

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lenka Rydlová

STANOVENÍ VYBRANÝCH PRVKŮ V ROSTLINNÝCH
EXTRAKTECH TECHNIKOU ATOMOVÉ ABSORPČNÍ
SPEKTROMETRIE

Determination of Selected Elements in Plant Extracts by
Atomic Absorption Spectrometry

Bakalářská práce

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

Konzultanti: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D., RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Praha 2015

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného projektu
UNCE 204025/2012.

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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. května 2015.

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce bylo stanovení vybraných prvků (Na, Mg, K, Ca, Zn, Se) v rostlinných extraktech a šťávách rostlin pomocí techniky atomové absorpční spektrometrie s různými způsoby atomizace.

Pro stanovení výše uvedených prvků byly optimalizovány jednotlivé metody. Při použití plamene jako atomizačního prostředí byla optimalizována především výška procházejícího paprsku primárního záření výbojky nad hranou hořáku. Zde se výška pohybovala obecně mezi 6,0 – 8,0 mm. Dále byly optimalizovány průtoky jednotlivých složek plamene (acetylen, vzduch, oxid dusný) a byla seřízena poloha výbojky s dutou katodou a pozice plamene. Za optimálních podmínek byly naměřeny základní charakteristiky popisující metodu stanovení uvedených prvků (LOD pro sodík $2,13 \mu\text{g L}^{-1}$, pro hořčík $2,44 \mu\text{g L}^{-1}$, pro draslík $11,3 \mu\text{g L}^{-1}$, pro vápník $15,6 \mu\text{g L}^{-1}$, pro zinek $6,04 \mu\text{g L}^{-1}$, pro selen $0,34 \mu\text{g L}^{-1}$).

V další části práce byly optimalizované metody použity pro měření uvedených prvků v reálných vzorcích. Po prvotní úpravě zahrnující ředění získaných vzorků, přidavky různých reakčních činidel aj., byly vzorky v atomovém absorpčním spektrometru atomizovány plamenem (Na, Mg, K, Ca, Zn) a následně stanoveny, či převedeny na těkavou sloučeninu (Se) a stanoveny pomocí techniky generování těkavých hydridů chemickým způsobem s využitím tetrahydridoboritanu sodného. Získané výsledky byly uvedeny v jednotkách $\mu\text{g L}^{-1}$ nebo mg L^{-1} . Dále byl sledován vliv extrakce vodným nebo methanolovým roztokem na účinnost vyloučení prvků z jednotlivých rostlin. U některých prvků, resp. rostlin (stanovení draslíku u hluchavky bílé) lze říci, že se potvrdil původní předpoklad, že účinnější extrakce je dosaženo pomocí methanolového roztoku. U jiných prvků, resp. rostlin (stanovení hořčíku u jablečnicku obecného) tomu bylo naopak a vyskytly se dokonce případy, u kterých byla koncentrace prvku oběma způsoby extrakce téměř shodná (stanovení sodíku u jitrocele kopinatého). Dále bylo zjištěno, v kterých rostlinách je největší zastoupení sledovaných prvků, což je výhodné zejména z nutričních důvodů.

Klíčová slova

atomová absorpční spektrometrie, plamenová atomizace, generování těkavých sloučenin, sodík, hořčík, draslík, vápník, zinek, selen, rostlinné extrakty

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to determine selected elements (Na, Mg, K, Ca, Zn, Se) in plant extracts and juices by atomic absorption spectrometry using different types of atomization.

Each method has been optimized for determination of the mentioned elements. For flame atomization it has been used optimization of height of the primary radiation from the hollow cathode lamp over the edge of the burner. The height was generally between 6.0 and 8.0 mm. Then there have been optimized flow of each component of the flame (acetylene, air, nitrous oxide) and it has been set location of the hollow cathode lamp and the flame. Under the optimized conditions basic characteristics describing the method of the determination of mentioned elements have been measured (LOD for sodium $2.13 \mu\text{g L}^{-1}$, for magnesium $2.44 \mu\text{g L}^{-1}$, for potassium $11.3 \mu\text{g L}^{-1}$, for calcium $15.6 \mu\text{g L}^{-1}$, for zinc $6.04 \mu\text{g L}^{-1}$, for selenium $0.34 \mu\text{g L}^{-1}$).

In the next part of the thesis the optimized methods have been used for measuring concentration of all elements in real samples. After the preparation of the samples including dilution, addition of various reagents etc., they have been atomized by flame in an atomic absorption spectrometer (Na, Mg, K, Ca, Zn) and determined, or converted to a volatile compound (Se) and determined by chemical hydride generation using sodium borohydride. Acquired results have been given in $\mu\text{g L}^{-1}$ and mg L^{-1} . Then the influence of extraction with water and methanol solution on exclusion of elements from each plant has been compared. In case of some elements, resp. plants (determination of potassium in white nettle) it has been approved the original assumption, that the efficiency extraction is achieved by methanol solution. In case of other elements, resp. plants (determination of magnesium in horehound) it has been the opposite case and in other cases the concentration of the element using both types of extraction have been almost the same (determination of sodium in ribwort plantain). Then it has been determined in which plants is the largest representation of observed elements, which is useful especially for nutrition.

Keywords

atomic absorption spectrometry, flame atomization, volatile compound generation, sodium, magnesium, potassium, calcium, zinc, selenium, plant extracts

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky k bakalářské práci. Dále bych ráda poděkovala konzultantům RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. a RNDr. Václavu Červenému, Ph.D.

Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině i všem ostatním, kteří se jakkoli podíleli na vzniku této bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod	- 8 -
2	Teoretická část	- 10 -
2.1	Vznik a vývoj atomové spektrometrie	- 10 -
2.2	Atomová absorpční spektrometrie	- 11 -
2.2.1	Instrumentace	- 12 -
2.2.2	Zdroje primárního záření	- 12 -
2.2.3	Absorpční prostředí	- 14 -
2.2.4	Monochromátor a optika	- 15 -
2.2.5	Uspořádání optického systému	- 16 -
2.2.6	Interference v AAS	- 16 -
2.2.7	Deuteriová korekce pozadí	- 17 -
2.3	Chemické generování těkavých hydridů	- 18 -
2.3.1	Generování a atomizace těkavých sloučenin	- 18 -
2.4	Esenciální prvky	- 18 -
2.4.1	Vápenaté ionty (Ca^{2+})	- 18 -
2.4.2	Hořečnaté ionty (Mg^{2+})	- 19 -
2.4.3	Sodné (Na^+) a draselné (K^+) ionty	- 20 -
2.4.4	Zinečnaté ionty (Zn^{2+})	- 20 -
2.4.5	Selen (Se)	- 21 -
3	Experimentální část	- 22 -
3.1	Pomůcky a přístroje	- 22 -
3.2	Chemikálie	- 23 -
3.3	Analyzované vzorky	- 23 -
3.4	Příprava vzorků	- 25 -
3.5	Měření AAS	- 26 -
3.5.1	Parametry přístrojů	- 26 -
3.5.2	Příprava kalibračních roztoků	- 27 -
3.5.3	Aparatura pro chemické generování pro stanovení selenu	- 27 -
3.6	Statistické zpracování výsledků	- 28 -
4	Výsledky a diskuse	- 30 -
4.1	Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací	- 30 -
4.1.1	Optimalizace výšky hořáku	- 30 -
4.1.2	Proměření kalibračních závislostí	- 32 -
4.1.3	Charakteristika metody	- 35 -
4.2	Generování těkavých hydridů pro stanovení selenu	- 36 -
4.2.1	Optimalizace průtokové rychlosti argonu a pumpy	- 36 -
4.2.2	Měření kalibračních závislostí	- 38 -
4.2.3	Charakteristika metody	- 39 -
4.3	Měření reálných vzorků	- 40 -
4.3.1	Majoritní zastoupení prvků ve vzorcích	- 43 -
5	Závěr	- 46 -

Seznam zkratek a použitých symbolů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
LOD	mez detekce (z anglického slova <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	mez stanovitelnosti (z anglického slova <i>Limit of Quantification</i>)
LDR	lineární dynamický rozsah
UV	ultrafialová oblast
F-AAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie
ETA-AAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
THB	tetrahydridoboritan sodný
CHG	chemické generování hydridů
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
sek	sekunda
h	výška hořáku [mm]
A	absorbance
c	koncentrace [$\mu\text{g L}^{-1}$, mg L^{-1}]
λ	vlnová délka [nm]
I	napájecí proud výbojky [mA]
u	průtoková rychlost [mL min^{-1} , L hod^{-1}]
t	teplota [$^{\circ}\text{C}$]
v	šířka spektrálního intervalu [nm]
σ	směrodatná odchylka
\bar{x}	aritmetický průměr
\tilde{x}	medián
R	rozpětí souboru všech výsledků
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
r	mez opakovatelnosti

1 Úvod

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného projektu UNCE 204025/2012, který je zaměřen na hledání moderních technologií pro identifikaci a optimalizaci nádorových léčiv nové generace. Tematicky tato bakalářská práce spadá do oblasti využití analytické atomové spektrometrie pro analýzu vybraných prvků.

Pro udržení zdraví člověka je nezbytná vyvážená strava bohatá nejen na makrobiogenní prvky, ale také na prvky oligobiogenní (např. Ca, Mg, S, Na, K, Fe), mikrobiogenní (Cu, Zn, Co, Mn, I, Mo) a stopové neboli mikroelementy (např. Se)¹. Tyto látky jsou esenciální a jejich nedostatek či absence ve výživě může způsobit závažná onemocnění jako např. křivice, osteomalacie, osteoporóza, zpožděný pohlavní vývoj, nedostatečná funkce imunitního systému apod. Podávání esenciálních prvků může být prospěšné i v léčbě jiných onemocnění, která na první pohled s výživou nesouvisí jako je rakovina. Hledání nových zdrojů těchto prvků v rostlinných látkách může přinést lidskému organismu přirozenější a lépe vstřebatelnou formu než jakou představují anorganické doplňky stravy. Rostliny jsou také bohatým zdrojem široké škály esenciálních prvků v různých koncentracích; pestrá strava tedy může zajistit optimální zásobení organismu mikrobiogenními a stopovými prvky, aniž by docházelo k nárazovému užití vyšší koncentrace formou tablety. Hlavním cílem této práce bylo stanovit pomocí atomové spektrometrie Na, Mg, K, Ca, Zn, Se v 15 resp. 18 extraktech různých léčivých rostlin (vodné resp. methanolové extrakty) a ve 22 různých ovocných a zeleninových šťávách. Dílčími úkoly bylo optimalizovat stanovení vybraných prvků pomocí atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací a zjistit základní charakteristiky stanovení těchto prvků.

Atomová absorpční spektrometrie je v analytické chemii jednou z nejpoužívanějších metod pro zjištění prvkového složení látek v roztoku. Její výhoda spočívá ve vysoké selektivitě, která je zajištěna volbou vhodné vlnové délky odpovídající konkrétnímu analytu. Použití plamenové atomizace je levné, rychlé a instrumentálně nenáročné. Na druhé straně lze tuto techniku použít pouze při stanovení vyšších koncentrací. Elektrotermická atomizace se vyznačuje zejména tím, že k atomizaci nevyužívá plamene, takže se veškerý nadávkovaný objem vzorku převede

na volné atomy. Nespornou výhodou je tedy především výborná citlivost. Nevýhodou jsou naproti tomu vyšší náklady na provoz a poměrně významné maticní interference. Technikou generování těkavých sloučenin se dají stanovit již stopová množství, omezena jsou však na hydridotvorné prvky, nebo obecně na prvky, které lze převést na vhodnou, dostatečně těkavou sloučeninu. Ta je pak oddělena od kapalné matrice, čímž se omezí významně vliv interferencí¹¹.

2 Teoretická část

2.1 Vznik a vývoj atomové spektrometrie

Absorpce záření atomy byla zkoumána už na počátku 19. století, kdy Fraunhofer pozoroval tmavé čáry na slunečním spektru. První analytická aplikace atomové absorpce byla provedena Müllerem při stanovení rtuti. Až v roce 1955, kdy Walsh objevil univerzálnost využití v přístupu prvkové analýzy, byla na světě klasická atomová absorpční spektroskopie².

Na počátku stál objev svítiplynu. Profesor Robert W. Bunsen (1811 – 1899) nedlouho poté vynalezl Bunsenův kahan (poprvé smíchán vzduch s palivem ještě před zapálením), který produkoval horký a nezářivý plamen. Díky tomu bylo výrazně usnadněno pozorování atomových spektrálních čar. Brzy potom Bunsen objevil v minerální vodě prvky rubidium a cesium, které následně úspěšně izoloval. Na konci padesátých let devatenáctého století odstartovala jeho dlouholetá spolupráce s profesorem Gustavem R. Kirchhoffem (1824 – 1887). Spolu se pak zabývali porovnáním emisních spekter získaných z čistých solí s absorpčními spektry z jejich laboratoře. Výsledkem této práce bylo zjištění spojení mezi emisí a absorpcí záření, které publikoval Kirchhoff: „Každý materiál, který emituje záření při dané vlnové délce, může také toto záření při stejné vlnové délce absorbovat“.

