

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie

**OBSAH KOVŮ V LÉČIVÝCH ROSTLINÁCH**

–

**EMPIRICKÝ A CHEMOMETRICKÝ PŘÍSTUP**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Školitel specialista : Dr. Jean-Philippe Basly, MC

Hradec Králové, 2007

MICHAELA KOMÍNKOVÁ

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADCI KRÁLOVÉ  
Department of Analytical Chemistry

**METAL CONTENT IN MEDICINAL PLANTS**

-

**EMPIRICAL AND CHEMOMETRIC APPROACH**

DIPLOMA THESIS

Supervisor in Czech Republic: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Supervisor in France: Dr. Jean-Philippe Basly, MC

Hradec Králové, 2007

MICHAELA KOMÍNKOVÁ

Děkuji panu Jeanu-Philippu Baslymu, Docteur de l'Université de Caen, Maître de Conférences, a panu Doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při vypracovávání diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry analytické chemie (Fakulta farmacie) a Katedry životního prostředí (Fakulty přírodních věd) Univerzity v Limoges za cenné rady a účinnou spolupráci.

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Hradec Králové, 15. května 2007

# **1. OBSAH**

2.	Zkratky .....	7
3.	Úvod .....	9
4.	Cíl práce .....	11
5.	Teoretická část.....	13
5.1.	Kovy v rostlinách .....	14
5.1.1.	Hořčík.....	15
5.1.2.	Mangan.....	16
5.1.3.	Zinek .....	17
5.1.4.	Železo.....	18
5.1.5.	Měď.....	19
5.1.6.	Nikl.....	19
5.1.7.	Chrom.....	20
5.2.	Mikrovltná mineralizace.....	21
5.3.	Atomová absorpční spektrometrie.....	23
5.3.1.	Základy instrumentace .....	23
5.3.1.1.	Zdroje záření .....	24
5.3.1.2.	Lampa s dutou katodou .....	24
5.3.1.3.	Lampy s vysokou září .....	25
5.3.1.4.	Spektrální lampy .....	25
5.3.1.5.	Vysokofrekvenční bezelektrodové výbojky.....	25
5.3.2.	Plamenová atomová absorpční spektrometrie.....	25
5.3.3.	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací.....	32
5.3.3.2.	Vyhodnocování a metodika stanovení .....	35
5.3.3.5.	Absorpční a emisní čáry atomů.....	36
5.3.3.6.	Průběh chemických dějů .....	37
5.3.4.	Shrnutí AAS .....	38
6.	Experimentální část .....	39
6.1.	Chemikálie a roztoky.....	40
6.2.	Přístroje a zařízení .....	41
6.3.	Vzorky drog.....	42
6.4.	Příprava roztoků .....	43
6.4.1.	Příprava standardního roztoku .....	43
6.4.2.	Příprava kalibračních roztoků .....	43

6.5.	Mikrovlňná mineralizace.....	45
6.6.	Plamenová atomizace .....	46
6.7.	Elektrotermická atomizace .....	47
7.	Výsledky a diskuze.....	48
7.1.	Obsah kovů.....	49
7.1.1.	Chrom.....	51
7.1.2.	Zinek .....	51
7.1.3.	Železo.....	52
7.1.4.	Mangan.....	52
7.1.5.	Nikl.....	53
7.1.6.	Měď.....	53
7.1.7.	Hořčík.....	54
7.2.	Statistická analýza .....	55
7.2.1.	Distribuční analýza.....	55
7.2.1.1.	Normální graf (Normal probability plot) .....	55
7.2.1.2.	Test Shapiro-Wilkův .....	56
7.2.2.	Neparametrické metody .....	57
7.2.2.1.	Mann-Whitneyův test.....	57
7.2.2.2.	Spearmanův test .....	58
7.3.	Diskuse .....	59
8.	Závěr.....	61
9.	Literatura .....	63
10.	Příloha .....	66

## **2. ZKRATKY**

$\alpha$	faktor pravděpodobnosti
AAS	atomová absorpční spektrometrie
CZ	Česká republika
ETA	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F	faktor
FAAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie
FR	Francie
GFAAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
IAA	kyselina indolyloctová (růstový hormon)
M	kov
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
n	počet prvků v množině
p	počet paralelních stanovení
PL	Polsko
SD	odhad směrodatné odchylky
$W_{\text{teor.}}$	kritický obor testované hypotézy
$W_{\text{calc.}}$	obor přijetí testované hypotézy



## **3. ÚVOD**

Léčivé rostliny neustále přitahují pozornost člověka. Pro obsah léčivých látek nacházejí své uplatnění nejen v oblasti fytoterapie, ale samozřejmě jsou vyhledávanými i v oblasti vědy. Obecně lze říci, že obsah léčivých látek závisí nejen na charakteru dané rostliny, ale zejména na vnějších faktorech, jako je vliv životního prostředí (kvalita půd, vod, ovzduší). Pokud je bilance narušena, dochází k následnému pozměnění poměru zastoupených elementů, ale i k pozměnění obsahu léčivých látek v rostlině. Tato změna může mít za následek modifikaci fyziologických procesů, patologickou akumulaci prvků či sloučenin v rostlině, popřípadě může způsobit i její úhyn. Narušená kvalita životního prostředí tak může negativně ovlivňovat zdraví člověka, proto je nutné neustále kontrolovat její stav a případné znečištění odstranit.

Kovy tvoří podstatnou součást stavebních i enzymatických systémů v buňkách rostlin, ale i živočichů a člověka. Určité kovy mohou mít v závislosti na koncentraci pro rostliny (ale i ostatní organismy) negativní až toxický vliv. Obsah kovů musí být proto optimální pro všechny články potravinového řetězce.

Tato práce se zabývá kvantitativní analýzou kovů Cu, Cr, Ni, Mg, Mn, Zn a Fe za použití metod atomové absorpční spektrometrie v sušených drogách, pocházejících ze tří evropských zemí: České republiky, Francie a Polska.

## **4. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo zjistit, v jakém množství se v sušených drogách, zakoupených ve Francii, České republice a Polsku, nacházejí kovy a zda se zjištěný obsah pohybuje pod stanoveným limitem pro obsah kovů v rostlinách. Dalším hlediskem práce bylo porovnat získané výsledky pomocí statistických analýz, zejména potvrdit či vyvrátit pravděpodobnost diferenciacce původu drog dle obsahu kovu. Posledním úkolem statistických analýz bylo zjistit případné korelace mezi jednotlivými kovy.

Veškerá uvedená měření jsem prováděla na Univerzitě v Limoges ve Francii v rámci mezinárodního výměnného programu Erasmus.

## **5. TEORETICKÁ ČÁST**

## **5.1. KOVY V ROSTLINÁCH**

Prvky obsažené v rostlinách můžeme rozdělit do několika skupin dle významu a funkce: makroelementy (makrobiogenní prvky), mikroelementy (oligobiogenní, stopové prvky) a další prvky. (1) Potřebné množství elementů, které je stále fixováno vnitřním systémem rostliny, může kolísat v závislosti na mnoha faktorech, jako je druh rostliny, genotyp, růstové podmínky a přítomnost specifických orgánů či pletiv. (2,3)

- Makroelementy představují základní (esenciální) složky organických látek a vyskytují se od desetin po desítky procent (C, O, H, N, P, K, Ca, Mg, S). (4,5)
- Mikroelementy (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, ...) tvoří nižší procento obsahu (do desetiny procenta). (4) Nejčastěji jsou součástí enzymatických komplexů, kde plní funkce katalyzátoru. Charakteristickou zvláštností fyziologie těchto prvků je, že na jedné straně jsou nenahraditelné z hlediska nároků rostlin, ale při vysokých koncentracích mohou vykazovat toxický vliv na buňku a ovlivňovat kvalitu rostlinných produktů. (5,6,7)
- Z ostatních, které nemají biogenní charakter, jsou zastoupeny především: Na, Si, Al aj. (1) Jejich zastoupení je specifické pro daný druh rostliny. (4)
- Poslední skupinu představují prvky cizorodé. (1, 4) Jejich obsah v pletivech rostlin je buď důsledkem zvýšeného přirozeného obohacení, nebo jsou důsledkem antropogenních vlivů. Pro rostliny nemají přímý užitek a jejich významná role ve fyziologii rostlin nebyla doposud doložena. Můžeme mezi ně zařadit toxické (těžké) kovy: Cd, Pb, Cr, As, Be, Ni, Hg aj. (1,4)

Rostliny reagují na okolní stresové podněty tak, že dochází ke změně distribuce prvků v pletivech a ke kumulaci těžkých kovů, a to nejčastěji bez projevů toxických účinků na samotné rostliny, ale mohou také zasáhnout do jejich fyziologických procesů. (5,6) Jedním z nejdůležitějších faktorů, které složení ovlivňují, představuje geochemické složení půd a zároveň schopnost rostliny transportovat a akumulovat vybrané elementy. (8)

Účinnost a bezpečnost všech farmaceutických přípravků je vymezena zejména složením (požadovaným i nežádoucím). Pečlivým výběrem rostlinného materiálu a standardním procesem zpracování může být obsah konstituentů zachován a umožnit tak dosáhnout opakovatelných terapeutických výsledků. (3) Nárůst zájmu o možné účinky rostlin na zdraví člověka přispívá k důležitosti kvantitativní elementární analýzy rostlin. (5,6,9)

Prvky, které jsme stanovovali, patří do skupiny prvků makrobiogenních (Mg), mikrobiogenních (Fe, Mn, Zn, Cu) i do skupiny toxických (těžkých) kovů (Ni, Cr).

### **5.1.1. Hořčík**

Hořčík je přijímán rostlinami jako kationt  $Mg^{2+}$  v menším množství než vápník. Rostlina ho získává z magnezitu, olivinu a dolomitu. (1) V příjmu  $Mg^{2+}$  existuje antagonistický vztah ke  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $H^+$ ,  $Al^{3+}$ . Vedle vnějších faktorů je obsah Mg v rostlině ovlivněn také geneticky. Je prokázáno, že více hořčíku obsahují rostliny dvouděložné oproti jednoděložným.

V rostlině je hořčík transportován ve formě chelátů a v některých případech je závislý na vápníku. Protože je tento tok orientován především do apikálních listů, při Mg deficienci se symptomy objeví nejdříve u starších listů. (4)

Hořčík je nezbytný pro energetické přeměny v buňce (je aktivátorem enzymů zapojených do metabolických přeměn cukrů), je složkou chlorofylu (1), kde je chelátově vázán v porfyrinovém jádře. Z celkového obsahu v rostlině je v chlorofylu vázáno 15-20 % Mg. Hořčík se zúčastňuje na dalších biochemických reakcích udržováním koloidního stavu protoplazmy a je aktivátorem nebo součástí početného množství enzymových systémů. Aktivuje fosfokinázy, dekarboxylázy a dehydrogenázy. Podobně jako  $Mg^{2+}$  působí i  $Mn^{2+}$  a pravděpodobně i  $Zn^{2+}$  a  $Co^{2+}$ . Právě vlivem této substituce se často příznaky jeho nedostatku projeví později. Jeho nedostatek vyvolává blednutí, žloutnutí a vznik hnědých skvrn na listech. (1,4) Rostliny vyžadují rovnoměrný přísun hořčíku během celé vegetace. Jeho obsah v sušině rostlinných orgánů se pohybuje pod 0,5 %.

Snížený obsah hořčíku v rostlinných produktech nepříznivě ovlivňuje zdravotní stav lidí i zvířat. Může docházet k hypomagnezémii, která se projevuje zejména zvýšenou nervosvalovou dráždivostí, vznikem křečí aj., ale může být narušena i činnost myokardu (tachykardie, poruchy rytmu). (10) U zvířat hypomagnezémie vede k pastevní tetanii, která je způsobená primárním nebo sekundárním nedostatkem hořčíku. (4) Naopak hypermagnezémie může snižovat nervosvalovou dráždivost, může dojít až k zástavě dechu, způsobuje také poruchu šíření vzruchu myokardem, zvracení či zácpu. (10)

### **5.1.2. Mangan**

Mangan je přijímán jako manganaté soli z kyselého prostředí půdy. (1) Obsah manganu v rostlinách kolísá od 0,001-0,01% sušiny u různých druhů i v různých orgánech jedné a téže rostliny. Nejbohatší jsou obaly semen a plodů, zárodky semen a zelené listy. Rostlina ho přijímá jako  $Mn^{2+}$  nebo jako Mn-chelát. Antagonisticky působí vápník, hořčík,  $NH_4^+$  aj., synergický vliv se projevuje u nitrátů. (4) Navíc se často uplatňuje přednostní příjem Mn na úkor Fe. (11)

V biochemických funkcích je podobný hořčíku, aktivuje některé enzymy, kde může být nahrazen hořčíkem. Katalyzuje tvorbu chlorofylu a metabolismus IAA – růstové látky. (1) Zvláště významná je jeho funkce fotosyntetického transportu elektronu (při fotolýze). Je kofaktorem arginázy. (12)

Mangan je dále nezbytný pro redukci  $NO_2^-$  z  $NO_3^-$ . Při deficienci a toxicitě Mn se může zvyšovat obsah  $NO_3^-$  v rostlinách jako důsledek nitrátreduktázového systému. Nejcitlivějšími organelami na nedostatek manganu jsou chloroplasty.

Mezi rostlinami se projevují velké druhové rozdíly jak v nárocích, tak i ve schopnosti příjmu Mn z půdy. Nedostatek vyvolává zvláštní chlorózu. (1) Při silnějším nedostatku manganu se listy úplně odbarví, přičemž nervatura zůstává zelená. Růst je



silně omezen nebo se dokonce zcela zastaví. V lodyhách dochází k úbytku xylému, špatně se vyvíjí kořenový systém, přičemž jsou nejvíce postiženy postranní kořeny. Dochází k omezení růstu plodů a mnohdy se rostliny do tohoto stadia vůbec nedostávají.

