

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Karolína Petráňová

ANALÝZA EXTRAKTŮ OVOCE A ZELENINY METODAMI
ATOMOVÉ SPEKTROMETRIE

Analysis of fruits and vegetables extracts by atomic spectrometry
method

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 4. 8. 2020

Karolína Petráňová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Jakobovi Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a ochotu pomoci a poradit při zpracování této práce.

Abstrakt CZ

V této bakalářské práci bylo cílem stanovit vybrané prvky, konkrétně chrom, měď, železo, mangan a zinek v extraktech ovoce a zeleniny. Metodou stanovení byla atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací.

Před samotnou analýzou vzorků byla provedena optimalizace podmínek pro stanovení u jednotlivých prvků. Konkrétně byla stanovena optimální výška paprsku nad hranou hořáku a také bylo zjišťováno vhodné naředění vzorků. Následně byly stanoveny základní charakteristiky stanovení jednotlivých prvků za optimálních podmínek.

Při analýze reálných vzorků extraktů byly používány zjištěné optimální podmínky. Připravené vzorky byly před samotným měřením vhodně naředěny. Ve všech 36 extraktech z ovoce a zeleniny byl stanoven obsah všech 4 vybraných prvků. Veškeré výsledky byly opatřeny statistickým vyhodnocením.

Klíčová slova

Atomová absorpční spektrometrie, plamenová atomizace, železo, chrom, zinek, měď, mangan, ovocné extrakty, zeleninové extrakty

Abstract EN

The aim of this thesis was to determine selected elements – chromium, manganese, copper, iron and zinc – in fruit and vegetable extracts. The method used for measurement was atomic absorption spectrometry with flame atomization.

First, the optimal conditions for the measurement were found. Then the basic characteristics of the determination of each element under optimal conditions were determined.

The determined optimal conditions were used in the analysis of real samples of extracts. The samples were appropriately diluted before measurement. The content of all 4 selected elements was determined in all 36 extracts from fruits and vegetables. All results were provided with statistical evaluation.

Key words EN

Atomic absorption spectrometry, flame atomization, iron, chromium, zinc, copper, manganese, fruit extract, vegetable extract

Obsah práce

1 ÚVOD.....	8
1.1 Cíl bakalářské práce.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Atomová absorpční spektrometrie.....	9
2.1.1 Instrumentace v AAS.....	9
2.2 Stanovované prvky.....	12
2.2.1 Chrom.....	12
2.2.2 Měď.....	13
2.2.3 Železo.....	14
2.2.4 Mangan.....	14
2.2.5 Zinek.....	15
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	16
3.1 Používané přístroje a zařízení, pracovní parametry.....	16
3.2 Používané chemikálie.....	16
3.3 Postup prací.....	16
3.3.1 Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku.....	16
3.3.2 Kalibrace.....	17
3.3.3 Příprava vzorků.....	17
3.3.4 Stanovení koncentrace ve vzorcích.....	19
3.4 Statistické vyhodnocení.....	19
3.4.1 Základní charakteristiky měření.....	20
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE.....	22
4.1 Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku.....	22
4.2 Kalibrace.....	23
4.3 Stanovení základních charakteristik metody.....	25
4.4 Analýza vzorků.....	25
5 ZÁVĚR.....	28
6 POUŽITÁ LITERATURA.....	29

Seznam použitých zkratk a symbolů

a	směrnice kalibrační závislosti
AAS	atomová absorpční spektrometrie (z angl. atomic absorption spectrometry)
c	koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
h	ustálená hodnota signálu šumu
k_n	tabelovaný koeficient pro výpočet směrodatné odchylky
K_N	tabelovaný koeficient pro výpočet intervalu spolehlivosti
$L_{1/2}$	interval spolehlivosti
LOD	mez detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)
n	počet opakování měření
R	rozpětí hodnot výsledků
S	velikost signálu
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
\bar{x}	aritmetický průměr
\tilde{x}	medián
x_i	hodnota i-tého měření
x_{\max}	maximální hodnota daného měření
x_{\min}	minimální hodnota daného měření

1 ÚVOD

Vybrané prvky, stanovované v této bakalářské práci (Cu, Cr, Fe, Mn, Zi) se řadí mezi biogenní prvky. V lidském těle jsou zastoupeny stopově a pro organismus jsou nepostradatelné. Mají rozmanité funkce, nejčastěji jsou však součástí enzymů, případně hormonů. Mnohé z těchto prvků hrají nezastupitelnou roli v životně důležitých procesech v lidském organismu, jako je buněčné dýchání nebo metabolismus živin.

Atomová absorpční spektrometrie, která byla použita k analýze vzorků v této práci, umožňuje analýzu mnoha různých prvků – zejména kovů a přechodných kovů. Umožňuje sledování nízkých i vyšších koncentrací těchto prvků ve vzorcích přírodního původu, zejména díky své citlivosti a selektivitě.

1.1 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení vybraných prvků v přírodních extraktech metodou atomové absorpční spektrometrie. Dílčími kroky, díky nimž bylo možné stanovit obsah daných prvků ve vzorcích, byla optimalizace podmínek měření pro každý z prvků, nalezení základních charakteristik měření (citlivost, mez detekce a stanovitelnosti, lineární dynamický a pracovní rozsah) a správná úprava vzorků před analýzou (vhodné ředění).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS), je analytická optická metoda, která je založena na měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Atom je převeden do vyššího energetického stavu právě absorpcí elektromagnetického záření [1].

