

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Terezie Zášková

STANOVENÍ OLOVA A KADMIA V EXTRAKTECH OVOCE A  
ZELENINY POMOCÍ ATOMOVÉ ABSORPČNÍ  
SPEKTROMETRIE

Determination of lead and cadmium in fruits and vegetables extracts  
by atomic absorption spectrometry

Bakalářská práce

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

Praha 2020

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 30. května 2020.

Terezie Zášková

## Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Jakobovi Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracování této práce.

## **Abstrakt**

Náplní této bakalářské práce byla analýza extraktů ovoce a zeleniny. Ve vzorcích byl sledován obsah olova (ve formě olovnatých iontů) a kadmia (ve formě kademnatých iontů) pomocí atomové absorpční spektrometrie. Nejprve bylo nutné provést optimalizační studii a najít tak optimální podmínky metody a vybrat vhodný způsob atomizace vzorku. Bylo voleno mezi plamenovou a elektrotermickou atomizací. V rámci optimalizace byly pro atomizaci v plameni zkoumány tyto parametry: výška paprsku nad hranou hořáku, rychlost průtoku paliva, horizontální poloha hořáku, šířka spektrálního intervalu a velikost napájecího proudu výbojky. Optimalizační studie pro elektrotermickou atomizaci zahrnovala především vliv teploty pyrolýzy a atomizace na velikost signálu. Pro stanovení detekčních limitů použitých přístrojů byly použity standardní roztoky olova a kadmia. Meze detekce při atomizaci v plameni byly pro olovo, resp. kadmium 0,002 mg/l, resp. 0,003 mg/l. Při elektrotermické atomizaci byla mez detekce pro olovo, resp. kadmium 0,026 µg/l, resp. 0,029 µg/l.

Experimentálně zjištěné hodnoty byly statisticky zpracovány a obsah olova a kadmia byl porovnán s mezními hodnotami olova a kadmia, které může obsahovat vzorek ovoce a zeleniny podle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006. Experimentálně zjištěné hodnoty obsahu olova i kadmia ve všech vzorcích ovoce a zeleniny splňují maximální povolenou mez.

## **Klíčová slova**

Atomová absorpční spektrometrie, olovo, kadmium, plamenová atomizace, elektrotermická atomizace, extrakty, ovoce, zelenina.

## **Abstract**

The content of this thesis was to analyse fruit and vegetable extracts. In the samples, the concentration of lead and cadmium was determined by atomic absorption spectrometry. First, it was necessary to conduct an optimization study to find the optimal conditions of the method and select the appropriate method of atomization of the sample. It was chosen between flame and electrothermal atomization. For optimization, the following parameters were studied for atomization in flame: beam height above the burner, fuel flow rate, horizontal burner position, spectral interval width and lamp supply current. An optimization study for electrothermal atomization included the effect of atomization and pyrolysis temperature on signal size. Standard lead and cadmium solutions were used to determine the detection limits of the instruments used. The limit of detection in flame atomization was for lead respectively cadmium 0,002 mg/l, resp. 0,003 mg/l. In electrothermal atomization the detection limit was for lead, resp. cadmium 0,026 µg/l, resp. 0,029 µg/l.

The experimentally determined values were statistically processed and the lead and cadmium contents were compared with the lead and cadmium limit values that may be contained in a sample of fruit and vegetables according to Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19th December 2006. Experimentally determined lead and cadmium levels in all fruit and vegetable samples comply with the maximum permitted level.

## **Key words**

Atomic absorption spectrometry, lead, cadmium, flame atomization, electrothermal atomization, extracts, fruit, vegetable.

# Obsah práce

1	ÚVOD .....	- 8 -
1.1	Cíl bakalářské práce .....	- 8 -
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	- 9 -
2.1	Olovo .....	- 9 -
2.1.1	Charakteristika olova .....	- 9 -
2.1.2	Výskyt olova .....	- 9 -
2.1.3	Metody stanovení olova.....	- 11 -
2.2	Kadmium .....	- 12 -
2.2.1	Charakteristika kadmia .....	- 12 -
2.2.2	Výskyt kadmia .....	- 12 -
2.2.3	Metody stanovení kadmia .....	- 13 -
2.3	Atomová absorpční spektrometrie.....	- 14 -
2.3.1	Princip metody .....	- 14 -
2.3.2	Instrumentální uspořádání.....	- 15 -
2.4	Stanovení olova a kadmia metodou F-AAS .....	- 20 -
2.5	Stanovení olova a kadmia metodou ET-AAS .....	- 21 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	- 22 -
3.1	Používané přístroje a pracovní parametry .....	- 22 -
3.2	Používané chemikálie .....	- 22 -
3.3	Charakteristika vzorků.....	- 22 -
3.4	Postup prací F-AAS.....	- 24 -
3.5	Postup prací ET-AAS .....	- 25 -
3.6	Statistické zpracování výsledků .....	- 26 -
4	VÝLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE .....	- 28 -
4.1	Metoda F-AAS .....	- 28 -
4.1.1	Optimalizace pracovních parametrů.....	- 28 -
4.1.2	Kalibrace metody a základní charakteristiky stanovení .....	- 33 -
4.2	Metoda ET-AAS.....	- 36 -
4.2.1	Optimalizace pracovních parametrů.....	- 36 -
4.2.2	Kalibrace metody a základní charakteristiky stanovení .....	- 38 -
4.2.3	Analýza vzorků ovocných šťáv .....	- 40 -
4.2.4	Vyhodnocení výsledků.....	- 40 -
4.3	Shrnutí výsledků .....	- 44 -
5	ZÁVĚR .....	- 45 -
6	POUŽITÁ LITERATURA .....	- 46 -

## Seznam uvedených zkratek a symbolů

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
EDL	Bezelektroodová výbojka
ET-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
HCL	Výbojka s dutou katodou
HG-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s generováním těkavých sloučenin
ICP	Indukčně vázané plasma
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MS	Hmotnostní spektrometrie
<i>c</i>	Koncentrace [mol/l]
<i>h</i>	Výška paprsku nad hranou hořáku [mm]
<i>I</i> <sub>napájecí</sub>	Napájecí proud výbojky [mA]
<i>l</i>	Vzdálenost hořáku od krajní polohy [mm]
Me	Medián
<i>O</i>	Opakovatelnost
<i>Q</i> <sub>v</sub>	Průtoková rychlost paliva [l/min]
<i>s</i>	Směrodatná odchylka
<i>s</i> <sub>r</sub>	Relativní směrodatná odchylka
<i>T</i>	Teplota [°C]

# 1 ÚVOD

V poskytnutých 36 vzorcích vodných extraktů ovoce a zeleniny byl stanoven obsah olova a kadmia. Tyto kovy byly zvoleny kvůli jejich toxikologickému významu. Pro stanovení vybraných kovů ve vzorcích byla zvolena analytická metoda zvaná atomová absorpční spektrometrie. Rozhodováno bylo mezi plamenovou a elektrotermickou atomizací.

Ovoce, zelenina a výrobky z nich jsou velmi prospěšné díky velkému obsahu vitamínů a minerálů. Odborníci na výživu doporučují konzumaci několika porcí ovoce a zeleniny denně. V důsledku znečištění půdy, ovzduší a vody dochází ale i ke kontaminaci potravin.

Přibližně 30 prvků je považováno za zásadní pro život. Některé jsou vyžadovány ve větších koncentracích, další se vyskytují ve stopovém množství. Pak ale existují i kovy jejichž přítomnost i v nízkých koncentracích vyvolává škodlivé účinky.

Vyšší koncentrace těžkých kovů v potravě představují vážné riziko pro člověka zejména pro děti. Nebezpečí hrozící dětem je větší, neboť jejich strava není tak pestrá a také vzhledem k jejich hmotnosti je citlivost na některé kovy větší než u dospělých. Aby se zajistila bezpečnost potravin, je nutno provádět jejich kontrolu.

## 1.1 Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo stanovení koncentrace olova a kadmia v poskytnutých 36 vzorcích vodných extraktů ovoce a zeleniny pomocí atomové absorpční spektrometrie technikou plamenové nebo elektrotermické atomizace. Aby bylo dosaženo tohoto cíle práce, bylo nutné pro oba prvky provést následující:

- optimalizaci pracovních parametrů pro plamenovou atomizaci (výška paprsku nad hranou hořáku a jeho horizontální poloha, velikost napájecího proudu výbojky, průtoková rychlost acetylenu a šířka spektrálního intervalu)
- optimalizaci pracovních parametrů pro elektrotermickou atomizaci (teplota pyrolýzy a atomizace)
- stanovení základních charakteristik pomocí kalibračních roztoků
- stanovení obsahu olova a kadmia v poskytnutých vzorcích vhodnou technikou.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Olovo

#### 2.1.1 Charakteristika olova

Olovo (lat. Plumbum) řadíme do 14. skupiny periodické tabulky společně s uhlíkem, křemíkem, germaniem a cínem. Chemická značka olova je Pb, protonové číslo 82 a relativní atomová hmotnost 207,2. I přesto, že jeho oxidy jsou amfoterní, vykazuje kovový charakter. Jedná se o kov nízkotavitelný, měkký a toxický. Ve sloučeninách se nachází v oxidačním stavu  $\text{Pb}^{\text{II}+}$  a  $\text{Pb}^{\text{IV}+}$  (cit.<sup>1</sup>).

V přírodě se elementární olovo vyskytuje jen zřídka<sup>1</sup>. Olovo se získává převážně z olověné rudy<sup>2</sup>. Nejznámější rudy olova jsou galenit ( $\text{PbS}$ ), anglesit ( $\text{PbSO}_4$ ) a cerusit ( $\text{PbCO}_3$ )<sup>1</sup>. Olověná ruda se namele a flotací se oddělí část s vysokým obsahem kovu. Poté se ruda praží s omezeným přístupem vzduchu za vzniku  $\text{PbO}$ . Ten se poté smíchá s koksem a olovo se oddělí žárovou redukcí uhlíkem. Ze získaného olova se ještě musí odstranit nežádoucí kovové nečistoty, především Cu, Ag, Au, Zn, Sn, As a Sb<sup>2</sup>.

Užívání olova sahá až do starověku. V Egyptě olovo využívali při výrobě keramiky, v Římě pro vodovodní potrubí<sup>2</sup>. Dnes je využití olova vzhledem k jeho toxicitě omezené. Využívá se na výrobu akumulátorů, jako ochrana proti rentgenovému záření a záření gama, na výrobu pigmentů ( $\text{PbO}_4$ ) či výrobu olověných baterií a olovnatého křišťálu<sup>1</sup>.

#### 2.1.2 Výskyt olova

##### Olovo v lidském organismu

Olovo je nejčastěji se vyskytujícím těžkým prvkem, neboť jeho izotopy jsou konečným produktem rozpadu radioaktivních prvků<sup>2</sup>. Je známa celá řada krystalických solí, ale kromě  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  a  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  je většina málo rozpustná či nerozpustná ve vodě<sup>3</sup>. Otravy olovem jsou známy při těžbě rud, výrobě akumulátorů, v metalurgii nebo z vodovodního potrubí či z nádob, jejichž glazura obsahovala suřík ( $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ). Akutní otrava se dnes vyskytuje jen vzácně. Mezi projevy akutní otravy patří nasládlá chuť v ústech, zvracení a křečovitá bolest žaludku, slinění a nauzea<sup>4</sup>.

Chronické otravy jsou hojnější. Vyznačují se olověným lemem dásní (modrošedé až černé barvy), slabostí, snížením tělesné hmotnosti, psychickými změnami a u dětí převážně retardací. Dalším znakem je popelavé zbarvení kůže. Smrtelné dávky pro člověka se u sloučenin jako jsou oxidy olova ( $\text{PbO}_2$ ,  $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ) a soli olovnaté a olovičité pohybují v desítkách gramů. Problematickou sloučeninou je tetraethylolovo, dříve využívané jako antidetonátor do benzínu, které snadno prochází kůží. Otrava se projevuje nespavostí, nechutenstvím, bolestí hlavy. Člověk se velmi rychle unaví, zpomalí se srdeční činnost a poklesne mu tělesná teplota<sup>4</sup>.

Denní příjem olova člověkem je 230 – 350  $\mu\text{g}$  vodou a potravinami a 90  $\mu\text{g}$  z ovzduší. Příjem olova vyšší než 0,5 mg za den je chronická otrava. U dospělého člověka je absorpce olova 6 – 10 % po požití a inhalací 30 – 50 %. Mezi potraviny s vysokým obsahem olova patří ryby, vejce, čaj, ústřice a obiloviny<sup>5</sup>.

Sloučeniny olova jsou absorbovány dýchacím a gastrointestinálním traktem. Některé hydrofobní organické sloučeniny jako tetraethylolovo mohou být absorbovány i kůží<sup>6</sup>. Olovo má vliv na cévy, krev a nervový systém<sup>4</sup>. V krevním oběhu se 90 % olova váže na červené krvinky<sup>5, 6</sup>. Olovo tak ovlivňuje všechny části syntézy hemu a porfyrinů. Kromě toho inhibuje některé enzymy jako například ATPázu, kyselou fosfatázu či acetylcholinesterázu<sup>2</sup>. Ukládá se v kostech ve formě fosforečnanu olovnatého<sup>4</sup>. Může se ale také hromadit v měkkých tkáních zejména játrech, ledvinách a mozku. Olovo má zvláštní afinitu k hematoencefalické bariéře<sup>6</sup>. V krvi je biologický poločas olova 20 dnů, v kostech 10 – 20 let<sup>5</sup>. Sloučeniny olova se mohou uvolňovat zpět do krevního oběhu prostřednictvím procesů jako remodelace kostí. Mobilizaci olova z kostí stimuluje hormonální změny vyvolané těhotenstvím a laktací<sup>6</sup>. Otravy olovem se léčí komplexací olova prostřednictvím silného chelatačního činidla např. EDTA<sup>2</sup>.

### **Olovo v rostlinách**

Zdrojem kontaminace životního prostředí olovem jsou úpravny rud, rafinerie, pigmenty do barev, hnojiva a insekticidy či spalování fosilních paliv. Díky zavedení bezolovnatého benzínu poklesl obsah sloučenin tetraethyl- a tetramethyl- olova<sup>5</sup>.

Olovo se do rostlin dostává především z atmosféry a adsorbuje se do epikutikulárních lipidů na vnější straně listů. V půdě je průměrně 5 – 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  olova. V rostlinách se kumuluje zejména v kořenech, obsah olova v nadzemních částech rostlin je nízký. Vstupu olova do rostlin brání meristémová zóna kořenové špičky a kořenová čepička<sup>5</sup>.

