивно средство се користио восак *Hoechst wax C micropowder* (*Merck, C.A.S. number: 110-30-5*). Сва мерења на уређају су обављена у дуплику.

Описани експерименти су тако дизајнирани да могу да испитају како различите промене параметара припреме узорка могу да утичу на тачност одређивања. Колики је утицај сваког од испитаних параметара припреме узорка на тачност *XRF* анализе је одређено посматрањем промене системске грешке добијених резултата. Како би се обавила свеобухватна процена тачности, било је неопходно одредити и случајну грешку. У ту сврху, пелети масе 4 g са 20 % воска су направљени у трипликату, од обе врсте биљног материјала.

4.2. Оптимизација аналитичких параметара за емпиријску калибрацију *WD-XRF* спектрометра

Варијације аналитичких параметара као што су одабрани кристал, јачина струје (mA), напон (kV) на рендгенској цеви, затим, колиматор и детектор су примењиване при анализи двадесет елемената (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi). Карактеристична линија свеког елемента је очитана у квалитативним спектрима са различитом комбинацијом аналитичких параметара који би могли да утичу на интензитет карактеристичног зрачења и изглед пика у спектру. Јако је тешко наћи реалан биљни узорак који има довољан број елемената у одговарајућој концентрацији за потребе овог истраживања. Целулоза има матрикс који је јако сличан биљном и додатком течном стандардног елемента током припреме узорка (спајковање) је лако направити стандард који има комбинацију жељених елемената у одговарајућој концентрацији и матрикс сачињен од лаких елемената. Спајковани стандард целулозе концентрације 500 mg·kg⁻¹ је коришћен за потребе овог експеримента. Поступак спајковања целулозе и припреме пелета описан је у поглављу 4.3.

У табелама 4.1 до 4.5 су приказане све варијације аналитичких параметара при одређивању елемената који су испитивани.

Табела 4.1 Приказ варијација примењених аналитичких параметра за Na, Mg, Al и K.

Елемент	Кристал	Таласна дужина линије (nm)	Колиматор	Детектор	Струја (mA)	Напон (kV)
Na	AX03	45,249	2,60	FPC	80	30
	AX03	45,249	1,00	FPC	80	30
	AX03	45,249	0,40	FPC	80	30
	AX03	45,249	0,15	FPC	80	30
	AX09	15,219	1,00	FPC	80	30
	AX09	15,219	0,40	FPC	80	30
	AX09	15,219	0,15	FPC	80	30
Mg	AX03	37,259	2,60	FPC	80	30
	AX03	37,259	1,00	FPC	80	30
	AX03	37,259	0,40	FPC	80	30
	AX03	37,259	0,15	FPC	80	30
Al	AX03	31,255	2,60	FPC	80	30
	AX03	31,255	1,00	FPC	80	30
	AX03	31,255	0,40	FPC	80	30
	AX03	31,255	0,15	FPC	80	30
	PET	144,71	1,00	FPC	80	30
	PET	144,71	0,40	FPC	80	30
	PET	144,71	0,15	FPC	80	30
	PET	144,71	2,60	FPC	80	30
K	PET	50,633	1,00	FPC	80	30
	PET	50,633	0,40	FPC	80	30
	PET	50,633	0,15	FPC	80	30
	Ge111	69,911	1,00	FPC	80	30
	Ge111	69,911	0,40	FPC	80	30
	Ge111	69,911	0,15	FPC	80	30
	LiF200	136,684	1,00	FPC	80	30
	LiF200	136,684	0,40	FPC	80	30
	LiF200	136,684	0,15	FPC	80	30

Табела 4.2 Приказ варијација примењених аналитичких параметра за Ca, Cr и Mn.

Елемент	Кристал	Таласна дужина линије (nm)	Колиimator	Детектор	Струја (mA)	Напон (kV)
Ca	Ge111	61,903	0,15	FPC	80	30
	Ge111	61,903	0,40	FPC	80	30
	Ge111	61,903	1,00	FPC	80	30
	PET	45,146	0,15	FPC	80	30
	PET	45,146	0,40	FPC	80	30
	PET	45,146	1,00	FPC	80	30
	LiF200	113,086	0,15	FPC	80	30
	LiF200	113,086	0,40	FPC	80	30
	LiF200	113,086	1,00	FPC	80	30
Cr	LiF200	69,354	0,15	FPC	50	50
	LiF200	69,354	0,40	FPC	50	50
	LiF200	69,354	1,00	FPC	50	50
	LiF220	107,109	0,15	FPC	50	50
	LiF220	107,109	0,40	FPC	50	50
	LiF220	107,109	1,00	FPC	50	50
	LiF220	107,109	0,15	SC	50	50
	LiF220	107,109	0,40	SC	50	50
	LiF220	107,109	1,00	SC	50	50
Mn	LiF200	62,973	1,00	FPC	50	50
	LiF200	62,973	0,40	FPC	50	50
	LiF200	62,973	0,15	FPC	50	50
	LiF220	95,201	1,00	FPC	50	50
	LiF220	95,201	0,40	FPC	50	50
	LiF220	95,201	0,15	FPC	50	50
	LiF220	95,201	1,00	SC	50	50
	LiF220	95,201	0,40	SC	50	50
	LiF220	95,201	0,15	SC	50	50

Табела 4.3 Приказ варијација примењених аналитичких параметра за Fe, Co, Ni и Cu.

Елемент	Кристал	Таласна дужина линије (nm)	Колиimator	Детектор	Струја (mA)	Напон (kV)
Fe	LiF200	57,518	1,00	FPC	50	50
	LiF200	57,518	0,40	FPC	50	50
	LiF200	57,518	0,15	FPC	50	50
	LiF220	85,726	1,00	FPC	50	50
	LiF220	85,726	0,40	FPC	50	50
	LiF220	85,726	0,15	FPC	50	50
Co	LiF200	52,795	0,15	FPC	50	50
	LiF200	52,795	0,4	FPC	50	50
	LiF200	52,795	1,00	FPC	50	50
	LiF220	77,894	0,15	FPC	50	50
	LiF220	77,894	0,40	FPC	50	50
	LiF220	77,894	1,00	FPC	50	50
Ni	LiF200	48,667	0,40	FPC	50	50
	LiF200	48,667	0,15	FPC	50	50
	LiF220	71,265	0,40	FPC	50	50
	LiF220	71,265	0,15	FPC	50	50
Cu	LiF200	45,027	0,40	FPC	50	50
	LiF200	45,027	0,15	FPC	50	50
	LiF200	45,027	0,40	SC	50	50
	LiF200	45,027	0,15	SC	50	50
	LiF220	65,555	0,40	FPC	50	50
	LiF220	65,555	0,15	FPC	50	50
	LiF220	65,555	0,40	SC	50	50
	LiF220	65,555	0,15	SC	50	50

Табела 4.4 Приказ варијација примењених аналитичких параметра за Zn, Ga, Sr, Ag, Cd и In.

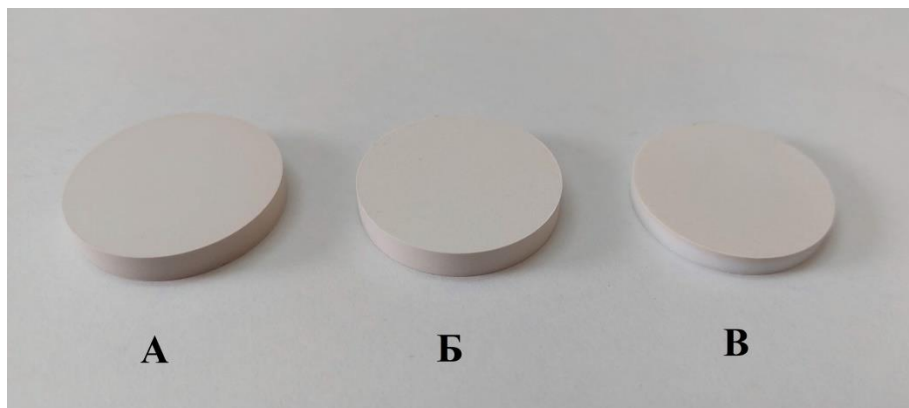
Елемент	Кристал	Таласна дужина линије (nm)	Колиimator	Детектор	Струја (mA)	Напон (kV)
Zn	LiF200	41,799	0,40	FPC	50	50
	LiF200	41,799	0,15	FPC	50	50
	LiF200	41,799	0,40	SC	50	50
	LiF200	41,799	0,15	SC	50	50
	LiF220	60,579	0,40	FPC	50	50
	LiF220	60,579	0,15	FPC	50	50
	LiF220	60,579	0,40	SC	50	50
	LiF220	60,579	0,15	SC	50	50
Ga	LiF200	38,917	0,40	SC	50	50
	LiF200	38,917	0,15	SC	50	50
	LiF220	56,197	0,40	SC	50	50
	LiF220	56,197	0,15	SC	50	50
Sr	LiF200	25,149	0,40	SC	50	50
	LiF200	25,149	0,15	SC	50	50
	LiF220	35,855	0,40	SC	50	50
	LiF220	35,855	0,15	SC	50	50
Ag	LiF220	22,716	0,15	SC	60	40
	LiF220	22,716	0,15	SC	70	40
	LiF220	22,716	0,40	SC	60	40
	LiF220	22,716	0,40	SC	70	40
Cd	LiF220	21,715	0,15	SC	60	40
	LiF220	21,715	0,15	SC	70	40
	LiF220	21,715	0,40	SC	60	40
	LiF220	21,715	0,40	SC	70	40
In	LiF220	20,778	0,15	SC	60	40
	LiF220	20,778	0,15	SC	70	40
	LiF220	20,778	0,40	SC	60	40
	LiF220	20,778	0,40	SC	70	40

Табела 4.5 Приказ варијација примењених аналитичких параметра за Bi, Pb и Tl.

Елемент	Кристал	Таласна дужина линије (nm)	Колиimator	Детектор	Струја (mA)	Напон (kV)
Bi	LiF220	47,361	0,40	SC	50	50
	LiF220	47,361	0,15	SC	60	40
	LiF220	47,361	0,40	SC	60	40
	LiF220	47,361	0,15	SC	70	40
	LiF220	47,361	0,40	SC	70	40
Pb	LiF220	48,733	0,40	SC	50	50
	LiF220	48,733	0,15	SC	60	40
	LiF220	48,733	0,40	SC	60	40
	LiF220	48,733	0,15	SC	70	40
	LiF220	48,733	0,40	SC	70	40
Tl	LiF220	50,168	0,40	SC	50	50
	LiF220	50,168	0,15	SC	60	40
	LiF220	50,168	0,40	SC	60	40
	LiF220	50,168	0,15	SC	70	40
	LiF220	50,168	0,40	SC	70	40

4.3. Развијање метода *WD-XRF* анализе биљног материјала

За потребе развијања метода за квантитативну анализу елемената помоћу целулозних стандарда употребом *WD-XRF* спектрометра, испитана су три различита начина припреме узорака (слика 4.4): стандарди од чисте целулозе коришћени за креирање методе анализе „Целулоза“ (Ц) (на слици под А), стандарди од целулозе са додатком 20 % воска коришћени за креирање методе анализе „Целулоза са воском“ (ЦВ) (на слици под Б), стандарди са целулозом нанетом у танком слоју на носач борне киселине коришћени за креирање методе анализе „Танак слој“ (ТС) узорка (на слици под В).



Слика 4.4 Пелети целулозних стандарда: (А) спајкована целулоза, (Б) спајкована целулоза са 20 % воска, (В) спајкована целулоза у танком слоју нанета на носач од борне киселине.

4.3.1. Метода „Целулоза“ (Ц)

„Целулоза“ (Ц) представља методу квантитативне анализе елемената биљног материјала помоћу *WD-XRF* технике. При креирању Целулоза методе, за емпиријску калибрацију *WD-XRF* спектрометра, коришћена је стандардна серија синтетичких целулозних стандарда. Целулозни стандарди су направљени пресовањем одговарајуће количине спајковане целулозе у пелете пречника 32 mm. Метода Целулоза је намењена за анализу биљног материјала који је за потребе *WD-XRF* анализе припремљен на исти начин као и целулозни калибрациони стандарди, пресовањем спрашеног биљног материјала у пелете.

4.3.2. Метода „Целулоза са воском“ (ЦВ)

„Целулоза са воском“ (ЦВ) представља методу квантитативне анализе елемената биљног материјала помоћу *WD-XRF* технике. При креирању ЦВ методе, за емпиријску калибрацију *WD-XRF* спектрометра, коришћена је стандардна серија синтетичких целулозних стандарда. Целулозни стандарди су направљени пресовањем одговарајуће количине смеше спајковане целулозе са додатком 20 % воска у пелете пречника 32 mm. Метода ЦВ је намењена за анализу биљног материјала који је за потребе *WD-XRF* анализе

припремљен на исти начин као и целулозни калибрациони стандарди, пресовањем смеше спрашеног биљног материјала са додатком 20 % воска у пелете.

4.3.3. Метода „Танак слој“ (ТС)

„Танак слој“ (ТС) представља методу квантитативне анализе елемената биљног материјала помоћу *WD-XRF* технике. При креирању ТС методе, за емпиријску калибрацију *WD-XRF* спектрометра, коришћена је стандардна серија синтетичких целулозних стандарда. Целулозни стандарди су направљени додатком одговарајуће количине смеше спајковане целулозе са додатком 20 % воска нанете у танком слоју на носач борне киселине, и даљим пресовањем у пелете пречника 32 mm. Метода ТС је намењена за анализу мале количине биљног материјала који је за потребе *WD-XRF* анализе припремљен на исти начин као и целулозни калибрациони стандарди, пресовањем у пелете смеше спрашеног биљног материјала са додатком 20 % воска нанетог у танком слоју на носач борне киселине .

4.3.4. Припремање синтетичких целулозних стандарда

За припрему целулозних стандарда коришћена је прашкаста чиста целулоза (*Acros Organics C.A.S. number: 9004-34-6*) којој је додата дефинисана количина мултиелементарног стандардног раствора (*Alfa Aesar Multi - Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®*). Спајковањем су се добиле жељене концентрације у целулози, и то: 0, 10, 20, 50, 100, 200 и 500 mg·kg⁻¹. За сваку концентрацију је у 8 g целулозе додата одговарајућа запремина стандардног раствора почетне концентрације 1000 mg·kg⁻¹. Стандардни раствор је садржао двадесет елемената: Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi. Након додатка стандардног раствора промена на целулозном матриксу је била минимална и није примећен значајан губитак масе (Pind, 1984) (Слика 4.5).



Слика 4.5 Спајковање целулозе током припреме најниже концентрације целулозног стандарда ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Спајкована целулоза је преко ноћи остављена у сушници на $60 \text{ }^\circ\text{C}$, како би вишак течности испарио. Затим је смеша хомогенизована у ахатном авану и настављено је сушење на температури од $60 \text{ }^\circ\text{C}$ до постизања константне масе.

Сваки спајковани контигент целулозе је подељен на три дела. Прва два дела су коришћена за припрему пелета за Целулоза (Ц) и Целулоза са воском (ЦВ) методе. Трећи део спајковане целулозе је сачуван за *ICP-OES* анализу како би се потврдило да је концентрација анализата у целулозним стандардима једнака жељеној концентрацији. Количине спајковане целулозе су биле $4,0 \text{ g}$ за Целулоза методу, $3,0 \text{ g}$ за Целулоза са воском методу и $0,70 \text{ g}$ за *ICP-OES* анализу. Сва спајковања су рађена у трипликату. Пелети који су припремани у оквиру ЦВ методе су садржали 20% везивног средства (*Hoechst wax C micropowder, Merck, C.A.S. number: 110-30-5*).

Друга серија целулозних стандарда је припремљена за потребе методе Танак слој (ТС). Концентрације које су се добијале спајковањем су биле исте као и код метода Целулоза (Ц) и Целулоза са воском (ЦВ). Количина од $2,0 \text{ g}$ спајковане целулозе је подељена на три једнака дела од $0,70 \text{ g}$ и сваком делу је додато 20% воска. Смеша спајковане целулозе и воска се пажљиво, у танком слоју наносила на носач од 3 g борне киселине.

Како би се проверила тачност метода, сертификовани референтни материјали (СРМ) листа парадајза (*NIST SRM 1573a Tomato leaves*) и иглица бора (*NIST SRM 1575a Pine needles*) су припремани на исти начин као и пелети целулозе за методе Целулоза са воском (ЦВ) и Танак слој (ТС).

Креиране методе су даље испитане поређењем резултата *WD-XRF* и *ICP-MS* анализе реалних узорка. У ту сврху су одабрана 33 узорка иглица различитих врста четинара. Иглице су осушене на собној температури и хомогенизоване помоћу ултрацентрифугалног млина (*Retsch ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Germany*). Пелети за *XRF* анализу су припремани по истој процедури као и целулозни пелети са 20 % везивног средства.

Сви пелети (целулозуни, сертификовани референтни материјали и реални узорци) су пресовани у пелете пречника 32 mm. За процес пелетирања је коришћена хидраулична преса *Retsch PP 25 (Retsch GmbH, Хан, Немачка)*. За све пелете је примењен исти програм пелетирања који је подразумевао притисак од 20 тона у трајању од 5 минута.

Аликвот спајковане целулозе намењен за анализу на *ICP-OES* је разорен у отвореном систему. Маса од 0,7 g спајковане целулозе је одмерена у стакленим чашама и дигестија је спроведена на воденом купатилу етапним додавањем 35 cm³ концентроване HNO₃ (*Sigma-Aldrich, C.A.S. number: 7697-37-2*) у аликвотима од по 5 cm³ и 8 cm³ 30 % H₂O₂ (*Sigma-Aldrich, C.A.S. number: 7722-84-1*) у аликвотима од по 2 cm³.

Реални биљни узорци четинара су за *ICP-MS* анализу припремани коришћењем система микроталасне дигестије (*MLS UltraCLAVE*). Узорци су разарани помоћу 5 cm³ дестиловане концентроване HNO₃ (65% p.a., *Carl Roth*). Сви узорци су анализирани у трипликату. Узорци бланка и сертификованих референтних материјала (*NIST SRM 1573a* и *NIST SRM 1575a*) су коришћени за контролу квалитета.

Након емпиријске калибрације помоћу стандарда од спајковане целулозе испитани су параметри валидације креираних метода, и то: осетљивост, линеарност, лимит детекције, лимит квантификације, прецизност (поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност) и тачност.

4.3.5. Параметри валидације креираних метода

Основни параметри валидације (осетљивост, линеарност, лимит детекције, лимит квантификације, прецизност (поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност)) су испитани код метода Целулоза, Целулоза са воском и Танак слој. Метода Целулоза има ограничену практичну примену, јер пелети направљени само од биљног узорка нису довољно стабилни у условима унутар коморе спектрометра). Са друге стране, безстандардна метода УК има потенцијал за практичну примену, посебно у скрининг тестирањима. Из поменутих разлога, испитивање тачности је обављено за ЦВ, ТС и УК методе.

4.3.5.1. Осетљивост

Карактеристике креираних метода су процењене кроз осетљивост, односно посматран је нагиб калибрационе праве. Калибрациона права на апциси има концентрацију анализата, а на ординати одговор инструмента, односно интензитет рендгенског зрачења (*kcps- kilo counts per second*, бројање по секунди). Осетљивост је испитивана за сваку креирану методу. Пошто су све калибрационе праве креиране у трипликату, посматрана је аритметичка средина нагиб калибрационе праве.

4.3.5.2. Линеарни опсег

Линеарни опсег аналитичких метода је испитан применом линеарне регресије на калибрационим правима мерених целулозних стандарда помоћу креираних метода. Како би била квантификована девијација линеарности, посматран је коефицијент линеарности (R^2), заједно са нагибом и одсечком на ординати. Како су све калибрационе праве креиране у трипликату, посматрана је аритметичка средина посматраних параметра линеарности.

4.3.5.3. Лимит детекције и лимит квантификације

Лимит детекције (ЛД) је одређен на основу једначине 4.1 у која представља количник три стандардне девијације одсечка (3σ) на ординати и нагиба калибрационе праве (Shrivastava and Gupta, 2011):

$$ЛД = \frac{3\sigma}{\text{нагиб}} \quad (\text{Једначина 4.1})$$

Лимит квантификације (ЛК) је одређен на основу једначине 4.2 у која представља количник десет стандардних девијација одсечка (10σ) на ординати и нагиба калибрационе праве:

$$ЛК = \frac{10\sigma}{\text{нагиб}} \quad (\text{Једначина 4.2})$$

4.3.5.4. Прецизност

Посматрањем поновљивости и унутарлабораторијске репродуктивности (УЛР) испитана је прецизност. Поновљивост је одређена мерењем истог пелета три пута током једног дана и престављена је као релативна стандардна девијација (РСД, %) поновљених мерења. Унутарлабораторијска репродуктивност представља релативну девијацију мерења различитих пелета истих концентрационих нивоа. УЛР описује робусност методе, односно колико се резултати мерења мењају уколико се промене околности током регуларног аналитичког рада. Из тог разлога, УЛР покрива цео аналитички процес, од припреме пелета стандарда до мерења на инструменту.

Поновљивост и УЛР су одређиване помоћу пелета два концентрациона нивоа, 20 и 500 mg kg⁻¹. Такође, посматрањем УРЛ добија се информација о успешности поступка спајковања с обзиром да су за сваку методу стандарди спајковане целулозе рађени у трипликату.

4.3.5.5. Тачност

Тачност представља меру слагања измерене са правом вредношћу. У првом кораку је било важно потврдити да целулозни стандарди имају заиста жељену вредност концентрације анализата. Провера веродостојности концентрација је обезбеђена дигестијом аликвота спајковане целулозе која се користила за припрему пелета за калибрацију *WD-XRF* и даљом анализом на *ICP-OES* уређају. Концентрације добијене помоћу обе технике су упоређене корелационом анализом.

У следећем кораку је тачност креираних метода проверена анализом сертификованих референтних биљних материјала (*NIST SRM 1573a* и *NIST SRM 1575a*) и поређењем добијених концентрација са референтним вредностима.

Укупно 33 реална узорка иглица четинара су анализирани помоћу *ICP-MS* и *WD-XRF* уређаја. Добијене концентрације су упоређене корелационом анализом.

Параметар Тачност (*T*) креираних аналитичких метода је додатно тестирана помоћу критеријума који је описан у једначини 4.3 (Ivanova *et al.*, 1998).

$$T = \frac{|C_x - C_w| + 2\sigma}{C_w} * 100 \quad (\text{Једначина 4.3})$$

Члан C_x представља измерену вредност концентрације анализата, C_w је тачна вредност, док је σ стандардна девијација C_x мерења. Приказана једначина узима у обзир системску ($C_x - C_w$) и случајну грешку (2σ). Добијени резултат представља проценат укупне грешке у односу на референтну вредност C_w . Како су вредности T приказане у облику %, тачности различитих елемената и концентрационих нивоа се може лако поредити. Уколико је T вредност мања од 25 % сматра се одличном. Вредности T између 25 и 50 %, се сматрају прихватљивим, док су вредности T веће од 50 % лоше (Ivanova *et al.*, 1998).

Додатно је испитана безстандардна метода анализе *UniQuant*. Том приликом су анализирани сви пелети синтетичких целулозних стандарда који су направљени за претходно поменуте методе.

4.4. Припрема реалних биљних узорака

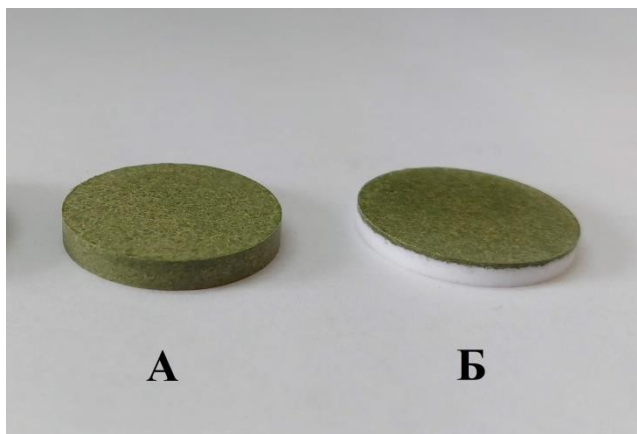
Биљни узорци четири врсте четинара црни бор (*Pinus nigra*), јела (*Abies alba*), тиса (*Taxus baccata*) и ариш (*Larix decidua*) анализирани су уз помоћ четири аналитичке

технике (*ICP-MS*, *ICP-OES*, *WD-XRF*, *INAA*). Иглице четинара су сакупљане током априла и маја 2016. године на четири локације: Београд (БГ), Панчево (ПА), Банатски Брестовац (ББ) и Шар-планина (ШП). Поменуте локације припадају урбаним и руралним срединама. На тај начин се обезбеђује широки концентрациони опсег елемената присутних у четинама. Прикупљане четине су биле старе годину дана, док су изданци потицали из текуће године.

Након узорковања, иглице су смештене у пластичне кесе. Након доношења у лабораторију, остављене су на собној температури и ваздуху како би се сушиле. Сушење је настављено на 60 °C у сушници. Иглице су затим самлевене и поново враћене у сушницу на 60 °C до постизања константне масе. До анализе, самлевени и осушени узорци су чувани у пластичним киветама. Биљни узорци су за сваку аналитичку технику припремани адекватним поступком који ће бити описани у даљем тексту.

4.4.1. Припрема реалних биљних узорака за *WD-XRF* анализу

За потребе *WD-XRF* самлевени и осушени узорци иглица су пресовани помоћу *Retsch PP25* хидрауличне пресе у пелете са пречником 32 mm (слика 4.3). Направљене су две врсте пелета: пелет са 20 % везивног средства и пелет са узорком у танком слоју на носачу од борне киселине (Слика 4.6).



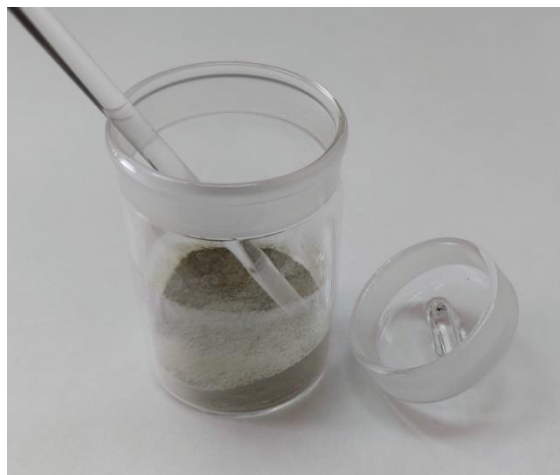
Слика 4.6 Пелети иглица четинара: (А) пелет са 20 % везивног средства, (Б) пелет са узорком у танком слоју на носачу од борне киселине.

Пелети од биљног материјала са додатком воска су припреман од око 4 g уситњених иглица четина и 20 % везивног средства. Као везивно средство се користио восак *Hoechst wax C micropowder* (*Merck, S.A.S. number: 110-30-5*). Узорак и восак су одмеравани у стакленим вегегласима и затим хомогенизовани помоћу стакленог штапића (Слика 4.7).



Слика 4.7 Уситњени биљни узорак са додатком 20 % воска, пре хомогенизације.

На слици 4.8 приказана је смеша биљног узорка и воска након хомогенизације. С обзиром да су биљни узорак и восак различите боје и величине честице, визуелним путем је потврђена хомогеност добијене смеше.



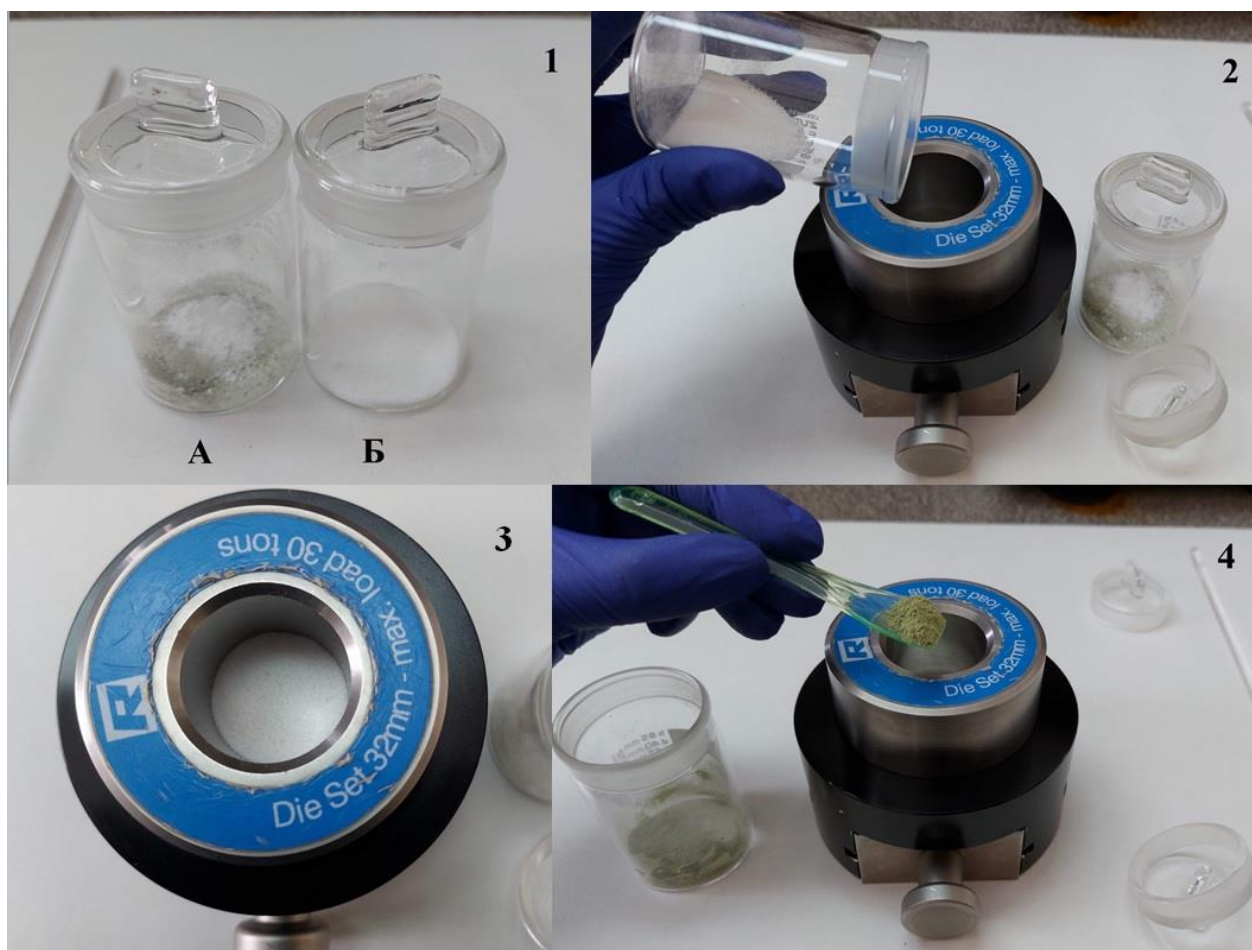
Слика 4.8 Смеша биљног узорка и воска након хомогенизације.

Након хомогенизације, смеша биљног узорка и воска пренесена је у носач узорка пресе (слика 4.9) и унутар пресе је примењиван притисак од 15 тона у трајању од 5 минута. Притисак од 15 тона је искуствено одређен као оптималан.



Слика 4.9 Уношење хомогене смеше биљног узорка и воска у носач узорка пресе.

Уколико је маса биљног узорка износила мање од 1 g, пелети су прављени наношењем узорка у танком слоју на носач од борне киселине. На слици 4.10 је по ступњевима приказан поступак припреме пелета у танком слоју. На првом делу слике (1) су приказани вегегласи у којима су одмерени: смеша биљног узорка и 20 % воска (А) и борна киселина (Б). У носач узорка пресе је прво унета борна киселина (2 део слике) која је била равномерно распоређена унутар носача (3 део слике). Маса носача је износила 3 g. Затим је ручно, помоћу адекватне шпатуле, пажљиво нанета хомогена смеша биљног узорка и воска у танком слоју (4 део слике). Потом је на узорак примењиван притисак од 15 тона у трајању од 5 минута. До анализе, пелетирани узорци су чувани у затвореним пластичним контејнерима.



Слика 4.10 Поступак припреме узорка у танком слоју на носачу од борне киселине. (1) Одмерен биљни узорак и восак (А) и борна киселина (Б), (2) Уношење борне киселине у носач узорка, (3) Равномерно распоређивање носача од борне киселине, (4) Наношење смеше узорка и воска у танком слоју.

Добијени пелети су анализирани помоћу *WD-XRF* спектрометра, применом безстандардне методе *UniQuant* и помоћу претходно креираних метода емпиријске калибрације помоћу спајкованих целулозних стандарда. За анализирање пелета са 20 % воска коришћена је метода Целулоза са воском (ЦВ), док је за анализу пелета у танком слоју коришћена метода Танак слој (ТС).

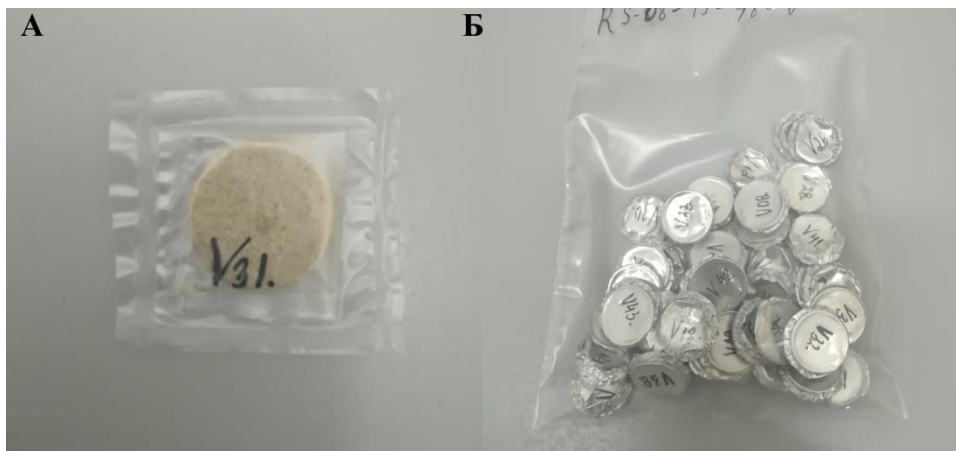
4.4.2. Припрема реалних биљних узорака за *INAA* анализу

Инструментална неутронска активациона анализа је коришћена за квантитативну анализу биљних узорака. Прецизно је одмеравано око 0,3 g спрашеног биљног узорка и уз помоћ пресе биљни прах је пресован у пелете пречника 10 милиметара (слика 4.11).



Слика 4.11 Преса коришћена за добијање пелета анализираних помоћу NAA технике.

Добијени пелети су паковани на два различита начина у зависности од дужине озрачивања, тако да су за сваки пелет припремљена по два подузорка. За одређивање краткоживећих изотопа, узорци су паковани у полиетилен (слика 4.12, део А), док су за потребе одређивања дугоживећих изотопа паковани у алуминијумске фолије (слика 4.12, део Б).



Слика 4.12 Приказ узорка припремљених за озрачивање. (А) Узорак припремљен за одређивање краткоживећих изотопа, (Б) узорак припремљен за одређивање дугоживећих изотопа.

Пре озрачивања, упаковани узорци се паковани у такозване контејнере (слика 4.13). Пошто је приликом *INAA* анализе јако важно да узорци и стандарди буду изложени

једнаком снопу неутрона, унутар једног контејнера су паковани узорци (најчешће десет узорака) и одговарајући стандарди.



Слика 4.13 Алуминијумски и полиетиленски контејнери за озрачивање узорака (Frontasyeva and Pavlov, 2000)

4.4.3. Припрема реалних биљних узорака за *ICP-OES* анализу

За потребе *ICP-OES* анализе узорци су разарани у отвореном систему. Осушени биљни узорци масе 0,5 до 1 g разарани су етапним додавањем 15 cm³ концентроване HNO₃ (*Sigma-Aldrich, C.A.S. number: 7697-37-2*) у аликвотима од по 5 cm³ и 6 cm³ 30 % водоник пероксида (*Sigma-Aldrich, C.A.S. number: 7722-84-1*) у аликвотима од по 2 cm³. Након разарања, узорци су филтрирани и пребачени у пластичне боце.

4.4.4. Припрема реалних биљних узорака за *ICP-MS* анализу

Реални биљни узорци четинара су за *ICP-MS* анализу припремани коришћењем система микроталасне дигестије (*MLS UltraCLAVE*). Узорци су разарани помоћу 5 cm³ дестиловане концентроване азотне киселине (65% *p.a.*, *Carl Roth*). За припрему калибрационих раствора коришћен је мултиелементарни стандард VI (*Certipur, Merck*). Сви узорци су анализирани у трипликату. Узорци бланка и сертификованог референтног материјала (*NIST SRM 1573a* и *NIST SRM 1575a*) су коришћени за контролу квалитета.

4.5. Инструменталне технике

За квалитативно и квантитативно одређивање елемената у различитим биљним, целулозним и узорцима стандардних материјала током израде овог рада, коришћене су следеће аналитичке технике:

- (1) Таласно дисперзивна рендгенско флуоресцентна спектрометрија, *WD-XRF*²;
- (2) Инструментална неутронска активациона анализа, *INAA*³;
- (3) Индуктивно спрегнута плазма са масеном спектрометријом, *ICP-MS*⁴;
- (4) Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом, *ICP-OES*¹.

У даљем тексту ће детаљније бити описане аналитичке поставке инструменталних техника које су се користиле. Начини припреме узорак за поменуте аналитичке технике су приказани раније у оквиру одељака са описом одговарајућих експерименталних целина (поглавља од 4.1 до 4.4).

4.5.1. Таласно дисперзивна рендгенско флуоресцентна анализа, *WD-XRF*

Током израде овог рада коришћен је таласно дисперзивни рендгенско флуоресцентни *ARL™ PERFORM'X* секвенцијални спектрометар (*Thermo Fisher Scientific, Швајцарска*). За производњу примарног рендгенског зрачења, уређај користи родијумску рендгенску цев, снаге 4,2 kW са подесивим напоном (максимални 80 kV) и струјом (максимално 120 mA) и берилијумским прозором дебљине 50 μm. Покретни гониометар је опремљен са седам различитих кристала (AXC16, AX09, AX03, Ge111, PET, LiF200, LiF220), четири колиматора (најшири (2,60), широк (1,00), средњи (0,40) и узан (0,15)) и тандемом два детектора (гасно пропорционално проточни бројач и сцинтилациони бројач). Комора спектрометра се налази под вакуумом и притисак у њој износи <1 Pa.

За анализу спектра и обраду података коришћен је специјализовани софтверски програм *OxSas* (*Thermo Fisher Scientific, Швајцарска*).

4.5.2. Безстандардна метода *UniQuant* (УК)

UniQuant (*Thermo Scientific, Швајцарска*) је комерцијално доступни софтверски пакет који представља безстандардну методу за семикватитативну и квантитативну рендгенско флуоресцентну анализу (*UniQuant*, новембар 2021). Овај софтверски пакет обрађује 115 одабраних мерних канала. Сваки мерни канал има дефинисане аналитичке услове и позицију гониометра која одговара одређеној таласној дужини. Током само једне анализе могуће је измерити интензитет једне или две аналитичке линије 79 елемената, од натријума до америцијума. Софтвер има могућност да покрије јако широк концентрациони опсег на најразличитијим типовима матрикса ослањајући се на само један сет иницијалних калибрационих података.

² Универзитет у Београду - Хемијски факултет, Студентски трг 12-16, 11000 Београд, Србија

³ Франкова лабораторија за неутронску физику, Обједињени институт за нуклеарна истраживања, Жолио-Кири 6, 141980 Дубна, Руска Федерација

⁴ Институт за хемију, Универзитет у Грацу, *Universitätsplatz 1*, 8010 Грац, Аустрија

UniQuant је заснован на методи фундаменталних параметара и одговарајућих алгоритама за обраду података. Алгоритми користе физичке једначине и параметре као што су коефицијенти масене апсорпције и спектрална дистрибуција рендгенске цеви. Како би се добили резултати одговарајуће тачности, поменути комплексни алгоритми примењују корекције ефеката матрикса и интерелементарних ефеката.

Поред дефинисаних алгоритама, подаци који се о конкретном узорку уносе у софтверски програм су од изузетне важности за продукцију тачних резултата. На основу унетих података, софтвер конвертује измерени интензитет рендгенског зрачења у концентрацију одређиваног елемента. Конкретно када је *UniQuant* у питању, неопходно је унети неколико тачних информација о анализираном узорку како би били сигурни да ће израчунавање концентрације бити обављено на адекватан начин. Софтвер рачуна концентрацију на основу густине узорка и из тог разлога су димензија пелета (висина и пречник) и маса (у милиграмима) круцијални подаци.

У случају биљног узорка, јако је важно описати и дефинисати који је проценат органске материје присутан у анализираној биљци. Показано је да одабир тачне емпиријске формуле органског матрикса може значајно да утиче на резултат (Andersen *et al.*, 2013). Током израде овог рада, претпостављено је да је органски матрикс базиран на целулози и коришћена је емпиријска формула $C_6H_{10}O_5$.

Поред поменутих података, коришћени софтвер захтева и уношење информације о односу масе везивног средства и узорка како би резултати аутоматски били кориговани за вредност садржаја везивног средства. Такође, *UniQuant* софтвер омогућава и одабир алтернативних линија уколико се одређује елемент чија карактеристична линија подлеже значајним преклапањима.

4.5.3. Инструментална неутронска активациона анализа, *INAA*

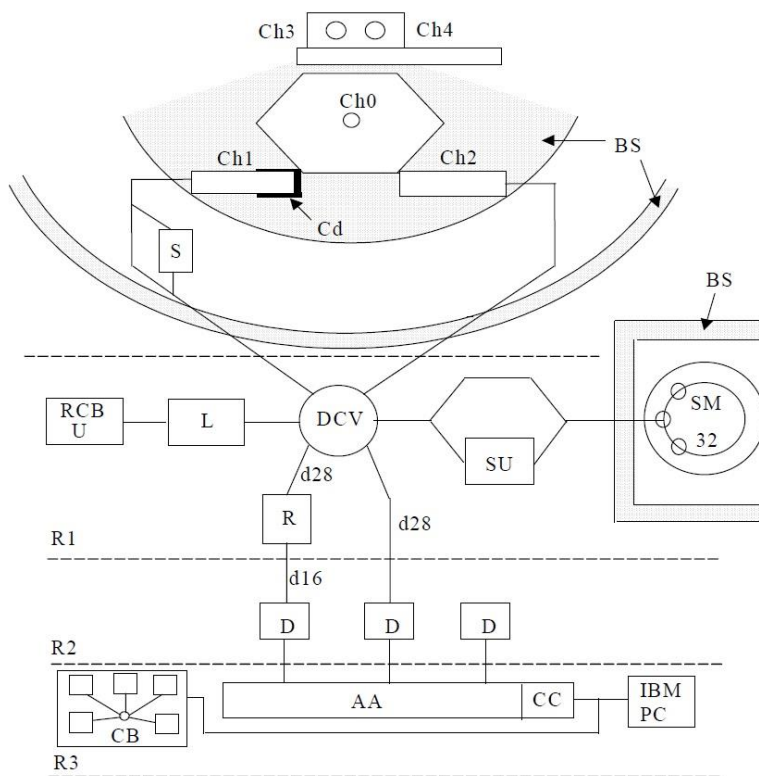
За потребе *INAA* анализе и озрачивање узорака, коришћен је брзи импулсни реактор ИБР-2 који се је спрегнут са пнеуматско-транспортним системом РЕГАТА. ИБР-2 поседује активну зону која је испуњена плутонијум (IV) оксидом (PuO_2). Око реактора се налазе модератори који успоравају неутроне (термализују). Поред модератора, реактор је опремљен и системом за хлађење са течним азотом који одржава константну радну температуру од 60 до 70 °C. Оваква радна температура омогућава одређивање елемената у форми лако испарљивих једињења. У импулсном реактору ИБР-2, неутрони и γ -зраци се стварају у периодичним кратким импулсима, а значајни параметри у том процесу су:

- (1) Средња густина снопа неутрона;
- (2) Трајање импулса;
- (3) Фреквенција;
- (4) Густина снопа честица у импулсу;
- (5) Фон између импулса.