2.1.1 Instrumentace v AAS

Základními částmi atomového absorpčního spektrofotometru jsou zdroj záření, atomizátor, monochromátor a detektor, viz Obr. 2.1. Po detektoru následuje zařízení pro záznam a vyhodnocení výsledku měření. [2]



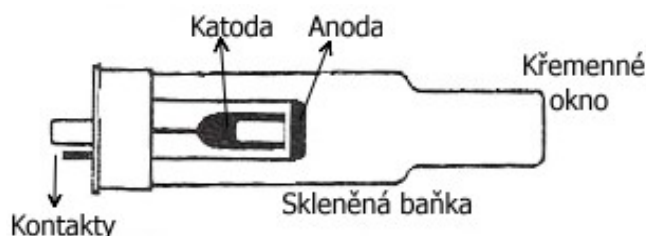
Obr. 2.1: Schéma uspořádání základních částí přístroje pro AAS. (Převzato a upraveno dle [2])

Principem funkce přístroje je, že ze zdroje primárního záření vystupuje záření jednotlivých emisních čar prvku, které prochází absorpčním prostředím a volné atomy prvku zde absorbují určité vlnové délky z tohoto dopadajícího záření. Monochromátor následně izoluje vybranou, obvykle rezonanční, čáru záření a ostatní čáry štěrbinou neprojdou. V detekčním systému je zaznamenáváno zeslabení intenzity původního záření [1].

Zdroje primárního záření

Nejčastěji je využíváno čárových zdrojů záření, které emitují intenzivní zářivou energii v úzkém spektrálním intervalu. Pro každý prvek, který je možné měřit pomocí AAS existuje doporučená spektrální čára charakterizovaná konkrétní vlnovou délkou, při které lze dosáhnout vysoké a charakteristické absorpce tohoto záření stanovovaným prvkem [3].

Nejčastěji používané zdroje záření v AAS jsou výbojky s dutou katodou, jejichž schéma je na Obr. 2.2. Tyto výbojky emitují čárové spektrum prvku, který má být stanovován [4]. Dutá katoda je vyrobena ze sledovaného prvku, nebo je jím plněna. Anoda je vyrobena obvykle z niklu, zirkonu, tantalu, nebo wolframu. Skleněná trubice výbojky je při výrobě evakuována a následně naplněna inertním plynem, obvykle neonem, nebo argonem [5].



Obr. 2.2: Schéma výbojky s dutou katodou. Převzato a upraveno dle [1].

Charakteristické záření vzniká po vložení vysokého napětí na obě elektrody, díky čemuž se vytvoří mezi elektrodami doutnavý výboj. Jeho vznik a průběh souvisí s tvorbou iontů vzácného plynu, které jsou přitahovány ke katodě. Tyto ionty vyrážejí atomy stanovovaného prvku z povrchu katody a ty se následně excitují při srážkách s dalšími částicemi. Při návratu excitovaných atomů stanovovaného prvku do základního stavu dochází k emisi charakteristického záření [4].

Dalším možným zdrojem primárního záření jsou bezelektrodové výbojky. Bezelektrodové výbojky emitují užší čáry s vyšší intenzitou, než výbojky s dutou katodou [5]. Díky vyšší intenzitě čar jsou tyto výbojky vhodné pro stanovení prvků, které mají své rezonanční linie pod 220 nm [1].

Bezelektrodová výbojka je tvořena křemennou baňkou, která je naplněna vzácným plynem, obvykle argonem. Výbojka obsahuje stanovovaný prvek ve formě těkavé sloučeniny. Okolo této baňky je cívka, do které je generátorem dodávána vysokofrekvenční energie, která je potřebná k vytvoření stabilního výboje [4].

Atomizátory

V atomizátoru dochází ke vzniku volných atomů stanovovaného prvku z roztoku

vzorku. Atomizace je velmi důležitý krok v celém procesu měření, a velmi na něm závisí citlivost stanovení [5]. Atomizace probíhá u většiny prvků nejčastěji za vysokých teplot prostřednictvím termodisociačních procesů termochemickými reakcemi [4].

Často využívaným způsobem atomizace je plamenová technika. Prvním krokem této atomizace kapalného vzorku je jeho převedení na jemný aerosol, který následně vstupuje do plamene atomizátoru [6]. Zmlžování vzorku probíhá ve zmlžovači. Ze vzniklého aerosolu jsou následně odstraněny větší kapky. V metodě AAS se obvykle využívají pneumatické zmlžovače, nebo zmlžovače vysokotlaké [2]. Vzniklý jemný aerosol je v proudu plynů spalován nad hlavicí hořáku, kdy hlavice hořáku musí být nastavena pod optickou osou přístroje tak, aby přicházející měrný paprsek procházel zónou plamene s největší koncentrací volných atomů stanovovaného analytu [4]. Volné atomy v plameni vznikají v několika krocích. Nejprve dochází k desolvataci, tedy k vypaření použitého rozpouštědla. Následně je látka převedena do plynného stavu, z něhož následně disociuje na požadované volné atomy. Kromě vzniku volných atomů může docházet ke vzniku iontů, molekul, nebo excitovaných atomů, což je pro měření nežádoucí. Dochází ke snížení koncentrace volných atomů, což následně snižuje detekční limit [6].

