

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Katarína Labancová

**STANOVENIE ŤAŽKÝCH KOVOV V KRVI A PERIACH  
SÝKORIEK VEĽKÝCH**

Stanovení těžkých kovů v krvi a peří sýkor koňader

Determination of heavy metals in great tits blood and feathers

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

## **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.

V Praze dne 25. srpna 2017.

.....

podpis

## **Pod'akovanie**

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

## **Abstrakt CZ**

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou vybraných těžkých kovů (olovo, kadmium, měď, chrom, arsen) ve vzorcích krve a peří sýkor koňader (*Parus major*) metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací a technikou generování těkavých sloučenin s detekcí křemenného atomizátoru. Za optimálních podmínek byla sestavena kalibrační závislost a zjištěné základní charakteristiky pro jednotlivé prvky.

## **Klíčová slova**

Atomová absorpční spektrometrie, elektrotermická atomizace, chemické generování, těžké kovy, krev, peří, sýkora

## **Abstrakt SK**

Táto bakalárska práca sa zaoberá analýzou vybraných ťažkých kovov (olovo, kadmium, meď, chróm a arzén) vo vzorkách krvi a periach sýkoriek veľkých (*Parus major*) metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou a technikou generovania prchavých zlúčenín s detekciou kremenného atomizátoru. Za optimálnych podmienok bola zostavená kalibračná závislosť a zistené základné charakteristiky pre jednotlivé prvky.

## **Kľúčové slová**

atómová absorpčná spektrometria, elektrotermická atomizácia, chemické generovanie, ťažké kovy, krv, perie, sýkorka

## Obsah

Zoznam použitých skratiek .....	6
1 Úvod.....	7
1.1 Cieľ bakalárskej práce .....	7
2 Teoretická časť.....	8
2.1 Atómová absorpčná spektrometria .....	8
2.2 AAS s plameňovou atomizáciou .....	8
2.3 AAS s elektrotermickou atomizáciou.....	9
2.4 AAS s generovaním prchavých zlúčenín.....	11
2.4.1 Chemické generovanie hydridov .....	12
2.4.2 Elektrochemické generovanie hydridov .....	12
2.4.3 Fotochemické generovanie hydridov .....	12
2.5 Stanovované prvky .....	13
2.5.1 Olovo .....	13
2.5.2 Meď .....	14
2.5.3 Kadmium.....	16
2.5.4 Chróm.....	17
2.5.5 Arzén .....	18
2.6 Sýkorka veľká.....	19
3 Experimentálna časť.....	20
3.1 Používané chemikálie .....	20
3.2 Používané prístroje, zariadenia a pracovné parametry .....	20
3.3 Experimentálna aparatúra pre metódu ETA-AAS.....	21
3.4 Experimentálna aparatúra pre metódu HG-AAS.....	21
3.5 Analyzované vzorky .....	23
3.6 Príprava vzorkou k analýze .....	23
3.7 Príprava kalibračných roztokov .....	25
3.8 Štatistické spracovanie výsledkov .....	25
4 Výsledková časť a diskusia.....	27
4.1 Optimálne podmienky pre elektrotermickú atomizáciu .....	27
4.2 Optimálne podmienky pre stanovenie arzénu metódou chemického generovania....	30
4.3 Kalibračná závislosť .....	30
4.4 Základné charakteristiky stanovenia .....	33
4.5 Analýza vzorkou krvi a peria.....	33
5 Záver .....	37
6 Literatúra.....	38

## Zoznam použitých skratiek

A	Absorbancia
AAS	Atomová absorpčná spektrometria
ETA	Elektrotermická atomizácia
HG	Generovanie hydridov
K	Kelvin
LOD	Medza detekcie
LOQ	Medza stanoviteľnosti
n	Počet
O	Opakovateľnosť
ppm	Jednotka koncentrácie odpovedajúca mg/L
R	Rozpätie
s	Smerodajná odchýlka
UV	Ultrafialové žiarenie
v	Prietoková rýchlosť
VIS	Viditeľné žiarenie
$\tilde{x}$	Medián

# 1 Úvod

V súčasnosti patrí atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou medzi obľúbené metódy stanovenia stopových a ultrastopových koncentrácií takmer všetkých kovov, metaloidov a niektorých nekovov. Princíp je založený na dostatočne účinnom prevedení stanovovaných prvkov z roztoku vzorku do plynného atómového stavu. Výhodou bezplameňových atomizátorov je fakt, že celé nadávkované množstvo sa podieľa na stanovení a teda dosiahneme omnoho vyššiu okamžitú koncentráciu voľných atómov v plynnej fáze vo veľmi malom objeme. Atómová absorpčná spektrometria s chemickým generovaním prchavých zlúčenín je čoraz častejšie využívaná metóda. Patrí medzi metódy vhodné pre stanovenie významných hydridotvorných prvkov. Princíp metódy je založený na prevedení analytu na prchavú formu a následné účinné oddelenie analytu od matrice a tým sa dosiahne odstránenie rôznych interferencií. Medzi výhody tejto metódy patrí nízka cena aparatury a jednoduché prevedenie.

## 1.1 Cieľ bakalárskej práce

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanovenie koncentrácie vybraných ťažkých kovov v dodaných vzorkách krvi a peria sýkoriek. Ako vhodná metóda pre stanovenie olova, kadmia, medi a chrómu bola zvolená metóda atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou a pre stanovenie arzenu bolo použité chemické generovanie hydridov. Prvým cieľom práce bola príprava dodaných vzorkou k analýze (zahrňujúca váženie, rozklad a následné riedenie). Pred vlastným stanovením vybraných kovov v dodaných vzorkách bolo nutné pre meranie olova, kadmia, medi a chrómu overiť optimálne podmienky stanovenia (teplota pyrolýzy a teplota atomizácie) a pre meranie arzenu zostaviť experimentálnu aparaturu a overiť optimálne podmienky merania. Ďalším cieľom bolo za optimálnych podmienok zmerať kalibračné závislosti a zistiť základné charakteristiky stanovenia jednotlivých prvkov týmito technikami. Záverom bolo nutné merať a vyhodnotiť koncentrácie vyššie uvedených kovov v dodaných vzorkách.

## 2 Teoretická časť

### 2.1 Atómová absorpčná spektrometria

Atómová absorpčná spektrometria je jednou z najrozšírenejších optických analytických metód. Jej princípom je absorpcia žiarenia voľnými atómami v plynnom stave, ktoré vznikajú atomizáciou. Voľné atómy absorbujú žiarenie s určitou vlnovou dĺžkou a fotóny s určitou energiou. Počet absorbovaných fotónov udáva kvantitu a energia absorbovaných fotónov udáva kvalitu stanovovaných atómov. Vďaka svojej citlivosti a selektívnosti sa používa na stopovú a ultrastopovú analýzu [1].

Konštrukcia AAS sa skladá zo štyroch častí. Prvou časťou je zdroj primárneho žiarenia, ktorý musí mať vysokú energiu v úzkom spektrálnom intervale, stabilný žiarivý tok, minimálne pozadie a čiary nedeformované samoabsorpciou. Najčastejšie sa používajú výbojky s dutou katódou z kovu, ktorý sa stanovuje, bezelektrodové výbojky alebo viacprvkové lampy pri ktorých je ale menšia presnosť analýzy. Zaraďujú sa tu aj deutériové lampy, ktoré sa ale používajú za účelom korekcie pozadia [2]. Druhou časťou je atomizátor, v ktorom dochádza k atomizácii kvapalných vzorkou na samostatné atómy a zároveň dochádza k absorpcii elektromagnetického žiarenia voľnými atómami. Podľa spôsobu atomizácie delíme AAS : F-AAS (flame – atomic absorption spectrometry), ETA-AAS (electrothermal - atomic absorption spectrometry), HG-AAS (hydride generation - atomic absorption spectrometry) [3]. Tretou časťou je disperzný systém, ktorý slúži na izoláciu spektrálneho intervalu, ktorý obsahuje príslušnú absorpčnú rezonančnú čiaru stanovovaného prvku. Používa sa difrakčná mriežka alebo hranol. Štvrtou časťou je detektor. Najčastejšie sa využíva fotonásobič, ktorý ma vysokú citlivosť a je vhodný k rýchlym analýzám v širokom rozsahu intenzity [4].

### 2.2 AAS s plameňovou atomizáciou

Patrí medzi najstaršie a najbežnejšie používané metódy. Zvyčajne sa používa plameň acetylén - vzduch s teplotou 2300 K alebo plameň oxid dusný - acetylén s teplotou 2700 K.

Kvapalná vzorka sa privádza do plameňa pomocou zhmľovačov, kde sa vytvoria drobné kvapky aerosólu. Len malá časť vzorky sa premení na aerosól z dôvodu nízkej účinnosti zhmľovačov. Preto sa používa na stanovenie vyšších koncentrácií.

V plameni horáka prebieha disociácia a vznik voľných atómov. Nevýhodou plameňových atomizátorov je ich malá detekčná účinnosť z dôvodu malého podielu vzorky v plameni, ale výhodou je jednoduché a rýchle použitie [5] [6].