Неутронски импулси у пулсирајућем реактору настају помоћу периодичне промене коефицијента стварања неутрона. Промена се дешава механичким путем, уз помоћ рефлектора. Два постојећа рефлектора се ротирају различитом брзином. Спорији рефлектор се обрће брзином од 5 обртаја/секунди, а брзи од 50 обртаја/секунди. Импулс неутрона настаје када оба рефлектора истовремено прођу кроз активну зону реактора. Реактор ИБР-2, помоћу своје конструкције рефлектора, емитује импулсе фреквенције 5,25 и 50 Нз. Поред неутрона, реактор, такође, излучује и γ -зраке. Водени слој модератора у активној зони реактора дебљине 5 cm обезбеђује генерисање термалних (0,55 eV) и резонантних (0,55-105 eV) неутрона.

ИБР-2 пулсирајући реактор поседује средњи топлотни капацитет од 2 MW. Снага импулса на врху максимума износи 1500 MW, док је снага између два импулса 0,12 MW. Полуширина импулса брзих неутрона износи 245 μ s, док је густина тока термалних неутрона на површини модератора $1013n (cm^2s)^{-1}$ (максимално $1016n (cm^2s)^{-1}$). Трајање импулса термалних неутрона је 320 μ s.

ИБР-2 реактор има 5 канала за ирадијацију узорака, од чега један (*Ch3*) пролази кроз активну зону (слика 4.14). Могуће је озрачивати пет контејнера истовремено у сваком од канала. Процес преноса контејнера се обавља пнеумо-транспортним системом РЕГАТА под притиском од 3 до 6 атмосфера. Контејнер са узорцима може минимално бити озрачен 3 секунде.



Слика 4.14 Приказ пнеумотранспортног система РЕГАТА. *Ch1, Ch2, Ch3, Ch4*-каналы за озрачивање, *S* – складиште радиоактивних узорака, *DCV* – контролни вентил за усмеравање, *L* – утоварна јединица, *RCB* – радиохемијски бокс, *U* – јединица за распакивање, *SU* – јединица за одвајање, *SM* – складиште за узорке, *P* – јединица за препакивање, *D* – складиште течног азота (хлађење Ge(Li) детектора), *AA* – анализатор амплитудног записа, *CB* – контролна табла, *CC* – *CAMAC* контролор, *R1, R2, R3* – просторије у којима су смештени узорци. (Frontasyeva and Pavlov, 2000).

Приликом одређивања краткоживећих изотопа Mg, Al, Si, Cl, Ca, Ti, V и Mn, контејнери са узорцима су били озрачени 3 минута. Дугоживећи продукти распада језгара су коришћени како би се одредили следећи елементи: Cl, Sc, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr, Mo, Ag, In, I, Cs, Ba, La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Yb, Lu, Hf, Ti, W, Au, Hg, Th и U. Ирадијација узорака како би се одредили дугоживећи изотопи је вршена, без прекида, 100 часова. У табели 4.6 приказани су изотопи који настају активацијом током примене *INAA* методе и њихове енергије и времена полураспада (Ostrovnaуа, 2000).

Табела 4.6 Изотопи који настају активацијом током примене *INAA* методе и њихове енергије и времена полураспада.

Елемент	Изотоп	Време полураспада	Енергија (keV)	Елемент	Изотоп	Време полураспада	Енергија (keV)
Na	²⁴ Na	15,0 h	2753	Mo	^{99m} Tc	60,0h	140,5
Mg	²⁷ Mg	9,45 min	1014,4	Ag	^{110m} Ag	249,7 g	657,8
Al	²⁸ Al	2,24 min	1778,9	Cd	¹¹⁵ Cd	44,6 d	527,9
Cl	³⁸ Cl	37,3 min	2167,5	Sb	¹²⁴ Sb	60,2 d	1691,0
K	⁴² K	12,4 h	1524,7	I	¹²⁸ I	25,0 min	442,3
Ca	⁴⁹ Ca	8,7 min	3084,4	Cs	¹³⁴ Cs	2,06 y	795,8
Sc	⁴⁶ Sc	83,8 d	889,2	Ba	¹³¹ Ba	11,8 d	496,8
V	⁵² V	3,76 min	1434,1	Hf	¹⁸¹ Hf	42,4 d	482,0
Cr	⁵¹ Cr	27,7 d	310,1	Ta	¹⁸² Ta	115 d	1221,4
Mn	⁵⁶ Mn	2,58 h	1810,7	W	¹⁸⁷ W	23,9 h	685,8
Fe	⁵⁹ Fe	44,5 d	1291,6	Au	¹⁹⁸ Au	2,7 d	411,8
Co	⁶⁰ Co	5,27 y	1332,4	La	¹⁴⁰ La	40,3 h	1596,5
Ni	⁵⁸ Co	71,3 d	810,8	Ce	¹⁴⁰ Ce	32,5 d	151,2
Cu	⁶⁶ Cu	12,7 h	1039,4	Sm	¹⁵³ Sm	46,8 h	103,2
Zn	⁶⁵ Zn	243,9 d	1116,0	Tb	¹⁶⁰ Tb	72,1 d	879,4
As	⁷⁶ As	26,3 h	559,1	Yb	¹⁶⁹ Yt	30,7 d	198,0
Se	⁷⁵ Se	118,8 h	264,7	Lu	¹⁷⁷ Lu	6,75 d	208,4
Br	⁸² Br	35,3 h	776,5	Th	²³³ Pa	27,4	312,0
Rb	⁸⁵ Rb	18,7 d	1076,6	U	²³⁹ Np	2,35	228,2
Sr	⁸⁵ Sr	50,6 d	514,0				

Након завршене ирадијације, карактеристично гама зрачење је анализирано помоћу *Canberra HP Ge* детектора. За финалну обраду добијених гама спектра и њихову конверзију у концентрацију коришћени су софтвери који су развијени у Франковој лабораторији неутронске физике Обједињеног института за нуклеарна истраживања у Дубни (*FLNPR, JINR*).

INAA метода анализе има одређена ограничења за неке елементе када су аналитичке перформансе у питању. Када је одређивање бабра и кадмијума у питању, детекциони лимити су прилично високи због карактеристика насталих изотопа ових елемената. Поред њих, изотоп олова има јако кратко време полураспада које се мери милсекундама. Из тог разлога је немогуће детектовати олово овом аналитичком техником.

4.5.5. Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектрометријом, ICP-OES

Током израде овог рада, коришћен је *Ultima 2 ICP-OES* спектрометар (*Horiba Scientific, Француска*). Уређај је опремљен 40,68 MHz чврстим генератором, гориоником са алуминијум оксидним ињектором са 3 mm унутрашњим пречником. Спектрометар поседује стаклени распршивач са троканалном перистатичком пумпом. Оптички систем је термостабилан са фокалним сочивима и оптичком резолуцијом од <5 nm за 120-320 nm и <11 nm за 320-800 nm. За детекцију је коришћен двоструки фотомултипликатор.

Сви елементи су одређивани у радијалном моду посматрања плазме. Коришћене таласне дужине анализираних елемената су приказане у табели 4.7.

Табела 4.7 Коришћене таласне дужине одређиваних елемената

Елемент	Таласна дужина (nm)	Елемент	Таласна дужина (nm)
Na	588,995	Cu	327,396
Mg	285,213	Zn	206,191
Al	396,152	Sr	421,552
K	766,490	Ag	328,068
Ca	422,673	Cd	214,438
Cr	205,552	In	303,936
Mn	257,610	Tl	190,800
Fe	259,940	Bi	223,061
Co	228,616	Pb	216,999
Ni	341,476		

4.5.4. Масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом, ICP-MS

За анализу биљног материја коришћен је *Agilent 8800 ICP-QQQ* спектрометар (*Agilent Technologies, Токио, Јапан*). Овај уређај поседује троструки квадрупол (triple quadrupole) што представља масени спектрометар који се састоји из два трансмисиона квадрупол масена спектрометра везана редно са једним квадруполом између (ORS³ ћелија у случају коришћеног спектрометра). Уређај је опремљен чврстим 27.12 MHz генератором плазме, *ShieldTorch* системом и никал и платинским системом за фокусирање (коновима).

За обраду података, коришћени су специјализовани софтверски пакети *Agilent MassHunter* и *Mass Profiler*.

5. Поставке и специфични циљеви експеримената

5.1. Припремање оптималног пелета и утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу (Експеримент 1)

Припрема узорака за потребе XRF анализе у виду пресовања пелета има многе предности. Пресовање пелета је брзо и захтева минималан утрошак енергије и хемикалија (Byers *et al.*, 2019, Shaltout *et al.*, 2011). Као што је раније споменуто, корак припреме узорка је јако важан јер има велики утицај на коначан резултат анализе (Morgenstern *et al.*, 2005, Rousseau, 2001). Када је припрема узорака за емпиријску калибрацију у питању, неопходно је узорке за анализу припремати на исти начин као и калибрационе стандарде. Међутим, поставља се питање како припремити идеалан пелет за безстандардну анализу и како промене параметара припреме узорка утичу на резултате безстандардне анализе биљног материјала, с обзиром да не постоји универзална препорука за припрему узорка за овај тип анализе (Omote *et al.*, 1995). Посебно је важно обратити пажњу на пар параметара припреме узорка, и то:

- (1) Маса узорка;
- (2) Примењени притисак пелетирања;
- (3) Однос масе узорка и везивног средства.

Маса узорка директно утиче на дебљину пелета и на тај начин и на дубину продирања рендгенског зрачења. Када је матрикс сачињен од елемената малог атомског броја, као што је биљни материјал, дубина продирања је значајно већа. Када се у таквом матриксу одређују елементи великог атомског броја, обезбеђивање довољне дебљине пелета може бити карактеристика пелета о коме је важно водити рачуна (Abdullah *et al.*, 2014, Marguí *et al.*, 2009, Tezotto *et al.*, 2013, Towett *et al.*, 2016, Morgan *et al.*, 2015, Chuparina *et al.*, 2003, Padilla *et al.*, 2019). Међутим, безстандардна метода захтева уношење масе узорка у софтвер као обавезни податак како би се адекватно израчунала концентрације анализираних елемената. Циљ овог дела експеримента је био да се испита како промена масе узорка утиче на резултате добијене помоћу безстандардне методе.

Поред захтева да један сет узорака има приближно исту масу, важно је обратити пажњу на примењени притисак током пелетирања. Примењени притисак утиче на дебљину и густину пелета (Perring и Andrey, 2004, Marguí *et al.*, 2005). Из тог разлога је важно одредити најмању дебљину пелета која би дала поуздане резултате, чак и када је анализа елемената већег атомског броја у биљном матриксу у питању јер је у том случају критична дебљина пелета значајно већа. Да би се испитао утицај промене притиска на добијене резултате у овом експерименту, примењивани су различити притисци приликом припреме узорака.

Количина везивног средства је параметар који је такође значајно испитати. Повећање количине везивног средства ће разблажити узорак, а на тај начин и аналит који се одређује. Међутим, додаток везивног средства утиче и на физичке карактеристике пелета. Када се налазе у комори спектрометра, узорци су под утицајем јако високог вакуума и повећане температуре што готово сигурно може довести до физичких промена на површини пелета. Физичке промене на површини пелета могу значајно утицати на резултате, посебно када је анализа елемената са малим атомским бројем у питању (Marguí *et al.*, 2009). Уколико се током припреме пелета користи везивно средство, биће обезбеђено добијање значајно стабилнијих пелета са равном површином. Пошто повећање количине везивног средства утиче на физичке карактеристике пелета, важно је одредити да ли и колико додата количина везивног средства утиче на резултат *XRF* анализе.

5.2. Одређивање погодних аналитичких параметара за *WD-XRF* анализу биљног матрикса (Експеримент 2)

Позадина представља обавезну компоненту једног спектра и представља интензитет рендгенског зрачења која је измерено на дефинисаном углу 2θ (Chuparina *et al.*, 2015). Аналитичка линија такође представља интензитет зрачења на углу 2θ , али онај који одговара карактеристичној таласној дужини за анализирани елемент, док је позадина било који други положај који није аналитичка линија. Интензитет на позицији пика аналитичке линије обично одговара збиру интензитета који потиче од карактеристичног зрачења аналита и интензитета позадине. Позадина се састоји од примарног континуума и спектралног зрачења извора, карактеристичног зрачења узорка које је рефлектовано са кристала и емисионог зрачења кристала које настаје након интеракције са кристалом (Bertin, 1978). Из свега поменутог је јасно да контролисањем примарног зрачења и одабиром кристала можемо да утичемо на изглед позадине, а на тај начин и на квалитет аналитичког пика.

Матрикс анализираног узорка јако утиче на висину позадине. Познато је да матрикси сачињени од лаких елемената више подлежу процесу расејања због мањег приноса фотоелектричног ефекта током интеракције са примарним рендгенским зрачењем (Chuparina & Gunicheva, 2003). Биљни узорци су највећим процентом сачињени од елемената малог атомског броја. Из тог разлога је од посебне важности адекватан одабир аналитичких параметара при анализи биљног материјала.

Основни циљ овог експеримента је био да се квалитативно и квантитативно прикажу и одреде оптимални аналитички параметри који доводе до добијања најподобнијег аналитичког сигнала. Постављени циљ је био установити оптимални производ струје и напона, одабир колиматора, кристала и детектора који заједно дају аналитички сигнал који има највећи интензитет у односу на позадину и најмање подлеже интерелементарним интерференцама. Предмет овог експеримента је било 20 елемената у

биљном матриксу (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi) који су својим карактеристикама репрезентативни за цео периодни систем елемената.

5.3. Емпиријска калибрација помоћу целулозних стандарда и параметри валидације креираних метода (Експеримент 3)

Током емпиријске калибрације *XRF* спектрометра јако је важно да матрикс коришћених стандарда буде истоветан матриксу реалних узорака на којима ће се калибрација примењивати (Mäkinen *et al.*, 2006). Како биљни материјал најчешће садржи велики удео целулозе, јавља се могућност коришћења спајковане целулозе у виду стандарда за калибрацију (Marguí *et al.*, 2009, Krishna *et al.*, 2009, Evans, 1970, Mzyk *et al.*, 2015, Thompson, 2009, Rousseau *et al.*, 1996, Morgan *et al.*, 2015, Paltridge *et al.*, 2012). Испитане су могућности *WD-XRF* спектрометра за квантитативну анализу помоћу целулозних стандарда који садрже двадесет елемената (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi).

Испитана су три различита начина припреме узорака. Како се целулоза често користи и као везивно средство приликом припреме пелета (Clark *et al.*, 1992), могуће је само од ње направити јако стабилне пелете. Из тог разлога је прва група узорака била направљена само од спајковане целулозе и ови пелети су били коришћени за креирање методе анализе Целулоза (Ц).

Ипак, иако биљни материјал формира прилично стабилне пелете, под утицајем повишене температуре и вакуума унутар спектрометра може лако доћи до погоршавања физичких карактеристика пелета и његовог крућења. Управо зато се биљним узорцима ипак додаје одређена количина везивног средства. Поред тога, као што је раније поменуто, јако је важно да матрикс стандарда коришћених за калибрацију буде што сличнији матриксу анализираних узорака. Из тог разлога, једна група стандарда је била направљена од спајковане целулозе са додатком 20 % воска као везивног средства и ти стандарди су коришћени за креирање методе Целулоза са воском (ЦВ). Поред тога што су стабилнији, овако добијени пелети имају и равнију површину што је јако важно за добијање квалитетних резултата.

За припремање пелета је неопходно обезбедити пар грама узорка, најчешће и више када је биљни узорак у питању. Често се дешава да је расположива количина мања. Тада је потребно припремити пелет са ограниченом количином узорка, али тако да такав пелет и даље даје резултате одговарајућег квалитета. Из тог разлога је трећа група пелета направљена од мале количине узорка који је у танком слоју нанет на носач од борне киселине. Ови узорци су коришћени за креирање методе Танак слој (ТС).

Након калибрације, креираним методама су испитани параметри валидације, и то: осетљивост, линеарност, лимит детекције, лимит квантификације, прецизност (поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност) и тачност. Тачност метода није

само испитана за емпиријски креиране методе помоћу целулозних стандарда, већ и за безстандардну методу анализе UniQuant.

5.4. Анализа реалних биљних узорака и поређење са другим спектрометријским техникама (Експеримент 4)

Елементарни састав биљака се конвенционално одређује спектрометријским техникама као то су *ICP-OES* и *ICP-MS* (Stephens *et al.*, 2004, Queralt *et al.*, 2005, Kilbride *et al.*, 2006, Reidinger *et al.*, 2012). Оно што карактерише ове технике је захтев за узорком у течном стању. Како би се потпуно разорио чврсти матрикс, неопходна је најчешће мокра дигестија која захтева адекватну инструментацију, време и употребу корозивних, токсичних и неколошких хемијских агенаса (Polkowska-Motrenko *et al.*, 2000, Arruda *et al.*, 2003). Комплексна припрема узорка представља главну ману конвенционално коришћених техника.

Потреба за развијањем техника која су у складу са принципима зелене хемије расте у последње време. Из тог разлога технике за директну анализу чврстог узорка, односно недеструктивне технике, привлаче посебну пажњу (Gałaszka *et al.*, 2012, Armenta *et al.*, 2015, Płotka-Wasyłka *et al.*, 2012, Płotka-Wasyłka, 2018, Chojnacka and Mikulewicz, 2019). Једна од таквих техника је *INAA*, која је добро позната у области животне средине и коришћена је при анализи биљака (Frontasyeva, 2010, Taftazani *et al.*, 2017, Tousei *et al.*, 2016, Acharya and Pujari, 2019, Abou Mandour *et al.*, 2015, Vergel *et al.*, 2019).

XRF је још једна недеструктивна техника која има многобројне предности (Wu *et al.*, 2012, Andrey *et al.*, 2018, Radu *et al.*, 2009, Vanhoof *et al.*, 2004, Thaisa *et al.*, 2015, Chuparina and Gunicheva, 2003, Morgan *et al.*, 2015, Perring and Andrey, 2004). Како би се ова техника у свом пуном потенцијалу користила у анализи биљног материјала, неопходно је испитати њене перформансе, предности и мане у односу на конвенционално коришћене технике. Основни циљ овог експеримента је био да се процени да ли је *WD-XRF* техника погодна за елементарну анализу биљног материјала (иглица четинара) у поређењу са две конвенционално коришћене технике (*ICP-OES* и *ICP-MS*) и једном ограничено распрострањеном недеструктивном техником (*INAA*). Поред класичне методе добијене емпиријском калибрацијом *WD-XRF* уређаја, испитана је безстандардна метода анализе која има велики аналитички потенцијал (брза скрининг метода која не захтева употребу стандарда).

6. Резултати и дискусија

6.1. Утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу (УК)

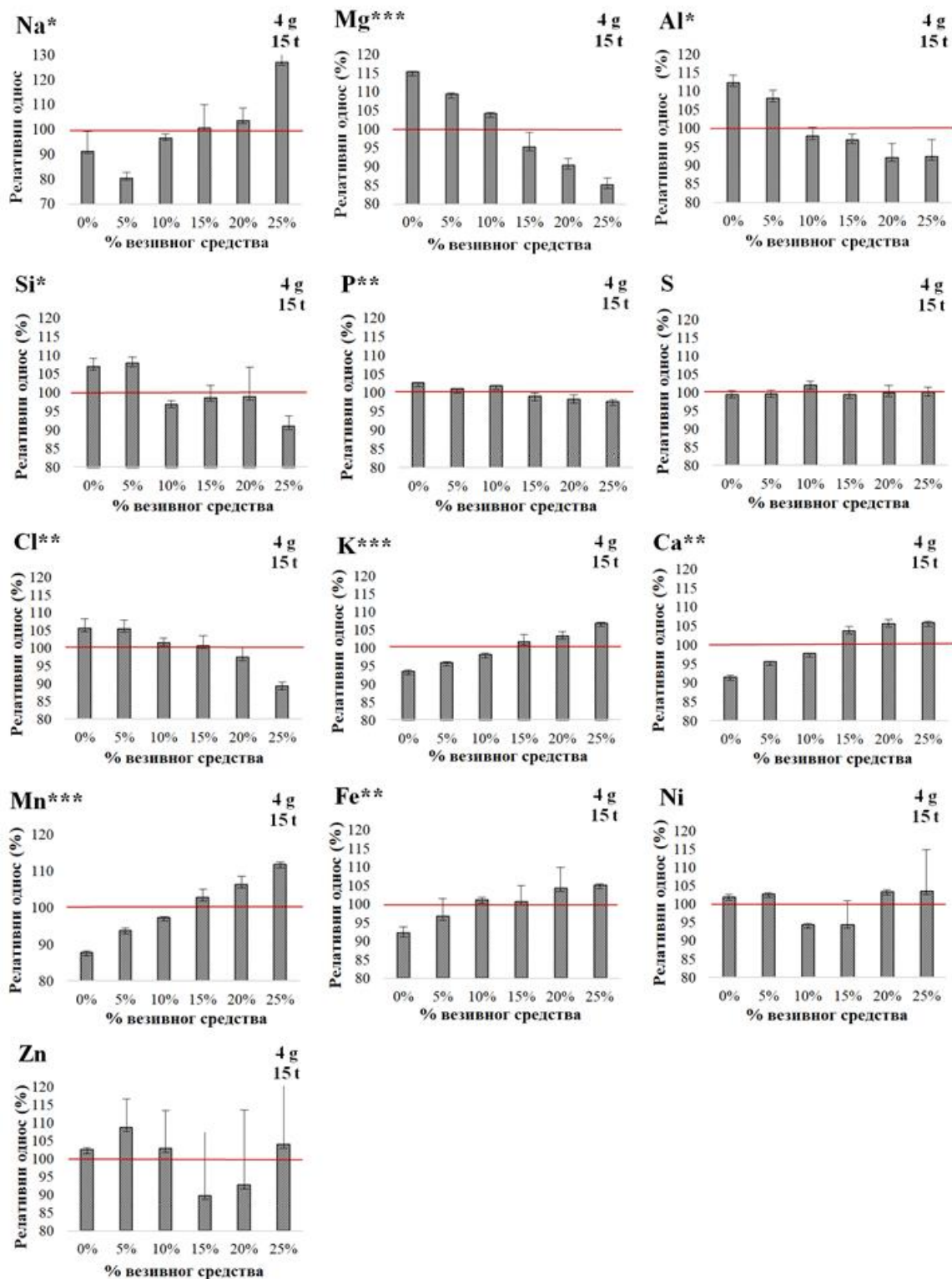
На сликама од 6.1. до 6.5. приказани су релативни односи концентрације елемената у иглицама четинара у односу на промене различитих параметара припреме узорака. Релативни односи су добијени као количник концентрације елемента (C_i) и средње вредности свих концентрација датог елемента у сету (C_{avg}) (једначина 6.1).

$$\text{Релативни однос \%} = C_i / C_{avg} \qquad \text{једначина 6.1.}$$

Посматрањем добијених резултата могуће је уочити одређене трендове. Очекивано је да резултати који се добијају употребом безстандардне методе, и зависе пре свега од унетих података о узорку и примењених алгоритама, не показују никакав тренд у промени концентрација анализираних елемената уколико се промене параметри припреме узорака. Међутим, примећено је да, уколико се секвенцијално мењају неки од параметара припреме узорка, долази до промене у измереној концентрацији. Овакви резултати могу указивати на могућност увођења системске грешке која се јавља услед промене параметара припреме узорка. Оваква могућност отвара низ важних питања. Да ли промене неких параметара припреме узорка доприносе укупној системској грешки одређивања више од осталих? Да ли је утицај промене параметара припреме узорка исти за све анализираних елементе? Колико ће промена сваког од параметара припреме узорка утицати на резултат анализе? Да ли ће знак системске грешке увек бити исти (позитиван или негативан) и како се то може објаснити?

6.1.1 Утицај варијације садржаја везивног средства

На сликама 6.1. и 6.2. могуће је уочити постојање трендова у променама релативних концентрација анализираних елемената који су приписани повећању садржаја воска. Уочени трендови нису једнаког знака за све елементе. Позитиван тренд, односно повећање релативних концентрација са повећањем садржаја воска је примећен код Mg, Al, Si, и Cl. Обрнути, негативан тренд смањења релативне концентрације са повећањем садржаја воска, примећен је код K, Ca, Mn, Fe. Комбинација супротних трендова, прво повећање и затим смањење релативне концентрације са повећањем садржаја воска је примећена код S и P. Исти трендови су уочени код оба типа анализираних четинара.

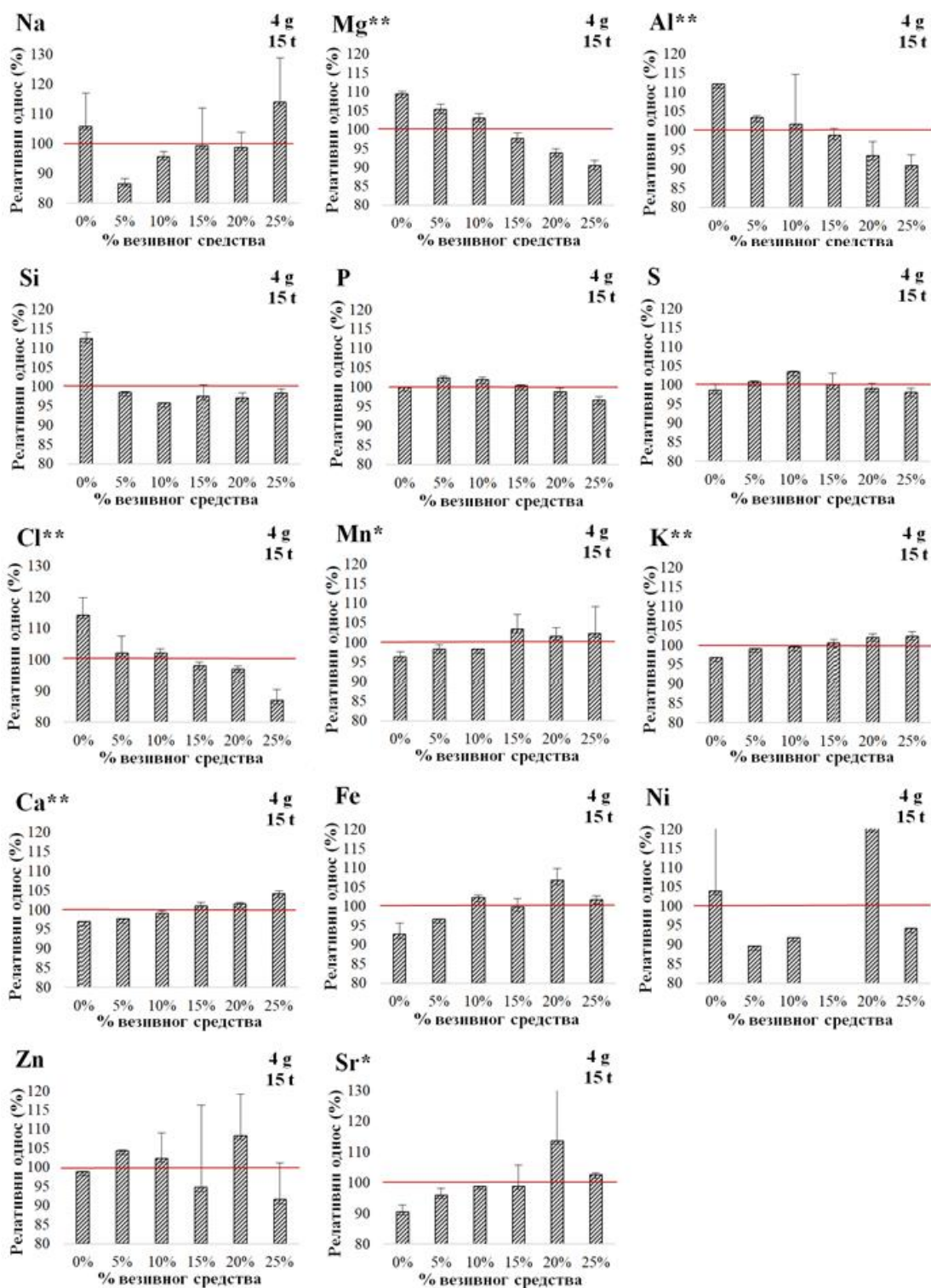


Слика 6.1. Релативне концентрације елемената (%) у пелетима иглица бора са различитим садржајем везивног средства (пелети од 4 g и примењен притисак од 15 тона). Обележена грешка представља \pm релативну стандардну девијацију (%) поновљених мерења.

* Корелација је статистички значајна на 0,05 нивоу.

** Корелација је статистички значајна на 0,01 нивоу.

*** Корелација је статистички значајна на 0,001 нивоу.



Слика 6.2. Релативне концентрације елемената (%) у pelletима иглица јеле са различитим садржајем везивног средства (pelети од 4 g и примењен притисак од 15 тона). Обележена грешка представља \pm релативну стандардну девијацију (%) поновљених мерења.

* Корелација је статистички значајна на 0,05 нивоу.

** Корелација је статистички значајна на 0,01 нивоу.

За већину елемената је корелација између релативних концентрација и промене садржаја воска била је статистички значајна. Када су иглице бора у питању, статистички значајна корелација ($P < 0,001$) је уочена за Mg, K и Mn. Код P, Cl, Ca и Fe пронађена је статистички значајна корелација са нивоом $P < 0,01$, док је код Na, Al, Si и Sr статистички значајна корелација била на нивоу $P < 0,05$. Када су у питању S, Ni и Zn није пронађена статистички значајна корелација између релативне концентрације и промене садржаја воска.

Када су у питању иглице јеле и промена садржаја воска, статистички значајна корелација на нивоу $P < 0,001$ је уочена код Mg и Al, на нивоу поузданости $P < 0,01$ код Cl, K и Ca, док је статистички значајна корелација на нивоу поузданости $P < 0,05$ пронађена код Mn и S. Код Na, Si, P, S, Fe, Ni и Zn није установљена статистички значајна корелација.

На основу оваквих резултата могуће је закључити да повећање садржаја воска узрокује промене у измереним концентрацијама анализираних елемената и да се поменуте промене дешавају по дефинисаном обрасцу.

Пелет који, поред праха узорка, садржи и везивно средство је компактнији и анализирана површина је равнија. Јасно је да додаток везивног средства поред стабилности, унапређује и физичке карактеристике пелета. Равна анализирана површина је јако важна карактеристика пелета јер узрокује смањење утицаја *ефекта сенке*, који негативно утиче на измерене концентрације.

Ефекат сенке је илустрован у теоријском делу, на слици 2.21.(поглавље 2.5.3.6.). Познато је да упадно, примарно зрачење из цеви формира угао од 90° у односу на површину узорка. Узорци који имају неравну површину имају мању ефективну анализирану површину у односу на потпуно равну анализирану површину. Мања ефективна анализирана површина код неравних узорака узрокује смањени интензитет измереног зрачења у односу на очекивани интензитет. Ефекат сенке не утиче подједнако на све елементе периодног система елемената. Пошто је дубина продирања зрачења при анализи лакших елемената мања, део ближи површини узорка заузима далеко већи удео у анализираној запремини. Из тог разлога су интензитети аналитичких линија лакших елемената подложнији утицају ефекта. Познавајући претходне чињенице, очекивано је да је, због повећаног интензитета зрачења, повећана концентрација неких елемената (са мањим атомским бројем) узрокована повећаном количином додатог воска. Визуелно је могуће приметити да су пелети са већим садржајем воска компактнији, са приметно равнијом површином што је погодније за рендгенску анализу.

Код елемената као што су Al, Mg и Cl, уочен је супротан тренд, смањење концентрације са повећањем садржаја везивног средства. Овај феномен је могуће објаснити различитом величином честица воска и биљног узорка. Восак има изузетно мале честице ($< 50 \mu\text{m}$) са јако униформном дистрибуцијом величине честица.

Јако је тешко добити биљни узорак са апсолутно униформном дистрибуцијом величине честица након лабораторијског уситњавања, па је дистрибуција величине честице најчешће неуниформна. Велики удео честица узорка је већа од јако финог праха воска. Приликом припреме пелета, прах узорка се меша са воском и након уношења смеше у носач узорка пресе мешавина најситнијих фракција узорка и воска пада на само дно носача узорка пресе. Под утицајем високог притиска пресовања честице узорка бивају реорганизоване у гушћу структуру унутар пелета. Пошто честице воска имају тенденцију да попуне празан простор између честица биљног узорка и зидова носача узорка пресе, дно пелета бива обогаћено воском у поређењу са остатком пелета.

Одређивање лаких елемената, као што су Mg и Al, може бити значајно погођено утицајем овог феномена, управо из раније поменутих разлога. Дубина продирања зрачења унутар узорка који има претежно органски матрикс је јако мала за лаке елементе и износи свега 17 μm за Mg и 45 μm за Al (Schramm, 2012). Из тог разлога ће чак и јако танак слој воска на површини пелета значајно утицати на одређивање лаких елемената, јер површински део узорка заузима далеко већи удео у анализираној запремини лаких елемената. Како се повећава атомски број одређиваних елемената, повећава се и дубина продирања зрачења унутар узорка и у одређеном моменту читава запремина пелета бива анализирана. На пример, дубина продирања зрачења већ за K износи 494 μm , а за Ca износи 684 μm (Schramm, 2012). Како је током овог експеримента секвенцијално повећаван садржај воска, површински део пелета бивао је обогаћенији и благо разблажен воском. Уопштено посматрано, цео пелет је хомогеног састава. Међутим, локалне неправилности у дистрибуцији воска и разблажење анализираних површине пелета воском могу бити објашњење за постепено смањивање концентрације елемената (Al, Mg и Cl) узроковано повећањем садржаја воска.

Везивна средства су обично неки органски материјали или су сачињена од елемената малог атомског броја. Материјали малог атомског броја при интеракцији са рендгенским зрачењем емитују секундарно зрачење које је већим уделом расејано зрачење. Додатак воска може, услед појаве расејаног зрачења, проузроковати повећање позадинског шума. Овај ефекат може имати доминантни утицај уколико се одређују елементи малог атомског броја у ниским концентрацијама (Beckhoff *et al.*, 2006).

Биљни материјал садржи велики проценат целулозе, а целулоза је органски материјал сачињен од елемената малог атомског броја, па се може рећи да је биљни материјал лак матрикс сам по себи. Из тог разлога би ефекат матрикса који је узрокован додатком воска требао бити мање присутан и са мањим утицајем у односу на ефекат сенке и локалну неуниформност дистрибуције честица воска и узорка (Evans, 1970).

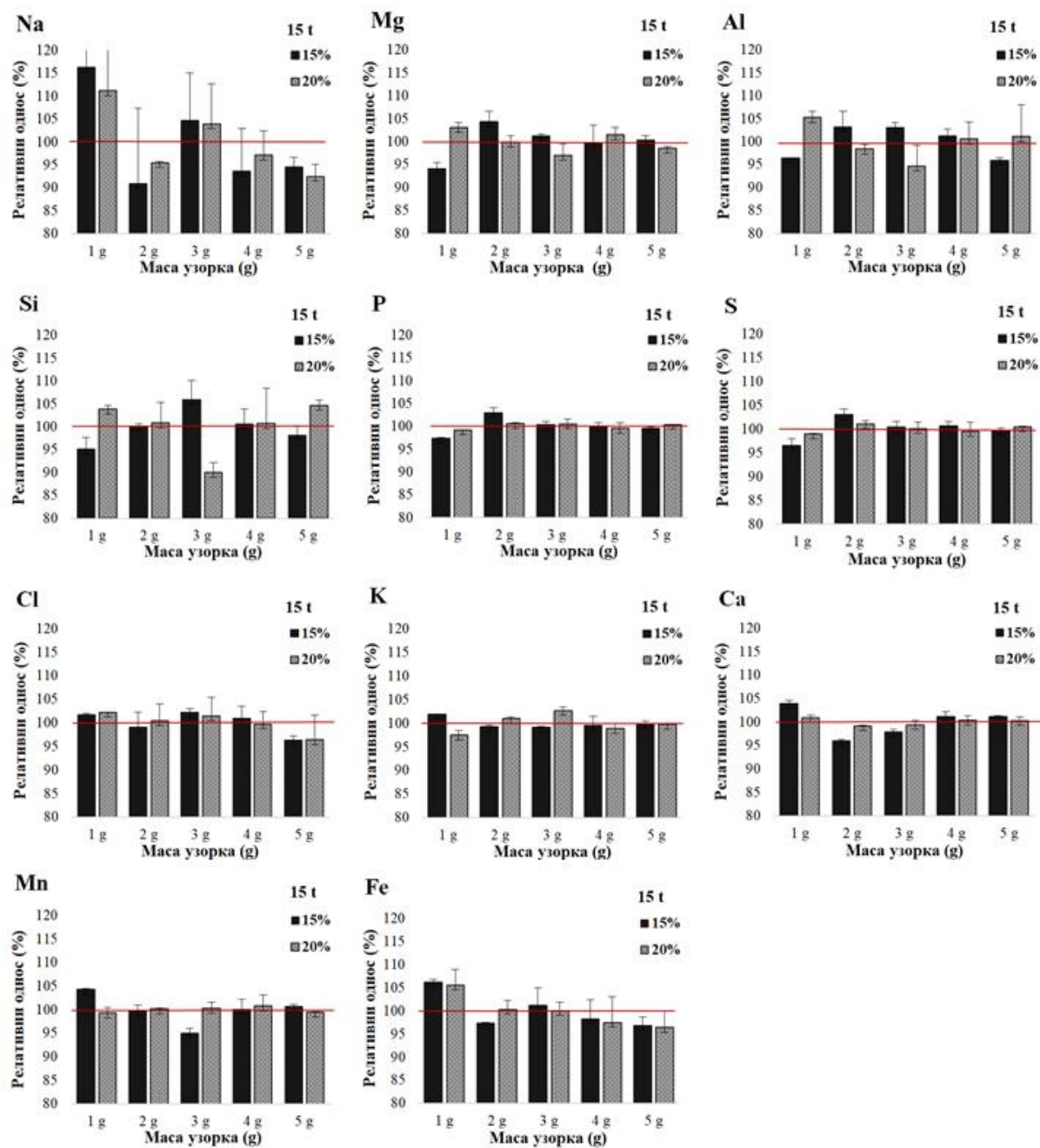
Комбинација супротних трендова, прво повећање и затим смањење релативних концентрација, је примећено код S и P. Овакви резултати су узроковани комбинацијом претходно описаних феномена. Оба феномена, ефекат сенке и локална неуниформност

дистрибуције честица воска и узорка, су присутна, осим што ефекат сенке постаје мање доминантан када концентрација воска постане већа.

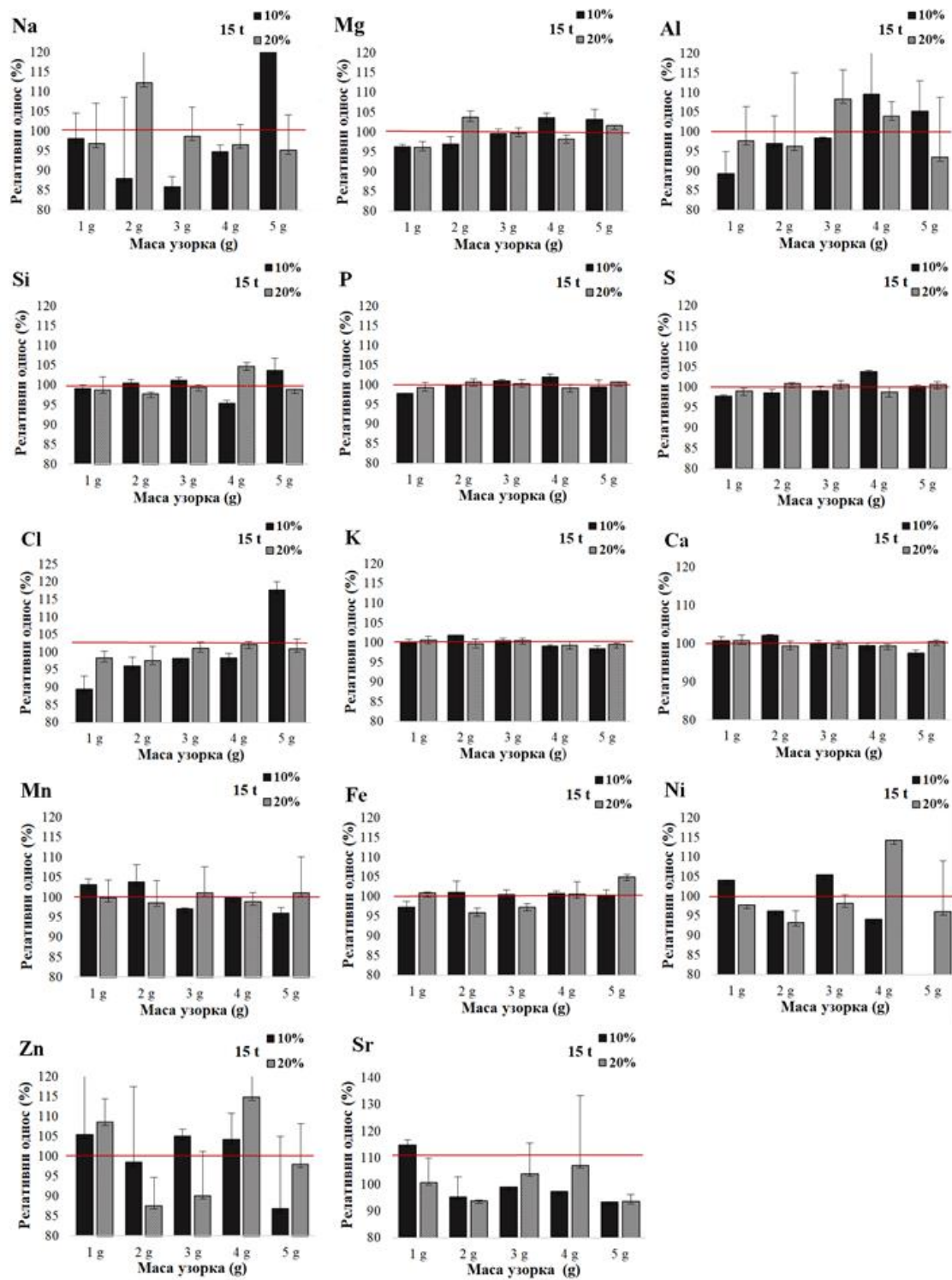
За елементе као што су Ni, Zn и Sr је важно нагласити да су њихове концентрације у анализираним биљним узорцима сувише ниске да би се безстандардна метода применила са задовољавајућом тачношћу. У табели 6.18., поглавље 6.3.3. ове дисертације су приказани лимити детекције и квантификације ових елемената у биљном узорку применом WD-XRF спектрометријске анализе која је заснована на емпиријској калибрацији употребом стандарда од спајковане целулозе (Orlić *et al.*, 2021).