V AAS se obvykle využívají laminární předmíchané plameny. Do hořáku jsou vedeny již předem smíchané směsi paliva a okysličovadla. Palivem bývá nejčastěji acetylén, jako okysličovadlo se využívá vzduch, nebo oxid dusný. Pokud se jako okysličovadlo využívá vzduch, maximální teploty dosahují asi 2500 K. V případě oxidu dusného jsou maximální dosahované teploty plamene 2900 K [1]. Vlastní plamen se skládá z několika vrstev o různých teplotách, proto je potřeba pro každé stanovení nalézt optimální polohu hořáku tak, aby v měřené části plamene byla co nejvyšší koncentrace volných atomů stanovovaného prvku [2].

Elektrotermické atomizátory jsou zařízení, která jsou vyhřívána na potřebnou teplotu elektrickým proudem. Nejpoužívanějším materiálem pro tyto atomizátory je grafit a jeho různé modifikace. Atomizační teploty se poté dostávají až k 3000 °C [4]. Atomizátor je tvořen grafitovou trubicí, atomizace probíhá postupným ohřevem této trubice. Tato trubice je umístěna a držena tak, aby byla během měření v optické dráze atomového absorpčního spektrometru [1]. Atomizátor se musí nacházet v ochranné atmosféře (nejčastěji argonu, nebo dusíku), aby se zamezilo přístupu kyslíku a vzduchu k volným atomům a nemohlo dojít k oxidaci [2].

Výhodou tohoto způsobu atomizace je, že stačí pro analýzu výrazně menší množství vzorku. Zároveň veškerý použitý vzorek je atomizován, díky čemuž je mnohem vyšší okamžitá koncentrace volných atomů v plynné fázi [1].

Disperzní systém

Jako disperzní prvek se v AAS používá monochromátor [2]. Monochromátor slouží k izolaci spektrálního intervalu, ve kterém se nachází absorpční čára příslušející sledovanému prvku. Využívá se interferometricky zhotovených mřížek, s rozsahem vlnových délek 190 až 900 nm. Nejčastěji používaným uspořádáním je konstrukce Czerny -Turner [1].

Detektory

Nejčastěji používanými detektory v AAS jsou fotonásobiče. Fotonásobič tvoří skleněná baňka, ve které je vakuum. Uvnitř je fotosenzitivní katoda a anoda a devět až třináct dynod [6]. Celý fotonásobič je uzavřen ve světlotěsném pouzdru. Umístěn bývá hned za výstupní štěrbinou monochromátoru [2].

Detekce funguje na principu vyrazení elektronů při dopadu fotonů na fotokatodu, což je zapříčiněno fotoelektrickým efektem. Vyraženo je ale pouze pár elektronů a signál by byl špatně měřitelný. Proto elektrony pokračují na dynody, které mají postupně zvyšující se napětí. S každým nárazem na dynodu jsou produkovány z každého elektronu další sekundární elektrony. Tento kaskádový efekt vytvoří velké množství elektronů, jejichž intenzita je na konci změřena na anodě [6].

2.2 Stanovované prvky

Veškeré stanovované prvky v této práci se řadí mezi stopové prvky, což znamená, že se v těle vyskytují v řádu miligramů na kilogram. Jejich funkce jsou velice pestré, ale obvykle jsou součástí enzymů, nebo hormonů [7,8].

2.2.1 Chrom

V těle se chrom uplatňuje při metabolismu sacharidů a lipidů. Vyskytuje se převážně v živočišné potravě, v rostlinách je jeho obsah nižší [8]. Chrom se vyskytuje například ve vejcích, mořských plodech a masu, ale také v brokolici a zelených fazolích [9].

Toxicita chromu záleží na jeho oxidačním čísle – čím vyšší, tím jsou ionty chromu toxicitější. Na rostliny chrom působí různě – může zpomalovat růst, inhibovat některé enzymy a také může mít mutagenní účinky [10]. Pro lidské tělo způsobuje chrom akutně zejména poleptání sliznic, chronicky je karcinogenní [11].

Chrom je možné stanovit například pomocí volumetrie. Využívá se zde komplexotvorných reakcí s chelatačním činidlem – obvykle EDTA. Bod ekvivalence může být určen vizuálně s využitím indikátoru, nebo potenciometricky. Další možnou metodou stanovení je diferenční pulsní voltametrie, nebo spektrometrické metody, nejčastěji AAS [12].

2.2.2 Měď

Měď je v těle nepostradatelná, zaujímá důležitou katalytickou funkci při syntéze hemu a při absorpci železa. V potravě se měď vyskytuje například v rybách (zejména mořských), mořských měkkýších, ale také v oříšcích, bramborách i některé zelenině, či ovoci [13].

V rostlinách se vyskytuje prakticky výhradně ve formě komplexů, vázaná s bílkovinami, nebo nízkomolekulárními ligandy [14]. Je zde nepostradatelná pro normální růst a vývoj rostlin, také je součástí mnoha metaloproteinů. Účastní se mitochondriálního dýchání, nebo hormonální signalizace. Při nadbytku mědi ale dochází k inhibici růstu a narušení důležitých metabolických drah, konkrétně například přenosu elektronů při fotosyntéze. K podobným komplikacím může dojít i při nedostatku mědi v rostlině, proto existuje mnoho pochodů, pro udržení homeostázy [15].

