

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Alexandra Hadbavníková

STANOVENIE MEDI V POTRAVINOVÝCH DOPLNKOCH
METÓDOU AAS

Stanovení mědi v potravinových doplňcích metodou AAS

Determination of Copper in Food Supplements by AAS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 7.8.2020

Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. za vedenie, trpezlivosť a čas, ktorý mi počas merania venoval, a za poskytnutie odborných vedomostí a rád. Tiež by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľom za možnosť štúdia a veľkú podporu .

Abstrakt SK

Táto bakalárska práca sa zaoberá stanovením medi v podobe med'natých iónov v zvolených potravinových doplnkoch metódou atómovej absorpčnej spektrometrie. Prvým krokom experimentu bolo nájdenie optimálnych podmienok merania pre parametre: výška lúča nad hranou horáka, horizontálna poloha horáka, prietoková rýchlosť paliva, uhol natočenia horáka a šírka spektrálneho intervalu. Následne bola určená kalibračná závislosť a vypočítané základné charakteristiky merania: opakovateľnosť, citlivosť, limit detekcie ($0,019 \text{ mg dm}^{-3}$) a limit stanoviteľnosti ($0,065 \text{ mg dm}^{-3}$) pri polohe horáka 0° . Pre výskyt prvkov železa, mangánu a sodíka vo vybraných potravinových doplnkoch vo zvýšenej koncentrácii boli vykonané interferenčné štúdie. Analyzované boli potravinové doplnky: Spektrum 50+, Supradyn Energy Complex, Centrum od A až po železo, GS Extra Strong Multivitamin, Caltrate Plus, DAS Gesunde Plus A-Z Multispektrum a Calibrium 50 Plus. Vybrané vzorky boli prevedené do vodných roztokov tromi spôsobmi, a to rozkladom vo vode pri laboratórnej teplote, v kyseline dusičnej pri laboratórnej teplote a v kyseline dusičnej pri zvýšenej teplote. Samotné stanovenie medi bolo vykonané pomocou spektrometru GBC 933 AA a výsledky štatisticky spracované. Experimentálne stanovené množstvo medi bolo porovnané s množstvom uvedeným výrobcom. Ako najvhodnejší spôsob rozkladu sa ukázalo použitie kyseliny dusičnej pri zvýšenej teplote, kedy výsledky analýzy najpresnejšie zodpovedali deklarovaným množstvám a tak je atómová absorpčná spektrometria vhodnou metódou pre stanovenie obsahu medi v potravinových doplnkoch.

Kľúčové slová

Med', potravinové doplnky, atómová absorpčná spektrometria, optimalizácia, rozklad vzorky

Abstrakt CZ

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením mědi v podobě měďnatých iontů ve zvolených potravinových doplňcích metodou atomové absorpční spektrometrie. Prvním krokem experimentu bylo nalezení optimálních podmínek měření pro parametry: výška paprsku nad hranou hořáku, horizontální poloha hořáku, průtoková rychlost paliva, úhel natočení hořáku a šířka spektrálního intervalu. Následně byla určena kalibrační závislost a vypočítané základní charakteristiky měření: opakovatelnost, citlivost, limit detekce ($0,019 \text{ mg dm}^{-3}$) a limit stanovitelnosti ($0,065 \text{ mg dm}^{-3}$) při poloze hořáku 0° . Pro výskyt prvků železa, manganu a sodíku ve vybraných potravinových doplňcích ve zvýšené koncentraci byly provedeny interferenční studie. Analyzované byly potravinové doplňky: Spektrum 50, Supradyn Energy Complex, Centrum od A až po železo, GS Extra Strong Multivitamin, Caltrate Plus, DAS Gesunde Plus A-Z Multispektrum a Calibrium 50 Plus. Vybrané vzorky byly převedeny do vodných roztoků třemi způsoby, a to rozkladem ve vodě za laboratorní teploty, v kyselině dusičné za laboratorní teploty a v kyselině dusičné za zvýšené teploty. Samotné stanovení mědi bylo provedeno pomocí spektrometru GBC 933 AA a výsledky statisticky zpracovány. Experimentální stanovené množství mědi bylo porovnáno s množstvím uvedeným výrobcem. Jako nejvhodnější způsob rozkladu se ukázalo použití kyseliny dusičné za tepla, kdy se výsledky analýzy nejvíce shodovaly s deklarovaným množstvím. Atomová absorpční spektrometrie je vhodnou metodou pro stanovení obsahu mědi v potravinových doplňcích.

Klíčová slova

Měď, potravinové doplňky, atomová absorpční spektrometrie, optimalizace, rozklad vzorku

Abstrakt EN

This bachelor thesis deals with the determination of copper in the form of copper ions in selected food supplements by atomic absorption spectrometry. The first step of the experiment was to find the optimal measurement conditions for the parameters: beam height above the burner edge, burner horizontal position, fuel flow rate, burner angle and spectral interval width. Subsequently, the calibration dependence was determined and the basic measurement characteristics were calculated: repeatability, sensitivity, limit of detection (0.019 mg dm^{-3}) and limit of quantification (0.065 mg dm^{-3}) at the burner position 0° . Interference studies were performed for the presence of iron, manganese and sodium elements in selected food supplements because of their increased concentrations. These selected food supplements were analysed: Spektrum 50, Supradyn Energy Complex, Center from A to iron, GS Extra Strong Multivitamin, Caltrate Plus, DAS Gesunde Plus, A-Z Multispektrum and Calibrium 50 Plus. Selected samples were converted to solutions using three procedures: decomposition in water at room temperature, decomposition in nitric acid at room temperature and decomposition in nitric acid at high temperature. The determination of copper itself was performed using a GBC 933 AA spectrometer and the results were statistically processed. The experimentally determined amount of copper was compared with the amount stated by the manufacturer. The most suitable method of decomposition proved to be the use of nitric acid at high temperature, when the concentrations of copper corresponded most accurately to the declared amounts, and thus atomic absorption spectrometry is a suitable method for determining the copper content of food supplements.

Key words

Copper, food supplements, atomic absorption spectrometry, optimization, sample decomposition

Obsah

1	Úvod.....	- 9 -
1.1	Cieľ práce.....	- 9 -
2	Teoretická časť	- 10 -
2.1	Atómová absorpčná spektrometria	- 10 -
2.1.1	Princíp metódy AAS.....	- 10 -
2.1.2	Inštrumentácia	- 11 -
2.2	Med'.....	- 14 -
2.3	Potravinové doplnky	- 17 -
3	Experimentálna časť	- 18 -
3.1	Použité prístroje a zariadenia, pracovné parametre	- 18 -
3.2	Použité chemikálie	- 18 -
3.3	Charakteristika vzoriek	- 19 -
3.4	Pracovný postup.....	- 20 -
3.5	Štatistické spracovanie výsledkov	- 22 -
4	Výsledky a diskusia.....	- 25 -
4.1	Optimalizácia podmienok merania	- 25 -
4.1.1	Plameňový profil	- 25 -
4.1.2	Horizontálna poloha horáka.....	- 25 -
4.1.3	Prietoková rýchlosť paliva.....	- 26 -
4.1.4	Citlivosť horáka s uhlom natočenia.....	- 27 -
4.1.5	Vplyv šírky spektrálneho intervalu.....	- 28 -
4.2	Kalibračné stanovenie a základné charakteristiky stanovenia	- 29 -
4.3	Interferenčné štúdie.....	- 31 -
4.4	Analýza potravinových doplnkov	- 32 -
4.4.1	Rozklad vo vode pri laboratórnej teplote	- 32 -
4.4.2	Rozklad v kyseline dusičnej pri laboratórnej teplote.....	- 33 -
4.4.3	Rozklad v kyseline dusičnej pri teplote 70 °C.....	- 34 -
5	Záver.....	- 35 -
6	Použitá literatúra	- 36 -

Zoznam použitých skratiek a symbolov

AAS	Atómová absorpčná spektrometria
<i>c</i>	Koncentrácia [mol dm^{-3}]
EDL	Bezelektrodová výbojka
ET-AAS	Atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou
F-AAS	Atómová absorpčná spektrometria s plameňovou atomizáciou
<i>h</i>	Výška lúča nad hranou horáka [mm]
HCL	Výbojka s dutou katódou
LOD	Limit detekcie
LOQ	Limit stanoviteľnosti
<i>Me</i>	Medián
<i>R</i>	Rozpätie
<i>s</i>	Smerodajná odchýlka

1 Úvod

Meď je ušľachtilý kovový prvok, v prírode sa vyskytujúci hlavne vo forme sulfidov. Zároveň patrí medzi biogénne prvky a je tak nevyhnutný pre aktívne fyziologické pochody každej bunky. Podieľa sa na tvorbe mnohých enzýmov, ochrane pred voľnými radikálmi, zvýšení imunitnej obrany a nepriamo sa podieľa na krvotvorbe. Užívaním potravinových doplnkov je možné nedostatkový príjem medi vyvažovať.

V tejto práci bola na stanovenie medi vo vybraných potravinových doplnkoch použitá metóda atómovej absorpčnej spektrometrie. Tá patrí medzi významné spôsoby zisťovania prvkového zloženia látok v roztoku, ktorou je možné stanoviť viac ako 60 prvkov v periodickej tabuľke. Princíp metódy je podrobnejšie popísaný v teoretickej časti.

1.1 Cieľ práce

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo stanovenie obsahu medi metódou atómovej absorpčnej spektrometrie v siedmich potravinových doplnkoch obsahujúcich rôzne deklarované množstvá medi. K dosiahnutiu hlavného cieľa bolo potrebné vykonať nasledujúce merania:

- Optimalizácia výšky lúča nad hranou horáka, horizontálnej polohy horáka, prietokovej rýchlosti acetylénu, uhla natočenia horáka a šírky spektrálneho intervalu.
- Premeranie kalibračných roztokov a roztoku blanku pre zistenie kalibračnej závislosti a následné stanovenie limitu detekcie, limitu stanoviteľnosti, citlivosti a opakovateľnosti.
- Zistenie interferenčných vplyvov vybraných majoritných prvkov.
- Nájdenie vhodného spôsobu prevedenia potravinových doplnkov do roztoku.