6.1.2. Утицај варијације масе узорка

Промене релативне концентрације анализираних елемената са променом масе биљног узорка коришћеног током припреме узорка приказане су на сликама 6.3. и 6.4. Испитан је утицај промене масе узорка у два сета, сетови са 15 и 20 % воска у случају иглица бора и сетови са 10 и 20 % воска у случају иглица јеле. Иако на први поглед може деловати као да постоји тренд, није добијена статистички значајна корелација између масе пелета и измерене концентрације, осим у случају Fe и Zn код иглица бора и код Al и Mg у случају иглица јеле. Добијене статистички значајне корелације могу бити последица случајности.



Слика 6.3. Релативне концентрације елемената (%) у различитим масама пелета иглица бора (пелети са 15 и 20 % воска и примењеним притиском од 15 тона). Обележена грешка представља \pm релативну стандардну девијацију (%) поновљених мерења.



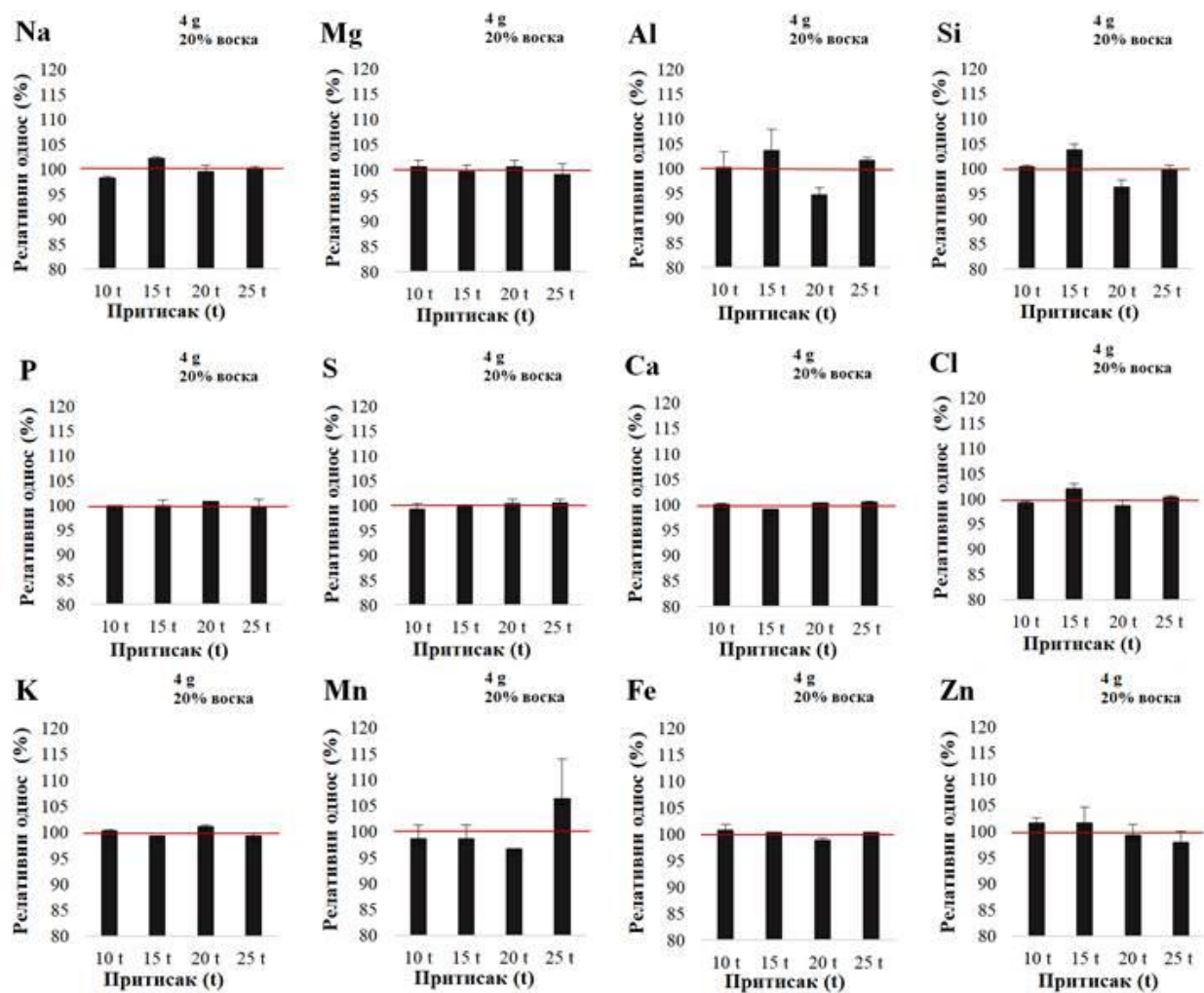
Слика 6.4. Релативне концентрације елемената (%) у различитим масама пелета иглица јеле (пелети са 10 и 20 % воска и примењеним притиском од 15 тона). Обележена грешка представља \pm релативну стандардну девијацију (%) поновљених мерења.

Биљни материјал се претежно састоји из елемената малог атомског броја. Приближно 98 % биљног материјала је сачињено од угљеника, кисеоника, азота и водоника. Такав материјал је прилично транспарентан за рендгенско зрачење. Примарно рендгенско зрачење из извора може интераговати са читавом запремином материјала узорка и генерисати секундарно флуоресцентно рендгенско зрачење које и из најдубљих слојева узорка може доспети до површине и бити детектовано (Chuparina and Gunicheva, 2003, Marguí *et al.*, 2009). Међутим, чак и у тако лакој матриксу, приликом одређивања елемената нижег атомског броја, дубина продирања карактеристичног секундарног рендгенског зрачења је мала. На пример, дубина продирања карактеристичне $K\alpha$ линије Na у биљном матриксу обично износи свега пар μm и минимална критична дебљина узорка је засигурно обезбеђена (Schramm, 2012). Међутим, неопходно је обратити пажњу уколико се одређују елементи већег атомског броја. У том случају је дубина продирања карактеристичног рендгенског зрачења тежих елемената у биљним матриксама вишеструко већа и често превазилази дебљину пелета. У том случају је постојећа дебљина биљног пелета сувише мала.

Пошто маса узорка директно утиче на дебљину пелета, постоји бојазан да ће значајно смањење масе узорка може довести до добијања пелета чија је дебљина мања од критичне дебљине пелета за одређивање одређеног елемента. Резултати овог истраживања су показали да маса узорка не утиче значајно на концентрацију елемената одређиваних помоћу безстандардне методе, чак и уколико је дебљина пелета мања од критичне дебљине за одређену карактеристичну линију. Употребљена безстандардна метода употребом својих алгоритама и уз податак о густини (маси) узорка, на адекватан начин превазилази проблем варијације масе узорка.

6.1.3. Утицај варијације примењеног притиска пелетирања

Промене релативних концентрација елемената у односу на промену примењеног притиска приликом пелетирања приказане су на слици 6.5. Очекивано је да се применом већег притиска пелетирања добијају компактнији пелети са већом густином. Такође је очекивано да такви пелети дају прецизније и тачније резултате мерења.



Слика 6.5. Релативне концентрације елемената (%) у пелетима припремљеним применом различитих притисака при пелетирању (пелети масе 4 g и са 20 % воска). Обележена грешка представља \pm релативну стандардну девијацију (%) поновљених мерења.

Резултати овог истраживања су показали да промена примењеног притиска пелетирања биљног материјала не утиче значајно на добијене концентрације помоћу безстандардне методе. Није пронађена статистички значајна корелација између измерене концентрације елемената и примењеног притиска пелетирања.

На основу добијених података може се закључити да је могуће смањити притисак и време примене притиска током пелетирања у оквиру процеса припреме узорка без изазивања значајних последица по измерене концентрације.

У безстандардни софтверски пакет UniQuant је неопходно унети податке о маси узорка (у mm), димензије пелета (пречник и висина пелета у mg) и густину (однос масе и запремине) узорка, које софтвер даље користи као важан параметар приликом израчунавања концентрације. На основу унетих података и измерених интензитета карактеристичног рендгенског зрачења софтверски пакет примењује алгоритме и рачуна коначне концентрације присутних елемената.

6.1.4. Упоредивање системске и случајне грешке

Након процене присуства системске грешке која произилази из варијације сваког од испитаних параметара припреме узорка, важно је проценити колика је случајна грешка одређивања. Одређивањем случајне грешке, могућа је адекватна и потпуна процена стварног доприноса системске грешке укупној грешки безстандардне рендгенске анализе биљног материјала.

На основу релативног односа, који је добијен као количник разлике максимума и минимума измерених концентрација и средње вредности испитиваног сета (C_{avg}), процењен је утицај промена испитиваних параметара припреме узорка на развијање системске грешке (једначина 6.2.).

Системска грешка = максимум – минимум/ C_{avg} једначина 6.2.

Случајна грешка је одређена рачунањем две релативне стандардне девијације мерења три пелета припремљених на исти начин и под истим условима. Ови пелети направљени у трипликату, су припремљени у два сета од 4 g узорка са додатком 15 % воска за један и 20 % воска за други сет када су у питању иглице бора и додатком 10 % воска за један и 15 % воска за други сет узорака иглица јеле.

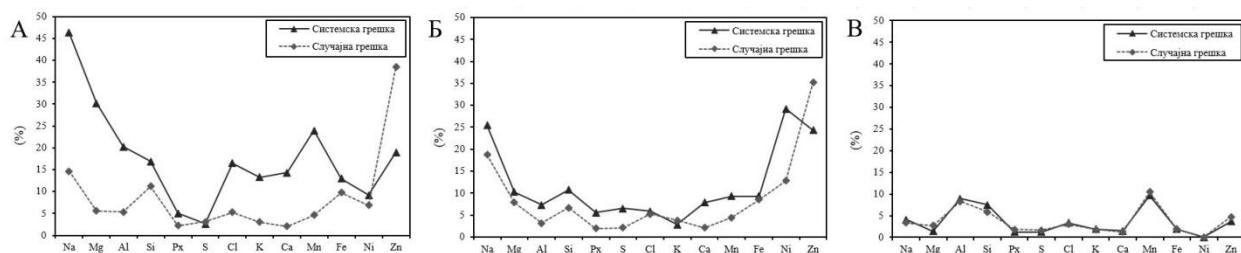
Слика 6.6. приказује поређење случајних и доприноса промене параметара припреме узорка системској грешки (А део слике - промена садржаја везивног средства, Б део слике - промена масе узорка, В део слике - промена примењеног притиска пелетирања). Добијени резултати су показали да је системска грешка увек већа од случајне грешке. Ипак, разлика између случајне и системске грешке није иста код свих узрочника системске грешке. Варијација количине везивног средства је највише утицала на повећање системске грешке (А део слике 6.6.). Варијација масе узорка је у мањој мери узроковала повећање системске грешке (Б део слике 6.6.), док је утицај промене примењеног притиска пелетирања на системску грешку готово не приметан (В део слике 6.6.). Слични резултати су добијени за оба типа биљног узорка (иглице бора и јеле).

На слици 6.7. приказано је поређење системских грешака насталих услед варијације различитих параметара припреме узорка. Од свих испитаних параметара, промена садржаја везивног средства највише утиче на системску грешку, иако на први поглед

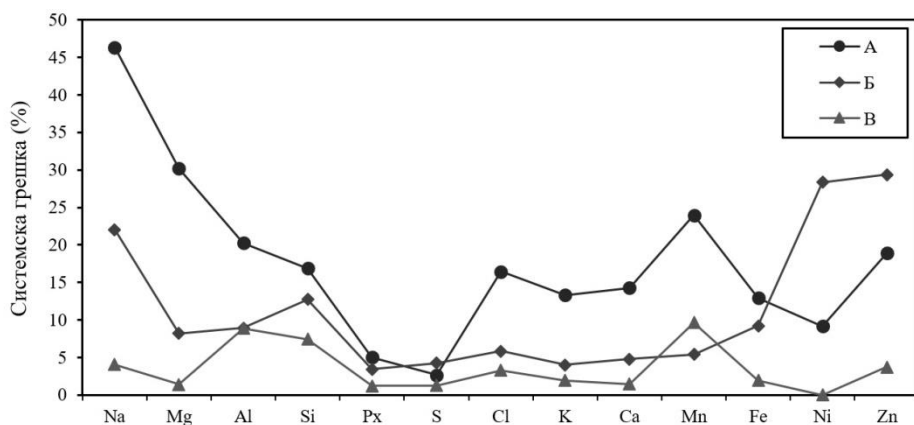
делује као да је промена садржаја воска од 0 до 25 % мање драстична у односу на промену масе узорка од 1 до 5 g или промену примењеног притиска пелетирања од 5 до 25 тона.

Могуће је уочити да нису сви елементи подједнако погођени варијацијама промене параметара припреме узорка. Промена садржаја воска је унела системску грешку до 46 % за узорак иглица бора и до 30 % за узорак иглица јеле. Просечно је промена садржаја воска увела системску грешку од 18 % за иглице бора и 13 % за иглице јеле. Промена масе узорка је унела значајно мању системску грешку, у просеку 11 % за иглице бора и 10 % за иглице јеле, док је промена примењеног притиска пелетирања утицала на системску грешку за 3,9 % код оба типа четинара.

На основу претходно приказаних резултата се може закључити да било која од испитаних варијације параметара припреме узорка уводи системску грешку у одређеној мери. Иако промене неких параметара (промена садржаја воска) уводе појаву веће системске грешке, јако је важно водити рачуна да се у оквиру једног анализираног сета сви узорци припремају на исти начин, зато што је у оквиру неког аналитичког поступка и најмања системска грешка непожељна.



Слика 6.6. Поређење системских и случајних грешака насталих услед варијација различитих параметара припреме узорка иглица бора. (А - варијација садржаја везивног средства, Б – варијација масе узорка са 15 % воска, В – варијација примењеног притиска пелетирања).



Слика 6.7. Поређење системских грешака добијених променом различитих параметара припреме узорка иглица бора (А - варијација садржаја везивног средства, Б – варијација масе узорка, В – варијација примењеног притиска пелетирања).

6.2. Одређивање погодних аналитичких параметара за *WD-XRF* анализу биљног матрикса

На сликама од 6.8. до 6.16.2. приказани су преклопљени квалитативни спектри добијени при различитој комбинацији аналитичких параметара, за све испитане елементе. На основу приказаних квалитативних спектра, очитани су интензитети на две позиције, на позицији врха карактеристичног сигнала и на позицији позадине. Сагледавање само интензитета на позицији сигнала не може да пружи адекватну информацију о квалитету сигнала, поготову у случају биљног матрикса за који је карактеристичан високи позадински шум. Из тог разлога се за процену квалитета добијеног сигнала користила разлика интензитета на позицији врха сигнала и интензитета позадине, односно интензитет само пика. У табелама од 6.1. до 6.16. приказани су очитани интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика добијени употребом различитих комбинација аналитичких параметара. Осим квантитативне процене (помоћу интензитета пика), коришћена је и визуелна процена спектра (облик пика, преклапање са линијама других елемената, изглед и облик позадине) при одабиру оптималних аналитичких параметара који обезбеђују добијање адекватног аналитичког сигнала за потребе емпиријске калибрације.

6.2.1. Натријум

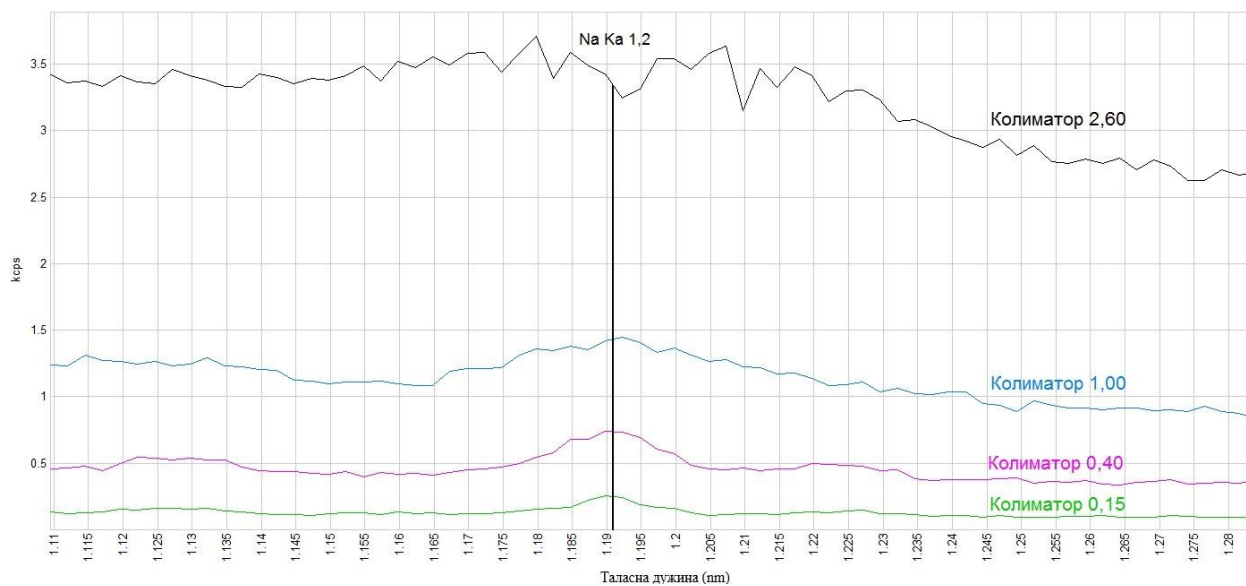
У табели 6.1. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика Na у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.8. приказани су преклопљени квалитативни спектри Na добијени коришћењем AX03 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV, док је варирана ширина колиматора. На слици 6.9. приказан су преклопљени спектри са истим параметрима, осим коришћеног кристала, који је у овом случају био AX09.

Табела 6.1. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Na. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

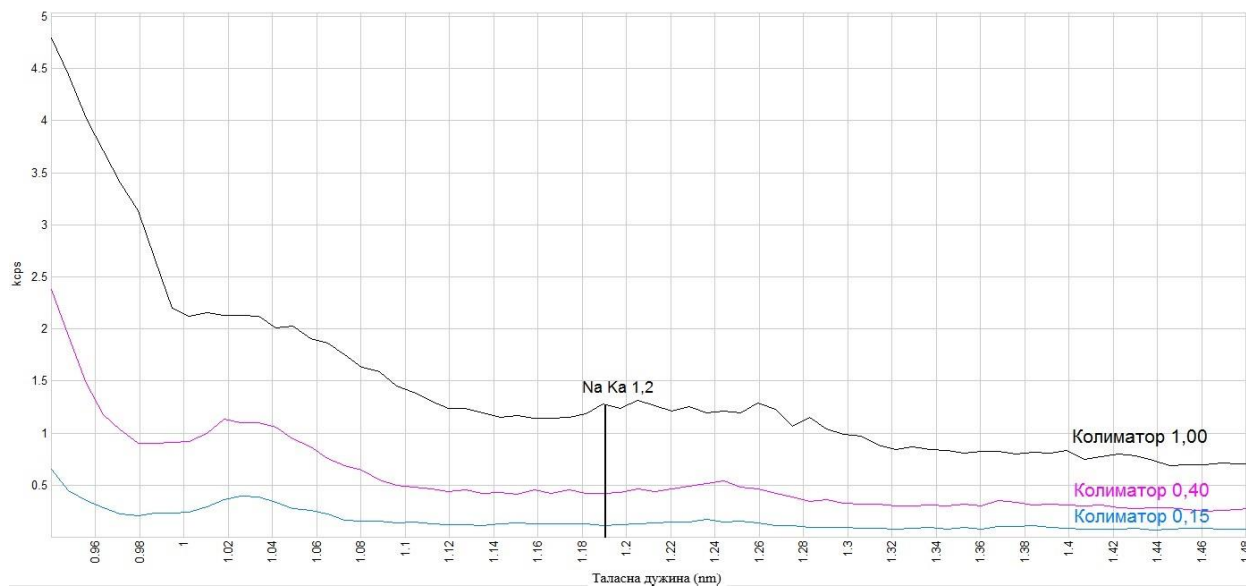
Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
AX03	2,60	FPC	80	30	1,041	3,08	3,35	0,27
	1,00	FPC	80	30	1,041	1,01	1,45	0,44
	0,40	FPC	80	30	1,041	0,39	0,75	0,35
	0,15	FPC	80	30	1,041	0,11	0,27	0,16
AX09	1,00	FPC	80	30	1,041	1,02	1,28	0,26
	0,40	FPC	80	30	1,041	0,40	0,45	0,05
	0,15	FPC	80	30	1,041	0,10	0,15	0,04

Na је могуће одредити употребом AX03 и AX09 кристала. У оба случаја је интензитет пика јако мали, док је позадина вишеструко интензивнија. Повећавањем ширине колиматора, већи је интензитет добијених линија, али постаје све шири и слабије дефинисан. Коришћењем AX03 кристала добија се адекватније дефинисан пик, па би коришћење овог кристала био примаран избор. Када је у питању одабир колиматора, употреба ширине колиматора 1,00 је оптимална због најбољег односа резолуције и интензитета.

С обзиром да је за добијање спектра коришћен целулозни стандард концентрације $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, добијени пикови су малог интензитета и лошег квалитета, може се закључити да је *WD-XRF* техника недовољно осетљива за одређивање Na, па се може очекивати да добијени резултати буду смањене прецизности и тачности.



Слика 6.8. Преклопљени квалитативни спектри Na добијени употребом AX03 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 2,60 (црно), 1,00 (плаво), 0,40 (розе) и 0,15 (зелено).



Слика 6.9. Преклопљени квалитативни спектри Na добијени употребом AX09 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).

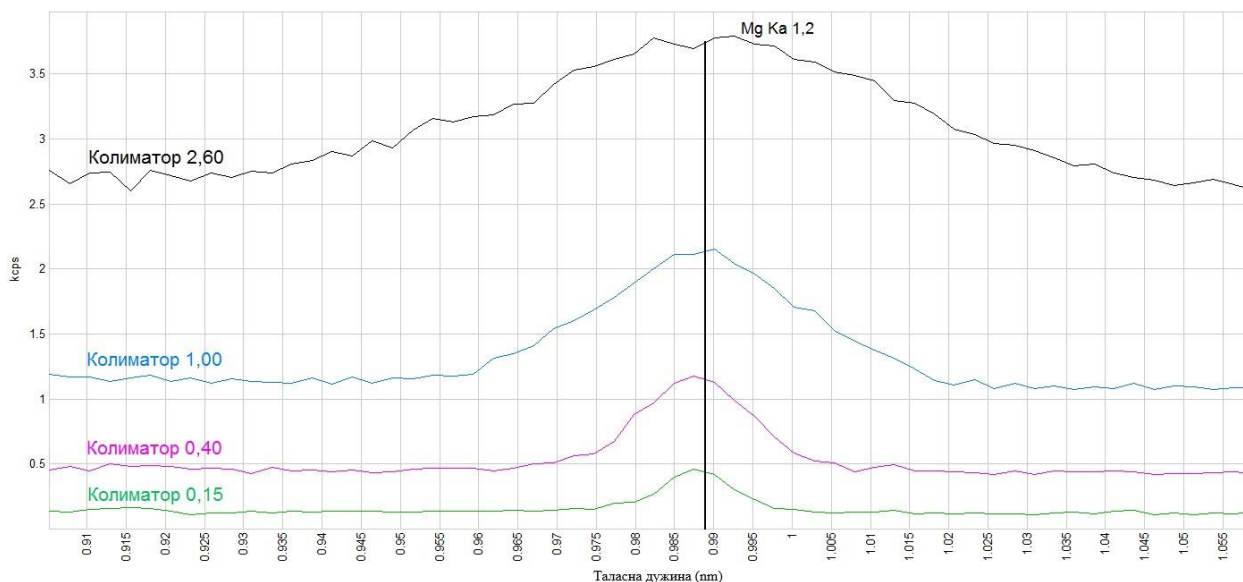
6.2.2. Магнезијум

У табели 6.2. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика Mg у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.10. приказани су преклопљени квалитативни спектри Mg добијени коришћењем AX03 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV, док је варирана ширина четири колиматора.

Табела 6.2. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Mg. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиimator	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
AX03	2,60	FPC	80	30	1,254	2,59	3,79	1,20
	1,00	FPC	80	30	1,254	1,05	2,16	1,11
	0,40	FPC	80	30	1,254	0,44	1,20	0,75
	0,15	FPC	80	30	1,254	0,13	0,47	0,34

При одабиру оптималних аналитичких параметара за одређивање Mg не постоји пуно избора, могуће га је одређивати једино помоћу AX03 кристала. Интензитет добијених пикова је већи, док је њихов изглед значајно бољи у односу на натријум. Одабиром колиimatorа ширине 1,00 добија се сигнал који је довољно интензиван, позадина која је довољно ниска и пик који је дефинисан.



Слика 6.10. Преклопљени квалитативни спектри Mg добијени употребом AX03 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV и различитих колиimatorа: 2,60 (црно), 1,00 (плаво), 0,40 (розе) и 0,15 (зелено).

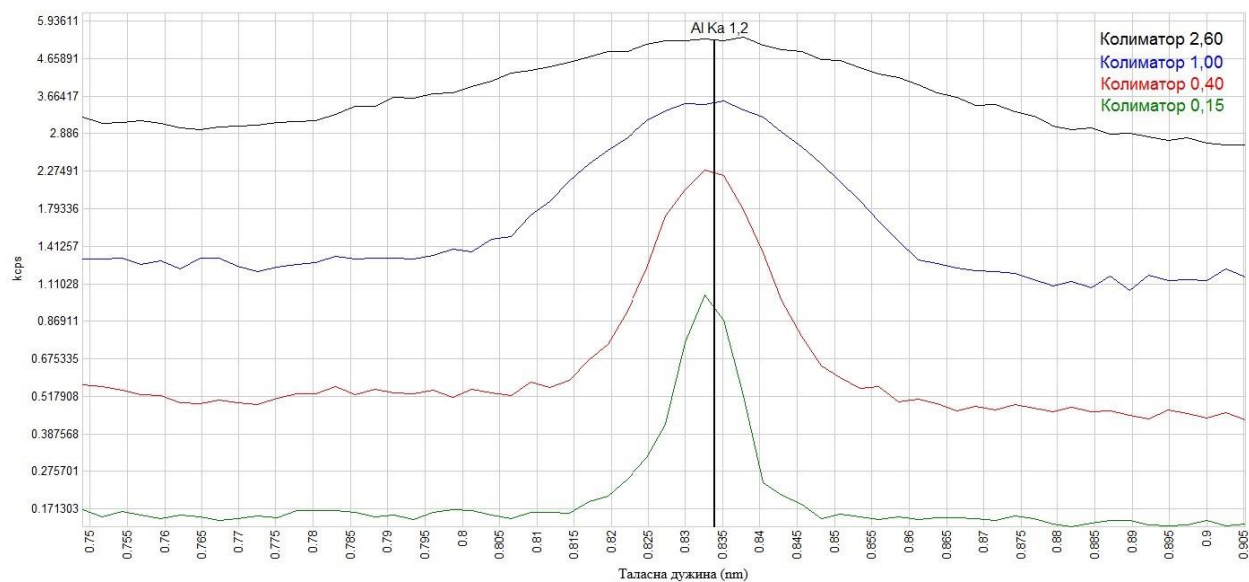
6.2.3. Алуминијум

У табели 6.3. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика Al у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.11. приказани су преклопљени квалитативни спектри Al добијени коришћењем AX03 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV, док је варирана ширина колиматора. На слици 6.12. приказан су преклопљени спектри са истим параметрима као код слике 6.11., осим коришћеног кристала, који је у овом случају био PET.

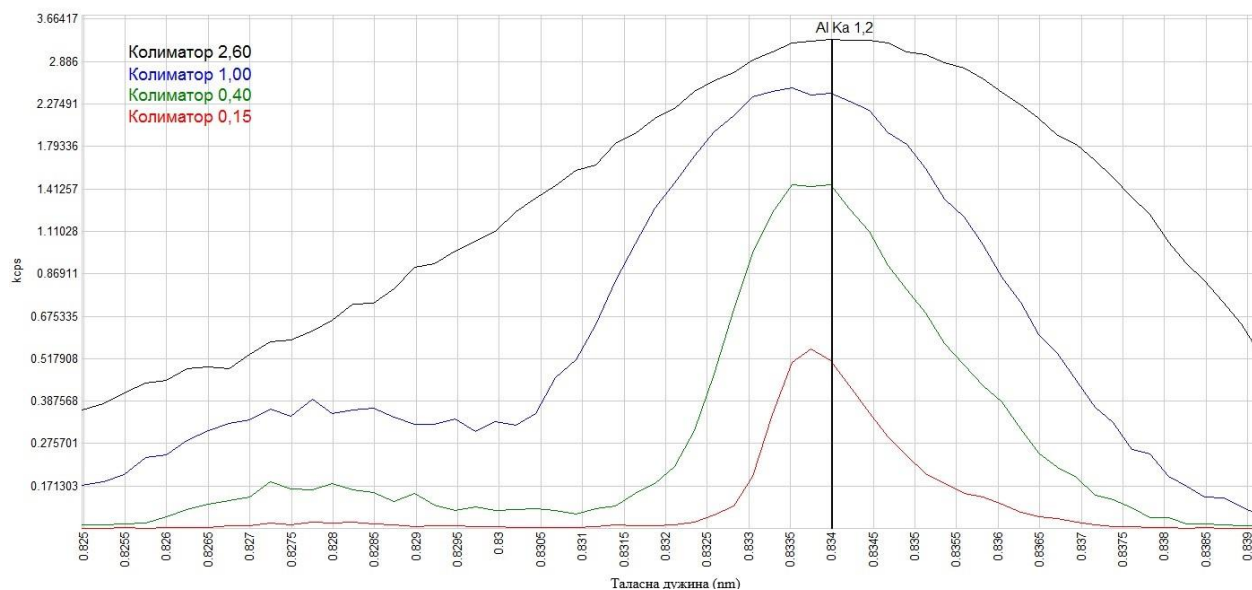
Табела 6.3. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Al. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
AX03	2,60	FPC	80	30	1,487	2,93	5,28	2,35
	1,00	FPC	80	30	1,487	1,30	3,53	2,22
	0,40	FPC	80	30	1,487	0,51	2,31	1,80
	0,15	FPC	80	30	1,487	0,16	1,02	0,86
PET	2,60	FPC	80	30	1,487	0,49	3,26	2,77
	1,00	FPC	80	30	1,487	0,27	2,49	2,22
	0,40	FPC	80	30	1,487	0,09	1,47	1,37
	0,15	FPC	80	30	1,487	0,04	0,54	0,50

Уколико се упореде спектри Al добијени AX03 и PET кристалима могуће је уочити да су интензитети пикова слични, са мало интензивнијим пиковима код PET кристала. Позадина је значајно интензивнија код употребе AX03 кристала. Из тог разлога се препоручује употреба PET кристала при одређивању Al. Како се Al у биљном материјалу не налази у ниским концентрацијама, препоручује се коришћење колиматора ширине 0,40.



Слика 6.11. Преклопљени квалитативни спектри Al добијени употребом AX03 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 2,60 (црно), 1,00 (плаво), 0,40 (црвено) и 0,15 (зелено).



Слика 6.12. Преклопљени квалитативни спектри Al добијени употребом PET кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 2,60 (црно), 1,00 (плаво), 0,40 (зелено) и 0,15 (црвено).

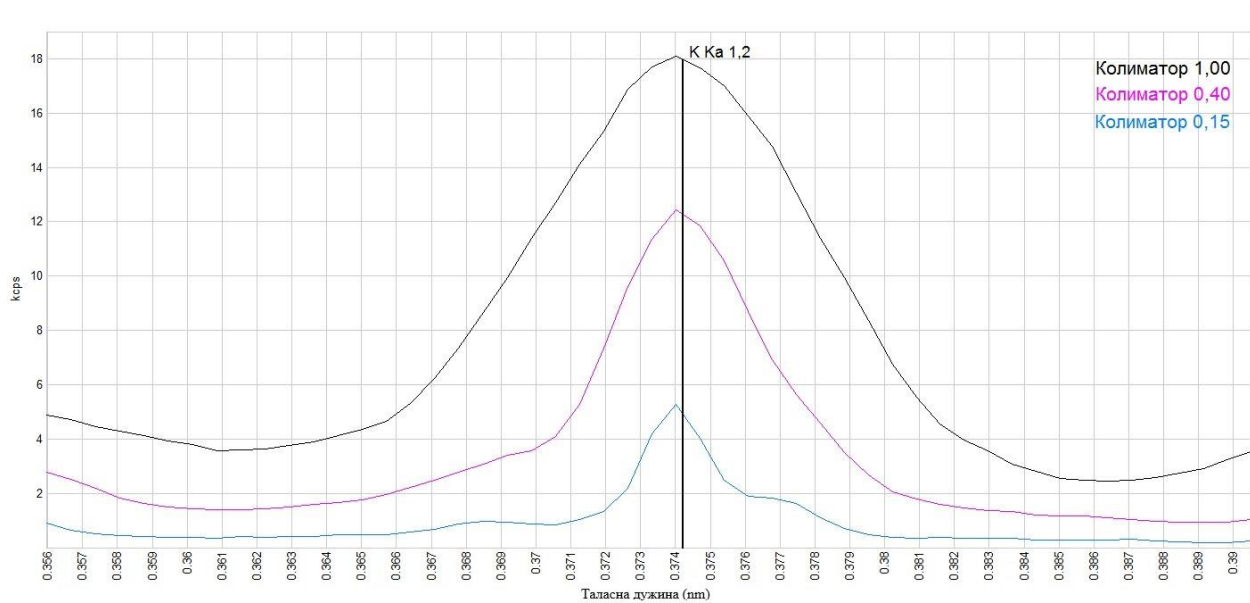
6.2.4. Калијум

У табели 6.4. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика К у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.13. приказани су преклопљени квалитативни спектри К добијени коришћењем PET кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV, док је варирана ширина три колиматора. На сликама 6.14. и 6.15. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима, осим коришћених кристала, који су у овом случају били Ge111 и LiF200.

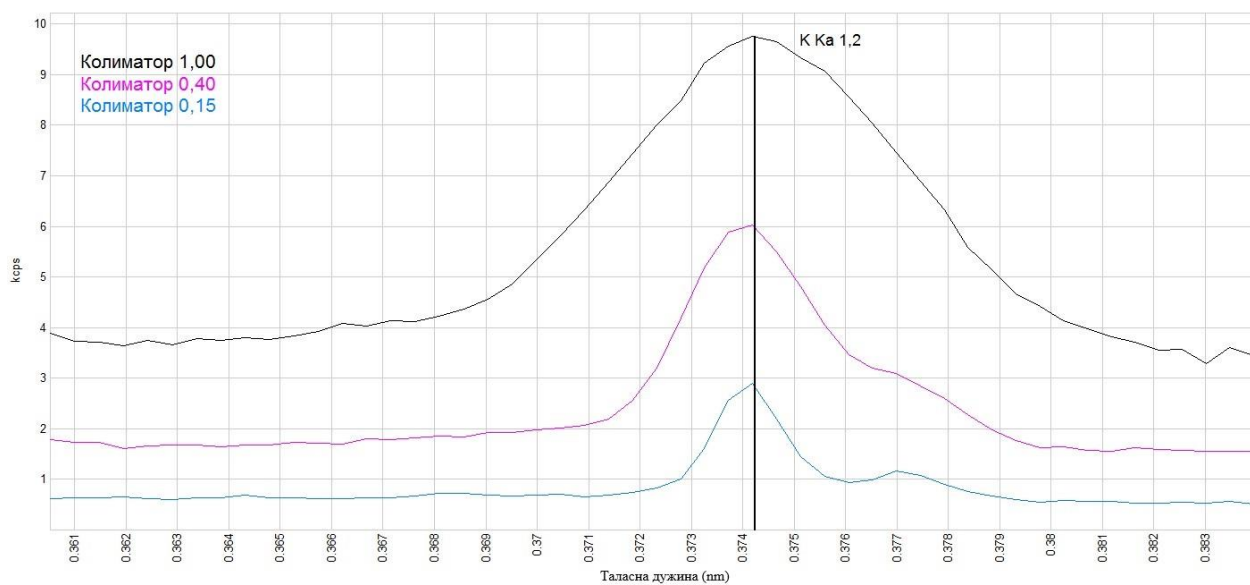
Табела 6.4. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за К. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
PET	1,00	FPC	80	30	3,313	2,79	18,06	15,27
	0,40	FPC	80	30	3,313	1,64	12,41	10,77
	0,15	FPC	80	30	3,313	0,39	5,35	4,96
Ge111	1,00	FPC	80	30	3,313	3,68	9,79	6,12
	0,40	FPC	80	30	3,313	1,80	6,05	4,24
	0,15	FPC	80	30	3,313	0,57	2,92	2,35
LiF200	1,00	FPC	80	30	3,313	1,98	18,63	16,66
	0,40	FPC	80	30	3,313	1,09	11,61	10,52
	0,15	FPC	80	30	3,313	0,27	4,46	4,19

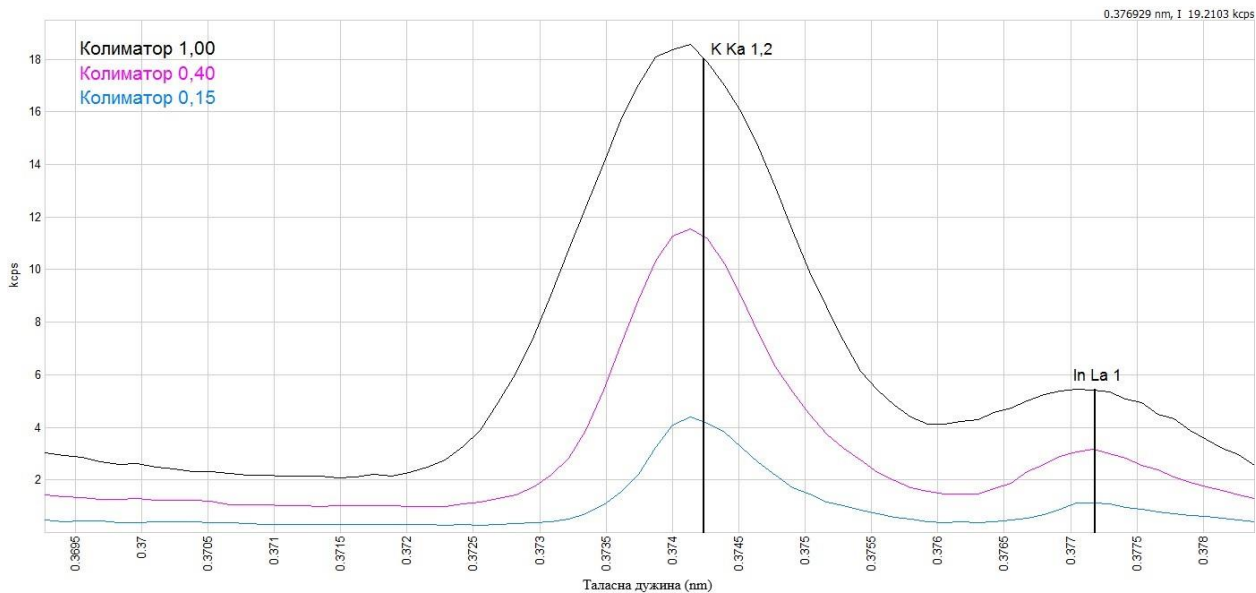
К је могуће одређивати употребом PET, Ge111 и LiF200 кристала. На основу добијених спектра је могуће уочити да сва три кристала дају задовољавајуће спектре. Међутим, употребом LiF200 кристала се добијају спектри са најнижом позадином и овај кристал карактерише јако добра резолуција. Како су концентрације К јако високе у биљним материјалима, препоручује се коришћење 0,40 колиматора.



Слика 6.13. Преклопљени квалитативни спектри К добијени употребом PET кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).



Слика 6.14. Преклопљени квалитативни спектри К добијени употребом Ge111 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).



Слика 6.15. Преклопљени квалитативни спектри К добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиатора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).

6.2.5. Калцијум

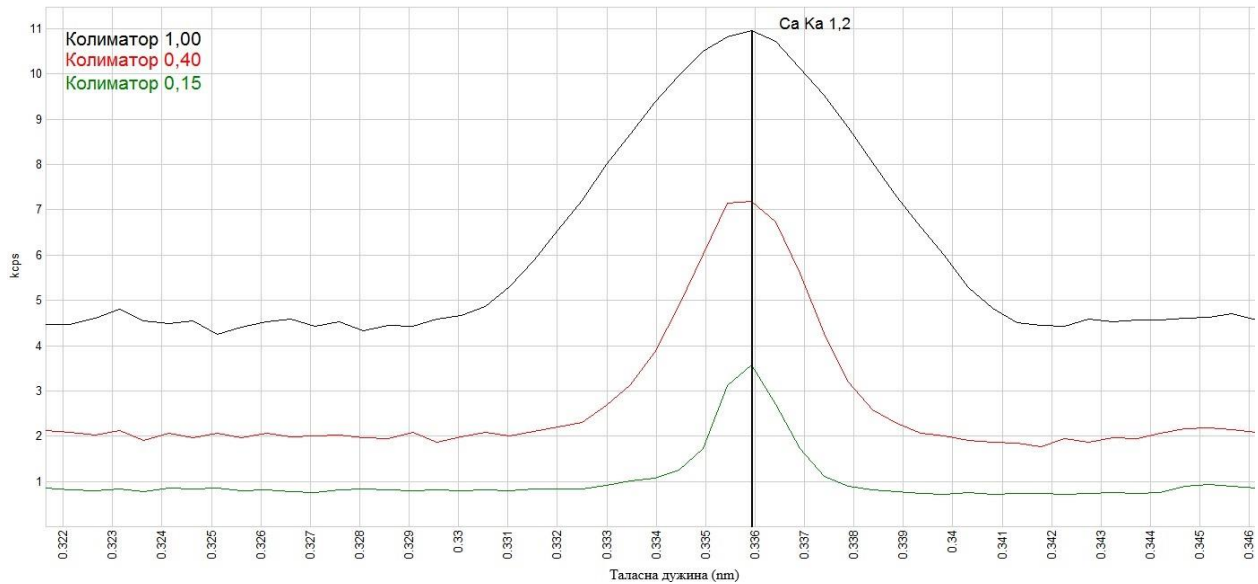
У табели 6.5. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика Ca у kcps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.16. приказани су преклопљени квалитативни спектри калијума добијени коришћењем Ge111 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV, док је варирана ширина три колиатора. На сликама 6.17. и 6.18. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима, осим коришћених кристала, који су у овом случају били PET и LiF200.