### **2.1.3 Metody stanovení olova**

#### **Kolorimetrie**

Kolorimetrie je metoda, při které se srovnává zbarvení stanovované látky se zbarvením standardu o známé koncentraci<sup>7</sup>. Malé množství olova lze stanovit kolorimetricky, kdy se hnědé zbarvení PbS porovnává se zbarvením standardního roztoku<sup>8</sup>.

#### **Gravimetrie**

Při gravimetrickém stanovení se analyzovaný iont vyloučí ve formě sraženiny (málo rozpustné sloučeniny), která se převede do vážitelné formy, a to sušením či žiháním do konstantní hmotnosti<sup>9</sup>. Olovo lze srážet jako síran, chroman, popř. šťavelan. Nejvíce se využívá stanovení olova ve formě síranu. Ten se však nevylučuje kvantitativně, protože síran olovnatý má poměrně velkou rozpustnost<sup>8,9</sup>. Rozpustnost PbSO<sub>4</sub> lze snížit přidávkem alkoholu<sup>8</sup>. Olovnaté ionty se ve formě síranu nejčastěji analyzují odkouřením vzorku s konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>9</sup>.

Elektrogravimetricky lze olovo stanovit ve formě oxidu olovičitého, který se vyloučí na platinové síťkové anodě. Elektroda se poté vysuší a zváží<sup>8</sup>.

#### **Volumetrie**

Odměrná analýza je stanovení analytu založené na měření objemu odměrného roztoku potřebného k reakci stanovované látky, když známe přesnou koncentraci titračního činidla<sup>10</sup>.

Vhodnou odměrnou metodou pro stanovení olovnatých iontů je metoda chromanová, při které se olovo vysráží ve formě chromanu olovnatého, sraženina se rozpustí v HCl, přidá se jodid draselný a uvolněný jod se titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného<sup>8</sup>.

Olovo lze také stanovit titrací roztoku octanu olovnatého odměrným roztokem molybdenanu amonného nebo titrací roztoku olovnaté soli odměrným roztokem kyanoželeznatanu draselného<sup>8</sup>.

#### **Elektrochemické metody**

Z elektrochemických metod se pro stanovení olova využívá voltametrie, při které sledujeme závislost proudu, který prochází elektrochemickým článkem složeným z polarizovatelné pracovní a nepolarizovatelné referentní elektrody na potenciálu pracovní elektrody. Lze také využít polarografii, která využívá rtuťovou kapkovou elektrodu<sup>11, 12</sup>.

## Optické metody

Z optických metod lze pro stanovení olova využít například atomovou absorpční spektrometrii, která je popsána v kap. 2.3.

## 2.2 Kadmium

### 2.2.1 Charakteristika kadmia

Kadmium (lat. Cadmium) je chemickým prvkem 12. skupiny periodického systému společně se zinkem, rtuť a koperniciem<sup>1</sup>. Kadmium objevil F. Stromeyer z Gothingenu v roce 1817<sup>2</sup>. Chemická značka kadmia je Cd, protonové číslo 48 a relativní atomová hmotnost 112,411. Kadmium je kov řazený mezi přechodné prvky. Vyskytuje se v oxidačním stavu  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Cd}^+$  (tyto sloučeniny jsou však nestálé). Kadmium se rozpouští v oxidujících i neoxidujících kyselinách. Na vzduchu kadmium pomalu oxiduje a pokrývá se vrstvou  $\text{CdO}^1$ . V zemské kůře je asi 0,16 ppm kadmia<sup>2</sup>. Vyskytuje se v rudách zinku a olova. Sulfid kademnatý se využívá k výrobě pigmentů (kadmiová žluť)<sup>1</sup>. Při tavení kadmia vzniká oxid kademnatý, jehož působení vyvolá tzv. horečku slévačů<sup>5</sup>. Oxid kademnatý může být v závislosti na své tepelné historii zelenožlutý, hnědý, červený nebo až černý<sup>2</sup>.

Komerčně se kadmium používá při výrobě televizních obrazovek, laserů, baterií, barevných pigmentů nebo jako bariéra při jaderném štěpení<sup>13</sup>.

### 2.2.2 Výskyt kadmia

#### Kadmium v lidském organismu

Kadmium patří mezi vysoce toxické kovy<sup>4</sup>. Potravou člověk přijme 0,03 – 0,06  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  kadmia denně<sup>5</sup>. Vazbou na sulfanylové skupiny a kompeticí s některými biogenními prvky jako železo, měď a hlavně zinek, inhibuje mnoho enzymů. Ovlivňuje také metabolismus sacharidů. Toxicita kadmia je závislá na cestě vstupu do organismu. Požití kadmia vyvolává zvracení, a tak se absorbuje jen malý podíl dávky. Smrtelná dávka se v takovém případě pohybuje mezi 0,3 – 8,9 g. Při inhalaci prachu nebo dýmu je smrtelná koncentrace 40 – 50  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$  při expozici 1 hodinu nebo 9  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$  pro expozici trvající 5 hodin<sup>4</sup>. Po dlouhodobé inhalaci se v plicích absorbuje až 40 % kadmia<sup>5</sup>.

Po absorpci je kadmium transportováno po celém těle, obvykle vázáno na proteiny obsahující thiolovou skupinu jako je metalothionein<sup>13</sup>. Na buněčné úrovni pak ovlivňuje proliferaci, diferenciaci a způsobuje apoptózu<sup>14</sup>. Projevy otravy jako je dráždění dýchacích

cest, kašel, lapání po dechu a kovová chuť v ústech se projeví teprve po uplynutí latentní doby 0,5 – 10 hodin. Akutní otrava vyústí v edém plic a následuje smrt zástavou dechu. Při přežití otravy přetrvává poškození ledvin, jater a reprodukčních orgánů. Chronickým působením kadmia vzniká neplodnost, poškození plic, jater a kostí<sup>4</sup>. Kadmium patří mezi karcinogeny plic, prostaty a varlat<sup>4</sup>. Asi 30 % kadmia je uloženo v játrech, 30 % v ledvinách a zbytek různě po těle. Poločas vyloučení kadmia z těla je 25 let<sup>13</sup>.

Zdrojem kadmia jsou i potraviny, kam kadmium přechází z hnojiv. Přírodní fosfáty mohou totiž kromě vápenatých iontů obsahovat i ionty kademnaté. V Japonsku se tak lidé hromadně otrávilí kontaminovanou rýží<sup>4</sup>. Zdrojem kadmia je také cigaretový kouř<sup>5</sup>. Krev a ledviny kuřáků trvale vykazují vyšší hodnoty kadmia než u nekuřáků. Diabetici jsou náchylnější k tubulárnímu poškození ledvin vlivem expozice kadmia. Hledají se účinné antioxidační terapie a existuje in vitro důkaz, že selen a zinek mohou alespoň částečně antagonizovat toxické účinky kadmia. Pro odstranění kadmia z těla lze použít EDTA, DMPS a DMSA. Klinicky se využívá EDTA, ovšem existují obavy, že chelatace může poškodit ledvinové kanálky<sup>13</sup>.

### **Kadmium v rostlinách**

Znečištění životního prostředí kadmii pochází především z těžebního a hutního průmyslu, výroby nikl-kadmiových baterií, pigmentů a plastových stabilizátorů<sup>14</sup>.

V rostlinách kadmium působí na proces fotosyntézy a to inhibicí fotofosforylace a aktivit fotosystémů. Příjem kadmia rostlinami je především z půdy. Kadmium proniká do rostlinných pletiv z povrchu listů<sup>5</sup>.

### **2.2.3 Metody stanovení kadmia**

#### **Gravimetrie**

Kadmium se stanovuje vážením ve formě síranu. Je však velmi složité odstranit veškerou kyselinu sírovou a je tedy nutné provádět opakované žihání<sup>8</sup>. Další možností je stanovení kadmia srážením ve formě fosforečnanu<sup>10</sup>. Poměrně přesné je elektrogravimetrické stanovení kadmia ve slabě zásaditém roztoku<sup>8</sup>.

## **Volumetrie**

Odměrné stanovení se využívá pro větší množství kadmia ve vzorku. Nejčastěji se provádí chelatometrickou titrací. Další možností odměrného stanovení kadmia je nepřímá manganometrie, kdy se kadmium vyloučí ve formě nerozpustného šťavelanu, ten se rozloží kyselinou sírovou a vzniklá kyselina šťavelová se titruje odměrným roztokem manganistanu<sup>7</sup>.

## **Elektrochemické metody**

Stanovení kadmia v koncentracích  $10^0$  až  $10^{-7}$  mol/l lze provést pomocí potenciometrie s iontově selektivní elektrodou<sup>7</sup>. Iontově selektivní elektroda je v tomto případě vyrobena z CdSe+Ag<sub>2</sub>S. Potenciometrie využívá měření rovnovážného napětí elektrochemického článku, který je tvořen indikační a referentní elektrodou<sup>11</sup>.

## **Optické metody**

Pro stanovení malého množství kadmia se využívají metody atomové absorpční a emisní spektrometrie. Atomová absorpční spektrometrie je podrobně popsána v kap. 2.3.

## **2.3 Atomová absorpční spektrometrie**

Podle Kirchhoffa mohou atomy absorbovat takové záření, jaké samy vydávají. Ve slunečním spektru proto lze pozorovat tzv. Fraunhoferovy čáry, které jsou způsobeny pohlcením části záření atomy z plynného obalu slunce. Z toho vychází princip atomové absorpční spektrometrie (zkratka AAS)<sup>15</sup>.

### **2.3.1 Princip metody**

Vzájemným působením elektromagnetického záření a atomů se elektrony dostávají ze svých základních energetických hladin do excitovaných stavů tedy hladin s vyšší energií. Zde však dlouho nevydrží a vracejí se zpět na základní hladinu. Při deexcitaci dochází k vyzáření přebytečné energie ve formě elektromagnetického záření:

$$\Delta E = h \cdot \nu = E_2 - E_1 \quad (2.1)$$

kde hodnoty  $E_2$  a  $E_1$  vyjadřují energii excitované a původní energetické hladiny,  $\nu$  je frekvence a  $h$  je Planckova konstanta. V excitovaném stavu vydrží atomy asi  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  s. Malá část energie je vyzářena ve formě tzv. fluorescenčního záření, většina energie ale odchází při vzájemných srážkách<sup>16</sup>.

Atomová spektra jsou čarová. Poloha a intenzita čar je charakteristická pro každý prvek. Absorpční spektrum představuje grafickou závislost absorbance na vlnové délce. Oproti emisnímu spektru však obsahuje méně čar:

$$\text{počet absorpčních čar} = \sqrt{2 \cdot \text{počet emisních čar}} \quad (2.2)$$

Díky menšímu počtu čar nedochází k jejich překryvu a zvyšuje se tak selektivita metody AAS<sup>16</sup>.

Údajem pro kvantitativní analýzu je zeslabení intenzity čar, které se řídí Lambertovým-Beerovým zákonem<sup>16</sup>. Ten můžeme pro čarové spektrum vyjádřit vztahem:

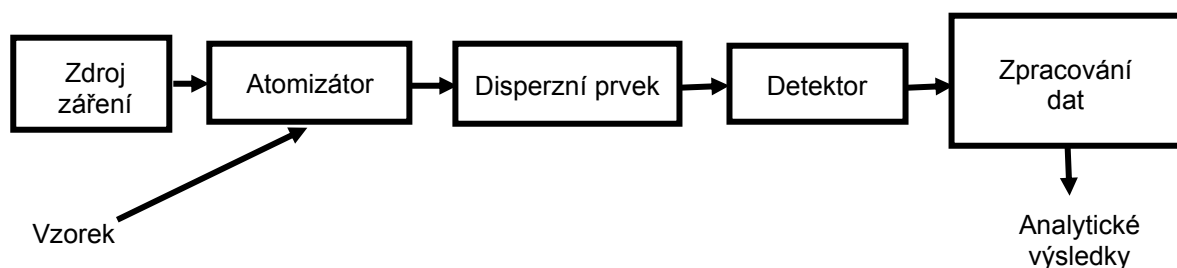
$$I = I_0 \cdot e^{-\chi n l} \quad (2.3)$$

kde  $I_0$  a  $I$  je intenzita čáry před a po absorpci,  $l$  je tloušťka absorbující vrstvy,  $\chi$  atomový absorpční koeficient a  $n$  počet volných atomů analyzovaného prvku v jednotce objemu<sup>15</sup>. Aby bylo možné AAS využít v praxi, musí platit, že čára emisní je užší než čára absorpční. Rozšíření emisních čar je způsobeno např. vysokým napájecím proudem lampy<sup>16</sup>.

Atomová absorpční spektrometrie tedy sleduje zeslabení paprsku průchodem absorpčním prostředím<sup>15</sup>.

### 2.3.2 Instrumentální uspořádání

Přístroje pro atomovou absorpční spektrometrii se podle uspořádání dělí na jednopaprskové a dvoupraprskové. Jednopaprskové měří zářivý tok paprsku prostupujícího plamenem. Dvoupraprskové uspořádání eliminuje chyby způsobené fluktuacemi primárního zdroje, neboť dochází k rozdělení paprsku na dva. Jeden prochází plamenem, druhý nikoliv a využívá se jako srovnávací<sup>15</sup>. Schéma atomového absorpčního spektrofotometru je znázorněno na Obr. 2.1.



Obr. 2.1 Základní schéma atomového absorpčního spektrometru.

Zdroj primárního záření emituje záření o určité vlnové délce, které prochází prostředím s volnými atomy analyzovaného prvku, kde dojde k jeho zeslabení. Zeslabené záření prochází disperzním systémem a dopadá na detektor.