Nadbytek manganu v půdě vyvolává na rostlinách rovněž těžké chlorózy. Na rubu listů se tvoří hnědé až červenohnědé tečky, které v pozdějším stadiu splývají ve větší skvrny. Při silném nadbytku listy odumírají. (4)

### **5.1.3. Zinek**

Zinek je rostlinami přijímán převážně jako kationt  $Zn^{2+}$  a také v hydratovaných formách. Může být přijat také ve vhodné chelátové vazbě nebo jako  $Zn(OH)^+$ . Hladina zinku v rostlinách je velmi nízká a všeobecně se pohybuje do 100 ppm v sušině. Příjem zinku inhibuje přítomnost některých kovů. Kompetitivní vliv na příjem má Fe a Mn. Depresivně na příjem působí  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  a  $Ba^{2+}$ . Zinek se hromadí v kořenech zejména při vysokých hladinách v prostředí. (4)

V rostlinném organismu plní zinek významné funkce. Při nedostatku Zn bylo zjištěno poškození funkce chloroplastů a snížila se intenzita fotosyntézy. Účast zinku v pochodech fotosyntézy spočívá pravděpodobně v tom, že zinek je nezbytnou složkou karboanhydrázy, alkoholdehydrogenázy, glutamátdehydrogenázy, laktádehydrogenázy a alkalické fosfatázy. (4,12) Důležitou úlohu hraje zinek při regulaci metabolismu nukleových kyselin, zasahuje i do metabolismu cukrů a ovlivňuje biosyntézu IAA (1) a dalších růstových hormonů - giberelinů. (4)

Deficience se projevuje hlavně na mladých částech rostlin vytvářením růžic s úzkými a drobnými listy, které jsou bledě zelené a zkrácením internodií.

Vedle nedostatku zinku se zvláště v oblastech postižených průmyslovými emisemi, v okolí skládek apod., objevuje u rostlin jeho nadbytek a často i toxicita. Projevuje se

redukci růstu kořenů a listů. Vysoké hladiny Zn v živném prostředí depresivně působí na příjem P a Fe. (4)

#### **5.1.4. Železo**

Příjem železa rostlinou probíhá mladými částmi kořenového systému, a to převážně jako  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  nebo ve formě Fe-chelátů. Jeho příjem antagonisticky ovlivňují  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ . Rostlina sama vylučuje chelátotvorné látky, které jsou využívány na vazbu těžkých kovů přítomných v půdním roztoku (Cu, Zn). Jeho množství je snižováno v závislosti přednostního příjmu Mn na úkor Fe. (11) V půdě se vyskytuje hojně ve špatně rozpustných sloučeninách  $\text{Fe}^{3+}$  (jeho příjem ztěžují vápnité půdy). (1) S tím silně souvisí i vliv pH společně s vysokým obsahem  $\text{Ca}^{2+}$  podmiňuje srážení i oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  a ve vodivých pletivech se tvoří nerozpustné soli železitých fosfátů.

Železo je nezbytnou složkou celé řady enzymových systémů a ovlivňuje i proteinový metabolismus; při jeho nedostatku se snižuje obsah proteinů a roste hladina rozpustných organických dusíkatých sloučenin.

Většina přijatého železa se soustřeďuje do chloroplastů, kde dosahuje až 90 % celkového Fe listu. Zde je chelátově vázané v porfyrinové struktuře hemu nebo heminu.

Nedostatek způsobuje chlorózu (blednutí listů). (1) Může k tomu docházet při interakcích železa s jinými kovy, vyvázáním železa v rostlině fosfátem nebo na bazických substrátech v důsledku vysokého poměru K:Ca. Příznaky deficiencie železa se projevují u většiny rostlin podobně. Listy se vyznačují chlorotickým blednutím, zatímco pletivo bezprostředně sousedící s nervaturou si ponechává normální zabarvení. Při silnějším nedostatku Fe se ztrácí u listů postupně chlorofyl, až celý list dostává zabarvení slonoviny. (4)

### **5.1.5. Měď**

Obsah mědi v rostlinách závisí především na druhových zvláštnotech rostlin a na půdních podmínkách. Omezený přestup Cu z půdy do rostlin je zdůvodňováno vazbou Cu na anorganické částice v půdě. (11) Průměrný obsah mědi v rostlinných pletivech kolísá od 1,5 do 8,5 ppm v sušině. Vysoký obsah mědi byl zjištěn v generativních orgánech (4,6), v listech, v plodech a semenech. (4)

Relativně vysoká koncentrace Cu se objevuje v chloroplastech, a to až 70 % z celkového obsahu Cu v listech. Měď plní v rostlině funkci katalytického prvku, kde se bezprostředně váže na molekulu bílkoviny. Dále je složkou proteinů v chloroplastu, kterými je zabezpečován transport elektronů. Měď může hrát významné místo v syntéze nebo stabilitě chlorofylu a dalších rostlinných pigmentů, i když mechanismus není dosud plně objasněn. Měď je součástí enzymových oxidáz (cytochromoxidázy, askorbátoxidázy, polyfenoloxidázy ap.). Spolu s Fe se podílí na redukci nitrátů v rostlině (je složkou nitrátoreduktázy). Vedle těchto reakcí měď se objevuje v proteinovém a sacharidovém metabolismu. Při deficienci Cu dochází v rostlinách k destrukci proteinu až na rozpustné aminokyseliny. (4,6)

I když měď je biogenním prvkem pro rostliny, vyšší koncentrace jsou pro rostlinu toxické. (1) Toxicita je způsobena snadným vstupem jejího iontu do buňky a mimořádnou schopností tvořit komplexy s řadou organických látek. Měď se váže pevněji než Fe, a to je jeden z hlavních důvodů, proč ovlivňuje negativně příjem železa. Nadbytek se projevuje u většiny rostlin podobně jako nedostatek Fe, chlorózou. (1, 4)

### **5.1.6. Nikl**

Důkazy o jednoznačné nezbytnosti tohoto prvku pro rostliny chybí, avšak řada prací zdůrazňuje jeho pozitivní působení na růst rostlin. Podle některých zdrojů je nikl součástí ureázy. (4) Obsah niklu se v rostlinách pohybuje v rozmezí 0,1 – 5,0 ppm

na sušinu. Fytotoxické koncentrace dosahují hodnot 10-100 mg na kg sušiny. Jeho vysoký obsah omezuje růst rostlin a potlačuje fotosyntézu a transpiraci. (4) Je kofaktorem ureázy. (11) U bobovitých bylo zjištěno snížení intenzity fixace vzdušného dusíku. Příjem niklu kořeny a jeho transport do nadzemních částí rostlin je brzděn  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Toxicita Ni je vysvětlována poměrem Ni: Fe v rostlinách než jeho absolutní koncentrací. Z rostlin, které Ni kumulují. Jsou to: jahody, maliny, angrešt a většina semen. (4)

### **5.1.7. Chrom**

Koncentrace Cr je závislá na obsahu jeho rozpustných sloučenin v půdách. Nejvíce Cr se kumuluje v kořenech, méně v listech a stoncích. Nejnižší obsahy byly zjištěny v zrně. Rostliny přijímají  $\text{Cr}^{6+}$ , který je však v prostředí málo stabilní. Chrom stimuluje vývoj rostlin a kladně působí na metabolismus cukrů. Toxicita Cr závisí na stupni oxidace a přístupnosti přijatelných forem Cr. (4)

Toxické pro člověka jsou  $\text{Cr}^{6+}$ . Jejich účinek je vysvětlován oxidací iontů  $\text{Fe}^{2+}$  v hemoglobinu na  $\text{Fe}^{3+}$  methemoglobinu, který již organismus nemá schopnost přeměnit zpět na hemoglobin. (4)

## 5.2. MIKROVLNNÁ MINERALIZACE

Nejfrekventovanějšími technikami rozkladu biologického materiálu v praxi jsou suchý a mokrý rozklad. (13)

Mokrý rozklad pak představuje destrukci matrice vzorku ve směsi silných minerálních kyselin za zvýšené teploty, případně i tlaku. V tomto případě, který je často preferován (14), je reakční směs umístěna do hermeticky uzavřeného prostoru a vystavena účinkům teplot vyšších než je teplota varu azeotropu  $\text{HNO}_3$  ( $122,4^\circ\text{C}$ ) při atmosférickém tlaku. Současně dojde k výraznému vzestupu tlaku v reakčním prostoru (jednotky až desítky Mpa). (13)

V posledních několika letech jsou v analytických laboratořích velmi frekventována zařízení využívající mikrovlnného záření jako zdroje energie pro ohřev kapalné reakční směsi v uzavřené nádobě, bez ohřevu nádoby a vnějšího prostoru. Na trhu je možno najít několik systémů speciálně vyvinutých pro aplikaci v analytické chemii, vyrobených z materiálů odolných proti působení korozivních par silných kyselin a vybavených zařízeními pro kontrolu teploty a tlaku uvnitř reakčních nádob.

Materiál reakčních nádob, konstrukční uspořádání a s tím související maximální tlak uvnitř nádoby jsou determinujícím faktorem účinnosti rozkladu organické matrice vzorku, a tím i použitelnosti mineralizátu pro jednotlivé analytické měřicí techniky. Velká část aplikací mokrého rozkladu za zvýšeného tlaku využívá teflonových či křemenných reakčních nádob uzavřených v silném kovovém plášti. Možnost zvýšení teploty rozkladu je v tomto případě omezena materiálem, ze kterého jsou vyrobeny reakční nádoby. (13)

Mokrý rozklad biologického materiálu v uzavřeném systému v prostředí koncentrované kyseliny dusičné má následující výhody ve srovnání s otevřeným systémem mokrého rozkladu za atmosférického tlaku:

- nedochází ke ztrátám prvků vytěkáním,
- kratší doba rozkladu a jeho vyšší účinnost,

- může být použita samotná kyselina dusičná, kterou je možno relativně snadno připravit ve vysoké čistotě,
- používá se nižší objem reagentů, což vede ke snížení úrovně slepého pokusu,
- nepřichází v úvahu sekundární kontaminace vzorku během rozkladu z prostředí laboratoře. (13,14)

### **5.3. ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE**

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod. Tato optická metoda umožňuje kvantitativní analýzu více než 60 prvků (zejména kovů a metaloidů). Je to metoda používaná na stanovení koncentrace prvku v látce měřením absorpce záření atomovými parami prvku generovanými z látky. Stanovení se provádí při vlnové délce jedné z absorpčních čar stanovovaného prvku. (15)

Vychází z Kirchhoffova a Bunsenova zákona, podle něhož jsou volné atomy v plynném stavu schopny absorbovat záření o takové vlnové délce, kterou samy emitují. Energetická hodnota absorbovaných fotonů je charakteristická pro určitý druh atomů a počet absorbovaných fotonů představuje množství stanovovaných atomů daného prvku.

Monochromatické záření vhodného zdroje je absorbováno volnými atomy prvku v základním stavu. Neabsorbované záření prochází monochromátorem, dopadá na fotonásobič a vzniklý signál je po zesílení registrován jako absorbance, ale může být také indikován elektrickým indikátorem či digitálním záznamem. (16) Hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci stanovovaného prvku (platí Lambertův-Beerův zákon). (16,17)

#### **5.3.1. Základy instrumentace**

Nejdůležitějšími součástmi atomového absorpčního spektrofotometru je zdroj monochromatického záření, kterým je obvykle výbojka s dutou katodou, zhotovená ze stejného kovu jako je analyzovaný, absorpční prostředí (plamenový nebo elektrotermický atomizátor), mřížkový nebo hranolový monochromátor a fotonásobič jako detektor se zesilovačem pro záznam absorbančního signálu. (16,17)

Z výbojky vychází čárové atomové spektrum daného kovu a prochází absorpčním plynovým prostředím, tzn. plamenem, do něhož je přes zmlžovač a zmlžovací komoru rozprašován roztok analyzovaného vzorku. V plameni je vzorek tepelně rozkládán, dochází ke vzniku volných atomů v neexcitovaném stavu, které jsou schopny absorbovat záření o vlnové délce  $\lambda$ . Nepohlcené záření prochází přes monochromátor do detektoru, kde je jeho hodnota po zesílení zpracována na výstupní signál, který je dále počítačově zpracováván. Záření zdroje je modulováno mechanicky nebo elektricky s určitou frekvencí. Zesilovač pak pracuje na souhlasné frekvenci, čímž dochází k eliminaci rušící emise prvků a kontinuální emise v atomizátoru. (16)

### 5.3.1.1.Zdroje záření

Jako zdroj monochromatického světla ve spektrofotometru se používá několik typu lamp: lampa s dutou katodou, lampy s vysokou září, spektrální lampy či vysokofrekvenční bezelektrodové výbojky. (16)

### 5.3.1.2.Lampa s dutou katodou

Záření vychází z katody ve tvaru dutého válce, který je naplněny neonem nebo argonem za sníženého tlaku 3-5 torrů. Katoda je buď vytvořena z kovu, který je stanovován, nebo je tímto kovem vyplněna. Víceprvkové lampy mají slitinové katody.

Anodou je silný wolframový nebo niklový drát. Napětí mezi katodou a anodou pak dosahuje hodnoty mezi 100-400 V. V průběhu doutnavého výboje mezi dvěma elektrodami se ionizuje vzácný plyn anody a ionty plynu vyrážejí proud atomů z kovu do dutiny, kde se excitují. Emitovaná čára za sníženého tlaku má menší šířku než čára absorpční.

Závady lampy:

- částečná samoabsorpce záření nebo samozvrat v atomovém oblaku před katodou u kovů s nízkou tenzí par a při vysokých napájecích proudech (mění se profil emisní čáry),
- tepelné rozšíření čáry při vyšších proudech (větší počet srážek atomů),



- z materiálu katody se uvolňuje vodík, který vykazuje kontinuální spektrum v UV oblasti.