2 Teoretická časť

2.1 Atómová absorpčná spektrometria

Atómová absorpčná spektrometria patrí v dnešnej dobe medzi jednu z najrozšírenejších metód stopovej prvkovej analýzy z dôvodu jej vysokej citlivosti a nízkym nákladom. V koncentračnom rozmedzí od jednotiek $\mu\text{g dm}^{-3}$ až po niekoľko desiatín g dm^{-3} stanoví všetky kovové prvky, metaloidy a aj niektoré nekovy¹. Radí sa medzi najmladšie fyzikálno-chemické metódy. V roku 1953 A. Walsh zostrojil prvý analytický atómový absorpčný spektrometer a v roku 1955 publikoval prvú prácu na tému AAS^{2,3}.

2.1.1 Princíp metódy AAS

Stanovenie metódou AAS je založené na absorpcii elektromagnetického žiarenia voľnými atómami v plynnom stave. Analyzovaná vzorka je prevedená pri vysokých teplotách do stavu voľných atómov v atomizátore za pomoci zmlžovača. Každý prvok absorbuje žiarenie charakteristickej vlnovej dĺžky s vhodnou energiou, ktorá je potrebná na presun vonkajších elektrónov atómu z jeho základného energetického stavu do excitovaného stavu. Energetický rozdiel medzi základným a excitovaným stavom musí zodpovedať kvantu pohltenej energie^{4,5}. Prechodom zo základného stavu na vyššie stavy, zodpovedajú takzvané základné rezonančné čiary, ktoré sú pre atómy jednotlivých prvkov úplne špecifické a najcitlivejšie. Atómové absorpčné spektrá nachádzame v rozmedzí vlnových dĺžok 190 - 900 nm⁶. Zrážkami s ďalšími prítomnými iónmi sa atóm vráti do základného stavu tzv. nežiarivým procesom. Následne je získaná koncentrácia voľných atómov prvku ako funkcia zoslabenia primárneho žiarenia, ktorému zodpovedá hodnota absorbancie podľa Lambert-Beerovho zákona. AAS nie je metódou absolútnou, preto je potrebné vyhodnotenie merania vykonať metódou prídavku štandardov alebo metódou kalibračnej krivky³.

2.1.2 Inštrumentácia

Hlavné komponenty atómového absorpčného spektrometra, v poradí v akom sú zaradené v optickej osi za sebou, sú:

- zdroj primárneho žiarenia - monochromatické rezonančné žiarenie analyzovaného prvku,
- atomizátor - absorpčné prostredie s voľnými atómami,
- monochromátor - izolácia rezonančných čiar primárneho žiarenia,
- detekčný systém - zmena žiarivého toku fotónov na elektrický prúd⁷.

Zdroje primárneho žiarenia

Zdroje primárneho žiarenia musia splňať špecifické požiadavky. Atómy absorbujú žiarenie iba vo veľmi úzkom spektrálnom rozsahu, $5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ nm, v ktorom je potrebné, aby mal zdroj vysokú žiarivú energiu. Následne musia vykazovať stabilnú intenzitu tejto energie, minimálne pozadie a spektrálne čiary nedeformované samoabsorpciou. V bežnej praxi je najčastejšie používaná výbojka s dutou katódou (HCL), ktorou bolo vykonané meranie aj v tejto práci, a bezelektrodová výbojka (EDL). Zdroje, ktoré v bežnej praxi nemajú veľké uplatnenie, sú vysokovýkonné kontinuálne zdroje a polovodičové laserové diódy, a to hlavne pre svoju vysokú obstarávaciu cenu^{1,8}.

HCL emitujú čiarové spektrum stanovovaného prvku. Výbojka pozostáva zo skleneného obalu, v ktorom je umiestnená katóda a anóda. Katóda je tvorená stanovovaným prvkom alebo je potiahnutá jeho fóliou. Anóda pozostáva z volfrámového alebo niklového vlákna. Vnútro výbojky je plnené inertným plynom (Ne, Ar) pod nízkym tlakom, 1 - 5 torr. Vkladanie napätia v rozmedzí 350 - 500 V medzi elektródy, vedie ku generovaniu prúdu v rozmedzí 1 - 50 mA. Výsledkom je elektrický výboj. Atómy inertného plynu sú ionizované a vznikajúce katióny urýchlene smerujú ku katóde, kde ich náraz rozprskne atómy analyzovaného prvku. Následne sú kolíziami s iónmi Ne/Ar tieto atómy excitované. Pri prechode excitovaných atómov do základného stavu je emitované špecifické žiarenie⁹.

EDL sú využívané ako zdroje primárneho žiarenia hlavne pre prvky ako arzén, olovo, selén alebo telúr, ktoré majú rezonančné línie pod 220 nm. To z dôvodu, že EDL emitujú intenzívnejšie žiarenie ako HCL, pričom si zachovávajú úzke šírky čiar. Zvýšená

intenzita žiarenia je potrebná v spomínaných rezonančných líniách prvkov, pri ktorých sa uplatňuje absorpcia žiarenia plameňom, okolitým vzduchom a optickým systémom. Výbojka pozostáva zo sklenenej banky, ktorá obsahuje zmes prvku alebo jeho halogenidu a inertného plynu. Na vytvorenie stabilného zdroja sa využíva rádiový alebo mikrovlnný generátor. Výbojka je pri rádiovom napájaní vo vnútri cievky generátora a vzniká prstencový výboj pri stenách banky zapríčínajúci vznik excitovaných atómov. Pri mikrovlnnom generátore je výbojka v rezonančnej dutine^{3,6}.

Atomizátor

Atomizátor je zariadenie, ktoré slúži na prevedenie roztoku vzorky do stavu voľných atómov, a tak nastáva absorpcia primárneho žiarenia vzorkou. Na atomizáciu sa používa plameňový, elektrotermický alebo kremenný atomizátor v spojení s technikou generovania prchavých zlúčenín⁸.

Plameňový atomizátor využíva techniku, pri ktorej je roztok vzorky zmlžovaný alebo ultrazvukovo rozprašovaný v zmlžovacej komore. Vzniknutý aerosól je zavedený spolu so zmesou paliva a oxidovadla do plameňa. Tam je vzorka atomizovaná vysokou teplotou plameňa. Stanovovaný prvok vo vzorke absorbuje jemu špecifické žiarenie v ultrafialovej alebo viditeľnej oblasti elektromagnetického spektra, ktoré je emitované zdrojom primárneho žiarenia. Porovnaním tejto absorpcie a absorpcie žiarenia štandardu známej koncentrácie môžeme vykonať kvantitatívnu analýzu prvku vo vzorke¹⁰. K zmlžovaniu je často využívaný pneumtický zmlžovač, ktorého účinnosť sa zvyšuje umiestnením nárazovej guľôčky pred jeho ústie. Plameň, v ktorom je spaľovaná zmes acetylén-vzduch sa používa ako nízkoenergetický atomizačný zdroj pre stanovenie približne 30 kovov a jeho teplota dosahuje 2250 °C. Pre stálejšie prvky, ktoré spomínaný plameň nie je schopný plne atomizovať, sa používa zmes acetylén-oxid dusný, ktorého teplota dosahuje 2700 °C. Aby rýchlosť horenia neprevýšila rýchlosť prúdenia zmesi, volí sa rôzna dĺžka štrbiny titánového horáka. Technika plameňovej atomizácie vyžaduje optimalizáciu výšky lúča nad hranou horáka, horizontálnej polohy horáka, citlivosti natočenia horáka, prietokovej rýchlosti paliva, šírky spektrálneho intervalu, a to ako dôsledok rôzneho umiestnenia atómov v plameni, teda rôzneho plameňového profilu. Optimalizáciou týchto parametrov zabezpečíme najvyššiu koncentráciu voľných iónov¹¹.

Elektrotermický atomizátor využíva k vyhrievaniu na požadovanú teplotu elektrický prúd. Je tvorený trubicou z rôznych modifikácií grafitu, obalenou v ochrannej atmosfére z argónu, ktorá ju chráni pred oxidáciou pri vyšších teplotách. Analýza vzorky prebieha v štyroch fázach. Prvá fáza vysušuje vzorku pri teplote 105 - 120 °C. Následne sa v druhej fáze termickej úpravy odstraňuje matrica v teplotnej oblasti 400 - 800 °C. Samotná atomizácia vzorky a meranie nastáva v tretej fáze, pri teplote 2500 °C. V poslednom kroku sa atomizátor čistí od zvyškov vzorky, ktorá sa v ňom môže nachádzať po atomizácii, pri teplote 2800 °C. Výhodou metódy ET-AAS oproti F-AAS je jej vyššia citlivosť, nízky detekčný limit a priama analýza pevnej vzorky. Naopak vysoké cenové náklady zaobstarania a prevádzky prístroja, spolu s vysokým vplyvom interferencií matrice, sú jej nevýhodami¹.

Kremenný atomizátor, je použitý pri technike generovania a atomizácie prchavých zlúčenín. Táto technika sa používa na analýzu prvkov ako napríklad Se, As, Sn, Pb, ktoré sú schopné vytvárať prchavé zlúčeniny, najčastejšie hydridy stanovovaného prvku. Generácia prchavých zlúčením prebieha zväčša chemickou cestou, ktorá využíva tetrahydridoboritan sodný ako redukčné činidlo v kyslom prostredí, pričom dochádza k vzniku atomárneho vodíka reagujúceho s analytom za vzniku hydridu. Ten je nosným plynom, napríklad argónom, unášaný do atomizátora, tvoreného kremennou trubicou zahrievanou plameňom alebo elektricky, kde vznikajú jednotlivé atómy analytu ako dôsledok reakcie kyslíka s vodíkom, pri ktorej sa vytvárajú vodíkové radikály. Analýza prebieha tak, ako v AAS spektrometri. Výhodou metódy je oddelenie matrice od analytu, zrýchlená doba merania pri ponechaní vysokej citlivosti. Nevýhodou je ale obmedzenie analyzovať vzorky, ktoré vytvárajú hydridy^{12,13}.