Табела 6.5. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (kcps) при различитим аналитичким параметрима за Ca. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

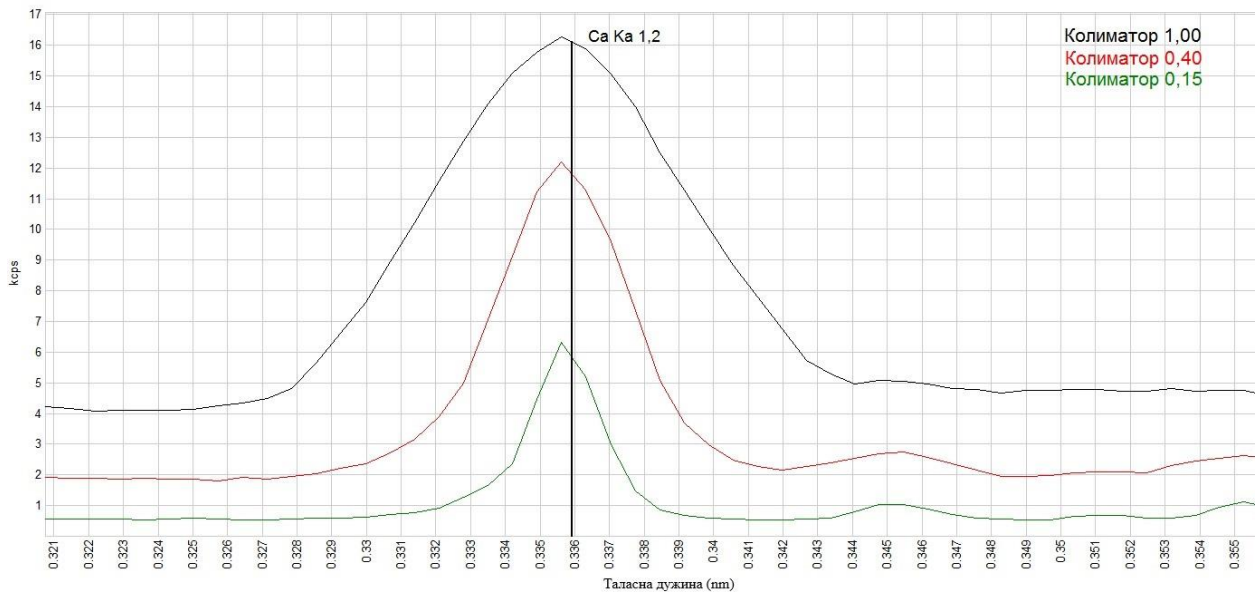
Кристал	Колиатор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, kcps	Интензитет на позицији сигнала, kcps	Интензитет пика, kcps
Ge111	0,15	FPC	80	30	3,691	0,76	3,57	2,81
	0,40	FPC	80	30	3,691	1,89	7,20	5,32
	1,00	FPC	80	30	3,691	4,47	10,99	6,52
PET	0,15	FPC	80	30	3,691	0,54	6,36	5,82
	0,40	FPC	80	30	3,691	1,94	12,12	10,18
	1,00	FPC	80	30	3,691	4,30	16,27	11,97
LiF200	0,15	FPC	80	30	3,691	0,26	4,80	4,54
	0,40	FPC	80	30	3,691	1,03	10,97	9,94
	1,00	FPC	80	30	3,691	2,21	15,68	13,47

Ca је могуће одређивати употребом PET, Ge111 и LiF200 кристала. Иако сва три кристала дају задовољавајуће спектре, употребом LiF200 се добијају спектри са добром

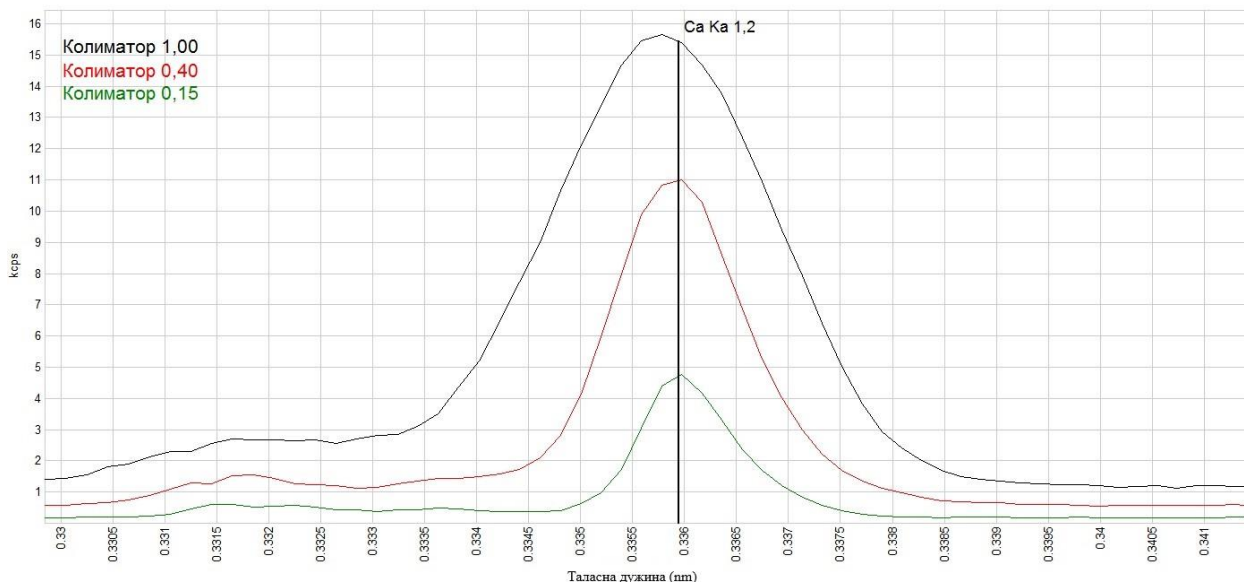
резолюцијом, најнижом позадином и интензивним пиком. Како су концентрације Са јако високе у биљним материјалима, препоручује се коришћење 0,40 колиматора.



Слика 6.16. Преклопљени квалитативни спектри Са добијени употребом Ge111 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (црвено) и 0,15 (зелено).



Слика 6.17. Преклопљени квалитативни спектри Са добијени употребом PET кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (црвено) и 0,15 (зелено).



Слика 6.18. Преклопљени квалитативни спектри Са добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напон 30 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (црвено) и 0,15 (зелено).

6.2.6. Хром

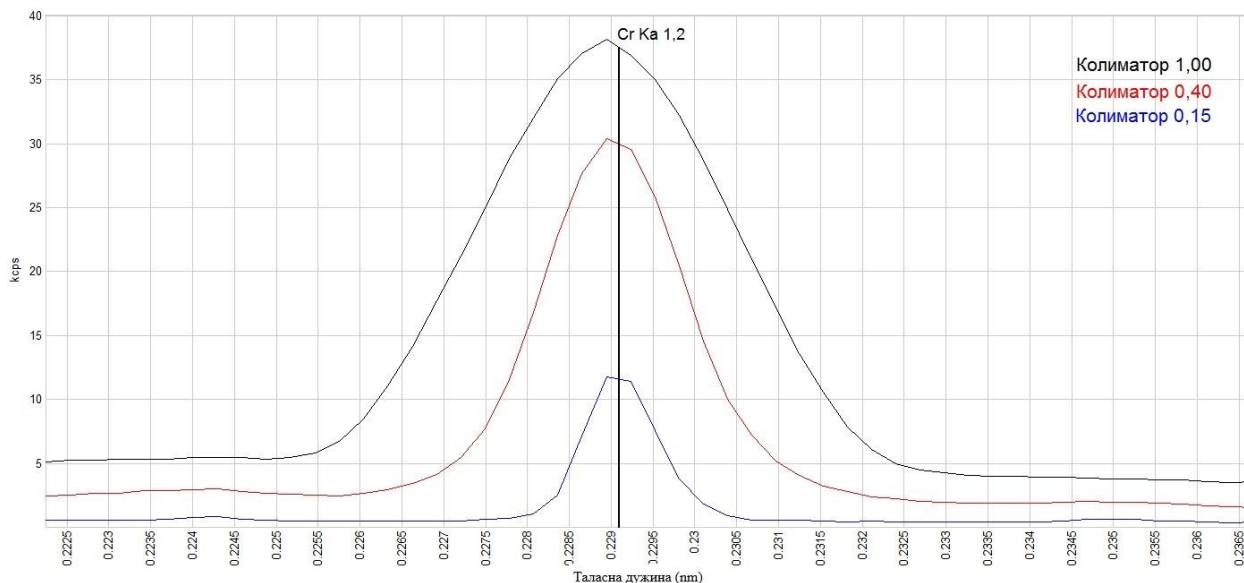
У табели 6.6. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и самог пика Cr у kcps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.19. приказани су преклопљени квалитативни спектри Cr добијени коришћењем LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина три колиматора. На слици 6.20. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима струје и напона, LiF220 кристалом, и комбинацијом два детектора и три колиматора.

Табела 6.6. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (kcps) при различитим аналитичким параметрима за Cr. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

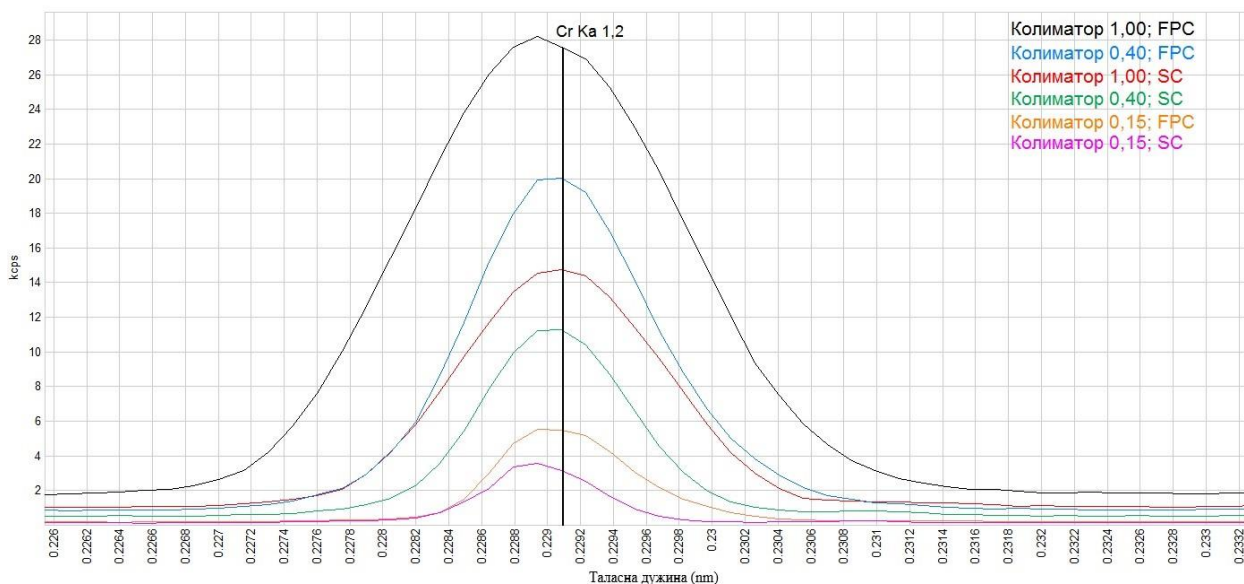
Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, kcps	Интензитет на позицији сигнала, kcps	Интензитет пика, kcps
LiF200	0,15	FPC	50	50	2,291	0,35	11,98	11,63
	0,40	FPC	50	50	2,291	2,59	30,33	27,74
	1,00	FPC	50	50	2,291	4,62	38,31	33,69
LiF220	0,15	FPC	50	50	2,291	0,26	5,65	5,39
	0,40	FPC	50	50	2,291	1,52	20,03	18,51
	1,00	FPC	50	50	2,291	2,09	28,19	26,10
	0,15	SC	50	50	2,291	0,26	3,66	3,40
	0,40	SC	50	50	2,291	0,73	11,30	10,56
	1,00	SC	50	50	2,291	1,26	14,85	13,60

На основу добијених резултата, приликом одабира адекватног кристала при одређивању Cr се саветује коришћење LiF200 кристала због изузетно интензивног сигнала

и ниске позадине, и 0,40 колиматора. Коришћењем LiF220 кристала се такође добијају квалитетни сигнали, али само уколико се користи FPC детектор.



Слика 6.19. Преклопљени квалитативни спектри Cr добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (црвено) и 0,15 (плаво).



Слика 6.20. Преклопљени квалитативни спектри Cr добијени употребом LiF220 кристала, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиматора: 1,00 и FPC (црно), 0,40 и FPC (плаво), 1,00 и SC (црвено), 0,40 и SC (зелено), 0,15 и FPC (наранџасто), 0,15 и SC (розе).

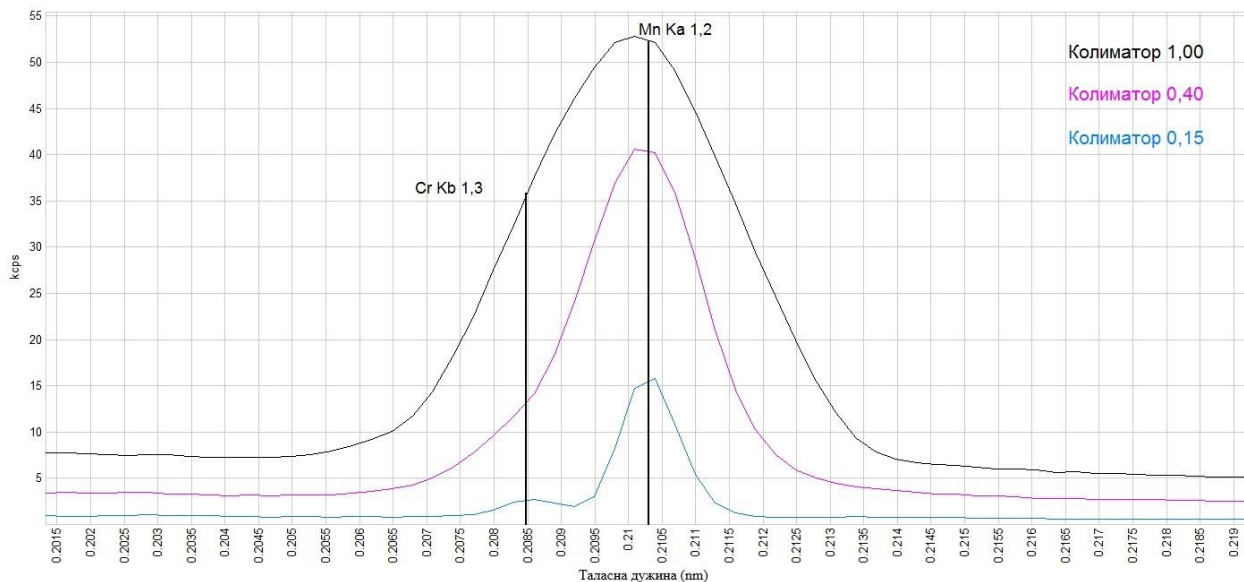
6.2.7. Манган

У табели 6.7. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Mn у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.21. приказани су преклопљени квалитативни спектри Mn добијени коришћењем LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина три колиматора. На сликама 6.22. и 6.23. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима струје и напона, LiF220 кристалом, и комбинацијом два детектора и три колиматора, у нормалној и логаритамској расподели.

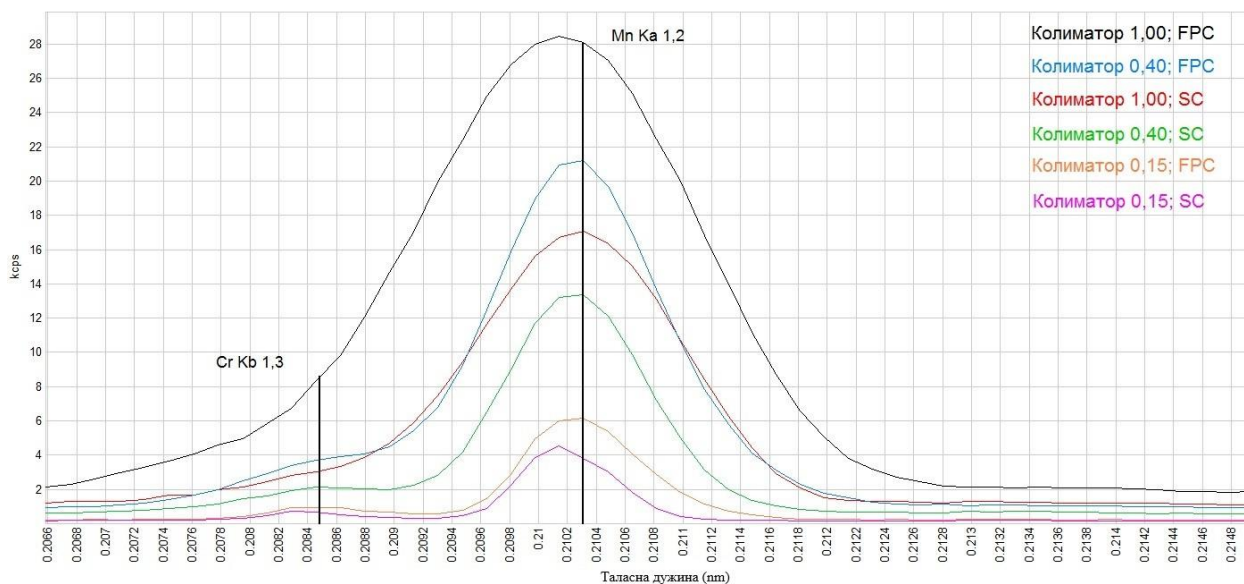
Табела 6.7. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Mn. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
LiF200	1,00	FPC	50	50	5,896	5,81	53,90	48,09
	0,40	FPC	50	50	5,896	2,62	40,60	37,98
	0,15	FPC	50	50	5,896	0,58	15,99	15,41
LiF220	1,00	FPC	50	50	5,896	2,14	28,56	26,42
	0,40	FPC	50	50	5,896	1,15	21,25	20,10
	0,15	FPC	50	50	5,896	0,42	6,32	5,90
	1,00	SC	50	50	5,896	1,03	17,13	16,10
	0,40	SC	50	50	5,896	0,63	13,42	12,79
	0,15	SC	50	50	5,896	0,26	4,65	4,39

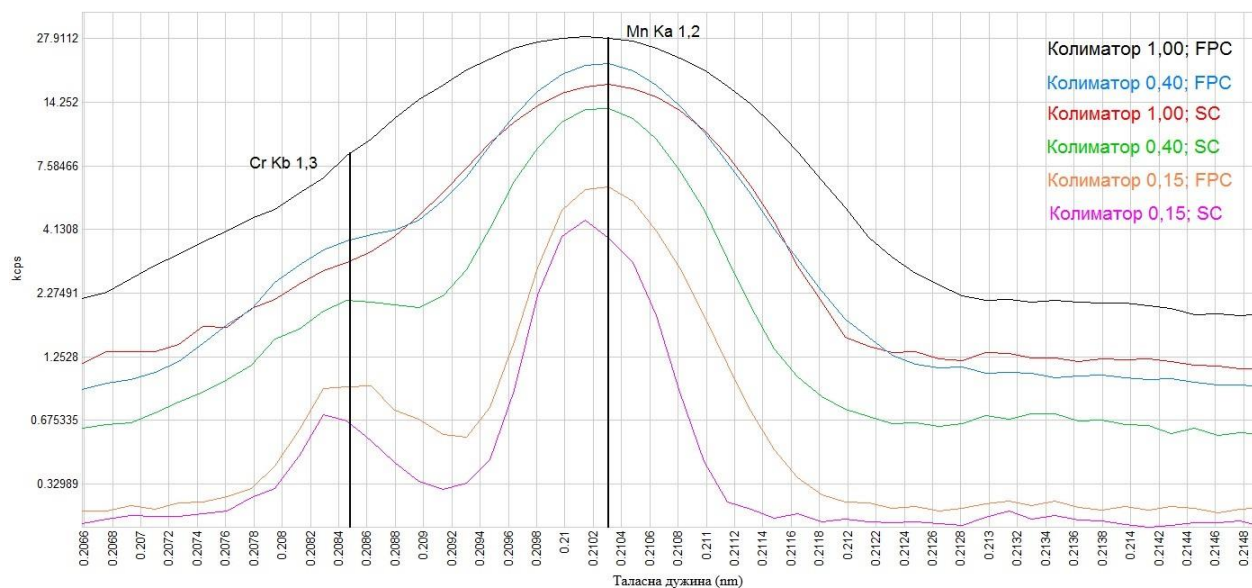
Приликом одређивања Mn, саветује се коришћење LiF200 кристала и 0,40 колиматора, као и у случају Sr. Коришћењем LiF220 кристала се такође добијају квалитетни сигнали, али само уколико се користи FPC детектор.



Слика 6.21. Преклопљени квалитативни спектри Mn добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).



Слика 6.22. Преклопљени квалитативни спектри Mn у нормалној расподели добијени употребом LiF220 кристала, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиматора: 1,00 и FPC (црно), 0,40 и FPC (плаво), 1,00 и SC (црвено), 0,40 и SC (зелено), 0,15 и FPC (наранџасто), 0,15 и SC (розе).



Слика 6.23. Преклопљени квалитативни спектри Mn у логаритамској расподели добијени употребом LiF220 кристала, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиматора: 1,00 и FPC (црно), 0,40 и FPC (плаво), 1,00 и SC (црвено), 0,40 и SC (зелено), 0,15 и FPC (наранџасто), 0,15 и SC (розе).

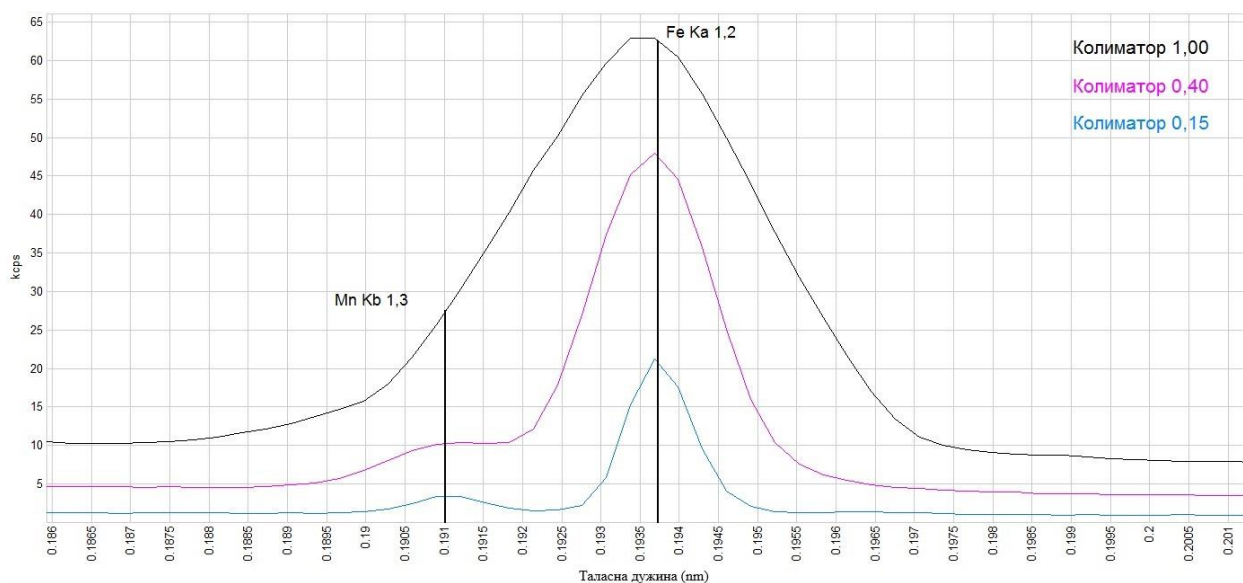
6.2.8. Гвожђе

У табели 6.8. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Fe у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.24. приказани су преклопљени квалитативни спектри Fe добијени коришћењем LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина три колиматора. На слици 6.25. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима и варијацијама колиматора као и претходни, само са употребом LiF220 кристала.

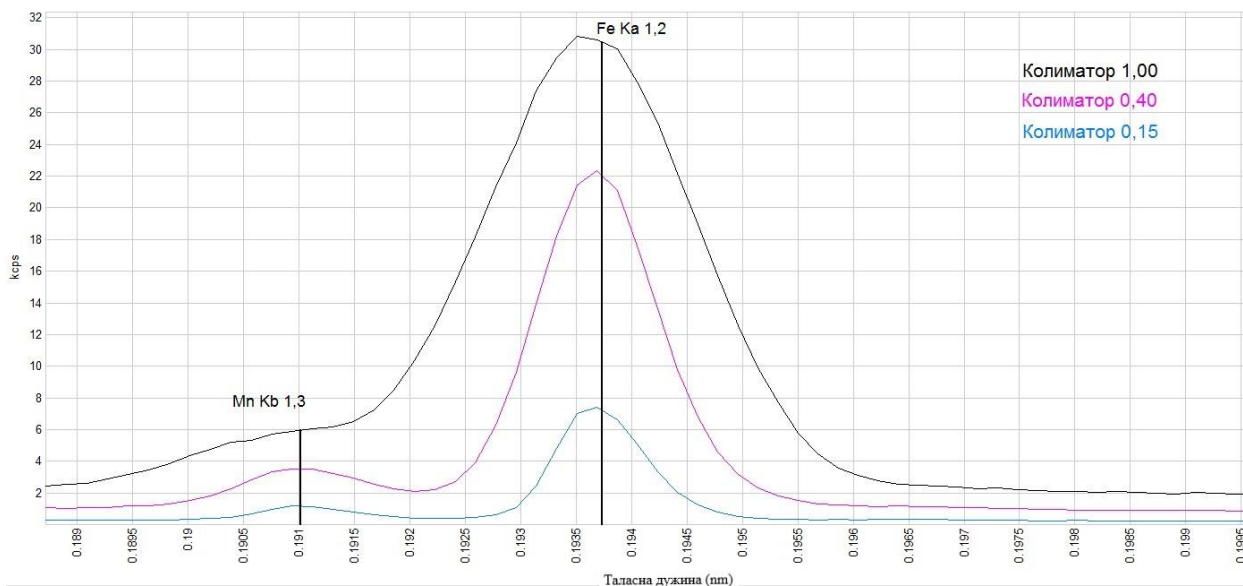
Табела 6.8. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Fe. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
LiF200	1,00	FPC	50	50	6,400	9,92	63,27	53,34
	0,40	FPC	50	50	6,400	4,90	48,79	43,89
	0,15	FPC	50	50	6,400	0,82	21,83	21,01
LiF220	1,00	FPC	50	50	6,400	2,32	31,34	29,02
	0,40	FPC	50	50	6,400	1,47	22,68	21,21
	0,15	FPC	50	50	6,400	0,68	7,81	7,13

Најинтензивнији сигнал, са довољно ниском позадином при анализи Fe се добија уколико се користи LiF200 кристал и 0,40 колиматор. Приликом коришћења LiF200 кристала се боље врши одвајање Fe K_{α} и Mn K_{β} линија, ипак на основу спектра се може видети да Mn K_{β} линија не утиче на интензитет Fe K_{α} линије на позицији пика.



Слика 6.24. Преклопљени квалитативни спектри Fe добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).



Слика 6.25. Преклопљени квалитативни спектри Fe добијени употребом LiF220 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиматора: 1,00 (црно), 0,40 (розе) и 0,15 (плаво).

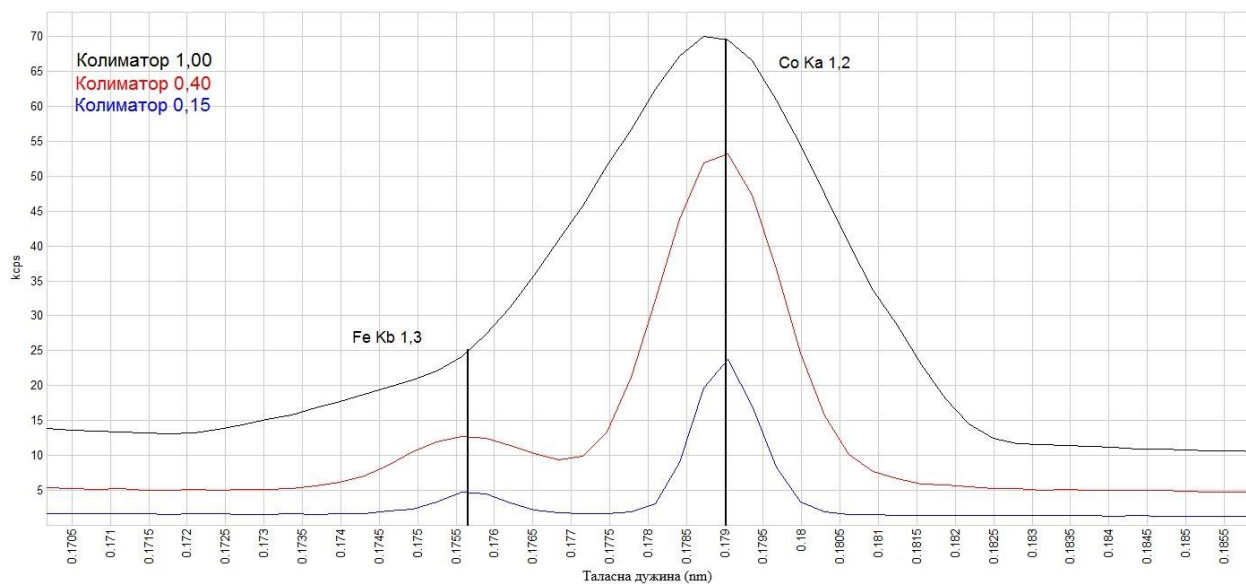
6.2.9. Кобалт

У табели 6.9. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Co у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.26. приказани су преклопљени квалитативни спектри Co добијени коришћењем LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина три колиматора. На слици 6.27. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима и варијацијама колиматора као и претходни, само са употребом LiF220 кристала.

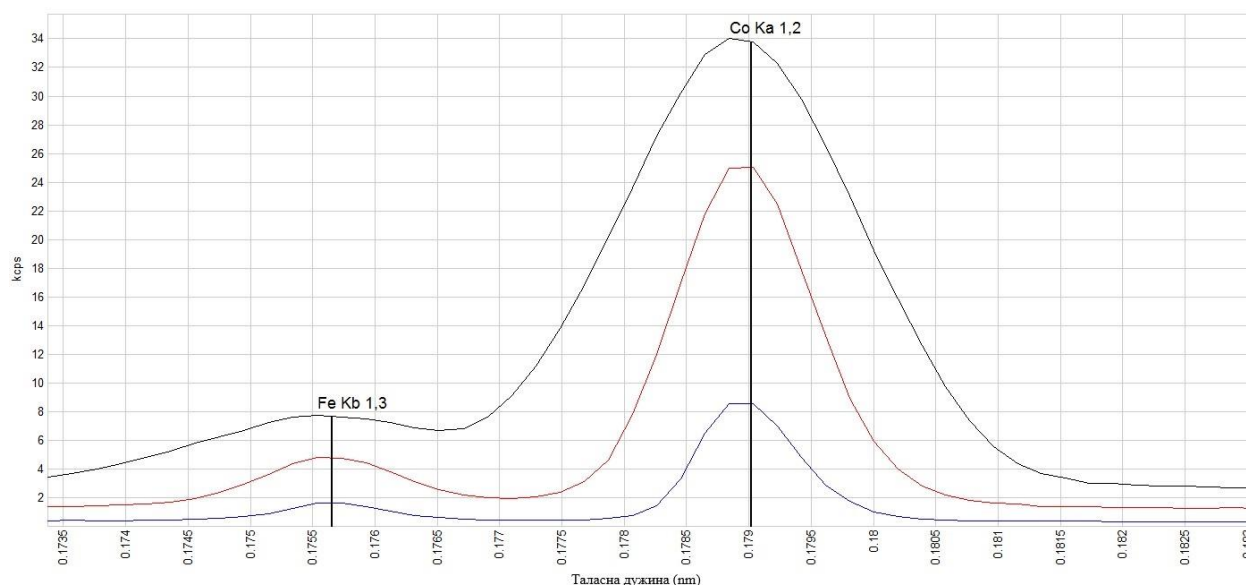
Табела 6.9. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Co. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
LiF200	0,15	FPC	50	50	6,926	1,41	24,02	22,61
	0,40	FPC	50	50	6,926	5,27	53,44	48,17
	1,00	FPC	50	50	6,926	11,82	69,88	58,06
LiF220	0,15	FPC	50	50	6,926	0,37	8,87	8,49
	0,40	FPC	50	50	6,926	1,56	25,47	23,91
	1,00	FPC	50	50	6,926	3,00	34,28	31,28

У случају Co се може извести исти закључак као и код Fe. Најинтензивнији сигнал, са довољно ниском позадином при анализи се добија уколико се користи LiF200 кристал и 0,40 колиматор. Приликом коришћења LiF200 кристала се боље врши одвајање Co K_{α} и Fe K_{β} линија, међутим Fe K_{β} линија не утиче на интензитет Co K_{α} линије на позицији пика.



Слика 6.26. Преклопљени квалитативни спектри Со добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиатора: 1,00 (црно), 0,40 (црвено) и 0,15 (плаво).



Слика 6.27. Преклопљени квалитативни спектри Со добијени употребом LiF220 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиатора: 1,00 (црно), 0,40 (црвено) и 0,15 (плаво).

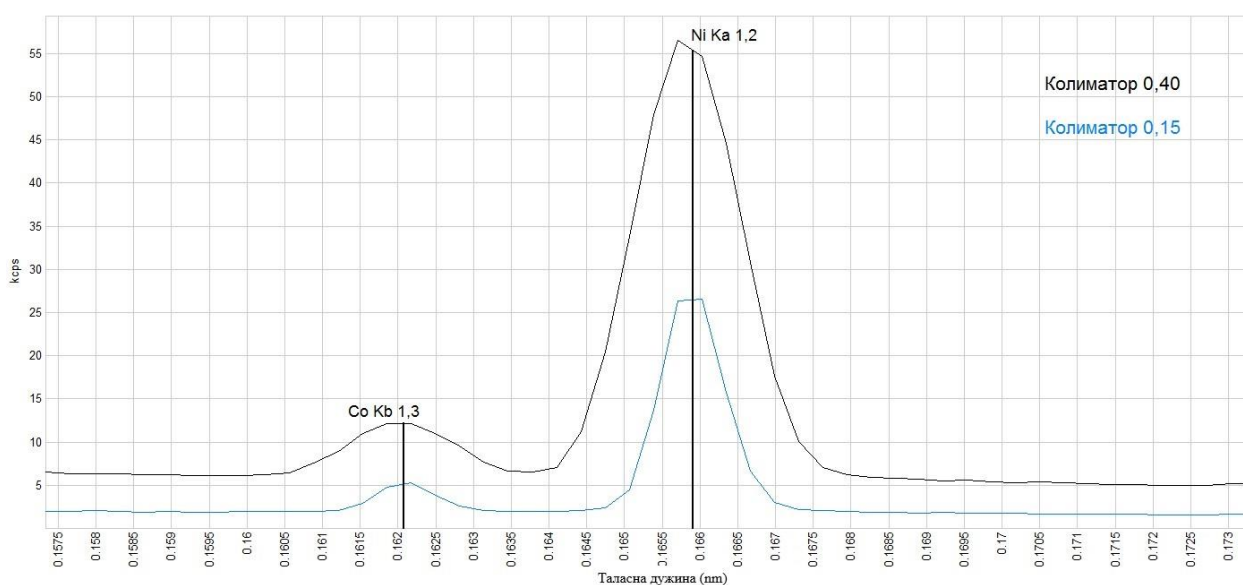
6.2.10. Никл

У табели 6.10. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Ni у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.28. приказани су преклопљени квалитативни спектри Ni добијени коришћењем LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина два колиатора. На слици 6.29. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима и варијацијама колиатора као и претходни, само са употребом LiF220 кристала.

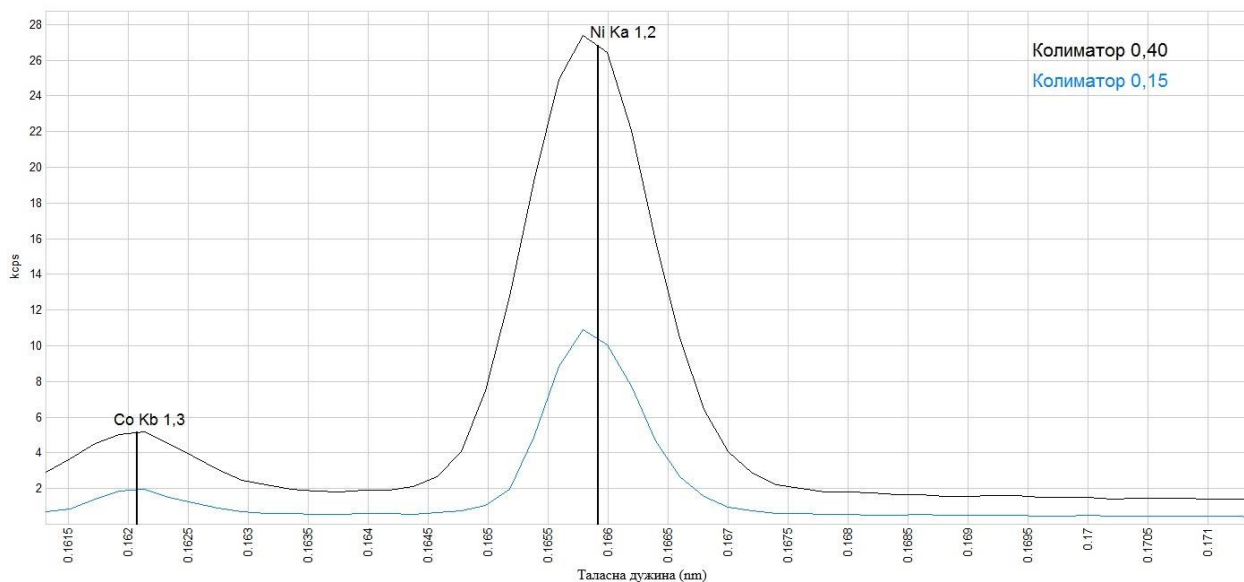
Табела 6.10. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (кcps) при различитим аналитичким параметрима за Ni. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиimator	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
LiF200	0,40	FPC	50	50	7,474	5,70	56,62	50,92
	0,15	FPC	50	50	7,474	1,87	26,86	24,99
LiF220	0,40	FPC	50	50	7,474	1,81	27,44	25,63
	0,15	FPC	50	50	7,474	0,55	11,01	10,45

Сигнал је јако интензиван, позадина је довољно ниска, а раздвајање Ni K_{α} и Co K_{β} линија је адекватно уколико се користе 0,40 колиimator и LiF200 кристал.



Слика 6.28. Преклопљени квалитативни спектри Ni добијени употребом LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиimatorа: 0,40 (црно) и 0,15 (плаво).



Слика 6.29. Преклопљени квалитативни спектри Ni добијени употребом LiF220 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиматора: 0,40 (црно) и 0,15 (плаво).

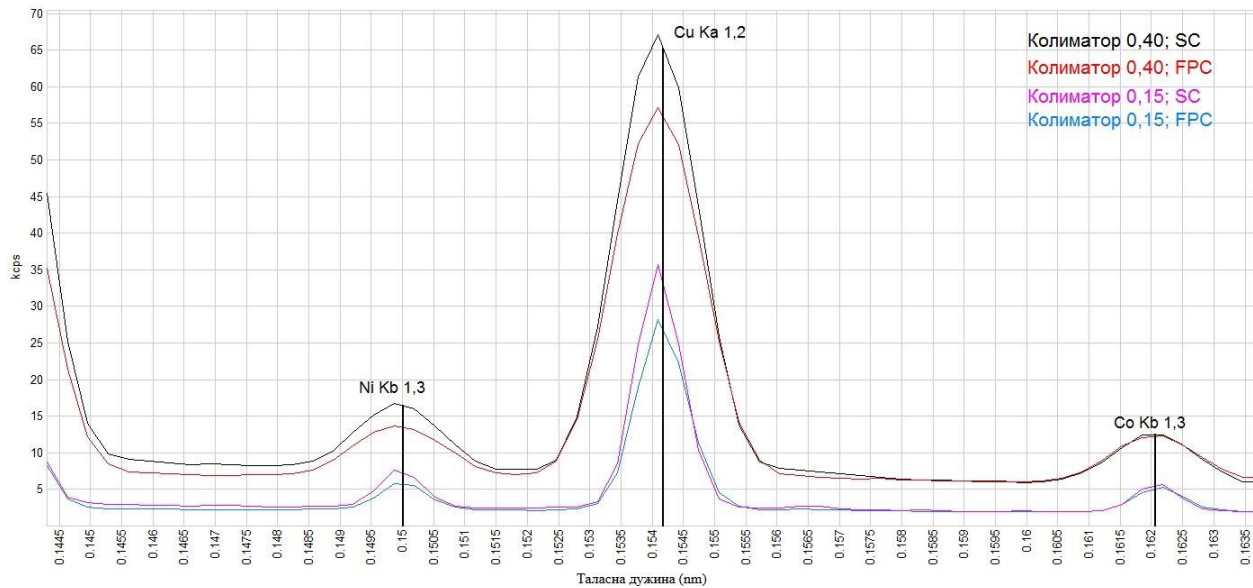
6.2.11. Бакар

У табели 6.11. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Cu у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.30. приказани су преклопљени квалитативни спектри Cu добијени коришћењем LiF200 кристала, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина два колиматора и два детектора (FPC и SC). На слици 6.31. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима струје и напона, комбинацијом иста два детектора и два колиматора, али са употребом LiF220 кристала.

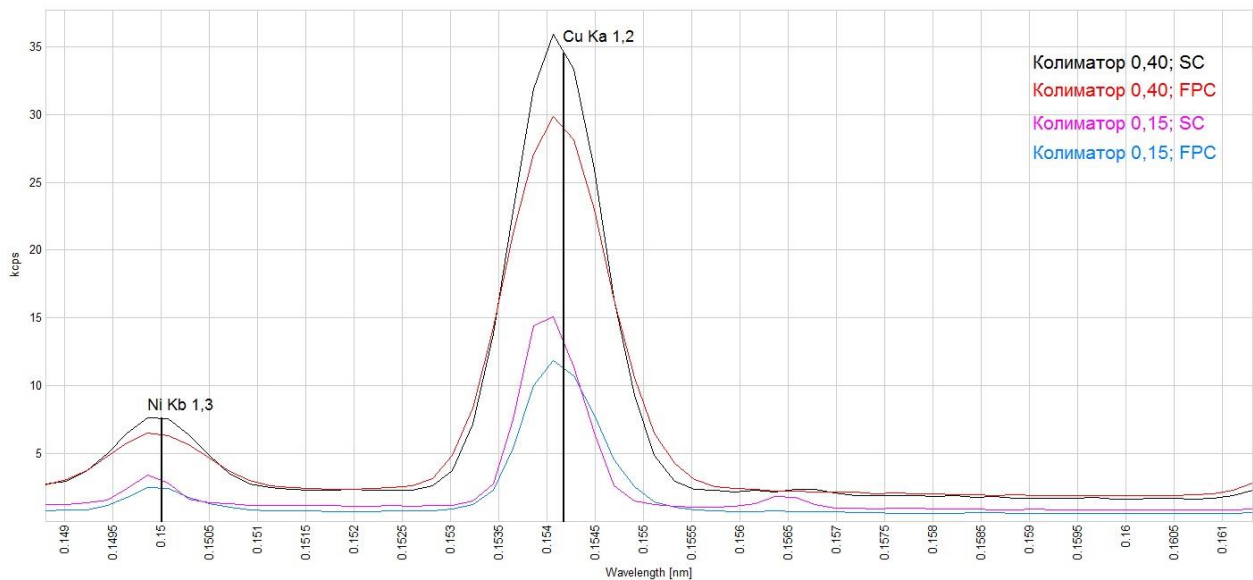
Табела 6.11. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Cu. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиimator	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
LiF200	0,40	FPC	50	50	8,042	6,77	57,28	50,50
	0,15	FPC	50	50	8,042	1,85	28,08	26,24
	0,40	SC	50	50	8,042	7,14	67,01	59,86
	0,15	SC	50	50	8,042	2,22	35,60	33,38
LiF220	0,40	FPC	50	50	8,042	2,50	29,98	27,47
	0,15	FPC	50	50	8,042	0,92	11,79	10,87
	0,40	SC	50	50	8,042	2,31	35,90	33,60
	0,15	SC	50	50	8,042	1,32	15,42	14,10

Квалитативни спектри Cu показују да LiF200 кристал у комбинацији са 0,40 колиimatorом и SC детектором даје најинтензивнији сигнал који не подлеже значајним преклапањима.