Výhodou jsou stíněné katody, které mají katody ve tvaru dutého kužele (zúžení výstupu katody zabraňuje samoabsorpci), katoda a anoda jsou elektricky izolovány keramickým materiálem a slídovými kotouči. Záření je omezeno jen na vnitřek katody, dosáhne se vyšší záře a podstatně čistšího spektra. (16)

#### 5.3.1.3.Lampy s vysokou září

U tohoto typu lamp nastává excitace atomu ve výbojích mezi dalšími pomocnými elektrodami v lampě. Dosáhneme tak vyšší intenzity záření, která je potřeba pro stanovení obtížně těkajících prvků, jako je například Si, Ti, V. (16)

#### 5.3.1.4.Spektrální lampy

Tyto lampy se používají například pro stanovení Rb nebo Cs. Bohužel jejich nevýhodou je silná samoabsorpce. (16)

#### 5.3.1.5.Vysokofrekvenční bezelektrodové výbojky

Představují lampy tvořené křemennou trubicí, naplněnou několika miligramy stanovovaného prvku. Jedná se buď o čistý kov, halogenid nebo kov s přídavkem jodu, ve směsi s argonem o tlaku několika torrů. Buzení se provádí vysokofrekvenčním generátorem při 2450 MHz. (16)

### **5.3.2. Plamenová atomová absorpční spektrometrie**

Plamenová atomová absorpční spektrometrie (FAAS) představuje jeden z typů AAS, kde se jako zdroje volných atomů používají plamenové hořáky. Jedná se o dlouhé jednoštěrbínové či víceštěrbínové hořáky z titanu nebo jiných antikorozivních materiálů, určené pro laminární plameny. Pro laminární proudění plynu do hořáku je nutná hodnota Reynoldsova čísla  $< 2300$ . Tato hodnota vychází ze vztahu:

$$Re = \rho s d / \eta ,$$

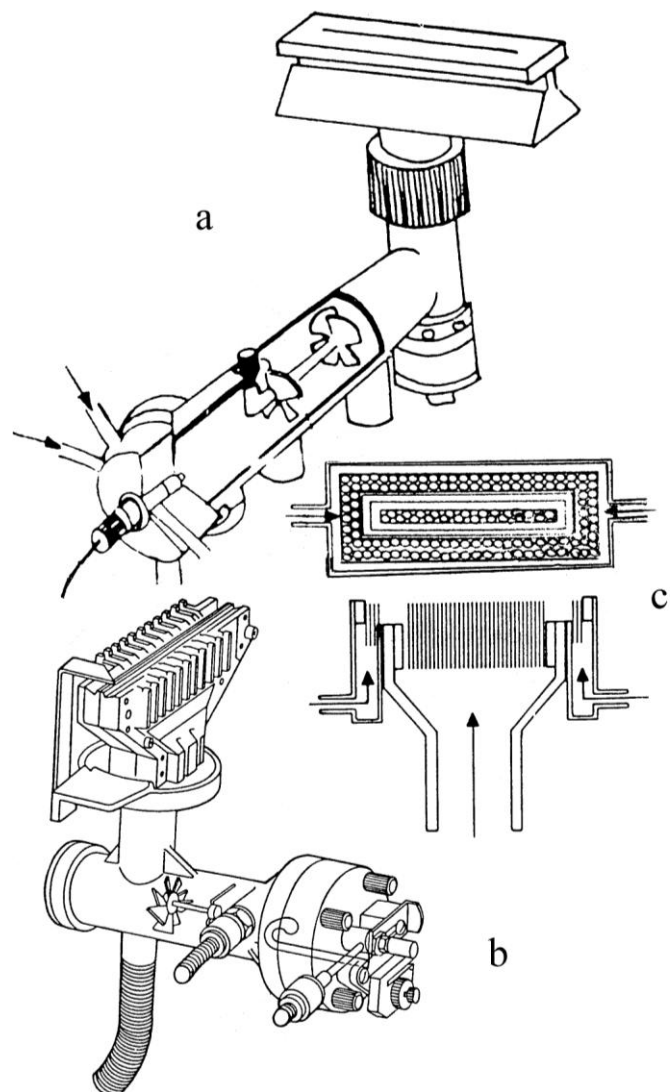
kde  $s$  je střední rychlost proudění ( $m \cdot s^{-1}$ ),

$\eta$  viskozita plynu ( $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ ),

$d$  průměr plamene (m),

$\rho$  hustota plynu ( $kg \cdot m^{-3}$ ).

Tříštěrbinové hořáky mají lepší hodnotu poměru signál/šum a je možno je použít pro rozmlžování roztoků s vysokým obsahem soli (až 30% roztoky). Pro jednoštěrbinové hořáky je možno použít jen roztoky s 3-5 % koncentrací soli. Štěrbinové hořáky nejsou použitelné pro plyny s velkou rychlostí hoření (směsi s čistým kyslíkem).



Obr. č. 1: Hořáky s mlžnou komorou (16)

a) jednošěrbinový, b) s profilovanou šěrbinou, c) stíněný Mékerova typu

### 5.3.2.1. Zmlžovače

V pneumatickém rozmlžovači je roztok vzorku nasáván kapilárou v důsledku podtlaku, způsobeným tryskáním jednoho plynu (zpravidla oxidovadla) a unášen ve formě aerosolu do plamene. Aerosol je tvořen kapičkami roztoku mnoha velikostí. Část aerosolu koaguluje v mlžné komoře a jen malá část roztoku postupuje

do plamene (účinnost zmlžování jako poměr množství zmlžované kapaliny do plamene k celkovému množství nasátého roztoku).

Při použití mlžné komory se do plamene dostane jen asi 5-20% roztoku, zbytek koaguluje v mlžné komoře. Při zahřívání mlžné komory se může zlepšit účinnost rozmlžení a zvyšuje se až 10krát citlivost stanovení prvku (vhodné jen pro zředěné roztoky). Výhodou použití difuzního zmlžovače je dobrá reprodukovatelnost měření. (16)

### 5.3.2.2. Plamen jako absorpční prostředí

Vznik atomů v plameni je složitý proces. Výtěžek atomizace závisí především na teplotě plamene a parciálním tlaku spalných produktů plamene. Rozhodující je výběr plynové směsi, stechiometrie paliva a oxidovadla. Mnohdy je výhodou vhodné redukční prostředí v plameni, přítomnost organických sloučenin a rozpouštědel. Plamen musí být opticky propustný, nemá absorbovat záření, má vést k maximálnímu výtěžku atomizace prvku. Absorpce atomů je sledována v definované výšce plamene. Pevné nebo kapalně částice v plameni mohou vyvolat rozptyl záření, nedisociované molekuly pak nespécifickou absorpci záření. U laminárních plamenů dochází k míchání plynů ještě před dosažením hořáku. Obvykle používané plameny plyných směsí jsou uvedeny v tabulce. (1)

Tabulka č. 1: Plameny plyných směsí používaných v AAS.

Plynná směs	Rychlost hoření cm/s	Průměrná teplota °C	Rozsah teplot °C
Propan-vzduch	80	1930	
Acetylen-vzduch	160	2300	2125 – 2400
Acetylen-N <sub>2</sub> O	180	2700	2660 – 2800
Vodík-argon (dusík) + vzduch			400 - 800

Obvyklou směsí je směs acetylen-vzduch. V plameni ionizují podstatně jen alkalické kovy. Plamen je opticky propustný jen do  $\lambda = 230$  nm, při 193,7 nm (čára arsenu) má již jen 35% propustnosti. Plamen se silně oxidačním účinkem (nadbytek vzduchu) se používá při stanovení Au, In, Pt, Pd, Rh. Slabě redukční plamen (nadbytek acetyleny) je vhodný pro prvky alkalických zemin, silně redukční pak pro stanovení Mo, Cr, Sn. Při používání svítivého plamene (velký nadbytek acetyleny) se projevuje zvýšený šum přístroje.

Ve směsi acetylen-N<sub>2</sub>O dochází k atomizaci prvků v červené zóně plamene (vysoká 5 - 50 mm u slabě redukčního plamene). Ve spektru plamene se objevují pásy CN, CH, NH, které zvyšují šum přístroje a znemožňují stanovení prvku při použití slabých zdrojů záření. V tomto plameni se však odstraní většina chemického rušení a dochází k rozrušení stabilních oxidických vazeb v binárních a ternárních oxidických fázích. Atomy velkého počtu prvků již v plameni ionizují.

Difúzní plameny vodík-argon (nebo dusík) mají vysokou propustnost v UV oblasti (stanovení As, Se, Cd, Sn). Jde o plameny vodíku, vedených argonem nebo dusíkem. Plameny mají členěnou strukturu. Nejteplejší místo v plameni je při dotyku plamene s okolním vzduchem (850 °C), ve středu plamene je 300-500 °C. Vhodný je tříštěrbinový hořák, nevýhodou těchto plamenů jsou vyšší chemické interference, rozptýl záření a vyšší pozadí.

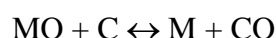
Stíněné plameny C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O nebo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/vzduch hoří v atmosféře argonu nebo dusíku, při čemž dochází k oddělení primární a sekundární zóny. Zabráni se přístupu atmosférického kyslíku a tím vzniká mezireakční zóna s nepatrným pozadím plamene. Pro AAS to znamená příznivější poměr signál/šum a tedy výhodnější mez postřehu vedle vyšší citlivosti stanovení. (16)

### 5.3.2.3. Atomizace prvků v plameni

Pro atomovou absorpci (ale také emisi a fluorescenci) má zásadní význam účinnost zmlžování roztoku v plameni, stupeň atomizace prvku a doba pobytu volných atomů v plameni.

Účinnost zmlžování závisí na konstrukci mlžné komory a fyzikálních vlastnostech roztoku. Stupeň vzniku volných atomů je naopak dán teplotou a charakterem plamene a je podstatně ovlivněn předchozími procesy, jako je zplynění molekul po odpaření kapiček aerosolu, jejich termické disociaci (resp. redukci na volné atomy), ale také následnými chemickými reakcemi volných atomů v plameni a případnou ionizací atomů při vysokých teplotách. (16)

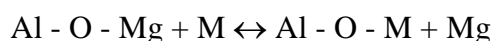
Po vypaření částic aerosolu vznikají nejčastěji oxidy prvků, které při vysokých teplotách tají, těkají a termicky disociují nebo se redukují na volné atomy:



Při vysokých teplotách dochází k částečné ionizaci atomů v závislosti na ionizačním potenciálu prvku a teplotě plamene, čímž dochází ke snížení absorbance. K vyššímu stupni ionizace dochází při nižších koncentracích prvku v roztoku, naopak při vyšších koncentracích ionizační stupeň klesá. Nežádoucí ionizaci atomů daného prvku lze snížit na minimum vhodnou skladbou plynů, které poskytují plamen, přítomností regulátoru teploty, spektrálních tlumičů či přítomností solí snadno ionizujících prvků (např. solí draslíku). (16)

Oxidy, ale také další sloučeniny (karbidy, nitridy) některých prvků (např. Al, Ti, Zr, Br resp. B, V, W, Ti, Ta, Zr, Nb) neúplně disociují na atomy i při vysokých teplotách. V přítomnosti doprovodných prvků (např. Al při stanovení Mg nebo Ca) mohou v plameni vznikat ternární oxidické fáze (tvorba spinelu  $\text{MgO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$  resp.  $\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ ), které jsou velmi termostabilní.

Na bázi konkurenční chemické reakce je pak možno vytěsnit stanovovaný prvek z termostabilní fáze jiným prvkem, čímž dochází ke zvýšení stupně atomizace stanovovaného prvku.



(pro M = Sr, Ca, Ba, La, Y, Ce)

Přidáním nadbytku komplexotvorných činidel (např. 8-hydroxychinolin nebo kyselina 5-sulfosalicylová při stanovení Mg nebo Ca) nebo kombinací uvolňovacího prvku a komplexotvorného činidla (Ca + 8-hydroxychnolin při stanovení Mg) zvýšíme stupeň atomizace stanovovaného prvku. Již malá koncentrace rušícího prvku totiž způsobuje silný pokles absorbance, která po dosažení určité hodnoty se s rostoucí koncentrací určitého prvku podstatně nemění.

Účinnost zmlžování vzorku je ovlivněna změnami viskozity, povrchového napětí a hustoty zmlžovaného vzorku. Fyzikální vlivy se projevují zpravidla v pomalém a rovnoměrném poklesu absorbance roztoku vzorku, např. s přibývajícím viskozitou nebo hustotou roztoku.

V koncentrovaných roztocích solí je viskozita zvýšena, neboť dochází k poklesu množství zmlžovaného roztoku. Naopak snížením povrchového napětí v přítomnosti organických rozpouštědel je množství roztoku dopraveného do plamene větší, protože se zmenšuje velikost kapiček, zpomaluje se sedimentace a koagulace.

Organická rozpouštědla zpravidla pozitivně ovlivňují absorbanci atomů v plameni, neboť snižují viskozitu a povrchové napětí roztoku, čímž se zvýší přísun aerosolu do plamene. V důsledku exotermního spalování organického rozpouštědla v plameni pak dochází k nárůstu teploty plamene, což způsobí zvýšení stupně atomizace. (16)

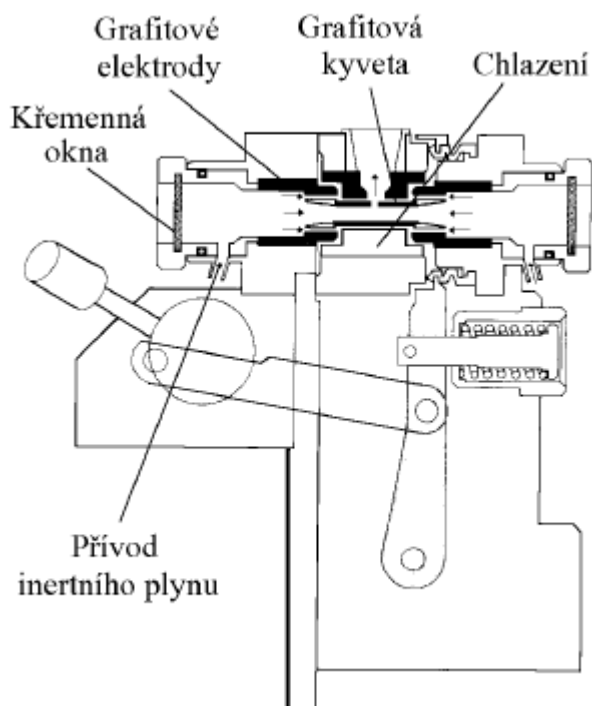
#### 5.3.2.4. Detektor

Pro detekci záření se využívá fotonásobič. Jeho výhodou je vysoká citlivost a velmi nízká časová konstanta ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$  s), tzn. pracuje bez setrvačnosti. (16)

### 5.3.3. Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací

Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETA, GFAAS) představuje jeden z typu AAS, kde se jako atomizátor používá miniaturní, elektrickým odporem vyhřívaná kyveta (grafitová, wolframová, tantalová aj.). Nejčastějším typem ohřevu je ohřev odporový, ale některé přístroje využívají i ohřev indukční či kapacitní. Atomizátorů je mnoho typů. Liší se použitým materiálem, konstrukcí, dosahovanými maximálními teplotami a rychlostmi ohřevu, prouděním inertní atmosféry a dalšími vlastnostmi. Veškeré charakteristiky daného atomizátoru se následně promítnou do velikosti a časového průběhu signálu analyzovaného vzorku.