Měď je možné stanovit mnoha analytickými metodami, jednou z nich může být elektrogravimetrie, což je elektrochemická metoda založená na elektrolýze stejnosměrným elektrickým proudem. Stanovovaný prvek je vylučován na inertní elektrodě, obvykle platinové. Měďnaté ionty jsou při stanovení redukovány na měď, která se vylučuje na elektrodě. Množství mědi v roztoku je zjištěno z přírůstku hmotnosti platinové elektrody [16]. Měď lze také stanovit pomocí komplexometrických titrací. Jako odměrný

roztok se nejčastěji využívá EDTA [12].

2.2.3 Železo

Železo je v těle přítomno ve formě řady sloučenin, které zajišťují nezbytné fyziologické funkce. Je nepostradatelné pro buněčné dýchání, přenos kyslíku v těle, nebo syntézu DNA [17].

Železo se obecně vyskytuje ve většině potravin živočišného i rostlinného původu [18]. V potravě se železo vyskytuje nejčastěji v trojmocné formě vázáno na proteiny a organické kyseliny, nebo v protoporphyrinu (hemu). Předpokladem resorpce železa je jeho uvolnění v rozpustné formě v žaludku [8]. Železo se vyskytuje v mase, jeho zvýšené množství je v játrech. Z rostlinné říše je železo možné najít hlavně v oříšcích, luštěninách, špenátu, petrželi, ale i v dalších [14].

Železo lze stanovit také titrací, zde je několik možností stanovení. Je možné využít chelatometrické titrace s vizuální, nebo potenciometrickou indikací bodu ekvivalence, jako u ostatních stanovovaných kovů. Lze také využít redoxní titrace, kdy se jako odměrný roztok využívá manganistan draselný [12]. Z optických metod se využívá například metoda AAS, která je popsána v této práci.

2.2.4 Mangan

Mangan je v těle nepostradatelným kovem – účastní se na správné imunitní funkci, regulaci krevního cukru a buněčné energie, reprodukci, trávení, růstu kostí nebo srážlivosti krve. V těle se vyskytuje obvykle ve formě metaloproteinů [19].

Obecně je mangan zastoupen mnohem více v rostlinných zdrojích, než v těch živočišných [14]. V rostlinách se mangan podílí například na fotosyntéze, také je nezbytný pro růst a vývoj rostlin. Pokud by ale hladina manganu byla příliš vysoká, stává se pro rostlinu toxickým [19]. Z rostlinné říše je mangan obsažen zejména v luštěninách a obilovinách. Z ovoce se mangan vyskytuje nejvíce v lesních plodech, například v malinách a borůvkách [14].

Toxicita manganu závisí na jeho oxidačním stavu, jeho toxicita stoupá se zvyšujícím se oxidačním číslem. Mezi chronické projevy patří tzv. manganismus, při kterém dochází

k neurologickým projevům, jako je únava, nechutenství, třes [11].

Mangan lze stanovit různými analytickými metodami. Lze ho stanovit například volumetrií s potenciometrickou indikací. Odměrným roztokem je v tomto případě manganistan draselný, titrace se provádí v přítomnosti difisforečnanu [20] Také lze využít komplexotvorné reakce, kdy je odměrným roztokem EDTA [12]. Mangan lze stanovit také kolorimetricky. Kolorimetrie je metoda, při které se porovnává zbarvení roztoku o neznámé koncentraci zkoumané látky a roztoku se standardem o známé koncentraci [21]. Mangan je možné také velmi dobře stanovit elektrochemicky pomocí polarografie [12]. Stanovit ho lze také optickými metodami, zejména pomocí atomové absorpční spektrometrie, která je podrobně popsána dříve v textu.

2.2.5 Zinek

V těle je zinek nepostradatelný jako součást mnoha metaloenzymů – je nezbytný pro metabolismus bílkovin, tuků i sacharidů. Také pomáhá udržovat acidobazickou rovnováhu [8]. V rostlinách zinek plní katalytickou a regulační funkci, podílí se například na regulaci transkripce. Zinek je tedy pro rostliny nepostradatelný, ale jeho nadbytek může naopak uškodit. Při nadbytku zinku dochází k poškození kořenů a zpomalení růstu rostliny [22].

Vysoký obsah zinku mají hlavně potraviny živočišného původu, například hovězí maso, mléko, nebo rybí maso [8].

Stejně jako ostatní kovy lze i zinek stanovit volumetricky za využití komplexotvorné reakce s EDTA. Stanovit lze také pomocí polarografie [12] a optickými metodami jako je AAS.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Používané přístroje a zařízení, pracovní parametry

- Spektrometr GBC 933 AA (GBC Scientific Equipment, Australia)
- Výbojky s dutou katodou pro jednotlivé prvky (Cr, Cu, Fe, Mn, Zn) (Varian Techtron, Australia)
- Přístroj pro přípravu deionizované vody Milli-Q PLUS (Millipore, USA)

Použité pracovní parametry pro stanovení jednotlivých prvků jsou uvedené v následující Tab. 3.1.