### 2.3 AAS s elektrotermickou atomizáciou

V tejto metóde sa dávkuje malé množstvo vzorky 10 – 40  $\mu\text{L}$  do grafitovej kyvety vyhrievanej prechodom elektrického prúdu. Celý nadávkovaný objem vzorky sa podieľa na absorpcii primárneho žiarenia. Vďaka tomu vzniká väčšia koncentrácia voľných atómov v plynnom stave [5] [7]. V porovnaní s AAS s plameňovou atomizáciou má táto metóda vysokú citlivosť, znížený detekčný limit, ale nevýhodou je že vzrastá pravdepodobnosť interferencie matrice a je nutné použiť korekciu pozadia [8]. Kyvety musia byť vyrobené z materiálu s dobrou tepelnou a elektrickou vodivosťou, chemickou odolnosťou, malou tepelnou rozťažnosťou a vysokou teplotou topenia. Vhodným materiálom je najčastejšie grafit, pyrolytický grafit, sklovitý uhlík, wolfrám, molybdén a tantal. Grafitová kyveta môže byť štandardná, vzorka sa dávkuje na stenu kyvety alebo kyveta s vloženou platformou a vzorka sa dávkuje na platformu alebo kyveta so sondou, kde sa vzorka dávkuje na sondu. V atmosfére čistého argónu prebieha elektrotermické ohrievanie kyvety, aby sa zabránilo prístupu kyslíku zo vzduchu k rozžeravenému grafitu a k voľným atómom analytu. Tok argónu chráni atomizátor pred oxidáciou a odnáša splodiny mimo atomizátor.

Vzorka pri atomizácii z platformy sa vyparuje do prostredia o vyššej teplote, pretože platforma spomalí vyparovanie pokiaľ stena a plyn nie sú teplejšie ako platforma. Veľkosť tohto rozdielu závisí na rýchlosti vyhrievania stien a rýchlosti prenosu tepla na platformu. Vyhrievanie platformy je spôsobené tromi zložkami: žiarivým teplom z horúcich stien atomizátoru, horúcim inertným plynom a tepelnou vodivosťou, ktorá je spôsobená dotykom platformy o stenu grafitovej trubice. Platforma sa stien atomizátoru dotýka iba v štyroch bodoch aby bola tepelná vodivosť čo najmenšia.

Vzorka v atomizátore je teplotne spracovaná pomocou teplotného programu v niekoľkých krokoch.

Prvá fáza je sušenie vzorky. Prebieha pri teplote trochu vyššej ako je teplota varu rozpúšťadla.

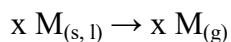
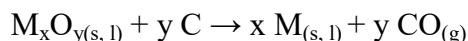
Vzorky musia byť dokonale vysušené aby nedochádzalo k ich stratám v ďalších krokoch teplotného programu. Dôležité je aby sa vzorka varom nerozstiekala a nedošlo tak k stratám. Doba sušenia závisí od objemu vzorky.

Druhá fáza je pyrolýza. Dochádza tu k premene formy analytu a odstránenie matrice. Z rozkladnej krivky, čo je závislosť absorbancie na meniacej sa teplote pyrolýzy pri konštantnej teplote atomizácie určíme maximálnu teplotu pyrolýzy. Optimálna teplota je teplota o 50 - 100°C nižšia ako je zlom na krivke, pri ktorej absorbancia začne klesať. Pokles je spôsobený stratami analyzovaného prvku pri pyrolýze.

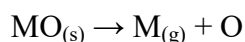
Tretia fáza je atomizácia. V tomto kroku sa zaznamenáva analytický signál. Optimálnu teplotu atomizácie určujeme z atomizačnej krivky, čo je závislosť absorbancie na meniacej sa teplote atomizácie pri konštantnej teplote pyrolýzy. Optimálna teplota je o 50 - 100°C vyššia ako je zlom na krivke po ktorej sa už absorbancia nemení. Atomizácii podlieha celé nadávkované množstvo vzorky čím vieme dosiahnuť relatívne vysokú okamžitú koncentráciu atómov a tým aj vysokú citlivosť stanovenia.

Po ukončení fázy pyrolýzy je predpoklad že analyt sa nachádza vo väčšej miere vo forme oxidu alebo halogenidu. Atomizácia v grafitovom atomizátore prebieha mechanizmami:

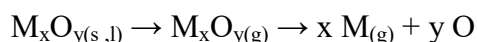
- V kondenzovanej fáze prebieha redukcia oxidu na kov a následné vyparenie kovu v niektorých prípadoch so vznikom diméru.



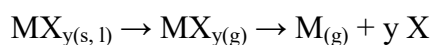
- V pevnej fáze prebieha termický rozklad.



- V plynnej fáze prebieha vyparenie oxidu a následná disociácia.



- V plynnej fáze prebieha vyparenie halogénu a následná disociácia.



Priebeh signálu pri elektrotermickej atomizácii odráža časovú závislosť množstva atómov v pozorovanom objeme atomizátoru a je funkciou teploty.

Štvrtá fáza je čistenie atomizátoru od zvyškov vzorky. Teplota a doba trvania určujeme podľa životnosti kvety pri použití vysokých teplôt. Piata fáza je chladenie kvety.

Transport atómov z atomizátoru v grafitových kvetách prebieha pomocou difúzie pri zastavenom toku plynu a pri dobrej termickej úprave vzorky počas pyrolýzy. U prvkov Ag, As, Au, Bi, Cd, Hg, Pb, Se a Zn ovplyvňuje prietok plynu citlivosť stanovenia. Pri atomizácii prvkov Ba, Be, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mn, Mo, Na, Ni, Sr, U a V dochádza k opakovanému vypareniu a následnej kondenzácii u pozdĺžne vyhrievaných atomizátorov. Prietok plynu neovplyvňuje veľmi citlivosť stanovenia[1].

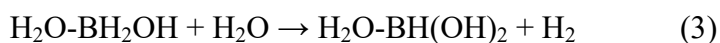
## **2.4 AAS s generovaním prchavých zlúčenín**

Jednou z najnáročnejších úloh v oblasti analýzy prvkov je stanovenie analytu na ultrastopovej úrovni. Generovanie prchavých zlúčenín je veľmi užívaný a účinný spôsob ultrastopovej analýzy v posledných rokoch. K pozitívam patrí vysoká účinnosť prenosu analytu do detektoru, separácia analytu od matrice, možnosť prekoncentrovať analyt v plynnej fáze pred detekciou, dobrá citlivosť a ľahká automatizovateľnosť [9] [10] [11]. Tvorba prchavých zlúčenín ako sú hydridy, organokovové zlúčeniny, cheláty, halogenidy, karbyony kovov, methylester kyseliny borité, ortuť a ich nasledovná separácia do plynnej fáze sa využíva v stopovej analýze. Analyt sa oddelí od matrice a je nosným plynom unášaný do atomizátora cez separátor. Cenovo dostupný je kremenný atomizátor. Síce vykazuje nízky šum základnej línie a vysokú citlivosť ale jeho negatívom je, že je málo odolný voči interferenciám a poskytuje nedostatočnú lineárnosť v kalibračných grafoch [9]. Zafírový atomizátor je drahší, odolný voči vysokým teplotám a koróziám. Oproti kremennému atomizátoru má dlhšiu životnosť [12]. Ďalej nasleduje disperzný systém kde sa používa difrakčná mriežka. Jej funkciou je aby len vybrané vlnové dĺžky prenikli k detektoru. Pre detekciu sa používa fotonásobič s vysokou citlivosťou. Generovanie prchavých zlúčenín sa delí na chemické generovanie, elektrochemické generovanie a UV - generovanie.

### 2.4.1 Chemické generovanie hydridov

Generovanie, pri ktorom sa pomocou chemickej reakcie neprchavého analytu s redukčným činidlom v prostredí minerálnych kyselín prevedie na prchavú formu. Má vysokú citlivosť a selektivnosť. Najpoužívanejším redukčným činidlom je tetrahydroboritan (sodná alebo draselná soľ).

Chemické generovanie je založené na postupnom rozklade  $\text{BH}_4^-$  v kyslom prostredí popísaný rovnicami (1-4) [13].:



V reakčnej zmesi sú prítomné štyri zlúčeniny, ktoré obsahujú jednu až štyri väzby B-H. Každá z týchto zlúčenín môže preniesť atóm vodíku na analyt, ale môžu sa podstatne líšiť v reakčnej rýchlosti.

### 2.4.2 Elektrochemické generovanie hydridov

Výhodou elektrochemického generovania je, že k redukcii analytu dochádza pôsobením elektrického prúdu a nemusíme používať tetrahydroboritan sodný, ktorý je drahý, často je zdrojom kontaminácie a je nestabilný. K ďalším výhodám patrí, že hydridotvorné prvky majú podobné reakčné médium, väčšiu toleranciu voči interferenciám, lepšiu reprodukovateľnosť, vyššiu citlivosť a nezávislosť na oxidačnom stave analytu pri použití katódy s vysokým vodíkovým prepätím [14] [15] [16] [17].

### 2.4.3 Fotochemické generovanie hydridov

Pôvod tejto metódy má súvislosť s čistením odpadných vôd, pri ktorom sa využívajú fotokatalytické procesy založené na pôsobení UV/VIS žiarenia. Toto žiarenie oxiduje rozpustenú organickú hmotu a tým sterilizuje baktérie. Ku kvapalnému vzorku je pridaná organická kyselina napríklad mravenčia, octová, propiónová alebo malónová a pôsobením UV žiarenia ako je napríklad ortuťová výbojka dochádza v roztoku k fotolýze organických kyselín a k radikálovým reakciám.