Základem grafitového atomizátoru je grafitová trubice (kyveta) umístěná ve speciální hlavici, která ji udržuje v optické dráze spektrometru. (18) Elektrotermický ohřev kyvety probíhá v atmosféře čistého argonu, jehož hlavní úlohou je zabránit přístupu kyslíku ze vzduchu k rozžhavenému grafitu a volným atomům analyzovaného vzorku, a také odvádět zplodiny ze systému.



Obr. č. 2: Hlavice elektrotermického atomizátoru (18)



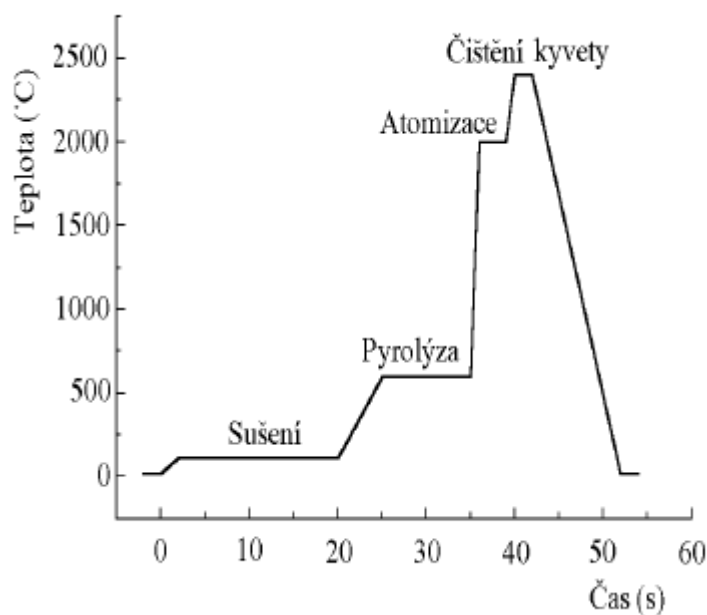
Vzorek je do kyvety dopraven přes dávkovací otvor pomocí programovatelného dávkovače. Dávkuje se velmi malé množství vzorku (10 - 40  $\mu\text{l}$ ). (18) Poté postupným ohřevem kyvety průchodem elektrického proudu (kyveta se chová jako elektrický odpor) dochází k atomizaci nadávkovaného vzorku. Teplotní program je individuální pro stanovení každého prvku a musí být pro daný přístroj optimalizován.

Někdy je nutné použít pro stanovení daného kovu určitý modifikátor. Modifikátory jsou látky, které jsou schopny ovlivnit průběh termické úpravy nebo atomizační mechanismus, přičemž nesmí obsahovat stanovovaný prvek. Principů působení modifikátorů je několik. Buď způsobí pokles neselektivní absorpce tím, že matrice je převedena na těkavější formu a vytéká z atomizátoru ještě před vlastní atomizací, nebo dochází ke zvýšení účinnosti atomizace stabilizací analytu při vyšších teplotách, tím lze zvýšit teplotu atomizace a lépe tak rozložit matrici. (16,18)

Na rozdíl od plamene v pevných atomizátorech, průběh a teplota různých kroků, tj. sušení, rozklad (pyrolýza) a atomizace, mohou být naprogramovány a tvar i velikost absorbančního pulsu tímto způsobem ovlivněny. Každá fáze zahřívání je charakterizována rychlostí nárůstu teploty, touto teplotou, dobou trvání rozkladu při této dosažené teplotě a průtokem plynu.

#### 5.3.3.1. Průběh analýzy

Teplota kyvety je zvyšována v několika krocích: ohřev na teplotu rozpouštědla (sušení), ohřev na teplotu pyrolýzy (odstranění maximální části matrice vzorku), ohřev na teplotu atomizace (vytvoření oblaku volných atomů) a konečné zahřátí nad teplotu atomizace, které slouží k vyčištění kyvety. Po této fázi nastává ochlazování kyvety na počáteční teplotu. (16)



Obr. č. 3: Teplotní program průběhu analýzy (18)

První fází je sušení vzorku. Většinou se volí teploty mírně nad bodem varu rozpouštědla (nejčastěji kolem 120°C), případně sušení ve více krocích v závislosti na charakteru analyzovaného vzorku. Při nárůstu teploty nesmí dojít k rozstříknutí vzorku varem roztoku. Doba trvání závisí na objemu vzorku. Vzorek musí být dokonale vysušen, aby nedocházelo k jeho ztrátám při nárůstu teploty v dalším kroku zpracování. Sušení vzorku, stejně jako jeho dávkování, je možné sledovat zrcátkem nebo pomocí kamery.

Další fází termické úpravy vzorku je pyrolýza. Ta slouží k přeměně roztoku tak, že snižuje poměr přítomného rozpouštědla ve vzorku. Ideálem je odstranění co největší části rozpouštědla bez ztráty stanovovaného analytu. Maximální teplota, kterou lze použít, se určuje z rozkladné křivky. Ta se sestaví z opakovaných měření stejného vzorku při konstantní teplotě atomizace, ale měnící se teplotě pyrolýzy. Jako optimální se volí teplota o 50 - 100 °C nižší než je zlom na křivce (tedy přibližně kolem 500°C), při kterém dochází k poklesu absorbance. Pokles hodnoty je způsoben ztrátami analytu při pyrolýze. Doba trvání pyrolýzy se dá určit např. ze sledování neselektivní absorbance. Fáze pyrolýzy může být opět rozdělena do několika kroků v závislosti na charakteru analytu.

Ve fázi atomizace se detektorem s fotonásobičem zaznamenává analytický signál. Optimální teplota této fáze se určuje z atomizační křivky, sestrojené pro konstantní teplotu pyrolýzy. V této fázi se teplota volí o 50 – 100 °C vyšší než teplota, od které se již signál nemění. Doba atomizace se určuje tak, aby nedocházelo ke změnám plochy signálu. Důležité jsou též rychlost nárůstu teploty (ramp) a průtok plynu při atomizaci. Na základě studia teplot při zlomech na rozkladných a atomizačních křivkách lze odhadnout mechanismus atomizace. I v malém objemu atomizátoru tak lze dosáhnout relativně vysokou okamžitou koncentraci atomu a tím i vysokou citlivost stanovení, neboť na procesech vedoucích k atomizaci se podílí celé množství nadávkovaného vzorku.

Předposlední fázi je čištění kvety od zbytku vzorku. Doba trvání a teplota této fáze se volí také s ohledem na životnost atomizátoru při použití vysokých teplot. Fázi poslední představuje chlazení atomizátoru.(16)

### 5.3.3.2.Vyhodnocování a metodika stanovení

Vyhodnocení výsledků provádí moderní přístroje automaticky. Pro konečný výpočet koncentrace prvku se vychází ze tří hodnot absorbance naměřené přístrojem (výpočet podle Deana a Dixona). Přístroj také vypočítá směrodatnou odchylku  $s_A$ , variační koeficient  $s_A \cdot 100/\bar{A}$  a interval spolehlivosti střední hodnoty absorbance pro 95 % statistickou pravděpodobnost. (16)

Obsah prvku lze vyjádřit v ppm a koncentraci v  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Vyhodnocování se provádí porovnáním s porovnávacími roztoky známých koncentrací stanovovaného prvku buď metodou přímé kalibrace (metoda kalibrační křivky), nebo metodou standardních přídavek. (16)

### 5.3.3.3. Metoda kalibrační křivky

Pro závislost  $A=f(c)$  se měří absorbance většího počtu roztoků (nejméně pěti) tak, aby  $A \leq 0.7$ . Při vyšších absorbancích se závislost zakřivuje ke koncentrační ose. Některé přístroje umožňují automatickou korekci zakřivené kalibrační křivky s použitím vybraných standardních roztoků. Při použití dokonalého přístroje a digitálního záznamu absorbance s průměrováním signálu čase je přesnost odečtení absorbance 0.3 - 0.8%. Pro měření roztoku s vysokými hodnotami absorbance se otočí hořák o určitý úhel (např.  $45^\circ$ ), takže se zkrátí absorpční dráha nebo se volí méně citlivá čára. Pro konstrukci kalibrační křivky je nutno respektovat případnou interferenci s ostatními prvky nacházejícími se v roztoku. (16)

### 5.3.3.4. Metoda standardních přídavků

Pokud je kalibrační závislost přímková, tak se neznámá koncentrace vyhodnocuje graficky s použitím roztoků vzorku s jedním až čtyřmi přídavky standardního roztoku. Postup je vhodný pro vzorky se složitější nebo proměnlivou osnovou. Tímto způsobem lze odstranit rušící fyzikální vlivy a vlivy chemické nezávislé na koncentraci. Nelze však odstranit koncentračně závislé vlivy a vliv ionizace atomů. (16)

### 5.3.3.5. Absorpční a emisní čáry atomů

Primární rezonanční absorpční čáry atomů (šířka  $10^{-5}$  nm) jsou rozšířeny na základě neuspořádaného termického pohybu atomů (Dopplerovo rozšíření), srážek excitovaných a neexcitovaných atomů (Lorentzovo rozšíření), kombinace Dopplerova a Lorentzova rozšíření vede ke konečnému Voigtovu profilu čáry.

Absorbance ve vztahu ke koncentraci atomů a délce absorpčního prostředí

Základní vztahy:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\kappa \cdot N \cdot l}$$

$$A = \log I_0/I = \kappa \cdot N \cdot l$$

kde

$I_0$  je intenzita záření před průchodem absorpčním prostředím,

$I$  intenzita záření po průchodu absorpčním prostředím,

$N$  počet volných atomů v jednotce objemu,

$\kappa$  atomový absorpční koeficient, vztažený na jeden atom (je možno udat hodnoty koeficientu pro různý profil absorpční čáry).

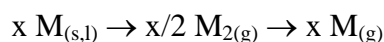
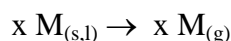
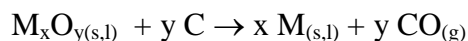
Pro celý profil absorpční čáry vyjadřujeme integrální hodnotu absorpce a absorpčního koeficientu. Pro praktické využití atomové absorpce musí být emisní čára vždy užší než absorpční a v průběhu měření nebo kalibrace se nesmí měnit stupeň atomizace  $\alpha$ .

Teoreticky je tedy závislost absorbance na koncentraci volných atomů a při zachování konstantního stupně atomizace i koncentraci prvku v roztoku, lineární. (16)

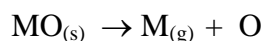
### 5.3.3.6. Průběh chemických dějů

Chemické děje v elektrotermickém atomizátoru jsou složité. Lze je rozdělit na děje vedoucí ke vzniku volných atomů a děje způsobující jejich zánik. Vychází se z předpokladu, že po ukončení analýzy je analyt přítomen především ve formě oxidu či halogenidu. Volné plynné atomy pak mohou vznikat v grafitovém atomizátoru následujícími mechanismy:

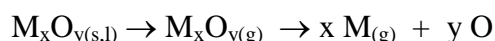
1. redukce oxidu na kov v kondenzované fázi a následné vypaření kovu, někdy se vznikem dimeru



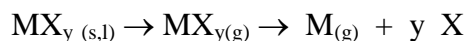
2. termický rozklad v pevné fázi



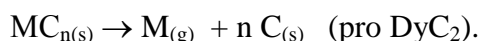
3. vypaření oxidu a jeho následná disociace v plynné fázi



4. vypaření halogenidu a jeho následná disociace v plynné fázi



Pokud v průběhu pyrolýzy vzniká jiná sloučenina, lze předpokládat její disociaci, např.



Průběh signálu při elektrotermické atomizaci je odrazem časové závislosti množství atomů v pozorovaném objemu atomizátoru a je funkcí teploty. (15)

Výhodou analýzy na přístroji s elektrotermickou atomizací je zvýšení citlivosti měření (až o 2 řády) a snížení detekčního limitu (až o 3 řády) než u plamenové atomizace. (16) Navíc se na absorpci primárního záření podílí celé množství nadávkovaného vzorku, čímž dosáhneme mnohem vyšší okamžitou koncentraci volných atomů v plynné fázi ve velmi malém objemu atomizátoru. (18) Její nevýhodou však zůstává nutnost kompenzovat pozadí. (16)

#### **5.3.4. Shrnutí AAS**

Metoda atomové absorpční spektrometrie umožňuje analyzovat velice různorodé vzorky, a to i bez předcházející separace. Její velkou výhodou je vysoká specifická stanovení, a to jak u kovů, tak i nekovů (celkem asi 70 prvků).

Sériového stanovení kovů přítomných v malé koncentraci se využívá v mnoha oblastech, jako je například analýza pitných a užitkových vod, biochemie (pro určování kovů v tkáních a tělních tekutinách), potravinářství, geologický průzkum, metalurgie, toxikologie, znečištění životního prostředí kovy a v dalších oblastech.