Tab. 3.1: Pracovní parametry pro stanovení jednotlivých prvků

	Cr	Mn	Cu	Zn	Fe
Vlnová délka [nm]	357,9	279,5	324,7	213,9	248,3
Šířka spektrálního intervalu [nm]	0,2	0,2	0,2	1	0,2
Napájecí proud [mA]	7,0	5,0	4,0	5,0	5,0

3.2 Používané chemikálie

- Kyselina dusičná 65% (Lach-Ner spol., Česká republika)
- Standardní roztok chromu ($c = 1002 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Merck, Německo)
- Standardní roztok mědi ($c = 1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Analytika, Česká republika)
- Standardní roztok železa ($c = 1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Merck, Německo)
- Standardní roztok manganu ($c = 1001 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Merck, Německo)
- Standardní roztok zinku ($c = 1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Analytika, Česká republika)

3.3 Postup prací

3.3.1 Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku

Nejprve byly připraveny standardní roztoky sledovaných vzorků o koncentraci $2,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na spektrometru GBC 933 AA byla postupně proměřena absorbance

standardních roztoků jednotlivých prvků při různých výškách paprsku nad hranou hořáku. Hodnota žhavicího proudu byla nastavena na požadovanou hodnotu (viz tabulka 3.1). Proměřeno bylo 8 různých výšek paprsku nad hranou hořáku, paprsek primárního záření tedy procházel v různých výškových zónách plamene. Každé měření absorbance bylo provedeno ve třech opakováních, přičemž každé měření trvalo 3 s.

3.3.2 Kalibrace

Pro proměření kalibrace byly připraveny roztoky o předem daných koncentracích. Ty byly poté proměřeny na spektrometru při optimální výšce paprsku nad hranou hořáku a daném průtoku acetyleny pro daný prvek. Z naměřených hodnot byl sestaven kalibrační graf a vybrána oblast koncentrací, vhodných pro měření.

3.3.3 Příprava vzorků

Vzorky používané v této práci byly dodány z katedry biochemie. Soupis označení vzorků a jejich obsah je popsán v následující tabulce. Následně bude v práci používáno číselných označení jednotlivých vzorků.

Tab. 3.2: Soupis stanovovaných vzorků a jejich označení

Označení	Název	Latinský název
1	Meruňka	<i>Prunus armenica</i>
2	Maliny	<i>Rubus idaeus</i>
3	Jahoda	<i>Fragaria vesca</i>
4	Broskev	<i>Prunus persica</i>
6	Červený rybíz	<i>Ribes rubrum</i>
8	Višeň	<i>Prunus cerasus</i>
9	Kaki	<i>Diospyros kaki</i>
10	Nashi	<i>Pyrus pyrifolia</i>
11	Máslová dýně	<i>Cucurbita moschata</i>
12	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>
13	Rajské jablko	<i>Solanum lycopersicum</i>
14	Pomeranč	<i>Citrus sinensis</i>
15	Citron	<i>Citrus limon</i>
16	Limetka	<i>Citrus limetta</i>
17	Cuketa	<i>Cucurbita pepo</i>
18	Mandarinka	<i>Citrus reticulata</i>
19	Avokádo	<i>Persea americana</i>
20	Pomelo	<i>Citrus maxima</i>
21	Grep	<i>Citrus paradisi</i>
22	Petržel	<i>Petroselinum crispum</i>
23	Mrkev	<i>Daucus carota</i>
24	Kurkuma	<i>Kurkuma longa</i>
25	Zázvor	<i>Zingiber officinale</i>
26	Červená řepa	<i>Beta vulgar</i>
27	Cibule	<i>Allium cepa</i>
28	Celer	<i>Apium graveolens</i>
29	Hlávkový salát	<i>Lactuca sativa</i>
30	Kedluben	<i>Brassica oleracea</i>
31	Ledový salát	<i>Lactuca sativa</i>
32	Čínské zelí (brukev pekingská)	<i>Brassica rapa</i>
33	Brokolice (Brukev zelná)	<i>Brassica oleracea</i>
34	Galgán červený	<i>Alpinia galanga</i>
35	Ředkvička	<i>Raphanus sativus</i>
36	Špenát	<i>Spinacia oleracea</i>
37	Ředkev bílá	<i>Raphanus sativus</i>
38	Galgán bílý	<i>Alpinia officinarum</i>

3.3.4 Stanovení koncentrace ve vzorcích

Ke stanovení koncentrace vybraných prvků ve vzorcích bylo využito metody atomové absorpční spektrometrie. Stanovení bylo prováděné za dříve určených optimálních podmínek. Původní vzorky byly pro měření 5x zředěny. Čas jednoho měření byl 1 s a u každého vzorku bylo měření opakováno 3x.

3.4 Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování analytických výsledků je nedílnou součástí vyhodnocení analýzy. Výsledky statistického vyhodnocení lze využít pro zlepšování metody, ale hlavně pomáhají určit přesnost výsledků a odhalit potenciální chybu v měřicím postupu [23].

Pro soubor n výsledků, které mají hodnoty X může být centroidní tendence vyjádřena různými způsoby, které následně vedou k různým hodnotám. To je dáno tím, zda jsou při určení střední hodnoty zvažovány všechny hodnoty souboru a zda je daný parametr citlivý na okrajové hodnoty. Pro velké soubory se využívá aritmetického průměru, který zahrnuje veškeré hodnoty souboru, ale je citlivý na okrajové hodnoty [24]. Aritmetický průměr je vhodný pro soubory, u kterých se předpokládá Gaussovo rozložení. Vypočte se podle vzorce

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i \quad (3.1)$$

ve kterém n je počet opakování měření a x_i hodnota i -tého měření [25].

Při menším počtu měření se využívá medián, což je hodnota středního výsledku, nebo v případě sudého počtu hodnot průměru dvou středních hodnot, uspořádaných v řadě [24]. Výhodou mediánu je, že je stabilní a neovlivní ho, pokud se některý z výsledků vzdálí od středu dat [25].