Pri týchto reakciách dochádza k fotoredukcii analytu na prchavú zlúčeninu. Výhodou fotochemického generovania je jednoduchšie experimentálne usporiadanie, nižšie riziko interferencií a používanie chemikálií, ktoré až tak neznečisťujú životné prostredie [18] [19].

## 2.5 Stanovované prvky

### 2.5.1 Olovo

Olovo (Pb, lat. plumbum) patrí medzi najrozšírenejšie ťažké kovy s nízkou teplotou tavenia, je mäkké, kujné, odolné voči korózii a zle vedie teplo a elektrinu. Ďalšie fyzikálne a chemické vlastnosti olova sú zahrnuté v Tab. 2.1.

Tab. 2.1 Fyzikálne a chemické vlastnosti olova

Vlastnosti	Hodnoty
Protónové číslo	82
Atómová hmotnosť [g/mol]	207,2
Elektrónová konfigurácia	[Xe]4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup> 6p <sup>2</sup>
Elektronegativita	2,33
Oxidačné čísla	0, II, IV
Hustota [kg/dm <sup>3</sup> ]	11,34
Teplota topenia [K]	600,61
Kryštalová sústava	Kubická
Magnetizmus	Diamagnetický
Elektrický odpor [nΩm]	208

Jeho výskyt v zemskej kôre je 13 ppm. Jeho rozšírenie súvisí s faktom, že tri zo štyroch prirodzených izotopov olova (<sup>206</sup>Pb, <sup>207</sup>Pb a <sup>208</sup>Pb) vznikajú v prvom rade ako stabilné produkty prirodzených rozpadových radov. Iba izotop <sup>204</sup>Pb rádioaktívnym rozpadom nevzniká. Elementárne olovo sa v prírode vyskytuje vzácné a nachádzame ho v horninách a mineráloch. Medzi najdôležitejšie rudy, ktoré obsahujú olovo patrí galenit (PbS), anglesit (PbSO<sub>4</sub>) alebo cerusit (PbCO<sub>3</sub>) [20].

Olovo je neesenciálny prvok. Samotný prvok a jeho zlúčeniny sú toxické. Z organizmu sa vylučujú veľmi ťažko a kumulujú sa najmä v kostiach, pečeni a obličkách.[21]. Dôležité je preto stanovenie olova aj na ultrastopovej úrovni [22]. Kontroly koncentrácie olova sú dôležité hlavne v potravinách a v materiáloch, ktoré prichádzajú do styku s potravinami alebo pitnou vodou. Olovo a jeho zlúčeniny sú karcinogénne a teratogénne [23]. Hlavnou príčinou kontaminácie životného prostredia olovom je používanie tetraethylolova ako aditívum na zvýšenie oktánového čísla benzínu. Spaľovaním benzínu sa do ovzdušia dostáva až 98 % z celkových emisií olova. Používa sa tiež v stavebných konštrukciách, v olovených akumulátoroch, ako strelivo a náboje. Olovo zabraňuje rádioaktívnemu žiareniu a používa sa ako ochranný plášť podmorských a podzemných káblov [24]. Prechádzajú placentou a majú škodlivé účinky na vývoj plodu a detí. Taktiež prestupujú do materského mlieka, čo je nebezpečné pre kojencu pretože toxicita olova pre detský organizmus je vyššia ako pre dospelého jedinca [25]. U dospelých ovplyvňujú negatívne tráviaci, nervový a imunitný systém. Mechanizmus toxicity olova a jeho zlúčenín je tvorenie stabilných komplexov s oxoskupinami enzýmov a ovplyvňuje takmer všetky kroky v procese syntézy hemu a metabolizmu porfyrínu. Typickými príznakmi otravy olova sú bolesti hlavy, kolika, anémia, kŕče, chronický zápal ľadvín, poškodenie mozgu a porucha centrálnej nervovej sústavy [20] [26].

### 2.5.2 Med'

Med' (Cu, lat. cuprum) sa v periodickej tabuľke prvkov radí medzi ušľachtilé kovy. Má červenohnedé sfarbenie, vyznačuje sa vysokou tepelnou a elektrickou vodivosťou a dobrou odolnosťou voči korózii. Niektoré ďalšie fyzikálne a chemické vlastnosti medi sú zhrnuté v Tab. 2.2 [27].

Tab. 2.2 Fyzikálne a chemické vlastnosti medi

Vlastnosti	Hodnoty
Protónové číslo	29
Atómová hmotnosť [g/mol]	63,5
Elektrónová konfigurácia	[Ar]3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
Elektronegativita	1,90
Oxidačné čísla	I, II, III
Hustota [kg/dm <sup>3</sup> ]	8,94
Teplota topenia [K]	1357,77
Kryštalová sústava	Kubická
Magnetizmus	Diamagnetický
Elektrický odpor [nΩm]	16,78

Výskyt medi v zemskej kôre je 68 ppm najčastejšie v podobe sulfidov, oxidov a uhličitanov [20]. Med' vytvára komplexy s pevným základom, ako sú karbonáty, nitráty, sulfáty, chloridy a amoniak. Množstvo takto viazanej medi môže tvoriť 13 - 97 % celého jej obsahu v riečnych vodách[27]. Med' sa používa v strojárskom, elektrotechnickom, chemickom a potravinárskom priemysle hlavne ako čistý kov. V poľnohospodárstve ako fungicíd, insekticíd. Uplatňuje sa aj pri ochrane dreva a kože. Životné prostredie znečisťuje med' z elektrotechnického priemyslu a výroby zliatin. Schopnosť medi prijímať a darovať elektróny pri zmene oxidačného stavu a následná katalýza vzniku radikálových iónov má dôležitý podiel na jej toxicite.

### 2.5.3 Kadmium

Kadmium (Cd, lat. cadmium) je mäkký strieborný kov, ktorý je nerozpustný vo vode. Niektoré ďalšie fyzikálne a chemické vlastnosti sú zhrnuté v Tab. 2.3.

Tab. 2.3 Fyzikálne a chemické vlastnosti kadmia

Vlastnosti	Hodnoty
Protónové číslo	48
Atómová hmotnosť [g/mol]	112,4
Elektrónová konfigurácia	[Kr] 4d <sup>10</sup> 5s <sup>2</sup>
Elektronegativita	1,69
Oxidačné čísla	II
Hustota [kg/dm <sup>3</sup> ]	8,65
Teplota topenia [K]	594,22
Kryštálová sústava	Hexagonálna
Magnetizmus	Diamagnetický
Elektrický odpor [nΩm]	72,7

Obsah kadmia v zemskej kôre je 0,16 ppm. Počas zvetrávania kadmium prechádza do roztoku a vytvára kademnatý kation alebo komplexné ióny a organické cheláty. Izolácia kadmia je vždy spojená s výrobou zinku. Najväčším zdrojom kadmia v životnom prostredí je zo spaľovania fosílnych palív, z hutníctva, z maštalného hnojiva a umelých fosforečných hnojív [28]. Kadmium je zaradené v zozname znečisťujúcich látok pre jeho rezistenciu v životnom prostredí a potenciálnu biokumuláciu a toxicitu. Zlúčeniny kadmia sú jedovaté.

## 2.5.4 Chróm

Chróm (Cr, lat. chromium) patrí medzi ťažké kovy. Je oceľovo sivý a tvrdý. Niektoré ďalšie fyzikálne a chemické vlastnosti sú zhrnuté v Tab. 2.4.

Tab. 2.4 Fyzikálne a chemické vlastnosti chrómu

Vlastnosti	Hodnoty
Protónové číslo	24
Atómová hmotnosť [g/mol]	51,9
Elektrónová konfigurácia	[Ar] 3d <sup>5</sup> 4s <sup>1</sup>
Elektronegativita	1,66
Oxidačné čísla	II, III, IV, V, VI
Hustota [kg/dm <sup>3</sup> ]	7,15
Teplota topenia [K]	2180
Kryštalová sústava	Kubická
Magnetizmus	Antiferomagnetický
Elektrický odpor [nΩ.m]	125

Chróm je zastúpený v zemskej kôre v množstve 122 ppm. Je jedným z hlavných polutantov životného prostredia. Predstavuje riziko pre faunu i flóru a jeho doba odbúravania je pomerne dlhá [29]. Chróm sa vyskytuje hlavne trojmocný ale omnoho nebezpečnejší je jeho šesťmocná forma, ktorá často spôsobuje akútne aj dlhodobé nežiaduce účinky. Táto šesťmocná forma spôsobuje hlavne rôzne alergické reakcie kože a niektoré jeho zlúčeniny patria medzi silné karcinogény a mutagény [30].

### 2.5.5 Arzén

Arzén (As, lat. arsenicum) sa v rámci chemických prvkov zaraďuje medzi polokovy. Jeho základné fyzikálne a chemické vlastnosti sú zhrnuté v Tab. 2.5.