Všechny spektroskopické experimenty provedené během 19. století byly ve viditelné oblasti. Přitom většina pozorování se prováděla pouhým okem. Ke konci 19. století a na začátku 20. století byla objevena oblast UV záření. K tomu, aby mohla být tato oblast vůbec pozorována, probíhal výzkum a zdokonalování monochromátorů a polychromátorů. Okolo roku 1925 se objevil vůbec první komerční spektrometr. Jako emisní zdroj byly použity oblouky a jiskry, pro detekci a kvantitativní stanovení kovových prvků ve viditelné i UV oblasti sloužily fotografické desky. Bylo jednodušší detegovat malé emisní signály v nezářivém prostředí, než redukce záření přes úzkou spektrální oblast plnou jasného světla jak tomu bylo při měření absorpce. Z tohoto důvodu převzala emisní spektroskopie žezlo až do první poloviny 20. století.

V druhé polovině 20. století se tuto situaci snažil změnit Alan Walsh, který pracoval několik let v organizaci the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) v Austrálii. Nejprve se zabýval molekulární spektroskopií, poté

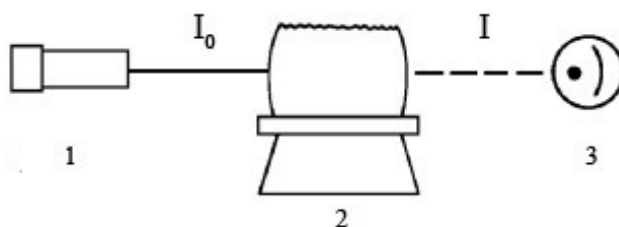
atomovou spektroskopií. Walsh zjistil, že pro měření atomové absorpce jsou vyžadovány zdroje lineární radiace s nejostřejšími možnými emisními čarami, tj. výbojka s dutou katodou (HCL – hollow cathode lamp). Úkolem monochromátoru je oddělit pouze čáru používanou pro měření od všech ostatních čar emitovaných zdrojem³.

2.2 Atomová absorpční spektrometrie

Při atomové absorpční spektrometrii dochází k absorpci elektromagnetického záření vlnové délky specifické pro daný analyt volnými atomy prvků. Pokud se zvýší množství atomů, dojde k vyšší absorpci. Měřením množství absorbovaného světla (absorbance) je možné provést kvantitativní stanovení měřeného analytu.

Vzorku musí být dodána dostatečná termální energie, při níž dojde k disociaci na volné atomy. To může být provedeno například nasátím vzorku do plamene. Zvolením správných podmínek atomizace zůstanou atomy v základním stavu, v němž jsou schopné absorbovat světlo dané vlnové délky produkované výbojkou.

Rychlost a přesnost stanovení atomové absorpční spektrometrie z ní činí jednu z nejoblíbenějších metod pro stanovení kovů⁴.



Obr. 2.1 – Schéma procesu atomové absorpce⁴ (upraveno)

1 – zdroj záření, 2 – absorpční prostředí, 3 – detektor

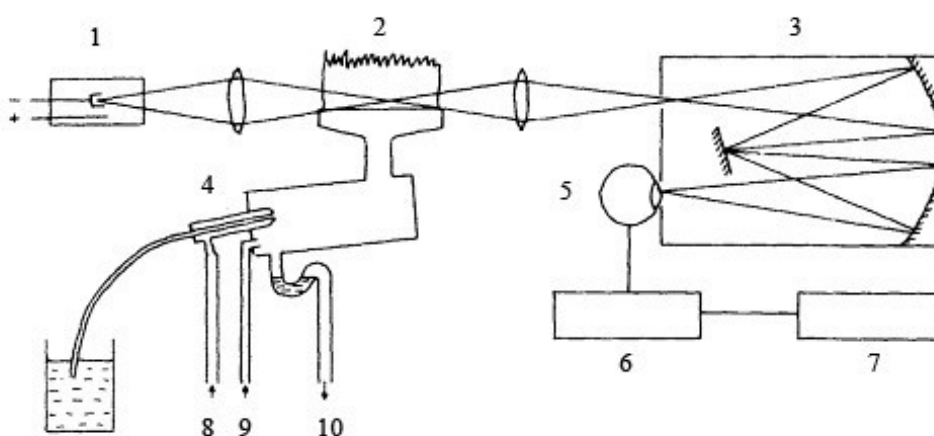
I_0 – paprsek světla s původní intenzitou, I – paprsek po absorpci světelného záření

Atomová absorpční spektrometrie je vhodnou metodou pro stanovení až stopových množství kovů s dostatečnou citlivostí pro většinu aplikací. Jednou z jejích variant je atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací. Patří mezi méně citlivé metody, má však mnohem dostupnější instrumentaci a provozní náklady^{5,6}. Malá citlivost F-AAS je způsobená nízkou efektivitou rozprašování a krátkým pobytem

volných iontů v plameni⁷.

2.2.1 Instrumentace

Konstrukce spektrometru nemusí být vždy složitá (viz Obr. 2.2). Jeho nezbytné součásti jsou *zdroj záření*, který emituje pouze vlnové délky, které stanovované atomy samy absorbují, *absorpční cela*, ve které dochází k disociaci molekul vzorku na volné atomy (nejčastěji plamenem), *monochromátor* pro disperzi světla na vlnovou délku se štěrbinou proměnlivé šířky na odizolování nejvýhodnější vlnové délky a nakonec *detektor* (fotonásobič), jehož úkolem je přeměnit světelnou energii fotonů na měřitelný elektrický signál⁸.



Obr. 2.2 – Schéma základní konstrukce atomového absorpčního spektrometru⁸
(upraveno)

1 – atomizátor, 2 – zdroj záření, 3 – monochromátor, 4 – zmlžovač, 5 - detektor, 6 – zesilovač signálu, 7 – počítač, 8 – oxidant, 9 – palivo, 10 – odpad

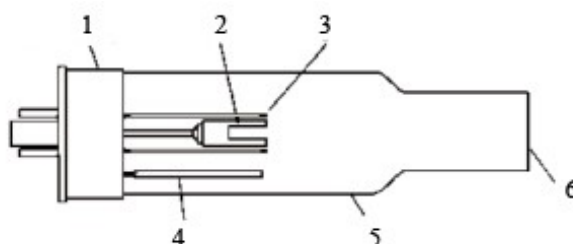
2.2.2 Zdroje primárního záření

Atom absorbuje záření určité vlnové délky. Pro dosažení vysoké citlivosti je třeba použít lineární zdroj, který emituje pouze specifické vlnové délky absorbovatelné daným atomem. Tím se celý proces stává rovněž velice specifickou analytickou technikou s omezenými spektrálními interferencemi. Nejčastějšími primárními zdroji záření jsou výbojky s dutou katodou a bezelektrodové výbojky⁴.

Výbojky s dutou katodou (HCL)

Hlavním požadavkem na výbojku s dutou katodou je, aby generovala úzkou emisní čáru prvku, který je měřen. Tato čára musí splňovat požadavek na dostatečnou spektrální čistotu a intenzitu k dosažení linearity kalibrační závislosti s nízkým šumem základní linie.

Výbojky s dutou katodou se vyrábějí ze skla, které je tvořeno křemenným nebo borosilikátovým výstupním okénkem. Uvnitř se nachází katoda tvořená z prvku, jenž je stanovován (viz Obr. 2.3). Pokud se jedná o kov, který je na vzduchu stálý a má vysoký bod tání, užívá se přímo čistého stanovovaného kovu (např. hliník). V případě, že je křehký, užívá se pouze ve formě prášku nataveného na vhodném podkladu (např. mangan, vanad). Této techniky se využívá i u výbojek pro stanovení více prvků (např. vápník a hořčík)⁹. Dále je zde anoda (např. ze zirkonu), která poskytuje požadovaný potenciál pro vznik výboje¹⁰.



Obr. 2.3 – Konstrukce výbojky s dutou katodou¹⁰ (upraveno)

1 – patice, 2 – katoda, 3 – skleněný kryt, 4 – anoda, 5 – tělo výbojky, 6 – výstupní okénko

Výbojka je plněna inertním vzácným plynem. Může jím být argon, mnohem častěji se však používá neon díky velkému ionizačnímu potenciálu, který se projevuje vyšší intenzitou signálu.

Mezi elektrody je vložen potenciálový rozdíl stovek voltů, jenž způsobí atomizaci plynu na volné atomy. Dochází k bombardování katody pozitivně nabitými ionty plynu, které z ní vyrážejí atomy kovu. Atomy kovů se dostávají do plynné fáze. Tam se srážejí s dalšími částicemi, elektrony a ionty plynu, které způsobí jejich excitaci. Poté dochází k emisi záření charakteristické vlnové délky pro daný kov a atomy se vracejí do základního energetického stavu^{10,11}.

Bezelektrodové výbojky (EDL)

Pro některé prvky, zejména těžké (např. arsen), je těžké vyrobit stabilní dutou katodu, proto se využívá bezelektrodových výbojek. Malé množství kovu nebo soli prvku, jehož spektrum je studováno, je vměstnáno pomocí nízkého tlaku argonu do křemenné baňky. Tato baňka je umístěna uprostřed cívek. Ty jsou součástí radiofrekvenčního generátoru. Po vložení napětí na cívky dochází k přenosu energie vzniklého radiofrekvenčního pole na kov nebo sůl umístěné v této baňce. Vzniklá energie způsobí vypařování a excitaci kovových atomů. Produkováno je charakteristické emisní spektrum daného kovu¹².

2.2.3 Absorpční prostředí

Absorpční prostředí je realizováno atomizátorem, který produkuje atomy plynu v základním stavu. Nejčastějšími způsoby je plamenová atomizace, elektrotermická atomizace a technika generování těžkých sloučenin¹².

Plamenová atomizace (F – AAS)

Používaným atomizátorem pro tuto metodu je plamen skládající se z paliva (např. acetylen) a oxidantu (např. vzduch nebo oxid dusný). Vzorek je přiveden do plamene pomocí zmlžovačů, kde dochází k tvorbě kapiček aerosolu z roztoku. Pneumatické zmlžovače mají malou účinnost (10 %), proto se jen malá část vzorku se přemění na aerosol. Plamenová atomizace se z tohoto důvodu používá pro stanovení vyšších koncentrací¹¹.

Elektrotermická atomizace (ETA – AAS)

U této metody je dávkováno malé množství vzorku (10-40 μ l) do odporově vyhřívané, nejčastěji grafitové, kyvety¹³. Za postupného ohřevu kyvety a díky procházejícímu elektrickému proudu dochází k atomizaci vzorku. Vzhledem k tomu, že při této metodě se nevyužívá plamene, veškeré nadávkované množství vzorku se podílí na absorpci záření¹¹. Prioritou této metody je tedy především vysoká citlivost¹⁴.

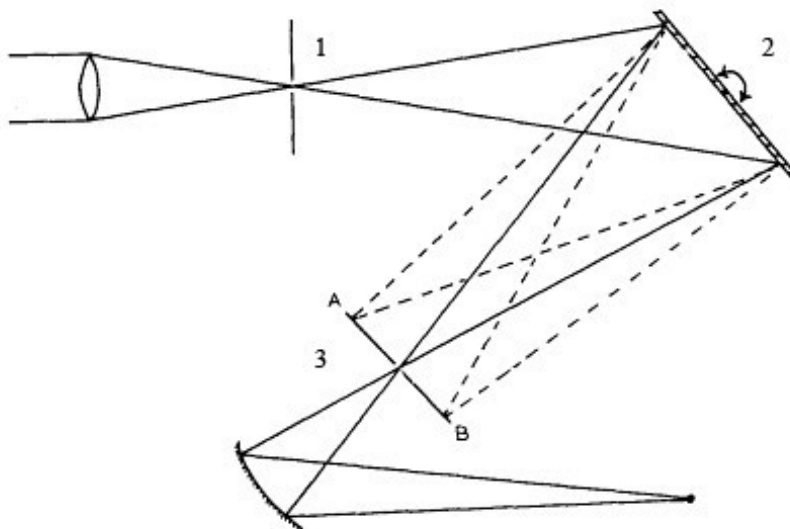
Generování a atomizace těkavých sloučenin (HG – AAS)

Při použití této techniky je analyt nejprve převeden na těkavou sloučeninu. Vzniklá sloučenina (obvykle hydrid) se přivede do proudu inertního plynu (argon), čímž dojde k jejímu oddělení od matrice vzorku. V křemenném atomizátoru (je umístěn v optické ose atomového absorpčního spektrometru) dochází po dodání tepelné energie k atomizaci.

Hlavní výhodou je oddělení analytu od matrice, díky čemuž dojde k omezení možných interferencí. Citlivost měření je srovnatelná s elektrotermickou atomizací¹¹.

2.2.4 Monochromátor a optika

Monochromátor je zařízení, které odděluje, izoluje a řídí intenzitu záření vstupujícího do detektoru (viz Obr. 2.4). Ve skutečnosti je to vlastně nastavitelný filtr, který vybírá specifickou úzkou oblast spektra pro přenos na detektor a vyloučí všechny ostatní vlnové délky mimo tuto vybranou oblast⁸.



Obr. 2.4 – Schéma monochromátoru⁸ (upraveno)

1 – vstupní štěrba, 2 – difrakční mřížka, 3 – výstupní štěrba

Ideálně by měl být monochromátor schopný izolovat pouze rezonanční čáry a ostatní úplně vyloučit. Obtížnost tohoto provedení závisí na analyzovaném prvku. Schopnost rozlišovat dvě různé vlnové délky je velice důležitá charakteristika monochromátoru. Tvorba difrakční mřížky pomocí monochromátoru se používá

v různých přístrojích využívajících atomovou absorpci. Záření z výbojky vstupuje do monochromátoru vstupní štěrbinou a je soustředěno na mřížku. Mřížka rozptyluje záření jednotlivých vlnových délek. Otáčením difrakční mřížky je vybrána nejvhodnější vlnová délka, která projde skrz výstupní štěrbinu do detektoru.