Pro určení toho, jak moc jsou data soustředěna či rozptýlena kolem středních hodnot slouží směrodatná odchylka (s) [26]. Ta se vypočítá podle vzorce

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

kde, k_n je statistický tabelovaný koeficient pro daný počet měření a R je rozpětí, jež je definováno rozdílem mezi největším (x_{\max}) a nejmenším (x_{\min}) výsledkem z řady stanovení [23].

Pro vyjádření relativní variability se nejčastěji využívá variační koeficient, neboli

relativní směrodatná odchylka. Je definován poměrem směrodatné odchylky a aritmetického průměru, nebo mediánu. Je to bezrozměrné číslo, často se ale udává v procentech. Říká, z kolika procent se hodnoty v průměru odchyľují od mediánu/aritmetického průměru. Vypočítat ho lze dle vzorce [27]

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

Interval spolehlivosti ($L_{1,2}$) je interval v němž leží s předem danou pravděpodobností skutečná stanovovaná hodnota. Řadí se mezi základní statistické charakteristiky výsledků a obvykle se udává přímo u výsledku. Vypočítat ho lze podle vzorce

$$L_{1,2} = K_n \cdot R \quad (3.4)$$

kde, K_n je tabelovaný koeficient pro daný počet měření a zvolenou hladinu významnosti. Čím je interval užší, tím je daný naměřený výsledek přesnější a více odpovídá skutečné hodnotě [23].

3.4.1 Základní charakteristiky měření

Mez detekce (LOD) představuje nejmenší možnou koncentraci analytu, která může být detekována. Tuto koncentraci však nemusí být možné kvantifikovat, tedy stanovit přesné číslo [28]. Limit detekce se obvykle stanovuje jako takové množství analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu. Za šum je považována časová fluktuace měřeného signálu, kdy není přítomen analyt. Mez detekce lze tedy spočítat podle následujícího vzorce

$$LOD = \frac{3 \cdot h}{a} \quad (3.5)$$

kde, h představuje chybu signálu získanou měřením blanku, nebo ustálenou hodnotu signálu šumu, a je směrnice kalibrační závislosti [29].

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnížší možné množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako přesnou číselnou hodnotu se stanovenou nejistotou [29].

Mez stanovitelnosti se stanovuje jako desetinásobek velikosti šumu a lze ji vypočítat dle vzorce [29]

$$LOQ = \frac{10 \cdot h}{a} \quad (3.6)$$

Citlivost metody je dána změnou měřeného signálu vůči koncentraci měřeného analytu:

$$citlivost = \frac{dS}{dc} \quad (3.7)$$

kde, S je velikost signálu a c je koncentrace analytu ve vzorku. Za citlivou metodu můžeme považovat takovou metodu, která poskytne maximální změnu měřeného signálu v přítomnosti analytu. Citlivost vyjadřuje směrnice kalibrace, pouze pokud se jedná o kalibraci s lineárním průběhem [29].

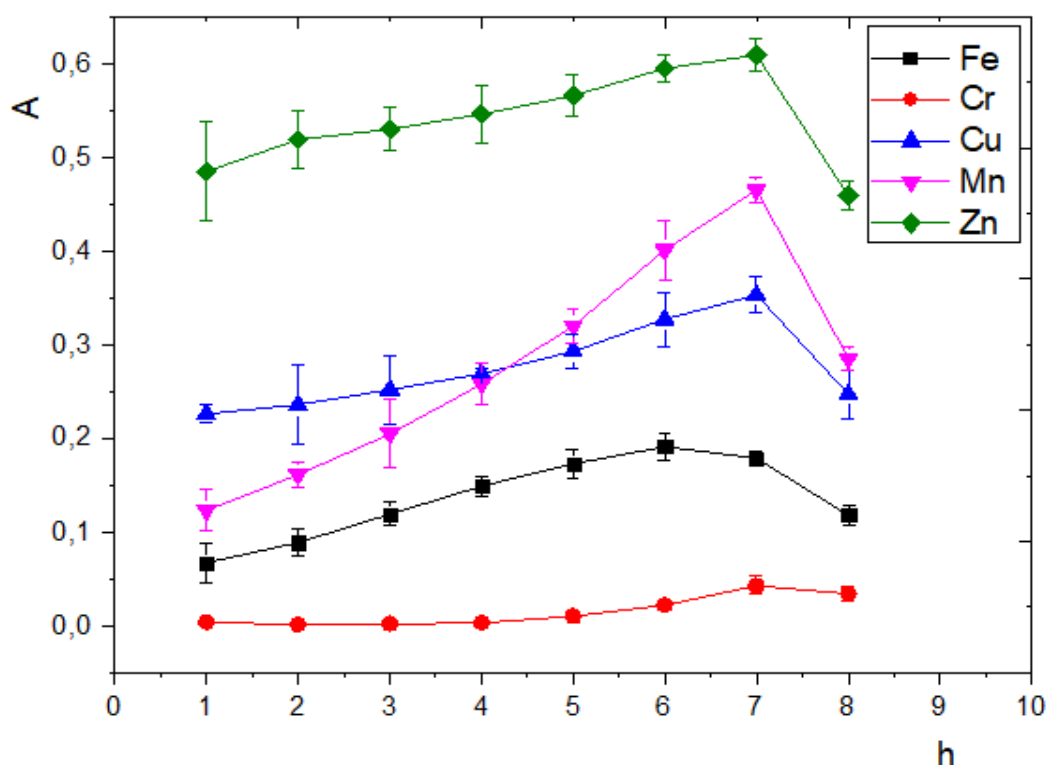
Opakovatelnost odpovídá směrodatné odchylce opakovaného měření téhož vzorku, které bylo provedené v daném čase, tou samou osobou na stejném pracovišti. Metodu lze považovat za opakovatelnou, pokud je výsledek opakované analýzy statisticky nerozlišitelný od původního měření [29]. Vypočítat ji lze jako relativní směrodatnou odchylku opakovaného měření [30].