Tab. 2.5 Fyzikálne a chemické vlastnosti arzénu

Vlastnosti	Hodnoty
Protónové číslo	33
Atómová hmotnosť [g/mol]	74,9
Elektrónová konfigurácia	[Ar]3d <sup>1</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>3</sup>
Elektronegativita	2,18
Oxidačné čísla	-III, III, V
Hustota [kg/dm <sup>3</sup> ]	5,727
Teplota topenia [K]	887
Kryštálová sústava	Trigonálna
Magnetizmus	Diamagnetický
Elektrický odpor [nΩ.m]	333

Výskyt arzénu v zemskej kôre je okolo 2 ppm. V prírode sa nachádza v mineráloch, najčastejšie v spojení so sírou v niektorých ložiskách sulfidov kovov, ale taktiež ako čistá kryštalická látka. Do životného prostredia sa dostáva z prírodných zdrojov ako je vulkanická činnosť, zvetrávanie hornín ale aj z priemyselných činností ako je spaľovanie fosílnych palív, ťažba uhlia a nerastných surovín, výroba olova a medi. Koncentrácie arzénu zistené v okolí baní a závodov taviacich olovenú a medenú hrudu sú niekoľkonásobne vyššie, ako na územiach, kde nedošlo k výraznému zásahu ľudskej činnosti do životného prostredia [31]. Arzén sa používa v poľnohospodárstve ako insekticíd a ako postrek na ochranu dreva proti hmyzu, baktériám a hubám. Svoje uplatnenie má aj v medicíne, napríklad pri liečbe rakoviny. Arzén nie je samostatne jedovatý, ale v tele sa metabolizuje na toxické zlúčeniny, najviac na oxid arzenitý. Toxicita zlúčenín arzénu stúpa s jeho rozpustnosťou vo vode. V organickej forme je arzén toxickejší ako v anorganickej.

## 2.6 Sýkorka veľká

Sýkorka veľká je bežným druhom spevavca často sa vyskytujúceho v blízkosti ľudí v mestách i v perifériách, preto sa dá považovať za vhodný ukazateľ kvality životného prostredia. Škodlivé látky (ako sú ťažké kovy) sa do tela týchto spevavcov dostávajú priamo expozíciou (dýchaním), ale aj napríklad potravou či vodou. Toxické až karcinogénne účinky ťažkých kovov v organizmoch môžu spôsobovať poruchy krvotvorby a významne tak ovplyvňovať dlhovekosť týchto zvierat [32]. Vzhľadom k známej schopnosti akumulácie ťažkých kovov v organizmoch je možné očakávať, že kontaminácia krvi a peria vtákov sa v ich rôznom veku bude líšiť (zvyšovať). Výsledky týchto analýz je možné ďalej využiť pre porovnanie rizikovosti ťažkých kovov vzhľadom k ľudskému zdraviu.

## 3 Experimentálna časť

### 3.1 Používané chemikálie

- štandardný roztok  $Pb^{2+}$  o koncentrácii 1000 mg/L, dusičnan olovnatý v kyseline dusičnej 0,5 mol/L, čistota CertiPUR<sup>®</sup> (Nemecko)
- štandardný roztok  $Cd^{2+}$  o koncentrácii 1000 mg/L, dusičnan kadmennatý v kyseline dusičnej 0,5 mol/L, čistota CertiPUR<sup>®</sup> (Nemecko)
- štandardný roztok  $Cu^{2+}$  o koncentrácii 1000 mg/L, dusičnan meďnatý v kyseline dusičnej 0,5 mol/L, čistota CertiPUR<sup>®</sup> (Nemecko)
- štandardný roztok  $Cr^{2+}$  o koncentrácii 1000 mg/L, dusičnan chromnatý v kyseline dusičnej 0,5 mol/L, čistota CertiPUR<sup>®</sup> (Nemecko)
- štandardný roztok As o koncentrácii  $995 \pm 5$  mg/L, čistota Merck (Nemecko)
- modifikátor matrice dihydrogénfosforečnan amónny o koncentrácii 1 g/L, čistota 99,999 % Sigma-Aldrich (Nemecko)
- modifikátor matrice dusičnan horečnatoolovnatý o koncentrácii 1 g/L, čistota  $99,995 \pm$  % Sigma-Aldrich (Nemecko)
- kyselina chlorovodíková, 36%, p.a. LachNer, (Česká republika)
- 3% tetrahydridoboritan sodný, čistota  $\geq 99\%$  Sigma-Aldrich (Nemecko) v 0,5% hydroxide sodnom, čistota 99,3 % Lachner s.r.o (Česká republika) pre stabilizáciu
- kyselina dusičná: 65%, for analysis (EMSURE<sup>®</sup>, Merck spol. s.r.o., Nemecko)
- neionizovaná voda pripravená zariadením Milli Q<sub>PLUS</sub> (Millipore, USA)

### 3.2 Používané prístroje, zariadenia a pracovné parametry

- atómový absorpčný spektrometer ContrAA 700 (Nemecko) s elektrotermickou atomizáciou využívajúci grafitovú kvetu s vloženou platformou a vybavený automatickým podávačom vzorkou, spektrometer bol ovládaný pomocou softwaru ASpect CS
- atómový absorpčný spektrometer Pye Unicam 939 (Unicam, UK), spektrometer bol ovládaný pomocou softwaru Solaar

- výbojka s dutou katódou pre stanovenie arzénu, napájací prúd bol nastavený na 8 mA, a vlnová dĺžka pre stanovenie arzénu bola 193,5 nm (Varian, Australia)
- kremenný atomizátor, dutá trubica v tvare písmena T, atomizačné rameno malo dĺžku 120 mm a vnútorný priemer 12 mm a stredná zúžená časť merala 70 mm a jej vnútorný priemer bol 4 mm (RMI, Česká republika)
- programovateľná 8-kanálová peristaltická pumpa Masterflex (Cole-Parmer instrumental company, USA)
- prietokové čerpacie hadičky o rôznych vnútorných priemeroch TYGON<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, USA)
- analytické váhy 2004 MP (Sartorius, Česká republika)
- zariadenie pre mikrovlnný rozklad MDS-2000 (CEM Corporation, USA)
- rozkladné patроны Lined Digestion Vessels
- vodný ultrazvukový kúpeľ E30H Elmasonic

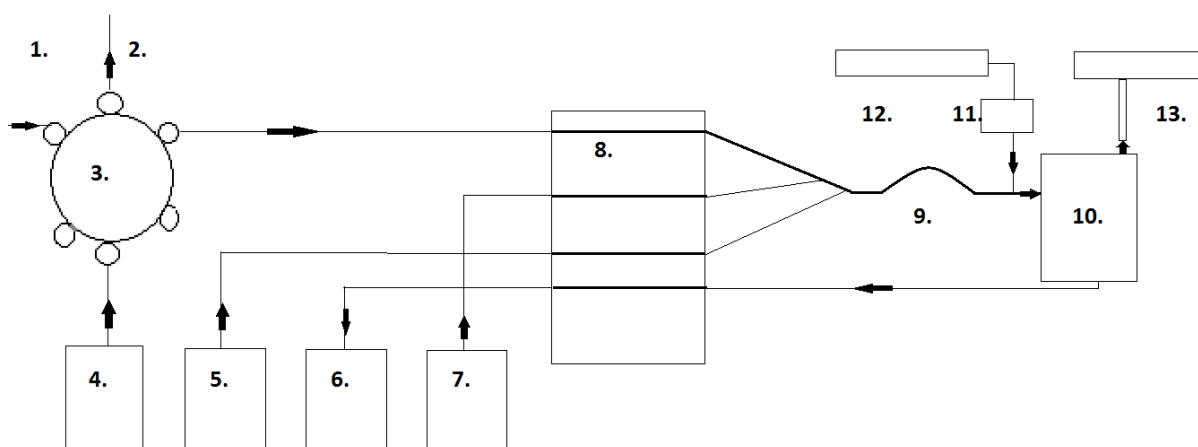
### 3.3 Experimentálna aparátúra pre metódu ETA-AAS

Koncentrácia olova, kadmia, medi a chrómu v reálnych vzorkách boli merané pomocou atómové absorpčné spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou. Využívaný bol prístroj ContrAA 700 ovládaný softwarom ASpect CS. Jednotlivé vzorky (optimalizačné a kalibračné roztoky, reálne vzorky) boli automaticky dávkované pomocou autosampléru a celý proces analýzy bol riadený počítačom. Konkrétne teplotné programy sú uvedené vo výsledkovej časti tejto práce, pretože prevzaté optimálne hodnoty z odbornej literatúry boli v niektorých prípadoch overované. Dávkované množstvo vzorku u tejto techniky bolo vždy 20  $\mu\text{L}$ , množstvo pridaného modifikátoru bolo podľa stanovovaného prvku 5  $\mu\text{L}$ . Vyhodnotenie nameraných koncentrácií a ich prepočet na hmotnosť vzorku bolo prevedené manuálne v programe MS Excel (Microsoft Office).

### 3.4 Experimentálna aparátúra pre metódu HG-AAS

Pre experimentálnu aparátúru chemického generovania bolo využité prietokové injekčné usporiadanie, do ktorého bolo nadávkované 500  $\mu\text{L}$  vzorky peria N627 341, N629 925, HN653 566, N653 550 a vzorky krvi PM1-PM12 pomocou injekčnej striekačky do šesťcestného ventilu.