Vstupní štěrbinu řídí množství procházejícího světla vstupujícího do monochromátoru (ideálně co největší). Naopak výstupní štěrbinu určuje šířku spektrálního intervalu (bandwidth), odpovídající úzké části spektra, které je přeneseno do detektoru. V praxi jsou obě štěrbinu propojeny, takže zvolení jejich šířky je většinou otázkou kompromisu mezi vpuštěním velkého množství světla a následně výborného poměru signálu k šumu a na druhé straně vyžadovaným stupněm separace čar do detektoru⁸.

2.2.5 Uspořádání optického systému

V AAS je možné využít dvojího uspořádání optického systému – jednopaprskové a dvoupaprskové.

V jednopaprskovém uspořádání jsou výše zmíněné komponenty spektrometru uspořádány lineárně. Plamen generuje ze vzorku páry atomů v základním stavu. To je ozářeno specifickým zářením z výbojky s dutou katodou. Část tohoto záření je kvantitativně absorbována v oddělených vlnových délkách a monochromátor ji izoluje, kde je absorpce nejlépe měřitelná, a poté putuje do detektoru.

Dvoupaprskové uspořádání bylo vytvořeno ve snaze překonat omezení současných výbojek. V tomto uspořádání se záření vycházející ze zdroje rozdělí na dva paprsky. Měrný paprsek vstupuje do atomizátoru a referenční paprsek projde nezměněn, protože se vyhne atomizátoru. Pokud je výchozí linie nastavena na nulu, oba paprsky by měly vykazovat stejnou intenzitu. Při zavádění vzorku do plamene je měrný paprsek oslaben a přístroj vypočítá absorpenci⁸.

2.2.6 Interference v AAS

Na počátcích vývoje této metody se s interferencemi příliš nepočítalo. Bylo to v dobách, kdy bylo studováno jen několik aplikací. V dnešní době se situace podstatně změnila. Interference jsou nyní pečlivě zdokumentovány. U těch nejstarších došlo k novým poznatkům, např. předpokládaná interference byla vlastně způsobena

nedokonalostí tehdejšího přístroje, takže v současnosti prakticky vymizela. Existuje několik typů interferencí sledovaných u AAS, některé z nich jsou popsány níže⁸.

Spektrální interference

Tento typ interferencí je v AAS pozorován velice zřídka. V minulosti se tyto interference vyskytovaly při stanovení prvku A v přítomnosti prvku B. Pokud zdroj obsahoval oba prvky a jejich absorpční čáry nebyl monochromátor schopen určit, způsobil prvek B interference. U prvních výbojek se z toho stal fenomén. Tento stav je možné překonat využitím alternativní absorpční čáry. Pravděpodobnost dvou náhodných čar je mizivá. Většina spektrálních interferencí v současné době vymizela díky vylepšení purifikačních technik katod⁸.

Chemické interference

Jedná se o nejčastěji pozorovatelný druh interferencí v AAS vůbec. Chemická interference může být v podstatě definována jako cokoli, co zabraňuje nebo potlačuje tvorbu atomů v základním stavu v plameni. Častým příkladem je interference způsobená hliníkem, křemíkem nebo fosforem při stanovení hořčíku, vápníku, stroncia, baria a mnohých dalších kovů. Je to z důvodu tvorby hlinitanů, křemičitanů a fosfátů, které tvoří v četných případech termostabilní sloučeniny. K překonání tohoto typu interference jsou dvě hlavní techniky. První využívá přidavku pomocných činidel (například EDTA), která zabrání tvorbě termostabilního komplexu analyt – interferující iont. Druhým způsobem je použití plamene o vyšší teplotě ve složení acetylen – oxid dusný⁸.

2.2.7 Deuteriová korekce pozadí

Deuteriová korekce využívá deuteriové výbojky, která je zdrojem kontinuálního záření v UV oblasti. Ta je složena z oblouku, který je v deuteriové atmosféře. Záření vycházející z výbojky s dutou katodou a z deuteriové výbojky je řízeno střídavě skrz choper do atomizátoru. Rotující kolečko choperu povoluje střídavý průchod záření ze zdroje, zatímco absorpce je detegována pouze pro jeden ze dvou paprsků. Absorbance deuteriové výbojky je pak odečtena od absorbance zdroje lineárního záření stanovovaného prvku¹⁵.

2.3 Chemické generování těkavých hydridů

Generování těkavých sloučenin je jedna z nejpoužívanějších metod stanovení stopových až ultrastopových množství prvků v analytické chemii. Nejoblíbenější technikou generování těkavých sloučenin je tvorba těkavých hydridů. Využívá se pro stanovení množství Ge, Sn, Pb, As, Sb, Bi, Se, Te, Hg, Cd a v poslední době i vzácných kovů¹⁶.

2.3.1 Generování a atomizace těkavých sloučenin

Analyt je nejdříve chemickou reakcí převeden na těkavou sloučeninu. Tou je nejčastěji hydrid, který se oddělí od matrice vzorku a je atomizován ve speciálním křemenném atomizátoru, který je umístěn v optické ose atomového absorpčního spektrometru. Pro převedení analytu na hydrid je nejčastěji používáno redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4) stabilizován roztokem NaOH v prostředí kyseliny (nejčastěji HCl). Generace hydridů může být prováděna dávkově, kontinuálně nebo technikou průtokové injekční analýzy – dávkováním analytu do proudu kyseliny.

Hlavní výhodou technik generování těkavých sloučenin je oddělení analytu od matrice, které částečně omezuje její případné interference. Citlivost měření a dosažené meze detekce pro hydridotvorné prvky jsou srovnatelné s elektrotermickou atomizací¹³.

Techniky generování (chemické, elektrochemické, fotochemické a sonochemické) těkavých sloučenin zaujímají významnou roli v separačních technikách využívaných v analytické chemii. Mezi všemi technikami generování zaujímá chemické generování prominentní roli, hlavně kvůli dlouhému historickému vývoji (započal před více než 40 lety) a mnohými aplikacemi.

Analytická aplikace CHG je v současné době atraktivní, zejména pro její vlastní jednoduchost a dosažení potřebného analytického výkonu v kombinaci s levným spektrometrickým zařízením. Tento aspekt se stal oblíbeným u většiny aplikací, které se rychle vyvíjejí podle parametru optimalizace a validace analytických výsledků¹⁷.

2.4 Esenciální prvky

2.4.1 Vápenaté ionty (Ca^{2+})

Průměrný dospělý člověk má v těle více než kilogram vápníku. Více než 99 % vápníku je obsaženo v kostech a zubech¹⁸ ve formě hydroxyapatitu, zbytek se nachází v

ostatních tkáních. Ca^{2+} ionty v plazmě představují pouze nepatrný zlomek (0,03 %) z celkového obsahu. Ještě nižší koncentrace volných Ca^{2+} iontů (nižší než 10^{-7} mol L^{-1}) se nacházejí v cytosolu živočišných a rostlinných buněk. Takto velmi nízké koncentrace Ca^{2+} jsou udržovány ATP-dependentními Ca^{2+} pumpami P-typu (Ca^{2+} -P-ATPasami), které se u živočichů hromadí Ca^{2+} především v lumen endoplazmatického retikula nebo transportují Ca^{2+} přes plazmatickou membránu do extracelulárního prostoru. Ve svalových buňkách jsou Ca^{2+} ionty uzavřeny ve specializované formě endoplazmatického retikula, nazývaném sarkoplazmatické retikulum. Uvolnění Ca^{2+} iontů ze sarkoplazmatického retikula a z extracelulárního prostoru a jeho navázání na podjednotku C-troponinu, které vede ke konformační změně a vtažení tropomyosinu do zářezů dvoušroubovice aktinového filamenta, je molekulární podstatou stahu svalového vlákna. K rapidnímu zvýšení cytosolové koncentrace Ca^{2+} iontů způsobenému krátkodobým otevřením Ca^{2+} kanálů dochází také v rámci signálních kaskád. Otevírání Ca^{2+} kanálů řídí fosfoinositolová dráha. Uvolněním Ca^{2+} ze zásobáren se aktivují následující členové kaskády proteinkinasy, které vyvolávají další metabolickou reakci, a tím navozují biologickou odpověď buňky např. na účinek některých hormonů jako je thyreotropní hormon. Ca^{2+} často nepůsobí jako signální látka přímo, ale pomocí navázání na rozpustný protein kalmodulin. Ca^{2+} ionty jsou také důležité pro přeměnu protrombinu na trombin v rámci hemokoagulační kaskády v procesu srážení krve. Metabolismus Ca^{2+} v těle reguluje hormon, jehož prekurzorem je vitamin D, dále parathormon a kalcitonin¹⁹.

V dětství může nedostatek vápenatých iontů v potravě vyústit až v onemocnění zvané křivice. S postupujícím věkem dochází úbytku kostní hmoty, což může vést až ke vzniku osteoporózy, takže je nutné dbát na dostatečný přísun vápníku v potravě²⁰.

2.4.2 Hořečnaté ionty (Mg^{2+})

Hořečnaté ionty jsou druhým nejhojnějším intracelulárním kationtem a čtvrtým nejčastějším kationtem v těle. Průměrný dospělý člověk má v těle asi 24 g hořčíku. Přibližně 53 % celkového obsahu hořčíku je uloženo v kostech, 27 % ve svalech, 19 % v měkkých tkáních, 0,5 % v erytrocytech a 0,3 % v séru. Uvnitř buněk je Mg^{2+} vázán na další látky jako je ATP, ADP, proteiny, RNA, DNA a citrát. Ačkoliv pouze malá část intracelulárního obsahu Mg^{2+} je v ionizované formě, je klíčová pro udržení rovnováhy

těchto iontů. Předpokládá se, že extracelulární Mg^{2+} v séru je z 33 % vázán na proteiny, 7 % tvoří komplex s citrátem, PO_4^{2-} a HCO_3^- a 55 % je v ionizovatelné formě, která je biologicky aktivní²¹. Hořčík je důležitým kofaktorem enzymů zapojených do reakcí spojených s přenosem fosfátu, které využívají adenosintrifosfát (ATP)⁸. Hořčík je důležitý pro více než 350 enzymů²². Hořečnaté ionty se nacházejí ve značném množství v rostlinách, kde jsou součástí molekuly chlorofylu²³.

Nutriční příjem hořčíku je spojován s předcházením hypertenze, diabetu 2. typu, kardiovaskulárních a dalších onemocnění včetně rakoviny. Jedním z navrhaných mechanismů je, že hořčík indukuje snížení hladiny C-reaktivního proteinu²².

2.4.3 Sodné (Na^+) a draselné (K^+) ionty

Zatímco K^+ je hlavním intracelulárním kationtem, jeho koncentrace v buňce je 150 mmol L^{-1} , Na^+ je hlavním extracelulárním kationtem, kde se nachází v koncentraci $133\text{--}200 \text{ mmol L}^{-1}$. Vysokou koncentraci K^+ a nízkou koncentraci Na^+ uvnitř buňky udržuje tzv. Na-K-ATPasová pumpa, která přenáší Na^+ ven z buňky a K^+ do buňky²⁴. Hlavní funkcí Na^+ iontů je udržovat normální distribuci vody a osmotický tlak plazmy. Na^+ i K^+ jsou důležité pro šíření nervového vzruchu podél axonu neuronu i šíření vzruchu po svalové buňce. Oba ionty mají také úlohu v regulaci některých metabolických reakcí, kde vystupují jako kofaktory. Kromě toho má sodík ještě funkci při udržování acidobazické rovnováhy. Koncentrace draslíku v krevní plazmě je v rozmezí $3,5\text{--}5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (cit.²³). Důležitý je poměr koncentrací intracelulárního a extracelulárního K^+ . Jak zvýšení, tak snížení koncentrace K^+ v plazmě může tento poměr vychýlit, což vede k srdečním arytmiím a ke svalové paralýze²⁵.

2.4.4 Zinečnaté ionty (Zn^{2+})

Zinek je esenciální stopový prvek nezbytný pro růst a vývoj především v období těhotenství, dětství a dospívání. Zinek dále ovlivňuje imunitní systém, hojení ran, funkci štítné žlázy, produkci prostaglandinů, mineralizaci kostí a srážení krve²⁶. Obsah zinku v těle dospělého člověka je přibližně $1,5\text{--}2,5 \text{ g}$. Z velké části (asi 90%) se zinek nachází uvnitř buněk různých orgánů, především svalů, kostí, kůži a plic ve formě pevných komplexů s organickými molekulami. Tyto komplexy jsou však snadno přeměnitelné, čímž může být modifikována trojrozměrná struktura nukleových kyselin,

specifických proteinů, buněčných membrán a ovlivněna katalytická účinnost mnoha enzymových systémů i intracelulární signalizace²⁷. Zinečnaté ionty jsou také nezbytné pro katalytickou účinnost více než 300 enzymů, přímo je asociován s nejméně 50 metaloenzymy, které mají celou řadu funkcí včetně syntézy nukleových kyselin, hormonů a jejich receptorů. Menší část celkového obsahu zinku představuje snadněji dostupnou rezervu, neboť zinek vázaný v tkáních je pomalu dostupný. Méně než 0,2% celkového obsahu zinku se nachází v plazmě, ve formě vázané na albumin nebo v menší míře na α_2 -makroglobulin a oligopeptidy. Hlavními funkcemi zinku je katalytická, strukturální a regulační²⁸. Z těchto důvodů hraje zinek klíčovou roli v buněčném růstu, diferenciaci a metabolismu²⁷.