Lineární dynamický rozsah je rozsah koncentrací analytu, kdy se hodnota signálu mění lineárně se změnou analytické koncentrace. V lineárním dynamickém rozsahu je citlivost detektoru konstantní [24].

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

4.1 Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku

Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku byla provedena pro 5 roztoků vybraných prvků o koncentraci $2,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Postupně byla měřena absorbance pro jednotlivé prvky při daných výškách hrany hořáku. Na přístroji bylo osm možných stupňů výšky hrany hořáku, po každém proměření se hořák posouval o jeden stupeň. Výsledky průběhu měření znázorňuje Obr. 4.1.



Obr. 4.1: Závislost absorbance na výšce paprsku nad hranou hořáku

Z naměřených hodnot bylo stanoveno optimum pro následná měření. Optimální stupeň výšky plamene je takový, kde stanovovaný roztok vykazuje nejvyšší absorbanci. Z Obr. 4.1 je zřetelné, že absorbance nejprve se zvyšujícím se stupněm výšky hrany hořáku postupně stoupá, po dosažení optima dochází k poklesu absorbance, u mědi, zinku a manganu je pokles za optimem prudký. Stanovené optimální výšky paprsku nad hranou

hořáku jsou uvedeny v následující tabulce 4.1.

Tab. 4.1: Experimentálně stanovené hodnoty optimální výšky paprsku nad hranou hořáku pro jednotlivé prvky