Слика 6.30. Преклопљени квалитативни спектри Cu добијени употребом LiF200 кристала, јачине струје 50 mA , напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиматора: 0,40 и SC (црно), 0,40 и FPC (црвено), 0,15 и SC (розе), 0,15 и FPC (плаво).



Слика 6.31. Преклопљени квалитативни спектри Cu добијени употребом LiF220 кристала, јачине струје 50 mA , напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиматора: 0,40 и SC (црно), 0,40 и FPC (црвено), 0,15 и SC (розе), 0,15 и FPC (плаво).

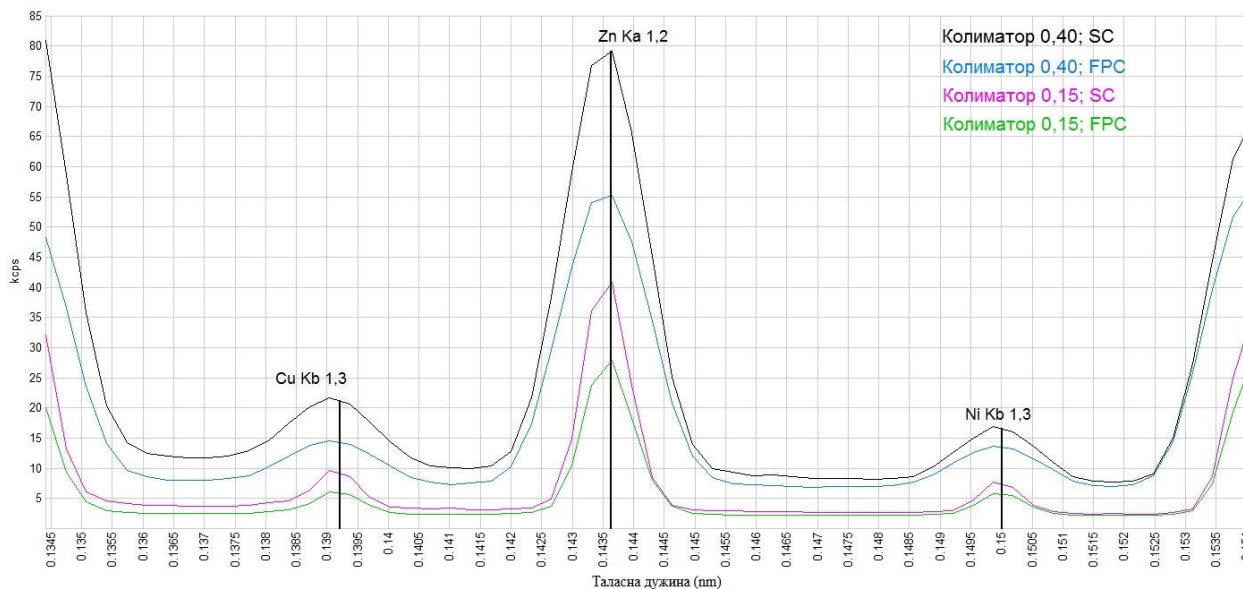
6.2.12. Цинк

У табели 6.12. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Zn у kcps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.32. приказани су преклопљени квалитативни спектри Zn добијени коришћењем LiF200 кристала, јачине струје 50 mA , напона 50 kV , док је варирана ширина два колиматора и два детектора (FPC и SC). На слици 6.33. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима струје и напона, комбинацијом иста два детектора и два колиматора, али са употребом LiF220 кристала.

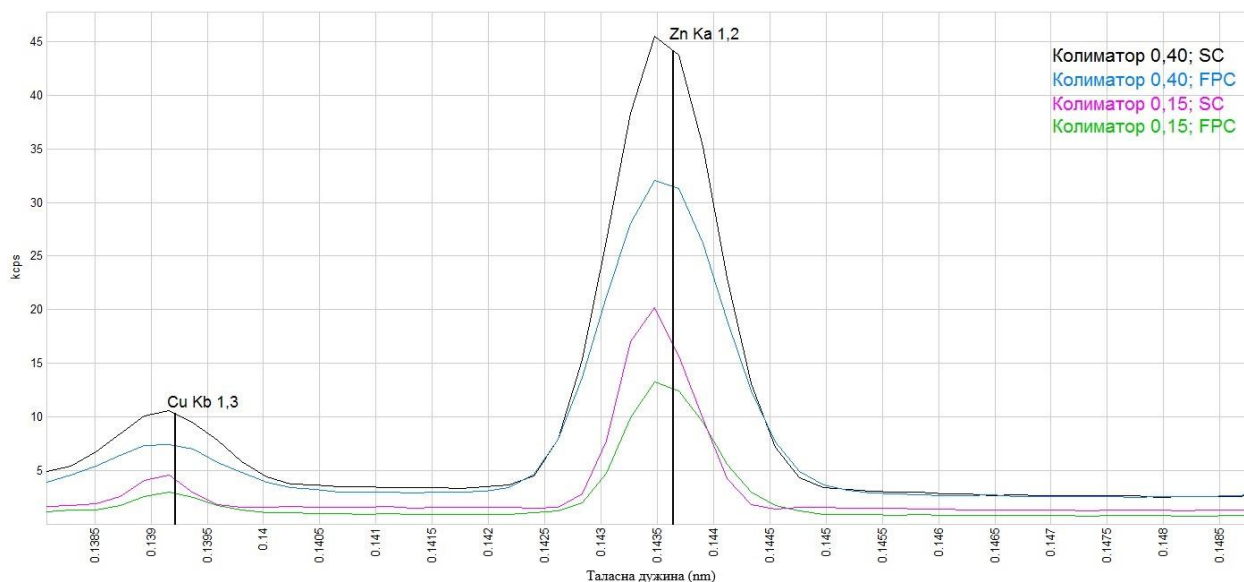
Табела 6.12. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (cps) при различитим аналитичким параметрима за Zn. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиimator	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, cps	Интензитет на позицији сигнала, cps	Интензитет пика, cps
LiF200	0,40	FPC	50	50	8,632	6,83	55,56	48,73
	0,15	FPC	50	50	8,632	2,23	27,93	25,70
	0,40	SC	50	50	8,632	9,21	79,18	69,97
	0,15	SC	50	50	8,632	2,67	41,00	38,33
LiF220	0,40	FPC	50	50	8,632	2,92	32,05	29,13
	0,15	FPC	50	50	8,632	0,67	13,44	12,77
	0,40	SC	50	50	8,632	3,09	45,66	42,57
	0,15	SC	50	50	8,632	1,42	20,53	19,11

На основу квалитативних спектра може се закључити да се коришћењем LiF200 кристала, 0,40 колиimatorа и SC детектора добија најинтензивнији сигнал. K_{β} линије Cu и Zn су адекватно раздвојене употребом ових аналитичких параметара. Како се Zn у биљкама налази у ниским концентрацијама, велики интензитет аналитичког сигнала би требао бити главни приоритет приликом одабира аналитичких параметра. Важно је нагласити да се и употребом коришћењем LiF220 кристала такође добијају спектри задовољавајућег квалитета.



Слика 6.32. Преклопљени квалитативни спектри Zn добијени употребом LiF200 кристала, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиimatorа: 0,40 и SC (црно), 0,40 и FPC (плаво), 0,15 и SC (розе), 0,15 и FPC (зелено).



Слика 6.33. Преклопљени квалитативни спектри Zn добијени употребом LiF220 кристала, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих комбинација детектора и колиматора: 0,40 и SC (црно), 0,40 и FPC (плаво), 0,15 и SC (розе), 0,15 и FPC (зелено).

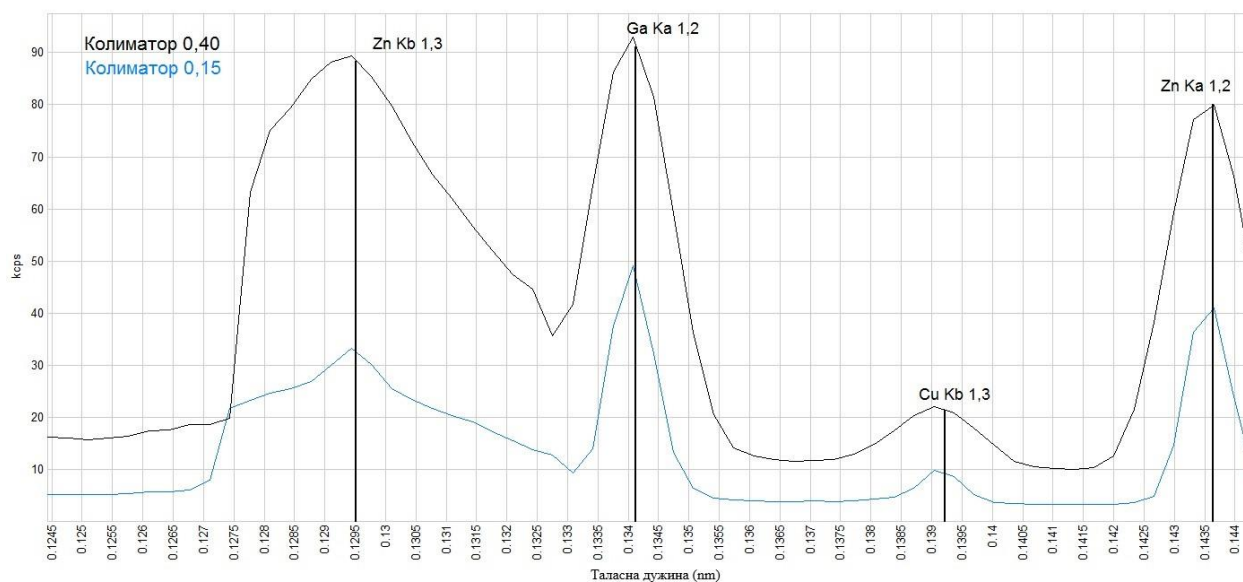
6.2.13. Галијум

У табели 6.13. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Ga у ксрps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.34. приказани су преклопљени квалитативни спектри Ga добијени коришћењем LiF200 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина два колиматора. На слици 6.35. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима и варијацијама колиматора као и претходни, само са употребом LiF220 кристала.

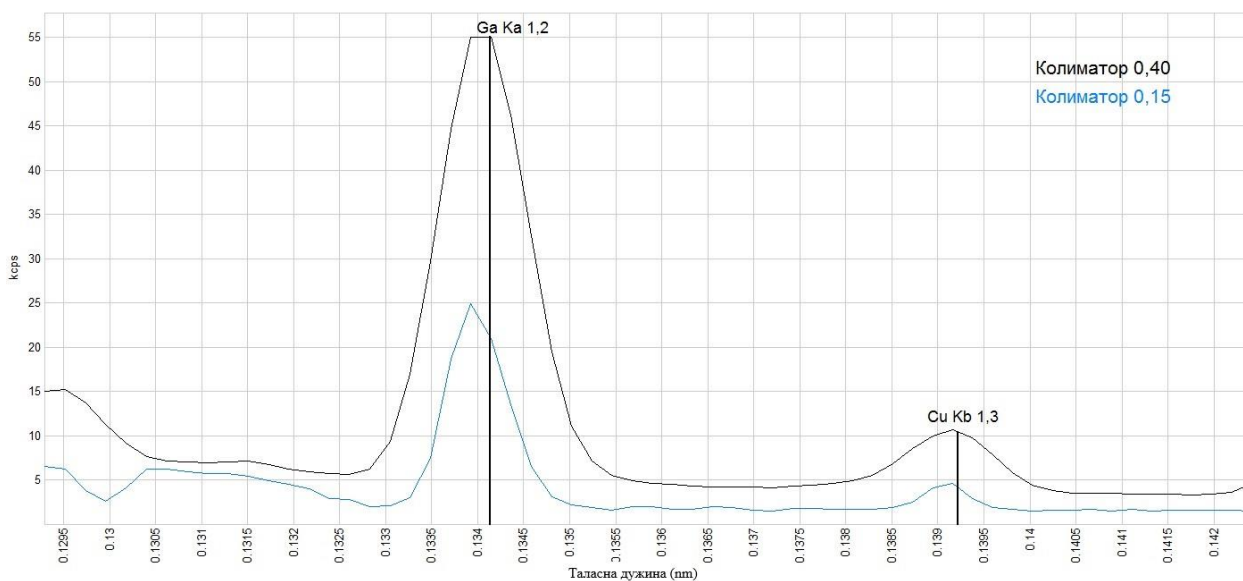
Табела 6.13. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (ксрps) при различитим аналитичким параметрима за Ga

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, ксрps	Интензитет на позицији сигнала, ксрps	Интензитет пика, ксрps
LiF200	0,40	SC	50	50	9,244	13,60	92,82	79,21
	0,15	SC	50	50	9,244	5,17	49,42	44,26
LiF220	0,40	SC	50	50	9,244	4,13	55,03	50,89
	0,15	SC	50	50	9,244	1,31	25,14	23,83

Приликом одређивања Ga препоручена је употреба LiF220 кристала и 0,40 колиматора. Иако се употребом LiF200 кристала добија пик који је већег интензитета, на основу квалитативног спектра на слици 6.13.1. је могуће уочити да је пик Ga има изразито несиметричну позадину која настаје услед повећаног интензитета континуалног спектра примарног зрачења и регији између 0,125 и 0,135 nm.



Слика 6.34. Преклопљени квалитативни спектри Ga добијени употребом LiF200 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиатора: 0,40 (црно) и 0,15 (плаво).



Слика 6.35. Преклопљени квалитативни спектри Ga добијени употребом LiF220 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиатора: 0,40 (црно) и 0,15 (плаво).

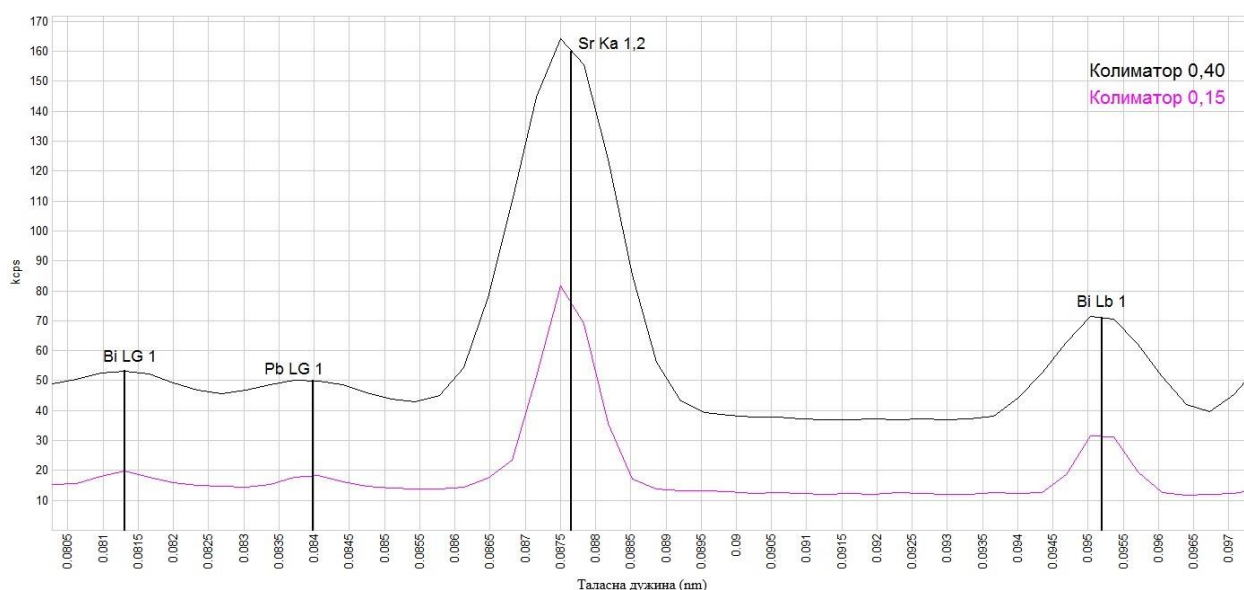
6.2.14. Стронцијум

У табели 6.14. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пика Sr у cps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.36. приказани су преклопљени квалитативни спектри Sr добијени коришћењем LiF200 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напона 50 kV, док је варирана ширина два колиатора. На слици 6.37. приказани су преклопљени спектри са истим параметрима и варијацијама колиатора као и претходни, само са употребом LiF220 кристала.

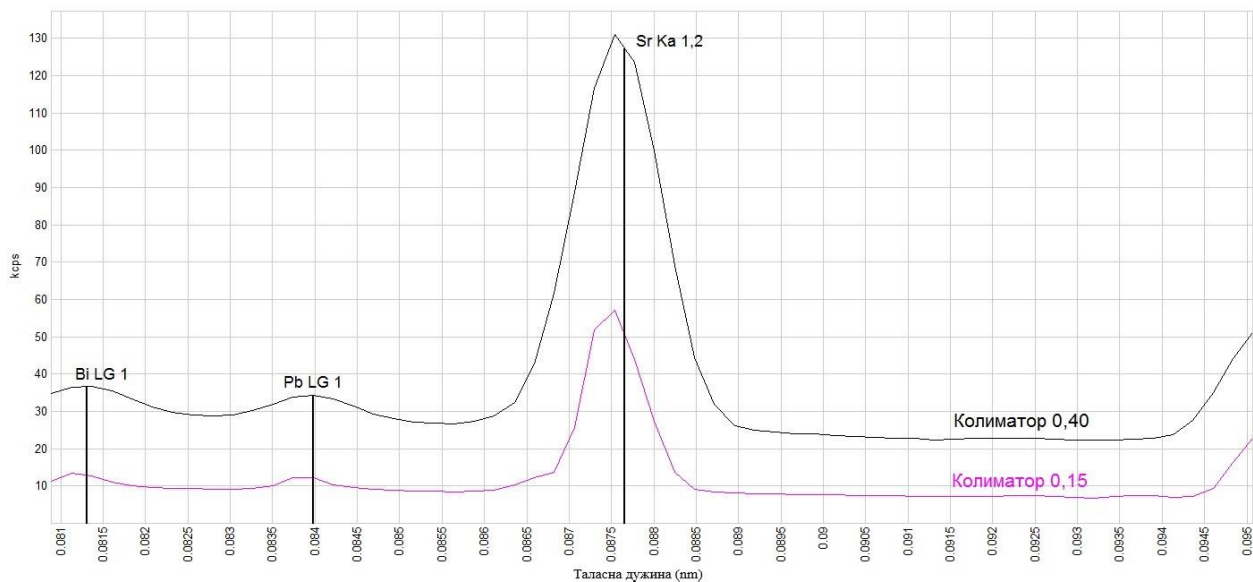
Табела 6.14. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (кспс) при различитим аналитичким параметрима за Sr. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Кристал	Колиматор	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Енергија сигнала, keV	Интензитет позадине, кспс	Интензитет на позицији сигнала, кспс	Интензитет пика, кспс
LiF200	0,40	SC	50	50	14,145	38,43	163,92	125,49
	0,15	SC	50	50	14,145	11,71	81,06	69,35
LiF220	0,40	SC	50	50	14,145	22,80	131,04	108,24
	0,15	SC	50	50	14,145	7,44	58,08	50,64

Из резултата табеле 6.14. је могуће уочити да се приликом одређивања Sr добијају сигнали коју су изразито интензивни. Како је позадина значајно нижа, препоручује се коришћење LiF220 кристала и 0,40 колиматора за оптимално одређивање овог елемента.



Слика 6.36. Преклопљени квалитативни спектри Sr добијени употребом LiF200 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиматора: 0,40 (црно) и 0,15 (плаво).



Слика 6.37. Преклопљени квалитативни спектри Sr добијени употребом LiF220 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напон 50 kV и различитих колиimatorа: 0,40 (црно) и 0,15 (плаво).

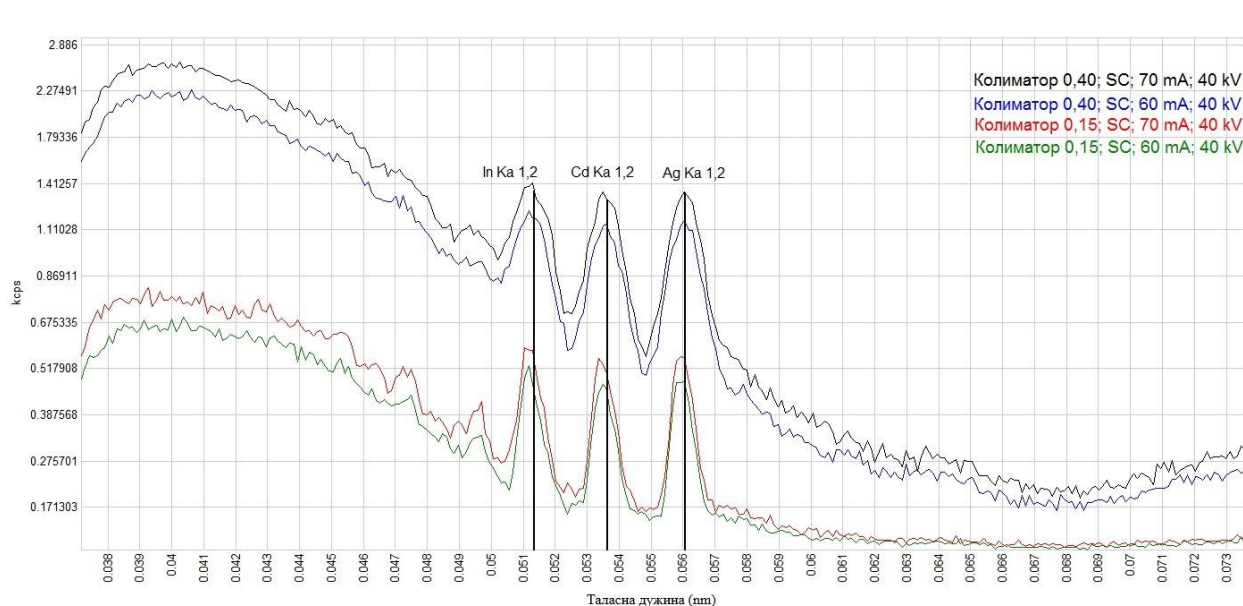
6.2.15. Сребро, кадмијум и индијум

У табели 6.15. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пикова Ag, Cd и In у kcps при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.38. приказани су преклопљени квалитативни спектри Ag, Cd и In добијени коришћењем LiF220 кристала, SC детектора, напона 40 kV, док је варирана ширина два колиimatorа вредности јачине струје (60 и 70 mA).

Табела 6.15. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (kcps) при различитим аналитичким параметрима за Ag, Cd и In. Плаво обојени ред представља препоручену комбинацију аналитичких параметара

Елемент	Кристал	Колиimator	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Интензитет позадине, kcps	Интензитет на позицији сигнала, kcps	Интензитет пика, kcps
Ag	LiF220	0,40	SC	60	40	0,54	1,35	0,81
		0,40	SC	70	40	0,45	1,16	0,71
		0,15	SC	60	40	0,16	0,57	0,41
		0,15	SC	70	40	0,14	0,49	0,35
Cd	LiF220	0,40	SC	60	40	0,64	1,36	0,72
		0,40	SC	70	40	0,55	1,14	0,59
		0,15	SC	60	40	0,18	0,56	0,38
		0,15	SC	70	40	0,15	0,47	0,32
In	LiF220	0,40	SC	60	40	0,72	1,42	0,71
		0,40	SC	70	40	0,84	1,21	0,38
		0,15	SC	60	40	0,23	0,60	0,37
		0,15	SC	70	40	0,17	0,54	0,37

Како се за одређивање In, Cd и Ag користи филтер примарног зрачења, интензитети аналитичких сигнала ових елемената су јако ниски. Повећавањем примењене струје, повећава се и интензитет добијених сигнала, али и позадине спектра. За добијање што интензивнијих сигнала, препоручује се коришћење 0,40 колиматора и комбинације јачине струје и напона 70 mA и 40 kV.



Слика 6.38 Преклопљени квалитативни спектри Ag, Cd и In у логаритамској расподели добијени употребом LiF220 кристала, SC детектора и различитих комбинација колиматора, јачине струје у mA и напона у kV: 0,40, 70 mA и 40 kV (црно), 0,40, 60 mA и 40 kV (плаво), 0,15, 70 mA и 40 kV (црвено), 0,15, 60 mA и 40 kV (зелено).

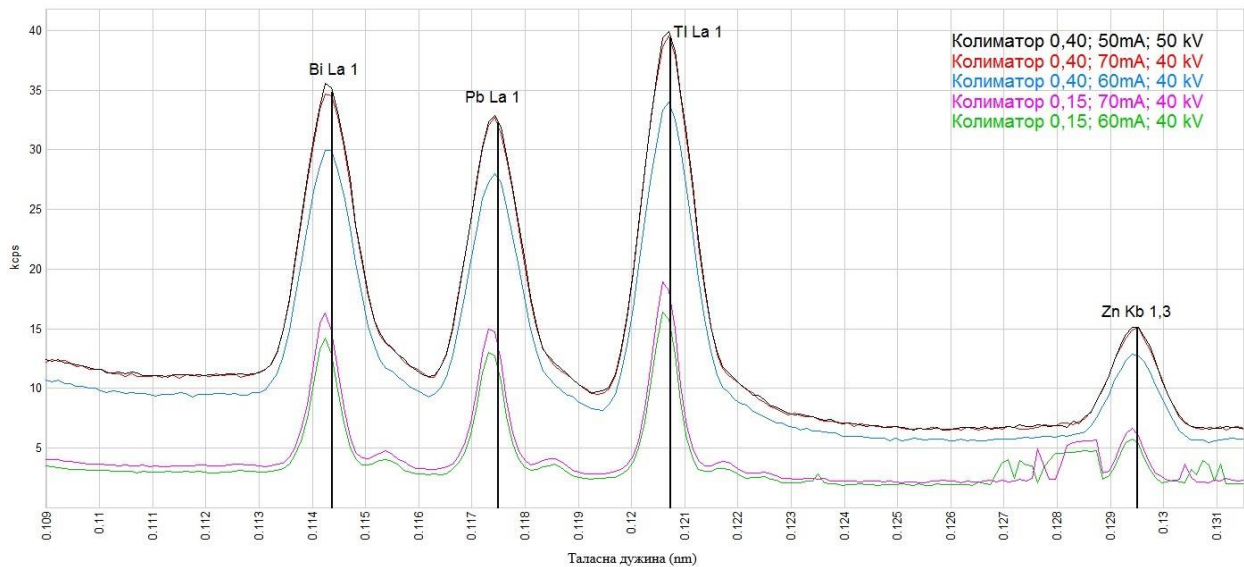
6.2.16. Бизмут, олово и талијум

У табели 6.16. приказани су интензитети позадине, позиције сигнала и пикова Bi, Pb и Tl у I_{cps} при варијацији аналитичких параметара. На слици 6.39. приказани су преклопљени квалитативни спектри Bi, Pb и Tl добијени коришћењем LiF220 кристала, SC детектора, комбинације напона од 40 и 50 kV, варијација ширине два колиматора и вредности јачине струје (50, 60 и 70 mA). На слици 6.40. приказани су исти преклопљени спектри као и на претходној слици, али у логаритамској расподели ординате.

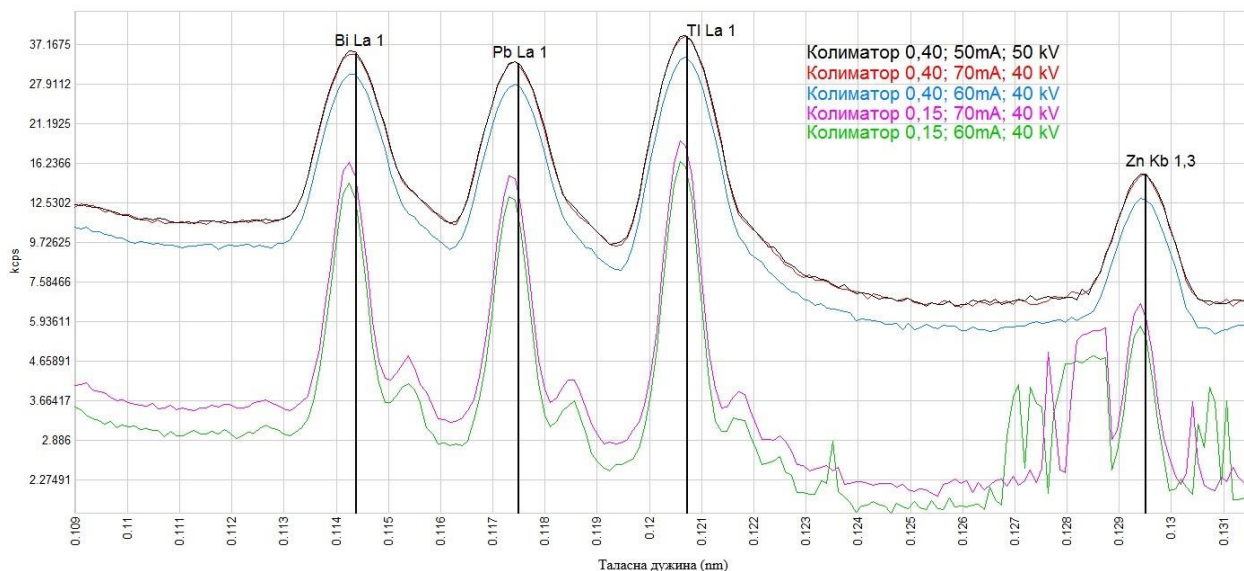
Табела 6.16. Интензитети позадине, позиције сигнала и пика (кcps) при различитим аналитичким параметрима за Bi, Pb и Tl

Елемент	Кристал	Колиimator	Детектор	Јачина струје, mA	Напон, kV	Интензитет позадине, кcps	Интензитет на позицији сигнала, кcps	Интензитет пика, кcps
Bi	LiF220	0,40	SC	50	50	10,93	35,64	24,71
		0,15	SC	60	40	2,99	14,30	11,31
		0,40	SC	60	40	9,13	30,17	21,04
		0,15	SC	70	40	3,44	16,47	13,03
		0,40	SC	70	40	10,78	34,81	24,03
Pb	LiF220	0,40	SC	50	50	9,43	33,02	23,58
		0,15	SC	60	40	2,10	13,18	11,08
		0,40	SC	60	40	8,17	28,15	19,98
		0,15	SC	70	40	2,62	15,05	12,43
		0,40	SC	70	40	9,58	32,97	23,38
Tl	LiF220	0,40	SC	50	50	8,46	39,98	31,52
		0,15	SC	60	40	2,25	16,47	14,22
		0,40	SC	60	40	6,96	34,14	27,18
		0,15	SC	70	40	2,70	19,02	16,32
		0,40	SC	70	40	8,39	39,75	31,37

Спектри Bi, Pb и Tl имају значајно веће интензитет у односу на претходна три испитана елемента иако се L_{α} линије користе као аналитичке. Аналитичке линије Bi, Pb и Tl су јако блиске и на основу спектара на сликама 6.39. и 6.40. могуће је уочити постојање преклапања са L_{β} линијама истих елемената. Како би се ови пикови раздвојили неопходно је коришћење 0,15 колиimatorа. Међутим, у таквом случају се добијају сигнали значајно мањег интензитета. Знајући да се ови тешки елементе обично у биљним узорцима налазе у јако ниским концентрацијама, јако је важно обезбедити такве услове да аналитички сигнал буде довољно интензиван како би одређивање имало задовољавајућу осетљивост. Када је анализа Bi, Pb и Tl у питању било би препоручљиво да се за потребе сваког конкретног истраживања емпиријски одреде оптимални аналитички параметри на основу присутне концентрације ових елемената у биљним узорцима.



Слика 6.39. Преклопљени квалитативни спектри Bi, Pb и Tl у нормалној распреди добијени употребом LiF220 кристала, SC детектора и различитих комбинација колиматора, јачине струје у mA и напона у kV: 0,40, 50 mA и 50 kV (црно), 0,40, 70 mA и 40 kV (црвено), 0,40, 60 mA и 40 kV (плаво), 0,15, 70 mA и 40 kV (розе), 0,15, 60 mA и 40 kV (зелено).

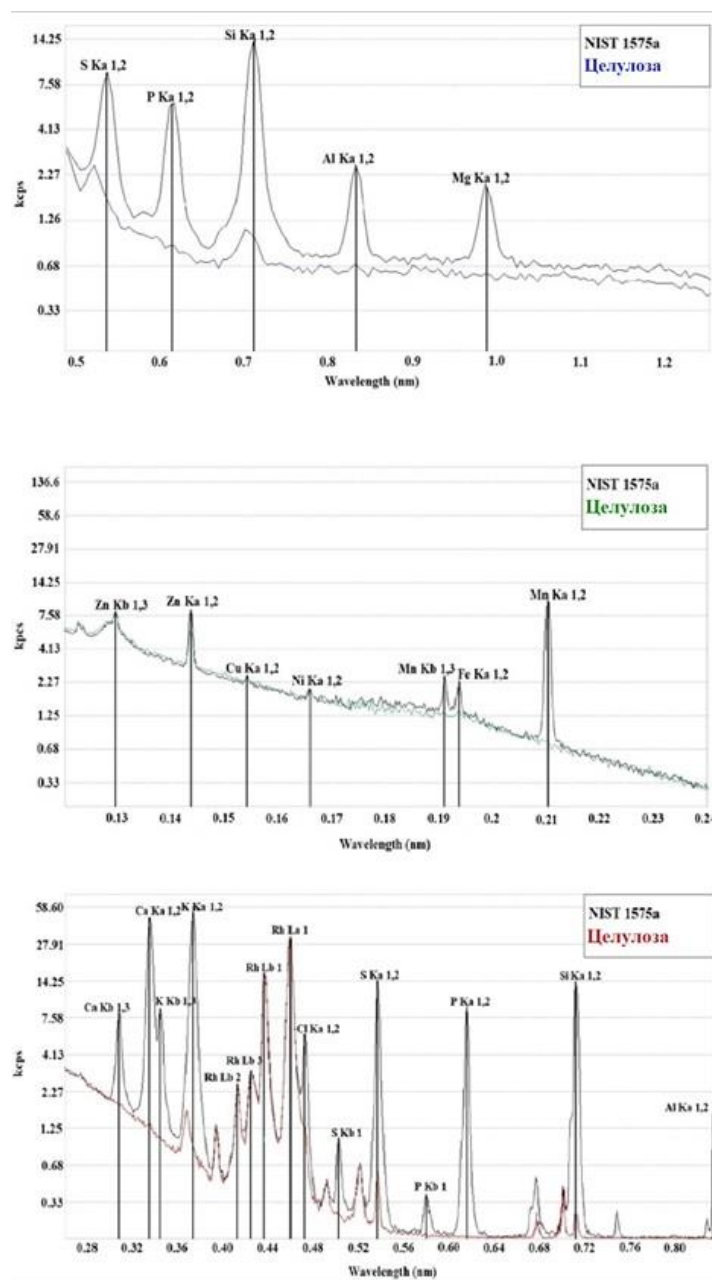


Слика 6.40. Преклопљени квалитативни спектри Bi, Pb и Tl у логаритамској распреди добијени употребом LiF220 кристала, SC детектора и различитих комбинација колиматора, јачине струје у mA и напона у kV: 0,40, 50 mA и 50 kV (црно), 0,40, 70 mA и 40 kV (црвено), 0,40, 60 mA и 40 kV (плаво), 0,15, 70 mA и 40 kV (розе), 0,15, 60 mA и 40 kV (зелено).

6.3. Емпиријска калибрација *WD-XRF* уређаја за анализу елемената у биљним узорцима помоћу синтетичких целулозних стандарда

Познато је да у рендгенској спектрометрији важно да матрикс калибрационих стандарда буде истоветан матриксу анализираних узорака (Chuparina and Gunicheva, 2003). Подударност матрикса целулозе са биљним матриксом је испитана преклапањем квалитативног спектра чисте целулозе и сертификованог референтног материјала иглица бора (*NIST SRM 1575a*), што је приказано на слици 6.41. Базне линије преклопљених квалитативних спектра су готово истог облика и интензитета.

Са квалитативних спектра на слици 6.41 се може видети да су аналитичке линије анализираних елемената адекватно одвојене и не подлежу значајним преклапањима. Могуће је видети да целулоза која је коришћена за припрему синтетичких стандардан не садржи нечистоће. Пикови који одговарају Zn и Cu потичу од носача узорка. Заменом коришћених носача неким који су сачињени од другог материјала било би могуће избећи појављивање ових пикова.



Слика 6.41. Поређење квалитативних спектра чисте целулозе и сертификованог референтног материјала иглица бора (NIST 1575a). Део слике А одговара LiF220 кристалу, део слике Б - AX03 кристалу, део В - PET кристалу. Ордината је приказана у логаритамској расподели како би се добијени пикови елемената заступљених у нижим концентрацијама адекватно видели.

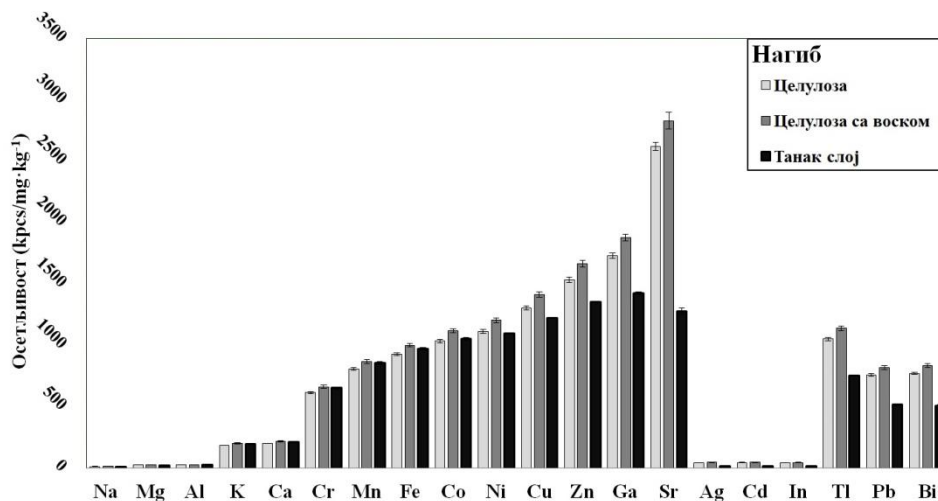
Део спектра између 0,37 и 0,49 nm садржи интерферирајуће линије које потичу од дискретног спектра линија Rh од кога је начињена анода рендгенске цеви. Уколико је неопходно одређивање елемената чије се карактеристичне линије налазе у поменутом делу спектра, јављање поменутих интерференци се може избећи коришћењем Cu филтера. Међутим, коришћење филтера утиче на осетљивост одређивања пар елемената тежих од Rh (у случају овог истраживања су то Ag, Cd, In).

6.3.1. Осетљивост методе

Осетљивост неког одређивања се може изразити преко нагиба калибрационе праве која подразумева зависност одговора инструмента у *kcps*. Осетљивост три испитане методе (Ц, ЦВ и ТС) представљена је у табели 6.17. Код све три методе Na, Mg и Al имају ниске осетљивости због смањеног приноса флуоресцентног зрачења и повећане апсорпције аналитичких карактеристичних линија које се дешава у матриксу узорка и самом инструменту. Следећа два елемента по атомском броју, K и Ca, имају значајно веће осетљивости у односу на претходна три елемента и овакав тренд се наставља редом за све елементе целе четврте периоде периодног система елемената. Разлог овако добре осетљивости елемента са атомским бројем између 20 и 40 је повољна комбинација пар фактора: ефикасне екситације, високог приноса флуоресцентног зрачења, ниске апсорпције карактеристичног секундарног зрачења, високе ефикасности рефлексије кристала и високе ефикасности детектора у анализираном опсегу таласних дужина (Bertin, 1978).

Као што је раније споменуто, елементи Ag, Cd и In имају нижу осетљивост због коришћења филтера примарног зрачења које умањује интензитет зрачења. Даље код одређивања елемената са већим атомским бројем осетљивост поново расте, али никада до нивоа елемената четврте периоде. Код елемената Tl, Pb и Bi осетљивост је поново ниска што је последица повећаног екситационог потенцијала и високог позадинског зрачења које поседује значајну количину расејаног зрачења. Још један разлог је то што се код ових елемената L линије користе као аналитичке, док њих карактеришу значајно нижи интензитети у поређењу са K линијама које се користе као аналитичке при одређивању лакших елемената.

Уколико сагледамо осетљивост три упоређене методе, може се уочити да не постоје разлике све до средине четврте периоде. Код одређивања елемената са великим атомским бројем (Ag, Cd, In) осетљивост ТЦ методе је само трећина вредности Ц и ЦВ метода. Дубина продирања рендгенског зрачења превазилази дебљину слоја узорка у пелету припремљеном за калибрацију ТС методе, па је осетљивост елемената са великом дубином продирања зрачења при одређивању мања. Осетљивост ЦВ методе је већа у односу на Ц методу. Разлог је додаток везивног средства који утиче на побољшавање физичких карактеристика пелета (обезбеђује се равније површине која се анализира) које га чине мање подложним утицају ефекта сенке (Orlić *et al.*, 2021).



Слика 6.42. Осетљивост Ц, ЦВ и ТС метода.

6.3.2. Опсег линеарности

Линеарност везе између интензитета зрачења и концентрације је могуће добро описати визуелним посматрањем калибрационих права, док је постојање линеарног модела могуће квантитативно потврдити високим вредностима коефицијената детерминације. У табели 6.17. су приказани коефицијенти линеарности R^2 , коефицијенти нагиба и одсечци на у-оси са придруженим стандардним девијацијама за три тестиране методе (Ц, ЦВ и ТС). Добијене високе вредности коефицијената детерминације додатно потврђују постојање линеарности код свих испитаних метода и елемената. Једини изузетак је Na, који је тешко квантификовати при концентрацијама мањим од $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Уочено је да стандард са највећом концентрацијом ($500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) одступа од калибрационе праве, али не производи резидуал већи од 10 %.

Код методе Ц, вредност R^2 варира између 0,9837 за Na до 0,9994 за Ca, али је већи од 0,9900 за све елементе (осим Na) и углавном је већи или близу 0,9990. Овакви резултати потврђују добру линеарност код свих испитиваних елемената у оквиру Ц методе.

Додатак везивног средства не утиче значајно на линеарност методе, нити на редослед којим вредност коефицијента линеарности опада у групи анализираних елемената. Изузетак је Na, и K у мањој мери, чији просечни R^2 износе 0,8171 и 0,9944. Девијације од типично високих вредности за ова два елемента могу бити последица трагова Na и K присутних у воску који се користи као везивно средство.