2.4.5 Selen (Se)

Selen je jedním z nejvzácnějších prvků a hraje velkou roli v celé živočišné říši. Chová se však jako dvousečná zbraň. V malém množství je nezbytný, zatímco překročením limitu v jeho přísunu do organismu může dojít k závažným následkům²⁹. Selen přijímaný z potravy ve formě selenocysteinu, selenomethioninu, Selenomethylselenocysteinu, selenitu a selenátu je absorbován sliznicí střeva přeměňován různými reakcemi na selenid (H_2Se). Tento intermediát je přeměněn na selenofosfát a selenocysteyl-tRNA, který je inkorporován do selenoproteinů. Hlavní transportní formou selenu v plazmě je selenoprotein P. Jedná se o glykosylovaný protein složený z 366 aminokyselinových zbytků, z nichž 10 je tvořeno zbytky selenocysteinu (21. aminokyseliny)³⁰. Významnými selenoproteiny jsou glutathionperoxidasy, thioredoxinreduktasy a dejodasy. Selenoproteiny mají důležitou roli při syntéze hormonů štítné žlázy a v ochraně štítné žlázy před poškozením H_2O_2 , který je k syntéze hormonů potřebný. Akutní toxicita se projevuje zvracením, dušností a nakonec smrtí z poruchy dýchání. Chronická toxicita se projevuje poruchami růstu³¹. Nedostatek selenu je spojován s vyšší úmrtností, nedostatečnou funkcí imunitního systému a poklesem kognitivních funkcí. Vyšší hladina selenu nebo nadbytečné zásobování selenem z potravy má antivirové účinky, je důležité pro reprodukci mužů i žen a snižuje riziko autoimunitního onemocnění štítné žlázy. V poslední době existují klinické studie prokazující roli selenu v ochraně před různými typy rakoviny, i když ne všichni pacienti reagují stejně, pravděpodobně v závislosti na hladině selenu v organismu^{32,33}.

3 Experimentální část

3.1 Pomůcky a přístroje

- atomový absorpční spektrometr AAS 3 (Carl Zeiss, Německo) s plamenovou atomizací (acetylen-vzduch, acetylen-oxid dusný)
- atomový absorpční spektrometr UNICAM 939 AA s deuteriovou korekcí pozadí (Unicam, Velká Británie) ovládaný softwarem Solar vybavený systémem pro chemické generování těkavých sloučenin (vlastní výroba)
- křemenný atomizátor tvaru písmena T (délka atomizačního ramene 170 mm a vnitřní průměr trubice 12 mm, uprostřed zúžená část délky 60 mm a vnitřním průměru 5 mm) odporově vyhříváný na teplotu 950 °C (RMI, ČR)
- programovatelná osmikanálová peristaltická pumpa MasterFlex[®]L/S[®] (Cole Parmer, USA)
- laboratorní lineární zdroj LPS 303, maximální proud 3,0 A, maximální napětí 30 V (American Reliance, USA)
- digitální plynový průtokoměr (Cole Parmer, USA)
- teflonová reakční smyčka (délka 1,0 m, ID 0,76 mm)
- spojovací materiál (SUPELCO, USA)
- PTFE spojovací hadičky (TYGON[®])
- průtokové hadičky (TYGON[®])
- čerpací hadičky (TYGON[®])
- výbojky s dutou katodou (Varian Techtron, Austrálie)
 - sodík (napájecí proud 10 mA, vlnová délka pro stanovení sodíku 589,0 nm)
 - vápník – hořčík (napájecí proud 10 mA, vlnová délka pro stanovení vápníku 422,7 nm, vlnová délka pro stanovení hořčíku 285,2 nm)
 - draslík (napájecí proud 10 mA, vlnová délka pro stanovení draslíku 766,5 nm)
 - zinek (napájecí proud 5 mA, vlnová délka pro stanovení zinku 213,9 nm)
 - selen (napájecí proud 8 mA, vlnová délka pro stanovení selenu 196,0 nm)

3.2 Chemikálie

- standardní roztok Zn^{2+} (vázáno na dusičnan) v kyselině dusičné 0,5 mol L⁻¹ o koncentraci 1,001 ± 0,002 g L⁻¹ (CertiPUR, Merck spol. s.r.o., Německo)
- standardní roztok Mg^{2+} (vázáno na dusičnan) v kyselině dusičné o koncentraci 0,5 mol L⁻¹ o koncentraci 1,000 ± 0,002 g L⁻¹ (CertiPUR, Merck spol. s.r.o., Německo)
- standardní roztok Ca^{2+} (vázáno na uhličitan) v 2 % kyselině dusičné o koncentraci 1,000 ± 0,002 g L⁻¹ (Astatol, Analytika spol. s.r.o., Česká republika)
- standardní roztok Na^+ (vázáno na dusičnan) v 2 % kyselině dusičné o koncentraci 1,000 ± 0,002 g L⁻¹ (Astatol, Analytika spol. s.r.o., Česká republika)
- standardní roztok K^+ (vázáno na dusičnan) v kyselině dusičné 0,5 mol L⁻¹ o koncentraci 0,999 ± 0,005 g L⁻¹ (CertiPUR, Merck spol. s.r.o., Německo)
- standardní roztok Se^{4+} (vázáno na oxid) v roztoku kyseliny dusičné 0,5 mol L⁻¹ o koncentraci 1,002 ± 0,005 g L⁻¹ (CertiPUR, Merck spol. s.r.o., Německo)
- **HCl** (37 %, min. 99,99 % čistoty, CertiPUR, Merck spol. s.r.o., Německo)
- **NaOH** (Mr = 40,00, Sigma Aldrich, Německo)
- **KCl** p. a. (Lachner, Česká republika)
- **CsNO₃** (min. 99,999 % čistoty, Sigma Aldrich, Německo)
- **La₂O₃** p. a. (Lachner, Česká republika)
- **8-hydroxychinolin** p. a. (Lachner, Česká republika)
- **NaBH₄** (Fluka Analytical)

3.3 Analyzované vzorky

Vzorky analyzované v rámci této bakalářské práce byly dodány ve třech skupinách. Jejich souhrnný popis je uveden v Tab. 3.1. První skupinu tvoří vzorky představující vodné výluhy vybraných léčivých rostlin (označeny písmenem V). Druhou skupinou jsou pak obdobné vzorky, které však byly získány jako methanolvý extrakt (označeny písmenem M). Poslední skupinu vzorků tvoří roztoky šťáv ovoce a zeleniny (označeny písmenem Š). Na Obr. 3.1 jsou vyfotografovány některé extrakty rostlin a zástupci vzorků třetí skupiny tak, jak byly uchovávány zmrazené při teplotě -15 °C před jejich úpravou před analýzou.

Tab. 3.1 – Vzorky použité pro analýzu (označení a název)

Analyzované rostlinné extrakty a šťávy					
1 V	vlaštovičník větší	1 M	vlaštovičník větší	1 Š	meruňky
2 V	mateřídouška obecná	2 M	mateřídouška obecná	2 Š	maliny
3 V	routa vonná	3 M	routa vonná	3 Š	jahody
4 V	smetánka lékařská	4 M	smetánka lékařská	4 Š	broskve
5 V	dobromysl obecná	5 M	dobromysl obecná	5 Š	josta
6 V	jitrocel kopinatý	6 M	jitrocel kopinatý	6 Š	červený rybíz
7 V	máta peprná	7 M	máta peprná	7 Š	bílý rybíz
8 V	řepík lékařský	8 M	řepík lékařský	8 Š	višně
9 V	šalvěj lékařská	9 M	šalvěj lékařská	9 Š	kaki
10 V	řebříček lékařský	10 M	řebříček lékařský	10 Š	nashi
11 V	čajovník čínský	11 M	čajovník čínský	11 Š	máslová dýně
12 V	jablečník obecný	12 M	jablečník obecný	12 Š	kiwi
13 V	levandule lékařská	13 M	levandule lékařská	13 Š	rajče (plod)
14 V	hluchavka bílá	14 M	hluchavka bílá	14 Š	pomeranč
15 V	stévie sladká	15 M	stévie sladká	15 Š	citron
		16 M	zázvor	16 Š	limetka
		17 M	kurkuma	17 Š	cuketa kulatá (plod)
		18 M	galgán	18 Š	mandarinka
				19 Š	avokádo
				20 Š	pomelo
				21 Š	grapefruit
				22 Š	petržel (kořen)

(V – vodné extrakty, M – methanolové extrakty, Š – šťávy)



Obr. 3.1 – Některé použité extrakty a šťávy vyfotografované před analýzou

3.4 Příprava vzorků

Extrakty léčivých rostlin a ovocné a zeleninové šťávy mi byly poskytnuty Bc. Kateřinou Bělonožníkovou a Bc. Michalem Tupcem.

Rostlinný materiál se extrahoval pomocí vhodného rozpouštědla, jímž byla voda a směs 80 % w metanolu s 20 % w vody (methanolvý roztok). Proces probíhal tak, že se do 100 mL baňky s kulatým dnem přidaly přesně asi 2,5 g usušené byliny. Poté se přidalo 50 mL extrakčního rozpouštědla a směs byla zahřívána 30 minut ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Následně se směs nechala 5 minut vychladnout a pak byla filtrována přes čtyři vrstvy gázy. Poté proběhla centrifugace filtrátu (10 minut, 9400g, 4 °C). Supernatant byl filtrován pomocí filtru Whatman (velikost pórů á 0,2 µm). Takto získané extrakty byly uchovávány v plastových uzavřených lahvičkách při teplotě -28 °C a nižší³⁴.

Ovoce a zelenina byla extrahována pomocí odšťavňovacího zařízení. Šťáva byla filtrována přes čtyři vrstvy gázy. Poté proběhla centrifugace filtrátu (10 minut, 9400g, 4 °C). Supernatant byl filtrován pomocí filtru Whatman (velikost pórů á 0,45 µm). Takto získané vzorky šťáv byly uchovávány v plastových uzavřených lahvičkách při teplotě -28 °C a nižší³⁵.

3.5 Měření AAS

3.5.1 Parametry přístrojů

Před měřením kalibračních roztoků a posléze i vzorků byly na obou použitých atomových absorpčních spektrometrech nastaveny počáteční parametry specifické pro jednotlivé analyty (viz Tab. 3.2 a Tab. 3.3).

V případě stanovení vápníku bylo k atomizaci na spektrometru AAS 3 vždy využito plamene ve složení acetylen – oxid dusný, u všech ostatních acetylen – vzduch.

Tab. 3.2 – Parametry přístroje pro stanovení některých prvků

prvek	Spektrometr AAS 3				
	Na	Mg	K	Ca	Zn
vlnová délka	589,0 nm	285,2 nm	766,5 nm	422,7 nm	213,9 nm
šířka spektrálního intervalu	0,5 nm	0,5 nm	1,0 nm	0,5 nm	0,5 nm
napájecí proud výbojky	10 mA	10 mA	10 mA	10 mA	5 mA
průtok acetylenu	60 L hod ⁻¹	60 L hod ⁻¹	60 L hod ⁻¹	60 L hod ⁻¹	60 L hod ⁻¹
průtok vzduchu	70 L hod ⁻¹	70 L hod ⁻¹	70 L hod ⁻¹	-	70 L hod ⁻¹
průtok oxidu dusného	-	-	-	70 L hod ⁻¹	-

Na spektrometru AAS 3 byly před měřením nastaveny ještě další parametry, při kterých probíhala všechna následná měření (nezávislá na měřeném prvku): integrační doba (3 sek), zpoždění (2 sek), doba spuštění integrace signálu (3 sek) a opakovací čas pro měření intenzit (1 sek).

Tab. 3.3 – Parametry přístroje pro stanovení selenu

Spektrometr UNICAM 939 AA	
vlnová délka	196,0 nm
šířka spektrálního intervalu	0,5 nm
napájecí proud výbojky	8 mA
teplota atomizátoru	950 °C

3.5.2 Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobního roztoku byly pro každý prvek připraveny kalibrační roztoky naředěním s deionizovanou vodou do odměrných baněk kalibrovaných na objem 100 mL (viz Tab. 3.4), přičemž příprava roztoků se pro každý prvek mírně lišila.

K roztokům vápníku se přidávalo 0,4 mL **pomocného roztoku KCl**, který byl připraven rozpuštěním 18,8 g pevného KCl ve 200 mL deionizované vody. Objem 0,4 mL se přidával k objemu 10 mL vzorku. K roztokům draslíku i sodíku bylo přidáváno 0,2 mL **přídavného roztoku A** k objemu 10 mL vzorku. Tento roztok byl připraven rozpuštěním 0,735 g CsNO₃ v deionizované vodě v 10 mL odměrné baňce. K roztokům vzorků pro stanovení hořčíku bylo přidáno navíc 0,2 mL přídavného roztoku A a 0,2 mL **přídavného roztoku B**, opět na k celkovému objemu 10 mL vzorku. Roztok B byl připraven rozpuštěním 0,24 g La₂O₃ a 1,02 g 8-hydroxychinolinu ve zředěné HCl (1:1 s deionizovanou vodou) opět v 10 mL odměrné baňce. K roztokům zinku ani selenu se žádné činidlo nepřidávalo, ale v obou případech bylo měření prováděno s deuteriovou korekcí pozadí.