## **6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 6.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- síran hořečnatý heptahydrát p.a., Normapur, Francie,  $M_r=246,47$
- dichroman draselný p.a., Normapur, Francie,  $M_r=294,2$
- síran manganatý monohydrát p.a., Normapur, Francie,  $M_r=169,0$
- síran měďnatý pentahydrát p.a., Normapur, Francie,  $M_r=249,7$
- síran nikelnatý heptahydrát p.a., Normapur, Francie,  $M_r=280,9$
- síran zinečnatý heptahydrát p.a., Normapur, Francie,  $M_r=287,54$
- chlorid železitý sextahydrát p.a., Normapur, Francie,  $M_r=270,3$
- chlorid palladnatý p.a., Normapur, Francie,  $M_r=177,3$
- kyselina dusičná 69%, Normapur, Francie,  $M_r=63,0$
- peroxid vodíku 30%, Normapur, Francie,  $M_r=34,01$
- ultračistá voda připravena pomocí Milli Q systému p.a. Millipore, Bedford, MA, USA



## **6.2. PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ**

- Mikrovlnný mineralizátor s mineralizací při zvýšené teplotě a tlaku (v uzavřeném systému) značky Anton Paar<sup>®</sup> Multiwave 3000, GmbH, Gratz, Rakousko.
- Plamenový spektrofotometr značky Varian<sup>®</sup> 880Z, Inc., Scientific instruments, USA, pro měření atomové absorpce.
- Atomový absorpční spektrofotometr s elektrotermickou atomizací Varian<sup>®</sup> 220, Inc., Scientific instruments, USA.

### 6.3. VZORKY DROG

Tabulka č. 2: Seznam analyzovaných rostlinných drog, matečných rostliny a jejich čeledí.

Název drogy	Latinský název rostliny	Čeď
Melissae folium	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>
Matricariae flos	<i>Camomilla recutita</i>	<i>Asteraceae</i>
Urticeae herba	<i>Urtica dioica</i>	<i>Urticaceae</i>
Menthae piperitae folium	<i>Mentha piperita</i>	<i>Lamiaceae</i>
Foeniculi amari fructus	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Apiaceae</i>
Tiliae flos	<i>Tilia spp.</i>	<i>Rosaceae</i>
Hyperici herba	<i>Hypericum perforatum</i>	<i>Hypericaceae</i>
Filipendulae ulmariae herba	<i>Filipendula ulmaria</i>	<i>Rosaceae</i>

Analyzované drogy byly zakoupeny v lékárnách i supermarketech v České republice, Polsku a Francii. Jednalo se o tři typy lékových forem: prášková droga, nálevové sáčky a želatinové tobolky obsahující sušenou drogu.

## **6.4. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ**

### **6.4.1. Příprava standardního roztoku**

Standardní roztoky jsem připravovala pro každý kov zvlášť. Do 100 ml odměrné baňky jsem na analytických váhách odvážila 1 g soli daného kovu, určeného pro přípravu standardních roztoků. Odměrnou baňku jsem doplnila po rysku ultračistou vodou, čímž vznikl roztok o obsahu 1000 ppm. Z něj jsem pak do jiné odměrné baňky odebrala 1 ml a doplnila vodou po rysku. Vznikl tak standardní roztok o obsahu 100 ppm.

### **6.4.2. Příprava kalibračních roztoků**

Koncentrace sad kalibračních roztoků se značně lišily. Přehled koncentrací uvádí tabulka č. 3. Pro příklad uvádím přípravu sady kalibračních roztoků pro Mg.

Kalibrační roztoky Mg obsahovaly 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 ml standardního roztoku o obsahu 100 ppm. V odměrné baňce byly doplněny vodou po rysku. Získala jsem tak kalibrační roztoky o obsahu 0,2, 0,4, 0,6 a 0,8 ppm.

Stejně jsem postupovala i při přípravě sad kalibračních roztoků pro ostatní kovy, ovšem s rozdílnými obsahy uvedenými v tabulce.

Tabulka č. 3: Obsahy kalibračních roztoků stanovovaných kovů v jednotkách ppm.

<b>kalibrační roztoky</b>				
	<b>č. 1</b>	<b>č. 2</b>	<b>č. 3</b>	<b>č. 4</b>
<b>Mg</b>	0,2	0,4	0,6	0,8
<b>Zn</b>	0,2	0,4	0,8	1,0
<b>Fe</b>	0,5	1,0	2,0	4,0
<b>Mn</b>	1,0	2,0	4,0	6,0

Připravené kalibrační roztoky jsem používala pro atomovou absorpční spektrometrii s plamenovým atomizátorem (FAAS). Hodnoty kalibračních roztoků pro zbývající kovy (Cu, Cr, Ni) byly v přístroji s elektrotermickým atomizátorem již předprogramovány.

## **6.5. MIKROVLNNÁ MINERALIZACE**

Pro rozklad organického materiálu jsme navážili přibližně 0,2000 g vzorku a následně vložili do teflonové tuby, která tvořila součást mineralizačního přístroje. K rostlinnému materiálu jsme postupně přidávali 5 ml  $\text{HNO}_3$  69% a dále pak 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Tuto směs jsme zlehka zamíchali a ponechali v digestoři (pre-digestion). Po ukončení vývoje plynů jsme očistili vnitřní stěny tub se vzorky, hermeticky jsme je uzavřeli a umístili jsme je do mikrovlnného zařízení. Po navolení automatického programu došlo ke spuštění mineralizačního procesu pod zvýšeným tlakem. Po ukončení programu a vychladnutí vzorků bylo nutno zmineralizované vzorky kvantitativně převést pomocí nálevky, stříčky a odměrné baňky o objemu 20 ml do uzavíratelných zkumavek. Označené vzorky jsme zfiltrovali a uchovávali v umělohmotných uzavřených zkumavkách v lednici po celou dobu analýzy. Stejným způsobem byly připravovány i slepé vzorky.

Ke každé sérii vzorků jsme zhotovili další série replikátů, které jsme také proměřili. Celkem jsme zhotovili 5 sérií francouzského původu, 3 série polského původu a 2 série původu českého.

## **6.6. PLAMENOVÁ ATOMIZACE**

Pro metodu FAAS bylo nutno vzorky naředit 10krát (v případě Fe, Zn, Mn) či 100krát (v případě Mg). Také bylo nutno vytvořit kalibrační standardy pro stanovení jednotlivých kovů o vzestupných koncentracích. Po zapnutí přístroje a počítače s tiskárnou jsme otevřeli také přívod plynů (acetylenu a vzduchu) a zapnuli digestoř k odsávání vzniklých plynů. Do přístroje jsme vložili lampu pro daný kov a optimalizovali jsme nastavení intenzity lampy a výšku hořáku. Poté jsme zapálili plamen a upravili jsme přívod acetylenu na optimální hodnotu. Nami vybraný program automaticky provedl měření. Nulová hodnota absorbance se nastavila na čisté rozpouštědlo, tedy redestilovanou vodu. Následně se přeměřila absorbance čtyř kalibračních standardů, z nichž přístroj vyhotovil kalibrační křivku. Pak došlo k proměření vložených vzorků. Vhodné bylo po každém 10. – 15. vzorku proměřit standard pro kontrolu kalibrace. Získané hodnoty byly automaticky uloženy na harddisk a zároveň vytištěny tiskárnou.

## **6.7. ELEKTROTERMICKÁ ATOMIZACE**

Tuto metodu jsme použili pro stanovení Cu, Cr a Ni. Po zapnutí přístroje jsme vybrali program pro stanovení příslušného kovu. Následně jsme do přístroje vložili také lampu pro stanovení daného kovu a také jsme optimalizovali její intenzitu stejně jako u plamenové atomizace. Do hlavice přístroje jsme umístili grafitovou kyvetu. Dávkovač jsme nastavili do takové polohy, aby dávkování probíhalo přímo do dávkovacího otvoru v kyvetě. Přesnou polohu dávkovače v kyvetě jsme ověřili pomocí zrcátka. Pokud bylo nutné použít modifikátor pro úpravu vzorku během analýzy daného kovu, byl umístěn do příslušného otvoru na otočníku stejně jako redestilovaná voda (blank). Modifikátor byl přidáván ke vzorku automaticky těsně před jeho vstříknutím do atomizátoru. Jednotlivé vzorky o objemu 200 $\mu$ l jsme nalili do nádobek určených k analýze a vložili na rotující kotoučový podavač. Kalibrační standardy pro kalibrační křivku nebylo nutno proměřovat, vycházelo se z již naměřených a uložených hodnot v daném programu. Otevřeli jsme přívod argonu a vody pro chlazení atomizátoru a spustili jsme vybraný program. Celý proces probíhal při zapojeném odsávání odpadních plynů.

Jako modifikátor pro Ni byl použit roztok Pd<sup>2+</sup> o koncentraci 1g/l a pro Cr roztok Mg<sup>2+</sup> o koncentraci 1g/l, které byly předem připraveny. Stanovování Cu žádný modifikátor nevyžaduje.

## **7. VÝSLEDKY A DISKUZE**



## 7.1. OBSAH KOVŮ

Po skončení každého měření jsem výsledky vložila do tabulky a vypočítala koncentraci jednotlivých kovů ve vzorcích. Tímto jsem získala také materiál pro statistickou analýzu, která byla provedena na konci celé studie.

Pro kovy Zn, Fe a Mn jsem přístrojem získané hodnoty koncentrace kovů v roztoku (mg/l) převedla na hodnotu koncentrace kovů v sušené droze (μg/g) podle vzorce:

$$\frac{(c_i \cdot zř - c_0 \cdot zř_0) \cdot v_{20}}{m} = c_f,$$

kde

$c_i$ .....přístrojem naměřená koncentrace v mg/l,

$zř$ .....zředění analytu před daným měřením,

$c_0$ .....přístrojem naměřená koncentrace slepého vzorku v mg/l,

$zř_0$ .....zředění slepého vzorku před měřením,

$v_{20}$ .....objem odměrné baňky 20 ml,

$m$ .....hmotnost suchého vzorku před mineralizací v g,

$c_f$ .....konečná koncentrace v μg/g.

Koncentrace Ni, Cu a Cr uvádí přístroj v μg /l. Pro výpočet finální koncentrace v (μg/g) jsme použili upravený vzorec:

$$\frac{(c_i \cdot zř - c_0 \cdot zř_0) \cdot v_{20}}{m \cdot 1000} = c_f,$$

kde

$c_i$ .....přístrojem naměřená koncentrace v μg/l,

$zř$ .....zředění analytu před daným měřením,

$c_0$ .....přístrojem naměřená koncentrace slepého vzorku v μg/l,

$zř_0$ .....zředění slepého vzorku před měřením,  
 $v_{20}$ .....objem odměrné baňky 20 ml,  
 $m$ .....hmotnost suchého vzorku před mineralizací v g,  
 $c_f$ .....konečná koncentrace v  $\mu\text{g/g}$ .

Koncentrace Mg je vyjádřena v %. Bylo tedy nutné převést výsledky vyjádřené v mg/l na procenta:

$$\frac{(c_i \cdot zř - c_0 \cdot zř_0) \cdot v_{20} \cdot 100}{m} = c_f,$$

kde

$c_i$ .....přístrojem naměřená koncentrace v mg/l,  
 $zř$ .....zředění analytu před daným měřením,  
 $c_0$ .....přístrojem naměřená koncentrace slepého vzorku v mg/l,  
 $zř_0$ .....zředění slepého vzorku před měřením,  
 $v_{20}$ .....objem odměrné baňky 20 ml,  
 $m$ .....hmotnost suchého vzorku před mineralizací v g,  
 $c_f$ .....konečná koncentrace v %.

Pro zřetelnější porovnání obsahu kovů jsem vypracovala tabulky č. 4 – 10. Každá z těchto tabulek uvádí průměrné hodnoty odhad směrodatné odchylky obsahu analyzovaného kovu v drogách. Hodnoty jsou u každé drogy seřazeny podle země původu.