Стандарди коришћени за калибрацију ТС методе садрже значајно мање спајковане целулозе у односу на друге две методе, а самим тим и мање жељеног анализата. Поред тога, процедура припреме стандарда у танком слоју је компликованија и из тог разлога је очекивано да постоји негативан утицај на калибрацију. Међутим, коефицијенти R^2 су

занемарљиво нижи у односу на Ц и ЦВ методу. За све одређиване елементе коефицијенти детерминације су били бољи од 0,9900. Најслабија, али ипак добра линеарност је утврђена код Ag и In код којих су R^2 износили 0,9927 за Ag и 0,9911 за In. Ниже вредности коефицијента R^2 су узроковане применом филтера примарног зрачења приликом одређивања ових елемената.

Линеарност је током овог истраживања испитана у опсегу концентрација од 0 до $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, док одређивање горње границе линеарности није био предмет истраживања. Међутим, анализом сертифицираних референтних материјала листа парадајза (NIST SRM 1573a) и иглица бора (NIST SRM 1575a), код којих концентрације неких елемената (Mg, Ca и K) превазилазе калибрациони опсег метода, може се рећи да све испитане методе могу тачно и прецизно квантификовати ове елементе. Резултати анализе СРМ потврђују да је линеарност присутна и при одређивању јако високих концентрација одређених елемената (Kallithrakas-Kontos *et al.*, 2016) (погледај одељак 6.3.5.4.).

Табела 6.17. Коэффициент детерминације R^2 , нагиб и одсечак на у-оси са стандардним девијацијама (СД) Ц, ЦВ и ТС метода

Елемент	Целулоза					Целулоза са воском					Танак слој				
	R^2	Нагиб \pm СД		Одсечак \pm СД		R^2	Нагиб \pm СД		Одсечак \pm СД		R^2	Нагиб \pm СД		Одсечак \pm СД	
Na	0,9837	11,3	0,4	1,38	0,01	0,8171	14,1	0,5	1,44	0,02	0,9940	11,55	0,07	1,394	0,88005
Mg	0,9951	23,3	0,7	1,51	0,02	0,9960	24,3	0,9	1,55	0,01	0,9956	22,3	0,1	1,525	0,002
Al	0,9958	24,1	0,3	0,04	0,02	0,9972	25,2	0,9	0,048	0,005	0,9950	24,3	0,3	0,035	0,004
K	0,9992	184	1	0,55	0,03	0,9944	198	6	0,76	0,08	0,9950	195	3	0,59	0,03
Ca	0,9994	200	2	0,52	0,03	0,9994	215	5	0,60	0,02	0,9956	212	3	0,58	0,03
Cr	0,9992	613	6	2,18	0,03	0,9988	661	12	2,33	0,02	0,9968	652	9	2,2	0,1
Mn	0,9990	807	10	3,37	0,04	0,9987	869	15	3,59	0,02	0,9967	854	11	3,4	0,1
Fe	0,9986	926	11	5,32	0,03	0,9983	1000	15	5,61	0,02	0,9965	969	11	5,3	0,1
Co	0,9982	1035	14	5,77	0,05	0,9980	1119	17	6,10	0,03	0,9965	1054	10	5,7	0,2
Ni	0,9977	1114	16	6,44	0,05	0,9975	1205	18	6,769	0,009	0,9964	1096	6	6,3	0,2
Cu	0,9970	1305	18	8,35	0,05	0,9970	1412	21	8,79	0,01	0,9964	1224	4	8,1	0,3
Zn	0,9961	1535	22	10,80	0,05	0,9963	1664	27	11,35	0,04	0,9963	1352	4	10,3	0,3
Ga	0,9953	1729	22	14,45	0,06	0,9958	1879	29	15,14	0,03	0,9960	1424	9	13,6	0,4
Sr	0,9946	2621	33	43,1	0,3	0,9953	2832	69	43,9	0,4	0,9947	1276	28	40,5	0,4
Ag	0,9989	43,8	0,3	0,682	0,003	0,9967	46	2	0,67	0,01	0,9927	15,8	0,5	0,649	0,006
Cd	0,9983	43,7	0,9	0,630	0,008	0,9969	46	2	0,61	0,01	0,9942	15,0	0,5	0,599	0,006
In	0,9989	41,5	0,8	0,82	0,01	0,9967	44	2	0,80	0,01	0,9911	14,3	0,4	0,789	0,002
Tl	0,9946	1051	14	19,22	0,08	0,9950	1138	20	20,32	0,02	0,9955	752	7	18,7	0,3
Pb	0,9938	755	11	21,11	0,07	0,9943	817	14	22,35	0,05	0,9951	516	7	20,8	0,2
Bi	0,9939	771	11	23,41	0,07	0,9945	834	16	24,75	0,06	0,9942	507	9	23,0	0,2

6.3.3. Лимит детекције и лимит квантификације

Табела 6.18. садржи детекционе (ДЛ) и квантификационе (КЛ) лимите Ц, ЦВ и ТС метода. Могуће је уочити да лакши елементи, као што су Na, Mg, Al, K и Ca, имају ниже ДЛ у односу на остале одређиване елементе. Када је у питању ЦВ метода, детекциони лимит ових елемената је у опсегу од 2,3 до 47 mg·kg⁻¹. Прелазни метали имају детекционе лимите мање од 1 mg·kg⁻¹, док Fe и Ni показују најниже вредности ДЛ (0,24 и 0,23 mg·kg⁻¹). Елементи код којих је неопходно коришћење филтера примарног зрачења (Ag, Cd и In) имају значајно више ДЛ, али су вредности и даље релативно ниске. Најтеже одређивани елементи (Tl, Pb и Bi) имају благо повишене детекционе лимите у поређењу са детекционим лимитима прелазних метала.

Све три методе показују сличне трендове у оквиру детекционих и квантификационих лимита. ЦВ и Ц методе имају више сличности и вредности које су најчешће од 0,5 до 1 mg·kg⁻¹. У односу на ове две методе, ТС метода има за пар редова величина веће ДЛ, осим у случају елемената Na, Mg, Al, K где је ТС метода заправо показала боље перформансе. Дубина продирања рендгенског зрачења при одређивању тежих елемената је јако велика (често износи пар cm) и у случају ТС методе превазилази дебљину слоја у којој је нанет стандард целулозе. Знатно дубље продирање рендгенског зрачења при одређивању тежих елемената негативно утиче на детекционе и квантификационе лимите ових елемената код ТС методе.

Табела 6.18. Лимити детекције (ЛД) и лимити квантификације (ЛК) за Ц, ЦВ и ТС методе у (mg·kg⁻¹)

Елементи	Целулоза		Целулоза са воском		Танак слој	
	ЛД	ЛК	ЛД	ЛК	ЛД	ЛК
Na	32	107	47	157	13	43
Mg	26	87	16	54,8	2,7	8,9
Al	22	75	6,1	20,2	4,7	16
K	5,0	17	11	38,0	3,9	13
Ca	4,8	16	2,3	7,7	3,7	12
Cr	1,7	5,6	1,1	3,5	4,7	16
Mn	1,4	4,6	0,59	2,0	5,0	17
Fe	1,0	3,4	0,46	1,6	4,5	15
Co	1,4	4,5	0,71	2,4	5,2	17
Ni	1,4	4,6	0,23	0,78	5,5	18
Cu	1,1	3,7	0,24	0,80	6,5	22
Zn	1,1	3,5	0,68	2,3	7,0	23
Ga	0,97	3,2	0,55	1,8	7,6	25
Sr	3,2	11	4,0	13,2	10	34
Ag	1,9	6,3	8,8	29,3	11	36
Cd	5,7	19,07	8,8	29,5	12	41
In	8,4	28	9,4	31,3	3,2	11
Tl	2,2	7,4	0,46	1,6	10	34
Pb	2,6	8,7	1,9	6,4	9,8	33
Bi	2,8	9,3	2,0	6,7	13	44

6.3.4. Прецизност: Поновљивост и унутарлабораторијска репродуктивност (УЛР)

Табела 6.19. садржи вредности поновљивости и унутарлабораторијске репродуктивности (УЛР) на ниским ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) и високим ($500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) концентрационим нивоима за три испитане методе (Ц, ЦВ и ТС).

Табела 6.19. Поновљивост (%) и унутарлабораторијска репродуктивност (УЛР, %) на ниским ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) и високим ($500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) концентрационим нивоима.

	Ц метода				ЦВ метода				ТС метода			
	Поновљивост		УЛР		Поновљивост		УЛР		Поновљивост		УЛР	
	Ниска	Висока	Ниска	Висока	Ниска	Висока	Ниска	Висока	Ниска	Висока	Ниска	Висока
Na	27,8	3,8	318	15,5	19,7	1,4	/	4,7	39,5	1,7	32,6	3,6
Mg	3,0	2,1	5,0	30,5	3,6	1,4	4,2	6,1	8,6	1,8	24,4	2,9
Al	12,6	2,6	3,5	28,7	2,0	1,7	9,2	6,0	10,5	2,4	10,4	1,7
K	2,5	1,2	1,0	17,0	0,0	0,9	4,2	4,6	4,3	1,2	15,1	1,8
Ca	2,5	1,2	5,0	14,9	0,5	0,8	9,2	4,0	0,6	1,3	9,2	2,2
Cr	0,5	0,9	10,0	9,4	0,5	0,8	3,5	2,5	1,2	0,8	3,5	1,1
Mn	1,5	1,0	7,6	8,9	0,0	0,7	0,0	2,4	1,9	0,8	3,5	0,7
Fe	2,0	0,8	7,6	8,1	0,0	0,6	0,0	2,1	1,9	0,8	0,0	0,6
Co	2,0	0,8	5,0	7,6	1,0	0,5	3,5	2,1	1,2	0,6	3,5	0,3
Ni	1,5	0,8	5,0	6,1	1,5	0,5	3,5	1,8	1,9	0,6	3,5	0,3
Cu	1,5	0,7	2,9	5,9	0,5	0,5	0,0	1,7	0,6	0,5	3,5	0,7
Zn	9,1	0,8	2,9	8,0	7,1	0,6	0,0	1,7	7,4	0,7	2,3	1,4
Ga	2,0	0,7	2,9	5,6	1,5	0,5	0,0	1,5	1,9	0,4	6,0	1,7
Sr	1,0	0,5	2,9	5,6	1,0	0,1	6,9	2,1	3,1	0,4	19,3	3,3
Ag	3,5	0,7	2,9	7,1	7,1	0,1	4,2	3,6	19,1	0,3	35,6	3,7
Cd	3,5	0,2	3,5	6,6	1,5	0,5	8,5	3,3	2,5	0,3	33,4	4,4
In	2,5	0,4	29	7,9	7,6	0,4	4,2	3,5	17,9	1,1	46,0	3,3
Tl	2,0	0,8	2,9	5,5	0,5	0,4	3,5	1,7	1,9	0,4	15,9	2,2
Pb	2,0	0,6	5,0	5,8	1,0	0,4	6,0	1,7	2,5	0,2	25,0	2,5
Bi	2,0	0,8	2,9	5,9	3,0	0,5	6,9	1,7	5,6	0,2	31,2	2,8

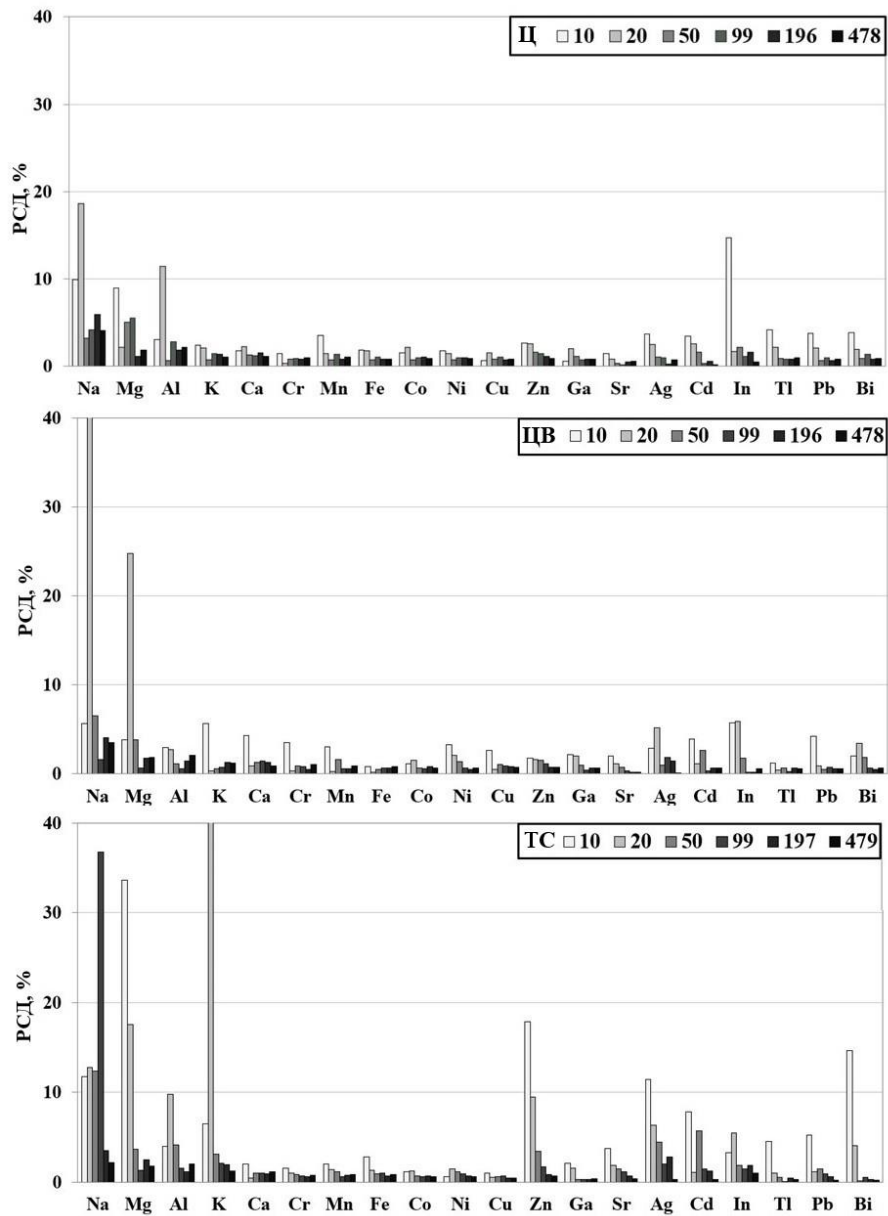
Елементи четврте периоде периодног система елемената су имали најбоље УЛР вредности. У неким случајевима су вредности релативних стандардних девијација биле једнаке нули. Очекивано, додатак везивног средства унапређује поновљивост, посебно при одређивању виших концентрација.

УЛР вредности ТС методе су биле на сличном нивоу у поређењу са друге две методе, осим у случају одређивања елемента лакших од Са и тежих од Sr, уколико су њихове концентрације ниске ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Овакви резултати показују да поступак ручног nanoшења узорка у танком слоју на површину носача од борне киселине не утиче у већој мери на перформансе ТС методе.

УЛР вредности Ц и ЦВ метода при концентрационом нивоу од $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ су биле сличне или горе, у поређењу са $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ нивоом. Овај тренд је најизраженији при одређивању лаких елемената Ц методом. Такође је уочено да су вредности поновљивости и УЛР биле много сличније на нижим концентрационим нивоима у односу на веће концентрационе нивое код свих испитаних елемената. Уколико посматрамо високе концентрације, УЛР вредности су вишеструко веће од вредности поновљивости, што може бити последица неадекватне хомогенизације током процеса спајковања. Аутоматизација процеса припреме би унапредила хомогеност припремљених стандарда. Како се лаки елементи махом одређују из површинских слојева узорка, хомогеност је јако битна особина при њиховом мерењу. При одређивању тежих елемената, рендгенско зрачење продире дубље, па хомогеност узорка нема пресудан значај за тачност одређивања.

Разумевање промене поновљивости са променом концентрације анализата је јако важно због адекватног дефинисања детекционих лимита. На слици 6.43. је приказана промена поновљивости у функцији концентрације за све анализиране елементе. Поновљивост је лоша код јако ниских концентрација (испод $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) лаких елемената (Na, Mg, Al). Сличан тренд је могуће уочити при одређивању тежих елемената, посебно уколико се током анализе користе филтери примарног рендгенског зрачења. ЦВ метода показује најбоље перформансе, док ТС метода показује најлошије, мада разлике међу методама нису значајне.

Све испитане методе показују одличну поновљивост, која је најчешће испод 1 %. Додатак везивног средства побољшава поновљивост, посебно при одређивању тежих елемената. Чак и при јако ниским концентрацијама вредност поновљивости ретко прелази 5 % код већине елемената.



Слика 6.43. Поновљивост (РСД, %) у функцији различитих концентрација ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) код Целулоза (Ц) методе, Целулоза са воском (ЦВ) методе, и Танак слој (ТС) методе.

6.3.5. Тачност

У претходној дискусији о осетљивости, прецизности, лимитима детекције и квантификације, упоређене су Ц, ЦВ и ТС методе. Узимање Ц методе у разматрање је имало практичну улогу у сагледавању потенцијалних негативних утицаја додатка везивног средства, као и промене својстава пелета услед различитих начина припреме узорка. Ипак, примена Ц методе је јако ограничена јер би за њену употребу било неопходно узорке за анализу припремати само од биљног материјала. Пелет направљен само од биљног материјала често није довољно стабилан и има лошије физичке карактеристике и геометрију анализираних површине. Међутим, безстандардна метода UniQuant (УК) има потенцијал за практичну примену као скрининг метода и детаљна процена тачности једне овакве безстандардне методе при анализи биљног материјала је изузетно значајна.

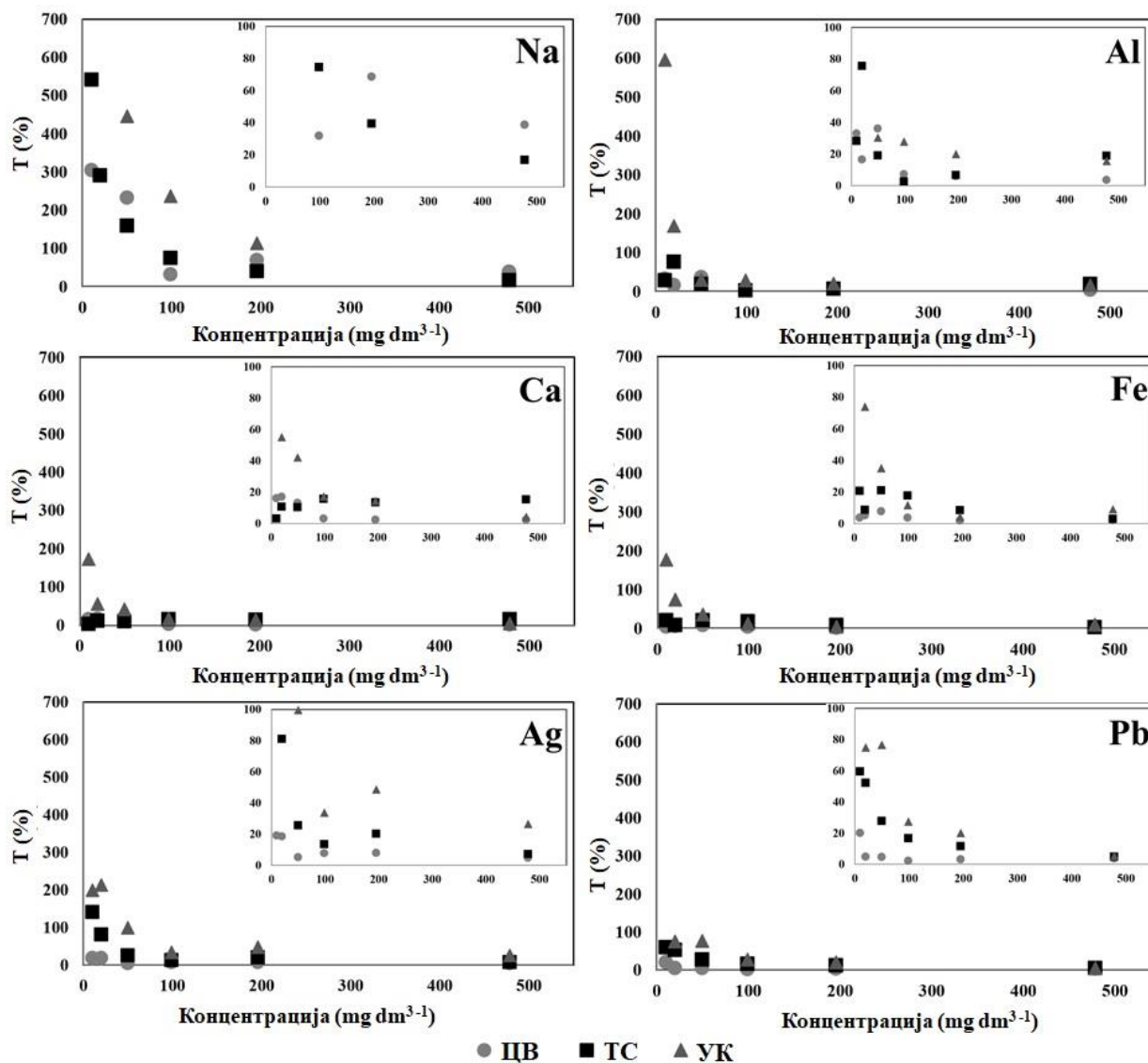
6.3.5.1. Карактеризација тачности на основу анализе синтетичког целулозног референтног материјала

На слици 6.44. приказане су вредности тачности измерених концентрација испитиваних целулозних стандарда. Приказани елементи су репрезентативни за све испитиване елементе.

Приликом поређења ЦВ, ТС и УК метода, могуће је приметити да ЦВ метода има највећу тачност, док УК метода има најмању. Овакав резултат је очекиван с обзиром да је УК безстандардна и семиквантитативна метода. Међутим, са повећањем концентрације, све три методе су имале Т вредност мању од 25 %, најчешће мања од 5 %, па је могуће рећи да разлике између три методе постају незнатне са повећањем концентрације.

УК метода има мању тачност при одређивању концентрација мањих од 20 и 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, док су методе ЦВ и ТС су показале јако добру тачност чак и при јако ниским концентрацијама. Тренд смањења тачности је у мањој мери изражен при одређивању елемената са малим атомским бојем, док је најзначајније смањење тачности уочено код тежих елемената од П1.

Код раније дискусије аналитичких параметара је уочено да коришћење филтера примарног зрачења негативно утиче на перформансе испитаних метода. Може се закључити да употреба филтера негативно утиче и на тачност елемената за чије је одређивање неопходна њихова употреба (Ag, Cd и In). Коришћење филтера примарног зрачења доводи до нетачних резултата уколико су концентрације Ag, Cd и In мање од 40 или 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Као и у претходним случајевима, разлог је значајно смањење интензитета примарног зрачења услед коришћења филтера.



Слика 6.44. Т вредности (једначина 4.3.) изражена за различите концентрационе нивое. Приказани елементи су репрезентативни за теже елементе (Pb), елементе који захтевају примену филтера примарног рендгенског зрачења (Ag), прелазне метале (Fe), лаке елементе (Na, Al и Ca).

Када је одређивање Na у питању, тачност је била очекивано јако лоша код свих метода, чак и уколико је концентрација већа од 100 mg·kg⁻¹. Тачност је била значајно боља код одређивања осталих лаких елемената, Mg, Al, K и Ca. Резултати су показали да Ca може бити тачно одређен чак и уколико се налази у најнижој испитаној концентрацији од 10 mg·kg⁻¹, док је код осталих лаких елемената тачно одређивање било могуће на концентрацијама већим од 50 mg·kg⁻¹.

Код анализе елемената тежих од Cu, посебно код елемената за које се користе филтери примарног рендгенског зрачења (Ag, Cd, In), тачност је била мања. За ову групу елемената, ЦВ метода је достигала Т вредност < 25 % уколико би анализирале

концентрације биле између 15 и 20 mg·kg⁻¹. Да би се постигла слична тачност употребом ТС методе, неопходне су биле концентрације између 40 и 80 mg·kg⁻¹, док су за УК методу биле неопходне концентрације веће од 100 mg·kg⁻¹. Најтежи испитивани елементи (Tl, Pb и Bi) су само применом ЦВ методе дали вредности тачности сличне прелазним металима.

6.3.5.2. Карактеризација тачности на основу линеарне регресије

На основу израчунатих параметара линеарне регресије измерених вредности концентрација елемената у синтетичким целулозним стандардима уцртаних наспрам референтних вредности додатно је окарактерисана тачност. Вредности параметара линеарне регресије, нагиба (a) и квадрата Пирсоновог коефицијента (R²), за ЦВ, ТС и УК методу су приказани у табели 6.20. Анализа линеарне регресије пружа могућност свеобухватне карактеризације тачности, за разлику од T вредности која може на добар начин описати тачност одређивања само на једном концентрационом нивоу.

Добијени резултати указују на постојање системске грешке код све три методе (ЦВ, ТС и УК), али и на системску грешку код УК методе. Вредности квадрата Пирсонових коефицијената (R²) су већи од 0,9900 за све испитиване елементе, осим Na. ЦВ метода показује већу прецизност у односу на ТС и УК методе. Код ЦВ методе R² износи 0,9999 код већине одређиваних елемената

УК метода има тенденцију да прецењује концентрације лаких елемената, док са повећањем атомског броја од Na ка К, коефицијенти правца брзо достижу идеалну вредност (a = 1). Развијање благо позитивне системске грешке је могуће уочити за елементе теже од Со, док се не уочава код тежих елемената (Tl, Pb и Bi).

Табела 6.20. Нагиб (а) и квадрат Пирсоновог коефицијента (R^2) добијени из линеарне регресије која је примењена на зависност измерених и очекиваних вредности

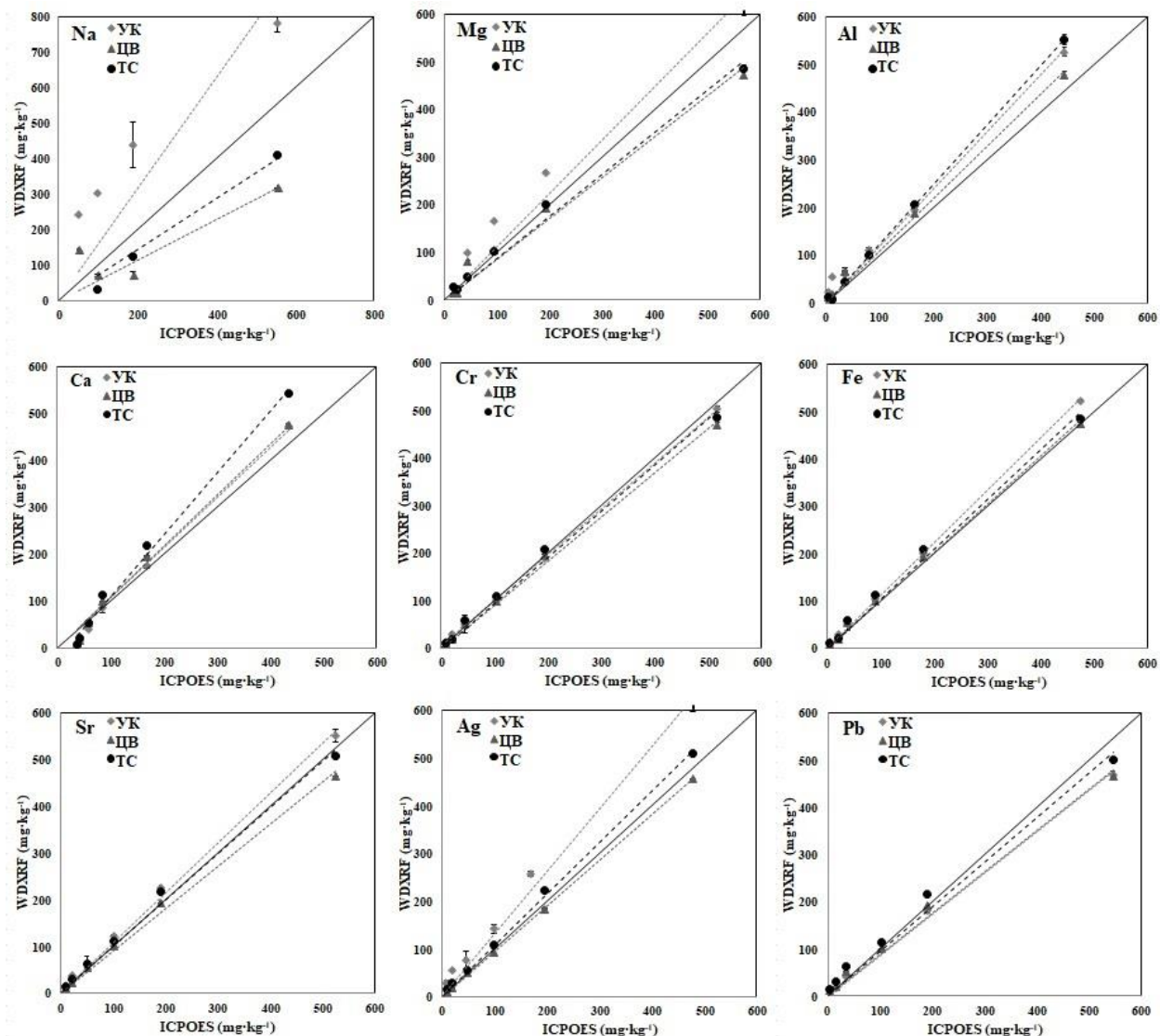
Елемент	а			R ²		
	ЦВ	ТС	УК	ЦВ	ТС	УК
Na	0,6433	0,8100	1,7906	0,6149	0,9462	0,8756
Mg	1,0155	1,0155	1,2937	0,9981	0,9981	0,9848
Al	0,9983	1,1309	1,0908	0,9975	0,9957	0,9913
K	0,9458	0,9681	1,0469	0,9941	0,9944	0,9966
Ca	0,9949	1,1316	0,9700	0,9997	0,9999	0,9964
Cr	0,9873	1,0291	1,0413	0,9998	0,9987	0,9980
Mn	0,9969	1,0274	1,1981	0,9999	0,9985	0,9988
Fe	0,9936	1,0311	1,0855	0,9998	0,9980	0,9985
Co	0,9930	1,0331	0,9745	0,9999	0,9983	0,9986
Ni	0,9926	1,0370	1,0982	0,9998	0,9983	0,9989
Cu	0,9905	1,0391	1,1168	0,9998	0,9984	0,9989
Zn	0,7472	1,0011	1,1017	0,9434	0,9988	0,9988
Ga	1,0231	1,0486	0,9744	0,9926	0,9987	0,9861
Sr	0,9749	1,0683	1,1542	0,9995	0,9988	0,9982
Ag	0,9550	1,0788	1,2873	0,9999	0,9983	0,9929
Cd	0,9558	1,0852	1,2507	0,9995	0,9968	0,9927
In	1,0094	1,0748	1,1528	0,9975	0,9914	0,9937
Tl	0,9842	1,0537	1,0515	0,9997	0,9988	0,9969
Pb	0,9761	1,0588	0,9694	0,9998	0,9979	0,9981
Bi	0,9823	1,0779	0,9854	0,9997	0,9974	0,9987

6.3.5.3. Карактеризација тачности на основу поређења резултата *WD-XRF* и *ICP-OES*

Како би се додатно испитала тачност *XRF* метода, упоређени су резултати анализа синтетичких целулозних референтних материјала. На слици 6.45 приказано је поређење *WD-XRF* и *ICP-OES* техника за изабране елементе који су представници за целу анализирану групу. Аликвоти спајкованог целулозног референтног материјала су разорени и анализирани помоћу *ICP-OES* технике, док је тачност *ICP-OES* одређивана контролисано анализом сертифицикованих референтних материјала.

ICP-OES и све три *WD-XRF* методе (ЦВ, ТС и УК) су биле одлично корелисане при анализи елемената четврте периоде. Када је одређивање лаких елемената у питању, ТС метода је више склона системској грешки у односу на ЦВ методу. Ни једна од ове две методе није погодна за одређивање натријума.

Метода УК показује позитивну системску грешку при одређивању лаких елемената као и при одређивању елемената који захтевају употребу филтера примарног зрачења током анализе (Ag, Cd и In). Системска грешка је најизраженија код Na и значајно опада како расте атомски број елемента (Mg и Al).



Слика 6.45. Поређење *ICP-OES* и *WD-XRF* резултата мерења синтетичких целулозних стандарда.

6.3.5.4. Карактеризација тачности на основу мерења сертифициваног референтног материјала (CPM)

Табела 6.21. садржи концентрације елемената добијених мерењем два сертифицивана референтна материјала (листа парадајза (NIST SRM 1573a) и иглица бора (NIST SRM 1575a)) и Т вредности која приказује доприносе системске и случајне грешке (једначина 4.3.).

Табела 6.21. Вредности тачности (Т) сертификованих референтних материјала листа парадајза (*NIST SRM 1573a*) и иглица бора (*NIST SRM 1575a*) добијених помоћу три различите XRF методе

Иглице бора					Лист парадајза				
Елемент	Референтна концентрација (mg·kg ⁻¹)	Т (%)			Елемент	Референтна концентрација (mg·kg ⁻¹)	Т (%)		
		ЦВ	ТС	УК			ЦВ	ТС	УК
Na	63	97,9	75,1	585	Na	136	106	577	501
Mg	1060	22,7	10,5	20,6	Mg	12000	29,6	11,3	18,7
Al	580	12,8	17,7	26,1	Al	598	21,6	22,1	31,2
K	4170	13,8	4,9	19,3	K	27000	37,7	29,1	12,0
Ca	2500	7,3	7,2	13,4	Ca	50500	43,9	35,4	4,4
Mn	488	6,7	4,0	29,8	Mn	246	59,1	63,3	20,5
Fe	46	6,9	5,3	18,8	Fe	368	60,4	63,0	5,9
Sr	Није сертиф.	/	/	/	Sr	85	62,6	193	27,6

Тачност је била задовољавајућа за све анализиране елементе СРМ иглица бора (осим за Na). Методе ЦВ и ТС показују значајно бољу тачност у односу на УК методу. Узимајући у обзир да УК метода има семиквантитативни карактер, дала је резултате задовољавајућег квалитета. Иако су концентрације неких елемената веће од највише концентрације калибрационог целулозног стандарда, измерене концентрације ових елемената су и даље задовољавајуће тачности и овакви резултати потврђују јако широк опсег линеарности XRF метода.

Резултати анализе СРМ листа парадајза показали су задовољавајућу, али ипак мању тачност у односу на анализу СРМ иглица бора. Важно је нагласити да СРМ листа парадајза има захтевнији матрикс с обзиром да су елементи као што су Ca, Al, Mg и Si заступљени у високим концентрацијама (од 1 до 5 %). За тачну анализу овако захтевног матрикса би било неопходно направити посебну серију калибрационих стандарда који одговарају матриксу са изразито високим концентрацијама одређених елемената. Таквим поступком би се узеле у обзир све спектралне интерференце до којих би могло доћи (промена базне линије, ефекат повећања, итд.).

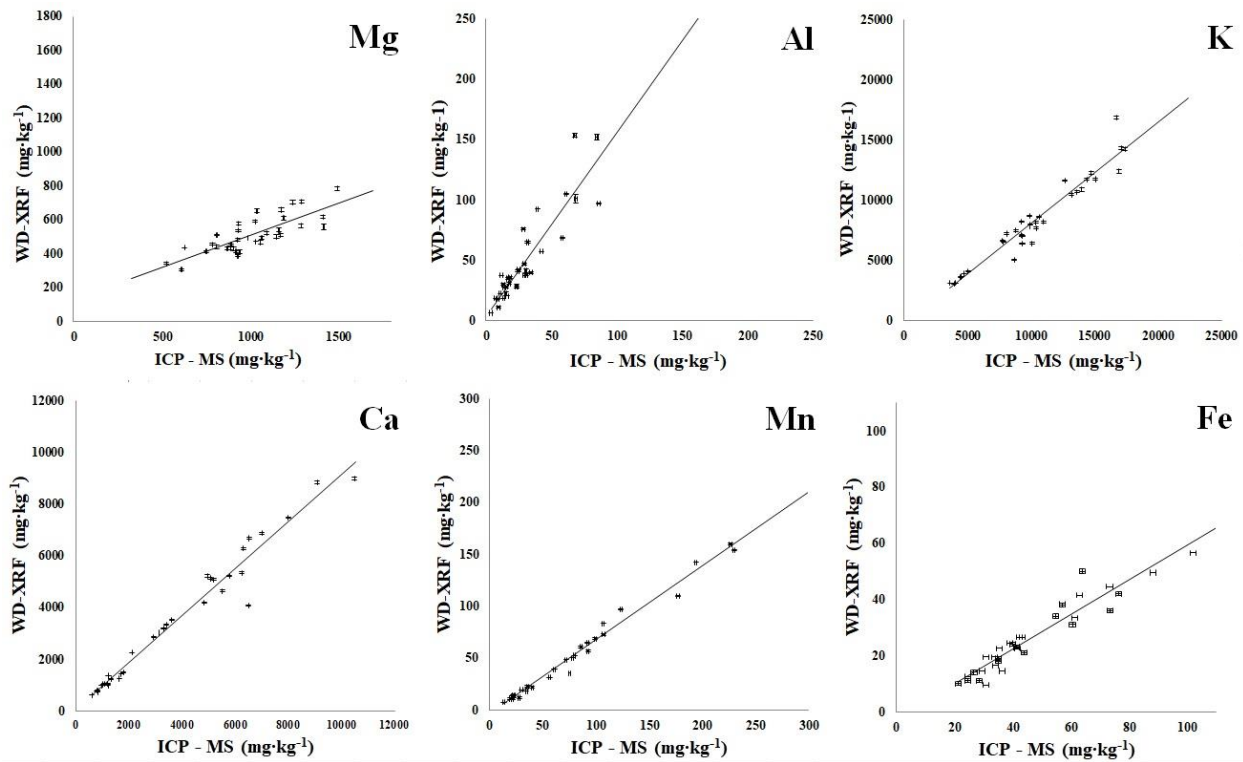
Тачност УК методе је била јако слична код оба анализирана СРМ узорка, што потврђује да је UniQuant софтвер специјализован да се адекватно носи са различитим концентрационим нивоима и интерелементарним интерференцама.

6.3.5.5. Карактеризација тачности на основу анализе реалних узорака

На самом крају је тачност *XRF* метода испитана мерењем концентрација елемената у реалним узорцима. У ту сврху су помоћу *WD-XRF* и *ICP-MS* техника измерене концентрације елемената у 33 узорка иглица четинара и добијене концентрације су упоређене.

За потребе *ICP-MS* анализе, биљни узорци су разорени у трипликату и аналитичка процедура је имала поуздан контролни програм (мерење одступања стандарда на два концентрациона нивоа). Из тог разлога се сматра да су резултати добијени овим аналитичким поступком и употребом *ICP-MS* технике поуздани и тачни, што их чини погодним за поређење са *WD-XRF* методом.

Резултати су упоређени посматрањем линеарне регресије добијене из поређења вредности концентрација добијених помоћу обе технике (слика 6.46.). Статистички параметри линеарне регресије, коефицијент корелације (R) и коефицијент нагиба (a), су приказани у табели 6.22.



Слика 6.46. Поређење концентрација добијених помоћу ЦВ методе и *ICP-MS*.

Корелација између ЦВ и *ICP-MS* је била највиша при одређивању Са, К, Fe и Mn ($0,95 < R < 0,99$ док су мерења применом ове две методе била јако усаглашена и код лакших елемената ($0,80 < R < 0,97$). Једини изузетак је био Na, али је нејасно да ли то последица ниске концентрације или неадекватности ЦВ методе.

Важно је нагласити да су концентрације неких макро елемената превазилазиле највишу концентрацију калибрационог стандарда ЦВ методе, и упркос томе, није било негативних утицаја на усаглашеност измерених вредности са *ICP-MS* методом. Резултати су потврдили да ЦВ и УК метода имају добар опсег линеарности чак и када измерене концентрације превазилазе концентрациони опсег употребљених калибрационих стандарда.

Табела 6.22. Статистички параметри линеарне регресије поређења ЦВ и УК метода са *ICP-MS* техником. R – коефицијент корелације, а – нагиб, M - медијана *ICP-MS* мерења

Елемент	УК и <i>ICP-MS</i>		ЦВ и <i>ICP-MS</i>		M ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
	a	R	a	R	
Na	1,38	0,8192	-0,07	0,0883	10,7
Mg	0,80	0,6977	0,38	0,8001	986
Al	2,87	0,9157	1,52	0,9061	29,3
K	1,32	0,8444	0,84	0,9680	9883
Ca	1,33	0,8665	0,91	0,9842	3128
Mn	1,42	0,8720	0,71	0,9923	75,3
Fe	1,89	0,9204	0,62	0,9495	41,3
Sr	0,97	0,9234	0,73	0,8006	5,90
P	0,87	0,9042	/	/	2953

При поређењу *ICP-MS* и УК, усаглашеност ових метода је била гора у односу на ЦВ методу, али и као таква добра ($0,70 < R < 0,92$). С обзиром да је УК безстандардна метода, поређење је било могуће проширити на елементе који нису били укључени приликом припреме спајкованих целулозних стандарда за формирање ЦВ методе. Такав елемент је био фосфор. Резултати су показали да је УК одређивање фосфора прилично тачно ($a = 0,87$; $R = 0,9042$).

Анализа коефицијента нагиба указује да УК метода има тенденцију да прецењује концентрације већине испитаних елемената, док ЦВ метода има тенденцију да их потцењује. Такви резултати указују на постојање системске грешке код обе методе, само је она различитог знака. Међутим, овако настале системске грешке могу лако бити отклоњене с обзиром да јако добра корелација између *ICP-MS* и *XRF* мерења указује на могућност лаког предвиђања грешке и њене квантификације.

6.4. Анализа реалних биљних узорака и поређење са другим спектрометријским техникама

Анализирани узорци четина припадају различитим биљним врстама и потичу из различитих средина (урбаних и руралних), па су елементи у њима присутни у јако широком концентрационом опсегу. У табелама 6.23. и 6.24. је приказана сумирана дескриптивна статистика (минимална и максимална вредност, медијана, аритметичка средина (АР), стандардна девијација (СД), медијана релативног односа (РР %) и број узорака у којима је измерен испитивани елемент (н)) концентрације елемената одређених употребом различитих аналитичких техника.