## Zdroj primárního záření

Šířka atomové čáry je asi 0,001 nm, což nelze izolovat ani dokonalým monochromátorem. Proto se využívají zdroje záření produkující čarové spektrum prvku, který analyzujeme<sup>15</sup>. Nejčastěji používaným zdrojem primárního záření jsou výbojky vydávající čarová spektra<sup>16</sup>. Využívají se výbojky s dutou katodou (HCL z anglického Hollow Catode Lamp) a bezelektrodové výbojky (EDL z anglického Electrodeless Discharge Lamp). Výbojka s dutou katodou je evakuovaná skleněná baňka vyrobená z optického skla (pro oblast do 240 nm je materiálem optický křemen) s předním okénkem, kterým může procházet vzniklé záření a zatavenými elektrodami vyplněnými inertním plynem nejčastěji neonem či argonem o nízkém tlaku (100 – 200 Pa). Katoda je dutá a vyrábí se ze stejného prvku jako ten, co bude ve vzorku stanovován<sup>16, 17</sup>. Pro vzácné a drahé kovy se využívá nosič, což je váleček z hliníku nebo mědi, do kterého je vložena fólie z analyzovaného kovu<sup>17</sup>. Někdy může být vytvořena ze slitiny více kovů tzv. kombinovaná elektroda. Anoda je vyrobená z inertního kovu (wolframu nebo niklu). Mezi elektrody je vkládáno vysoké napětí (600 V a více) čímž dojde ke vzniku doutnavého výboje a ten vytvoří elektrony a ionty inertního plynu<sup>16</sup>. Pokud je napětí dostatečně velké, pak plynné kationty získají dostatečnou kinetickou energii, aby uvolnily některé kovové atomy z povrchu katody. Část těchto atomů je srážkami excitována a při návratu do základního stavu vydává své charakteristické záření. Atomy kovu nakonec difundují zpět k povrchu katody a jsou zde znovu uloženy<sup>18</sup>. Zářivý tok výbojky je vyjádřen vztahem:

$$\Phi = \alpha \cdot i^n \quad (2.4)$$

kde  $\alpha$  je konstanta,  $i$  je proud výbojky a  $n$  je charakteristická hodnota pro každý prvek.

Nevýhodou výbojky s dutou katodou je, že v důsledku Dopplerova jevu dochází s rostoucím proudem výbojky k růstu pološířky čáry<sup>16</sup>.

Druhým využívaným zdrojem primárního záření jsou bezelektrodové výbojky. Jejich zářivý tok je o jeden až dva řády větší než zářivý tok výbojky s dutou katodou a zároveň je zachována malá pološířka čáry<sup>17, 18</sup>. Bezelektrodová výbojka je vyrobená z utěsněné křemenné trubice naplněné inertním plynem obsahující malé množství kovu (nebo jeho soli), který stanovujeme. Lampa neobsahuje žádnou elektrodu, ale místo toho je napájena intenzivním polem vysokofrekvenčního nebo mikrovlnného záření. Ionizace argonu poskytuje ionty, které jsou urychlovány, dokud nezískají dostatečnou energii k excitaci atomů kovu<sup>18</sup>.



## Atomizátor

Nejdůležitějším rozdílem mezi atomovou a molekulovou spektrometrií je nutnost převedení analytu na volné atomy u atomové spektrometrie. Proces přeměny analytu do formy plynných atomů se nazývá atomizace<sup>19</sup>. Atomizace se uskutečňuje plamenově nebo elektrotermicky. U plamenové atomizace dojde proudem oxidovadla (vzduchu nebo N<sub>2</sub>O) k nasátí roztoku. Ten jde do nebulizéru, kde je převeden na aerosol, promíchá se s palivem (nejčastěji acetylenem) a odchází do hořáku, kde se vše zapálí. Za normálních okolností se palivo a oxidační činidlo mísí přibližně ve stechiometrickém poměru, nicméně může být žádoucí směs bohatá na palivo<sup>16, 19</sup>.

V plameni pak nastane několik vzájemně propojených procesů. Prvním krokem je desolvatace, při které se rozpouštědlo odpaří za vzniku jemně rozmělněného pevného molekulárního aerosolu. Ten následně přejde do formy plynných molekul. Disociace většiny těchto molekul produkuje atomový plyn. Některé atomy v plynu ionizují za vzniku kationtů a elektronů. Interakcí paliva s oxidovadlem v plameni vznikají další molekuly a atomy. Frakce molekul, atomů a iontů je plamenem excitována a poskytuje atomová, iontová a molekulová emisní spektra. Atomizace je nejkritičtější krokem v plamenové spektrometrii a omezuje přesnost těchto metod<sup>18</sup>. Teplota plamene se volí podle stanovovaného prvku. U směsi acetylen-vzduch je teplota plamene asi 2700°C. Křemičitany či hůře disociující oxidy se atomizují v plameni acetylen-oxid dusný, jehož teplota je 3200°C. Plamen má několik teplotních zón, které znázorňuje tzv. plamenový profil. První je zóna přehřívací, kde dochází k zahřátí topných plynů na zápalnou teplotu. Probíhají zde reakce spalování, čímž se tvoří radikály. U redukčních plamenů následuje mezireakční zóna<sup>16</sup>. V této části plamene je nejvyšší koncentrace volných atomů. V sekundární zóně se produkty vnitřního jádra přeměňují na stabilní molekulární oxidy a dispergují se do okolí<sup>18</sup>. Sekundární zóna je nejteplejší a spotřebovává se zde kyslík z okolní atmosféry<sup>16</sup>.

Elektrotermická atomizace se provádí v elektricky vyhřívaných atomizátorech. Atomizátorem může být vyhřívaná podložka, kelímek či grafitová kyveta. Kyveta je váleček dlouhý asi 2,5 cm o průměru 7 mm s otvorem pro dávkování vzorku jehož objem je 5 – 20 μl. Kyvetou prochází inertní plyn a je chlazená vodou<sup>16</sup>. Kontinuální průtok inertního plynu ochraňuje grafitovou pec před oxidací a zajišťuje odstranění plynných produktů vznikajících během atomizace<sup>19</sup>.

Teplotní program je složen z několika fází:

- odpaření rozpouštědla
- pyrolýza a mineralizace
- atomizace a chlazení na laboratorní teplotu.

Ve fázi atomizace vzroste koncentrace atomů stanovovaného prvku tzv. atomizační puls, jehož plocha nebo výška je přímo úměrná množství analyzovaného kovu ve vzorku<sup>19</sup>.

Oproti atomizaci v plameni je odporový ohřev u elektrotermické atomizace časově náročnější nicméně citlivější, neboť využívá veškerý nadávkovaný vzorek, zatímco atomizace plamenem pouze asi 10 %<sup>16, 19</sup>.

Speciálním případem atomizace je metoda generování těkavých sloučenin, kterou lze ovšem využít pouze pro omezené množství prvků (Sb, As, Bi, Ge, Sn, Te, Se a Pb). Výhodou je velká citlivost a malá spotřeba vzorku<sup>20</sup>.

### **Disperzní prvek**

Na monochromátoru dochází k rozkladu polychromatického záření produkovaného excitovanými atomy. Monochromátor oddělí z polychromatického záření jen malý interval vlnových délek  $\Delta\lambda$ . Velikost intervalu závisí na šířce vstupní štěrbině, kterou polychromatické záření do monochromátoru vstupuje<sup>16</sup>. Šířka štěrbině se volí v rozmezí 0,2 – 2 nm, aby nedocházelo k průchodu blízkých nepohlcených čar spektra výbojky<sup>7</sup>. Po vstupní štěrbině následuje disperzní prvek (mřížka či hranol), kde dojde k rozkladu záření a vybraný interval odchází výstupní štěrbinou<sup>16</sup>.

Princip rozkladu polychromatického záření na hranolu vychází ze závislosti indexu lomu na vlnové délce. Při přechodu paprsku z jednoho prostředí do druhého dochází k jeho lomu. Nejmenší úhel lomu má záření červené naopak nejvíce se láme záření fialové<sup>16, 20</sup>. Pro viditelnou oblast se využívají hranoly vyrobené z olovnatého skla, hranoly z křemene a CaF<sub>2</sub> jsou vhodné pro UV záření<sup>16</sup>.

Dalším typem monochromátoru je mřížka, což je destička vyrobená z leštěného kusu skla, do jejíhož povrchu je vyryt velký počet rovnoběžných drážek. Mřížka je potažena hliníkem<sup>20</sup>. Vzdálenost dvou sousedních vrypů je tzv. mřížková konstanta. Po dopadu polychromatického záření na mřížku dojde k odrazu paprsků záření a poté k interferenci a rozkladu na záření monochromatické. Vrypy se na mřížce tvoří buď mechanicky nebo leptáním. Poté se destička pokryje vrstvou hliníku a křemene. V ultrafialovo – viditelné

oblasti se pracuje s mřížkami, které mají 2700 vrypů na 1 mm. Oproti hranolu má mřížka větší disperzní schopnost<sup>16</sup>.

### **Detektor**

Monochromatické záření vystupující z monochromátoru pokračuje do detektoru. Detektory lze rozdělit na fotoelektrické a fotografické.

Fotonásobiče lze využít od vakuové až po infračervenou oblast spektra<sup>16</sup>. Využívají fotoelektrického jevu, který se projeví po dopadu fotonu na fotokatodu. Povrch katody je z fotoemisního materiálu, který po ozáření světlen vhodné energie emituje elektrony<sup>21</sup>. Fotony z povrchu katody vyrazí elektrony, které putují směrem k anodě. Cestou ovšem prochází soustavou dynod (katod) a dopadem na každou z nich dojde k emisi dalších elektronů. Tyto elektrony jsou postupně urychlovány elektrostatickým polem. Proud odebíraný z anody je tedy zesílený<sup>16</sup>. Výsledný proud je úměrný zářivému výkonu paprsku<sup>21</sup>.

Polovodičové detektory jsou většinou ve formě PIN diod vyrobených z křemíku. Na podklad s vysokou vodivostí typu N se nanese dobře vodivá vrstva P. Každý foton, který dopadne na polovodič vytvoří pár elektron-díra, které putují k elektrodám. V polovodiči tak vzniká proud<sup>16</sup>.

Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu kombinuje indukčně vázané plazma (ICP z anglického Inductively Coupled Plasma) jako původce kladných částic a hmotnostní spektrometrii (MS z anglického Mass Spectrometry), která umožňuje tyto částice detekovat. Indukčně vázané plazma předá vzorku tepelnou energii, čímž dojde k tvorbě iontů, které analyzuje hmotnostní spektrometr. Ionty se v něm rozdělují na základě svého náboje a hmotnosti<sup>16</sup>.

## 2.4 Stanovení olova a kadmia metodou F-AAS

Na téma stanovení olova a kadmia metodou F-AAS v různých vzorcích bylo publikováno velké množství prací.

Příkladem může být například analýza z roku 2006, kdy byl ve 24 náhodně zakoupených ovocných nápojích z Ghanského trhu stanovován obsah těžkých kovů (Fe, Co, Cd, Zn, Pb a Cu). Vzorky byly mikrovlnně rozloženy a analyzovány pomocí plamenové atomové absorpční spektrometrie. Asi 78 % vzorků překročilo maximální hranici 0,3 mg/l pro železo a všechny vzorky maximální hranici 0,005 mg/l pro kadmium<sup>22</sup>.

Stanovení těžkých kovů pomocí F-AAS se využívá i při ekologických a toxikologických studiích životního prostředí. Příkladem je sledování kontaminace ekosystému v okolí řeky Guaraguaçu v Brazílii, kdy byl stanovován obsah olova ve stolici vydry jihoamerické. Šest vzorků bylo nejprve extrahováno 1% kyselinou dusičnou a poté analyzováno pomocí plamenové atomové absorpční spektrometrie<sup>23</sup>.

Stanovení kovů plamenovou atomovou absorpční spektrometrií se využívá i při kontrole kvality potravin. Na trhu Ambo v Etiopii byly testovány 4 druhy obilovin (pšenice, ječmen, čirok a kukuřice). Sledován byl obsah Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Co, Cr, Pb a Cd. Obsah Cd a Pb byl velmi malý (pod limitem stanoveným FAO/WHO) a autor tedy dospěl k závěru, že kontrolované obiloviny jsou bezpečné pro lidskou spotřebu<sup>24</sup>.

Protože se těžké kovy v životním prostředí vyskytují ve stopových množstvích, předchází samotnému stanovení zakoncentrování. Příkladem může být studie, kdy bylo využito amonium pyrolidin dithiokarbamátu (APDC), který tvoří stabilní komplexy s dvojmocnými kationty kovů. Cílem studie bylo zakoncentrovat a následně stanovit kadmium v průmyslových a environmentálních vzorcích<sup>25</sup>.

## 2.5 Stanovení olova a kadmia metodou ET-AAS

Na téma stanovení olova a kadmia metodou ET-AAS v různých vzorcích bylo napsáno hodně prací. Nejčastěji se provádí studie kvality životního prostředí a potravin.

Příkladem může být studie z regionu Marmara v severním Turecku. V této práci byl sledován obsah olova, kadmia a manganu v kranasovi obecném a tresce bezvousé ulovených v Marmarském moři. Testy byly provedeny čtvrtletně v období březen 2013 až prosinec 2013. Bylo zjištěno, že koncentrace těžkých kovů v rybách jsou přijatelné pro lidskou spotřebu<sup>26</sup>.

Další studie popisuje, jak bylo na portugalském trhu náhodně vybráno 21 ovocných šťáv, ve kterých byla zjišťována koncentrace arsenu, kadmia, chromu, olova, manganu a niklu. Všechna stanovení byla provedena atomovou absorpční spektrometrií. Arsen byl kvantifikován metodou generování hydridů (HG AAS), ostatní kovy pomocí grafitové pece<sup>27</sup>.

V oblastech, kde je vysoký obsah kadmia v půdě je nutné pravidelně sledovat jeho obsah v pěstovaných plodinách. Byla provedena studie, která sledovala obsah kadmia ve stoncích a zrnech rýže vypěstované v Číně a Thajsku. Nejprve byla provedena digesce vzorku koncentrovanou kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku, poté byl stanoven obsah kadmia pomocí ET-AAS. Bylo zjištěno, že bioakumulace kadmia je nižší v zrnech rýže a vyšší ve stonku. Mnohé studie u některých vzorků uvádějí překročení bezpečného limitu pro kadmium v zrnech rýže 0,4 mg/kg. Kadmium stále představuje problém pro lidské zdraví a riziko se zvyšuje častou konzumací rýže<sup>28</sup>.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Používané přístroje a pracovní parametry

- **Milli Q<sub>PLUS</sub> (Millipore, USA)** - přístroj pro přípravu deionizované vody.
- **GBC 933 AA (GBC Scientific Equipment, AUS)** – atomový absorpční spektrometr s technikou plamenové atomizace. Jako zdroje primárního záření byly použity výbojky s dutou katodou pro stanovení kadmia a olova. Měření olova proběhlo při vlnové délce 217,0 nm, stanovení kadmia při 228,8 nm. Pro stanovení obou prvků byl použit plamen acetylen – vzduch.
- **ContrAA® 700 (Analytik Jena, AG)** - atomový absorpční spektrometr s kontinuálním zdrojem záření a s vysokým rozlišením. Přístroj byl využit pro stanovení olova a kadmia ve vzorcích pomocí elektrotermické atomizace. Olovo bylo měřeno při vlnové délce 283,3 nm, kadmium při 228,8 nm.