### 7.1.1. Chrom

Tabulka č. 4: Koncentrace chromu ( $\mu\text{g/g}$ ) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Cr ( $\mu\text{g/g}$ )					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	2,33	0,13	0,89	0,35	0,95	0,11
Matricariae flos	6,40	1,63	0,09	0,08	0,21	0,04
Urticeae herba	13,88	2,10	0,11	0,11	0,31	0,09
Menthae piperitae folium	7,09	0,39	0,04	0,00	0,50	0,02
Foeniculi amari fructus	0,85	0,12	0,05	0,05	0,10	0,06
Tiliae flos	1,83	0,25	0,06	0,05	0,18	0,09
Hyperici herba	0,01	0,01	5,08	7,17	0,35	0,17
Filipendulae ulmariae herba	0,07	0,08	1,53	1,92	0,20	0,06

### 7.1.2. Zinek

Tabulka č. 5: Koncentrace zinku ( $\mu\text{g/g}$ ) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Zn ( $\mu\text{g/g}$ )					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	71,22	13,54	41,35	2,51	30,68	37,51
Matricariae flos	96,69	22,95	57,22	22,99	19,27	0,64
Urticeae herba	56,03	22,98	39,59	5,99	29,24	5,96
Menthae piperitae folium	69,28	12,47	29,15	5,99	41,94	4,93
Foeniculi amari fructus	43,73	4,76	31,05	5,17	33,00	3,03
Tiliae flos	40,76	5,28	25,73	4,05	30,17	0,73
Hyperici herba	25,01	5,39	31,55	4,82	40,60	12,20
Filipendulae ulmariae herba	24,64	0,85	35,34	3,08	71,40	15,82

### 7.1.3. Železo

Tabulka č. 6: Koncentrace železa ( $\mu\text{g/g}$ ) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Fe ( $\mu\text{g/g}$ )					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	447,54	116,06	672,72	100,38	506,56	459,18
Matricariae flos	1736,02	129,91	161,85	39,32	123,92	45,36
Urticeae herba	1769,84	192,60	208,28	35,45	337,74	76,23
Menthae piperitae folium	2244,48	222,51	194,74	49,46	360,49	182,45
Foeniculi amari fructus	133,04	35,67	74,30	5,67	355,70	384,97
Tiliae flos	488,46	139,12	117,25	30,02	155,08	74,02
Hyperici herba	83,79	25,05	141,65	27,82	151,95	11,98
Filipendulae ulmariae herba	136,36	10,51	103,23	27,34	119,42	49,84

### 7.1.4. Mangan

Tabulka č. 7: Koncentrace manganu ( $\mu\text{g/g}$ ) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Mn ( $\mu\text{g/g}$ )					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	23,70	6,94	36,34	2,98	67,15	11,84
Matricariae flos	72,57	4,89	31,10	31,10	73,25	7,01
Urticeae herba	45,68	5,24	87,18	5,16	86,70	11,01
Menthae piperitae folium	83,61	4,86	71,58	2,84	207,59	17,10
Foeniculi amari fructus	19,94	4,00	42,32	2,94	46,39	11,86
Tiliae flos	90,83	4,24	23,71	3,28	96,90	11,72
Hyperici herba	82,69	3,28	127,49	11,94	106,04	10,55
Filipendulae ulmariae herba	76,09	15,58	118,16	3,49	78,69	10,04

### 7.1.5. Nikl

Tabulka č. 8: Koncentrace niklu ( $\mu\text{g/g}$ ) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Ni ( $\mu\text{g/g}$ )					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	2,28	0,39	0,87	0,10	1,16	0,05
Matricariae flos	2,48	0,65	1,48	0,03	0,72	0,06
Urticeae herba	5,41	0,63	0,80	0,18	0,73	0,05
Menthae piperitae folium	3,11	0,41	0,52	0,04	1,09	0,05
Foeniculi amari fructus	1,36	0,02	1,21	0,03	0,82	0,14
Tiliae flos	1,42	0,30	0,13	0,00	0,41	0,03
Hyperici herba	1,46	0,01	3,34	0,03	0,49	0,07
Filipendulae ulmariae herba	0,16	0,03	2,97	0,11	2,06	0,27

### 7.1.6. Měď

Tabulka č. 9: Koncentrace mědi ( $\mu\text{g/g}$ ) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Cu ( $\mu\text{g/g}$ )					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	7,83	0,76	5,76	1,28	4,93	0,21
Matricariae flos	10,09	1,57	3,35	0,33	7,96	0,78
Urticeae herba	7,58	1,51	3,78	0,29	5,08	0,07
Menthae piperitae folium	9,02	0,96	4,60	2,06	7,13	0,22
Foeniculi amari fructus	8,44	0,55	3,04	2,98	35,50	2,07
Tiliae flos	6,16	1,34	2,10	0,69	5,62	0,16
Hyperici herba	1,71	0,55	1,69	0,66	4,95	0,20
Filipendulae ulmariae herba	1,47	0,49	2,09	0,41	7,22	1,16

### 7.1.7. Hořčík

Tabulka č. 10: Koncentrace hořčíku (mg/g) a odhad směrodatné odchylky (%) v drogách – podle země původu.

Název drogy	Mg (mg/g)					
	FR (p=5)		CZ (p=2)		PL (p=3)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Melissae folium	90,88	0,15	182,55	0,06	139,92	0,01
Matricariae flos	46,96	0,16	76,38	0,06	58,83	0,00
Urticeae herba	111,25	0,02	110,60	0,04	146,80	0,00
Menthae piperitae folium	105,34	0,04	131,12	0,04	151,44	0,00
Foeniculi amari fructus	52,24	0,16	84,15	0,02	64,87	0,00
Tiliae flos	44,75	0,14	71,38	0,05	52,90	0,00
Hyperici herba	34,47	0,00	39,27	0,01	43,78	0,00
Filipendulae ulmariae herba	132,01	0,02	88,54	0,04	106,48	0,00

## **7.2. STATISTICKÁ ANALÝZA**

Cílem statistické analýzy bylo zjistit, zda existuje předpoklad rozlišení analyzovaných drog podle původu v závislosti na obsahu daného kovu. Ve druhé části analýzy jsem se zaměřila na vzájemné ovlivňování kovů mezi sebou, což znamenalo prokázat pravděpodobnost korelací mezi nimi. Na ty to analýzy jsem používala zejména statistické metody programu STATISTICA.

### **7.2.1. Distribuční analýza**

Abych získala co nejpřesnější statistické výsledky, musela jsem na začátku celé analýzy provést základní testy o charakteru rozdělení jednotlivých veličin v daném vzorku. Pokud z testů vyplývá „klasické“ Gaussovo rozdělení, mluvíme o rozdělení normálním, na které můžeme následně aplikovat parametrické metody. Pokud nám ovšem z prvních analýz vyloučí, že data v daném vzorku neodpovídají normálnímu rozdělení, použijeme k analýze metody neparametrické, které nejsou závislé na typu rozdělení, ze kterého byl náhodně vybrán vzorek.

#### **7.2.1.1. Normální graf (Normal probability plot)**

Test analyzuje každý kov zvlášť. Tabulka č. 15 (příloha) uvádí hodnoty, které byly použity pro tento test. Po jeho provedení lze ze získaných grafů rozpoznat, zda hodnoty leží na přímce a výsledkem je normální distribuce, nebo zda vytváří křivku a distribuce normální není.

Výsledné grafy jsou uvedeny v příloze (Graf č. 1 - 7). Body v grafech neleží na přímce, tvoří zahnutou křivku. Můžeme tedy říci, že normální rozdělení je nepravděpodobné.

### 7.2.1.2. Test Shapiro-Wilkův

Tento test slouží k určení rozdělení (distribuci) množiny analyzovaných prvků. Je limitován počtem množin (5 - 38). Počet námi sledovaných množin odpovídá počtu stanovovaných kovů, tudíž se rovná 35. Tomu odpovídá teoretická hodnota  $W_{\text{teor}}$ . Pro  $n = 8$  s faktorem pravděpodobnosti  $\alpha 5 \%$ , která je rovna 0,818 (tabulka č. 16 v příloze). (19) Nulová hypotéza předpokládá, že distribuce je normální. Pokud je  $W_{\text{calc}}$  větší než  $W_{\text{teor}}$ ,  $\alpha$  je větší než 0,05, nulová hypotéza je akceptovaná, distribuce je tedy normální. V případě, že  $W_{\text{calc}}$  bude menší než  $W_{\text{teor}}$ ,  $\alpha$  bude menší než 0,05, bude nulová hypotéza zamítnuta, neboť alternativní hypotéza ji odmítá a distribuce bude tedy nepravidelná.

K testu jsme opět použili tabulku č. 15 (příloha).

Výsledky analýzy uvádí tabulky č. 11, 12 a 13.

Tabulka č. 11: Výsledky analýzy Shapiro-Wilka (Francie).

	<b>Cr</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Mg</b>
<b><math>W_{\text{calc}}</math></b>	0,834	0,942	0,812	0,848	0,910	0,849	0,894
<b>Normalita</b>	ano	ano	ne	ano	ano	ano	ano

Tabulka č. 12: Výsledky analýzy Shapiro-Wilka (Česká republika).

	<b>Cr</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Mg</b>
<b><math>W_{\text{calc}}</math></b>	0,632	0,881	0,647	0,892	0,878	0,940	0,940
<b>Normalita</b>	ne	ano	ne	ano	ano	ano	ano

Tabulka č. 13: Výsledky analýzy Shapiro-Wilka (Polsko).

	<b>Cr</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Mg</b>
<b><math>W_{\text{calc}}</math></b>	0,807	0,829	0,858	0,781	0,855	0,518	0,848
<b>Normalita</b>	ne	ano	ano	ne	ano	ne	ano



Z tabulky č. 11, 12 a 13 vyplývá, že prvky, jejichž hodnota  $W_{calc.}$  je větší než  $W_{teor.}$ , mají distribuci normální. Výjimku tvoří prvky Fe (tab. č. 11), Cr, Fe (tab. č. 12) a Cr, Mn, Cu (tab. č. 13), kde se tedy předpokládá distribuce nepravidelná.

## **7.2.2. Neparametrické metody**

Další testy vycházejí ze závěrů distribuční analýzy, že výsledná distribuce prvků je nepravidelná.

### **7.2.2.1. Mann-Whitneyův test**

Jedná se opět o dvouvýběrový test sloužící k porovnání dvou množin prvků (pro  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $\alpha = 5\%$ ). V našem případě analýza porovnává obsah jednoho kovu mezi dvěma zeměmi.

Test byl proveden pomocí statistického programu dostupného online (20). Tabulky výsledků analýzy jsou uvedeny v příloze (tabulky č. 17 - 23).

Z tabulek výsledků lze vyvodit tyto závěry. Pro kovy Cr, Zn, Fe, Mn a Mg (tabulky č. 17 – 20, 23 uvedené v příloze) platí, že hodnoty nejsou statisticky rozdílné s faktorem pravděpodobnosti  $\alpha 5\%$ . Lze tedy vyvodit, že tyto kovy nejsou ukazatelem původu sledovaných rostlin.

Hodnoty v tabulce č. 21 srovnávající koncentrace niklu již ovšem ukazují o možném statistickém rozdílu mezi těmito hodnotami, tudíž je zde určitá možnost rozlišení původu drog pocházejících z Francie a Polska podle koncentrace Ni. Další sledované hodnoty Ni žádné statistické rozdíly neprokázaly.

V tabulce č. 22, jsou již hodnoty natolik statisticky rozdílné, že můžeme tvrdit, že podle obsahu mědi lze rozlišit drogy pocházející z Francie a České republiky a dále drogy pocházející z České republiky a Polska.

Tento test byl ještě jednou proveden pomocí programu STATISTICA. Jeho výsledky uvádí tabulka č. 24 (příloha). Vyznačené řádky ukazují statistické rozdíly. Tyto rozdíly byly zaznamenány ve srovnání koncentrací chromu (FR-PL), zinku (FR-CZ), manganu (FR-PL) a mědi (FR-CZ, CZ-PL).

Z obou analýz tedy vyplývá, že koncentrace mědi může být ukazatelem původu mezi drogami pocházejícími z Francie a České republiky a drogami pocházejícími z České republiky a Polska.

#### 7.2.2.2.Spearmanův test

Spearmanův test hodnotí vzájemné korelace či ovlivňování dvou vybraných množin prvků. V našem případě byly porovnávány koncentrace dvou kovů pro každou zemi zvlášť. K testu byly tudíž použity všechny hodnoty koncentrací tak, jak je uvádí tabulky č. 4 - 10 .

Tabulky výsledků Spearmanova testu (tabulky č. 25 – 27 v příloze) určují vzájemný vliv jednotlivých kovů mezi sebou. Hodnoty, které nulovou hypotézu potvrzují, a tedy umožňují konstatovat, že vzájemné vztahy mezi kovy existují, jsou vyznačeny.

Mezi kovy, které se ze statistického hlediska vzájemně ovlivňují, patří Cr-Zn, Cr-Fe, Ni-Cr, Zn-Cu, Fe-Ni pro koncentrace kovů drog pocházejících z Francie, dále korelace mezi kovy Fe-Cu, Cu-Mg z drog původem z České republiky a nakonec korelace mezi Cr-Cu z drog původem z Polska.

### **7.3. DISKUSE**

#### ***Problematické etapy stanovení***

V této rozsáhlé studii bylo analyzováno 8 rostlinných drog, v nichž bylo stanovováno 7 různých kovů. Každý analyzovaný vzorek drog je díky svému složení (anorganických a organických komponentů) rozdílný. Proto byla jedním z nejkritičtějších momentů celé analýzy právě příprava vzorků. Právě tato fáze je častým zdrojem systematických chyb, neboť na vzorek o neznámém složení často nestačí intuitivně aplikovat standardní postupy (mineralizace, ředění, stanovení...). Mokry rozklad je limitován vysokými vstupními hodnotami blanku, které pocházejí z reagensů a nádob. Ztráty vzorku pak mohou být zapříčiněny odpařením, absorpcí, transformací či precipitací, které mohou probíhat během jednotlivých kroků přípravy.

#### ***Hodnocení obsahu kovů***

Ze stanovení koncentrací kovů lze konstatovat pochybnosti o validitě výsledků naměřených koncentrací železa. Uvedené směrodatné odchylky jsou příliš vysoké na to, aby byly celkové výsledky považovány za relevantní.

Průměr nalezených hodnot koncentrací byl porovnán s limity uvedenými v literatuře. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14: Srovnání naměřených průměrných obsahů kovů a obsahů uváděných literárními zdroji (21)

kov	průměrná hodnota obsahu mg/kg			
	FR	CZ	PL	literatura (21)
Cr	4,06	0,98	0,35	0,3 - 1,0
Zn	53,42	36,37	37,04	25,0 - 60,0
Fe	879,94	209,25	263,86	neuvádí
Mn	61,89	67,23	95,34	30,0 - 90,0
Ni	2,21	1,41	0,94	0,5 - 2,0
Cu	6,54	3,30	9,80	5,0 - 11,0
Mg	77236,38	97997,61	95626,96	neuvádí

V tabulce zjišťujeme až čtyřikrát zvýšené hodnoty pro Cr (FR) a mírně zvýšené hodnoty Mn (PL) a Ni (FR). Zbývající naměřené hodnoty koncentrací spadají do intervalů uváděných limitních koncentrací.

Obsah kovů klesá v řadě Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni (pro kovy drog původem z Francie), řada kovů s klesajícím obsahem pro české a polské vzorky se shoduje: Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr. Pokud tuto řadu srovnáme s klesající řadou uvedenou Mgr. Míkovou (11) – Mn, Fe, Zn, Cu, Ni, Cr, docházíme téměř ke stejným závěrům, přestože se její práce zabývá biosférou na haldách po těžbě pyritových břidlic.