Табела 6.23. Дескриптивна статистика концентрације елемената измерених помоћу различитих аналитичких техника: минимум у mg kg^{-1} , максимум у mg kg^{-1} , медијана у mg kg^{-1} , аритметичка средина (АР) у mg kg^{-1} , стандардна девијација (СД) у mg kg^{-1} , медијана релативног односа (РР %) у % и број узорака у којима је измерен испитивани елемент (н)

	<i>ICP-MS</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ	<i>ICP-MS</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ
	Na					Mg				
минимум	1,8	2,4	18,3	229,5	0,5	527,7	414,1	185,0	528,5	304,4
максимум	1840,6	1633,5	2160,0	1815,0	216,5	1812,4	1494,5	1740,0	1770,0	914,9
медијана	13,6	83,8	39,3	384,3	91,3	1030,2	854,2	1120,0	1055,0	509,4
АР	83,7	144,5	135,9	434,8	87,3	1051,1	872,1	1084,5	1022,7	524,9
СД	266,8	252,3	359,6	245,9	45,8	256,7	219,0	282,9	303,0	116,2
РР %*	100	359	322	2210	473	100	84	105	96	50
н	49	41	36	46	46	49	35	39	48	49
	Al					K				
минимум	3,9	2,4	12,2	16,5	6,6	3334	1591	2700	3285	2475
максимум	256,0	324,7	297,0	545,5	416,1	20011	5722	20800	29500	16901
медијана	30,8	30,5	38,9	77,3	47,1	9896	3555	8300	13100	7488
АР	51,0	46,9	62,6	129,3	90,1	10089	3673	8549	13175	7809
СД	54,2	54,7	63,7	121,2	91,7	4434	1117	3970	6134	3790
РР %*	100	90	130	308	174	100	36	84	135	81
н	49	47	39	46	49	49	40	39	48	49
	Ca					P				
минимум	618	425	370	806	636	876	/	/	681	/
максимум	17690	13093	16200	22200	16348	5646	/	/	5540	/
медијана	3620	2513	3100	4548	3347	2977	/	/	2418	/
АР	4297	3266	4231	6319	3894	2948	/	/	2635	/
СД	3448	2904	3458	5196	3172	1405	/	/	1321	/
РР %*	100	74	101	167	97	100	/	/	92	/
н	49	49	39	48	49	49	/	/	48	/

* Вредност медијане релативног односа (%) је израчуната као количник концентрације елемента измерена помоћу различитих аналитичких техника и концентрације измерене помоћу ICP-MS технике у истом узорку четина.

Табела 6.24. Дескриптивна статистика концентрације елемената измерених помоћу различитих аналитичких техника: минимум у mg kg^{-1} , максимум у mg kg^{-1} , медијана у mg kg^{-1} , аритметичка средина (АР) у mg kg^{-1} , стандардна девијација (СД) у mg kg^{-1} , медијана релативног односа (РР %) у % и број узорака у којима је измерен испитивани елемент (н)

	<i>ICP-MS</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ	<i>ICP-MS</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ
	S					Mn				
минимум	667	/	/	446	/	14	7	11	25	7
максимум	2145	/	/	2100	/	1300	533	600	1740	810
медијана	1288	/	/	893	/	85	36	56	123	52
АР	1319	/	/	1007	/	157	78	89	227	101
СД	372	/	/	414	/	230	105	116	308	149
РР %*	100	/	/	76	/	100	56	77	158	64
н	49	/	/	48	/	49	48	38	48	49
	Fe					Ni				
минимум	21	4	38	24	10	0	0	1	9	/
максимум	146	136	359	251	95	10	35	6	13	/
медијана	55	20	98	81	27	2	2	2	11	/
АР	62	26	111	83	34	2	3	3	11	/
СД	35	23	67	49	21	2	6	1	2	/
РР %*	100	38	173	146	56	100	82	120	187	/
н	49	46	35	48	49	49	36	30	2	/
	Zn					Rb				
минимум	10	7	9	35	1	0.4	/	0.4	11.0	/
максимум	84	271	81	337	215	36.2	/	41.0	45.5	/
медијана	36	24	44	127	55	4.3	/	5.2	16.5	/
АР	40	32	44	135	63	6.5	/	7.7	20.8	/
СД	17	37	17	62	36	6.6	/	8.1	10.4	/
РР %*	100	68	102	367	161	100	/	116	192	/
н	49	49	39	44	44	49	/	39	17	/
	Sr					Ba				
минимум	0.5	0.1	3.4	10.0	/	0.1	0.02	3	104	/
максимум	59.8	32.7	91.0	67.5	/	100	18	103	139	/
медијана	6.5	2.1	14.4	28.5	/	4	3	10	131	/
АР	11.9	3.9	19.6	30.5	/	12	5	25	125	/
СД	13.2	5.7	18.5	15.0	/	22	6	30	18	/
РР %*	100	42	111	149	/	100	44	136	143	/
н	49.0	40.0	26.0	23.0	/	49	18	23	3	/

* Вредност медијане релативног односа (%) је израчуната као количник концентрације елемента измерена помоћу различитих аналитичких техника и концентрације измерене помоћу *ICP-MS* технике у истом узорку четина.

6.4.1. Поређење техника на основу релативних односа

Како би се поједноставио начин посматрања података, пошто су испитивани елементи присутни у јако широком опсегу концентрација, коришћени су релативни односи концентрација. Релативни однос концентрација (%) је израчунат као количник измерене концентрације елемената помоћу различитих аналитичких техника и концентрације измерене помоћу *ICP-MS* технике. *ICP-MS* је конвенционално најчешће коришћена техника за анализу биљног материјала и има одличне перформансе (ниски детекциони лимити, широк опсег линеарности и јако добра тачност и прецизност одређивања). Поред тога, током овог експеримента је *ICP-MS* техника имала најподобнији програм контроле

квалитета, па је управо зато коришћена као основ за поређење и испитивање других техника. У табелама 6.25. и 6.26. су приказани минимум (%), максимум (%), медијана (%), аритметичка средина (%) и стандардна девијација (%) релативних односа концентрација добијених помоћу испитиваних аналитичких техника и концентрација добијених помоћу *ICP-MS* технике.

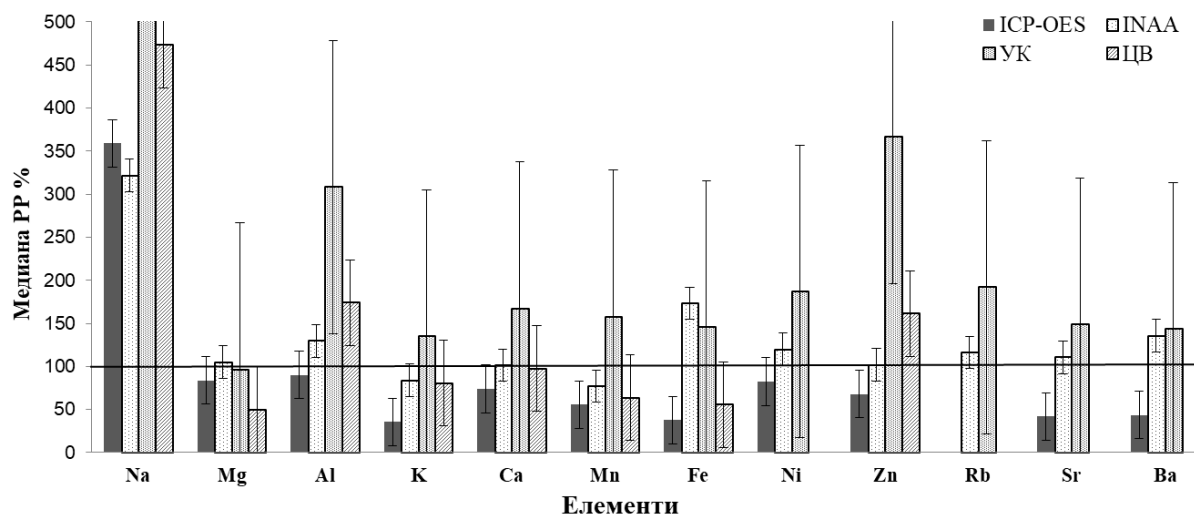
Табела 6.25. Минимум, максимум, медијана, аритметичка средина (АР) и стандардна девијација релативних односа у %

	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ
Na				Mg				
минимум	9	117	99	1	64	20	46	31
максимум	5888	1826	15424	4367	116	214	196	74
медијана	359	322	2210	473	84	105	96	50
АР	925	468	4169	869	86	107	100	51
СД	1445	384	4503	1055	11	26	31	9
Al				K				
минимум	23	0	26	12	18	0	57	24
максимум	285	314	831	514	51	135	299	143
медијана	90	130	308	174	36	84	135	81
АР	99	133	319	197	35	82	138	79
СД	56	67	172	103	7	20	48	18
Ca				P				
минимум	7	17	14	11	/	/	17	/
максимум	281	447	542	300	/	/	229	/
медијана	74	101	167	97	/	/	92	/
АР	79	110	171	100	/	/	98	/
СД	39	61	98	47	/	/	39	/
S				Mn				
минимум	/	/	27	/	3	0	5	2
максимум	/	/	178	/	418	111	964	524
медијана	/	/	76	/	56	77	158	64
АР	/	/	79	/	66	71	183	76
СД	/	/	32	/	67	21	148	80

Табела 6.26. Минимум, максимум, медијана, аритметичка средина (AP) и стандардна девијација релативних односа у %

	ICP-OES	INAA	УК	ЦВ	ICP-OES	INAA	УК	ЦВ
Fe				Ni				
минимум	0	99	26	12	1	45	156	/
максимум	139	638	336	78	962	604	218	/
медијана	38	173	146	56	82	120	187	/
AP	43	219	143	56	188	139	187	/
СД	25	126	59	12	226	95	43	/
Zn				Rb				
минимум	32	62	97	4	/	16	82	/
максимум	455	236	838	529	/	558	843	/
медијана	68	102	367	161	/	116	192	/
AP	78	119	363	177	/	126	292	/
СД	58	44	175	111	/	83	242	/
Sr				Ba				
минимум	7	66	84	/	0,5	74	131	/
максимум	162	175	326	/	380	305	251	/
медијана	42	111	149	/	44	136	143	/
AP	47	112	160	/	62	142	175	/
СД	27	26	59	/	83	52	66	/

Вредности медијане релативних односа концентрација (PP %) добијених различитим аналитичким техникама и концентрацијама добијених помоћу ICP-MS технике су приказани на слици 6.47.

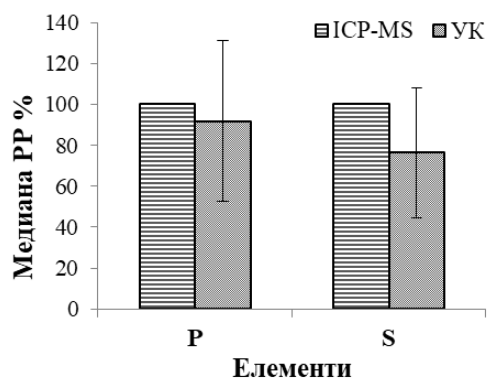


Слика 6.47. Вредности медијане релативних односа концентрација добијених коришћењем различитих аналитичких техника у односу на ICP-MS концентрације.

Могуће је уочити да су концентрације добијене помоћу различитих техника за већину елемента прилично усаглашене. Све испитане технике су емпиријски калибрисане, осим УК методе, која је безстандардна (и семиквантитативна) метода. Из тог разлога не изненађује најчешће разлика резултата добијених помоћу УК методе у односу на друге технике. ЦВ метода има нешто више детекционе лимите у односу на друге технике, и то је разлог изостајања приказа релативних односа за неке елементе код ове методе (Ni, Sr и Ba). Ови елементи нису детектовани помоћу ЦВ методе. Елемент који у највећој мери одступа је Na, што указује да је ово елемент који је јако тежак за одређивање било којом од коришћених техника.

Посматрањем релативних односа на слици 6.47., могуће је уочити још неке трендове. Резултати добијени *ICP-OES* техником су потцењени у поређењу са *ICP-MS* техником за све анализиране елементе, осим за Na. Насупрот томе, концентрације добијене помоћу УК методе су прецењене у односу на *ICP-MS* за све анализиране елементе, осим за Mg. Међутим, разлике у релативним односима добијених помоћу УК методе су једноличне, што указује на постојање позитивне системске грешке. Код *ICP-OES* технике одступања нису једнаке величине, па је разлог одступања немогуће приписати системској грешки. Уколико се посматрају односи ЦВ и *ICP-MS*, они нису доминантно ни позитивни ни негативни, што указује да не постоји системска грешка код ЦВ методе.

Релативни односи *INAA* концентрација су били у опсегу од 70 до 130 % у поређењу са *ICP-MS* концентрацијама, осим у случају Na (332 %), Fe (173 %), и Ba (136 %). *INAA*, као недеструктивна техника, даје резултате који су најсличнији *ICP-MS* резултатима.



Слика 6.48. Медијана релативних односа концентрација P и S добијених коришћењем *ICP-MS* и УК метода.

На слици 6.48. приказане су медијане релативних односа концентрација P и S измерених помоћу *ICP-MS* и УК метода. Ова две есенцијална елемента, нису одређивана другим аналитичким техникама, док је УК скрининг метода којом је могуће одредити све елементе периодног система елемената тежих од Na. Иако имају велику стандардну девијацију (~ 30 %), резултати добијени помоћу УК методе су у сагласности са резултатима *ICP-MS* технике када је одређивање P и S у питању.

6.4.2. Поређење техника на основу упоредног т-теста

Употребом упоредног т-теста проверавамо да ли између концентрација измерених помоћу различитих аналитичких техника постоји статистички значајна разлика. Упоредним т-тестом се увек бинарно пореде две групе података, па су тако увек упоређивани резултати добијени помоћу две технике. На основу резултата упоредног т-теста анализирани елементи су подељени у три групе (табела 6.27.). У прву групу спадају елементи код којих не постоји статистички значајна разлика у концентрацијама добијених помоћу различитих техника, и та група се назива „Без разлике“. Друге две групе садрже елементе код којих постоји статистички значајна разлика између концентрација добијених упоређеним техникама, али се концентрације примењених техника статистички значајно разликују на 0,05 (Разлика^{*}) и 0,01 (Разлика^{**}) нивоу значајности.

Табела 6.27. Груписање елемената на основу резултата упоредног т-теста примењеног на концентрације добијене испитиваним техникама. Границе између група елемената су базиране на *P* вредностима статистичке значајности ($P=0,05$ и $P=0,01$)

Упоређене технике	Без разлике	Разлика [*]	Разлика ^{**}
<i>ICP-MS</i> и <i>INAA</i>	Mg, Ca, Mn, Rb, Sr	Ba	Na, Al, K, Fe, Ni
<i>ICP-MS</i> и УК	Mg, P	Mn	Na, Al, K, Ca, S, Fe, Zn, Rb, Sr
<i>ICP-MS</i> и ЦВ	Na, Ca	Mn	Mg, Al, K, Fe, Zn
<i>ICP-OES</i> и <i>INAA</i>	Na, Mn, Ni, Zn	Mg, Ba	Al, K, Ca, Fe, Sr
<i>ICP-OES</i> и УК			Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Zn
<i>ICP-OES</i> и ЦВ	Na, Mn		Mg, Al, K, Ca, Fe, Zn
<i>INAA</i> и УК	Mg	Mn, Fe	Na, Al, K, Ca, Zn, Rb, Sr
<i>INAA</i> и ЦВ	Na, Al, K, Ca, Mn	Zn	Mg, Fe
УК и ЦВ			Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Zn

* Разлика је значајна на 0,05 статистичком нивоу.

** Разлика је значајна на 0,01 статистичком нивоу.

Из табеле 6.27. је могуће приметити да *ICP-MS* техника не показује статистички значајну разлику при анализи Mg, Ca, Mn, Rb и Sr у поређењу са *INAA*; за Mg и P у поређењу са УК; за Na и Ca у поређењу са ЦВ. Статистички значајна разлика између *ICP-MS* и недеструктивних техника је пронађена код свих осталих елемената. Техника *ICP-OES* не показује статистички значајну разлику при анализи Na, Mn, Ni и Zn у поређењу са *INAA*, и при анализи Na и Mn у поређењу са ЦВ. На постоји статистички значајна разлика између *ICP-OES* и УК за све остале елементе. При поређењу са *XRF* методама, *INAA* не показује статистички значајну разлику при анализи Mg у поређењу са УК, и при анализи Na, Al, K, Ca и Mn у поређењу са ЦВ. Постоји статистички значајна разлика при поређењу резултата УК и ЦВ метода код свих елемената.

Резултати упоредног т-теста показују да ни једна техника не показује статистички значајно слагање приликом одређивања Fe. УК метода показује најмање слагање са другим аналитичким техникама, не постоји статистички значајно слагање при одређивању

ниједног елемента у поређењу са *ICP-OES* и ЦВ методама, док са *INAA* показује слагање само при одређивању Mg. Елементи као што су Na, Mn и Ca најчешће показују слагање између упоређених техника.

Важно је бити опрезан приликом интерпретације резултата упоредног т-теста. Поједини елементи, као што је Na, могу показати одсуство статистички значајне разлике између упоређених техника. Међутим, овакав резултат не мора бити доказ да испитиване технике производе сличне резултате, већ да све технике непрецизно, нетачно и са великом случајном грешком одређују овај елемент.

6.4.3. Поређење техника на основу корелационе анализе

Иако су досадашњи резултати показали статистички значајно неслагање између испитиваних техника за велики број елемената, добијене концентрације и даље могу бити добро корелисане, што би указивало на постојање системске грешке код неке од техника или код одређивања неког конкретног елемента.

Постојање корелације између коришћених аналитичких техника је испитано помоћу корелационе анализе. Концентрације елемената измерене помоћу испитаних аналитичких техника су упоређене употребом непараметријског Спирмановог корелационог коефицијента (*Spearman's correlation coefficient*). Резултати корелационе анализе, односно вредности корелационог коефицијента ρ приказани су табели 6.28.

Табела 6.28. Спирманов корелациони коефицијент (ρ) концентрација елемената свих упоређених техника

Елемент/ Техника	ICP-MS и INAA	ICP-MS и УК	ICP-MS и ЦВ	ICP-OES и INAA	ICP-OES и УК	ICP-OES и ЦВ	INAA и УК	INAA и ЦВ	УК и ЦВ
Na	0,836***	0,354*	0,182	0,424*	0,041	0,168	0,455**	0,159	0,081
Mg	0,714***	0,334*	0,641***	0,622***	0,437**	0,681***	0,263	0,526***	0,194
Al	0,884***	0,753***	0,823***	0,818***	0,786***	0,833***	0,720***	0,801***	0,932***
K	0,938***	0,707***	0,813***	0,681***	0,611***	0,774***	0,729***	0,855***	0,837***
Ca	0,873***	0,690***	0,845***	0,880***	0,855***	0,970***	0,764***	0,900***	0,877***
P	/	0,723***	/	/	/	/	/	/	/
S	/	0,412**	/	/	/	/	/	/	/
Mn	0,766***	0,607***	0,711***	0,734***	0,731***	0,835***	0,669***	0,786***	0,822***
Fe	0,417***	0,535***	0,770***	0,472***	0,500***	0,586***	0,269*	0,434***	0,646***
Ni	0,779***	/	/	0,470*	/	/	/	/	/
Zn	0,647***	0,267	0,097	0,621***	0,361*	0,164	0,334*	-0,017	0,631***
Rb	0,767***	0,814***	/	/	/	/	0,814***	/	/
Sr	0,936***	0,753***	/	0,979***	0,688**	/	0,802***	/	/
Ba	0,930***	0,5	/	0,864**	/	/	/	/	/

* Корелација је значајна на 0,05 нивоу.

** Корелација је значајна на 0,01 нивоу.

*** Корелација је значајна на 0,001 нивоу.

Статистички значајна корелација на 0,001 нивоу је пронађена код свих елемената у оквиру ICP-MS и INAA поређења. Корелација између ICP-MS и обе XRF технике (УК и ЦВ) је била статистички значајна на 0,001 нивоу за већину испитиваних елемената, осим за Na и Mg ($P < 0,05$), и S ($P < 0,01$) у оквиру поређења са УК методом. Није пронађена статистички значајна корелација за Zn у оквиру ICP-MS и ЦВ поређења, и за Zn и Ba у оквиру ICP-MS и УК поређења.

Поређење *ICP-OES* са недеструктивним техникама (*INAA*, УК и ЦВ) показује сличне резултате као и поређење са *ICP-MS* техником. Статистички значајна корелација на 0,001 нивоу је пронађена код већине испитаних елемената. Корелација између *ICP-OES* и *INAA* је статистички значајна на 0,01 нивоу код одређивања Ва, и на 0,05 нивоу код одређивања Na и Ni. Корелација између *ICP-OES* и УК је статистички значајна при одређивању Mg и Sr, на 0,05 нивоу при одређивању Zn, и без статистичке значајности при одређивању Na. Поређење са ЦВ методом није показало статистички значајну корелација при одређивању Na и Zn.

Статистички значајна корелација између *INAA* и УК је пронађена код Al, K, Ca, Mn, Rb и Sr ($P < 0,001$), код Na ($P < 0,01$), и код Fe и Zn ($P < 0,05$), док за Mg није пронађена статистички значајна корелација. Код поређења *INAA* и ЦВ, статистички значајна корелација на 0,001 нивоу је пронађена за све анализиране елементе, осим Na и Zn, за које није пронађена статистички значајна корелација.

Поређењем резултата две *XRF* методе (УК и ЦВ), статистички значајна корелација на 0,001 нивоу је пронађена за све елементе, осим при одређивању Na и Mg, за које није пронађена статистички значајна корелација.

Резултати корелационе анализе показују да су испитане технике најчешће корелисане. Међутим, нису све технике међусобно добро корелисане и нису корелисане код свих одређиваних елемената. Важно је нагласити да ни једна техника није неприкосновена за одређивање баш свих елемената и мањкавост у тачности при одређивању неког елемента може бити узрокована карактеристикама саме методе одређивања или техничким разлозима. *XRF* инструмент може имати проблем при одређивању Zn уколико се користи држач узорка који садржи Zn; или може постојати проблем смањења осетљивости при одређивању неких елемената за које је неопходна употреба филтера примарног зрачења (на пример: Ru, Rh, Pd, Ag, Cd и In уколико се користи Rh анода у рендгенској цеви). Код *ICP-MS* уређаја, квантификација Ni може бити отежана уколико инструмент поседује елементе уређаја за фокусирање снопа направљене од Ni. Помоћу *INAA* технике се јако тешко може одредити Cd због изузетно кратког животног века одговарајућег изотопа.

Постоје елементи коју су компликовани за одређивање приликом употребе било које од испитаних техника и најбољи пример за овај случај би био Na. Одређивање Na је непрактично помоћу *ICP-OES* јер постоји само пар аналитичких линија које углавном имају спектралне сметње. Квантификација Na помоћу *XRF* технике је отежана због прилично малог интензитета спектралних линија овог елемента.

У овом експерименту су резултати одређивања Fe различитим техникама показали разилажење и разлог за то би била релативно ниска концентрација овог елемента у биљним узорцима у поређењу са концентрацијом макро елемената (Al, Mg, Ca, K). Ниске концентрације Fe у биљним узорцима не морају бити једини разлог за неслагање

результата, с обзиром да постоје и други елементи у заступљени у ниским концентрацијама (Sr, Br, Ni), чије је поређење показало слагање.

Иако су резултати свих техника били добро корелисани, *ICP-OES* техника је показала ниже резултате, док је УК метода показала ниже резултате у односу на *ICP-MS* технику. Овакви резултати указују на могућност постојања системске грешке код неких од техника, што може бити узрок неслагања између испитаних аналитичких техника. Ипак, утврђена и квантификована системска грешка може лако бити коригована у сету резултата.

Програм контроле квалитета сваког аналитичког поступка одређивања испитиваним техникама је подразумевао анализу сертифициваног референтног материјала иглица бора (*NIST pine needles certified reference material (1575a)*). Референтне вредности и измерене концентрације помоћу испитаних техника са вредностима релативних стандардних девијација (РСД, %) (за мерења помоћу испитиваних техника) и мерне несигурности (СД) (за сертифицивану вредност) су приказане у табели 6.29.

Табела 6.29. Сертифициване и измерене (помоћу *ICP-MS*, *ICP-OES*, *INAA*, УК и ЦВ) вредности (mg kg^{-1}) и релативне стандардне девијације (РСД, %) три поновљена мерења и вредност мерне несигурности за сертифицивану вредност

Елемент	Сертифициковано		<i>ICP-MS</i>		<i>ICP-OES</i>		<i>INAA</i>		УК		ЦВ	
	c , mg kg^{-1}	СД	c , mg kg^{-1}	РСД	c , mg kg^{-1}	РСД	c , mg kg^{-1}	РСД	c , mg kg^{-1}	РСД	c , mg kg^{-1}	РСД
Na	63	1	53	3	112	115			343	44	15	7
Mg	1060	170	854	33	945	18	1067	105	1267	6	923	52
Al	580	30	489	28	539	8	681	155	710	11	574	34
P	1070	80	1054	79					1367	15		
K	4170	70	3733	158	3120	49			4727	124	3849	128
Ca	2500	100	2269	97	2421	41	2667	115	2707	64	2542	71
Mn	488	12	472	30	462	10	496	48	595	19	500	10
Fe	45	2	45	3	50	13			46	4	47	1
Ni	1,47	0,1	1,2	0,1	1,5	0,2						
Zn	38	2	41	3	35	2			100	4	20	25
Rb	16,5	0,9	16	1					5	9		
Ba	6	0,2	5,4	0,2	5,6	0,1					2	1

Могуће је уочити како све технике показују прихватљиво слагање измерених концентрација са сертифициваним. Такав резултат би на први поглед могао да доведе до закључка да све технике успешно могу да тачно одреде концентрације елемената у узорку иглице бора. Међутим, резултати анализе реалних узорка показују да не постоји апсолутно слагање при одређивању свих елемената, помоћу свих техника. Добијени резултати чак указују на могуће постојање системске грешке код неких од испитиваних техника (*ICP-OES* и УК).

Поред максимално уложеног труда, у уобичајеним лабораторијским условима је јако тешко добити узорак који је након спрашивања и хомогенизације једнако ситан и хомоген као узорак сертификовног референтног материјала. Код *XRF* технике, овако различите физичке карактеристике узорака имају велики утицај на резултат одређивања. Са друге стране, код *ICP-MS* и *ICP-OES* техника, узорак може бити само делимично минерализован у процесу мокре дигестије.

На основу свега претходног, могуће је закључити да мерење сертификованог референтног материјала није довољно у програму контроле квалитета аналитичког одређивања. Уколико је важно обезбедити изузетно тачно одређивање, неопходно је увођење још неког корака у процедуру контроле квалитета, као што је интерни стандард или стандардни додатак.

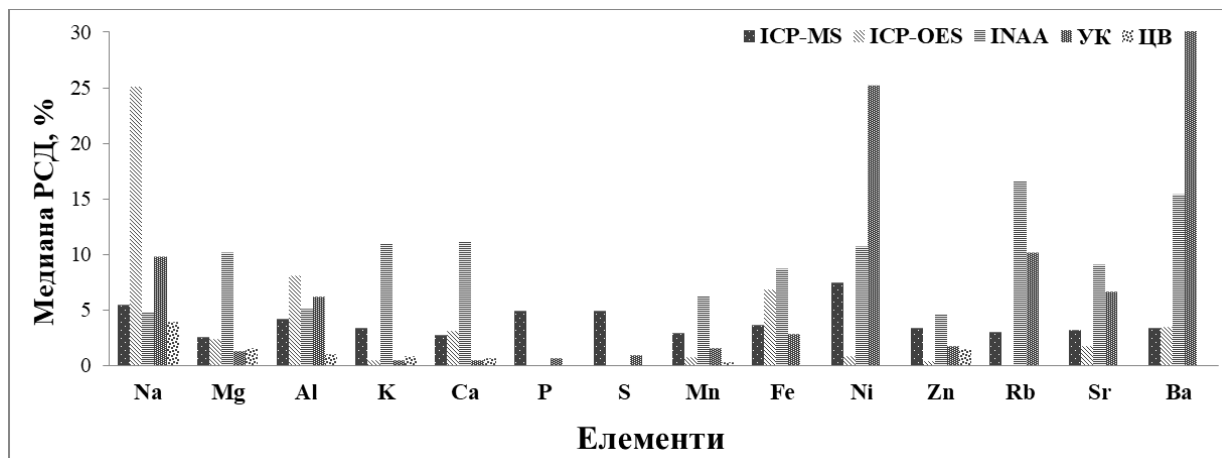
6.4.5. Поређење прецизности испитиваних техника

Сви узорци који су испитани у овом експерименту су анализирани у више понављања сваком од испитаних метода. На основу поновљених мерења, за свако одређивање је израчуната релативна стандардна девијација (РСД, %) која је коришћена за поређење прецизности техника. У табели 6.30. дати су минимум (%), максимум (%), аритметичка средина (АР, %) и медијана (%) релативних стандардних девијација.

Табела 6.30. Минимум (%), максимум (%), аритметичка средина (АР, %) и медијана (%) релативних стандардних девијација поновљених мерења свих испитиваних техника

	<i>ICP-MS</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ	<i>ICP-MS</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>INAA</i>	УК	ЦВ
	Na					Mg				
минимум	0.8	0.6	3	0.8	0	0.8	0.2	9.8	0	0
максимум	23	95	7	38	18	12	9	41	11	3
медијана	5	25	5	10	4	3	2	10	1	2
АР	7	34	5	10	4	3	2	11	2	2
	Al					K				
минимум	0.5	1.2	4	0	0	0.4	0.0	11	0	0.5
максимум	19	94	23	65	7	15	1	12	69	1
медијана	4	8	5	6	1	3	0	11	0.4	0.8
АР	5	12	6	11	1	4	0	11	2	0.8
	Ca					P				
минимум	0.3	0.3	11	0	0.4	0.9	/	/	0	/
максимум	9	23	15	118	1	16	/	/	101	/
медијана	3	3	11	0.4	0.6	5	/	/	0.6	/
АР	3	5	11	3	0.7	5	/	/	3	/
	S					Mn				
минимум	1	/	/	0	/	0.5	0.1	6	0	0
максимум	12	/	/	54	/	12	3	8	109	7
медијана	5	/	/	0.8	/	3	1	6	1	0.3
АР	5	/	/	4	/	4	1	6	5	1
	Fe					Ni				
минимум	0.5	1.1	6	0	0	1	0	8	17	0
максимум	17	38	18	17	7	533	35	18	33	13
медијана	4	7	9	3	0	8	1	11	25	0
АР	4	10	9	4	1	30	4	12	25	1
	Zn					Rb				
минимум	0.3	0.04	4	0	3	0.6	/	17	0	/
максимум	15	1	11	14	47	19	/	18	44	/
медијана	3	0	5	2	1	3	/	17	10	/
АР	4	0	7	3	0.4	4	/	17	15	/
	Sr					Ba				
минимум	0.3	0.4	8	1	/	0.2	0.4	13	15	/
максимум	11	17	13	44	/	14	32	17	47	/
медијана	3	2	9	7	/	3	3	15	38	/
АР	4	3	9	9	/	4	7	15	35	/

Медијане релативних стандардних девијација (РСД, %) поновљених мерења свих испитаних аналитичких техника су приказане на слици 6.49.



Слика 6.49. Медијане релативних стандардних девијација (РСД, %) поновљених мерења свих испитаних техника.

Из резултата приказаних у табели 6.30. и слици 6.49., могуће је приметити да све технике дају резултате са малом релативном стандардном девијацијом. Са изузетком за Ni, вредности РСД % су увек ниже од 5 % код *ICP-MS* одређивања, док су вредности РСД % *INAA* технике и *XRF* метода (УК и ЦВ) најчешће ниже од РСД % вредности *ICP-MS*. За већину елемената су РСД % вредности мање од 10 %. Најлошија прецизност постоји при одређивању елемената чије су концентрације у биљкама јако ниске (Ni, Rb, Sr, Ba).

7. Закључци

7.1. Специфични закључци експеримената

7.1.1. Закључци експеримента 1 - Припремање оптималног пелета и утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу

У циљу добијања оптималног пелета, испитан је утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу. При поређењу различитих варијација параметара припреме узорка за безстандардну *WD-XRF* анализу, промена садржаја везивног средства је највише утицала на повећање системске грешке. Системска грешка настала услед промене садржаја везивног средства (воска) није била иста за све одређиване елементе. Код тежих елемената (на пример Mn и Fe) са повећањем садржаја воска добијају се концентрације веће од очекиваних. Разлог је повећање садржаја воска, које чини пелет компактнијим и са равнијом површином, што узрокује смањење ефекта сенке и већу ефективну површину за анализу у односу на површину пелета без везивног средства.

Уколико се повећа садржај воска, за елементе као што су Mg и Al добијаће се концентрације ниже од очекиваних. Овакви резултати се добијају због различите дистрибуције величине честица узорка и воска. Током припреме узорка, површина пелета постаје обogaћена воском, што узрокује локално разблаживање. Дубина продирања рендгенског зрачења је мања код одређивања лаких елемената, па је одређивање ових елемената у већој мери погођено овим феноменом.

Како би се максимално смањила системска грешка неког аналитичког поступка, неопходно је да процедура припреме узорка буде иста за све узорке који се анализирају у оквиру једног истраживања. За свако ново истраживање потребно испочетка емпиријски одредити оптималну количину везивног средства, масу пелета и примењени притисак пелетирања који би давали најпогодније пелете за анализирани тип матрикса.

На основу добијених резултата може се закључити са да варијација масе узорка и примењеног притиска пелетирања не утичу значајно на резултате безстандардне анализе. Смањење примењеног притиска и времена пелетирања може допринети ефикасности процедуре припреме узорка, а да при том нема значајног утицаја на тачност анализе.

Параметар о коме је важно водити рачуна при безстандардној анализи је количина везивног средства. Уколико се анализирани сет узорака припрема са истом количином везивног средства, системска грешка настала из припреме узорка се своди на минимум. Уколико је потребно упоредити резултате студија током којих су узорци припремани на различите начине, а системска грешка није праћена неким од програма контроле

квалитета, на основу резултата овог експеримента се може закључити на који начин се могу кориговати измерене вредности.

7.1.2. Закључци експеримента 2 - Одређивање погодних аналитичких параметара за *WD-XRF* анализу биљног матрикса

Најзначајнији корак у оптимизацији методе анализе елемената у биљном материјалу је обављен одабиром адекватне комбинације аналитичких параметара за емпиријску калибрацију *WD-XRF* спектрометра за сваки од испитиваних елемената (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi). Коришћењем AX03 кристала, употребом 1,00 ширине колиматора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV и FPC детектора се добија адекватно дефинисан пик и оптималан однос резолуције и интензитета при одређивању Na. С обзиром да је за добијање спектра коришћен целулозни стандард концентрације 500 mg·kg⁻¹, добијени пикови су малог интензитета и лошег квалитета, може се закључити да је *WD-XRF* техника недовољно осетљива за одређивање Na, па се може очекивати да добијени резултати буду смањене прецизности и тачности.

При одабиру оптималних аналитичких параметара за одређивање магнезијума, могуће га је одређивати једино помоћу AX03 кристала. Интензитет добијених пикова је већи, док је њихов изглед значајно бољи у односу на натријум. Одабиром колиматора ширине 1,00, јачине струје 80 mA, напона 30 kV и FPC детектора добија се сигнал који је довољно интензиван, позадина која је довољно ниска и пик који је дефинисан.

Приликом одређивања Al се препоручује употреба PET кристала, јачине струје 80 mA, напона 30 kV, FPC детектора и колиматора ширине 0,40. Код осталих испитаних лаких елемента (K и Ca) је препоручено коришћење LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона од 30 kV и 0,40 колиматора јер се на тај начин добијају спектри добре резолуције са ниском позадином и интензивним пиком.

Приликом одабира адекватних аналитичких параметара при одређивању прелазних метала као што су Cr, Mn, Fe, Co и Ni, саветује се коришћење LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона од 50 kV и 0,40 колиматора због изузетно интензивног сигнала и ниске позадине.

Квалитативни спектри Cu и Zn показују да LiF200 кристал у комбинацији са јачином струје 50 mA, напоном од 50 kV, 0,40 колиматором и SC детектором дају најинтензивнији сигнал који не подлеже значајним преклапањима.

Приликом одређивања Ga и Sr се добијају сигнали који су јако интензивни и препоручена је употреба LiF220 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напона од 50 kV, и 0,40 колиматора.

Како се за одређивање In, Cd и Ag користи филтер примарног зрачења, интензитети аналитичких сигнала ових елемената су јако ниски. За добијање што интензивнијих сигнала, препоручује се коришћење 0,40 колиматора, LiF200 кристала, SC детектора и комбинације јачине струје и напона 70 mA и 40 kV.

Спектри Bi, Pb и Tl користе $L\alpha$ линије као аналитичке и оне се налазе јако блиско у спектру. Како би се ови пикови раздвојили неопходно је коришћење 0,15 колиматора, што значајно умањује интензитет. С обзиром на њихову малу заступљеност у биљним узорцима, јако је важно обезбедити довољно интензиван аналитички сигнал. Препоручљиво да се за потребе сваког конкретног истраживања емпиријски одреде оптимални аналитички параметри на основу присутне концентрације ових елемената у биљним узорцима.

7.1.3. Закључци експеримента 3 - Емпиријска калибрација помоћу целулозних стандарда и параметри валидације креираних метода

Испитивањем перформанси емпиријски креираних метода (Ц, ЦВ и ТС), насталих коришћењем синтетичких стандарда од спајковане целулозе, може се закључити да се све могу успешно користити за анализу лаких и тешких елемената у биљном узорку. Примена испитаних метода анализе подразумева једноставну, јефтину, еколошку процедуру за припрему узорка, чак и уколико је ограничена количина узорка доступна. Све три методе могу бити јако прецизне, са добром поновљивошћу, унутарлабораторијском репродуктивношћу и широким линеарним опсегом. Све методе су показале најбоље перформансе при анализи елемената четврте периоде периодног система елемента, док су најлошије перформансе метода биле при анализи лаких елемената.

Поређењем перформанси Ц и ЦВ методе, закључено је да додатак везивног средства позитивно утиче на побољшање прецизности, детекционог и квантификационог лимита.

Метода ТС је најчешће имала перформансе на истом нивоу као и друге две методе, иако се за потребе ове методе користе значајно мање количине анализираних материјала и подразумева корак ручног додавања узорка у танком слоју приликом припреме пелета. Добра прецизност ТС методе указује да примењена процедура припреме узорка не представља значајан извор случајне грешке. Међутим, у неким сегментима, ТС метода ипак није била једнако ефикасна као друге испитане методе. Осетљивост ТС методе није увек била задовољавајућег нивоа при анализи елемената са већим атомским бројем. Детекциони лимити су били виши приликом одређивања елемената тежих од Са, док је поновљивост била незадовољавајућа при одређивању тежих елемената у ниским концентрацијама. Међутим, генерални закључак је да ТС метода не заостаје значајно за Ц и ЦВ методама.

Приликом поређења тачности, може закључити да ЦВ метода има најбољу, а УК метода најмању тачност. Како су се повећавале одређиване концентрације, тачност све три методе је била добра и јако слична. Уколико су концентрације лаких елемената биле ниже од $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, оштро је опадала тачност УК методе. При анализи елемената већег атомског броја, перформансе ТС методе нису биле на нивоу осталих. Употреба филтера примарног зрачења негативно утиче на тачност ТС и ЦВ метода.

Елементи као што су Ga, Cd, In и Tl су у реалним биљним узорцима обично присутни у јако ниским концентрацијама. Испитане XRF методе имају прилично високе детекционе лимите при одређивању ових елемената. Из тог се разлога не препоручује коришћење XRF метода при анализи Ga, Cd, In и Tl у биљном материјалу.

Примећено је да УК метода има тенденцију развијања позитивне системске грешке, док је ЦВ метода склона негативној системској грешки. Међутим, при поређењу са другим методама је јасно да је ове грешке могуће предвидети и кориговати. УК метода може бити најтачнија уколико је потребно анализирати узорке са јако компликованим и комплексним матриksom, као на пример узорке са екстремно широким концентрационим опсегом елемената, што узорци из животне средине често могу бити.

7.1.4. Закључци експеримента 4 - Анализа реалних биљних узорака и поређење са другим спектрометријским техникама

Поређењем испитиваних спектрометријских техника дошло се до закључка да се поред конвенционалних техника за анализу течних узорака (*ICP-MS* и *ICP-OES*) и недеструктивне *INAA* технике за анализу чврстог узорка, XRF методе могу успешно користити за анализу биљног материјала, конкретно иглица четинара. Рутинско коришћење XRF метода за одређивање метала у биљним узорцима би уштедело време и новац јер је поступак припреме узорака у складу са принципима зелене хемије. Безстандардна метода УК даје добро корелисане резултате са резултатима осталих техника које користе емпиријску калибрацију.

Иако је имплементација контролног програма, која је подразумевала анализу сертификованог референтног материјала, дала задовољавајуће резултате за сваку од техника, резултати добијени коришћењем испитиваних техника у неким случајевима нису биле адекватно корелисали. Разлог за овакву неусаглашеност може бити коришћење мулти-елементарних стандарда за калибрацију. Мулти-елементарни стандарди могу да садрже интерферирајуће елементе у значајно већим концентрацијама од оних у којима се ти елементи налазе у реалним биљним узорцима. Такође, често се дешава да сертификовани референтни материјал не буде потпуно исти као и матрикс који се анализира у оквиру неког истраживања (и по питању хемијског састава, концентрација и физичких карактеристика биљног узорка). У оваквим ситуацијама је коришћење

сертификованог референтног материјала у сврхе контролног програма (праћења тачности) лимитирано.

Препоручљиво је коришћење додатног контролног програма, у виду стандардног додатка или интерног стандарда, уколико је приоритет добијање резултата највеће могуће тачности.

7.1. Општи закључак

У оквиру ове дисертације испитан је потенцијал *WD-XRF* спектрометрије и развијене су методе за анализу елемената у биљном материјалу употребом целулозе као универзалног матрикса за производњу синтетичких стандарда за калибрацију. За потребе емпиријске калибрације, оптимизовани су аналитички параметри *WD-XRF* спектрометра за анализу 20 елемената (Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Tl, Pb и Bi) коришћењем синтетичког целулозног стандарда. На основу добијених резултата, препоручује се употреба следећих аналитичких параметри при анализи биљног материјала:

- Коришћењем AX03 кристала, употребом 1,00 ширине колиматора, јачине струје 80 mA, напона 30 kV и FPC детектора се добија адекватно дефинисан пик и оптималан однос резолуције и интензитета при одређивању Na и Mg.
- Приликом одређивања Al се препоручује употреба PET кристала, јачине струје 80 mA, напон 30 kV, FPC детектора и колиматора ширине 0,40. Код осталих испитаних лаких елемента (K и Ca) је препоручено коришћење LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 80 mA, напона од 30 kV и 0,40 колиматора.
- Приликом одабира адекватних аналитичких параметара при одређивању прелазних метала као што су Cr, Mn, Fe, Co и Ni, саветује се коришћење LiF200 кристала, FPC детектора, јачине струје 50 mA, напона од 50 kV и 0,40 колиматора.
- Квалитативни спектри Cu и Zn показују да LiF200 кристал у комбинацији са јачином струје 50 mA, напоном од 50 kV, 0,40 колиматором и SC детектором даје најинтензивнији сигнал који не подлеже значајним преклапањима.
- Приликом одређивања Ga и Sr се препоручује употреба LiF220 кристала, SC детектора, јачине струје 50 mA, напона од 50 kV и 0,40 колиматора.
- За добијање што интензивнијих сигнала In, Cd и Ag, препоручује се коришћење 0,40 колиматора, LiF200 кристала, SC детектора и комбинације јачине струје и напона 70 mA и 40 kV.
- Препоручује се да за потребе сваког конкретног истраживања емпиријски одреде оптимални аналитички параметри на основу присутне концентрације Bi, Pb и Tl у биљним узорцима.

Развијене аналитичке методе, креиране коришћењем синтетичких стандарда од спајковане целулозе, се могу успешно користити за анализу лаких и тешких елемената у биљном узорку, а да притом подразумевају једноставну, јефтину, еколошку процедуру за припрему узорка, чак и уколико је ограничена количина узорка доступна. У оквиру ове докторске дисертације развијене су и испитане три методе добијене употребом синтетичких стандарда од спајковане целулозе: Целулоза (Ц), Целулоза са воском (ЦВ) и Танак слој (ТС). Испитиване методе могу бити јако прецизне, са добром поновљивошћу, унутарлабораторијском репродуктивношћу, широким линеарним опсегом и добром тачношћу. Све методе су показале најбоље перформансе при анализи елемената четврте

периоде периодног система елемента, док су најлошије перформансе метода биле при анализи лаких елемената.