Monochromátor

Monochromátor v metóde AAS slúži ako disperzný prvok. Jeho úlohou je izolácia spektrálneho intervalu z polychromatického zdroja na získanie príslušnej absorpčnej rezonančnej čiary stanovovaného prvku. Na stanovenie sa väčšinou používa mriežkový monochromátor konštrukcie Czerny-Turner. Je tvorený holografickou mriežkou v rozsahu vlnových dĺžok 190 - 900 nm a na prenos obrazu slúži vstupná štrbina, zrkadlo a výstupná štrbina. Nimi je regulovaná šírka spektrálneho intervalu, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 0,1 - 2,0 nm, a je potrebné nastaviť tento interval na hodnotu, pri ktorej by na detektor

nedopadali neabsorbované čiarové spektrá zo zdroja žiarenia. Usporiadanie atómového absorpčného spektrometra môže byť jedno alebo dvojlúčové³.

Detekčný systém

Ako detektor prepusteného žiarenia pre meranie v AAS sa využíva fotonásobič, ktorý je tvorený fotocitlivou katódou, anódou a systémom dynód umiestnených v sklenenej banke. Pri dopade fotónov na fotokatódu sa z jej povrchu vyrážajú elektróny, a to ako dôsledok fotoelektrického javu. Vyrazené elektróny dopadajú na kaskádu dynód s vloženým rastúcim napätím, čím sa znásobuje ich počet a vytvárajú elektrický prúd. Výsledný signál sa zosilňuje a spracováva ako absorbančný údaj¹⁴.

2.2 Med'

Med' je prvok červenkastej farby, ľudmi používaný viac ako 5000 rokov. Patrí do 11. skupiny periodickej sústavy a svojou elektrickou konfiguráciou $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$ sa radí medzi prechodné prvky. Protónové číslo medi je 29 a jej relatívna molekulová hmotnosť 63,546. Jej vodivosť je druhá najvyššia v poradí za striebrom. Súčasne je dobrým tepelným vodičom¹⁵. Teplota topenia medi má hodnotu 1083 °C, teplota varu dosahuje 2595 °C a jej hustota je 8,96 g cm⁻³.

Vyskytuje sa v oxidačných stavoch od Cu⁺ až do Cu⁴⁺. Najstabilnejším je stav Cu²⁺. V prírode sa nachádza vo forme minerálov ako chalkopyrit (CuFeS₂), malachit (Cu₂(CO₃)(OH)₂), kuprit (Cu₂O), azurit (Cu₃(CO₃)₂(OH)₂) a bornit (Cu₅FeS₄), pričom v čistom stave sa vyskytuje zriedka¹⁶. Z vyššie uvedených sulfidických alebo oxidických medených rúd sa produkuje primárna med' metódou pyrometalurgie alebo hydrometalurgie. Získaná med' dosahuje čistoty 94 - 97 % a následne sa elektrolyticky rafinuje na výslednú čistotu 99,55 % medi^{17,18}.

Pre svoje výhodné vlastnosti a schopnosť tvoriť zliatiny s mnohými prvkami je med' rozmanite využívaná v rozličných odvetviach. Vysoká elektrická vodivosť umožňuje použitie medi v elektropriemysle, a to ako medené drôty pre rozvod energie do domácností, ako navinutá cievka sa môže nachádzať v elektromotoroch a v neposlednom rade ju vieme použiť v integrovaných obvodoch. Ako výborný tepelný vodič sa aplikuje pri výrobe napríklad chladičov a kotlov. Pre všetky zmienené produkty je dôležité, že med'

vykazuje vysokú odolnosť voči korózii, keďže pôsobením vzdušnej vlhkosti a CO_2 pokryje svoj povrch zelenkastou vrstvou medenky ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$). Uplatňuje sa tak aj v klampiarstve pri výrobe odkvapov, striech alebo parapet a pri výrobe šperkov¹⁹.

Meď a jej úloha v organizme

Vzhľadom na tému bakalárskej práce stanovenia medi v potravinových doplnkoch, bude venovaná pozornosť v teoretickej časti významu medi v ľudskom organizme, jej fyziológii a patofyziológii.

Ako stopový prvok je meď v organizme zastúpená v množstve 0,10 - 0,15 g. Nachádza sa v oxidovanom stave ako Cu^{2+} alebo v redukovanom stave ako Cu^+ . Jej koncentrácia nie je v celom tele rovnomerná, najvyšší obsah je v pečeni a mozgu, najnižší v žalúdku. Priemerná denná dávka pre dospelého jedinca by mala dosahovať hodnotu 1 mg. Získava sa z potravín, kde je meď viazaná v organických komplexoch (aminokyseliny, peptidy, proteíny). Morské ryby, bravčové a hydinové mäso, strukoviny, zemiaky alebo orechy patria medzi potraviny s najvyšším obsahom medi²⁰.

V tele je meď vstrebávaná hlavne v hornej časti tenkého čreva pomocou difúzie alebo pri jej nedostatku pomocou aktívneho transportu. V krvnom obehu je transportovaná vo forme Cu^{2+} pomocou prenášačov (napr. ceruloplasmin, albumín). Na bunkovom povrchu je cytochrom b reduktasou meď redukovaná na meďnaté ióny, a následne prenesená do cytosolu bunky transmembránovými prenášačmi, kde je využívaná na tvorbu enzýmov. Nepotrebná meď je vylučovaná z organizmu stolicou²¹.

V ľudskom organizme plní meď funkciu kofaktora tzv. metaloenzýmov. Patria tam napríklad:

- superoxiddismutasa, ktorá chráni vnútorné prostredie bunky pred oxidačnými procesmi odstraňovaním voľných radikálov,
- aminooxidasa, zodpovedajúca za pigmentáciu vlasov a pokožky,
- cytochrom c oxidasa ako dôležitý metaloprotein mitochondrii, zúčastňujúci sa posledného kroku bunkového dýchania,
- ceruloplasmin, ako najdôležitejší transportný proteín medi v krvnej plazme, ktorý zároveň katalyzuje oxidáciu Fe^{2+} iónov na Fe^{3+} , ktoré je transferín schopný preniesť krvným obehom do tkanín. Tak sa meď nepriamo podieľa na krvotvorbe²².

Nedostatok medi, ktorý môže byť dôsledkom dlhodobého nízkeho príjmu z potravy, nedostatočnou absorpciou medi, nízkej hladiny pri narodení a naopak zvýšenej spotreby v priebehu dospievania, sa v organizme prejavuje zvýšenou hladinou cholesterolu, zníženej tolerancie glukózy, poruchou metabolizmu železa, či srdečnou arytmiou. Nedostatok medi sa vyskytuje iba v ojedinelých prípadoch. Nadbytok medi môže byť dôsledkom nadmernej absorpcie medi alebo poruchou jej vylučovania, poškodením činnosti obličiek alebo nadmerným užívaním doplnkov stravy. Jej toxicita sa riadi mechanizmom tvorby kyslíkových radikálov a zároveň sa redukujú meďnaté ióny viazané v komplexoch. Prejavia sa symptómy ako zvracanie, nevoľnosť, hnačka a anémia. Najznámejšie dedičné ochorenie metabolizmu medi je Wilsonova choroba. Pacient nie je schopný vylučovať meď z organizmu, čo zapríčiňuje jej akumuláciu v tkanivách. Prejavuje sa hlavne neurologickými poruchami (napr. kŕče, poruchy koordinácie) a poškodením činnosti pečene (napr. cirhóza pečene, chronická hepatitída)^{23,24}.

Stanovenie medi

Analytické stanovenie medi je možné vykonať viacerými metódami.

Nepriame jodometrické stanovenie medi funguje na princípe reakcie medzi meďnatými iónmi s nadbytkom jodidu v neutrálnom alebo slabom kyslom prostredí, pričom vzniká elementárny jód, ktorého množstvo sa zistí titráciou odmerným roztokom thiosíranu sodného. Bod ekvivalencie je indikovaný vizuálne pomocou samotného roztoku jódu (pri znižovaní jeho koncentrácie nastáva farebný prechod červenej na žltú). Pridávaním škrobu, ktorý následne farbí roztok do modra alebo hnedá, sa citlivosť indikácie zvyšuje²⁵.

Chelatometrické stanovenie sa zaraďuje medzi komplexometrické titrácie, keďže vznikajú stabilné komplexné zlúčeniny reakciou meďnatých iónov s chelatónom 3. Bod ekvivalencie je indikovaný pomocou metalochromného indikátora – murexid. Ten s meďnatými iónmi vytvára menej stabilnejší komplex žltej farby a v momente, keď je meď kompletne viazaná s chelatónom, sa v alkalickom prostredí sfarbí voľný indikátor na modro – fialovo⁸.

Elektrograviterické a coulometrické stanovenie sú metódy pri ktorých dochádza k elektrolýze jednosmerným elektrickým prúdom. Meď je vylučovaná na platinovej elektróde katalytickou redukciou. Obsah medi sa následne určí z prírastku hmotnosti katódy pri elektrogravimetrii a z veľkosti náboja ktorý prešiel elektródou pri coulometrii²⁶.

Optické metody stanovenia medi boli v tejto bakalárskej práci použité a sú detailnejšie popísane v kapitole 2.1 *Atómová absorpčná spektrometria*.

2.3 Potravinové doplnky

Potravinové doplnky sú charakterizované ako potraviny, ktoré sa odlišujú od bežných potravín vysokým obsahom vitamínov, minerálnych látok alebo látok poskytujúcich telu iné nutričné alebo fyziologické výhody. Sú určené ku konzumácii v rôznych tuhých alebo tekutých formách. Ich primárny účel je spestrenie a doplnenie stravy konzumentov.

Na rozdiel od liekov, ktoré sú schvaľované Štátnym ústavom pre kontrolu liečiv (SÚKL), podliehajú doplnky stravy potravinovým predpisom. V Českej republike spadajú pod vyhlášku 58/2018 Sb, ktorá upravuje požiadavky na zloženie potravinových doplnkov, ich označovanie a spôsob použitia a podmienky pre pridávanie ďalších látok do potravín s výnimkou potravinových doplnkov. Ich propagácia nesmie obsahovať tvrdenie výslovne uvádzajúce, že vyvážená strava neposkytuje dostatočné množstvo živín. Ďalej výrobca nemôže tvrdiť ani poukazovať, že potravinové doplnky sú schopné prevencie alebo liečby ochorení. Samotná účinnosť daného doplnku stravy nie je kontrolovaná, takže bez ohľadu na pravdivosť tvrdení, je možné tieto účinky použiť pri reklame a predaji daného výrobku.