Množství všech pomocných činidel byla v uvedených objemech přidávána vždy k 10 mL roztoku (v případě kalibračních roztoků i později vzorků).

Tab. 3.4 – Koncentrace připravovaných kalibračních roztoků

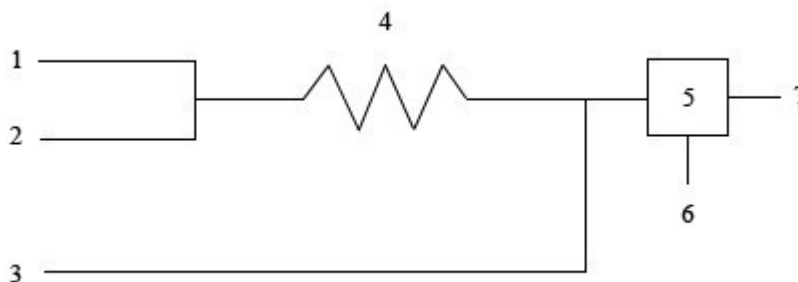
prvek	Koncentrace (mg L ⁻¹)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Na	0,10	0,25	0,50	1,0	2,5	5,0	10	25	-	-
Mg	0,05	0,10	0,25	0,50	1,0	2,5	5,0	10	-	-
K	0,10	0,25	0,50	1,0	2,5	5,0	10	25	50	-
Ca	0,10	0,25	0,50	1,0	5,0	10	20	-	-	-
Zn	0,025	0,05	0,10	0,25	0,50	1,0	2,5	5,0	10	50
Se	0,002	0,005	0,01	0,025	0,05	0,10	-	-	-	-

3.5.3 Aparatura pro chemické generování pro stanovení selenu

Před stanovením selenu byla nejprve sestavena aparatura pro chemické generování těkavých sloučenin. Její schéma je popsáno na Obr. 3.2.

Pro chemické generování hydridu selenu byl připraven roztok redukčního činidla

THB rozpuštěním 6,0 g THB a 5,0 g NaOH v 1000 mL deionizované vody. Dále byl připraven roztok HCl (zředěný 1:1 s deionizovanou vodou).



Obr. 3.2 – Schéma aparatury pro chemické generování těkavých sloučenin (převzato a upraveno³⁶)

1 – přívod vzorku s HCl, 2 – přívod NaBH₄, 3 – přívod nosného plynu (Ar), 4 – reakční cívka, 5 – separátor fází, 6 – odvod do odpadu, 7 – odvod do atomizátoru

3.6 Statistické zpracování výsledků

V případě této práce byly ve všech prováděných experimentech měřeny tři hodnoty, aby byla zajištěna dostatečná přesnost následného statistického vyhodnocení. Pro vyhodnocení výsledků bylo počítáno s mediánem.

Medián, \tilde{x} , je hodnota uprostřed zjištěných výsledků seřazených podle velikosti.

To platí v případě lichého počtu hodnot. Pokud jde o sudý počet hodnot, vypočítá se aritmetický průměr dvou prostředních čísel.

Aritmetický průměr, \bar{x} , je dán součtem všech hodnot souboru vydělený počtem hodnot. Pro počet měření $n < 20$ mohou krajní hodnoty výsledek zkreslovat, v takovém případě se k odhadu střední hodnoty použije medián;

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Rozpětí souboru všech výsledků, R , je rozdílem mezi největší a nejmenší hodnotou daného souboru;

$$R = x_{\max} - x_{\min} = x_n - x_1$$

Směrodatná odchylka, s , udává šířku intervalu, v němž se vyskytují výsledky opakovaných měření.

$$s = k_n \cdot R$$

Relativní směrodatná odchylka, s_r , je vyjádřena podílem směrodatné odchylky a mediánu z naměřených hodnot.

$$s_r = \frac{s}{x}$$

Interval spolehlivosti, $L_{1,2}$, neboli **mez opakovatelnosti**, r , udává interval, v němž se hledaný parametr centroidní tendence daného souboru výsledků nachází s jistou pravděpodobností, která je volena koeficientem spolehlivosti nebo hladinou významnosti.

$$L_{1,2} = K_n \cdot R$$

$$r = K_n \cdot R$$

Mez detekce, LOD, je minimální koncentrace detegované látky, na kterou reaguje systém jednoznačně měřitelnou nebo pozorovatelnou změnou, signál je statisticky odlišný od šumu.

Mez stanovitelnosti, LOQ, odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní stanovení.

Citlivost detektoru je definována jako jeho signál odpovídající jednotkovému látkovému či jinak definovanému množství.

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu.

Lineární dynamický rozsah, LDR, je rozsah koncentrací, ve kterém je citlivost detektoru konstantní¹¹.

K vyhodnocení experimentálních závislostí bylo využito programu MS Excel.

4 Výsledky a diskuse

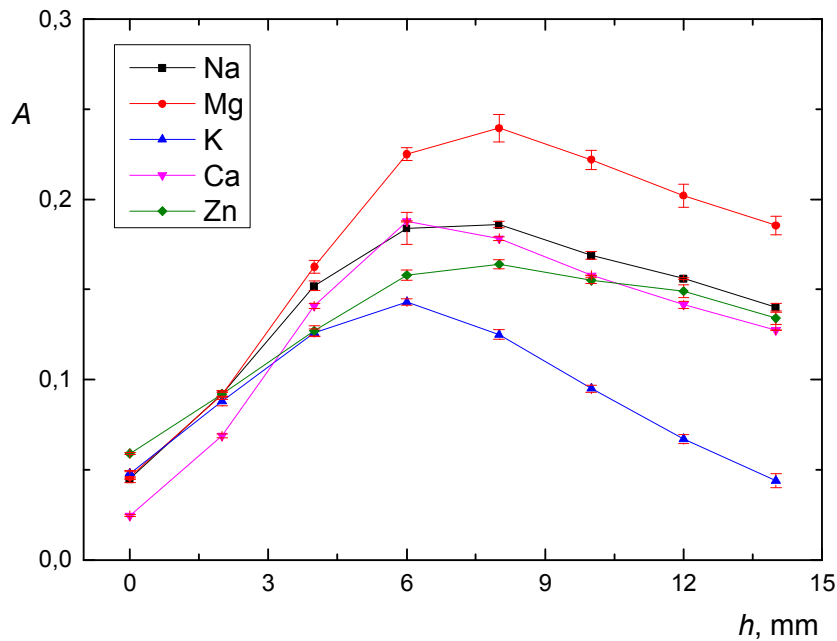
V rámci experimentální činnosti byla pozornost věnována nejprve optimalizaci a charakterizaci metod stanovení vybraných analytů. Jako vhodná metoda byla vybrána atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací. Takto byly stanoveny všechny analyty (sodík, hořčík, draslík, vápník) kromě selenu, který pro očekávanou nízkou koncentraci ve vzorcích takto stanovit nelze. V tomto případě byla technika plamenové atomizace nahrazena technikou generování hydridů chemickým způsobem. Následně byly analyzovány jednotlivé rostlinné vzorky a získaná data byla zpracována a diskutována.

4.1 Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací

Vzhledem k předpokladu, že většinu prvků lze díky jejich koncentraci stanovit technikou AAS s plamenovou atomizací, byla tato technika využita jako hlavní. Pro jednotlivé prvky individuálně bylo nutné nejprve optimalizovat výšku paprsku nad hranou hořáku a následně zjistit základní charakteristiky jejich stanovení.

4.1.1 Optimalizace výšky hořáku

Pro stanovení jednotlivých prvků technikou plamenové atomizace byla jako první provedena optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku, tedy změřena závislost absorbance na výšce procházejícího paprsku primárního zdroje záření, které je různě pohlcováno v různých částech plamene. Pro měření byl použit kalibrační roztok o koncentraci 0,25 mg L⁻¹ (hořčík), 0,5 mg L⁻¹ (sodík, draslík, zinek) a 1,0 mg L⁻¹ (vápník), pomocí něhož byla proměřena výška od 0 do 14 mm. Výsledky všech optimalizací jsou uvedeny na Obr. 4.1. Pro analýzu prvků pak byla nastavena výška s nejvyšší odezvou signálu. V případě sodíku, hořčíku, vápníku a zinku to bylo 8,0 mm, u draslíku a vápníku 6,0 mm.



Obr. 4.1 – Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku pro jednotlivé prvky

$$c_{\text{Mg}} = 0,25 \text{ mg L}^{-1}, c_{\text{Na, K, Zn}} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}, c_{\text{Ca}} = 1,0 \text{ mg L}^{-1},$$

$$\lambda_{\text{Na}} = 589,0 \text{ nm}, \lambda_{\text{Mg}} = 285,2 \text{ nm}, \lambda_{\text{K}} = 766,5 \text{ nm}, \lambda_{\text{Ca}} = 422,7 \text{ nm}, \lambda_{\text{Zn}} = 213,9 \text{ nm},$$

$$v_{\text{Na, Mg, Ca, Zn}} = 0,5 \text{ nm}, v_{\text{K}} = 1,0 \text{ nm}, I_{\text{Na, Mg, K, Ca}} = 10 \text{ mA}, I_{\text{Zn}} = 5 \text{ mA},$$

$$u_{\text{acetylen}} = 60 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 70 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{oxid dusný}} = 70 \text{ L hod}^{-1} (\text{jen pro vápník}),$$

$$h = 0 - 14 \text{ mm}$$

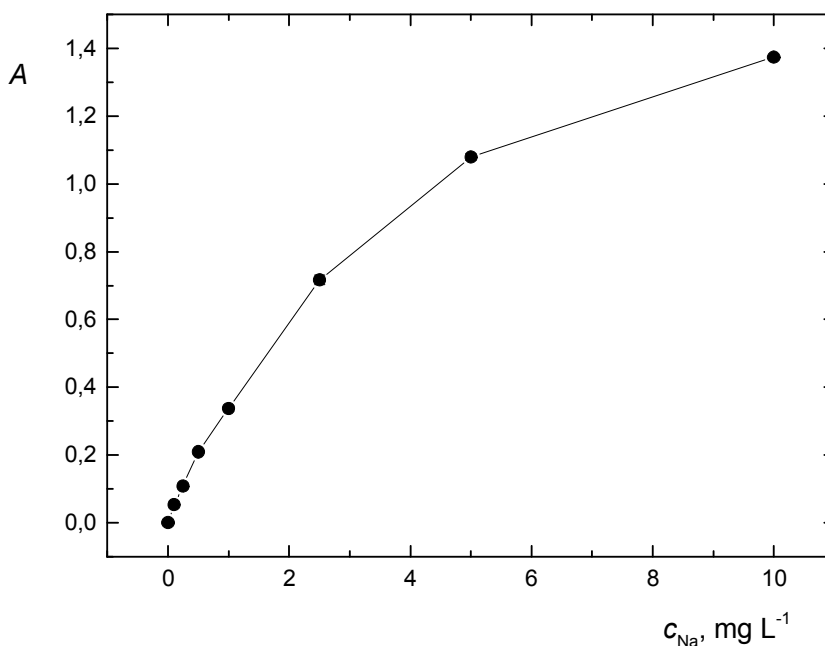
Z uvedených závislostí je patrné, že koncentrace volných atomů způsobující absorpci primárního záření není ve všech částech plamene stejná. Zaměříme-li se na konkrétní výšku, tak pro různé prvky odpovídá různému zastoupení volných atomů. Vzhledem k tomu, že výsledné optimální hodnoty výšky paprsku primárního záření nad hranou hořáku jsou v rozmezí od 6,0 do 8,0 mm, v případě nastavení hořáku na 7,0 mm můžeme pro všechna měření docílit vysoké citlivosti.

4.1.2 Proměření kalibračních závislostí

U všech kalibračních roztoků stanovovaných prvků byla nejprve změřena absorbance při vlnové délce charakteristické pro daný kov a doporučeném napájecím proudu pro každou výbojku. Ze získaných hodnot signálů byla pro všechny prvky sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci prvku uvedené na Obr. 4.2, Obr. 4.3, Obr. 4.4, Obr. 4.5 a Obr. 4.6.

Stanovení sodíku

Prvním stanovovaným analytem byl sodík. Z důvodu potlačení ionizačních interferencí bylo pro jeho stanovení nutné přidat k jednotlivým roztokům příslušné množství roztoku A (viz Kap. 3.5.2). Poté byly proměřeny roztoky o koncentraci 0,0; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0 a 10 mg L⁻¹ a byla sestrojena následující kalibrační závislost.