### 3.2 Používané chemikálie

- Standardní roztok olovnatých iontů o koncentraci 1000 mg/l, dusičnan olovnatý v 0,5 mol/l kyselině dusičné (Merck spol. s.r.o., DEU)
- Standardní roztok kademnatých iontů o koncentraci 1000mg/l, dusičnan kademnatý v 0,5 mol/l kyselině dusičné (Merck spol. s.r.o., DEU)
- Magnesium nitrate hexahydrate, čistota 99,995+ % (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- Antimonium dihydrogen phosphate, čistota 99,999+ % (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- Kyselina dusičná 65%, p.a. (Lach-Ner spol. s.r.o., ČR)

### 3.3 Charakteristika vzorků

Vzorky ovocných a zeleninových šťáv byly připraveny na katedře biochemie. Rostlinný materiál byl zvážen, nakájen a odšťavněn, získaná šťáva byla přefiltrována přes dvě vrstvy gázy a byl změřen její objem. Filtrát byl následně centrifugován 30 minut při zrychlení 9000 g a teplotě 4°C. Vzorky byly dodány zmražené v plastových uzavřených mikrozkuvkách o objemu 2 ml, objem jednotlivých vzorků byl přibližně 1,5 ml. Vzorky jsou očíslovány 1–38, celkem bylo dodáno 36 vzorků, vzorky číslo 5 (josta) a 7 (bílý rybíz) podle původního seznamu dodány nebyly. Přehled vzorků s jejich číslem, názvem, surovou hmotností a objemem tekutiny po odšťavnění a přefiltrování je uveden v Tab. 3.1.

Tab. 3.1 Přehled analyzovaných vzorků ovocných a zeleninových šťáv. Je uvedena hmotnost vzorku před odšťavněním a objem kapalného podílu po přefiltrování.

Číslo vzorku	Vědecký název rostliny	Zdroj extraktu	Hmotnost [g]	Objem [ml]
1	<i>Prunus armeniaca</i>	meruňka	247,1	82,0
2	<i>Rubus idaeus</i>	malina	127,3	40,0
3	<i>Fragaria vesca</i>	jahoda	170,4	98,0
4	<i>Prunus persica</i>	broskev	328,7	162
6	<i>Ribes rubrum</i>	červený rybíz	125,0	32,0
8	<i>Prunus cerasus</i>	višeň	83,80	27,0
9	<i>Diospyros kaki</i>	kaki	321,8	26,0
10	<i>Pyrus pyrifolia</i>	nashi	331,6	135
11	<i>Cucurbita moschata</i>	máslová dýně	292,1	79,0
12	<i>Actinidia deliciosa</i>	kiwi	267,5	144
13	<i>Solanum lycopersicum</i>	rajče	280,2	148
14	<i>Citrus sinensis</i>	pomeranč	334,7	157
15	<i>Citrus limon</i>	citron	229,9	85,0
16	<i>Citrus limetta</i>	limetka	214,2	74,0
17	<i>Cucurbita pepo</i>	cuketa	281,9	111
18	<i>Citrus reticulata</i>	mandarinka	217,8	103
19	<i>Persea americana</i>	avokádo	337,6	60,0
20	<i>Citrus maxima</i>	pomelo	389,2	95,0
21	<i>Citrus paradisi</i>	grep	391,9	164
22	<i>Petroselinum</i>	petržel	263,7	76,0
23	<i>Daucus carota</i>	mrkev	234,0	92,0
24	<i>Kurkuma longa</i>	kurkumovník dlouhý	125,5	75,0
25	<i>Zingiber officinale</i>	zázvor	230,9	136
26	<i>Beta vulgaris</i>	červená řepa	362,0	146
27	<i>Allium cepa</i>	cibule	282,5	141
28	<i>Apium graveolens</i>	miřík celer	311,8	80,0
29	<i>Lactuca sativa</i>	hlávkový salát	166,5	79,0
30	<i>Brassica oleracea</i>	kedluben	389,1	122
31	<i>Lactuca sativa</i>	ledový salát	261,3	108
32	<i>Brassica rapa</i>	čínské zelí	310,1	120
33	<i>Brassica oleracea</i>	brokolice	322,1	59,0
34	<i>Alpinia galanga</i>	galgán červený	183,7	57,0
35	<i>Raphanus sativus</i>	ředkvička	250,5	96,0
36	<i>Spinacia oleracea</i>	špenát setý	129,0	46,0
37	<i>Raphanus sativus</i>	ředkev bílá	448,8	159
38	<i>Alpinia officinarum</i>	galgán bílý	97,60	48,0

### 3.4 Postup prací F-AAS

Při přípravě standardních roztoků byl použit stabilizační roztok (vodný roztok 0,24% kyseliny dusičné). Roztoky olova byly měřeny při vlnové délce 217,0 nm a roztoky kadmia při 228,8 nm.

#### **Optimalizace pracovních podmínek**

Pro získání co nejpřesnějších výsledků při analýze vzorků bylo nejprve nutno provést optimalizaci metody. Pro optimalizaci byl připraven roztok olova o koncentraci 25 mg/l ze zásobního roztoku o koncentraci olova 1,0 g/l a roztok kadmia o koncentraci 2,5 mg/l ze zásobního roztoku o koncentraci kadmia 1,0 g/l. Během optimalizační studie byl studován vliv následujících parametrů na hodnotu signálu. Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku byla měřena v rozmezí 0–8 mm, optimalizace horizontální polohy hořáku v rozsahu 0–19 mm, průtoková rychlost acetylenu (paliva) byla sledována v rozmezí 1,5–4,0 l/min, optimální hodnota napájecího proudu výbojky byla vybírána z intervalu hodnot 3–8 mA a šířka spektrálního intervalu byla volena z hodnot 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 nm. Ze získaných dat byly vybrány nejvhodnější podmínky pro analýzu vzorků.

#### **Kalibrace a zjištění základních charakteristik**

Za optimálních podmínek byla provedena kalibrace a zjištěny základní charakteristiky metody. Nejprve byly připraveny kalibrační roztoky pro olovo o koncentracích 2,5; 5,0; 10; 25 a 50 mg/l ředěním standardního roztoku olova o koncentraci 1,0 g/l a kalibrační roztoky pro kadmium o koncentracích 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 a 50 mg/l ředěním standardního roztoku kadmia o koncentraci 1,0 g/l. Připravené roztoky byly proměřeny při hodnotách spektrálního intervalu 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 nm přičemž největší odezvy bylo dosaženo při šířce spektrálního intervalu 0,2 nm. Následně byly proměřeny roztoky olova o koncentracích 2,5 a 10 mg/l a roztoky kadmia o koncentracích 0,5 a 2,5 mg/l pro výpočet charakteristik metody jako je limit detekce, limit stanovitelnosti a opakovatelnost.



### 3.5 Postup prací ET-AAS

Při atomové absorpční spektrometrii s elektrotermickou atomizací bylo nutné ke každému roztoku přidávat tzv. modifikátor matrice. Pro olovo i kadmium bylo vždy použito 5  $\mu\text{l}$  modifikátoru matrice  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . Roztoky olova byly měřeny při vlnové délce 283,3 nm a roztoky kadmia při 228,8 nm.

#### **Příprava modifikátoru matrice $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$**

Do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo naváženo  $0,1000 \pm 0,0001$  g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a byly přidány 3 ml roztoku  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  o koncentraci 2 g/l v 0,2%  $\text{HNO}_3$ . Odměrná baňka byla doplněna po rysku a roztok byl promíchán.

#### **Optimalizace pracovních podmínek**

Pro získání co nejpřesnějších výsledků při samotné analýze vzorků byla provedena optimalizace pracovních podmínek. Pro optimalizaci byl použit roztok olova o koncentraci 50  $\mu\text{g/l}$  a roztok kadmia o koncentraci 5,0  $\mu\text{g/l}$ . Během optimalizační studie byl sledován vliv teploty pyrolýzy a atomizace na velikost signálu. Optimalizace teploty pyrolýzy byla provedena v rozmezí teplot 400–1400°C pro olovo a 400–1300°C pro kadmium, optimalizace teploty atomizace v intervalu 110–2000°C pro olovo a 900–1800°C pro kadmium. Zjištěné optimální podmínky byly využity pro analýzu vzorků.

#### **Kalibrace a zjištění základních charakteristik**

Za optimálních podmínek byla provedena kalibrace metody ET-AAS, pro níž byly připraveny kalibrační roztoky olova o koncentracích 0; 10; 20; 50 a 100  $\mu\text{g/l}$  ředěním standardního roztoku olova o koncentraci 1 g/l a kalibrační roztoky kadmia o koncentracích 0; 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0  $\mu\text{g/l}$  ředěním standardního roztoku kadmia o koncentraci 5,0  $\mu\text{g/l}$ . Kalibrační roztoky byly proměřeny a ze získaných hodnot byla sestavena kalibrační závislost. Následně byly proměřeny roztoky olova o koncentraci 0 a 50  $\mu\text{g/l}$  a roztoky kadmia o koncentraci 0 a 5,0  $\mu\text{g/l}$  pro výpočet charakteristik metody jako je limit detekce, limit stanovitelnosti a opakovatelnost.

## Analýza vzorků

Po dokončení kalibrace metody byla provedena samotná analýza vzorků. Pro analýzu vzorků byly použity hodnoty teploty pyrolýzy a atomizace zjištěné během optimalizace. Vzorky byly analyzovány na přístroji ContrAA® 700. Obsah olova byl měřen při vlnové délce 283,3 nm, obsah kadmia při vlnové délce 228,8 nm. Obsah olova a kadmia byl spočítán z kalibrační závislosti a poté bylo provedeno statistické zpracování výsledků.

### 3.6 Statistické zpracování výsledků

Statistická analýza je nutná pro správnou interpretaci a aplikaci výsledků získaných z experimentální praxe<sup>29</sup>. V této práci bylo každé měření provedeno třikrát a z naměřených hodnot byly provedeny následující statistické výpočty.

**Medián ( $Me(X)$ )** je hodnota, která leží přesně uprostřed řady výsledků seřazených od nejmenšího po největší. Medián dělí zjištěná data na dvě stejně velké části a platí, že 50 % hodnot je menších a 50 % hodnot je větších než hodnota mediánu. Medián se používá pro určení střední hodnoty souboru o maximálně sedmi hodnotách.

$$Me(X) = \frac{x_{N/2} + x_{(N/2)+1}}{2} \quad (3.1)$$

kde  $N$  je počet hodnot v souboru  $X$  s prvky  $x_i$  řazenými podle velikosti.

**Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )** je definován jako součet všech naměřených hodnot vydělený počtem hodnot. Používá se pro výpočet střední hodnoty souboru obsahujícího více než sedm hodnot.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.2)$$

kde  $n$  je počet měření a  $x_i$  je naměřená hodnota.

**Směrodatná odchylka ( $s$ )** vyjadřuje interval, ve kterém se vyskytují výsledky opakovaných měření<sup>12</sup>. Udává se ve stejných jednotkách jako naměřené hodnoty<sup>29</sup>.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.3)$$

kde  $n$  je počet měření a  $x_i$  je naměřená hodnota.

**Relativní směrodatná odchylka** ( $s_r$ , neboli variační koeficient) je směrodatná odchylka vyjádřená v procentech. Variační koeficient vztahuje přesnost měření ke střední hodnotě<sup>12</sup>.

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3.4)$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je střední hodnota (medián či aritmetický průměr).

**Mez detekce (LOD)** je nejnižší koncentrace, jejíž signál lze odlišit od šumu. Vypočítá se jako trojnásobek hodnoty standardní odchylky signálu pozadí<sup>29</sup>.

$$LOD = 3 \cdot s_{\text{šum}} \quad (3.5)$$

kde  $s_{\text{šum}}$  je směrodatná odchylka šumu základní linie, která byla vypočtena jako směrodatná odchylka 15 měření stejného vzorku s nízkou koncentrací analytu.

**Mez stanovitelnosti (LOQ)** je koncentrace, při které přesnost stanovení umožňuje kvantitativní vyhodnocení (přesnost detekčního limitu je 33 %). Tato hodnota odpovídá deseti směrodatným odchyvkám signálu pozadí<sup>29</sup>.

$$LOQ = 10 \cdot s_{\text{šum}} \quad (3.6)$$

kde  $s_{\text{šum}}$  je směrodatná odchylka šumu základní linie, která byla vypočtena jako směrodatná odchylka 15 měření stejného vzorku s nízkou koncentrací analytu.

**Opakovatelnost (O)** je variační koeficient měření za optimálních podmínek. Udává přesnost měření za nejlepších možných podmínek tedy stanovení stejnou metodou, ve stejné laboratoři, stejným pracovníkem, na stejném přístroji a ve stejný den.

$$O = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3.7)$$

## 4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

Následující kapitola shrnuje dosažené výsledky. Každé měření bylo provedeno vždy třikrát, jako průměrná hodnota je uveden aritmetický průměr a směrodatné odchylky jsou vyjádřeny pomocí chybových úseček.

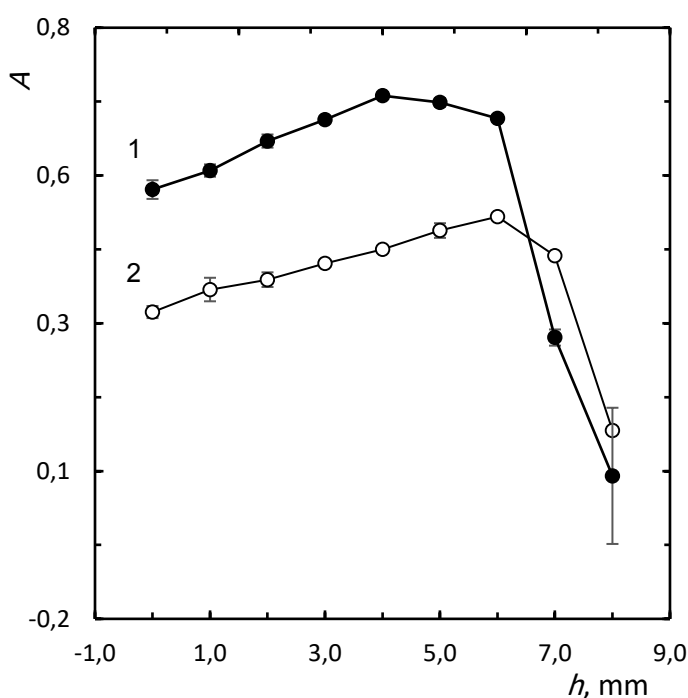
### 4.1 Metoda F-AAS

#### 4.1.1 Optimalizace pracovních parametrů

V této fázi práce byly postupně optimalizovány jednotlivé pracovní parametry. Experimenty byly provedeny s roztokem olova o koncentraci 25 mg/l a roztokem kadmia o koncentraci 2,5 mg/l.