Medzi formy medi, možných pre použitie výroby potravinových doplnkov, patrí uhličitan meďnatý, citronan meďnatý, glukonan meďnatý, síran meďnatý a komplex medi a lyzínu^{27,28}.

3 Experimentálna časť

3.1 Použité prístroje a zariadenia, pracovné parametre

GBC 933 AA

Meď vo vybraných potravinových doplnkoch, bol stanovovaná pomocou spektrometru GBC 933 AA od spoločnosti GBC Scientific Equipment Pty Ltd., AUS. Spektrometer bol pre vyhodnotenie získaných dát pripojený k počítaču. Zdrojom žiarenia bola výbojka s dutou katódou pre stanovenie medi. Vlnová dĺžka použitá pri meraniach bola 324,7 nm, prúd výbojky bol nastavený na hodnotu 5,0 mA a analýza bola vykonaná v plameni acetylén-vzduch. Vyhodnotením výsledkov optimalizačných meraní boli následné analýzy merané pri výške lúča nad hranou horáka 5 mm, prietokovej rýchlosti acetylénu $2,0 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, šírke spektrálneho intervalu 0,2 nm a 0° otočením horáka od paralelného usporiadania.

Elmasonic E30H

Na rozpustenie vzoriek pri zvýšenej teplote bola použitá ultrazvuková vodná kúpeľ Elmasonic E30H od spoločnosti Elma Schmidbauer GmbH, DEU.

Milli-Q Plus

Na prípravu deionizovanej vody bol použitý prístroj Milli-Q plus od spoločnosti Millipore, USA.

3.2 Použité chemikálie

Štandardný roztok meďnatých iónov ($c = 1,0 \text{ g dm}^{-3}$, dusičnan meďnatý v $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny dusičnej, Merck spol. s.r.o., DEU), deionizovaná voda z prístroja Milli-Q plus, kyselina dusičná 65%, p.a. (Lach-Ner spol. s.r.o., ČR), zásobný roztok železa ($c = \text{g dm}^{-3}$, Merck spol. s.r.o., DEU), zásobný roztok mangánu ($c = 1,0 \text{ g dm}^{-3}$, Merck spol. s.r.o., DEU), zásobný roztok sodíka ($c = 1,0 \text{ g dm}^{-3}$, ANALYTIKA spol. s.r.o., ČR).

3.3 Charakteristika vzoriek

Pre účely stanovenia medi v tejto bakalárskej práci boli pre experiment vybrané nasledujúce potravinové doplnky:

Vzorka č.1: Spektrum 50+

Spektrum 50+ od spoločnosti Walmark a.s., ČR je komplexný multivitamín s minerálmi, určený pre ľudí nad 50 rokov. Pomáha zachovať fyzickú a duševnú vitalitu, správnu funkciu imunitného systému, dodáva telu základné vitamíny a minerály, znižuje únavu a pre obohatenie výťažkom koreňa ženšenu podporuje činnosť pamäti. Vitamíny a stopové prvky obsiahnuté v prípravku pochádzajú z organických zdrojov. V tablete svetlo ružovej farby oválneho tvaru a približnej hmotnosti 1,40 g je deklarovaná hodnota medi 1 mg.

Vzorka č.2: Supradyn Energy Complex

Doplnok stravy Supradyn Energy Complex od spoločnosti Bayer s.r.o, ČR, je určený na konzumáciu od veku 12 rokov a obsahuje celý rad vitamínov, minerálov a stopových prvkov prispievajúcich k normálnej funkcii imunitného systému, energetického metabolizmu a psychickej činnosti. Šumivá tableta svetlo žltej farby okrúhleho tvaru, približnej hmotnosti 4,55 g, deklaruje hodnotu medi 1 mg.

Vzorka č.3: Centrum od A až po železo

Výživový doplnok Centrum od A až po železo od spoločnosti Pfitzer Corporation, AUT, je doporučený pre dospelé osoby a neobsahuje lepok ani cukor. Napomáha normálnemu metabolizmu, chráni pred oxidatívnym stresom, podporuje imunitný systém a prispieva k ochrane kože a očí. Svetlo modrá tableta oválneho tvaru a približnej hmotnosti 1,38, deklaruje hodnotu medi 0,5 mg.

Vzorka č.4: GS Extra Strong Multivitamin

GS Extra Strong Multivitamín od spoločnosti Green Swan Pharmaceuticals ČR, a. s., je určený pre osoby staršie ako 12 rokov, obsahujúci komplexné a vyvážené zloženie aktívnych látok, vitamínov a minerálov. Pomáha bojovať proti únave, podporuje metabolizmus, činnosť nervovej sústavy a pozitívne ovplyvňuje kožu, vlasy a nechty.

V svetlo ružovej tablete oválneho tvaru a približnej hmotnosti 1,50 g je deklarovaná hodnota medi 1 mg.

Vzorka č.5: Caltrate Plus

Prípravok Caltrate Plus od spoločnosti Pfizer Corporation, AUT, je určený pre osoby staršie ako 12 rokov. Vďaka zvýšenému obsahu vápnika a vitamínu D sa používa na prevenciu osteoporózy, aj na doplnenie vyššie uvedených látok a ďalších minerálov pri liečbe osteoporózy a zároveň je vhodný doplnok ku hormonálnej liečbe žien v období menopauzy. Oválna tableta staroružovej farby a približnej hmotnosti 1,76 g má deklarovanú hodnotu medi 1 mg.

Vzorka č.6: DAS Gesunde Plus A-Z Multispektrum

Výrobok DAS Gesunde Plus A-Z Multispektrum od spoločnosti GmbH & Co. KG, DEU, sa vyznačuje dlhodobým uvoľňovaním a obsahuje 21 vitamínov, minerálov, koenzým Q10 a luteín. Je vhodný pre osoby staršie ako 50 rokov. V tablete svetlo krémovej farby a približnej hmotnosti 1,41 g je deklarovaná nulová hodnota medi.

Vzorka č.7: Calibrum 50 Plus

Calibrum 50 Plus od spoločnosti Zentiva a.s, ČR, je určený pre osoby staršie ako 12 rokov. V tablete sa nachádza 13 vitamínov, beta karotén, 15 minerálov, ginkgo biloba a ženšen. Jeho užívanie je doporučené pri tráviacich ťažkostiach, príjme nevyváženej stravy, nadmernej fyzickej a duševnej námahe, pri zvýšenej potrebe vitamínov u fajčiarov, ženám užívajúcim antikoncepčné tablety a osobám trpiacim infekčnými ochoreniami. Tmavo ružová tableta oválneho tvaru a približnej hmotnosti 1,65 g deklaruje hodnotu medi 0,5 mg.

3.4 Pracovný postup

Optimalizácia podmienok merania

Na začiatku experimentu bolo potrebné minimalizovať interferenčné vplyvy matrice a zvýšiť citlivosť merania. Získané tak boli optimálne podmienky merania na dosiahnutie čo najpresnejších výsledkov. Zo zásobného roztoku medi s koncentráciou $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ bol pripravený štandardný roztok medi s koncentráciou $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$. V priebehu meraní bola

na prípravu štandardných roztokov a vzoriek použitá zmes 5,0 ml 65% HNO₃ s 1000 ml deionizovanej vody, tzv. stabilizačný roztok. Následne boli optimalizované parametre:

- výška lúča nad hranou horáka,
- horizontálna poloha horáka,
- prietoková rýchlosť acetylénu,
- citlivosť horáka s uhlom natočenia,
- šírka spektrálneho intervalu.

Kalibrácia AAS a základné charakteristiky stanovenia

Ďalším krokom experimentu bolo vykonať kalibráciu metódy AAS. Zo zásobného roztoku medi s koncentráciou 1,0 mg dm⁻³ bolo pripravených 9 kalibračných roztokov s koncentraciami 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 a 100 mg dm⁻³. Kalibračné roztoky boli merané pri šírkach spektrálneho intervalu s hodnotami 0,2; 5,0; 1,0; 2,0 nm. V tomto kroku boli roztoky následne premerané s uhlom otočenia horáka o 90° pri šírke spektrálneho intervalu s najvyššou odozvou.

Pre základné charakteristiky stanovenia bol zo zásobného roztoku medi s koncentráciou 1,0 g dm⁻³ pripravený roztok s koncentráciou medi 2,5 mg dm⁻³ a roztok blanku, ktoré boli premerané 20×.

Interferenčné štúdie

Zo stanovovaných potravinových doplnkov boli pre interferenčné štúdie vybrané ióny vyskytujúce sa vo zvýšenej koncentrácii. Boli to ióny železa, mangánu a sodíka. Pre meranie bola pripravená pre každý interferent sada 4 roztokov s koncentráciou interferentu 0; 5,0; 50 a 500 mg dm⁻³. V každom roztoku bola koncentrácia medi 5 mg dm⁻³. Meranie prebehlo pri optimálnych podmienkach.

Príprava vzoriek k analýze

Rozklad jednotlivých vzoriek potravinových doplnkov bol uskutočnený tromi spôsobmi, pričom výsledné roztoky boli merané na spektrometri GBC 933 AA a namerané hodnoty štatisticky spracované.

Ako prvé prebehlo rozpúšťanie v deionizovanej vode pri laboratórnej teplote. Potravinové doplnky boli pomocou deionizovanej vody rozpustené v 50ml Erlenmayerových bankách. Vzniknuté roztoky boli kvantitatívne prevedené do 100ml odmerných bánk, doplnené po risku a prefiltrované. Pre namerané hodnoty výsledných roztokov, ktoré boli vyššie ako hodnoty kalibračnej závislosti, stanovenej pomocou kalibračných roztokov medi s koncentraciami 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 mg dm⁻³, boli roztoky príslušných vzoriek ešte 10× zriedené.

Druhý rozklad v poradí bol uskutočnený pomocou 65% kyseliny dusičnej pri laboratórnej teplote. Vzorky boli v Erlenmayerových bankách rozpustené v 30 ml kyseliny dusičnej. Roztoky boli kvantitatívne prevedené do 100ml odmerných bánk, zriedené deionizovanou vodou až po risku a prefiltrované. Pre namerané hodnoty, ktoré boli opäť vyššie ako hodnoty kalibračnej závislosti stanovenej pomocou vyššie uvedených kalibračných roztokov, boli vybrané roztoky vzoriek opäť 10× zriedené.