Obr. 4.2 – Kalibrační závislost stanovení sodíku

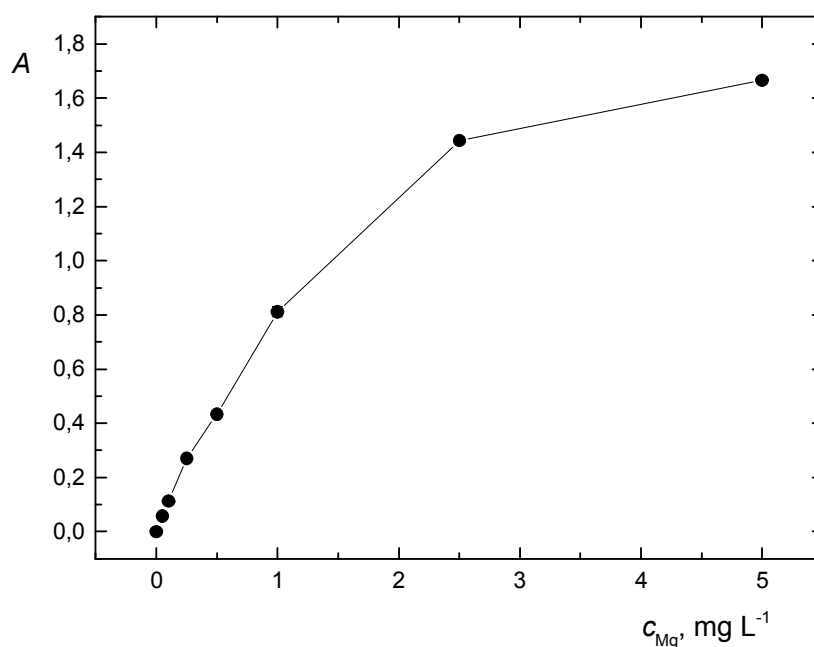
$$\lambda = 589,0 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, I = 10 \text{ mA}, u_{\text{acetylen}} = 60 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 70 \text{ L hod}^{-1}$$

Stanovení hořčíku

Dalším stanovovaným analytem byl hořčík. Při jeho stanovení bylo postupováno obdobně jako v případě stanovení sodíku. Zde bylo nutné přidat kvůli možným interferencím současně jak roztok A, tak i přídatný roztok B (viz Kap. 3.5.2). Měřeny byly roztoky o koncentraci 0,0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5 a 5,0 mg L⁻¹.

Stanovení draslíku

V případě stanovení draslíku, stejně jako u sodíku, byl k roztokům přidáván pouze přídatný roztok A k potlačení ionizačních interferencí (viz Kap. 3.5.2). Měřeny byly roztoky o koncentraci 0,0; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0 a 10 mg L⁻¹.

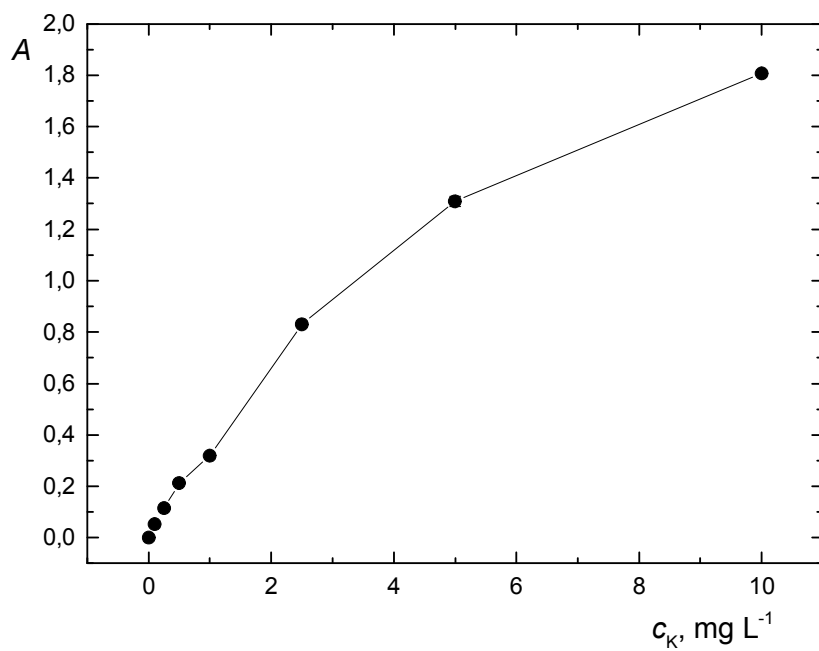


Obr. 4.3 – Kalibrační závislost stanovení hořčíku

$$\lambda = 285,2 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, I = 10 \text{ mA}, u_{\text{acetylen}} = 60 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 70 \text{ L hod}^{-1}$$

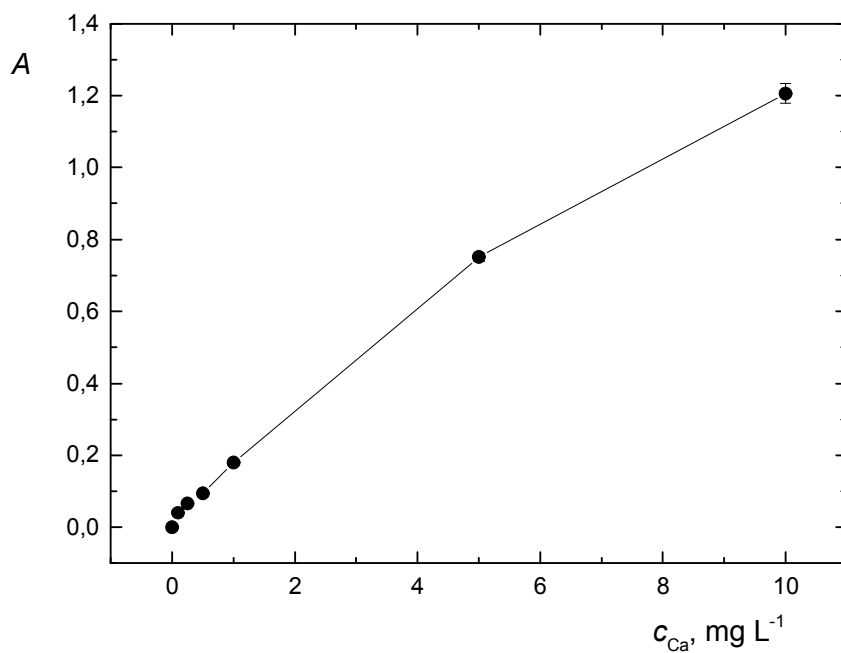
Stanovení vápníku

Dalším ze stanovovaných analytů byl vápník. Z důvodu potlačení interferencí byl k jeho roztokům přidáván roztok KCl (viz Kapitola 3.5.2). Poté byly měřeny roztoky o koncentraci 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 a 10,0 mg L⁻¹.



Obr. 4.4 – Kalibrační závislost stanovení draslíku

$\lambda = 766,5 \text{ nm}$, $\nu = 1 \text{ nm}$, $I = 10 \text{ mA}$, $u_{\text{acetylen}} = 60 \text{ L hod}^{-1}$, $u_{\text{vzduch}} = 70 \text{ L hod}^{-1}$

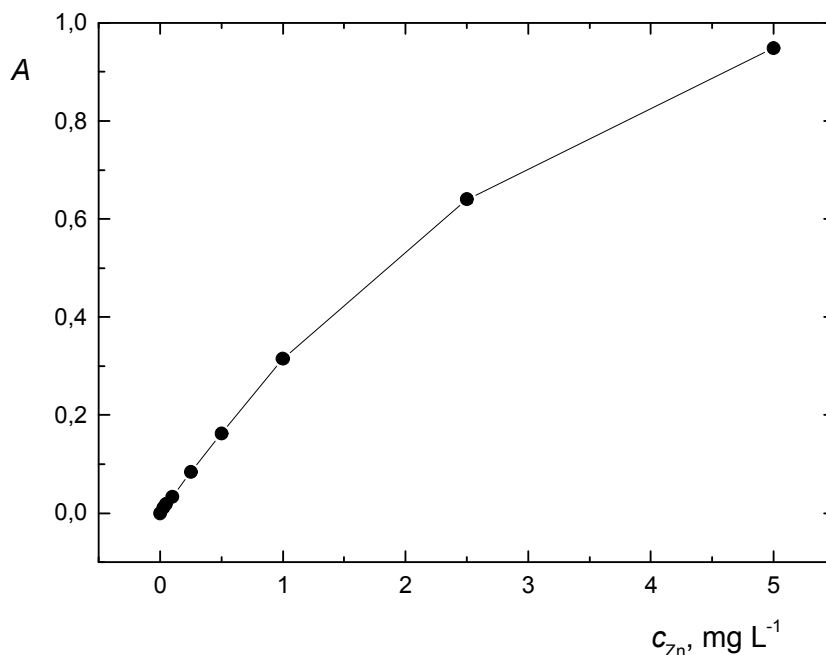


Obr. 4.5 – Kalibrační závislost stanovení vápníku

$\lambda = 422,7 \text{ nm}$, $\nu = 0,5 \text{ nm}$, $I = 10 \text{ mA}$, $u_{\text{acetylen}} = 60 \text{ L hod}^{-1}$, $u_{\text{oxid dusný}} = 70 \text{ L hod}^{-1}$

Stanovení zinku

Na rozdíl od ostatních analytů, v případě stanovení zinku, nebylo k jeho roztokům přidáváno žádné pomocné činidlo. Měření bylo ale prováděno s deuteriovou korekcí pozadí. Měřeny byly roztoky o koncentraci 0,0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0 mg L⁻¹.



Obr. 4.6 – Kalibrační závislost zinku

$$\lambda = 213,9 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, I = 5 \text{ mA}, u_{\text{acetylen}} = 60 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 70 \text{ L hod}^{-1}$$

4.1.3 Charakteristika metody

Po optimalizaci podmínek měření byla určena mez detekce, mez stanovitelnosti, citlivost, opakovatelnost, korelační koeficient, lineární dynamický rozsah a pracovní rozsah zvolené metody, tedy statistické údaje potřebné k charakterizaci použité metody (viz Tab. 4.1). K získání uvedených parametrů byla vždy využita sestavená kalibrační závislost.

Kalibrační roztok o koncentraci 0,05 mg L⁻¹ (hořčík), resp. 0,10 mg L⁻¹ (sodík, draslík, zinek), resp. 0,25 mg L⁻¹ (vápník) byl měřen na atomovém absorpčním spektrometru desetkrát. Z naměřených hodnot byla spočtena LOD a LOQ.

Poté byl desetkrát změřen roztok o koncentraci 1,0 mg L⁻¹ (hořčík, zinek), resp. 2,5

mg L⁻¹ (sodík, draslík), resp. 5,0 mg L⁻¹ (vápník). Z naměřených údajů byla spočtena opakovatelnost.

Změřená kalibrační závislost byla vynesena do grafu a její lineární část byla proložena přímkou lineární regrese. Tím byla získána směrnice kalibrační přímky, tedy citlivost. Z kalibrační přímky byly nakonec stanoveny i korelační koeficienty, lineární dynamický rozsah a pracovní rozsah.

Tab. 4.1 – Shrnutí základních charakteristik metod stanovení vybraných prvků

	Charakteristika metody				
	sodík	hořčík	draslík	vápník	zinek
Mez detekce* (mg L ⁻¹) · 10 ³	2,13 ^a	2,44 ^b	11,3 ^a	15,57 ^c	6,04 ^a
Mez stanovitelnosti** (mg L ⁻¹) · 10 ³	7,10 ^a	8,12 ^b	37,7 ^a	51,88 ^c	20,12 ^a
Citlivost (L mg ⁻¹)	0,4455	1,132	0,4648	0,2793	0,3920
Opakovatelnost (%)	0,521 ^d	0,473 ^e	0,851 ^d	0,986 ^f	0,713 ^e
Korelační koeficient	0,9858	1,000	0,9946	0,9214	0,9901
LDR do (mg L ⁻¹)	2,5	3,0	7,0	10	4,0
Pracovní rozsah do (mg L ⁻¹)	10	5,0	10	10	5,0

*3σ kritérium, **10σ kritérium, ^apro 0,1 mg L⁻¹, ^bpro 0,05 mg L⁻¹, ^cpro 0,25 mg L⁻¹, ^dpro 2,5 mg L⁻¹, ^epro 1,0 mg L⁻¹, ^fpro 5,0 mg L⁻¹

4.2 Generování těkavých hydridů pro stanovení selenu

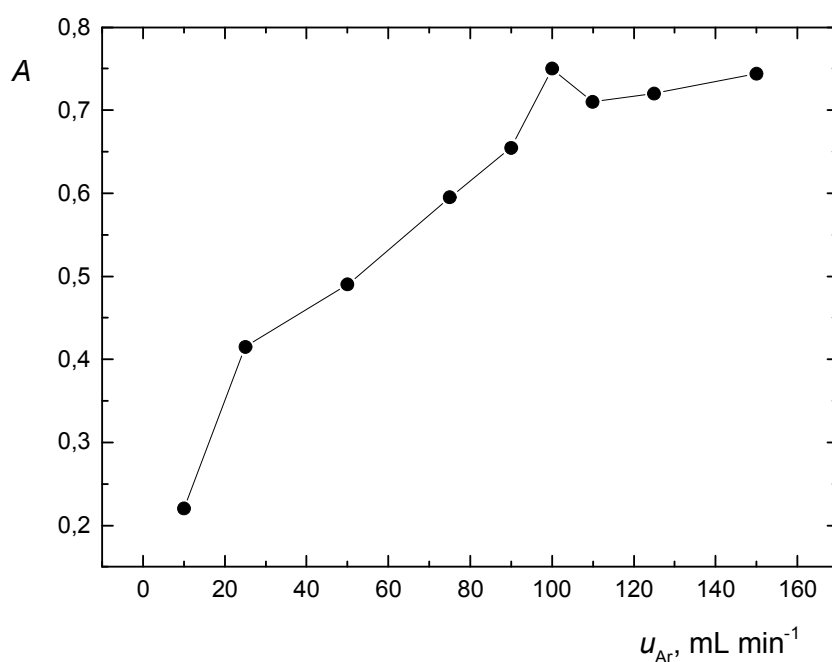
Pro očekávanou nízkou koncentraci ve vzorcích byl selen stanovován pomocí techniky chemického generování hydridů (Chemical Hydride Generation – CHG). Provedeny byly optimalizace průtokové rychlosti nosného plynu a průtokové rychlosti roztoků reakční směsi a byly určeny charakteristiky stanovení.