#### Výška paprsku nad hranou hořáku

Prvním studovaným parametrem byla výška paprsku nad hranou hořáku sledovaná v rozmezí 0–8 mm s krokem po 1 mm. Naměřené hodnoty jsou graficky znázorněny na Obr.4.1.

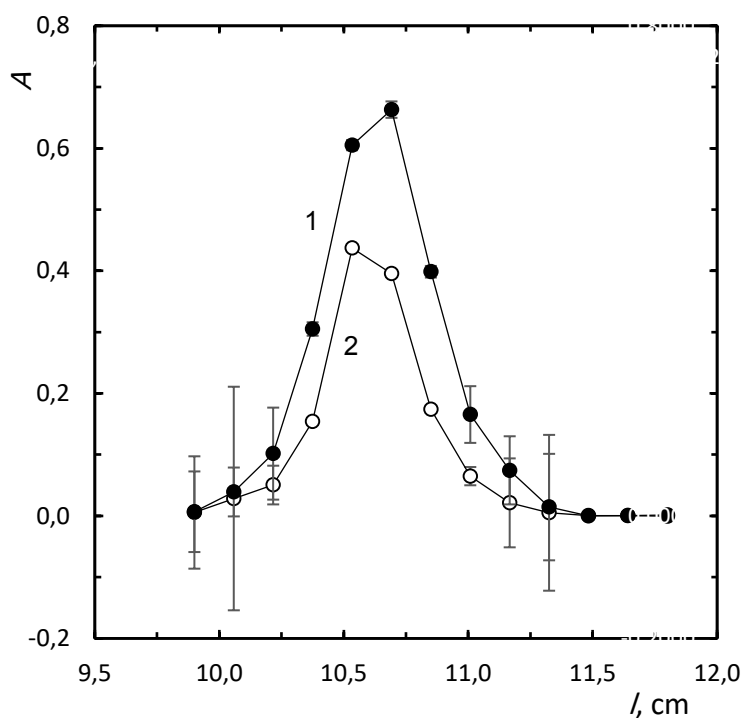


Obr. 4.1 Závislost absorpance na výšce paprsku nad hranou hořáku  
1 – olovo, 2 – kadmium,  $c(\text{Pb}^{2+}) = 25 \text{ mg/l}$ ,  $c(\text{Cd}^{2+}) = 2,5 \text{ mg/l}$ ,  $Q_v = 3,5 \text{ l/min}$

U obou prvků bylo pozorováno, že zpočátku dochází k pozvolnému nárůstu a po dosažení maxima k prudkému poklesu citlivosti. Z Obr. 4.1 vyplývá, že nejvyšší koncentrace volných atomů olova je dosaženo, když je paprsek 4 mm nad hranou hořáku a nejvyšší koncentrace volných atomů kadmia při hodnotě 6 mm. Následující měření proto byla provedena při tomto nastavení.

### Horizontální poloha hořáku

Druhým krokem optimalizace bylo sledování vlivu horizontální polohy hořáku. Byla sledována vzdálenost hořáku v intervalu 0–19 mm od krajní polohy hořáku. Hořák se nastavuje otáčením šroubu kdy 24 otáčkám odpovídá posunutí o 19 mm. Naměřené hodnoty jsou graficky znázorněny na Obr. 4.2.

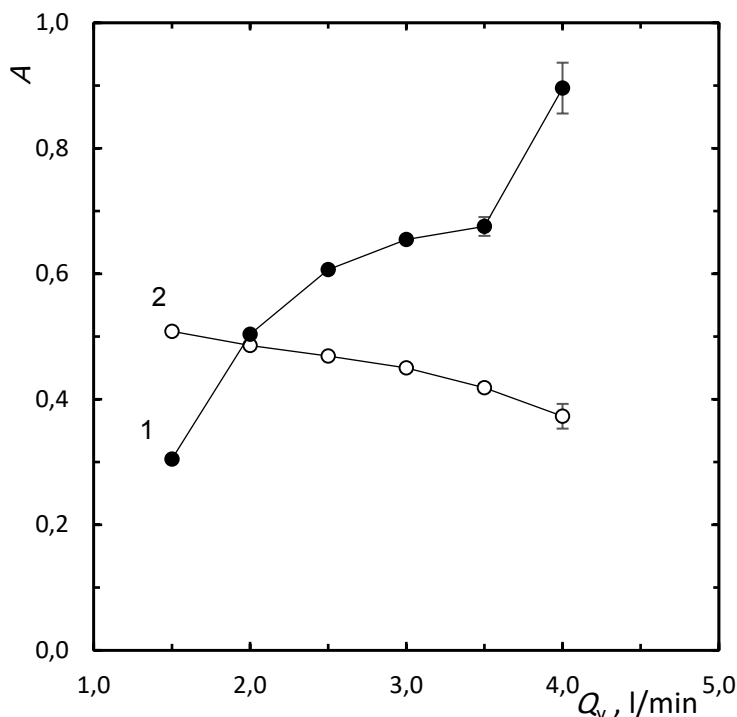


Obr. 4.2 Závislost absorpance na horizontální poloze hořáku, 0,79 mm = 1 otáčka šroubu  
 1 – olovo, 2 – kadmium,  $c(\text{Pb}^{2+}) = 25 \text{ mg/l}$ ,  $c(\text{Cd}^{2+}) = 2,5 \text{ mg/l}$ ,  $h(\text{Pb}^{2+}) = 4 \text{ mm}$ ,  
 $h(\text{Cd}^{2+}) = 6 \text{ mm}$ ,  $Q_v = 3,5 \text{ l/min}$

Z Obr. 4.2 je patrné, že u obou křivek nejprve dochází k prudkému zvýšení a následně prudkému poklesu citlivosti. Největší signál získáme při nastavení hořáku 7,9 mm pro olovo a pro kadmium 6,3 mm od krajní polohy hořáku. Další měření bylo provedeno s tímto nastavením.

### Průtoková rychlost acetylenu

Následně byla provedena optimalizace průtokové rychlosti acetylenu. Byly sledovány změny absorbance při hodnotách průtokové rychlosti 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 a 4,0 l/min. Zjištěné hodnoty graficky znázorňuje Obr. 4.3.



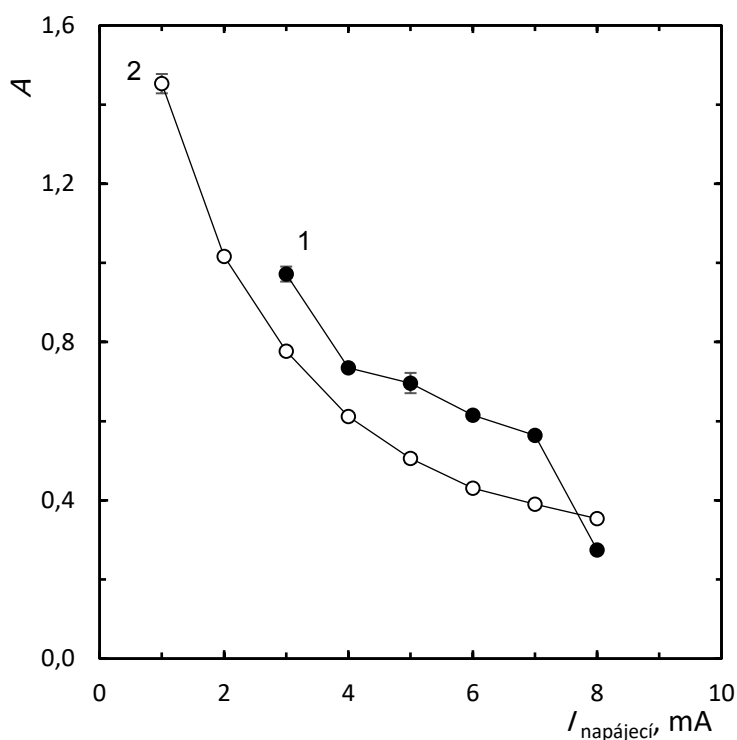
Obr. 4.3 Závislost absorbance na průtokové rychlosti acetylenu

1 – olovo, 2 – kadmium,  $c(\text{Pb}^{2+}) = 25 \text{ mg/l}$ ,  $c(\text{Cd}^{2+}) = 2,5 \text{ mg/l}$ ,  $h(\text{Pb}^{2+}) = 4 \text{ mm}$ ,  
 $h(\text{Cd}^{2+}) = 6 \text{ mm}$

Bylo pozorováno, že postupným zvyšováním průtokové rychlosti acetylenu při stanovení olova dochází k prudkému nárůstu citlivosti. Naopak u kadmia lze pozorovat pozvolný pokles citlivosti. Z Obr. 4.3 plyne, že největší signál pro olovo získáme při průtoku 4,0 l/min, ale z bezpečnostních důvodů bylo pro další měření využito průtokové rychlosti 3,5 l/min. Největší absorbance pro kadmium byla naměřena při průtoku acetylenu 1,5 l/min, ale kvůli častému zhášení plamene byla pro další měření použita průtoková rychlost 2,0 l/min.

## Napájecí proud výbojky

Dalším optimalizovaným parametrem byl napájecí proud výbojky. Byla měřena absorbance při hodnotách napájecího proudu 3–8 mA pro olovo a 1–8 mA pro kadmium. Získané hodnoty jsou graficky zpracovány na Obr. 4.4.



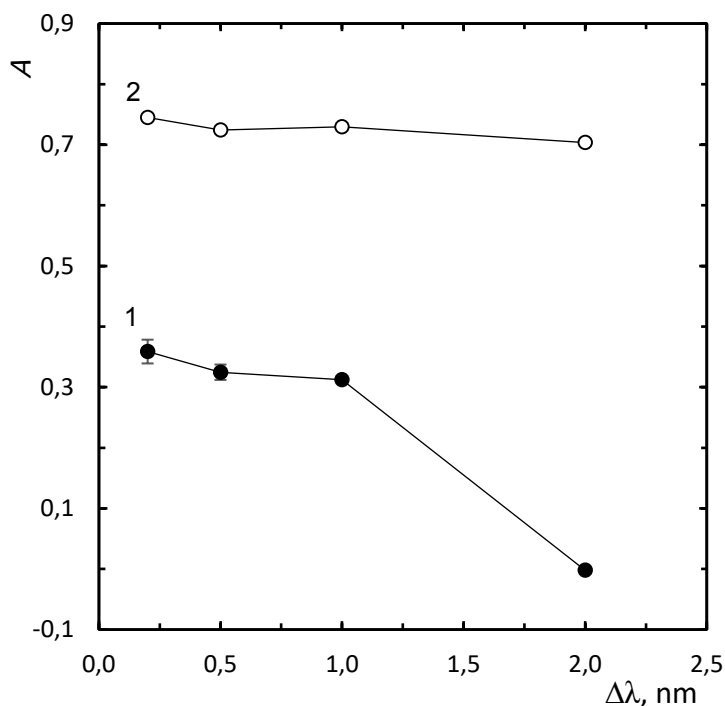
Obr. 4.4 Závislost absorbance na napájecím proudu výbojky

1 – olovo, 2 – kadmium,  $c(\text{Pb}^{2+}) = 25 \text{ mg/l}$ ,  $c(\text{Cd}^{2+}) = 2,5 \text{ mg/l}$ ,  $h(\text{Pb}^{2+}) = 4 \text{ mm}$ ,  
 $h(\text{Cd}^{2+}) = 6 \text{ mm}$ ,  $Q_v(\text{Pb}^{2+}) = 3,5 \text{ l/min}$ ,  $Q_v(\text{Cd}^{2+}) = 2,0 \text{ l/min}$

Z Obr. 4.4 je patrné, že zvyšováním napájecího proudu výbojky dochází u olova i kadmia k prudkému poklesu citlivosti. Největší absorbanci měříme při napájecím proudu výbojky 3 mA pro olovo a 1 mA pro kadmium, proto pro další měření bylo využito těchto hodnot.

### Šířka spektrálního intervalu

Posledním optimalizačním parametrem byla šířka spektrálního intervalu sledovaná v hodnotách 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 nm. Naměřené hodnoty signálu jsou graficky znázorněny na Obr. 4.5.



Obr. 4.5 Závislost absorbance na šířce spektrálního intervalu

1 – olovo, 2 – kadmium,  $c(\text{Pb}^{2+}) = 25 \text{ mg/l}$ ,  $c(\text{Cd}^{2+}) = 2,5 \text{ mg/l}$ ,  $h(\text{Pb}^{2+}) = 4 \text{ mm}$ ,  
 $h(\text{Cd}^{2+}) = 6 \text{ mm}$ ,  $Q_v(\text{Pb}^{2+}) = 3,5 \text{ l/min}$ ,  $Q_v(\text{Cd}^{2+}) = 2,0 \text{ l/min}$ ,  
 $I_{\text{napájecí}}(\text{Pb}^{2+}) = 3 \text{ mA}$ ,  $I_{\text{napájecí}}(\text{Cd}^{2+}) = 1 \text{ mA}$

Bylo pozorováno, že zvětšování spektrálního intervalu nemá u kadmia velký vliv na citlivost. Naopak u olova lze pozorovat, že nejprve dochází k pozvolnému poklesu, ke konci závislosti je pokles prudší. Z Obr. 4.5 je patrné, že největší signál získáme při nastavení šířky spektrálního intervalu na 0,2 nm pro olovo i pro kadmium.

Z provedených měření byly za optimální podmínky pro stanovení olova a kadmia ve vzorcích zvoleny a nastaveny parametry uvedené v Tab. 4.1.