Ako posledné boli potravinové doplnky rozpúšťané v Erlenmayerových bankách pomocou 30 ml 65% kyseliny dusičnej pri teplote 70 °C vo vodnom kúpeli Elmasonic E30H. Roztoky boli kvantitatívne prevedené do 100ml odmerných bánk, zriedené deionizovanou vodou po risku a prefiltrované. Pre výsledné hodnoty, ktoré boli opäť vyššie ako hodnoty kalibračnej závislosti, boli vybrané roztoky vzoriek 10× zriedené.

3.5 Štatistické spracovanie výsledkov

Na docielenie objektívneho záveru pri vyhodnocovaní výsledkov získaných z experimentálneho merania boli použité štatistické metódy. Každé meranie bolo opakované 3× na docielenie dostatočnej presnosti a následne boli vykonané tieto štatistické výpočty:

Medián, $Me(X)$

Medián je stredná hodnota výsledkov merania. Hodnoty sú zoradené vzostupne do radu a pri nepárnom počte výsledkov s malým počtom, kedy je $n < 7$, bude medián definovaný ako hodnota nachádzajúca sa uprostred tohto radu. V prípade párneho počtu, je medián definovaný ako aritmetický priemer dvoch prostredných výsledkov.

Rozpätie, R

Rozpätie predstavuje rozdiel medzi najväčšou a najmenšou hodnotou meraného súboru.

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (3.1)$$

Kde: x_{max} - najvyššia hodnota súboru, x_{min} - najnižšia hodnota súboru.

Smerodajná odchýlka, s

Smerodajná odchýlka sa rovná druhej odmocnine podielu z rozptylu a počtom meraní bez jedna.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.2)$$

Kde: n - počet meraní, x_i - výsledok merania, Σ - súčet hodnôt.

Pre malý počet meraní sa smerodajná odchýlka matematicky vypočíta podľa rovnice:

$$s = k_n \times R \quad (3.3)$$

Kde: k_n - tabelovaná hodnota pre každé n (v našom meraní bolo za k_n dosadená hodnota 0,5908, pretože boli stále vykonané 3 merania), R - rozpätie

Limit detekcie, LOD

Limit detekcie je charakterizovaný ako najnižšia koncentrácia analytu, ktorej signál môžeme s istotou odlíšiť od analytického šumu. Matematicky sa vypočíta ako trojnásobok šumu základnej línie.

$$LOD = 3 \times s_{sum} \quad (3.4)$$

Kde: s_{sum} - smerodajná odchýlka 20× opakovaného merania vzorku, ktorý obsahoval nízku koncentráciu analytu.

Limit stanoviteľnosti, LOQ

Limit stanoviteľnosti je charakterizovaný ako najnižšia koncentrácia, pri ktorej môžeme spoľahlivo detegovať a zároveň číselne vyjadriť analyt s vopred stanovenou nepresnosťou. Matematicky sa vypočíta ako desaťnásobok šumu základnej línie.

$$LOQ = 10 \times s_{\text{šum}} \quad (3.5)$$

Kde: $s_{\text{šum}}$ - smerodajná odchýlka $20\times$ opakovaného merania vzorky, obsahujúcej nízku koncentráciu analytu.

Citlivosť

Citlivosť metódy charakterizuje zmenu odozvy zariadenia odpovedajúcej zmene podnetu. Vypočíta sa z rovnice lineárnej závislosti, kde sa rovná smernici. Citlivosť sa mení s koncentráciou analytu, v prípade že kalibračná závislosť nie je lineárna.

Opakovateľnosť, O

Opakovateľnosť udáva mieru podobnosti výsledkov opakovaného merania rovnakého analytu pri rovnakých podmienkach v krátkom časovom intervale, na rovnakom prístroji a rovnakom mieste. Vypočíta sa ako relatívna smerodajná odchýlka súboru $20\times$ opakovaného merania vhodnej koncentrácie analytu.

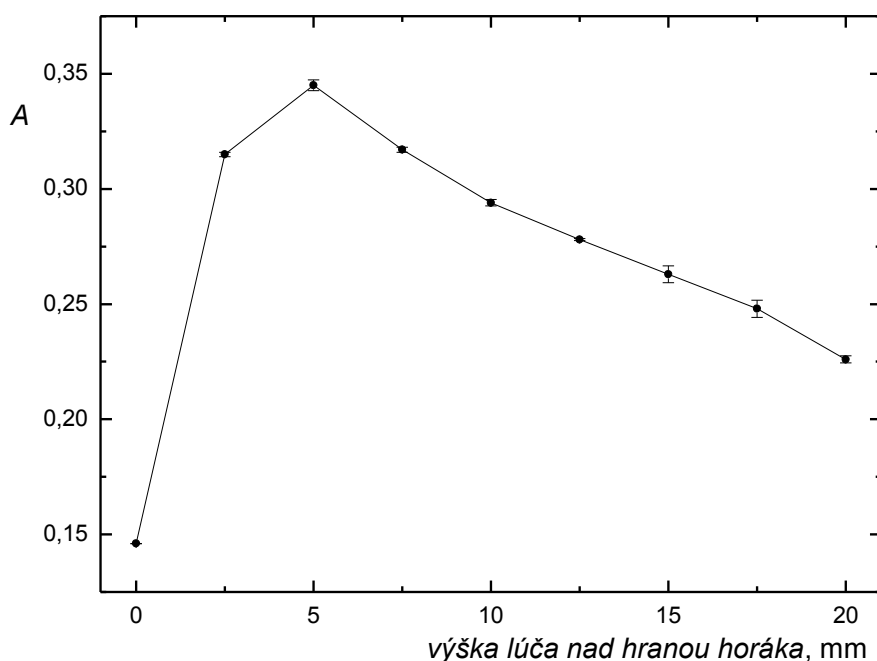
$$O = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3.6)$$

4 Výsledky a diskusia

4.1 Optimalizácia podmienok merania

4.1.1 Plameňový profil

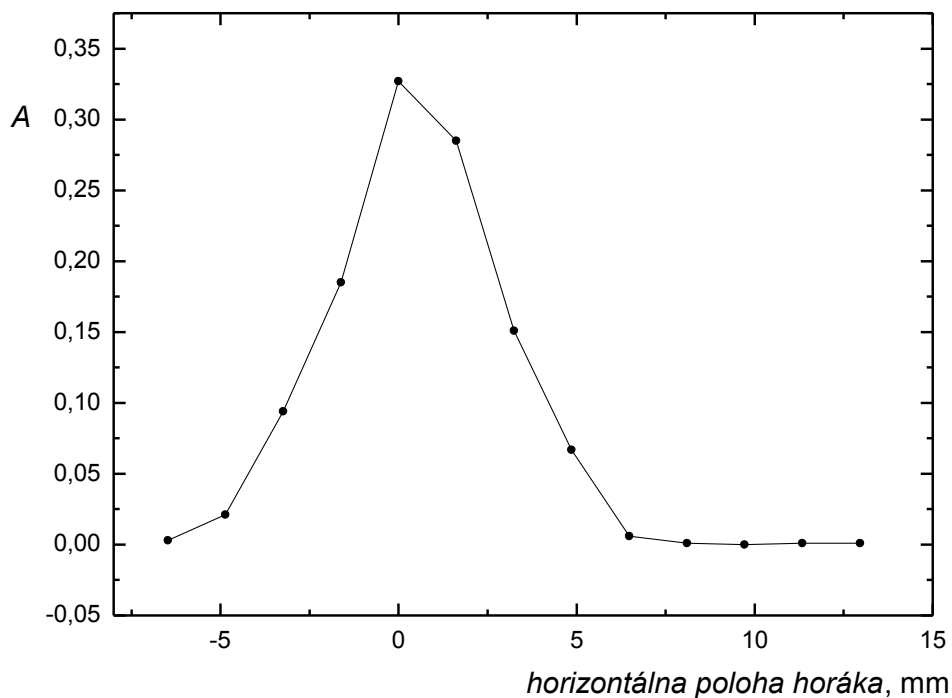
V prvom kroku optimalizácie bola zisťovaná závislosť absorpcie na výške lúča nad hranou horáka. Pre meranie bol použitý zásobný roztok medi s koncentráciou $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$. Závislosť absorpcie bola premeraná v rozmedzí polôh horáka 25 mm. Výsledky sú zobrazené na *Obr. 4.1*. Optimálna absorpcia bola odmeraná pri výške horáka 5 mm. Táto poloha bola neskôr použitá pre vlastné meranie.



Obr. 4.1.: Závislosť absorpcie na polohe výšky horáka ($c_{\text{Cu}} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, $\lambda = 324,7 \text{ nm}$, $u_{\text{acetylén}} = 2,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$)

4.1.2 Horizontálna poloha horáka

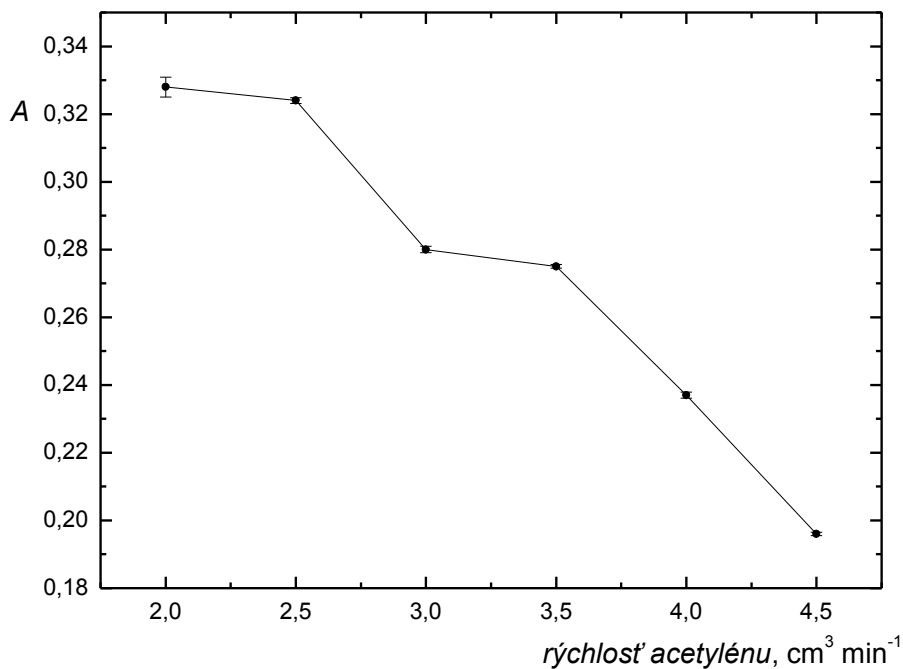
Optimalizáciou horizontálnej polohy horáka bola meraná najvyššia odozva absorpcie v závislosti lúča primárneho zdroja žiarenia a polohy štrbiny horáka pod lúčom. Na meranie bol použitý zásobný roztok medi s koncentráciou $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, pri nastavenej výške horáka 5 mm, v rozmedzí otáčok 0 - 23 otočení v rozmedzí 18 mm. Výsledky sú zobrazené na *Obr. 4.2*. a vyplýva z nich, že presne v mieste priechodu lúča žiarenia stredom plameňa bola citlivosť najvyššia.