Bol využitý kontinuálny prúd nosného média ktorým bola deionizovaná voda. Vzorky nariadené deionizovanou vodou boli po nadávkovaní unášané deionizovanou vodou a k okyseleniu kyselinou chlorovodíkovou riedenou 1:1 došlo až tesne pred reakciou s 3% tetrahydridboritanom v 0,5% hydroxide sodnom. Prechod vzniknutého hydridu do atomizátoru bol zabezpečený argónom, ktorý bol pripojený pred separátor fáz. Zo separátoru vychádzala hadička na odpad. Schéma aparátúry je na Obr.3.1. Detekcia vzniknutého hydridu bola pomocou atómového absorpčného spektrometra.



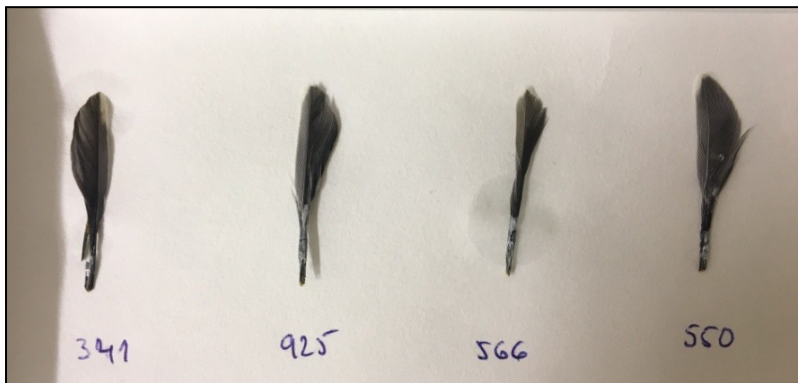
**Obr. 3.1 Schéma usporiadania aparátúry pre metódu chemického generovania hydridov pre stanovenie arzénu vo vzorkách peria a krvi sýkorek.**

1- prívod vzorky, 2- odpadná hadička, 3- šesťcestný ventil, 4- prívod vody, 5- prívod redukčného činidla, 6- odpad, 7- prívod kyseliny, 8- peristaltická pumpa, 9- reakčná slučka, 10- separátor fáz, 11- prietokomer, 12- nosný plyn, 13- kremenný atomizátor

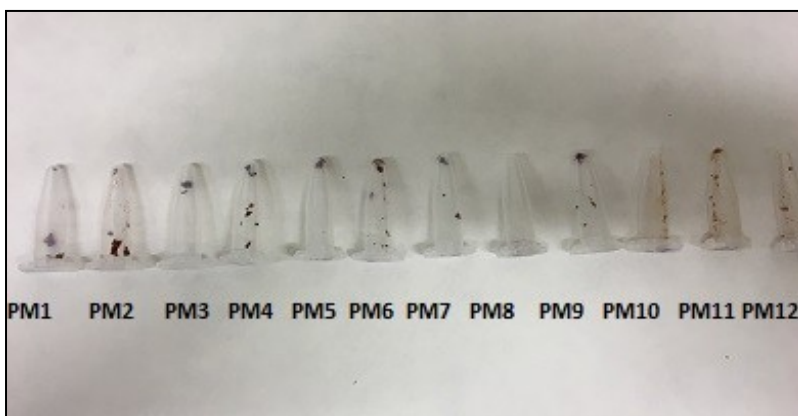
U tejto techniky bol atómový absorpčný spektrometer Pye Unicam 939 využívaný pre meranie absorbancie. Výpočet koncentrácie arzénu z nameranej absorbancie a jej prepočet na hmotnosť vzorku bol prevedený manuálne v programe MS Excel (Microsoft Office). Jednotlivé vzorky (optimalizačné a kalibračné roztoky, reálne vzorky) boli dávkované manuálne pomocou šesťcestného dávkovacieho ventilu. Dávkované množstvo vzorku u tejto techniky bolo vždy 500  $\mu\text{L}$ .

### 3.5 Analyzované vzorky

Vzorky krvi a peria vtákov, ktoré boli v tejto práci analyzované (viz Obr. 3.2 a 3.3), boli získané v rámci spolupráce na výskume zaoberajúceho sa vplyvom ťažkých kovov na zdravie a kondíciu voľne žijúcich sýkoriek veľkých[32]. Testované vzorky (peria n = 4, krvi n = 12) pochádzali z mláďat (n = 6) a dospelých (n = 8) odchytených v rôznych rokoch (2011 – 2015) v lokalite v Prahe 8 - Čimický a Ďáblický háj.



Obr.3.2 Fotka vzoriek peria mláďat sýkoriek omyté destilovanou vodou a usušené na filtračnom papieri.



Obr. 3.3 Fotka vzoriek krvi mláďat a dospelých sýkoriek pred zriedením s kyselinou dusičnou a deionizovanou vodou.

### 3.6 Príprava vzorkou k analýze

Vzorky peria boli omyté destilovanou vodou a boli usušené na filtračnom papieri. Následne boli odvážené na analytických váhach 2004 MP Sartorius a vložené do označených patron, do ktorých bolo pridané 5,0 ml 65% kyseliny dusičnej (viz Tab. 3.1). Vzorky boli rozložené v zariadení pre mikrovlnný rozklad MDS-2000.

Jednotlivé kroky rozkladu sú uvedené v Tab. 3.2. Po mineralizácii boli vzorky kvantitatívne prevedené do odmerných baniek a nariadené destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Vzorky peria boli pred analýzou nariadené dvakrát. Takto pripravené vzorky boli následne analyzované.

Tab. 3.1 Navážky jednotlivých vzoriek peria a príslušné číslo patry

<b>vzorky peria</b>	<b>m [g]</b>	<b>číslo patry</b>
N627 341	0,00425	1
N629 925	0,00496	4
HN653 566	0,00443	6
N653 550	0,00493	8
blank	-	10

Tab. 3.2 Fáza mikrovlnného rozkladu

<b>fáza</b>	<b>čas [min]</b>	<b>tlak [psi]</b>
I.	15	30
II.	15	60
III.	15	90
IV.	15	120

Vzorky krvi boli odvážené na analytických váhach diferenčným vážením (viz Tab. 3.3). Do mikroskúmaviek so vzorkou sme pridali 400  $\mu$ L 65% kyseliny dusičnej a 400  $\mu$ L deionizovanej vody. Následne sme mikroskúmavky vložili do 50°C vodného ultrazvukového kúpeľa na 10 minút. Vzorky krvi PM1 až PM12 boli zriedené desaťkrát tak, že bolo odobraných 100  $\mu$ L vzorku a bolo doplnených 900  $\mu$ L deionizovanej vody do mikroskúmaviek. Takto pripravené vzorky boli následne analyzované.

Tab. 3.3 Navážky jednotlivých vzoriek krvi

vzorky krvi	m vzorku [g]
PM1	0,00670
PM2	0,01485
PM3	0,01095
PM4	0,00875
PM5	0,00855
PM6	0,01925
PM7	0,01227
PM8	0,01284
PM9	0,01309
PM10	0,01476
PM11	0,06297
PM12	0,02996

### 3.7 Príprava kalibračných roztokov

Pre každý prvok boli pripravené kalibračné roztoky zo štandardných zásobných roztokov o rôznych koncentráciách. Pre olovo, meď a chróm to boli koncentrácie 5, 10, 25 a 50 µg/L. Pre kadmium 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0 µg/L. Pre arzén 1,0; 2,5; 5,0 a 10 µg/L. U všetkých kalibračných radách boli zmerané tiež slepé roztoky (blanky).

### 3.8 Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky boli štatisticky spracované podľa nasledujúceho postupu. Počet opakovaných meraní toho istého vzorku pre stanovenie jedného prvku bolo vykonané trikrát. Určenie strednej hodnoty pre počet opakovaných analýz menších ako sedem je medián pre nepárny počet hodnôt. Pre párny počet hodnôt po zoradení podľa veľkosti je mediánom aritmetický priemer dvoch prostredných hodnôt podľa vzorca:

$$\tilde{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.1)$$

Kde  $\tilde{x}$  je medián,  $n$  je počet meraní a  $x_i$  je vyjadrením hodnoty  $i$  – tého merania.

Pre počet opakovaných analýz menších ako sedem sa smerodajná odchýlka ( $s$ ) vypočíta podľa vzorca:

$$s = k_n \cdot R \quad (3.2)$$

Kde  $k_n$  je tabelovaná hodnota kde pre každé  $n$ , ktoré vyjadruje počet merania a  $R$ , ktoré predstavuje rozpätie sa vypočíta podľa vzorca:

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (3.3)$$

Najvyššiu hodnotu z výsledkov predstavuje  $x_{max}$  a najnižšiu  $x_{min}$ . Pre tabelovanú hodnotu  $k_n$  bola dosadená hodnota 0,5908 kvôli trom opakovaným meraniam. Medza detekcie, medza stanoviteľnosti a opakovateľnosť boli určené pre metódu atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou a aj pre metódu chemického generovania hydridov.

Medza detekcie LOD je definovaná ako najmenšia koncentrácia analytu, ktorá je danou metódou dokázateľná, čiže je možné ju odlišiť od medze blanku. Vypočíta sa podľa vzorca:

$$LOD = \tilde{x} + 3 \cdot s \quad (3.4)$$

kde  $s$  značí smerodajnú odchýlku z 10-tich nameraných hodnôt blanku,  $\tilde{x}$  je medián.