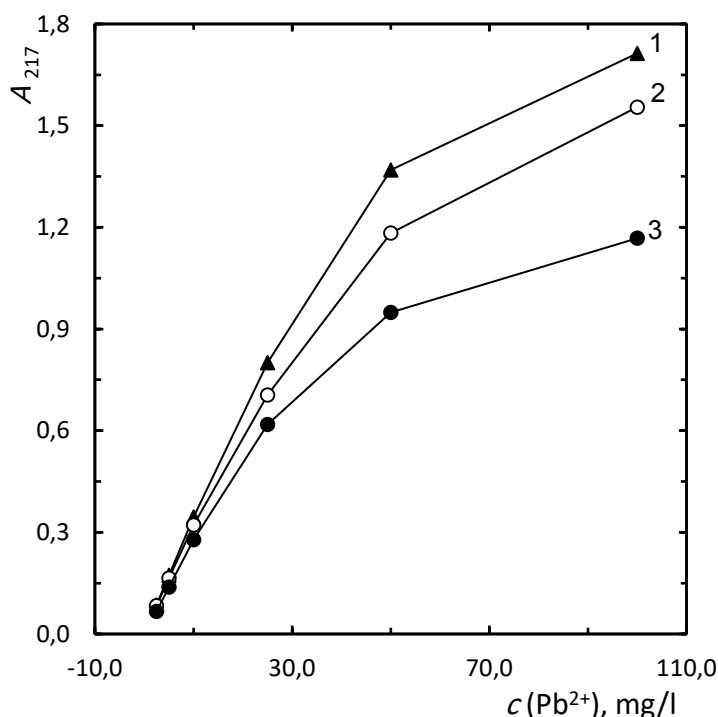
Tab. 4.1 Optimální nastavení přístroje GBC 933 AA pro stanovení olova a kadmia pomocí F-AAS

Parametr	Hodnota pro stanovení olova	Hodnota pro stanovení kadmia
Výška paprsku nad hranou hořáku	4 mm	6 mm
Horizontální poloha hořáku	7,9 mm od krajní polohy hořáku	6,3 mm od krajní polohy hořáku
Průtoková rychlost acetylenu	3,5 l/min	2,0 l/min
Napájecí proud výbojky	3 mA	1 mA
Šířka spektrálního intervalu	0,2 nm	0,2 nm

Uvedené hodnoty byly využity pro další měření.

#### 4.1.2 Kalibrace metody a základní charakteristiky stanovení

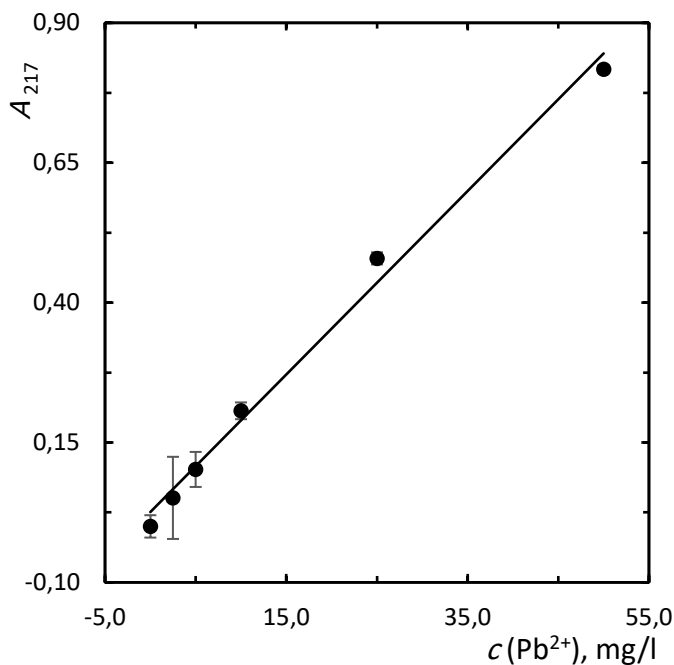
Aby byla zjištěna optimální šířka spektrálního intervalu, byly připraveny roztoky o koncentracích 2,5; 5,0; 10; 25; 50 a 100 mg/l olova a roztoky o koncentracích 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 a 50 mg/l kadmia. Roztoky byly následně proměřeny při různé šířce spektrálního intervalu, a to olovo při 0,2; 0,5 a 1,0 nm a kadmium při 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 nm. Naměřené hodnoty pro olovo jsou graficky zaznamenány na Obr. 4.6 a pro kadmium na Obr. 4.8.



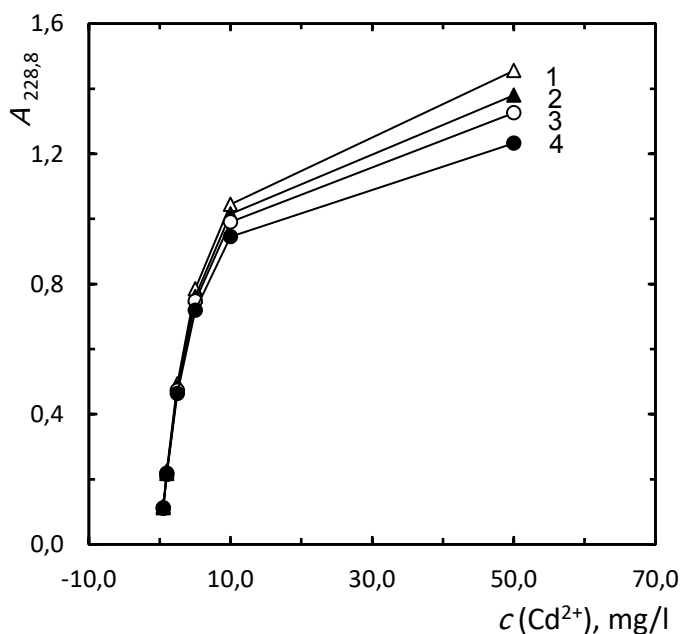
Obr. 4.6 Závislost absorpance roztoků olova na koncentraci při různé šířce spektrálního intervalu

1 –  $\Delta\lambda = 0,2$  nm, 2 –  $\Delta\lambda = 0,5$  nm, 3 –  $\Delta\lambda = 1$  nm,  $h(\text{Pb}^{2+}) = 4$  mm,  
 $Q_v(\text{Pb}^{2+}) = 3,5$  l/min,  $I_{\text{napájecí}}(\text{Pb}^{2+}) = 3$  mA

Z Obr. 4.6 je patrné, že nejvyšší absorpenci získáme při šířce spektrálního intervalu 0,2 nm a jedná se tedy o optimální nastavení, kterému odpovídá kalibrační závislost znázorněná na Obr. 4.7.

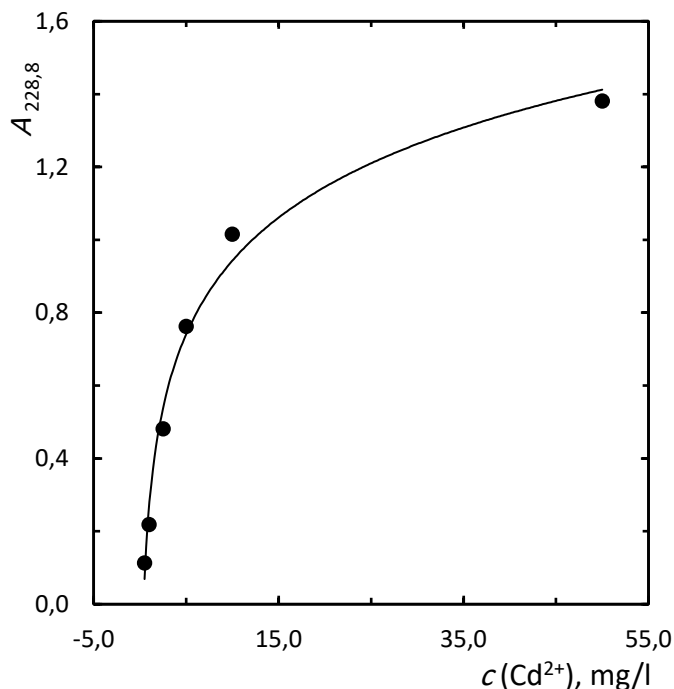


Obr. 4.7 Kalibrační závislost absorpance roztoků olova na jejich koncentraci  
 $h(\text{Pb}^{2+}) = 4 \text{ mm}$ ,  $Q_v(\text{Pb}^{2+}) = 3,5 \text{ l/min}$ ,  $I_{\text{napájecí}}(\text{Pb}^{2+}) = 3 \text{ mA}$ ,  $\Delta\lambda = 0,2 \text{ nm}$



Obr. 4.8 Závislost absorpance roztoků kadmia na koncentraci při různé šířce spektrálního intervalu  
 1 –  $\Delta\lambda = 0,2 \text{ nm}$ , 2 –  $\Delta\lambda = 0,5 \text{ nm}$ , 3 –  $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$ , 4 –  $\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$ ,  
 $h(\text{Cd}^{2+}) = 6 \text{ mm}$ ,  $Q_v(\text{Cd}^{2+}) = 2,0 \text{ l/min}$ ,  $I_{\text{napájecí}}(\text{Cd}^{2+}) = 1 \text{ mA}$

Z Obr. 4.8 vyplývá, že jako optimální se jeví šířka spektrálního intervalu 0,2 nm, při které získáváme nejvyšší signál. Této šířce spektrálního intervalu odpovídá kalibrační závislost znázorněná na Obr. 4.9.



Obr. 4.9 Kalibrační závislost absorbance roztoků kadmia na jejich koncentraci  
 $h(\text{Cd}^{2+}) = 6 \text{ mm}$ ,  $Q_v(\text{Cd}^{2+}) = 2,0 \text{ l/min}$ ,  $I_{\text{napájecí}}(\text{Cd}^{2+}) = 1 \text{ mA}$ ,  $\Delta\lambda = 0,2 \text{ nm}$

Základní charakteristiky metody F-AAS pro stanovení koncentrace olova a metody F-AAS pro stanovení kadmia byly spočteny z lineárních částí kalibračních závislostí a z 15krát změřených roztoků o koncentraci olova 2,5 a 10 mg/l a roztoků o koncentraci kadmia 0,5 a 2,5 mg/l. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.2.

Tab. 4.2 Základní charakteristika metody F-AAS pro stanovení koncentrace olova a kadmia

Charakteristika	Stanovení olova	Stanovení kadmia
Opakovatelnost [%]	0,544	0,339
Citlivost [l/mg]	0,019	0,142
Mez detekce [mg/l]	0,002	0,003
Mez stanovitelnosti [mg/l]	0,007	0,008
Lineární dynamický rozsah [mg/l]	2,5 – 25	0,5 – 5,0

## 4.2 Metoda ET-AAS

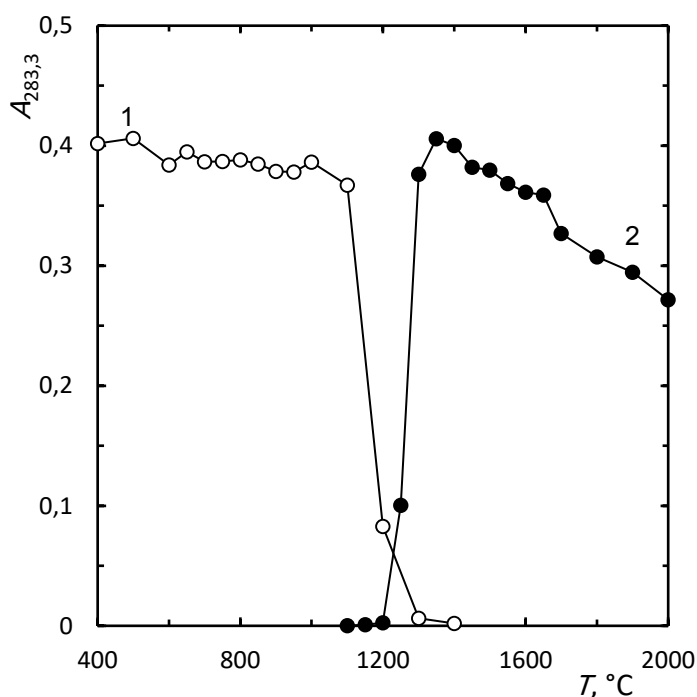
### 4.2.1 Optimalizace pracovních parametrů

Pro optimalizaci byl použit roztok olova o koncentraci 50 µg/l a roztok kadmia o koncentraci 5,0 µg/l.

#### Optimalizace teploty pyrolýzy

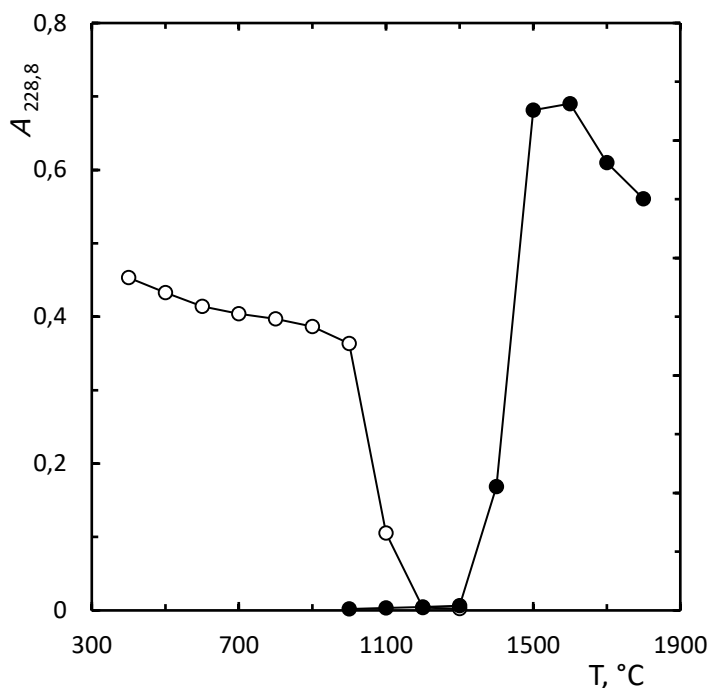
Prvním optimalizovaným parametrem byla teplota pyrolýzy. Byla sledována velikost signálu v rozmezí teplot 400–1400°C pro olovo a 400–1300°C pro kadmium.

Druhým krokem optimalizace bylo sledování absorbance při změně teploty atomizace. Tento parametr byl sledován v intervalu teplot 1100–2000°C pro olovo a 900–1800°C pro kadmium. Naměřené hodnoty pro olovo jsou graficky znázorněny na Obr. 4.10, zjištěné hodnoty pro kadmium graficky znázorňuje Obr. 4.11.