Obr. 4.2.: Závislosť absorbancie na horizontálnej polohe horáka ($c_{\text{Cu}} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, $\lambda = 324,7 \text{ nm}$, $u_{\text{acetylén}} = 2,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $h = 5 \text{ mm}$)

4.1.3 Prietoková rýchlosť paliva

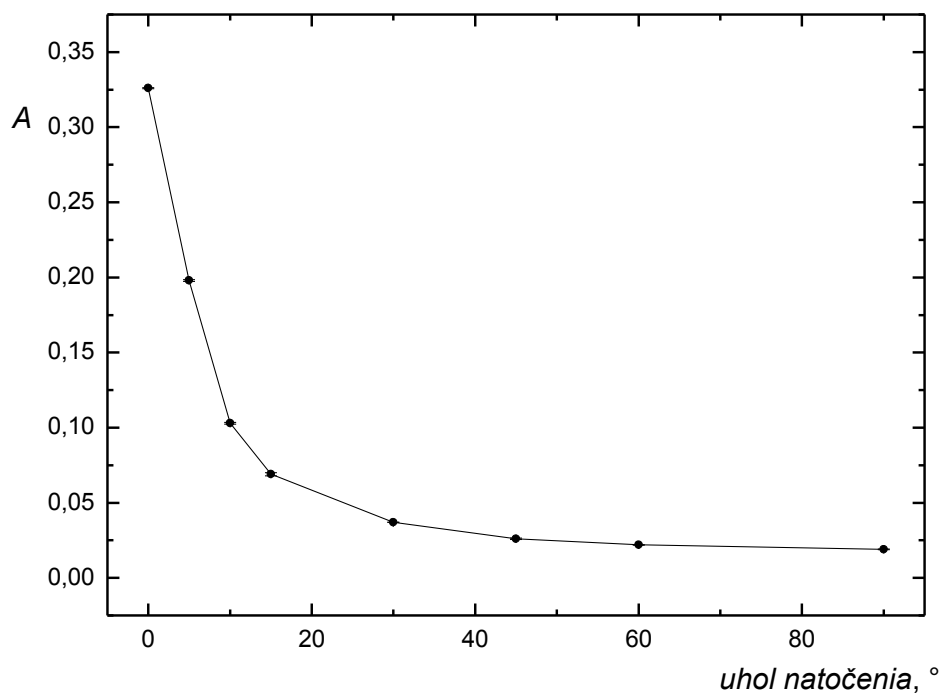
V nasledujúcom kroku bola meraná optimálna rýchlosť prietoku zvoleného paliva, acetylénu. Na meranie bol použitý zásobný roztok medi s koncentráciou $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, pri nastavenej výške horáka 5 mm, v rozmedzí rýchlosti 1,8 až $4,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Výsledky sú zobrazené na Obr. 4.3. Optimálna absorbancia bola odmeraná pri rýchlosti prietoku acetylénu $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Táto poloha bola neskôr použitá pre vlastné meranie.



Obr. 4.3.: Závislosť absorbanie na prietokovej rýchlosti acetylénu ($c_{\text{Cu}} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, $\lambda = 324,7 \text{ nm}$, $h = 5 \text{ mm}$)

4.1.4 Citlivosť horáka s uhlom natočenia

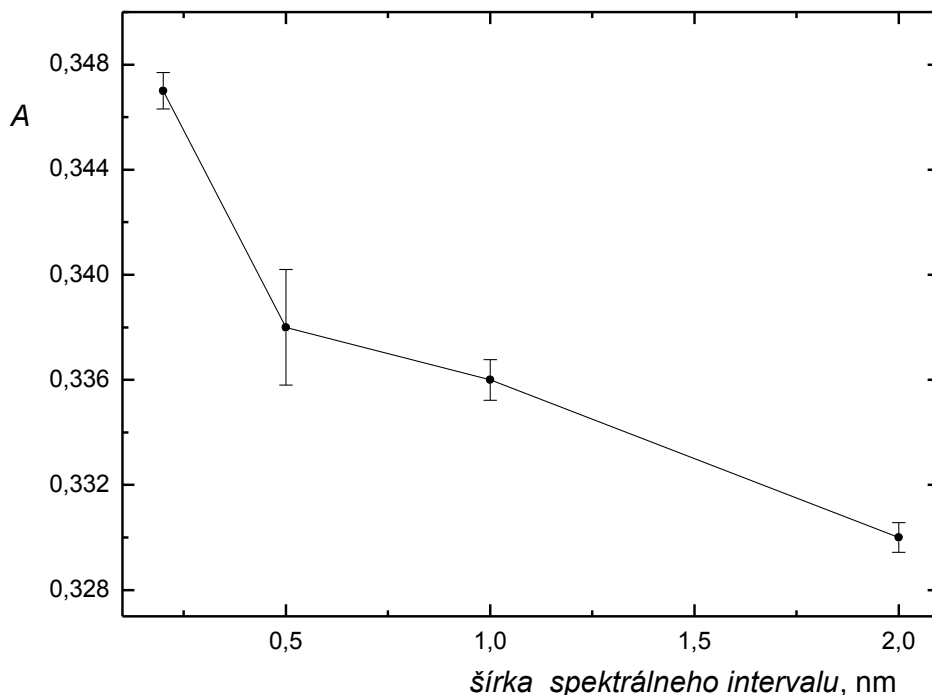
V tomto kroku bola meraná závislosť absorbanie vzhľadom na polohu otočenia štrbiny horáka oproti lúču z primárneho zdroja žiarenia. Na meranie bol použitý zásobný roztok medi s koncentráciou $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, pri nastavenej výške horáka 5 mm , rýchlosti prietoku acetylénu $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, v rozmedzí 0 až 90° . Výsledky sú zobrazené na Obr. 4.4.. Optimálna absorbanca bola odmeraná pri 0° . Táto poloha bola neskôr použitá pre vlastné meranie.



Obr. 4.4.: Závislosť absorbancie na uhol horáka ($c_{\text{Cu}} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, $\lambda = 324,7 \text{ nm}$, $u_{\text{acetylén}} = 2,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $h = 5 \text{ mm}$)

4.1.5 Vplyv šírky spektrálneho intervalu

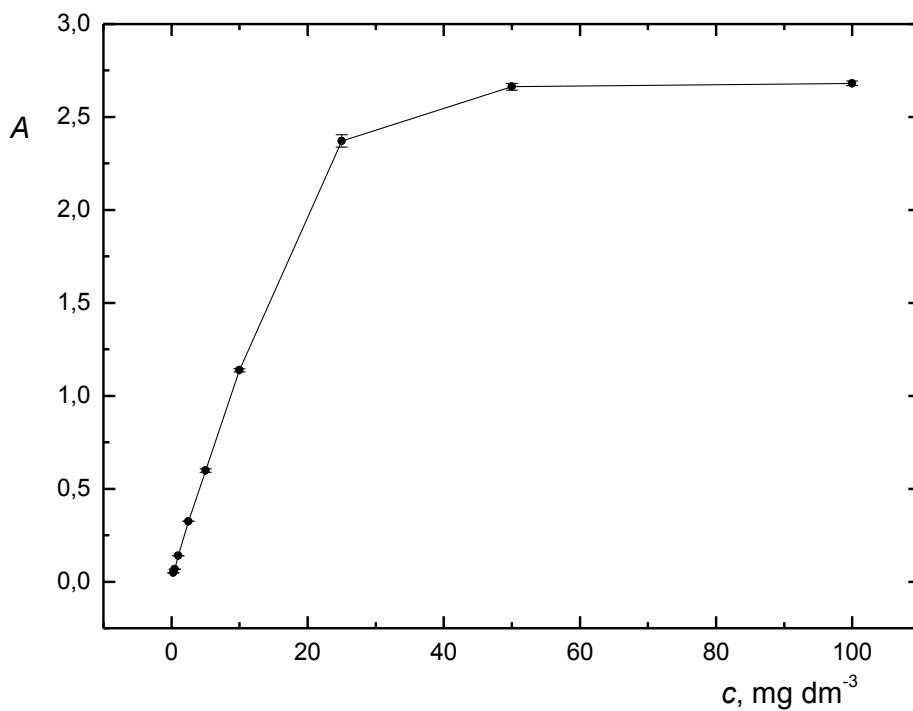
V poslednom kroku optimalizácie bola meraná závislosť absorbancie na šírke spektrálneho intervalu monochromátora. Na meranie bol použitý zásobný roztok medi s koncentráciou $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, pri nastavenej výške horáka 5 mm , rýchlosti prietoku acetylénu $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, pri uhle natočenia 0° , pre hodnoty šírky intervalu $0,2$; $0,5$; $1,0$; $2,0$. Výsledky sú zobrazené na Obr. 4.5. Optimálna absorbancia bola odmeraná pri šírke $0,2 \text{ nm}$, ktorá bola neskôr použitá pre vlastné meranie.