4.2.1 Optimalizace průtokové rychlosti argonu a pumpy

U selenu jako u jediného z analyzovaných prvků, bylo měření prováděno na druhém z použitých spektrometrů (UNICAM 939 AA) s použitím deuteriové korekce pozadí a s atomizací pomocí generování těkavých hydridů. Provedeny byly optimalizace průtokové rychlosti argonu (viz Obr. 4.7) a průtokové rychlosti reakčních složek směsi (viz Obr. 4.8).

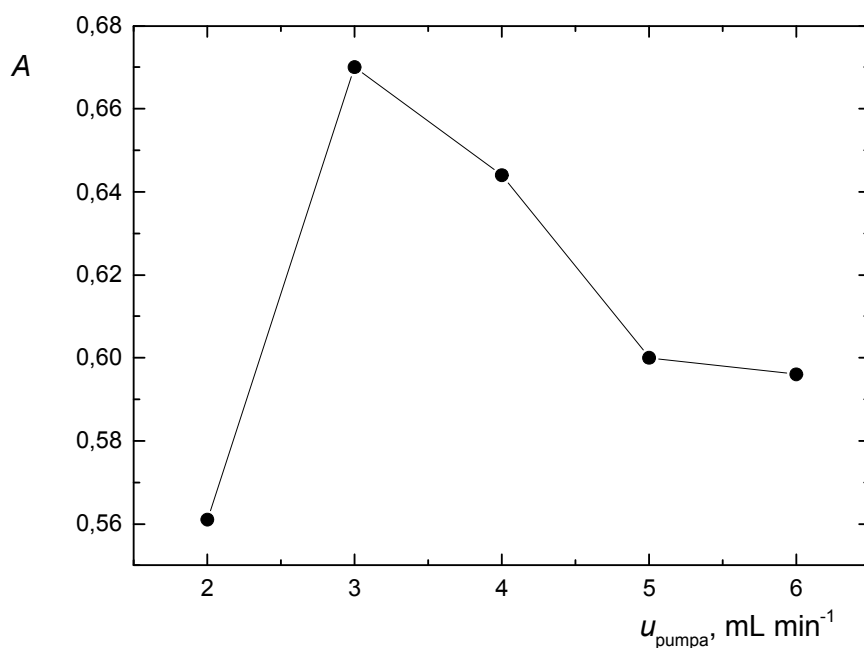
Měření závislosti absorbance na průtokové rychlosti argonu (nosný plyn) bylo prováděno při průtokové rychlosti 10; 25; 50; 75; 90; 100; 110; 125 a 150 mL min⁻¹ při použití roztoku o koncentraci selenu 100 µg L⁻¹. Výsledná hodnota průtokové rychlosti nosného plynu (100 mL min⁻¹), které odpovídal nejvyšší signál, byla použita pro měření kalibračních roztoků a vzorků.

Závislost absorbance na průtokové rychlosti reakčních roztoků byla proměřena při průtokové rychlosti 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 a 6,0 mL min⁻¹ u roztoku o koncentraci 100 µg L⁻¹. Hodnota (3,0 mL min⁻¹), u níž byl zaznamenán nejvyšší signál, byla použita pro následné měření kalibračních roztoků a vzorků.



Obr. 4.7 – Optimalizace průtokové rychlosti nosného plynu

$$c_{Se} = 100 \mu\text{g L}^{-1}, t_{\text{atomizátor}} = 950 \text{ }^{\circ}\text{C}$$



Obr. 4.8 – Optimalizace průtokové rychlosti reakčních roztoků

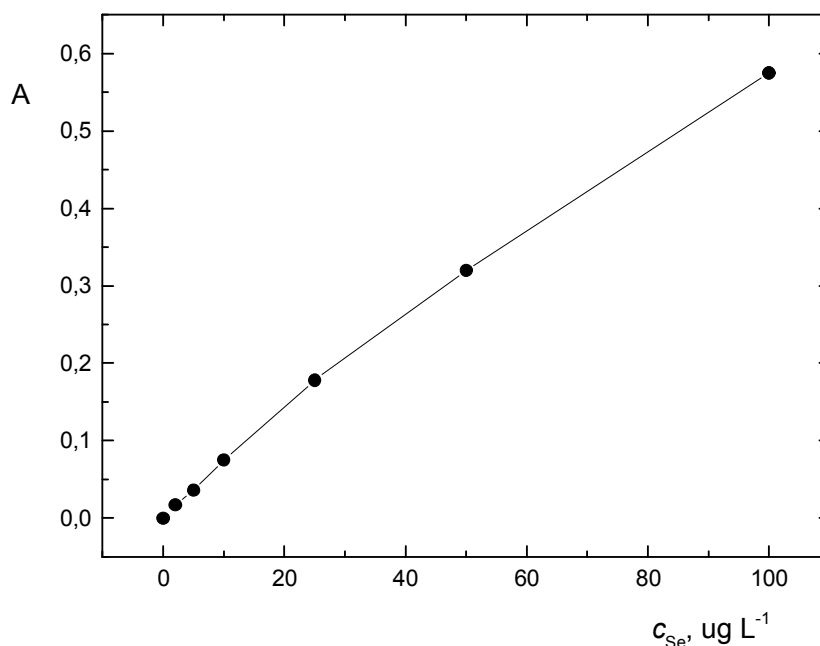
$$c_{\text{Se}} = 100 \mu\text{g L}^{-1}, t_{\text{atomizátor}} = 950 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

4.2.2 Měření kalibračních závislostí

Před měřením kalibračních roztoků selenu byla nejdříve sestavena aparatura a připraveny roztoky na generování těkavých hydridů (viz Kap. 3.5.3). Poté byly změřeny kalibrační roztoky, z nichž byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci analytu (viz Obr. 4.9).

Stanovení selenu

Jediným analytem stanovovaným technikou generování těkavých hydridů byl selen. U něj nebylo nutné k roztokům přidávat žádná pomocná činidla, měření však bylo prováděno s deuteriovou korekcí pozadí. Měřeny byly kalibrační roztoky o koncentraci 0,0; 2,0; 5,0; 10; 25; 50 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Obr. 4.9 – Kalibrační závislost selenu

$\lambda = 196,0 \text{ nm}$, $\nu = 0,5 \text{ nm}$, $I = 8 \text{ mA}$, $u_{\text{pumpa}} = 3 \text{ mL min}^{-1}$, $t_{\text{atomizátor}} = 950 \text{ }^{\circ}\text{C}$,

$u_{\text{argon}} = 100 \text{ mL min}^{-1}$

4.2.3 Charakteristika metody

Po optimalizaci podmínek pro měření byla určena mez detekce, mez stanovitelnosti, citlivost, opakovatelnost, korelační koeficient, lineární dynamický rozsah a pracovní rozsah pro charakterizaci zvolené metody (viz Tab. 4.2).

Kalibrační roztok o koncentraci $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ byl proměřen na atomovém absorpčním spektrometru desetkrát a z naměřených hodnot byla spočtena LOD a LOQ. Poté byl desetkrát změřen roztok o koncentraci $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Z naměřených údajů byla spočtena opakovatelnost. Z kalibrační závislosti byl nakonec stanoven korelační koeficient, lineární dynamický rozsah a pracovní rozsah.

Tab. 4.2 – Statistické zpracování údajů o metodě

Charakteristika metody	
	selen
Mez detekce* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,34 ^a
Mez stanovitelnosti** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,13 ^a
Citlivost ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	0,0074
Opakovatelnost (%)	1,86 ^b
Korelační koeficient	0,9910
Lineární dynamický rozsah do ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100
Pracovní rozsah ($\mu\text{g L}^{-1}$)	250

* 3σ kritérium, ** 10σ kritérium, ^apro $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, ^bpro $50 \mu\text{g L}^{-1}$

4.3 Měření reálných vzorků

V poslední části práce byla pozornost věnována měření samotných rostlinných vzorků, při kterém byly uplatněny dříve zjištěné optimální parametry. Přehled výsledných hodnot pro vodné extrakty je uveden v Tab. 4.3, pro methanolové extrakty v Tab. 4.4 a pro vzorky šťáv v Tab. 4.5. Stejně jako u kalibračních roztoků bylo i ke vzorkům přidán příslušný přidavný roztok k potlačení interferencí (viz Kap. 3.5.2). Vzhledem k rozdílnému zastoupení jednotlivých analytů ve vzorcích bylo nutné vzorky ředit deionizovanou vodou. V případě měření vápníku, sodíku a hořčíku byly vodné a methanolové extrakty i vzorky šťáv ředěny stokrát. Při měření draslíku byly pouze vodné extrakty ředěny stokrát, methanolové extrakty a šťávy tisíckrát. U zinku a selenu se všechny vzorky ředily desetkrát a měření bylo prováděno s deuteriovou korekcí pozadí.

Tab. 4.3 – Výsledné koncentrace kovů ve vodných extraktech*

Vzorek	koncentrace kovu (mg L ⁻¹)					
	sodík	hořčík	draslík	vápník	zinek	selen
1 V	12,4	129	208	612	1,29	<LOD
2 V	11,0	43,6	48,9	61,2	0,77	<LOD
3 V	2,84	56,7	117	466	0,46	<LOD
4 V	23,0	54,9	233	137	0,38	<LOD
5 V	13,9	43,1	95,8	169	0,33	<LOD
6 V	72,1	77,8	110	602	0,56	<LOD
7 V	12,2	179	42,5	201	0,41	<LOD
8 V	11,5	223	59,0	275	0,33	<LOD
9 V	4,01	186	36,8	238	0,65	<LOD
10 V	4,48	68,6	69,9	51,6	0,43	<LOD
11 V	7,52	38,3	60,9	0,42	0,43	<LOD
12 V	9,63	253	64,6	36,4	0,33	<LOD
13 V	4,94	37,1	39,9	71,7	0,30	<LOD
14 V	10,6	216	153	7,02	0,56	<LOD
15 V	5,65	56,2	72,2	60,4	0,95	<LOD

Tab. 4.4 – Výsledné koncentrace kovů v methanolových extraktech*

Vzorek	koncentrace kovu (mg L ⁻¹)					
	sodík	hořčík	draslík	vápník	zinek	selen
1 M	17,8	21,6	1196	25,0	0,68	<LOD
2 M	75,4	23,7	375	16,6	0,25	<LOD
3 M	50,1	11,2	170	4,02	0,070	<LOD
4 M	48,9	14,1	1317	1,62	0,17	<LOD
5 M	23,5	14,1	763	14,2	0,010	<LOD
6 M	99,7	36,0	973	72,0	0,010	<LOD
7 M	33,0	19,1	578	11,2	0,20	<LOD
8 M	70,0	35,7	215	11,2	0,090	<LOD
9 M	2,37	21,4	154	6,42	0,070	<LOD
10 M	4,01	12,7	403	5,22	0,14	<LOD
11 M	0,73	13,4	201	<LOD	0,12	<LOD
12 M	5,65	20,4	284	2,22	0,12	<LOD
13 M	<LOD	15,7	189	16,62	0,04	<LOD
14 M	2,60	37,4	1338	5,22	0,56	<LOD
15 M	0,73	15,7	403	4,02	0,090	<LOD
16 M	2,13	18,9	327	<LOD	0,040	<LOD
17 M	10,3	16,1	382	<LOD	0,010	<LOD
18 M	4,01	16,2	111	<LOD	0,22	<LOD

Tab. 4.5 – Výsledné koncentrace kovů ve vzorcích šťáv*

Vzorek	koncentrace kovu (mg L ⁻¹)					
	sodík	hořčík	draslík	vápník	zinek	selen
1 Š	8,46	36,5	968	31,1	0,22	<LOD
2 Š	98,7	60,5	1419	45,4	0,62	<LOD
3 Š	48,7	43,0	1168	33,4	0,28	<LOD
4 Š	16,0	31,0	927	16,0	0,41	<LOD
5 Š	2,13	59,2	1484	142,0	0,36	<LOD
6 Š	22,3	58,5	1994	177	0,74	<LOD
7 Š	27,9	62,9	2214	154	1,17	<LOD
8 Š	0,73	91,5	1839	86,4	0,28	<LOD
9 Š	10,6	18,1	831	46,1	0,010	<LOD
10 Š	1,90	54,4	1252	12,4	0,17	<LOD
11 Š	12,4	186	1629	161	3,82	<LOD
12 Š	11,5	40,0	1697	43,1	0,14	<LOD
13 Š	11,5	34,7	3058	24,4	0,49	<LOD
14 Š	4,71	125	1422	203	0,28	<LOD
15 Š	24,4	94,5	2313	202	0,68	<LOD
16 Š	11,7	149	2071	215	0,89	<LOD
17 Š	0,96	183	3536	143	0,65	<LOD
18 Š	5,18	90,5	2458	173	0,22	<LOD
19 Š	27,3	91,5	2406	7,62	1,20	<LOD
20 Š	3,77	32,7	593	54,6	0,20	<LOD
21 Š	125	79,1	4425	101	0,43	<LOD
22 Š	426	188	2087	89,4	0,71	<LOD

*uvedené koncentrace analytů jsou měřeny s relativní směrodatnou odchylkou < 3 %

4.3.1 Majoritní zastoupení prvků ve vzorcích

V Tab. 4.6 jsou uvedeny rostliny, u kterých bylo zaznamenáno největší zastoupení měřených prvků. Jitrocel kopinatý a vlašovičnick větší se zde vyskytují více než v jednom případě. U jitrocele byla dosažena maximální koncentrace sodíku u vodného i methanolového extraktu. Podobně tomu je u vlašovičnick většího z hlediska obsahu zinku. Ne všechny léčivé rostliny, jako např. vlašovičnick větší mohou sloužit jako zdroj iontů pro člověka vzhledem ke své možné toxicitě při podávání ve větším množství. Do souboru byl vlašovičnick větší zařazen z hlediska, toho, že je využíván jako léčivá rostlina pro vnější použití. Z výsledků uvedených v Tab. 4.6 by se dalo usoudit, že přípravou odvaru ze sušeného jitrocele kopinatého je možné získat nejvyšší koncentraci sodíku, z jablečnicku obecného hořčík, ze smetánky lékařské draslík a z vlašovičnicku většího vápník a zinek. Přípravou čerstvé šťávy z petržele je největší zisk sodíku a hořčíku, z grapefruitu draslíku, z limetky vápníku a z máslové dýně zinku.