Obr. 4.10 Závislost absorbance roztoku olova na teplotě pyrolýzy a atomizace  
1 – pyrolýza, 2 – atomizace,  $c(\text{Pb}^{2+}) = 50 \mu\text{g/l}$

Ze zjištěných hodnot absorbance při různé teplotě pyrolýzy a atomizace byly následně zvoleny optimální podmínky pro stanovení olova. Teplota pyrolýzy byla stanovena na 800 °C, pro atomizace byla zvolena hodnota 1500 °C. Tyto hodnoty byly využity při dalším měření.



Obr. 4.11 Závislost absorpance roztoku kadmia na teplotě pyrolýzy a atomizace  
1 – pyrolýza, 2 – atomizace,  $c(\text{Cd}^{2+}) = 5,0 \mu\text{g/l}$

Ze zjištěných hodnot absorpance při různé teplotě pyrolýzy a atomizace byly následně zvoleny optimální podmínky pro stanovení kadmia. Z Obr. 4. 11 vyplývá, že jako optimální teplota pyrolýzy se jeví teplota  $500^\circ\text{C}$  a jako optimální teplota atomizace hodnota  $1600^\circ\text{C}$ . Tyto hodnoty byly použity pro další měření.

Jednotlivé kroky analýzy včetně příslušných teplot a časů jsou uvedeny v Tab. 4.3 pro olovo a v Tab. 4.4 pro kadmium.

Tab. 4.3 Teplotní program přístroje ContrAA® 700 pro stanovení olova

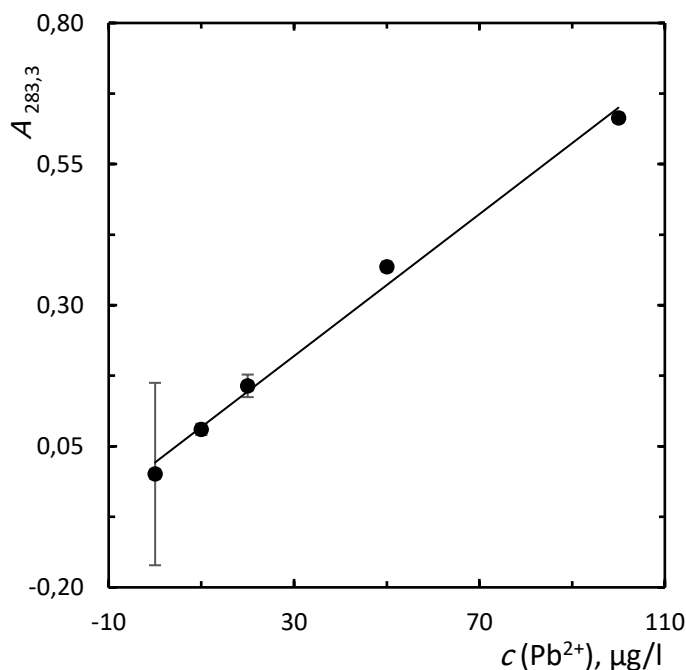
Krok	Název	Teplota [°C]	Zvýšení [°C/s]	Doba [s]	Celkový čas [s]	Plyn
1	Sušení	80	6	20	29,7	Max
2	Sušení	90	3	20	23,3	Max
3	Sušení	110	5	10	14,0	Max
4	Pyrolýza	350	50	20	24,8	Max
5	Pyrolýza	800	300	10	11,5	Max
6	Úprava plynu	800	0	5	5,0	Stop
7	Atomizace	1500	1500	4	4,5	Stop
8	Čištění	2450	500	4	5,9	Max

Tab. 4.4 Teplotní program přístroje ContrAA® 700 pro stanovení kadmia

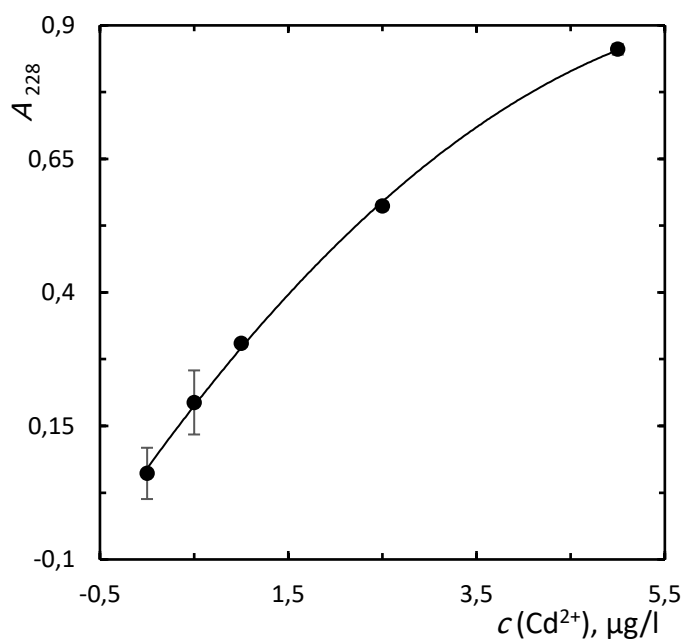
Krok	Název	Teplota [°C]	Zvýšení [°C/s]	Doba [s]	Celkový čas [s]	Plyn
1	Sušení	80	6	20	29,2	Max
2	Sušení	90	1	20	30,0	Max
3	Sušení	110	1	10	30,0	Max
4	Pyrolýza	350	50	20	24,8	Max
5	Pyrolýza	500	300	10	10,5	Max
6	Úprava plynu	500	0	5	5,0	Stop
7	Atomizace	1600	1400	3	3,8	Stop
8	Čištění	2450	500	4	5,7	Max

#### 4.2.2 Kalibrace metody a základní charakteristiky stanovení

Pro zjištění kalibrační závislosti byly připraveny roztoky o koncentracích olova 0; 10; 20; 50 a 100 µg/l a roztoky o koncentracích kadmia 0; 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0 µg/l. Roztoky byly následně proměřeny na přístroji ContrAA® 700. Naměřené hodnoty absorbance pro olovo jsou graficky zaznamenány na Obr. 4.12 a pro kadmium na Obr. 4.13.



Obr. 4. 12 Kalibrační závislost absorbance roztoků olova na jejich koncentraci  
 $T_{\text{pyr}} = 800^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{ato}} = 1500^\circ\text{C}$



Obr. 4. 13 Kalibrační závislost absorbance roztoků kadmia na jejich koncentraci  
 $T_{\text{pyr}} = 500^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{ato}} = 1600^{\circ}\text{C}$

Základní charakteristiky metody ET-AAS pro stanovení koncentrace olova a metody ET-AAS pro stanovení koncentrace kadmia byly spočteny z lineárních částí kalibračních závislostí a z 6krát naměřených hodnot absorbance roztoků o koncentraci olova 0 a 50 µg/l a roztoků o koncentraci kadmia 0 a 5,0 µg/l. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.5.

Tab. 4.5 Základní charakteristika metody ET-AAS pro stanovení koncentrace olova a kadmia

Charakteristika	Stanovení olova	Stanovení kadmia
Opakovatelnost [%]	1,947	4,117
Citlivost [l/µg]	0,007	0,196
Mez detekce [µg/l]	0,026	0,029
Mez stanovitelnosti [µg/l]	0,086	0,096
Lineární dynamický rozsah [µg/l]	0 – 50	0 – 2,5

### 4.2.3 Analýza vzorků ovocných šťáv

Poté, co byla provedena optimalizační studie, následovalo měření samotných vzorků extraktů ovoce a zeleniny. Analýza probíhala na přístroji ContrAA® 700 za optimálních podmínek metody ET-AAS pro stanovení koncentrace olova a kadmia zjištěných během optimalizační studie. Tyto podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.2.1 Optimalizace. Výpočet koncentrace a směrodatných odchylek byl proveden pomocí softwaru počítače připojeném k přístroji. Pro sestavení kalibračních závislostí byl použit standardní roztok olova o koncentraci 100 µg/l a standardní roztok kadmia o koncentraci 5 µg/l, jako blank byla použita deionizovaná voda. Ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl modifikátoru matrice. Koncentrace olova a kadmia byla měřena v různě zředěných roztocích extraktů z ovoce a zeleniny. Ředění jednotlivých roztoků bylo zahrnuto do výpočtu koncentrace.

### 4.2.4 Vyhodnocení výsledků

Naměřené koncentrace olova a kadmia v jednotlivých extraktech byly následně porovnány s maximálními limity pro tyto kovy v potravinách. Maximální povolené meze těžkých kovů v potravinách jsou dané Nařízením Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006<sup>30</sup>. Oddíly vztahující se k limitům pro olovo a kadmium jsou upraveny a rozšířeny v podobě pozdějších předpisů Nařízení Komise (EU) č. 420/2011 ze dne 29. dubna 2011<sup>31</sup> a Nařízení Komise (EU) č. 2015/1005 ze dne 25. června 2015<sup>32</sup>, kterými se mění Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006. Maximální povolené meze těžkých kovů v ovoci a zelenině jsou uvedeny v Tab. 4.6 pro olovo a v Tab. 4.7 pro kadmium.

Tab. 4.6 Maximální povolené meze olova v ovoci a zelenině. Převzato z <sup>30, 31, 32</sup>

Potravina	Maximální limit (mg/kg čerstvé hmotnosti)
Zelenina kromě košťálové zeleniny listové, koží brady, listové zeleniny a čerstvých bylinek, hub, mořských řas a plodové zeleniny	0,10
Košťálová zelenina listová, listová zelenina kromě čerstvých bylinek a tyto houby: žampion, hlíva ústřičná a houba shiitake	0,30
Plodová zelenina	
kukuřice cukrová	0,10
jiná než kukuřice cukrová	0,05
Ovoce kromě brusinek, rybízu, bezinek a plodů planiky	0,10
Brusinky, rybíz, bezinky a plody planiky	0,20



Tab. 4.7 Maximální povolené meze kadmia v ovoci a zelenině. Převzato z<sup>30, 31, 32</sup>

Potravina	Maximální limit (mg/kg čerstvé hmotnosti)
Zelenina a ovoce, kromě listové zeleniny, čerstvých bylinek, košťálové zeleniny listové, hub, řapíkaté a stonkové zeleniny, kořenové a hlíznaté zeleniny a mořských řas	0,050
Řapíkatá a stonková zelenina, kořenová a hlíznatá zelenina, kromě celeru bulvového	0,10
Listová zelenina, čerstvé bylinky, košťálová zelenina listová, celer bulvový a tyto houby: žampion, hlíva ústříčná, houba shiitake	0,20

Zjištěné výsledky koncentrace olova v jednotlivých extraktech jsou shrnuty v Tab. 4.8, v Tab. 4.9 jsou uvedeny stanovené koncentrace kadmia.

Tab. 4.8 Naměřené hodnoty koncentrace olova v jednotlivých extraktech ovoce a zeleniny a mezní hodnoty olova, které může obsahovat vzorek ovoce nebo zeleniny podle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006.

Číslo vzorku	Vědecký název rostliny	Zdroj extraktu	Mezní hodnota [mg/kg]	Exp. zjištěná koncentrace Pb <sup>2+</sup> [μg/kg]	Shoda s mezní hodnotou [%]
1	<i>Prunus armeniaca</i>	meruňka	0,10	3,77±0,10	3,77
2	<i>Rubus idaeus</i>	malina	0,10	65,37±0,52	65,37
3	<i>Fragaria vesca</i>	jahoda	0,10	3,60±0,12	3,60
4	<i>Prunus persica</i>	broskev	0,10	4,56±0,09	4,56
6	<i>Ribes rubrum</i>	červený rybíz	0,20	4,45±0,11	2,22
8	<i>Prunus cerasus</i>	višeň	0,10	4,05±0,12	4,05
9	<i>Diospyros kaki</i>	kaki	0,10	0,87±0,07	0,87
10	<i>Pyrus pyrifolia</i>	nashi	0,10	7,93±0,11	7,93
11	<i>Cucurbita moschata</i>	máslová dýně	0,05	2,87±0,02	5,73
12	<i>Actinidia deliciosa</i>	kiwi	0,10	8,46±0,16	8,46
13	<i>Solanum</i>	rajče	0,05	3,57±0,02	7,14
14	<i>Citrus sinensis</i>	pomeranč	0,10	8,47±0,07	8,47
15	<i>Citrus limon</i>	citron	0,10	4,84±0,03	4,84
16	<i>Citrus limetta</i>	limetka	0,10	2,33±0,12	2,33
17	<i>Cucurbita pepo</i>	cuketa	0,05	3,79±0,05	7,58
18	<i>Citrus reticulata</i>	mandarinka	0,10	3,98±0,14	3,98
19	<i>Persea americana</i>	avokádo	0,10	0,99±0,05	0,99
20	<i>Citrus maxima</i>	pomelo	0,10	1,27±0,04	1,27
21	<i>Citrus paradisi</i>	grep	0,10	8,66±0,20	8,66
22	<i>Petroselinum</i>	petržel	0,10	2,18±0,11	2,18
23	<i>Daucus carota</i>	mrkev	0,10	2,79±0,01	2,79
24	<i>Kurkuma longa</i>	kurkumovník dlouhý	0,30	3,11±0,10	1,04
25	<i>Zingiber officinale</i>	zázvor	0,30	9,81±0,21	3,27
26	<i>Beta vulgaris</i>	červená řepa	0,10	9,50±0,04	9,50
27	<i>Allium cepa</i>	cibule	0,05	3,99±0,17	7,98
28	<i>Apium graveolens</i>	miřík celer	0,10	1,06±0,06	1,06
29	<i>Lactuca sativa</i>	hlávkový salát	0,30	3,30±0,11	1,10
30	<i>Brassica oleracea</i>	kedluben	0,30	3,31±0,03	1,10
31	<i>Lactuca sativa</i>	ledový salát	0,30	2,53±0,06	0,84
32	<i>Brassica rapa</i>	čínské zelí	0,30	1,20±0,03	0,40
33	<i>Brassica oleracea</i>	brokolice	0,30	5,43±0,12	1,81
34	<i>Alpinia galanga</i>	galgán červený	0,30	10,16±0,77	3,39
35	<i>Raphanus sativus</i>	ředkvička	0,10	2,06±0,06	2,06
36	<i>Spinacia oleracea</i>	špenát setý	0,30	2,39±0,17	0,80
37	<i>Raphanus sativus</i>	ředkev bílá	0,10	7,12±0,13	7,12
38	<i>Alpinia officinarum</i>	galgán bílý	0,30	39,83±0,63	13,28

Tab. 4.9 Naměřené hodnoty koncentrace kadmia v jednotlivých extraktech ovoce a zeleniny a mezní hodnoty kadmia, které může obsahovat vzorek ovoce nebo zeleniny podle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006.