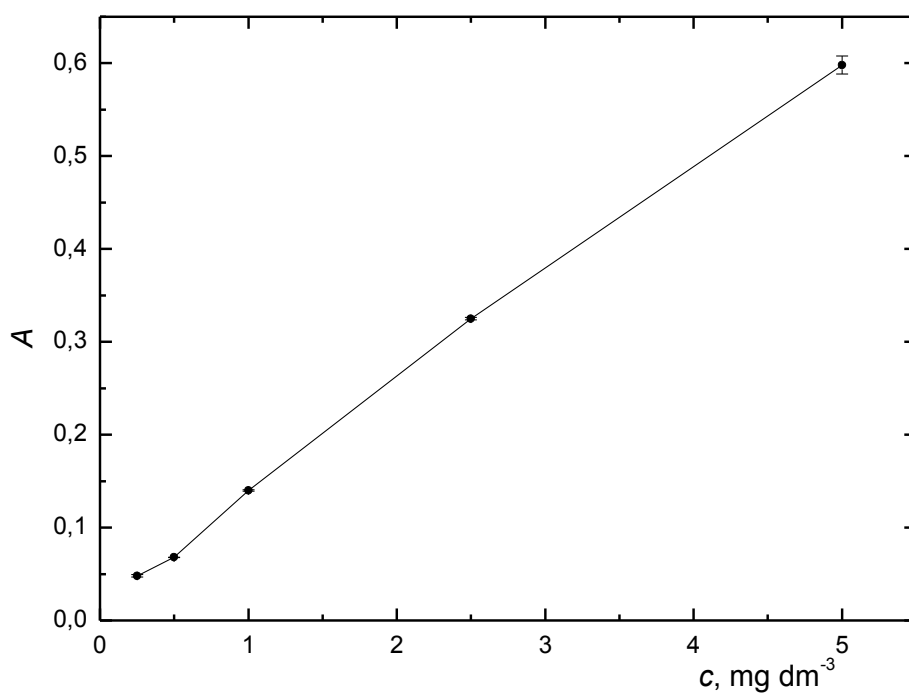
Obr. 4.5.: Závislosť absorbanie na šíрку spektrálneho intervalu monochromátora ($c_{\text{Cu}} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, $\lambda = 324,7 \text{ nm}$, $u_{\text{acetylén}} = 2,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $h = 5 \text{ mm}$)

4.2 Kalibračné stanovenie a základné charakteristiky stanovenia

Po optimalizácii boli odmerané hodnoty signálov pre roztoky s koncentráciou 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 a 100 mg dm^{-3} , v rozmedzí širok spektrálneho intervalu 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 nm. Na základne týchto hodnôt bola zostrojená kalibračná závislosť absorbanie na koncentracii pre jednotlivé hodnoty širok a po spracovaní výsledkov vyplynulo, že šířka spektrálneho intervalu výsledky merania neovplyvňuje vo významnej miere a na ďalšie merania bola zvolená šířka spektrálneho intervalu 0,2 nm (Obr. 4.6.).



Obr. 4.6.: Kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii medi pri šírke spektrálneho intervalu 0,2 nm. ($\lambda = 324,7$ nm, $u_{\text{acetylén}} = 2,0$ cm³ min⁻¹, $h = 5$ mm)



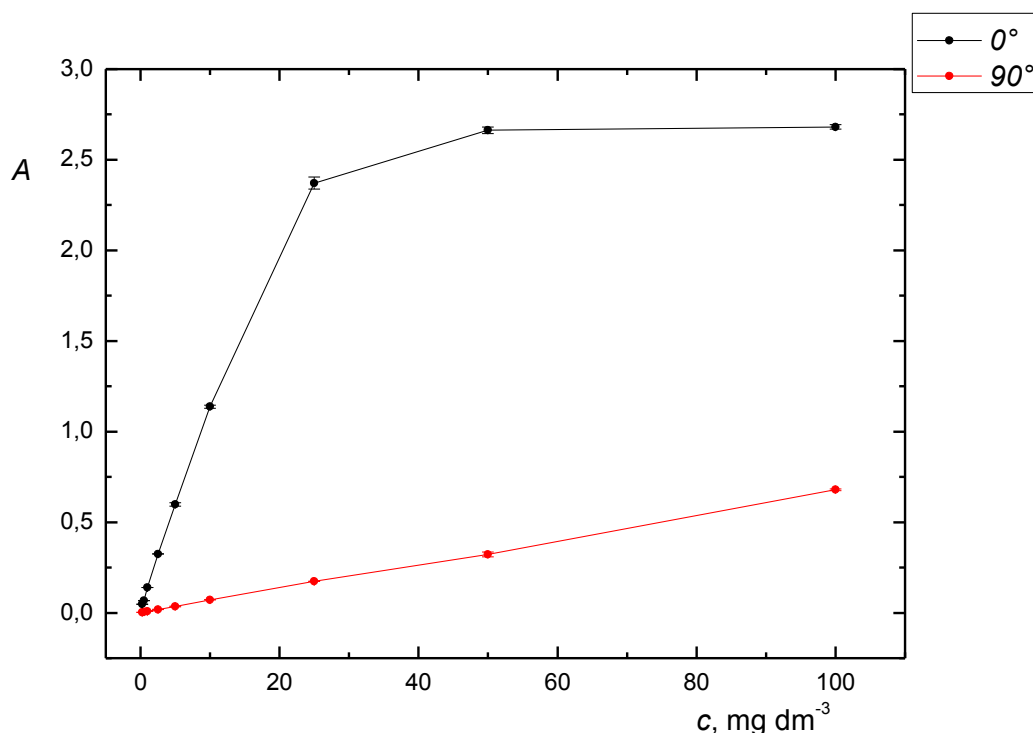
Obr. 4.7.: Lineárna kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii medi pri šírke spektrálneho intervalu 0,2 nm. ($\lambda = 324,7$ nm, $u_{\text{acetylén}} = 2,0$ cm³ min⁻¹, $h = 5$ mm)

Zo získaných hodnôt lineárnej časti kalibračnej krivky (Obr. 4.7) a hodnôt 20× meraných roztokov s koncentráciou 0 mg dm^{-3} a $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$, boli spracované základné charakteristiky stanovenia (viď Tab. 4.1).

Tab. 4.1.: Základné charakteristiky stanovenia medi metódou F- AAS

Charakteristika	Cu
opakovateľnosť [%]	0,20
citlivosť [$\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1}$]	0,123
limit detekcie [mg dm^{-3}]	0,019
limit stanoviteľnosti [mg dm^{-3}]	0,065
lineárny dynamický rozsah [mg dm^{-3}]	0,25 – 5,00

Pri kalibrácii bola zároveň meraná závislosť absorbancie na koncentrácii roztokov pri otočení štrbiny horáka oproti lúču z primárneho zdroja žiarenia o 90° . Hodnoty boli merané pri šírke spektrálneho intervalu $0,2 \text{ nm}$. Výsledky sú zobrazené na Obr. 4.7..



Obr. 4.8.: Kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii medi. ($\lambda = 324,7 \text{ nm}$, $u_{\text{acetylén}} = 2,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $h = 5 \text{ mm}$, $\nu = 0,2 \text{ nm}$)

4.3 Interferenčné štúdie

V ďalšom kroku experimentu boli vykonané interferenčné štúdie, ktoré mali určiť účinok ďalších prvkov nachádzajúcich sa v potravinových doplnkoch na presnosť

a citlivosť meraní. Vybrané testované interferenty boli Fe, Mn a Na. Každý interferent bol meraný zvlášť v sadách roztokov s koncentráciami 0; 5,0; 50 a 500 mg dm⁻³, pričom koncentrácia medi mala v každom roztoku konštantnú hodnotu 5 mg dm⁻³. Vyhodnotením výsledkov bolo zistené, že prítomnosť daných prvkov zníži odozvu detektora o maximálne 10 %. Bolo možné usúdiť, že zmena signálu v tomto rozsahu nebude prispievať k výraznej zmene výsledkov meraní.

4.4 Analýza potravinových doplnkov

Samotná analýza vybraných potravinových doplnkov prebehla pri zistených optimálnych podmienkach merania (kapitola 4.1 *Optimalizácia podmienok merania*). Rozklad a príprava vzoriek bola vykonaná v súlade s postupom práce (kapitola 3.4 *Pracovný postup*), pričom výsledne roztoky boli namerané pri 10 násobnom zriedení. To bolo zahrnuté vo finálnych výpočtoch. Výsledky meraní a štatistické výpočty boli vyhodnotené počítačom pripojeným ku spektrometru.

4.4.1 Rozklad vo vode pri laboratórnej teplote

Pri laboratórnej teplote prebiehal rozklad reálnych vzoriek v 100 ml deionizovanej vody. Výsledné hodnoty boli spracované (viď Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Experimentálne stanovené hodnoty potravinových doplnkov a výrobcom uvedené množstvo medi pri rozklade vo vode pri laboratórnej teplote.

Vzorky	Deklarované množstvo medi v tablete [mg]	Experimentálne stanovené množstvo medi [mg]
Spektrum 50+	1,0	1,08 ± 0,01
Supradyn Energy Complex	1,0	1,31 ± 0,01
Centrum od A až po železo	0,5	0,33 ± 0,01
GS Extra Strong Multivitamin	1,0	---
Caltrate Plus	1,0	---
DAS Gesunde Plus	- *	---
Calibrium 50 Plus	0,5	---

* Pre potravinový doplnok DAS Gesunde Plus výrobca nedeklaruje žiadne množstvo medi.

Z nameraných hodnôt možno vyvodit', že šumivá tableta vzorky Supradyn Energy Complex je vo vode najlepšie rozpustná, pričom jej stanovené množstvo prevyšovalo to deklarované výrobcom. Pre tento jav je potrebné prihliadnuť na rôznorodosť matrice jednotlivých tabliet, ktorá mohla spôsobovať interferencie, poprípade nie je možné vylúčiť vyššiu hodnotu medi v danej tablete. Naopak, pre vzorky GS Extra Strong multivitamin, Caltrate Plus a Calibrium 50 plus boli experimentálne zistené koncentrácie pohybujúce sa pod limitom detekcie a tak nebolo možné vypočítať množstvo medi v týchto tabletách. Rozpustenie vzoriek vo vode bolo nedostatočné a postup rozkladu potravinových doplnkov vo vode pri laboratórnej teplote môžeme označiť ako neúčinný.