Medza stanoviteľnosti LOQ je definovaná ako najmenšia koncentrácia analytu, ktorá sa dá stanoviť s určitou spoľahlivosťou. Vypočíta sa podľa vzorca:

$$LOQ = \tilde{x} + 10 \cdot s \quad (3.5)$$

kde  $s$  značí smerodajnú odchýlku z 10-tich nameraných hodnôt blanku,  $\tilde{x}$  je medián.

Opakovateľnosť merania sa vyjadruje ako relatívna smerodajná odchýlka výsledkov desaťkrát opakovaných stanovení vykonaných v krátkom časovom intervale za rovnakých podmienok.

$$O = \frac{s}{\tilde{x}} \cdot 1 \quad (3.6)$$

kde  $s$  značí smerodajnú odchýlku z 10-tich nameraných hodnôt blanku,  $\tilde{x}$  je medián.

## 4 Výsledková časť a diskusia

V tejto časti bakalárskej práce sú uvedené optimálne podmienky a základné charakteristiky stanovenia olova, kadmia, medi a chrómu atómovou absorpčnou spektrometriou s elektrotermickou atomizáciou, optimálne podmienky a základné charakteristiky stanovenia arzénu atómovou absorpčnou spektrometriou s technikou generovania hydridov, namerané a vyhodnotené koncentrácie vybraných prvkov v dodaných vzorkách. Výsledky sú prezentované v podobe tabuliek a grafov.

### 4.1 Optimálne podmienky pre elektrotermickú atomizáciu

Na základe predošlých štúdií v laboratóriu spektrometrických metód Katedry analytické chémie PĚF UK a výrobcom doporučených experimentálnych parametrov boli overené optimálne podmienky pre stanovenie olova, kadmia, medi a chrómu. Vlnové dĺžky a modifikátory pre jednotlivé stanovované prvky sú uvedené v Tab. 4.1.

Tab. 4.1 Optimálne vlnové dĺžky a modifikátory pre stanovenie olova, kadmia, medi a chrómu vo vzorkách

prvok	vlnová dĺžka [nm]	modifikátor
Pb	283,306	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Cd	228,802	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Cu	324,754	Pd/Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Cr	357,869	Pd/Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Optimálne teploty pyrolýzy a atomizácie boli zvolené tak, aby bola čo najväčšia odozva absorpčného signálu a výsledky boli opakovateľné. Pyrolýza prebieha v dvoch krokoch, pretože v jednom kroku by nedochádzalo k úplnému spáleniu matrice vo vzorkách. Optimálne teploty atomizácie boli určené aby mali čo najväčší absorpčný ohlas, teda najvyššiu citlivosť. Teplotné programy pre jednotlivé prvky sú uvedené v Tab. 4.2 – 4.5.

Tab. 4.2 Teplotný program pre stanovenie olova

Jednotlivé fázy ohrievania	Teplota [°C]	Stúpanie teploty [°C/s]	Trvanie jednotlivého kroku [s]	Čas [s]
sušenie 1	80	6	20	28,3
sušenie 2	90	3	20	23,3
sušenie 3	110	5	10	14,0
pyrolýza 1	350	50	20	24,8
pyrolýza 2	800	300	10	11,5
plynná adaptácia	800	0	5	5,0
atomizácia	1500	1500	4	4,5
čistenie	2450	500	4	5,9

Tab. 4.3 Teplotný program pre stanovenie kadmia

Jednotlivé fázy ohrievania	Teplota [°C]	Stúpanie teploty [°C/s]	Trvanie jednotlivého kroku [s]	Čas [s]
sušenie 1	80	6	20	28,3
sušenie 2	90	1	20	30,0
sušenie 3	110	1	10	30,0
pyrolýza 1	350	50	20	24,8
pyrolýza 2	500	300	10	10,5
plynná adaptácia	500	0	5	5,0
atomizácia	1600	1400	3	3,8
čistenie	2450	500	4	5,7

Tab. 4.4 Teplotný program pre stanovenie medi

Jednotlivé fázy ohrievania	Teplota [°C]	Stúpanie teploty [°C/s]	Trvanie jednotlivého kroku [s]	Čas [s]
sušenie 1	80	6	20	29,7
sušenie 2	90	3	20	23,3
sušenie 3	110	5	10	14,0
pyrolýza 1	350	50	20	24,8
pyrolýza 2	1100	300	10	12,5
plynná adaptácia	1100	0	5	5,0
atomizácia	2000	1500	4	4,6
čistenie	2450	500	4	4,9

Tab. 4.5 Teplotný program pre stanovenie chrómu

Jednotlivé fázy ohrievania	Teplota [°C]	Stúpanie teploty [°C/s]	Trvanie jednotlivého kroku [s]	Čas [s]
sušenie 1	80	6	6	20
sušenie 2	90	3	3	20
sušenie 3	110	5	5	10
pyrolýza 1	350	50	50	20
pyrolýza 2	1300	300	300	10
plynná adaptácia	1300	0	0	5
atomizácia	2300	1500	1500	4
čistenie	2450	500	500	4

## 4.2 Optimálne podmienky pre stanovenie arzénu metódou chemického generovania

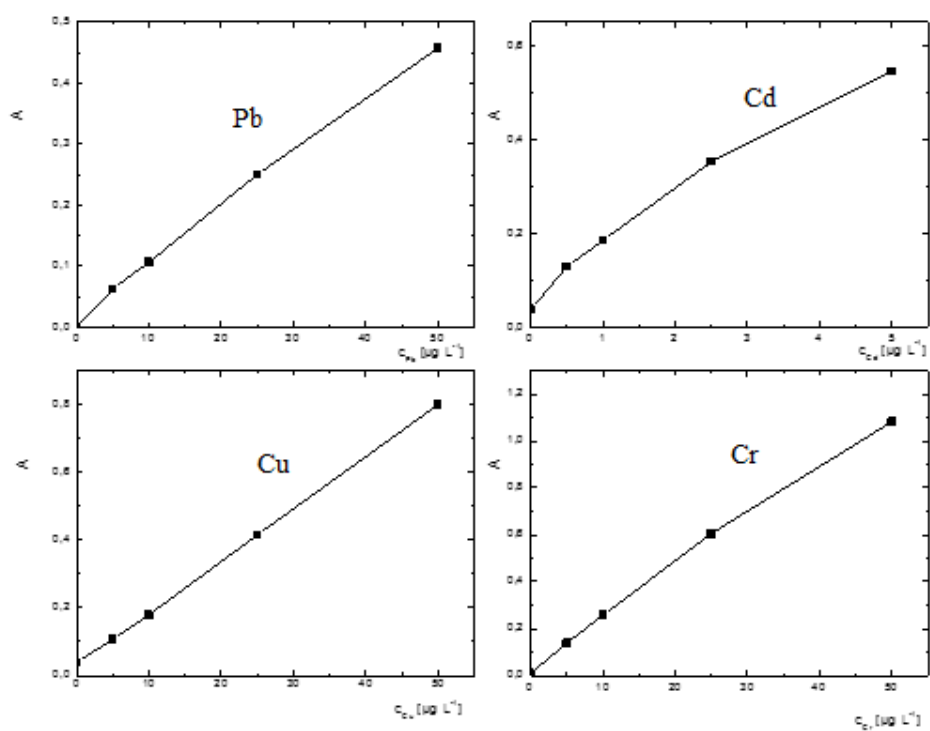
Posledným analyzovaným prvkom bol arzén. Jeho stanovenie ako už bolo spomenuté predtým prebiehalo na inom princípe ako predchádzajúce prvky. Vďaka tomu sa odlišujú jednotlivé optimalizované parametre. Pozornosť v tomto prípade bola venovaná prietokovej rýchlosti nosného plynu, prietokovej rýchlosti pracovných roztokov, ich koncentrácie a taktiež atomizačnej teplote. V Tab. 4.6 sú zhrnuté optimálne a overené podmienky pre detekciu arzénu metódou chemického generovania získané na základe predchádzajúcich štúdií.

Tab. 4.6 Optimálne parametre pre chemické generovanie arzénu

Parametre	Hodnoty
prietoková rýchlosť nosného plynu	80 mL/min
prietoková rýchlosť pracovných roztokov HCl/NaBH <sub>4</sub>	1,2 mL/min
Prietoková rýchlosť vzorky	3,5 mL/min
koncentrácia HCl	5,8 mol/L (1:1)
koncentrácia NaBH <sub>4</sub>	3,0 % (m/v) v 0,5 % NaOH
teplota atomizátoru	950°C

## 4.3 Kalibračná závislosť

Za optimálnych podmienok bola zmeraná kalibračná závislosť pre všetky stanovované prvky. Meralo sa päť kalibračných bodov pre olovo, meď a chróm od 0 µg/L až po 50 µg/L a pre chróm od 0 µg/L až po 5 µg/L. Získaná závislosť je zobrazená na Obr. 4.1. Kalibračná závislosť pre arzén s piatimi kalibračnými bodmi od 0 µg/L až po 10 µg/L je vytvorená z hodnôt plôch píkov nahore a z výšok píkov dole a zobrazená na Obr. 4.2.