Tab. 4.6 – Přehled rostlin s majoritním zastoupením daného prvku

	voda	methanol	šťávy
sodík	jitrocel kopinatý	jitrocel kopinatý	petržel
hořčík	jablečnick obecný	jitrocel kopinatý	petržel
draslík	smetánka lékařská	hluchavka bílá	grapefruit
vápník	vlašovičnick větší	jitrocel kopinatý	limetka
zinek	vlašovičnick větší	vlašovičnick větší	máslová dýně

Vzhledem k tomu, že jednotlivé prvky a jejich ionty jsou v rostlinách vázané na různé sloučeniny, s různými vlastnostmi, byl zvolen i další způsob extrakce, který je v jiných studiích častý – extrakce methanolem. Tyto extrakty samozřejmě nemohou být považovány za zdroj iontů z příslušné rostliny. V případě přípravy methanolového výluhu je možné získat z jitrocele kopinatého nejvíce sodíku, hořčíku a vápníku, z hluchavky bílé nejvíce draslíku a z vlašovičnicku většího nejvíce zinku.

V Tab. 4.7 je u každého ze změřených prvků uvedeno pět vzorků (vodných, methanolových i šťáv), u nichž byl zaznamenán jejich nejvyšší obsah.

Tab. 4.7 – Přehled rostlin s nejvyšší koncentrací daného prvku

prvek	vzorek (V)*	koncentrace (mg L ⁻¹)	vzorek (M)*	koncentrace (mg L ⁻¹)	vzorek (Š)*	koncentrace (mg L ⁻¹)
sodík	jitrocel kopinatý	72,0	jitrocel kopinatý	99,7	petržel	426
	smetánka lékařská	23,0	mateřídouška obecná	75,4	grapefruit	125
	dobromysl obecná	13,9	řepík lékařský	70,0	maliny	98,7
	vlaštovičník větší	12,4	routa vonná	50,1	jahody	48,7
	máta peprná	12,2	smetánka lékařská	48,9	bílý rybíz	27,9
	hořčík	jablečník obecný	253	hluchavka bílá	37,4	petržel
řepík lékařský		223	jitrocel kopinatý	36,0	máslová dýně	186
hluchavka bílá		216	řepík lékařský	35,7	cuketa kulatá	183
šalvěj lékařská		186	mateřídouška obecná	23,7	limetka	149
máta peprná		179	vlaštovičník větší	21,6	pomeranč	125
draslík	smetánka lékařská	233	hluchavka bílá	1338	grapefruit	4425
	vlaštovičník větší	208	smetánka lékařská	1317	cuketa kulatá	3536
	hluchavka bílá	154	vlaštovičník větší	1196	rajče	3058
	routa vonná	117	jitrocel kopinatý	973	mandarinka	2458
	jitrocel kopinatý	111	dobromysl obecná	763	avokádo	2406
vápník	vlaštovičník větší	612	jitrocel kopinatý	72,0	limetka	215
	jitrocel kopinatý	602	vlaštovičník větší	25,0	pomeranč	203
	routa vonná	466	mateřídouška obecná	16,6	citron	202
	řepík lékařský	275	levandule lékařská	16,6	červený rybíz	177
	šalvěj lékařská	238	dobromysl obecná	14,2	mandarinka	172
zinek	vlaštovičník větší	1,29	vlaštovičník větší	0,68	máslová dýně	3,82
	stevie sladká	0,95	hluchavka bílá	0,56	avokádo	1,20
	mateřídouška obecná	0,77	mateřídouška obecná	0,25	bílý rybíz	1,17
	šalvěj lékařská	0,65	galgán	0,22	limetka	0,89
	jitrocel kopinatý, hluchavka bílá	0,56	máta peprná	0,20	červený rybíz	0,74

*V – vodné extrakty, M – methanolvé extrakty, Š – šťávy

Ze získaných výsledků by se dalo usoudit, které rostliny v souvislosti s tím, jakým způsobem byly připravované, jsou „nejzdravější“ z hlediska obsahu esenciálních prvků. V této tabulce lze pozorovat viditelné rozdíly v obsahu jednotlivých prvků z hlediska výchozího extrakčního činidla. Když vezmeme v úvahu například zastoupení draslíku ve smetánce lékařské, již na první pohled je zřejmé, že účinnější extrakce byla dosažena methanolvým (1317 mg L^{-1}) než vodným roztokem (233 mg L^{-1}). Tento výsledek podporuje původní představu, že extrakcí methanolvým roztokem dojde k vyloučení většího množství prvku, tedy že bude dosaženo vyšší extrakční účinnosti. Pokud se však podíváme na hořčík a jeho zastoupení v řepíku lékařském, zjistíme, že u vodného extraktu byla naměřena koncentrace $223,35 \text{ mg L}^{-1}$, u methanolového $35,73 \text{ mg L}^{-1}$. Z těchto výsledků je patrné, že není možné považovat extrakci methanolvým roztokem za univerzální metodu s nejvyšší extrakční účinností prvků pro všechny výše uvedené léčivé rostliny. Množství jednotlivých prvků získaných oběma způsoby extrakce se liší, což dokumentuje, že prvky jsou vázány na různé sloučeniny.

Ve vzorcích šťáv v případě zinku silně dominuje máslová dýně. U vápníku je nejvyšší zastoupení zejména u citrusových plodů (limetka, pomeranč, citron, mandarinka) a červeného rybízu. Draslík je hojně zastoupen rovněž v citrusech (grapefruit, mandarinka), ale také v rajčeti. Na hořčík jsou bohaté zejména zástupci ze zeleniny, jimiž je kořen petržele a plod cukety kulaté. Sodíku bylo naměřeno nejvíce v petrželi, ale velké množství bylo zjištěno u i malin a jahod.

5 Závěr

Bylo optimalizováno stanovení vybraných prvků (sodík, hořčík, draslík, vápník, zinek) metodou atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací a stanovení selenu technikou generování těkavých sloučenin chemickým způsobem.

Ve vodných a methanolových extraktech z 15 resp. 18 léčivých rostlin bylo stanoveno množství sledovaných prvků. Nejvyšší obsah hořčíku měl vodný roztok jablečnicku obecného a řepíku lékařského, vápníku bylo nejvíce ve vlašovičnicku větším a jitroceli kopinatém. Obsah draslíku byl vždy vyšší než sodíku. Nejvyšší obsah zinku byl ve vodném roztoku vlašovičnicku většího.

Byl zjištěn rozdíl mezi vodným a methanolovým extraktem v množství testovaných prvků. Jejich extrahovatelnost závisí na sloučeninách, ve kterých jsou v rostlinách přítomny.

Sledované prvky byly stanoveny také ve 22 šťávách ovoce a zeleniny. Vysoká koncentrace Ca^{2+} byla zejména v citrusových plodech a červeném rybízu, Mg^{2+} v kořenu petržele, máslové dýni nebo cuketě kulaté, Zn^{2+} v máslové dýni, avokádu a bílém rybízu.

Obsah selenu byl ve všech případech pod mezí detekce.

Literatura

1. Sofrová D. a kolektiv: *Biochemie. Základní kurz*. 4. vyd. Praha, Karolinum 2009
2. Van Loon J. A.: *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: Selected Methods*. New York, Academic Press 1980
3. Welz B., Vale M. G. R., Pereira É. R., Castilho I. N. B., Dessuy M. B.: Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, Present and Future Aspects – A Critical Review, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **25**:5, 799-821 (2014).
4. Beatty R. D., Kerber J. D.: *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. 2nd ed. Norwalk, The Perkin-Elmer Corporation 1993
5. Chen J., Teo K. Ch.: Determination of cadmium, copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, *Analytica Chimica Acta*, **450**:1-2, 215–222 (2001)
6. Dionísio A. G. G., Dantas de Jesus A. M., Amais R. S., Donati G. L., Miranda K., Guerra M. B. B., Nóbrega J. A., Pereira-Filho E. R.: Old and New Flavors of Flame (Furnace) Atomic Absorption Spectrometry, *International Journal of Spectroscopy*, **2011**:262715, 30 pages (2011)
7. Wu P., He S., Luo B., Hou X.: Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A Review, *Applied Spectroscopic Reviews*, **44**:5, 411-437 (2009)
8. *Atomic Absorption Spectrometry*. J. E. Cantle (edit.). Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company 1982
9. Ebdon L., Evans E. H., Fisher A., Hill S. J.: *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*. Weinheim, John Wiley & Sons 1998
10. Brodie K., Neate S.: *Features and Operation of Hollow Cathode Lamps and Deuterium Lamps*. Santa Clara, Agilent Technologies 2010
11. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2010
12. Robinson J. W., Frame E. M. S., Frame G., M. II: *Undergraduate Instrumental Analysis*, 6th ed. New York, Marcel Dekker 2005
13. Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2004
14. Robinson J. W.: *Atomic Spectroscopy*, 2nd ed. New York, Marcel Dekker 1996
15. *Handbook of Spectroscopy*. G. Gauglitz, T. Vo-Dinh (edits.). Weinheim, WILEY-VCH Verlag 2003
16. D'Ulivo A., Dědina J., Mester Z., Sturgeon R. E., Wang Q., Welz B.: Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, **83**:6, 1283–1340 (2011)
17. D'Ulivo A.: Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report), *Spectrochimica Acta Part B*:

- Atomic Spectroscopy*, **69**, 67 – 68 (2012)
18. Gupta U. C., Gupta S. C.: Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review, *Pedosphere*, **24**:1, 13 – 38 (2014)
 19. Kittnar O. a kolektiv: *Lékařská fyziologie*. Praha, Grada Publishing 2011
 20. Roza G.: *Calcium*. New York, The Rosen Publishing Group 2008
 21. *Applied Physiology in Intensive Care Medicine*. R. M. Pinsky, L. Brochard, J. Mancebo (edits.). Berlin, Springer-Verlag 2006
 22. Dibaba D. T., Xun P., He K.: Dietary magnesium intake is inversely associated with serum C-reactive protein levels: meta-analysis and systematic review, *European Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 510 – 516 (2014)
 23. Fraústo da Silva J. J. R., Williams R. J. P.: *The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life*. 2nd ed. New York, Oxford University Press 2001
 24. Young D. B.: *Control of Potassium: Distribution, Excretion, and Extracellular Concentration*. Elektronická verze knihy Morgan and Claypool 2013
 25. Novák F.: *Úvod do klinické biochemie*. Praha, Karolinum 2002
 26. Maret W.: Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis: Recent Insights and Current trends. *BioMetals*, **14**, 187 – 190 (2001)
 27. Brown K. H., Wuehler S. E., Peerson J. M.: The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency, *Food & Nutrition Bulletin*, **22**:2, 113-125 (2001)
 28. Bhowmik D., Chiranjib, Kumar K. P. S.: A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic disease, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **1**:1, 5 – 11 (2010)
 29. Reilly C.: *Selenium in Food and Health*. 2nd ed. New York, Springer Science & Bussines Media 2006
 30. Fairweather-Tait S. J., Bao Y., Broadley M. R., Collings R., Ford D., Hesketh J. E., Hurst R.: Selenium in Human Health and Disease, *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**:7, 1337 – 1383 (2011)
 31. Ullrey D. E. et al: *Selenium in Nutrition: Revised Edition*. Washington, D. C., National Academy Press 1983
 32. Rayman M. P.: Selenium and human health, *The Lancet*, **379**, 1256 – 1268 (2012)
 33. Hatfield D. L., Berry M. J., Gladyshev V. N.: *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*, 2nd ed. New York, Springer Science & Business Media 2006
 34. Tupec, M.: *Antioxidační vlastnosti léčivých rostlin*. Bakalářská práce PřF UK Praha 2013
 35. Bělonožníková K.: *Vlastnosti rostlinných extraktů*. Bakalářská práce PřF UK Praha 2014
 36. Vošmíková A.: *Vliv rušivých prvků při elektrochemickém generování selenovodíku*. Bakalářská práce PřF UK Praha 2012