Číslo vzorku	Vědecký název rostliny	Zdroj extraktu	Mezní hodnota [mg/kg]	Experimentálně zjištěná koncentrace Cd <sup>2+</sup> [µg/l]	Shoda s mezní hodnotou [%]
1	<i>Prunus armeniaca</i>	meruňka	0,05	0,53±0,05	1,07
2	<i>Rubus idaeus</i>	malina	0,05	0,79±0,03	1,59
3	<i>Fragaria vesca</i>	jahoda	0,05	1,44±0,05	2,87
4	<i>Prunus persica</i>	broskev	0,05	2,45±0,04	4,91
6	<i>Ribes rubrum</i>	červený rybíz	0,05	1,35±0,02	2,70
8	<i>Prunus cerasus</i>	višeň	0,05	0,49±0,04	0,98
9	<i>Diospyros kaki</i>	kaki	0,05	0,14±0,05	0,27
10	<i>Pyrus pyrifolia</i>	nashi	0,05	5,49±0,04	10,97
11	<i>Cucurbita</i>	máslová dýně	0,20	0,81±0,03	0,41
12	<i>Actinidia deliciosa</i>	kiwi	0,05	1,93±0,02	3,86
13	<i>Solanum</i>	rajče	0,05	1,03±0,01	2,06
14	<i>Citrus sinensis</i>	pomeranč	0,05	1,10±0,02	2,20
15	<i>Citrus limon</i>	citron	0,05	0,93±0,02	1,85
16	<i>Citrus limetta</i>	limetka	0,05	1,40±0,03	2,80
17	<i>Cucurbita pepo</i>	cuketa	0,20	0,59±0,01	0,30
18	<i>Citrus reticulata</i>	mandarinka	0,05	0,91±0,06	1,83
19	<i>Persea americana</i>	avokádo	0,05	0,94±0,01	1,89
20	<i>Citrus maxima</i>	pomelo	0,05	0,45±0,04	0,91
21	<i>Citrus paradisi</i>	grep	0,05	1,15±0,01	2,31
22	<i>Petroselinum</i>	petržel	0,10	2,59±0,06	2,59
23	<i>Daucus carota</i>	mrkev	0,10	2,14±0,03	2,14
24	<i>Kurkuma longa</i>	kurkumovník	0,20	2,24±0,02	1,12
25	<i>Zingiber officinale</i>	zázvor	0,20	1,95±0,02	0,98
26	<i>Beta vulgaris</i>	červená řepa	0,10	6,65±0,05	6,65
27	<i>Allium cepa</i>	cibule	0,10	10,55±0,08	10,55
28	<i>Apium graveolens</i>	miřík celer	0,20	2,52±0,01	1,26
29	<i>Lactuca sativa</i>	hlávkový salát	0,20	4,72±0,03	2,36
30	<i>Brassica oleracea</i>	kedluben	0,20	1,03±0,03	0,52
31	<i>Lactuca sativa</i>	ledový salát	0,20	1,08±0,01	0,54
32	<i>Brassica rapa</i>	čínské zelí	0,20	1,48±0,02	0,74
33	<i>Brassica oleracea</i>	brokolice	0,20	0,76±0,07	0,38
34	<i>Alpinia galanga</i>	galgán červený	0,20	1,09±0,05	0,54
35	<i>Raphanus sativus</i>	ředkvička	0,10	0,88±0,03	0,88
36	<i>Spinacia oleracea</i>	špenát setý	0,20	3,77±0,04	1,89
37	<i>Raphanus sativus</i>	ředkev bílá	0,10	1,73±0,01	1,73
38	<i>Alpinia</i>	galgán bílý	0,20	1,40±0,04	0,70

### 4.3 Shrnutí výsledků

Za nejvíce nebezpečné prvky pro životní prostředí se považují As, Cr, Cu, Cd, Ni, Hg, Pb a Zn. Vysoký obsah těchto kovů v zemědělské půdě znamená riziko kontaminace rostlin. Potravinou se tyto kovy následně dostanou do lidského těla<sup>33</sup>.

Zdroje toxických kovů, hlavně olova, kadmia a zinku, jsou především průmyslové procesy, kontaminovaná odpadní voda a hnojiva a výfukové plyny. Transportní proteiny rostliny zřejmě neumí ionty olova, kadmia a zinku odlišit od prvků nezbytných pro její život, a proto jsou kořenovým systémem z půdy snadno přijímány. V buňkách poté dochází k inaktivaci některých enzymů. Odolnost rostlin vůči působení těžkých kovů se mezidruhově liší<sup>34</sup>.

Vliv na obsah každého prvku u daného druhu ovoce či zeleniny záleží na mnoha faktorech: povaze ovoce a zeleniny, minerálním složení půdy tzn. dostupnosti daného prvku, minerálním složení zavlažovací vody, povětrnostních podmínkách, zemědělských postupech jako jsou druhy a množství použitých hnojiv, atmosférickém ukládání kovů z průmyslových činností a emisi z vozidel<sup>27</sup>.

V této práci byl sledován obsah olova a kadmia ve vybraných extraktech z ovoce a zeleniny. Obsah těchto kovů byl porovnán s maximální povolenou hodnotou pro daný prvek. Žádný z analyzovaných vzorků nepřesáhl maximální povolené meze olova ani kadmia. Největší obsah olova byl naměřen ve vzorku číslo 2 (malina) a to  $65,37 \pm 0,52 \mu\text{g/kg}$ , což odpovídá 65,37 % maximální povolené meze. Vyšší obsah olova byl také zjištěn ve vzorku číslo 38 (galgán bílý), kde bylo stanoveno  $39,83 \pm 0,63 \mu\text{g/kg}$ . Mez pro obsah olova je v tomto případě 0,30 mg/kg, a proto je shoda s mezní hodnotou 13,28 %.

Nejnižší koncentrace olova byla zjištěna u vzorku číslo 9 (kaki) a to  $0,87 \pm 0,07 \mu\text{g/kg}$ , což odpovídá 0,87 % maximální povolené hodnoty. Nejmenší shodu s mezní hodnotou 0,40 % měl vzorek číslo 32 (čínské zelí).

Nejvyšší koncentrace kadmia byla zjištěna ve vzorku číslo 27 (cibule)  $10,55 \pm 0,08 \mu\text{g/kg}$ , což odpovídá 10,55 % mezní hodnoty. Naopak nejnižší koncentraci kadmia měl vzorek číslo 9 (kaki) a to  $0,14 \pm 0,05 \mu\text{g/kg}$ , což je 0,27 % maximální povolené meze.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že nejméně kontaminovaným vzorkem byl vzorek číslo 9 (kaki).

## 5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo hlavním cílem stanovení olova a kadmia ve 36 vzorcích extraktů ovoce a zeleniny pomocí metody atomové absorpční spektrometrie. Pro splnění cíle byla nejprve provedena optimalizační studie pro plamenovou a elektrotermickou atomizaci. Při optimalizaci atomizace plamenem byl sledován vliv výšky paprsku nad hranou hořáku, rychlosti průtoku paliva, horizontální polohy hořáku, šířky spektrálního intervalu a velikosti napájecího proudu výbojky na velikost signálu. Optimalizační studie pro elektrotermickou atomizaci zahrnovala vliv teploty pyrolýzy a atomizace na velikost signálu. Pro plamenovou atomizaci byl použit přístroj GBC 933 AA, pro atomizaci elektrotermickou byl přístroj ContrAA® 700.

U obou metod byla dále provedena kalibrace a stanovení základních charakteristik metody. Ze zjištěných hodnot charakteristik byla pro analýzu vlastních vzorků využita metoda atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány a zjištěné hodnoty byly porovnány s maximální přípustnou hodnotou pro ovoce a zeleninu podle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006 a příslušných doplňujících dokumentů. Žádný z analyzovaných vzorků extraktů ovoce a zeleniny nepřekročil maximální povolené meze olova ani kadmia. Největší obsah olova byl naměřen ve vzorku číslo 2 (malina), nejnižší obsah olova ve vzorku číslo 9 (kaki). Nejvyšší koncentrace kadmia byla zjištěna ve vzorku číslo 27 (cibule), naopak nejnižší koncentrace ve vzorku číslo 9 (kaki).

Závěrem lze říci, že všechny vytyčené cíle této bakalářské práce byly úspěšně splněny.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G.: *Inorganic chemistry*. 2nd ed. UK, Pearson 2005.
- [2] Greenwood, N. N., Earnshaw, A.: *Chemistry of the elements*. 2nd ed, UK, Butterworth-Heinemann 1997.
- [3] Cotton, F. A.; Wilkinson, G.: *Anorganická chemie*. Praha, Academia 1973.
- [4] Horák, J.; Linhart, I.; Klusoň, P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vydání, Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2004.
- [5] Pavlíková, D.; Pavlík, M.; Matějů, L.; Balík, J.: *Ekotoxikologie*. 2. vydání, Praha, Česká zemědělská univerzita v Praze 2008.
- [6] de Souza, I. D., de Andrade, A. S., Dalmolin, R.J.S.: *Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning*. *Critical Reviews in Toxicology* 48, 375–386 (2018) <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>
- [7] Holzbecher, Z.; Churáček, J. a kol.: *Analytická chemie*. Praha, SNTL 1987.
- [8] Hillebrand, W. F.; Lundell, G. E. F.: *Vybrané metody anorganické analýsy*. Praha, SNTL 1958.
- [9] Renger, F.; Kalous, J.: *Analytická chemie I*. Pardubice, Univerzita Pardubice 2004.
- [10] Záruba, K. a kol.: *Analytická chemie (1. díl)*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2016.
- [11] Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*. Praha, Karolinum 2005.
- [12] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2003.
- [13] Bernhoft, R. A.: *Cadmium Toxicity and Treatment*. *The Scientific World Journal* 2013, 1–7 (2013) <https://doi.org/10.1155/2013/394652>

- [14] Bertin, G., Averbeck, D.: *Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)*. *Biochimie* 88, 1549–1559 (2006) <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.001>
- [15] Zýka, J. a kol.: *Analytická příručka 2*. 3. vydání, Praha, SNTL 1980.
- [16] Praus, P.; Vontorová, J.: *Analytická chemie II*. Ostrava, Vysoká škola báňská-Technická univerzita Ostrava 2015.
- [17] Černohorský, T.; Jandera, P.: *Atomová spektroskopie*. 1. vydání, Pardubice, Univerzita Pardubice 1997.
- [18] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*. 7th ed. USA, Cengage Learning 2018.
- [19] Harvey, D.: *Modern analytical chemistry*. USA, McGraw-Hill 2000.
- [20] Fifield, F. W.; Kealey, D.: *Principles and practice of analytical chemistry*. USA, Blackwell Science 2000.
- [21] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.: *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th ed. USA, Cengage Learning 2013.
- [22] Ackah, M.; Anim, A. K.; Zakaria, N.; Osei, J.; Saah-Nyarko, E.; Gyamfi, E. T.; Tulasi, D.; Enti-Brown, S.; Hanson, J.; Bentil, N. O.: *Determination of some heavy metal levels in soft drinks on the Ghanaian market using atomic absorption spectrometry method*. *Environ Monit Assess* 186, 8499–8507 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4019-8>
- [23] Cavallini, N. G.; Reis, R. A.; Quadros, J.; Oliveira, A.; Nazário, M. G.; Tiepolo, L. M.: *Determination of Lead (Pb) in stools of Lontra longicaudis (Olfers, 1818) by flame atomic absorption spectrometry (FAAS)*. *Eclat. Quim. J.* 43, 70 (2018). <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.1SI.2018.p70-78>
- [24] Wodaje, A. T.: *Assessment of some heavy metals concentration in selected cereals collected from local markets of Ambo City, Ethiopia*. *J. Cereals Oilseeds* 6, 8–13 (2015). <https://doi.org/10.5897/JCO15.0138>

- [25] Sürme, Y.; Bişgin, A. T.; Uçan, M.; Narin, I.: *Cloud Point Extraction and Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Cd(II) in Industrial and Environmental Samples*. *J Anal Chem* 73, 140–144 (2018). <https://doi.org/10.1134/S1061934818020120>
- [26] Cucu, A. K.; Topkaya, M.; Erdogan, G.; Aboul-Enein, H. Y.: *Quantitative Determination of Heavy Metal Contamination in Horse Mackerel and Whiting Caught in the Sea of Marmara*. *Bull Environ Contam Toxicol* 102, 498–503 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02574-5>
- [27] Anastácio, M.; dos Santos, A. P. M.; Aschner, M.; Mateus, L.: *Determination of trace metals in fruit juices in the Portuguese market*. *Toxicology Reports* 5, 434–439 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.010>
- [28] Molina, L.; Lapis, J. R.; Sreenivasulu, N.; Cuevas, R. P. O.: *Determination of Cadmium Concentration in Milled and Brown Rice Grains Using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*. In: Sreenivasulu, N. (Ed.), *Rice Grain Quality. Methods in Molecular Biology*, vol. 1892, Human Press, New York, pp. 265–275 (2019). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8914-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8914-0_15)
- [29] Christian, G. D.; Dasgupta, P. K.; Schug, K. A.: *Analytical Chemistry*. 7th ed. USA, Wiley 2014.
- [30] Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. *Úřední věstník Evropské unie*. Dostupné z URL: <[https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.2006.364.01.0005.01.CES](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2006.364.01.0005.01.CES)> [cit. 9.1.2020]
- [31] Nařízení Komise (EU) č. 420/2011 ze dne 29. dubna 2011, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. *Úřední věstník Evropské unie*. Dostupné z URL: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32011R0420>> [cit. 9.1.2020]



- [32] Nařízení Komise (EU) č. 2015/1005 ze dne 25. června 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity olova v některých potravinách. *Úřední věstník Evropské unie*. Dostupné z URL: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32015R1005>> [cit. 9.1.2020]
- [33] Adriano, D. C.: *Trace elements in terrestrial environments*. New York, Springer-Verlag 2001
- [34] Procházka, S.; Macháčková, I.; Krekule, J.; Šebánek, J. a kol.: *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia 1998