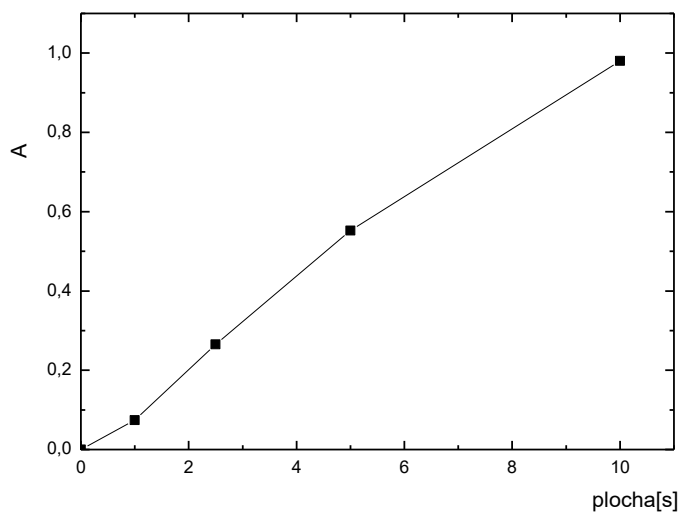
Obr. 4.1 Kalibračná závislosť stanovenia olova, kadmia, medi a chrómu

Pb:  $\lambda_{\text{Pb}} = 283,3060 \text{ nm}$ , modifikátor  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $t_{\text{atom}} = 1500^\circ\text{C}$

Cd:  $\lambda_{\text{Cd}} = 228,8018 \text{ nm}$ , modifikátor  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $t_{\text{atom}} = 1600^\circ\text{C}$ ,

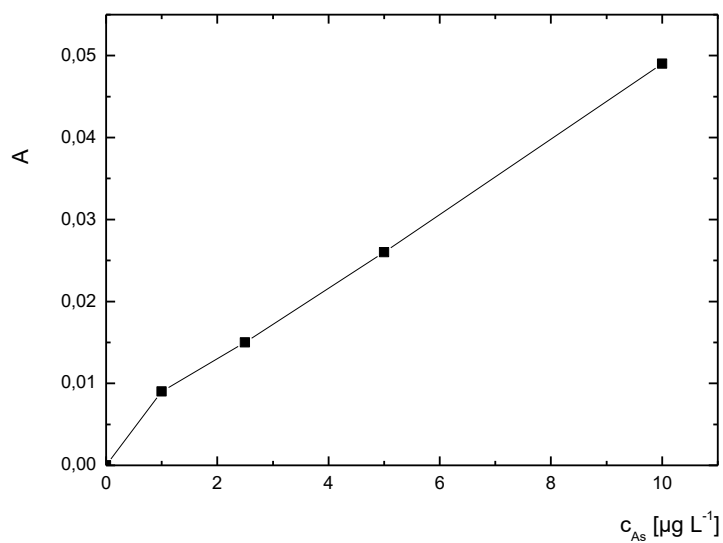
Cu:  $\lambda_{\text{Cu}} = 324,7540 \text{ nm}$ , modifikátor  $\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $t_{\text{atom}} = 2000^\circ\text{C}$

Cr:  $\lambda_{\text{Cr}} = 357,8687 \text{ nm}$ , modifikátor  $\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $t_{\text{atom}} = 2300^\circ\text{C}$



Obr.4.2 Kalibračná závislosť stanovenia arzénu

$c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol/L}$ ,  $v_{\text{Ar}} = 80 \text{ mL/min}$ ,  $c_{\text{NaBH}_4/\text{NaOH}} = 3,0 \%$  (m/v) v  $0,5 \%$  NaOH,  $v_{\text{HCl}/\text{NaBH}_4} = 1,2 \text{ mL/min}$ ,  $t_{\text{atom}} = 950 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $v_{\text{vzorek}} = 3,5 \text{ mL/min}$



Obr.4.3 Kalibračná závislosť stanovenia arzénu

$c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol/L}$ ,  $v_{\text{Ar}} = 80 \text{ mL/min}$ ,  $c_{\text{NaBH}_4/\text{NaOH}} = 3,0 \%$  (m/v) v  $0,5 \%$  NaOH,  $v_{\text{HCl}/\text{NaBH}_4} = 1,2 \text{ mL/min}$ ,  $t_{\text{atom}} = 950 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $v_{\text{vzorek}} = 3,5 \text{ mL/min}$

#### 4.4 Základné charakteristiky stanovenia

Z kalibračných závislostí a ďalších meraní boli zistené základné charakteristiky pre jednotlivé prvky, ktoré sú uvedené v Tab. 4.7. Limit detekcie bol vypočítaný ako trojnásobok a limit stanoviteľnosti ako desaťnásobok smerodajnej odchýlky desaťkrát opakovaného merania blanku vydelená smernicou kalibračnej závislosti.

Opakovateľnosť bola vypočítaná ako relatívna smerodajná odchýlka desaťkrát opakovaného merania vzorku o koncentrácii pre olovo 25 µg/L, pre kadmium 1,0 µg/L, pre meď 25 µg/L, pre chróm 25 µg/L a pre arzén 5 µg/L. Z vypočítaných hodnôt vyplýva že stanovenie kadmia atómovou absorpčnou spektrometriou s elektrotermickou atomizáciou vykazuje najnižší limit detekcie a najvyššiu citlivosť.

Tab. 4.7 Základné charakteristiky olova, kadmia, medi, chrómu metódou AAS s elektrotermickou atomizáci a arzénu metódou chemického generovania

Charakteristika	Pb	Cd	Cu	Cr	As
limit detekcie [µg/L]	0,030	0,0041	0,069	0,031	0,20
limit stanoviteľnosti [µg/L]	0,10	0,014	0,23	0,10	0,67
Opakovateľnosť [%]	2,89 <sup>a</sup>	1,92 <sup>b</sup>	1,15 <sup>c</sup>	1,04 <sup>d</sup>	4,73 <sup>e</sup>
Citlivosť [L/µg]	0,0126	0,147	0,0153	0,0124	0,101
koleračný koeficient	0,9995	0,9815	0,9998	0,9995	0,9936

<sup>a</sup> pre 25 µg/L, <sup>b</sup> pre 1,0 µg/L, <sup>c</sup> pre 25 µg/L, <sup>d</sup> pre 25 µg/L, <sup>e</sup> pre 5,0 µg/L

#### 4.5 Analýza vzorkou krvi a peria

Pre vylúčenie novej kontaminácie analyzovaných vzorkou činidlami, ktoré boli použité pre rozklad vzorkou, činidlá použité ako modifikátory matrice i reakčné činidlá pri chemickom generovaní boli s každou sériou rozkladu a pre všetky merané prvky boli tiež analyzované slepé roztoky (blanky). Namerané koncentrácie stanovovaných prvkov v slepých vzorkách boli vo všetkých prípadoch pod limitom stanoviteľnosti danej metódy. Z hodnôt uvedených v Tab. 4.8 a Tab. 4.9 vyplýva, že najvyššia koncentrácia bola nameraná pre meď, ktorá má najvyššiu koncentráciu na 1 g vzorku peria.

Naopak veľmi nízke až podlimitné koncentrácie boli namerané v prípade arzénu. V tomto prípade potom prepočet na hmotnosť analyzovaného vzorku nebol možný.

Tab. 4.8 Množstvo olova, kadmia a medi vztažený na jeden gram vzorky peria sýkoriek

<b>prvok</b>	<b>Olovo</b>	<b>kadmium</b>	<b>meď</b>
<b>parametre</b>	<b>c [µg/g]</b>	<b>c [µg/g]</b>	<b>c [µg/g]</b>
<b>N627341</b>	127 ± 1,3	2,04 ± 0,49	191 ± 7,4
<b>N629925</b>	34,2 ± 0,034	11,9 ± 0,11	193 ± 2,9
<b>HN653566</b>	44,1 ± 0,31	0,354 ± 0,0071	185 ± 0,37
<b>N653550</b>	9,91 ± 0,76	1,07 ± 0,0086	127 ± 4,6

Tab. 4.9 Množstvo chrómu a arzénu vztažený na jeden gram vzorky peria sýkoriek

<b>prvok</b>	<b>Chróm</b>	<b>arzén</b>
<b>parametre</b>	<b>c [µg/g]</b>	<b>c [µg/g]</b>
<b>N627341</b>	146 ± 5,7	4,73 ± 0,057
<b>N629925</b>	53,2 ± 0,80	< 1,5
<b>HN653566</b>	41,7 ± 0,083	< 1,5
<b>N653550</b>	67,9 ± 2,4	1,94 ± 0,12

Z vypočítaných hodnôt z Tab. 4.10 a Tab. 4.11 vyplýva, že najvyššia koncentrácia v krvi sýkoriek je medi. Niektoré koncentrácie kadmia nebolo možné vypočítať z dôvodu nízkej koncentrácie, ktorá je pod medzou detekcie.