4.4.2 Rozklad v kyseline dusičnej pri laboratórnej teplote

Následne pri laboratórnej teplote prebiehal rozklad reálnych vzoriek v 65% kyseline dusičnej a výsledné hodnoty boli spracované (viď Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Experimentálne stanovené hodnoty potravinových doplnkov a výrobcom uvedené množstvo medi pri rozklade v kyseline dusičnej pri laboratórnej teplote.

Vzorky	Deklarované množstvo medi v tablete [mg]	Experimentálne stanovené množstvo medi [mg]
Spektrum 50+	1,0	1,09 ± 0,01
Supradyn Energy Complex	1,0	1,23 ± 0,01
Centrum od A až po železo	0,5	0,53 ± 0,01
GS Extra Strong Multivitamin	1,0	0,73 ± 0,03
Caltrate Plus	1,0	1,03 ± 0,01
DAS Gesunde Plus	- *	0,03 ± 0,00
Calibrium 50 Plus	0,5	0,51 ± 0,01

* Pre potravinový doplnok DAS Gesunde Plus výrobca nedeklaruje žiadne množstvo medi.

Z výsledkov pri rozklade tabliet v kyseline dusičnej pri laboratórnej teplote možno usúdiť, že s výnimkou vzorky GS Extra Strong Multivitamin, boli merané hodnoty vyššie ako hodnoty uvedené výrobcom. Znížené stanovené množstvo u tejto tablety mohlo byť spôsobené chybou pri rozklade na roztok alebo deklarované množstvo výrobcom je chybné. V prípade výrobku DAS Gesunde Plus, ktorej výroba obsah medi neuvádza, bola nameraná nízka hodnota, ktorej pravdepodobnou príčinou bol rozmanitý obsah matrice

tablety. Z výsledných hodnôt meraní, ktoré v rozmedzí $\pm 0,25$ mg zodpovedajú deklarovaným množstvám výrobcu, možno tento postup rozkladu s použitím metódy AAS pokladať za vhodný pre stanovenie medi vo vybraných potravinových doplnkoch.

4.4.3 Rozklad v kyseline dusičnej pri teplote 70 °C

Pri zvýšenej teplote o hodnote 70 °C prebiehal rozklad reálnych vzoriek v 65% kyseline dusičnej a výsledné hodnoty spracované (viď *Tab. 4.4*).

Tab. 4.4: Experimentálne stanovené hodnoty potravinových doplnkov a výrobcom uvedené množstvo medi pri rozklade v kyseline dusičnej pri 70°C .

Vzorky	Deklarované množstvo medi v tablete [mg]	Experimentálne stanovené množstvo medi [mg]
Spektrum 50+	1,0	1,05 \pm 0,03
Supradyn Energy Complex	1,0	1,15 \pm 0,04
Centrum od A až po železo	0,5	0,56 \pm 0,01
GS Extra Strong Multivitamin	1,0	1,07 \pm 0,02
Caltrate Plus	1,0	0,96 \pm 0,01
DAS Gesunde Plus	- *	0,03 \pm 0,01
Calibrium 50 Plus	0,5	0,66 \pm 0,01

* Pre potravinový doplnok DAS Gesunde Plus výrobca nedeklaruje žiadne množstvo medi.

Pri poslednom meraní sú stanovené výsledky podobné hodnotám zisteným z predošlého rozkladu. Všetky experimentálne množstvá, s výnimkou prípravku Caltrate Plus, boli vyššie ako množstvo udané výrobcom. Stanovené hodnoty pri rozklade vzoriek v kyseline dusičnej pri 70 °C sú podobné deklarovaným množstvám v rozmedzí $\pm 0,15$ mg, a tak opäť možno tento postup rozkladu s použitím metódy AAS považovať za vhodný pre stanovenie medi vo vybraných potravinových doplnkoch. Nízka nameraná hodnota pre doplnok Das Gesunde Plus poukazuje na vplyv matrice produktu.

5 Záver

Zameraním tejto bakalárskej práce bolo stanovenie obsahu medi metódou atómovej absorpčnej spektrometrie v siedmich potravinových doplnkoch obsahujúcich rôzne deklarované množstvá medi.

Súčasťou práce bolo zistenie optimálnych podmienok merania. Stanovené parametre boli: výška lúča nad hranou horáka, horizontálna poloha horáka, prietoková rýchlosť acetylénu, uhol natočenia horáka a šírka spektrálneho intervalu. Následne boli premerané kalibračné roztoky a roztok blanku, z ktorých bola zistená kalibračná závislosť a stanovený limit detekcie, limit stanoviteľnosti, citlivosť a opakovateľnosť, pričom z výsledkov bolo možné zhodnotiť, že uvedený prístroj a vybraná metóda vyhovuje pre stanovenie medi vo vybraných potravinových doplnkoch. Pri interferenčných štúdiách bolo zistené, že vybrané interferenty (Fe, Mn, Na) výrazne neovplyvnia výsledky stanovení.

V záverečnej časti práce boli vybrané potravinové doplnky prevedené do roztokov tromi spôsobmi. V deionizovanej vode pri laboratórnej teplote, v kyseline dusičnej pri laboratórnej teplote a v kyseline dusičnej pri zvýšenej teplote. Získané roztoky boli prefiltrované, zriedené a následne prebehla samotná analýza. Rozklad v deionizovanej vode pri laboratórnej teplote je možné považovať za nevhodný, keďže až u troch vzoriek s deklarovaným množstvom medi bola nameraná hodnota koncentrácie pohybujúca sa pod limitom detekcie. Ako najvhodnejší spôsob rozkladu vzoriek sa ukázal rozklad v kyseline dusičnej pri zvýšenej teplote, keďže výsledky tohto merania najviac zodpovedali deklarovanému množstvu medi stanoveného výrobcom a v niektorých prípadoch bola nami stanovená hodnota vyššia ako množstvo uvedené výrobcom. Jedným z dôvodov mohla byť vyššia koncentrácia medi v produktoch, nakoľko potravinové doplnky nie sú klasifikované ako lieky a tak obsah jednotlivých deklarovaných zložiek nie je kontrolovaný.

Záverom môžeme skonštatovať, že všetky vytýčené ciele bakalárskej práce boli úspešne splnené.

6 Použitá literatura

- (1) Helán, V.; *Automatická Spektrometrie : Sborník Přednášek z Kurzu*; 2 Theta, Český Těšín 2020.
- (2) Walsh, A.; *The Application of Atomic Absorption Spectra to Chemical Analysis*; *Spectrochimica Acta* 1955, 7, 108–117.
- (3) Němcová, I.; Rychlovský, P.; Čermáková, L.; *Spektrometrické Analytické Metody I*; UK-Karolinum, Praha 2004.
- (4) Khopkar, S. M.; *Basic Concepts Of Analytical Chemistry*; New Age International, 1998.
- (5) Kříženecká, S.; Synek, V.; *Základy analytické chemie*; Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Ústí nad Labem 2014.
- (6) Záruba, K.; *Analytická chemie 2. díl*; VŠCHT, Praha 2016.
- (7) Loon, J. A. V.; *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: Selected Methods*; Elsevier, 2012.
- (8) Opekar, F.; a kol.; *Základní analytická chemie*; 2nd ed.; UK-Karolinum, Praha 2010.
- (9) Rosenberg, E.; Panne, U.; *Atomic Absorption Spectrometry (AAS) and Atomic Emission Spectrometry (AES)*. In *Handbook of Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd. 2005; pp 421–496.
- (10) Klouda, P.; *Moderní Analytické Metody*, 2., upr. a dopl. vyd.; Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- (11) Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*; John Wiley & Sons, 2008.
- (12) Tyson, J. F.; *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry* By Jiri Dedina (Academy of Sciences, Czech Republic) and Dimitar L. Tsalev (University of Sofia, Bulgaria); Wiley, U.K. 1995. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118 (18), 4510–4510.
- (13) Sibakoti, T.; McCurdy, D.; *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry (HGAAS) for the Determination of Lead(Pb)*; 2011.
- (14) Dočekal, B.; *Detektory v atomové absorpční spektrometrii*. In *Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii*; Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007; pp 11-15.
- (15) Bobrowska-Grzesik, E.; *Chemical Elements: Compendium*; 2 Theta, Český Těšín 2013.
- (16) Haynes, W. M. (ed.); Lide, D. R. (ed.); Bruno, T. J. (ed.); *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 97th ed.; Boca Raton, Florida 2017.

- (17) Davis, J. R.; *Copper and Copper Alloys*; ASM International, USA 2001.
- (18) Lázár, M.; Imriš, I.; Pyrometalurgické spracovanie elektronického odpadu plazmovou technológiou; *Chem. Listy* 2015, 7.
- (19) Massey, A. G.; Thompson, N. R.; Johnson, B. F. G.; *The Chemistry of Copper, Silver and Gold*; Pergamon, 1973.
- (20) Abdel-Mageed, A.; Oehme, F.; A Review of the Biochemical Roles, Toxicity and Interactions of Zinc, Copper and Iron: II. Copper; *Veterinary and human toxicology* 1990, 32 (3), 230–234.
- (21) Peña, M. M. O.; Lee, J.; Thiele, D. J.; A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution; *The Journal of Nutrition* 1999, 129 (7), 1251–1260.
- (22) Angelova, M.; Asenova, S.; Nedkova, V.; Koleva-Kolarova, R.; Copper in the Human Organism; *Trakia J Sci* 2011, 9, 88–98.
- (23) Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M.; Copper Biochemistry and Molecular Biology; *The American Journal of Clinical Nutrition* 1996, 63 (5), 797S-811S.
- (24) Ala, A.; Walker, A. P.; Ashkan, K.; Dooley, J. S.; Schilsky, M. L.; Wilson's Disease; *The Lancet* 2007, 369 (9559), 397–408.
- (25) Meites, L.; Iodometric Determination of Copper; *Anal. Chem.* 1952, 24 (10), 1618–1620.
- (26) Barek J.; Opekar F.; Štulík K.; *Elektroanalytická chemie*, UK-Karolinum, Praha 2005.
- (27) Michalová, I.; *Doplňky stravy: (potraviny k doplnění jídelníčku)*; Sdružení českých spotřebitelů, Praha 2007.
- (28) Vyhláška č. 58/2018 Sb., o doplňcích stravy a složení potravin.