Поређењем перформанси метода, закључено је да додатак везивног средства позитивно утиче на побољшање прецизности, детекционог и квантификационог лимита. И поред значајно мање количине узорка метода ТС је најчешће имала перформансе на истом нивоу као и друге две методе. Код ТС методе је важно обратити посебну пажњу при анализи елемената са већим атомским бројем, јер она тада показује смањену осетљивост што утиче на све аналитичке перформансе методе.

Елементи као што су Ga, Cd, In и Tl су у реалним биљним узорцима обично присутни у јако ниским концентрацијама. Испитане XRF методе имају прилично виске детекционе лимите при одређивању ових елемената. Из тог се разлога не препоручује коришћење XRF метода при анализи ових елемената у биљном материјалу, осим у случају испитивања биљака који су хиперакумулатори поменутих елемената.

Поред метода креираних емпиријском калибрацијом употребом синтетичких целулозних стандарда за анализу биљака, испитана је и безстандардна метода *UniQuant* (УК). УК метода је показала тенденцију развијања позитивне системске грешке и слабију тачност одређивања у односу на емпиријски калибрисане методе. Међутим, метода може бити најтачнија уколико је потребно анализирати узорке са јако компликованим и комплексним матриksom (узорке са екстремно широким концентрационим опсегом елемената). Са концентрацијама лаких елемената нижим од $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, оштро опада тачност УК методе. Употреба филтера примарног зрачења негативно утиче на тачност УК методе.

С обзиром да је код емпиријски добијених метода познато да је неопходно узорке припремати на исти начин као и калибрационе стандарде, важно је било испитати утицај промене параметара припреме биљног узорка на безстандардну методу и оптимизовати параметре припреме узорка у циљу добијања оптималног пелета. Резултати су показали да од свих испитаних параметара припреме узорка (садржај везивног средства, маса узорка, примењен притисак пелетирања) промена садржаја везивног средства је највише утицала на повећање системске грешке. Утицај системске грешке услед промене овог параметра није исти за све елементе, већ:

- Код тежих елемената (на пример Mn и Fe) са повећањем садржаја воска добијају се концентрације веће од очекиваних, због добијања пелета бољим физичким карактеристикама које узрокују смањење ефекта сенке.
- Уколико се повећа садржај воска, за елементе као што су Mg и Al добијаће се концентрације ниже од очекиваних, због различите дистрибуције величина честица узорка и воска што узрокује локално разблаживање узорка.

На основу добијених резултата може се закључити да варијација масе узорка и примењеног притиска пелетирања не утичу значајно на резултате безстандардне анализе.

За свако ново истраживање потребно испочетка емпиријски одредити оптималну количину везивног средства, масу пелета и примењени притисак пелетирања који би давали најпогодније пелете за анализирани тип матрикса. Параметар о коме је важно водити рачуна при безстандардној анализи је количина везивног средства. Како би се максимално смањила системска грешка неког аналитичког поступка, неопходно је да процедура припреме узорка буде иста за све узорке који се анализирају у оквиру једног истраживања. Уколико је потребно упоредити резултате студија током којих су узорци припремани на различите начине, а системска грешка није праћена неким од програма контроле квалитета, на основу резултата се може закључити на који начин се могу кориговати измерене вредности.

Поређењем резултата добијених употребом *WD-XRF* спектрометрије и других спектрометријских техника (*ICP-MS*, *ICP-OES* и *INAA*) дошло се до закључка да се *WD-XRF* (емпиријски калибрисаних метода и безстандардне методе) методе могу успешно користити за анализу биљног материјала. Рутинска употреба *WD-XRF* методе је економична у смислу времена и ресурса, с обзиром да је поступак припреме узорка у складу са принципима зелене хемије. Важан закључак је и да су резултати добијени безстандардном методом добро корелисани са резултатима свих осталих испитаних техника, чија је анализа заснована на емпиријској калибрацији.

WD-XRF техника није увек била адекватно корелисана са осталим испитаним техникама, чак иако је свака од техника имала адекватно имплементиран контролни програм који је подразумевао анализу и сертификованог референтног материјала са задовољавајућом тачношћу. Закључује се да је само коришћење сертификованог референтног материјала у сврхе контролног програма (праћења тачности) недовољно и неопходно је проширивање контролног програма (стандардни додатка или интерни стандард) у циљу добијање резултата највеће могуће тачности.

8. Литература

Abdullah, M. Z., Saat, A., Hamzah, Z., Abdullah. Optimization of Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer to Analyze Heavy Metals in Moss Samples. *Am. J. Eng. Appl. Sci.* 4, 355–362 (2011).

Abou Mandour, M. A., Badawi, A., Mohamedb, N. M. A., Emam A. Towards a methodology for bulk sample neutron activation analysis. *J. Taibah Univ. Sci.* 10, 235–241 (2015).

Acharya, R., Pujari, P. K. Potential of conventional and internal monostandard NAA and PGNAA and PIGE in forensic sciences: An overview. *Forensic Chem.* 12, 107–116 (2019).

Agarwal, B. K. Characteristic X-Rays BT - X-Ray Spectroscopy: An Introduction. in (ed. Agarwal, B. K.) 51–104 (Springer Berlin Heidelberg, 1991).

Al-Alawi, M. M., Mandiwana, K. L. The use of Aleppo pine needles as a bio-monitor of heavy metals in the atmosphere. *J. Hazard. Mater.* 148, 43–46 (2007).

Alvarado, J. S., Neal, T. J., Smith, L. L., Erickson, M. D. Microwave dissolution of plant tissue and the subsequent determination of trace lanthanide and actinide elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 322, 11–20 (1996).

Andersen, L. K., Morgan, T. J., Boulamanti, A. K., Álvarez, P., Vassilev, S. V., Baxter, D. Quantitative X-ray fluorescence analysis of biomass: Objective evaluation of a typical commercial multi-element method on a WD-XRF spectrometer. *Energy and Fuels* 27, 7439–7454 (2013).

Anderson, C., Moreno, F., Geurts, F., Wreesmann, C., Ghomshei, M., Meech, J. A comparative analysis of gold-rich plant material using various analytical methods. *Microchem. J.* 81, 81–85 (2005).

Andrey, D., Dufrier, J. P., Perring, L. Analytical capabilities of Energy Dispersive X-Ray Fluorescence for the direct quantification of iron in cocoa powder and powdered cocoa drink. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 148, 137–142 (2018).

Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *Trends Anal. Chem.* 71, 2–8 (2015).

Arruda, S. C. C., Rodriguez, A. P. M., Arruda, M. A. Z. Ultrasound-assisted extraction of Ca, K and Mg from in vitro citrus culture. *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 470–474 (2003).

Babos, D. V., Costa, V. C., Sperança, M. A., Pereira-Filho, E. R. Direct determination of calcium and phosphorus in mineral supplements for cattle by wavelength dispersive X-ray fluorescence (WD-XRF). *Microchem. J.* 137, 272–276 (2018).

Bado, S. Padilla-Alvarez, R., Migliori, A., Forster, B. P., Jaksic, M., Diawara, Y., Kaiser, R., Laimer, M. The application of XRF and PIXE in the analysis of rice shoot and compositional screening of genotypes. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 371, 407–412 (2016).

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

Bamford, S. A. Jaksic, M., Medunic, Z., Wegrzynek, D., Chinea-Cano, E., Markowicz, A. Extending the quantitative analytical capabilities of the EDXRF technique for plant-based samples. *X-Ray Spectrom.* 33, 277–280 (2004).

Beckhoff, B., Kanngießner, B., Langhoff, N., Wedell, R., Wolff, H. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis.* (Springer Berlin Heidelberg, 2006).

Bennett, H., Graham, O. XRF Analysis of Ceramics, Minerals and Allied Materials. *J. Chem. Educ.* 70, A25 (1993).

Bertin, E. P. *Introduction to X-ray Spectrometric Analysis.* (Plenum Press, 1978).

Bertolotti, G., Gialanella, S. Review: Use of conifer needles as passive samplers of inorganic pollutants in air quality monitoring. *Analytical Methods* 6, 6208–6222 (2014).

Blonski, M. S., Appoloni, C. R., Parreira, P. S., Aragão, P. H. A., Nascimento Filho, V. Analysis of the chemical elements in leaves infected by fumagina by X-ray fluorescence technique. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 270, 197–201 (2006).

Bowers, C. Matrix Effect Corrections in X-ray Fluorescence Spectrometry. *J. Chem. Educ.* 96, 2597–2599 (2019).

Budak, G., Aslan, I., Karabulut, A., Tiraşoğlu, E. Analysis of some elements in three *Chrysolina* (Coleoptera, Chrysomelidae) species by EDXRF spectrometry. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 101, 195–200 (2006).

Bueno Guerra, M. B. Schaefer, C. E.G.R., De Carvalho, G. G.A., De Souza, P. F., Júnior, D. S., Nunes, L. C., Krug, F. J. Evaluation of micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plant materials. *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1096–1101 (2013).

Bueno Guerra, M. B., de Almeida, E., Carvalho, G. A., Souza, P. F., Nunes, L. C., Juniorc, D. S., Krug, F. J. Comparison of analytical performance of benchtop and handheld energy dispersive X-ray fluorescence systems for the direct analysis of plant materials. *J. Anal. At. Spectrom.* 29, 1667–1674 (2014).

Buhrke, V. E.; Jenkins, R.; Smith, D. K., Rudman, R. A Practical Guide for the Preparation of Specimens for X-ray Fluorescence and X-ray Diffraction Analysis. *J. Chem. Educ.* 76, 762 (1999).

Byers, H. L., Mchenry, L. J., Grundl, T. J. XRF techniques to quantify heavy metals in vegetables at low detection limits. *Food Chem. X* 1, 100001 (2019).

Casten, R. F., Beausang, C. W. Gamma-Ray Spectroscopy. in *Encyclopedia of Physical Science and Technology* 433–454 (Academic Press, 2003).

Čeburnis, D., Steinnes, E. Conifer needles as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: Comparison with mosses and precipitation, role of the canopy. *Atmos. Environ.* 34, 4265–4271 (2000).

Charles, B. B., Fredeen, K. J. Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. (PerkinElmer Instruments, 2004).

Charles, B. B., Kenneth, F. J. Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. (PerkinElmer Instruments, 2004).

Cheremisinoff, N. P. Elemental and structural characterization tests in Polymer Characterization 43–81 (William Andrew Publishing, 1996).

Chojnacka, K., Mikulewicz, M. Green analytical methods of metals determination in biosorption studies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 116, 254–265 (2019).

Chuparina, E. V., Gunicheva, T. N. Nondestructive X-ray Fluorescence Determination of Some Elements in Plant Materials. *J. Anal. Chem.* 58, 856–861 (2003).

Chuparina, E. V., Smagunova, A. N., Eliseeva, L. A. Study of the processes of background formation in the long-wavelength region of X-Ray spectrum. *J. Anal. Chem.* 70, 949–955 (2015).

Clark, R. B., Frank, K. D., Zaifnejad, M., Denning, J. L. X-Ray fluorescence analysis of small leaf samples mixed with cellulose or boric acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23, 569–583 (1992).

Conde, C. A. N., Requicha Ferreira, L. F., Campos, A. J. de. The Gas Proportional Scintillation Counter as a Room-Temperature Detector For Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Analysis. *Adv. X-ray Anal.* 25, 39–44 (1981).

Darvell, B. W. Radiography. *Mater. Sci. Dent.* 665–698 (2018).

De Carvalho, G. G. A., Bueno Guerra, M. B., Adame, A., Nomura, C. S., Oliveira, P. V., Pereira De Carvalho, H. W., Santos, D., Nunes, L. C., Krug, F. J. Recent advances in LIBS and XRF for the analysis of plants. *J. Anal. At. Spectrom.* 33, 919–944 (2018).

Dean, J. Inductively Coupled Plasma: Current and Future Developments. in 177–199 (2019).

Dean, J. R. Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy. (John Wiley & Sons, Ltd., 2005).

Djingova, R., Ivanova, J., Kuleff, I. Comparative evaluation of the possibilities of INAA, ED-XRF, ICP-AES and AAS in the analysis of plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 237, 25–34 (1998).

Edwards, S. J. A review of the theories of x-ray satellite lines. *Contemp. Phys.* 11, 195–200 (1970).

Eichert, D. The Fundamentals of Total Reflection X-ray Fluorescence. *Spectroscopy* 35, 20–24 (2020).

Ekinci, N., Ekinci, R., Polat, R., Budak, G. Analysis of trace elements in medicinal plants with energy dispersive X-ray fluorescence. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 260, 127–131 (2004).

Elam, W. T., Ravel, B. D., Sieber, J. R. A new atomic database for X-ray spectroscopic calculations. *Radiat. Phys. Chem.* 63, 121–128 (2002).

Electromagnetic Radiation. 25 Aug. 2020, <https://chem.libretexts.org/@go/page/2420> (Accessed 30 November 2021.).

Evans, C. C. X-ray fluorescence analysis for light elements in plant and faecal materials. *Analyst* 95, 919–29 (1970).

Fiamegos, Y., de la Calle Guntiñas, M. B., Beatriz, M., Calle, D. Validation strategy for an ed-xrf method to determine trace elements in a wide range of organic and inorganic matrices based on fulfilment of performance criteria. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 150, 59–66 (2018).

Fifield F. W., Kealey, D. B. Principles and practice of analytical chemistry, 3rd edition. Blackwell Science Ltd 38, (Blackwell Science Ltd, 1991).

Fittschen, U. E. A., Kunz, H. H., Höhner, R., Tyssebotn, I. M. B., Fittschen, A. A new micro X-ray fluorescence spectrometer for in vivo elemental analysis in plants. *X-Ray Spectrom.* 46, 374–381 (2017).

Frederick W., F., Peter J., H. Environmental Analytical Chemistry. (Blackie academic & professional, UK, 1997).

Freeh, W., Cedergren, A. Chapter 15 Aluminium. in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 12, 451–473 (Elsevier, 1992).

Frontasyeva, M. V, Pavlov, S. S. Analytical investigations at the IBR-2 reactor in Dubna. (2000).

Frontasyeva, M. V. Neutron activation analysis in the life sciences. *Phys. Part. Nucl.* 42, 332–378 (2011).

Frontasyeva, M. V., Pavlov, S. S., Shvetsov, V. N. NAA for applied investigations at FLNP JINR: Present and future. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 286, 519–524 (2010).

Gałaszka, A., Migaszewski, Z. M., Konieczka, P., Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 37, 61–72 (2012).

Gauglitz, G., Vo-Dinh, T. Handbook of Spectroscopy. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003).

Gibson, L. T. Archaeometry and Antique Analysis - Metallic and Ceramic Objects. in *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* 117–123 (Elsevier, 2004).

Gržetić, I. Elektron u čvrstim telima i primena elektrona. (Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1997).

Gržetić, I., Orlić, J., Radić, V., Radić, M., Ilijević, K. Analysis of medieval Serbian silver coins from XIV and XV century by means of wavelength-dispersive X-ray spectrometry. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 366, 161–170 (2016).

Guinn, V. P., Lukens, H. R. Trace analysis: Physical Methods. *Analytical Chemistry* (Wiley, New York, 1965).

Guohui, L., Shouzhong, F. Direct determination of 25 elements in dry powdered plant materials by X-ray fluorescence spectrometry. *J. Geochemical Explor.* 55, 75–80 (1995).

Han, X. Y., Zhuo, S. J., Shen, R. X., Wang, P. L., Ji, A. Comparison of the quantitative results corrected by fundamental parameter method and difference calibration specimens in X-ray fluorescence spectrometry. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 97, 68–74 (2006).

Haschke, M. Boehm, S. Micro-XRF in Scanning Electron Microscopes. in *Advances in Imaging and Electron Physics* 199, 1–60 (Elsevier, 2017).

Hellmut, F., Melba, P. "electromagnetic radiation". *Encyclopedia Britannica*, 23 Jul. 2020, <https://www.britannica.com/science/electromagnetic-radiation>. Accessed 30 November 2021.).

Hill, S. J., Fisher, A. S. Atomic absorption, methods and instrumentation. in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 37–43 (Elsevier, 2016).

Hoenig, M., Baeten, H., Vanhentenrijk, S., Vassileva, E., Quevauviller, P. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. *Anal. Chim. Acta* 358, 85–94 (1998).

Hou, X., Amais, R. S., Jones, B. T., Donati, G. L. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 1–25 (2016).

Injuk, J. & Van Grieken, R. Sample Preparation for X-Ray Fluorescence Analysis. in (2006).

Irgolic, K. J. Arsenic. in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 12, 287–350 (Elsevier, 1992).

Ivanova, J., Djingova, R. & Kuleff, I. Determination of some heavy and toxic elements in plants and soils with ED-XRF using americium-241 excitation source. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 238, 29–32 (1998).

Janssens, K. Chapter 4 X-ray based methods of analysis. in *Non-Destructive Microanalysis of Cultural Heritage Materials* 42, 129–226 (Elsevier, 2004).

Jeffries, T. E. Chapter 7 Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. in *Non-Destructive Microanalysis of Cultural Heritage Materials* 42, 313–358 (Elsevier, 2004).

Jenkins, R. *X-Ray Fluorescence Spectrometry*. Wiley-Interscience; 2nd edition (June 18, 1999).

Jenkins, R., Manne, R., Robin, R., Senemaud, C. Nomenclature system for X-ray spectroscopy, part VIII. *Pure Appl. Chem.* 63, (1991).

Juranović Cindrić, I., Zeiner, M., Starčević, A., Stingeder, G. Metals in pine needles: characterisation of bio-indicators depending on species. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 4339–4346 (2019).

Kallithrakas-Kontos, N., Foteinis, S., Paigniotaki, K., Papadogiannakis, M. A robust X-ray fluorescence technique for multielemental analysis of solid samples. *Environ. Monit. Assess.* 188, 1–10 (2016).

Kilbride, C., Poole, J., Hutchings, T. R. A comparison of Cu, Pb, As, Cd, Zn, Fe, Ni and Mn determined by acid extraction/ICP-OES and ex situ field portable X-ray fluorescence analyses. *Environ. Pollut.* 143, 16–23 (2006).

Kirk, N. K., Mahoney, A. W., Williams, L. S., Rogers, V. C. X-Ray Fluorescence Measurements of Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn in Fruits, Vegetables and Grain Products. *J. Food Compos. Anal.* 4, 39–51 (1991).

Kirkbride, K. P. Analytical techniques. *Spectroscopic Techniques in Encyclopedia of Forensic Sciences* 179–191 (Elsevier, 2000).

Kord, B., Kord, B. Heavy metal levels in pine (*Pinus eldarica* Medw.) Tree barks as indicators of atmospheric pollution. *BioResources* 6, 927–935 (2011).

Kramar, U. X-ray Fluorescence Spectrometers. in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry 2989–2999* (Academic Press, 1999).

Krishna, A. K., Mohan, K. R., Dasaram, B., Murthy, N. N., Sudarshan, V. A Qualitative Application in Quantitative Determination of Major and Trace Elements in Plant Species Using Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry. *At. Spectrosc.* 30, 208–217 (2009).

L'Annunziata, M. F. Introduction: Radioactivity and Our Well-Being. in *Radioactivity* 1–45 (Elsevier Science B.V., 2007).

Laing, G. D., Tack, F. M. G., Verloo, M. G. Performance of selected destruction methods for the determination of heavy metals in reed plants (*Phragmites australis*). *Anal. Chim. Acta* 497, 191 – 198 (2003).

Lamble, K., Hill, S. J. Determination of Trace Metals in Tea Using Pressure and Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Analyst* 120, 413–417 (1995).

Lavilla, I., Filgueiras, A. V., Bendicho, C. Comparison of digestion methods for determination of trace and minor metals in plant samples. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5072–5077 (1999).

Lewis, S. W., Lim, K. F. Spectroscopy: Basic Principles. in *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition* 635–640 (Academic Press, 2013).

Luque de Castro, M. D., Luque García, J. L. Chapter 3 Analytical uses of ultrasounds. in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 24, 43–82 (Elsevier, 2002).

Mahapatra, N. S. An approach to the solution of matrix problems in the XRF analysis of lead-zinc ore by the use of an internal standard and mathematical corrections. *X-Ray Spectrom.* 16, 171–176 (1987).

Mairinger, F. Chapter 2 UV-, IR- and X-ray imaging. in *Non-Destructive Microanalysis of Cultural Heritage Materials* 42, 15–71 (Elsevier, 2004).

Mäkinen, E. Korhonen, M., Viskari, E. L., Haapamäki, S., Järvinen, M., Lu, L. Comparison of XRF and FAAS methods in analysing CCA contaminated soils. *Water. Air. Soil Pollut.* 171, 95–110 (2006).

Margui, E., Hidalgo, M., Queralt, I. Multielemental fast analysis of vegetation samples by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry: Possibilities and drawbacks. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 60, 1363–1372 (2005).

Marguí, E., Queralt, I., Carvalho, M. L., Hidalgo, M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. *Anal. Chim. Acta* 549, 197–204 (2005).

Marguí, E., Queralt, I., Hidalgo, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 362–372 (2009).

Marguí, E., Van Grieken, R. State-of-the-art of X-ray fluorescence instrumentation for chemical analysis. *Petro Ind. News* June/July, 16–18 (2013).

Markert, B., Breure, A., Zechmeister, H. G. *Bioindicators and Biomonitors.* (Elsevier, 2011).

Mermet, J. M. *Fundamental Principles of Inductively Coupled Plasmas. Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications* 27–60 (2006).

Mittal, R. Allawadhi, K. L., Sood, B. S., Singh, N., Kumar, A., Kumar, P. Determination of potassium and calcium in vegetables by X-ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectrom.* 22, 413–417 (1993).

Mohammed, H., Sadeek, S., Mahmoud, A. R., Zaky, D. Comparison of AAS, EDXRF, ICP-MS and INAA performance for determination of selected heavy metals in HFO ashes. *Microchem. J.* 128, 1–6 (2016).

Morgan, T. J., George, A., Boulamanti, A. K., Álvarez, P., Adanouj, I., Dean, C., Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K. Quantitative X-ray fluorescence analysis of biomass (Switchgrass, Corn Stover, Eucalyptus, Beech, and Pine Wood) with a typical commercial multi-element method on a WD-XRF spectrometer. *Energy and Fuels* 29, 1669–1685 (2015).

Morgenstern, P., Brüggemann, L., Wennrich, R. Effect of the sample matrix on measurement uncertainty in X-ray fluorescence analysis. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 60, 1373–1379 (2005).

Muia, L. M., Van Grieken. Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Analysis of Geological Materials in Borax Beads Using Tertian's Binary Coefficient Approach Combined with Internal Standard Addition. *X-Ray Spectrom.* 183, 179–183 (1991).

Mzyk, Z., Anyszkiewicz, J., Gorewoda, T. Special tablets containing cellulose binder and Sr internal standard for simplifying X-ray fluorescence analysis of powder samples. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 114, 15–19 (2015).

Nascentes, C. C., Korn, M., Arruda, M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchem. J.* 1, 37–43 (2001).

Nečemer, M., Kump, P., Ščančar, J., Jačimović, R., Simčič, J., Pelicon, P., Budnar, M., Jeran, Z., Pongrac, P., Regvar, M., Vogel-Mikuš, K. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 63, 1240–1247 (2008).

Nesvizhevsky, V., Villain, J. The discovery of the neutron and its consequences (1930–1940). *Comptes Rendus Physique* 18, 592–600 (2017).

Omote, J., Kohno, H., Toda, K. X-Ray fluorescence analysis utilizing the fundamental parameter method for the determination of the elemental composition in plant samples. *Anal. Chim. Acta* 307, 117–126 (1995).

Orlić, J., Gržetić, I., Goessler, W., Braeuer, S., Časlavský, J., Pořízka, J., Ilijević, K. Artificial cellulose standards as calibration standards for wavelength-dispersive X-ray fluorescence analysis of elements in plant samples. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 502, 106–117 (2021).

Orlić, J., Gržetić, I., Ilijević, K. Effect of sample preparation procedure on standardless wavelength dispersive X-ray fluorescence analysis of plant samples. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 184, (2021).

Ostrovnyaya, T. M. Table for identification of nuclides formed in nuclear reactors. (2000).

Oxsas. Available at: <https://www.thermofisher.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD Documents/Product Manuals & Specifications/Elemental Analysis/XRF/XR-PS41141-OXSAS XRF-Hi-0713.pdf>.

Padilla, J. T., Hormes, J., Magdi Selim, H., Selim, H. M. Use of portable XRF: Effect of thickness and antecedent moisture of soils on measured concentration of trace elements. *Geoderma* 337, 143–149 (2019).

Paltridge, N. G., Palmer, L. J., Milham, P. J., Guild, G. E., Stangoulis, J. C. R. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain. *Plant Soil* 361, 251–260 (2012).

Parmar, T. K., Rawtani, D., Agrawal, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Front. Life Sci.* 9, 110–118 (2016).

Parzych, A., Mochnacký, S., Sobisz, Z., Kurhaluk, N., Polláková, N. Accumulation of heavy metals in needles and bark of Pinus species. *Folia For. Pol. Ser. A* 59, 34–44 (2017).

Perring, L. Nicolas, M., Andrey, D., Fragnière Rime, C., Richoz-Payot, J., Dubascoux, S., Poitevin, E. Development and Validation of an ED-XRF Method for the Fast Quantification of Mineral Elements in Dry Pet Food Samples. *Food Anal. Methods* 10, 1469–1478 (2017).

Perring, L., Andrey, D. Wavelength-dispersive x-ray fluorescence measurements on organic matrices: Application to milk-based products. *X-Ray Spectrom.* 33, 128–135 (2004).

Perring, L., Andrey, D., Basic-Dvorzak, M., Hammer, D. Rapid quantification of iron, copper and zinc in food premixes using energy dispersive X-ray fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* 18, 655–663 (2005).

Perring, L., Blanc, J. EDXRF determination of iron during infant cereals production and its fitness for purpose. *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 551–555 (2007).

Pietrzykowski, M., Socha, J., van Doorn, N. S. Linking heavy metal bioavailability (Cd, Cu, Zn and Pb) in Scots pine needles to soil properties in reclaimed mine areas. *Sci. Total Environ.* 470–471, 501–510 (2014).

Pind, N. Standard-addition procedure for the determination of traces of lead in solid samples by x-ray fluorescence spectrometry. *Talanta* 31, 1118–1120 (1984).

Płotka-Wasyłka, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta* 181, 204–209 (2018).

Płotka-Wasyłka, J. Gałuszka, A., Migaszewski, Z.M., Konieczka, P., Namieśnik, J., Chojnacka, K., Mikulewicz, M. Green analytical methods of metals determination in biosorption studies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 116, 61–72 (2012).

Polkowska-Motrenko, H., Danko, B., Dybczyński, R., Koster-Ammerlaan, A., Bode, P. Effect of acid digestion method on cobalt determination in plant materials. *Anal. Chim. Acta* 408, 89–95 (2000).

Potts, P. J. X-Ray Fluorescence and Emission - X-Ray Fluorescence Theory. in *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* 408–418 (Elsevier, 2005).

Potts, P. J., Webb, P. C. X-ray fluorescence spectrometry. *J. Geochemical Explor.* 44, 251–296 (1992).

Queralt, I., Ovejero, M., Carvalho, M. L., Marques, A. F., Llabrés, J. M. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques. *X-Ray Spectrom.* 34, 213–217 (2005).

Radu, T., Diamond, D. Comparison of soil pollution concentrations determined using AAS and portable XRF techniques. *J. Hazard. Mater.* 171, 1168–1171 (2009).

Ratola, N., Alves, A., Santos, L., Lacorte, S. Pine needles as passive bio-samplers to determine polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere* 85, 247–252 (2011).

Reidinger, S., Ramsey, M. H., Hartley, S. E. Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. *New Phytol.* 195, 699–706 (2012).

Richardson, D. H. S., Shoreb, M., Hartreeb, R., Richardson, R. M. The use of X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plants, especially lichens, employed in biological monitoring. *Sci. Total Environ.* 176, 97–105 (1995).

Rinaldoni, A. N., Campderrós, M. E., Pérez Padilla, A., Perino, E., Fernández, J. E. Analytic determinations of minerals content by XRF, ICP and EEA in ultrafiltered milk and yoghurt. *Lat. Am. Appl. Res.* 39, 113–118 (2009).

Rose, J. H., Adler, I., Flanagan, F. J. X-Ray Fluorescence Analysis of the Light Elements in Rocks and Minerals. *Appl. Spectrosc.* 17, 81–85 (1963).

Rouillon, M., Taylor, M. P. Can field portable X-ray fluorescence (pXRF) produce high quality data for application in environmental contamination research? *Environ. Pollut.* 214, 255–264 (2016).

Rousseau, R. M. Detection Limit and Estimate of Uncertainty of Analytical XRF Results. 18, 33–47 (2001).

Rousseau, R. M., Willis, J. P., Duncan, A. R. Practical XRF Calibration Procedures for Major and Trace Elements. *X-Ray Spectrom.* 25, 179–189 (1996).

Rudman, R. A Practical Guide for the Preparation of Specimens for X-ray Fluorescence and X-ray Diffraction Analysis (Buhrke, V. E.; Jenkins, R.; Smith, D. K.). *J. Chem. Educ.* 76, 762 (1999).

Sahuquillo, A., Rigol, A., Rauret, G. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 22, 152–159 (2003).

Salvador, M. J., Lopes, G. N., Nascimento Filho, V. F., Zucchi, O. L. A. D. Quality control of commercial tea by x-ray fluorescence. *X-Ray Spectrom.* 31, 141–144 (2002).

Samecka-Cymerman, A., Kosior, G., Kempers, A. J. Comparison of the moss *Pleurozium schreberi* with needles and bark of *Pinus sylvestris* as biomonitors of pollution by industry in Stalowa Wola (southeast Poland). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 108–117 (2006).

Sampling, Storage and Sample Preparation Procedures for X ray Fluorescence Analysis of Environmental Materials. (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1997).

Sardans, J., Peñuelas, J. Trace element accumulation in the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. and the trees *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. in Catalonia. *Chemosphere* 60, 1293–1307 (2005).

Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Tsigaridas, K. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environ. Pollut.* 159, 3560–3570 (2011).

Schramm, R. X-ray Fluorescence Analysis: Practical and easy. Fluxana (2012).

Serbula, S. M., Kalinovic, T. S., Ilic, A. A., Kalinovic, J. V., Steharnik, M. M. Assessment of airborne heavy metal pollution using *Pinus* spp. and *Tilia* spp. *Aerosol Air Qual. Res.* 13, 563–573 (2013).

Shaltout, A. A., Moharram M. A., Mostafa N. Y. Wavelength dispersive X-ray fluorescence analysis using fundamental parameter approach of *Catha edulis* and other related plant samples. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 67, 74–78 (2012).

Shaltout, A. A., Welz, B., Ibrahim, M. A. Influence of the grain size on the quality of standardless WDXRF analysis of river Nile sediments. *Microchem. J.* 99, 356–363 (2011).

Shrivastava, A., Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* 2, 21 (2011).

Sitko, R. Quantitative X-ray fluorescence analysis of samples of less than ‘infinite thickness’: Difficulties and possibilities. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 64, 1161–1172 (2009).

Skonieczna, J., Małek, S., Polowy, K., Węgiel, A. Element content of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stands of different densities. *Drewno* 57, 77–87 (2014).

Skoog, D. A., Holler, J. F., Nieman, T. A. Principles of instrumental analysis. (Saunders College Pub.; Harcourt Brace College Publishers, 1998).

Smallman, R. E., Ngan, A. H. W. Characterization and Analysis. in *Modern Physical Metallurgy* 159–250 (Butterworth-Heinemann, 2014).

Smith, F. E., Arsenault, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta* 43, 1207–1268 (1996).

Squires, G. L. Introduction to the Theory of Thermal Neutron Scattering. (Cambridge University Press, 2012).

Stephens, W. E., Calder, A. Analysis of non-organic elements in plant foliage using polarised X-ray fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 527, 89–96 (2004).

Sun, F., Wen, D., Kuang, Y., Li, J., Li, J., Zuo, W. Concentrations of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in needles of Masson pine (*Pinus massoniana* L.) growing nearby different industrial sources. *J. Environ. Sci.* 22, 1006–1013 (2010).

Taftazani, A., Roto, R., Ananda, N. R., Murniasih, S. Comparison of NAA, XRF, and ICP-OES methods on analysis of heavy metals in coals and combustion residues. *Indones. J. Chem.* 17, 228–237 (2017).

Tertian, R., Claisse, F. Principles of Quantitative X-ray Fluorescence Analysis. (Heyden, 1982).

Terzano, R. Denecke M. A., Falkenberg G., Miller B., Paterson D., Janssens K. Recent advances in analysis of trace elements in environmental samples by X-ray based techniques (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 91, 1029–1063 (2019).

Tezotto, T., Favarin, J. L., Neto, A. P., Gratão, P. L., Azevedo, R. A., Mazzafera, P. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). *Scientia Agricola* 70, 263–267 (2013).

Thaisa, A. S. G, De Gusmão, R. P., De Sousa, S., Moreira Cavalcanti Mata, M. E. R., Duarte, M. E. M., De Figueiredo, R. M. Moreira, F., R. T. Mineral content in French type bread with sodium replacement using fluorescence spectrometry X-rays by energy dispersive. *African J. Biotechnol.* 14, 3333–3339 (2015).

Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS.* (2004).

Thompson, M. Standard additions: myth and reality. *Anal. Methods Comm.* 1–2 (2009).

Tousi, E. T., Firoozabadi, M. M. & Shiva, M. Determination of the thorium potential in Shah-Kooh area in Iran by NAA and comparison with the results of ICP and XRF techniques. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* 90, 20–24 (2016).

Towett, E. K., Shepherd, K. D., Lee Drake, B., Shepherd, D., Drake, B. L. Plant elemental composition and portable X-ray fluorescence (pXRF) spectroscopy: Quantification under different analytical parameters. *X-Ray Spectrom.* 45, 117–124 (2016).

Trueman, C. *Geochemistry - Inorganic.* in *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* 171–181 (Elsevier, 2005).

Turner, A., Chan, C. C., Brown, M. T. Application of field-portable-XRF for the determination of trace elements in deciduous leaves from a mine-impacted region. *Chemosphere* 209, 928–934 (2018).

UniQuant®. Available at: <http://www.uniquant.com/>. (Accessed: 3rd November 2021)

Van Grieken, R. Preconcentration methods for the analysis of water by X-ray spectrometric techniques. *Anal. Chim. Acta* 143, 3–34 (1982).

Vanhoof, C., Corthouts, V., Tirez, K. Energy-dispersive X-ray fluorescence systems as analytical tool for assessment of contaminated soils. *J. Environ. Monit.* 6, 344–350 (2004).

Vergel, K., Zinicovscaia, I., Yushin, N., Frontasyeva, M. V. Heavy Metal Atmospheric Deposition Study in Moscow Region, Russia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103, 435–440 (2019).

Verhey, L. J., Petti, P. L. Principles of Radiation Physics. in *Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology* 95–119 (W.B. Saunders, 2010).

Wilschefski, S. C., Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin. Biochem. Rev.* 40, 115–133 (2019).

Wu, C. M., Tsai, H. T., Yang, K. H., Wen, J. C. How Reliable is X-Ray Fluorescence (XRF) Measurement for Different Metals in Soil Contamination? *Environ. Forensics* 13, 110–121 (2012).

Биографија аутора

Јована П. Орлић је рођена 02.12.1990. године у Београду, Република Србија. Основну и средњу школу завршила је у Београду. Основне академске студије на студијском програму „Хемија животне средине“ на Хемијском факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2009/10. године, а дипломирала је 2013. године са просечном оценом 8,29 (осам и 29/100). Мастер академске студије на студијском програму „Мастер хемичар“ уписала је школске 2013/14. године, а мастер тезу је одбранила у децембру 2014. године са просечном оценом 9,25 (девет и 25/100). Докторске академске студије на студијском програму „Доктор хемијских наука“ при Катедри за примењену хемију на Хемијском факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2015/16. године. Све програмом предвиђене испите положила је са просечном оценом 10,00 (десет и 0/100). Од марта 2015. до септембра 2019. је била запослена у Иновационом центру Хемијског факултета Универзитета у Београду као чланица пројекта Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије, број 176006 „Геохемијска испитивања седиментних стена – фосилна горива и загађивачи животне средине”. Од септембра 2019. године је запослена на Хемијском факултету Универзитета у Београду као истраживач сарадник.

Јована Орлић је учесница *COST* акција *CA15226 (Climate-Smart Forestry in Mountain Regions)* и *CA18130 (European Network for Chemical Elemental Analysis by Total Reflection X-Ray Fluorescence)*. Била је чланица *TEMPUS (Network for education and training for public environmental laboratories – NETREL)* и *Erasmus⁺ (ICT Networking for Overcoming Technical and Social Barriers in Instrumental Analytical Chemistry education – NETCHEM)* пројеката. Јована Орлић је била учесница билатералног пројекта Министарства просвете и технолошког развоја Републике Србије и Владе Републике Словачке „Стање загађености земљишта и узорака хране у Србији и Словачкој“. Током учешћа на билатералном пројекту Министарства просвете и технолошког развоја Републике Србије и Немачке службе за академску размену (DAAD) „Елементи ретких земаља у крастним бокситима и продуктима њихове прераде“ боравила је месец дана (септембар 2019.) на Лајбниц Универзитету у ХанOVERу, Немачка (*Leibniz University Hannover, Germany*). У оквиру билатералне сарадње са Обједињеним институтом за нуклеарна истраживања (*JINR*) боравила је три месеца (од маја до јула 2019.) у Франковој лабораторији за неутронску физику Обједињеног института за нуклеарна истраживања у Дубни, Русија.

Јована Орлић је 2018. године била добитница стипендије за учешће на конференцији *EMEC19 (19th European Meeting of Environmental Chemistry)* у Ројату, Француска (*Royat, France*) од стране Асоцијације за хемију и животну средину (*ACE - Association of Chemistry and Environment*), док је 2019. године освојила награду за најбољу постерску презентацију на конференцији *EMEC20 (20th European Meeting on Environmental Chemistry)* у Лођу, Пољска.

Јована Орлић је 2015. године учествовала у одржавању курса “*X-ray fluorescence*” у оквиру четвртог *YES Meeting* (организованог од стране *SAC Europe* и истраживачке станице

Петница) и курса „Одређивање емергентних и *WFD* приоритетних загађујућих супстанци применом *HPLC*“ у оквиру *NETREL* пројектна Факултету техничких наука Универзитета у Новом Саду 2016. године. На Хемијском факултету Универзитета у Београду учествовала је у одржавању курсева на основним (Основи хемије атмосфере и загађујуће супстанце у ваздуху, Неорганске загађујуће супстанце и Хемија вода и отпадних вода) и мастер студијама (Мониторинг у животној средини). Јована Орлић је учествовала у реализацији и изради многобројних завршних и мастер радова на Катедри за примењену хемију.

Од како се бави научно-истраживачким радом, Јована Орлић је објавила и учествовала у изради девет научних радова објављених у међународним часописима (један из М21а категорије, четири из М21 категорије и по два из М22 и М23 категорија), од чега је првопотписани аутор на три рада, док је на два рада аутор за корсеподенцију. Три научна рада су проистекла из докторске дисертације (по један рад из категорија М21, М22 и М23). Јована Орлић је имала двадесет два саопштења на научним скуповима (по један из М33 и М63 категорија, петнаест из М34 категорије и пет из М64 категорије), од чега четири проистекла из докторске дисертације (три саопштења из М34 и једно из М64 категорије).

Објављени и саопштени радови који чине део дисертације:

Рад у врхунском међународном часопису (M21):

Jovana Orlić, Ivan Gržetić, Konstantin Ilijević (2021) Effect of sample preparation procedure on standardless wavelength dispersive X-ray fluorescence analysis of plant samples, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 184, 106258 <https://doi.org/10.1016/j.sab.2021.106258> (IF₂₀₂₀ = 3,752)

Рад у међународном часопису (M22):

Jovana Orlić, Ivan Gržetić, Walter Goessler, Simone Braeuer, Josef Caslavský, Jaromír Porížka, Konstantin Ilijević (2021) Artificial cellulose standards as calibration standards for wavelength-dispersive X-ray fluorescence analysis of elements in plant samples, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 502, 106–117 <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2021.06.012> (IF₂₀₂₀ = 1,377)

Рад у међународном часопису (M23):

Jovana Orlić, Mira Aničić Urošević, Konstantin Vergel, Inga Zinicovscaia, Sanja Stojadinović, Ivan Gržetić, Konstantin Ilijević (2021) Comparison of non-destructive techniques and conventionally used spectrometric techniques for determination of elements in plant samples (coniferous leaves), *Journal of the Serbian Chemical Society*. <https://doi.org/10.2298/JSC210921101O> (IF₂₀₂₀ = 1,240)

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34):

1 **Jovana Orlić, Konstantin Ilijević, Slađana Savić, Nenad Zarić, Ivan Gržetić (2018)** *Optimization of the plant sample preparation procedure for metal analysis using Wavelength Dispersive X-Ray Spectroscopy (WDXRF)*, 19th European Meeting on Environmental Chemistry, Royat, France, 4-6th December, Book of Abstracts, p. 134.

2. **Jovana Orlić, Konstantin Ilijević, Ivan Gržetić (2019)** *Cellulose as a universal matrix for inorganic plant composition analysis using WD-XRF: accuracy testing*, 20th European Meeting on Environmental Chemistry, Lodz, Poland, 2-5th December, Book of Abstracts, p. 162.

3. **Jovana Orlić**, Mira Aničić Urošević, Konstantin Vergel, Inga Zinicovscaia, Sanja Stojadinović, Konstantin Ilijević, *Comparison of ICP-MS, ICP-OES, INAA, and WDXRF techniques in measuring elements in coniferous needles samples*, The 21th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC21) 30rd to 3th of December 2021, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p.93

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64):

1. **Jovana Orlić**, Marija Krstić, Teodora Krsmanović, Konstantin Ilijević, Ivan Gržetić (2018) *Ispitivanje potencijala celuloze kao univerzalnog matriksa za analizu metala u biljkama pomoću WD-XRF*, EnviroChem 2018, Kruševac, Srbija, May 30. - June 01., 2018, Book of Abstracts p. 69.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јована Орлић

Број индекса: ДХ14/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно

дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (*WD-XRF*) и поређење са другим

спектрометријским техникама

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Орлић

Број индекса ДХ14/2015

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (WD-XRF) и поређење са другим спектрометријским техникама

Ментор др Константин Илијевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (*WD-XRF*) и поређење са другим спектрометријским техникама

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јована Орлић

Број индекса: ДХ14/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно

дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (WD-XRF) и поређење са другим

спектрометријским техникама

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 30.12.2021.

Потпис аутора

Јована Орлић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Орлић

Број индекса ДХ14/2015

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (WD-XRF) и поређење са другим спектрометријским техникама

Ментор др Константин Илијевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 30.12.2021.

Јована Орлић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: Развијање и оптимизација метода одређивања метала у биљкама помоћу таласно дисперзивне рендгенско флуоресцентне спектрометрије (WD-XRF) и поређење са другим спектрометријским техникама која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 30.12.2021.

Јована Орнџић