#### ***Porovnávání výsledků statistiky (korelace)***

Korelační statistické testy ukázaly na několik možných korelací. Shodné korelace byly potvrzeny korelačními testy u Zn-Cu, Cr-Fe, Cr-Ni, Fe-Ni (FR) a dále pak korelace mezi Cu-Mg (CZ). U analýzy vzorků původem z Polska korelace nalezeny byly, ovšem pro nízký statistický význam hodnot z nich konkrétní závěr vyvodit nelze.

## **8. ZÁVĚR**

Během vypracování diplomové práce bylo provedeno stanovení kovů Cr, Zn, Fe, Mn, Ni, Cu a Mg v sušených drogách pocházejících ze tří evropských zemí: Francie, České republiky a Polska metodou AAS. Výsledky byly zhodnoceny metodami statistické analýzy.

Z diplomové práce vyplývají následující závěry:

- Zjištěné koncentrace kovů se až na výjimky - Cr, Ni (FR) a Mn (PL) - pohybovaly v intervalu povolených koncentrací.
- Jediným nalezeným kovem, kterým bylo možné rozlišit drogy podle původu, byla měď, a to mezi vzorky pocházejícími z Francie a České republiky a mezi vzorky původem z České republiky a Polska.
- Mezi korelace potvrzené statistickými analýzami můžeme zařadit korelace nalezené mezi francouzskými vzorky (Zn-Cu a Cr-Fe, Cr-Ni, Fe-Ni) a mezi vzorky českými (Cu-Mg).
- Je nutné vzít na vědomí problém validity výsledků v souvislosti se systematickými chybami vyskytujícími se během přípravy a měření vzorku.

## **9. LITERATURA**

1. Jahodář, J.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2000.
2. Ražič, S. S., a kol.: Determination of metal content in some herbal drugs – Empirical and chemometric approach. *Talanta* 67, 233-239 (2005).
3. Busse, W.: The Significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Inf. J.* 34, 15-23 (2000).
4. Richter, R.: Význam biogenních prvků, Ústav agrochemie a zemědělství rostlin, MZLU v Brně. Dostupné z [http://www.af.mendelu.cz/external/relay/agrochem/multitexty/html/biogenni\\_prvky/A\\_obsah\\_biogen.htm](http://www.af.mendelu.cz/external/relay/agrochem/multitexty/html/biogenni_prvky/A_obsah_biogen.htm) (citováno 2. 4. 2007).
5. Ražič, S. S., a kol.: Inorganic analysis of herbal drugs. Part I. Metal determination in herbal drugs originating from medicinal plants of the family *Lamiaceae*. *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (11), 1347-1355 (2005).
6. Fargašová, A., Beinrohr, E.: Metal – Metal Interactions in Accumulation of  $V^{5+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{6+}$ , and  $Cu^{2+}$  in Under- and Above-Ground Parts of *Sinapis alba*. *Chemosphere*, Vol. 36, No. 6, 1305-1317 (1998).
7. Kumar, N., a kol.: Phytoextraction: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1232-1238 (1995).
8. Ražič, S. S., Đogo, S. M., Slavković, L. J.: Multivariate characterisation of herbal drugs and rhizosphere soil samples according to their metallic content. *Microchem. J.* 84, 93-101 (2006).
9. Steenkamp, V., Von Arb, M., Steward, M. J.: Metal concentrations in plants and urine from patients treated with traditional remedies. *Forensic Sci. Int.* 114, 89-95 (2000).
10. Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka, Grada Publishing, 1. vydání, 2001.
11. Míková, J.: Kyselá důlní vody a projevy v biosféře, dostupné z <http://www.natur.cuni.cz/ugmnz/> (citováno 30. 4. 2007)



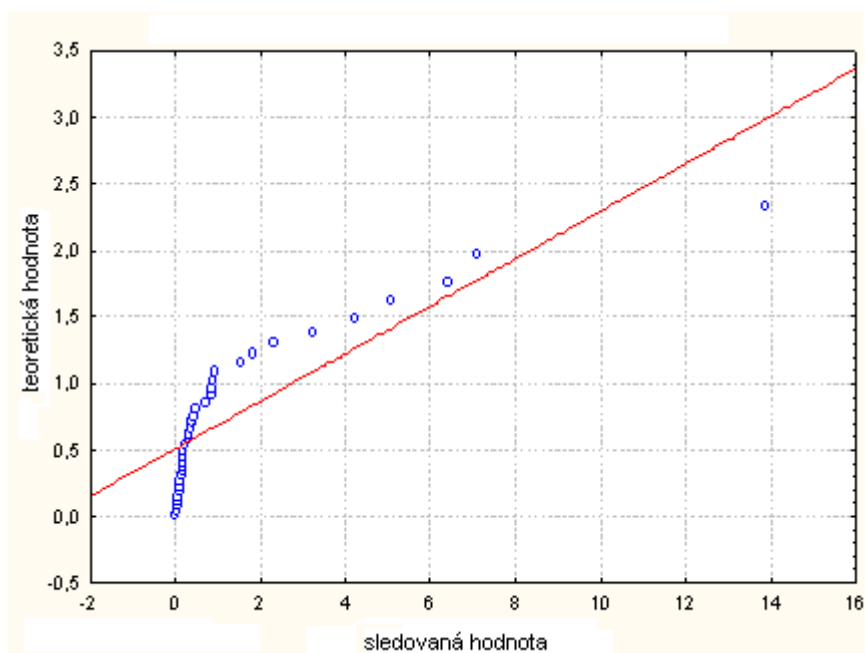
12. Holoubek, I.: Chemie životního prostředí IV. - Vybrané typy polutantů, Research Center for Environmental Chemistry and Ecotoxicology (RECETOX). Dostupné z <http://recetox.muni.cz/index.php?s=studium&f=download> (citováno 3. 4. 2007).
13. Szaková, J., Mader P.: Základní metody rozkladu nadzemních částí vyšších rostlin pro stanovení obsahu vybraných esenciálních prvků (Ca, K, Mg, P, B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo a Zn). Chem. Listy 98, 338-395 (2004).
14. Lavilla, I., Filgueiras, A. V., Bendicho, C.: Comparison of Digestion Methods for Determination of Trace and Minor Metals in Plant Samples. J. Agric. Food Chem. 47, 5072-5077 (1999).
15. Český lékopis 2002, 1. díl, Grada Publishing a. s., Praha, 2002
16. Komárek, J.: Atomová absorpční spektrometrie. MUNI Brno, 2000. Dostupné z [http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem\\_sekce/predmety/C7300/index.htm](http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/index.htm) (citováno 3. 4. 2007).
17. Jandera, P.: Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze. Univerzita Pardubice, 1.vyd., 1999.
18. Barek, J., Čabala, R., Rychlovský, P., Zima, J.: Elektrotermická atomizace v AAS. Dostupné z <http://www.natur.cuni.cz/~analchem/praktika.html> (citováno 3. 4. 2007)
19. Statistické tabulky, Kritické hodnoty Shapiro – Wilkova testu. Dostupné z <http://www.educnet.education.fr/rnchimie/math/benichon/tables/tshapiro/tshapiro.htm> (citováno 29. 4. 2007).
20. Test Mann – Whitney. Dostupné z <http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.cgi> (citováno 20. 2. 2007)
21. Podlešáková, E., Němeček, J.: Soubor kritérií hodnocení zátěží půd a zemědělských plodin persistentními kontaminanty. Dostupné z [http://stary.biom.cz/sborniky/sb97PrVana/sb97PrVana\\_podles.html](http://stary.biom.cz/sborniky/sb97PrVana/sb97PrVana_podles.html) (citováno dne 7. 5. 2007)

## **10.PŘÍLOHA**

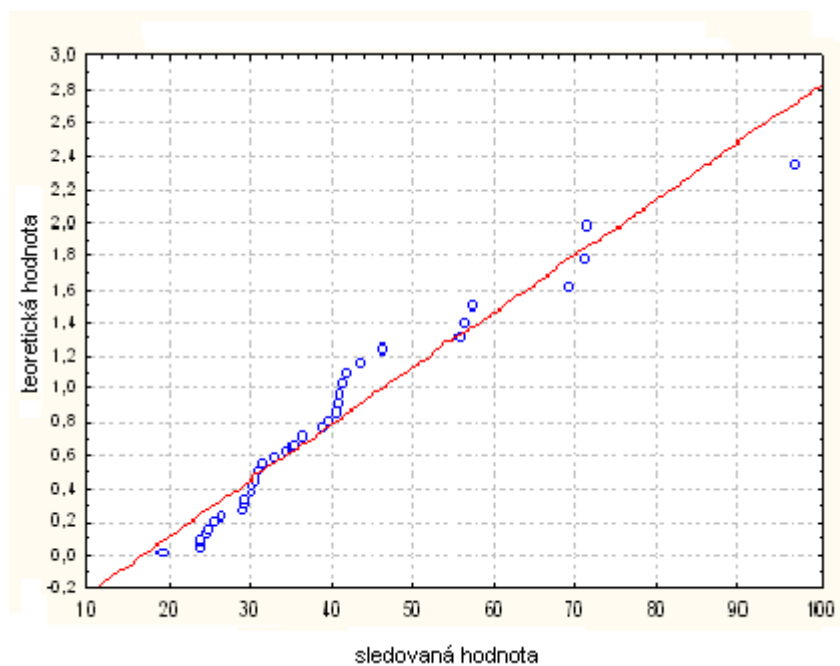
Tabulka č. 15: Hodnoty obsahu kovů bez rozdílu původu použité pro statistickou analýzu.

<b>Cr</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Mg</b>
3,25	34,60	604,96	36,50	1,95	6,42	36,50
2,33	71,22	447,54	23,70	2,28	7,83	23,70
6,40	96,69	1736,02	72,57	2,48	10,09	72,57
13,88	56,03	1769,84	45,68	5,41	7,58	45,68
7,09	69,28	2244,48	83,61	3,11	9,02	83,61
4,22	24,02	895,77	33,83	1,72	3,98	33,83
0,85	43,73	133,04	19,94	1,36	8,44	19,94
1,83	40,76	488,46	90,83	1,42	6,16	90,83
0,01	25,01	83,79	82,69	1,46	1,71	82,69
0,24	29,32	146,96	24,73	0,77	2,60	24,73
0,07	24,64	136,36	76,09	0,16	1,47	76,09
0,89	41,35	672,72	36,34	0,87	5,76	36,34
0,09	57,22	161,85	31,10	1,48	3,35	31,10
0,11	39,59	208,28	87,18	0,80	3,78	87,18
0,04	29,15	194,74	71,58	0,52	4,60	71,58
0,16	24,03	137,27	41,19	0,37	1,75	41,19
0,05	31,05	74,30	42,32	1,21	3,04	42,32
0,06	25,73	117,25	23,71	0,13	2,10	23,71
5,08	31,55	141,65	127,49	3,34	1,69	127,49
1,53	35,34	103,23	118,16	2,97	2,09	118,16
0,19	55,63	217,45	81,45	1,68	1,97	81,45
0,95	40,87	557,37	67,15	1,16	4,93	67,15
0,39	30,68	506,56	86,60	0,45	4,76	86,60
0,21	19,27	256,51	194,87	2,17	7,67	194,87
0,43	46,23	123,92	73,25	0,72	7,96	73,25
0,31	29,24	337,74	86,70	0,73	5,08	86,70
0,50	41,94	360,49	207,59	0,58	7,13	207,59
0,18	38,74	179,22	126,81	1,09	6,04	126,81
0,10	33,00	355,70	46,39	0,82	35,50	46,39
0,18	30,17	155,08	96,90	0,41	5,62	96,90
0,35	40,60	151,95	106,04	0,49	4,95	106,04
0,31	30,29	437,84	23,39	2,14	5,83	23,39
0,20	71,40	119,42	78,69	2,06	7,22	78,69
0,83	26,55	463,13	56,79	2,41	4,60	56,79
0,73	36,29	467,90	25,28	0,26	11,87	25,28

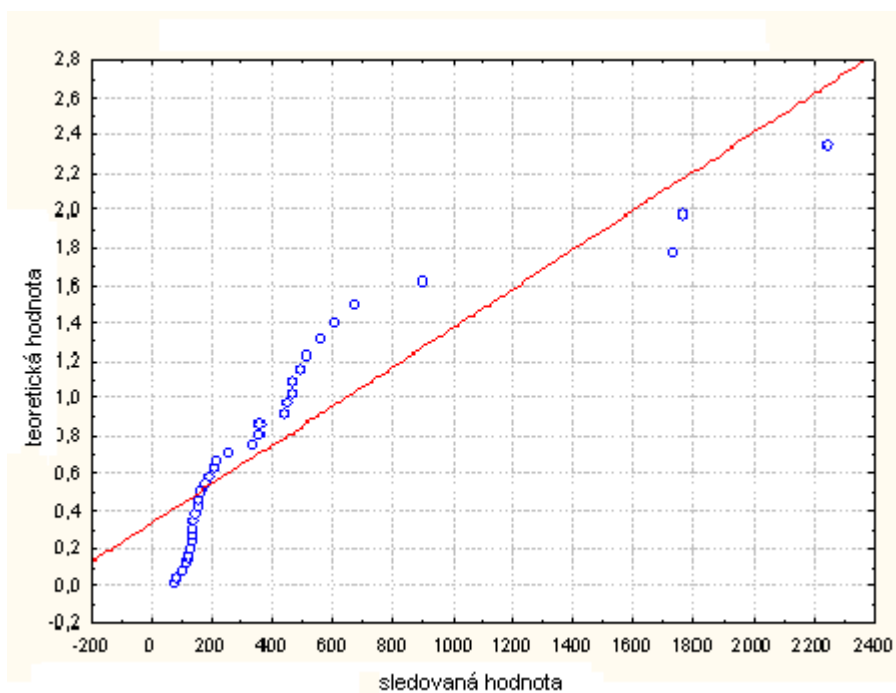
Graf č. 1: Normální graf hodnot Cr.