Tab. 4.10 Množstvo olova, kadmia a medi vzťahený na jeden gram vzorky krvi sýkoriek

<b>prvok</b>	<b>Olovo</b>	<b>kadmium</b>	<b>meď</b>
<b>parametre</b>	<b>c [µg/g]</b>	<b>c [µg/g]</b>	<b>c [µg/g]</b>
<b>PM1</b>	0,102 ± 0,0017	< 0,005	1,10 ± 0,061
<b>PM2</b>	< 0,03	< 0,005	1,11 ± 0,023
<b>PM3</b>	0,605 ± 0,015	0,0109 ± 0,00042	15,2 ± 0,24
<b>PM4</b>	0,316 ± 0,015	< 0,005	3,61 ± 0,058
<b>PM5</b>	0,530 ± 0,020	0,0135 ± 0,000068	15,3 ± 0,29
<b>PM6</b>	< 0,03	< 0,005	1,15 ± 0,084
<b>PM7</b>	1,00 ± 0,30	0,0126 ± 0,00042	6,46 ± 0,026
<b>PM8</b>	< 0,03	< 0,005	1,87 ± 0,022
<b>PM9</b>	< 0,03	< 0,005	1,62 ± 0,024
<b>PM10</b>	< 0,03	< 0,005	2,26 ± 0,39
<b>PM11</b>	0,0928 ± 0,012	< 0,005	0,955 ± 0,00096
<b>PM12</b>	< 0,03	< 0,005	0,744 ± 0,015

Tab. 4.11 Množstvo chrómu a arzénu vzťahovaný na jeden gram vzorky krvi sýkoriek

<b>prvok</b>	<b>Chróm</b>	<b>arzén</b>
<b>parametre</b>	<b>c [µg/g]</b>	<b>c [µg/g]</b>
PM1	0,193 ± 0,011	2,31 ± 0,15
PM2	0,0474 ± 0,0010	0,339 ± 0,016
PM3	0,632 ± 0,010	2,24 ± 0,078
PM4	14,1 ± 0,23	1,17 ± 0,025
PM5	1,07 ± 0,020	0,852 ± 0,085
PM6	< 0,40	< 0,20
PM7	0,555 ± 0,0022	0,766 ± 0,070
PM8	0,163 ± 0,0020	0,487 ± 0,018
PM9	0,197 ± 0,0030	0,359 ± 0,017
PM10	0,215 ± 0,037	< 0,20
PM11	0,0385 ± 0,000039	< 0,20
PM12	0,0468 ± 0,00094	< 0,20

Na základe analýzy vyššie uvedených vzorkou bola zaznamenaná značná variabilita v miere kontaminácie krvi a peria medzi mláďatami i dospelých v rôznych rokoch (2011 – 2015). Tieto výsledky potvrdzujú, že kontaminácia zvierat ťažkými kovmi sa v rôznych rokoch mení. Vzhľadom k malému množstvu vzorkou v tejto fázy nie je možné potvrdiť hypotézu o akumulácii kovov v krvi zvierat. K tomuto účelu budú v budúcnosti vykonané ďalšie analýzy.

## 5 Záver

Táto bakalárska práca bola zameraná na stanovenie koncentrácie vybraných ťažkých kovov (olova, kadmia, medi, chrómu a arzénu) v krvi a perí sýkoriek. Olovo, kadmium, meď a chróm boli stanovené metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou a arzén bol stanovený pomocou chemického generovania hydridov. Dodané vzorky boli odvážené, rozložené a následne riedené. Pred vlastným stanovením vybraných kovov boli v dodaných vzorkách overené optimálne podmienky stanovenia pre meranie olova, kadmia, medi, chrómu a arzénu. Pre arzén bola zostavená experimentálna aparátúra. Za optimálnych podmienok bola najprv zostavená kalibračná závislosť pre všetky stanovované prvky. Boli vypočítané základné charakteristiky stanovenia jednotlivých prvkov z ktorých vyplýva, že kadmium má najnižší limit detekcie a najvyššiu citlivosť. Záverom bola zmeraná a vyhodnotená koncentrácia jednotlivých prvkov a prepočítaná koncentrácia na jeden gram dodanej vzorky.

## 6 Literatúra

- [1] Komárek, J.: *Atómová absorpční spektrometrie*. Brno, Masarykova Univerzita v Brne (2000).
- [2] Májek, P.: *e – Analytická chémia*. Bratislava Ústav analytickej chémie STU (2006).
- [3] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metódy I*. Praha, Karolinum (2004).
- [4] Černohorský, T.; Jandera P.: *Atomová spektrometrie*. Pardubice, Univerzita Pardubice (1997).
- [5] Opekar F.; Jelínek I.; Rychlovský P.; Plzák Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum (2010).
- [6] Dionísio, A.G.G., de Jesus, A.M.D. : Old and new flavours of flame (furnace) atomic absorption spectrometry. *International journal of Spectrometry* 1-30 (2011).
- [7]. Robinson J. W.: *Atomic Spectroscopy*, 2nd ed. New York, Marcel Dekker (1996).
- [8] Ursínyová, M.; Hladíková, V.: Stanovenie selénu v sére metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou, *Chemické listy* 92, 495-498, (1998).
- [9] Dědina, J.: Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer *Spectrochimica Acta Part B* 62, 846-872 (2007).
- [10] Kratzer, J.; Musil, S.; Vobecký, M.; Dědina, J.:Hydride generation in atomizer collection of Pb in quartz tube atomizers for atomic absorption spektrometry  $^{212}\text{Pb}$  radiotracer study: review of advances in atomic spectrometry and related techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28, 344-353 (2013).
- [11] Shakerian, F.; Shabani, A. M. H.; Dadfarnia, S.; Avajji, M. K.: Hydride generation atomic absorption spectrometric determination of bismuth after separation and preconcentration with modified alumina. *Journal of Separation Science* 38, 677–682 (2015).

- [12] Musil, S.; Matoušek, T.; Dědina J.: Sapphire: a better material for atomization and in situ collection of silver volatile species for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta part B* 108, 61-67 (2015)
- [13] D'ulivo, A.; Onor, M.; Spiniello, R.; Pitzalis, E.: Mechanisms involved in chemical vapor generation by aqueous tetrahydroborate(III) derivatization Role of hexacyanoferrate(III) in plumbane generation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry* 63, 835–842 (2008).
- [14] Arbab-Zavar, M.H.; Chamsaz, M.; Yousefi, A.; Ashraf, N.: Electrochemical hydride generation of thallium. *Talanta* 79, 302–307 (2009).
- [15] Laborda, F.; Bolea, E.; Castillo, J. R.: Electrochemical hydride generation as a sample-introduction technique in atomic spectrometry: fundamentals, interferences, and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 743–751 (2007).
- [16] Arbab-Zavar, M.H.; Chamsaz, M.; Youseffi, A.; Aliakbari, M.: Electrochemical hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of cadmium. *Analytica Chimica Acta* 546, 126–132 (2005).
- [17] Sáenz, M.; Fernández, L.; Domínguez, J.; ALvarado, J.: Electrochemical generation of volatile lead species using a cadmium cathode: Comparison with graphite, glassy carbon and platinum cathodes. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry* 71-72, 107–111 (2012).
- [18] He, Y.; Hou, X.; Zhengh, Ch.; Sturgeon, R. E.: Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 769–774 (2007).
- [19] Rybínová, M.; Červený, V.; Hraníček, J.; Rychlovský, P.: UV-fotochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrometrických metod. *Chemické listy* 109, 930-937 (2015).

- [20] Greenwood, N.N.; Earnshaw, A.: *Chemistry of the elements 1,2*. Oxford, Butterworth-Heinemann (1997).
- [21] Nerin, C.; Olavide, S; Cacho, J; Garnica, A.: Determination of lead in airborne particulate by hydride generation. *Water, Air, and Soil Pollution* 44, 339-345 (1989).
- [22] Novotný, P.; Kratzer, J.: Hydride generation – in-atomizer collection of Pb in a quartz trap and atomizer device for atomic absorption spectrometry – an interference study. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry* 79-80, 77-81 (2013).
- [23] Polanski, A.;Smulikowski, K.: *Geochemia*. Bratislava, Slovenské pedagogické nakladateľstvo (1978).
- [24] Prousek J.: *Rizikové vlastnosti látok*. Bratislava, Slovenská technická univerzita (2001).
- [25] Nordberg, G. F.: *Handbook on the toxicology of metals 3*. Amsterdam, Academic Press, (2007).
- [26] Florea, A. M.; Busselberg, D.: Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals* 419-427 (2006).
- [27] Lukeš I.: *Systematická anorganická chemie*. Praha, Karolinum (2009).
- [28] Frankovská, J.;Kordík, J.;Slaninka, I.;Jurkovič, L.;Greif, V.;Šottník, P.;Dananaj, I.; Mikita, S.;Dercová, K.;Jánová, V.: *Atlas sanitačných metód environmentálnych záťaží*.Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava (2010).
- [29] Choppala, G.; Bolan, N.; Park, J.H.: Chromium Contamination and Its Risk Management in Complex Environmental Settings. *Advances in Agronomy* 120, 129-172 (2013).
- [30] Nordberh, G. F.: *Handbook on the toxicology of metals 3*. Amsterdam, Elsevier (2007).

- [31] Hagarová I.;Žemberyová M.: *Chemické Listy* 99, 578 – 584 (2005).
- [32] Bauerová P., Vinklerová J., Hraníček J., Čorba V, Vojtek L, Svobodová J., Vinkler M.: Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species, *Science of the Total Environment* 601–602, 1556 – 1565 (2017).