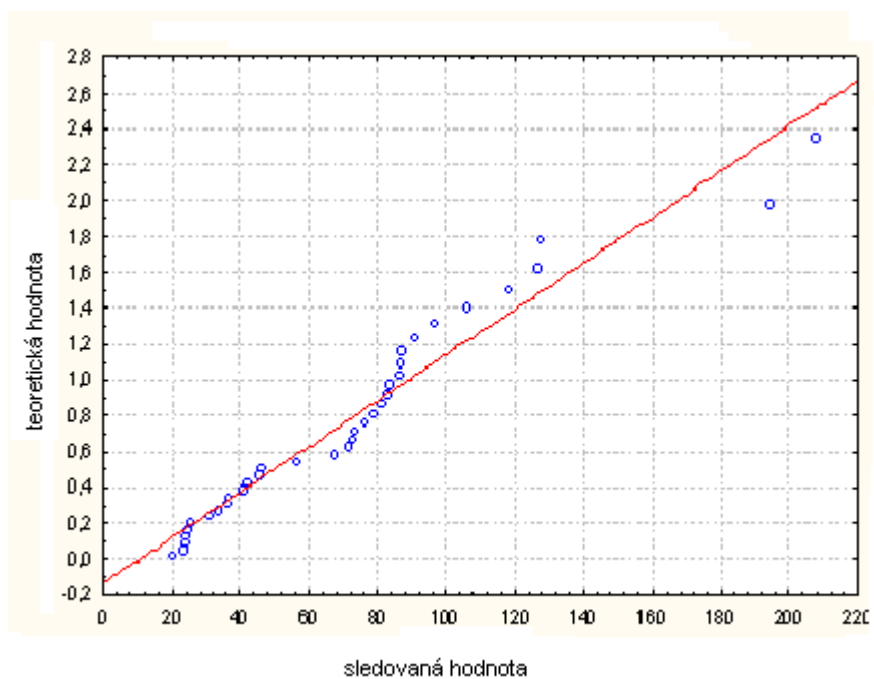
Graf č. 2: Normální graf hodnot Zn.



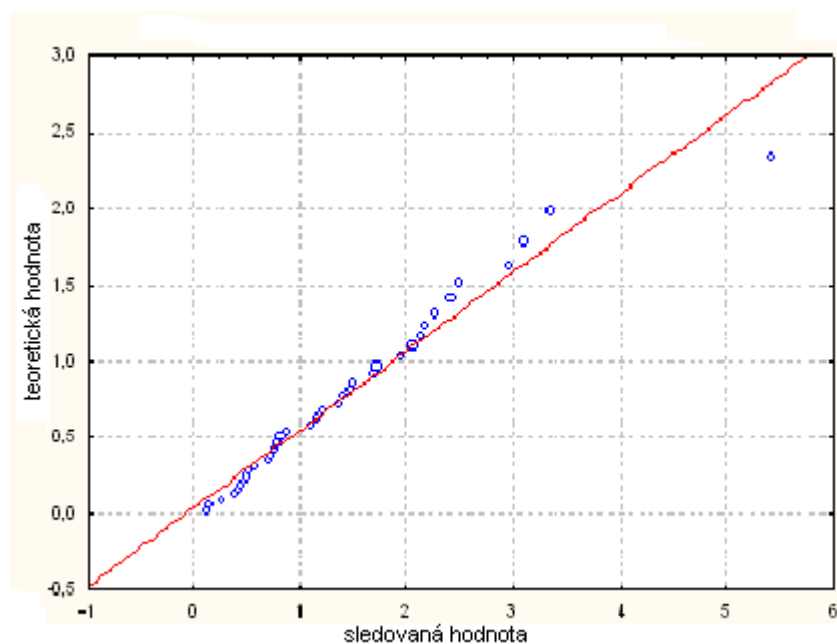
Graf č. 3: Normální graf hodnot Fe.



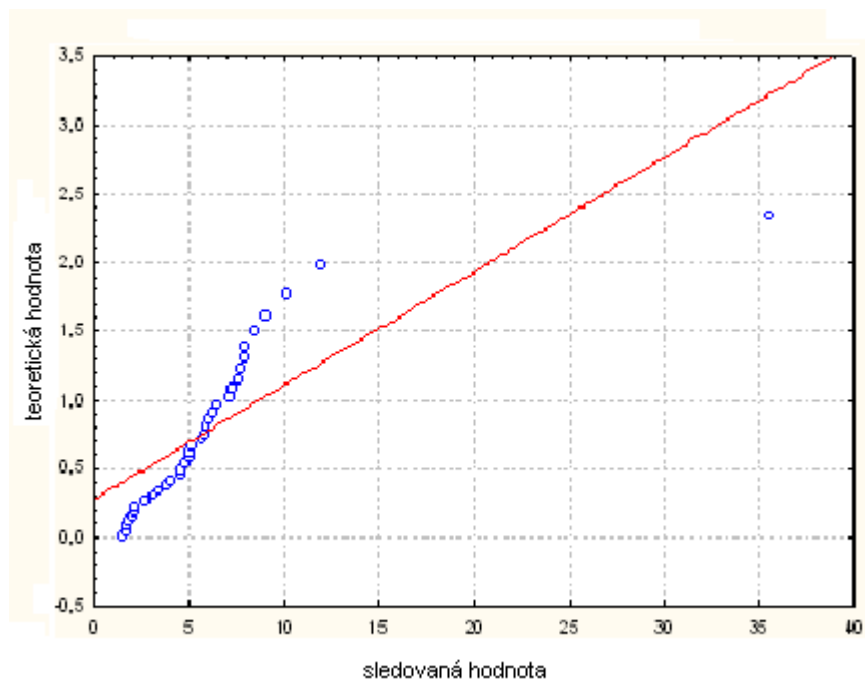
Graf č. 4: Normální graf hodnot Mn.



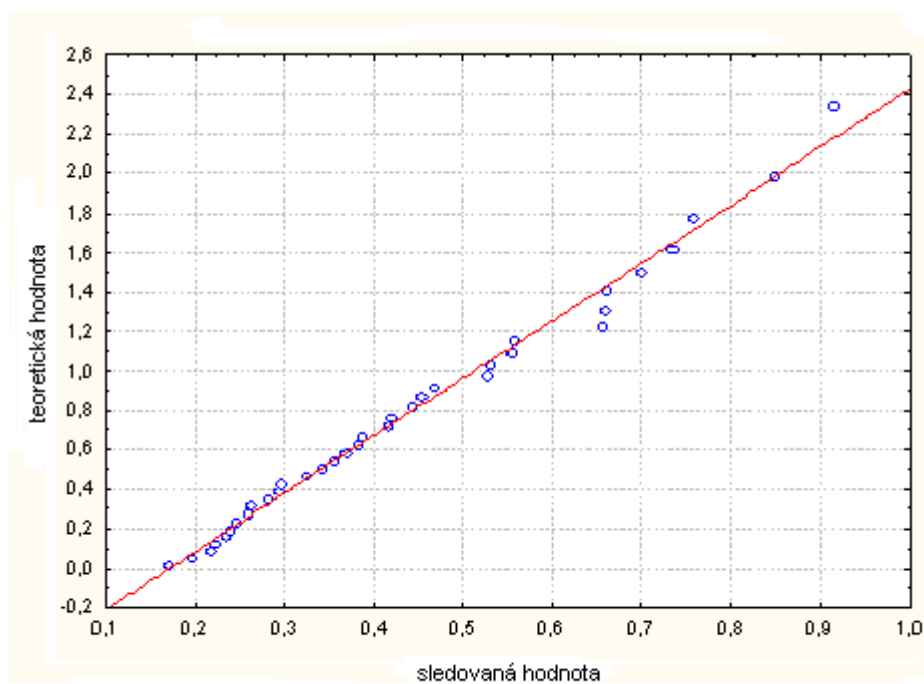
Graf č. 5: Normální graf hodnot Ni.



Graf č. 6: Normální graf hodnot Cu.



Graf č. 7: Normální graf hodnot Mg.



Tabulka č. 16: Tabulka kritických hodnot Shapiro-Wilkova testu. (19)

Table 4b : table des valeurs limites  $W_\alpha$  de  $W = \frac{b^2}{Z^2}$   
 pour les risques  $\alpha = 5 \%$  et  $1 \%$   
 (Biometrika 1965)

n	Risque 5 %	Risque 1 %
	$W_{0,05}$	$W_{0,01}$
5	0,762	0,686
6	0,788	0,713
7	0,803	0,730
8	0,818	0,749
9	0,829	0,764
10	0,842	0,781
11	0,850	0,792
12	0,859	0,805
13	0,866	0,814
14	0,874	0,825
15	0,881	0,835
16	0,887	0,844
17	0,892	0,851
18	0,897	0,858
19	0,901	0,863
20	0,905	0,868
21	0,908	0,873
22	0,911	0,878
23	0,914	0,881
24	0,916	0,884
25	0,918	0,888
26	0,920	0,891
27	0,923	0,894
28	0,924	0,896
29	0,926	0,898
30	0,927	0,900
31	0,929	0,902
32	0,930	0,904
33	0,931	0,906
34	0,933	0,908
35	0,934	0,910
36	0,935	0,912
37	0,936	0,914
38	0,938	0,916
39	0,939	0,917
40	0,940	0,919
41	0,941	0,920
42	0,942	0,922
43	0,943	0,923
44	0,944	0,924
45	0,945	0,926
46	0,945	0,927
47	0,946	0,928
48	0,947	0,929
49	0,947	0,929
50	0,947	0,930



Tabulka č. 17: Srovnání obsahu chromu (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
46	1,47	0,161	0,080
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
47	1,58	0,130	0,065
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
40	0,84	0,442	0,221

Tabulka č. 18: Srovnání obsahu zinku (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
44	1,26	0,234	0,117
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
44	1,26	0,234	0,117
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
33	0,11	0,959	0,480

Tabulka č. 19: Srovnání obsahu železa (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
45	1,36	0,194	0,097
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
42	1,05	0,328	0,164
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
42	1,05	0,328	0,164

Tabulka č. 20: Srovnání obsahu manganu (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
34	0,21	0,878	0,439
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
46	1,47	0,160	0,080
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
43	1,15	0,278	0,139

Tabulka č. 21: Srovnání obsahu niklu (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
43	1,15	0,278	0,139
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
53	2,21	0,028	0,014
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
41	1,15	0,382	0,191

Tabulka č. 22: Srovnání obsahu mědi (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
49	1,79	0,082	0,041
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
37	0,53	0,645	0,323
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
60	1,15	0,018	0,009

Tabulka č. 23: Srovnání obsahu hořčíku (test Mann-Whitney)

FR-CZ			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
38	0,63	0,574	0,287
FR-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
43	1,16	0,278	0,139
CZ-PL			
U	z	P( two tailed)	P (one tailed)
34	0,21	0,878	0,439

Tabulka č. 24: Výsledky Mann-Whitneyova testu provedeného programem STATISTICA.

	Z	p
CrFR/CrCZ	1,400280	0,161430
CrFR/CrPL	2,100420	0,035693
CrCZ/CrPL	0,420084	0,674424
ZnFR/ZnCZ	2,100420	0,035693
ZnFR/ZnPL	1,120224	0,262619
ZnCZ/ZnPL	0,140028	0,888638
FeFR/FeCZ	1,680336	0,092893
FeFR/FePL	1,260252	0,207579
FeCZ/FePL	0,980196	0,326990
MnFR/MnCZ	0,700140	0,483840
MnFR/MnPL	2,520504	0,011719
MnCZ/MnPL	1,260252	0,207579
NiFR/NiCZ	0,840168	0,400815
NiFR/NiPL	1,680336	0,092893
NiCZ/NiPL	1,120224	0,262619
CuFR/CuCZ	2,240448	0,025063
CuFR/CuPL	0,420084	0,674424
CuCZ/CuPL	2,380476	0,017291
MgFR/MgCZ	1,400280	0,161430
MgFR/MgPL	1,820364	0,068704
MgCZ/MgPL	0,140028	0,888638

Tabulka č. 25: Spearmanův test korelací (Francie)

	Cr	Zn	Fe	Mn	Ni	Cu	Fe
Cr		<b>0,74</b>	<b>0,93</b>	-0,10	<b>0,86</b>	0,62	0,38
Zn	<b>0,74</b>		0,60	-0,33	0,69	<b>0,88</b>	0,00
Fe	<b>0,93</b>	0,60		0,24	<b>0,76</b>	0,52	0,38
Mn	-0,10	-0,33	0,24		0,00	-0,29	-0,26
Ni	<b>0,86</b>	0,69	<b>0,76</b>	0,00		0,52	0,12
Cu	0,62	<b>0,88</b>	0,52	-0,29	0,52		-0,07
Mg	0,38	0,00	0,38	-0,26	0,12	-0,07	

Tabulka č. 26: Spearmanův test korelací (Česká republika)

	Cr	Zn	Fe	Mn	Ni	Cu	Fe
Cr		0,48	0,10	0,55	0,69	-0,43	-0,19
Zn	0,48		0,48	0,02	0,45	0,31	0,26
Fe	0,10	0,48		-0,07	-0,31	<b>0,76</b>	0,60
Mn	0,55	0,02	-0,07		0,57	-0,38	0,00
Ni	0,69	0,45	-0,31	0,57		-0,55	-0,36
Cu	-0,43	0,31	<b>0,76</b>	-0,38	-0,55		<b>0,83</b>
Mg	-0,19	0,26	0,60	0,00	-0,36	<b>0,83</b>	

Tabulka č. 27: Spearmanův test korelací (Polsko)

	Cr	Zn	Fe	Mn	Ni	Cu	Mg
Cr		0,10	0,45	0,33	0,26	<b>-0,71</b>	0,43
Zn	0,10		-0,02	0,29	0,55	0,05	0,17
Fe	0,45	-0,02		-0,10	0,24	-0,33	0,55
Mn	0,33	0,29	-0,10		-0,33	-0,33	0,02
Ni	0,26	0,55	0,24	-0,33		0,10	0,69
Cu	<b>-0,71</b>	0,05	-0,33	-0,33	0,10		-0,05
Mg	0,43	0,17	0,55	0,02	0,69	-0,05	