Prvek	Optimální výškový stupeň plamene
Cr	7
Mn	7
Cu	7
Zn	7
Fe	6

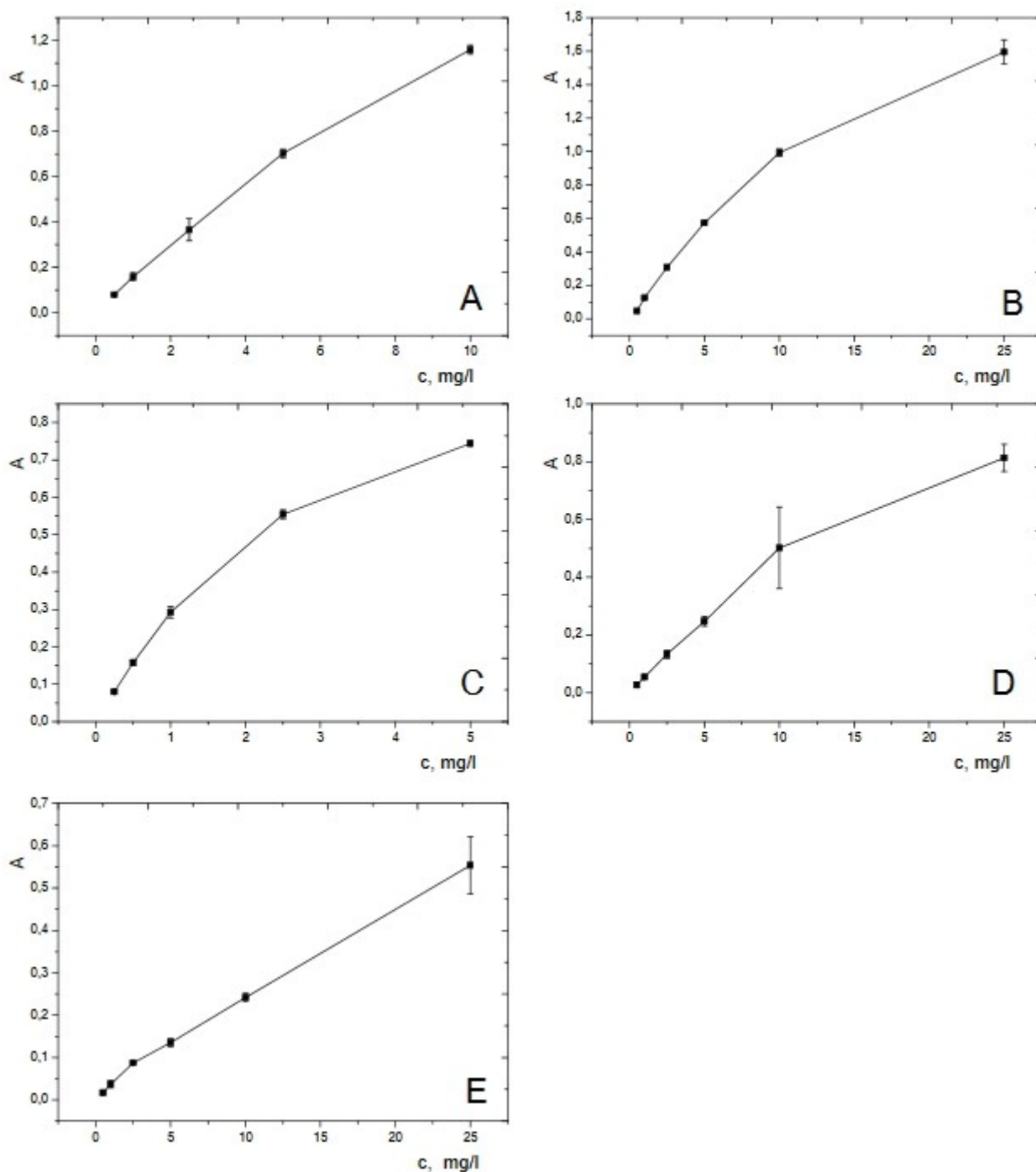
4.2 Kalibrace

Kalibrace byly měřeny při vybraných koncentracích pro jednotlivé prvky, které jsou uvedeny v Tab. 4.2. Pro každý prvek byla nastavena optimální výška paprsku nad hranou hořáku, hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4.1.

Tab. 4.2: Hodnoty koncentrací kalibračních roztoků pro jednotlivé prvky

Chrom	Mangan	Měď	Zinek	Železo
c	c	c	c	c
mg·dm ⁻³	mg·dm ⁻³	mg·dm ⁻³	mg·dm ⁻³	mg·dm ⁻³
0,25	0,25	0,25	0,10	0,25
0,50	0,50	0,50	0,25	0,50
1,00	1,00	1,00	0,50	1,00
2,50	2,50	2,50	1,00	2,50
5,00	5,00	5,00	2,50	5,00
10,00	10,00	10,00	5,00	10,00
25,00	-	25,00	-	25,00

Z naměřených hodnot byly sestaveny kalibrační grafy, ze kterých byl určen lineární rozsah koncentrací pro následné měření vzorků.



Obr. 4.2: Kalibrační grafy jednotlivých stanovovaných prvků. Grafy zobrazují závislost absorbance na koncentraci jednotlivých standardních roztoků. A – Mn, B – Cu, C – Zn, D – Fe, E - Cr

4.3 Stanovení základních charakteristik metody

Po stanovení optimální výšky plamene a proměření kalibračních roztoků, byly stanoveny základní charakteristiky metody.

Z kalibračních grafů byl stanoven lineární dynamický a pracovní rozsah, citlivost stanovení a korelační koeficient pro jednotlivé stanovované prvky. Pro stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti byl 20x proměřen blank a z tohoto měření byly dané charakteristiky vypočítány. Pro zjištění opakovatelnosti byl vybrán vhodný kalibrační roztok každého prvku, který byl 10x proměřen a z naměřených hodnot byla vypočítána opakovatelnost. Zjištěné a vypočtené charakteristiky metody pro jednotlivé prvky jsou uvedeny v následující tabulce 4.3.

Tab. 4.3: Základní charakteristiky metody pro stanovované prvky

	Cr	Mn	Cu	Zn	Fe
LOD [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	0,001	0,002	0,002	0,004	0,012
LOQ [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	0,006	0,010	0,006	0,010	0,024
Opakovatelnost [%]	0,98	2,07	0,50	0,28	16,21
Citlivost [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	0,021	0,138	0,095	0,205	0,049
Lineární dynamický rozsah do [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	25,0	5,0	10,0	2,5	10,0
Korelační koeficient	0,999	0,999	0,997	0,993	0,999
Pracovní rozsah do [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	25	10	25	5	10

4.4 Analýza vzorků

Analýza jednotlivých prvků byla provedena za optimálních podmínek, které byly experimentálně zjištěny, či nalezeny v literatuře a jsou uvedeny výše.

Následující tabulka shrnuje naměřené hodnoty, které byly přepočítány na původní koncentraci, před zředěním.

Tab. 4.4: Přepočítané koncentrace jednotlivých měřených prvků ve vzorcích

Označení vzorku	Koncentrace analytu [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]			
	Chrom	Mangan	Měď	Zinek
1	0,15±0,01	0,32±0,04	0,26±0,05	0,36±0,01
2	<LOD	0,43±0,02	0,50±0,02	0,56±0,02
3	<LOD	0,69±0,03	0,39±0,03	0,42±0,02
4	<LOD	0,33±0,03	0,75±0,03	0,91±0,01
6	<LOD	<LOD	0,48±0,01	0,49±0,03
8	<LOD	0,18±0,02	0,64±0,03	0,58±0,03
9	<LOD	<LOD	0,48±0,01	0,42±0,01
10	<LOD	<LOD	1,15±0,03	0,34±0,02
11	<LOD	0,09±0,01	1,23±0,01	0,90±0,03
12	<LOD	<LOD	1,50±0,03	0,52±0,02
13	0,60±0,08	0,11±0,02	1,14±0,02	0,63±0,04
14	0,20±0,03	<LOD	1,25±0,01	0,51±0,01
15	0,15±0,02	<LOD	1,29±0,02	0,72±0,01
16	<LOD	<LOD	1,32±0,01	0,75±0,03
17	<LOD	<LOD	1,40±0,01	1,15±0,02
18	<LOD	<LOD	1,42±0,01	0,59±0,02
19	<LOD	<LOD	1,60±0,03	1,57±0,03
20	<LOD	<LOD	1,43±0,03	0,70±0,02
21	<LOD	<LOD	1,42±0,02	0,68±0,01
22	<LOD	2,12±0,02	1,42±0,15	1,83±0,02
23	0,60±0,06	0,23±0,01	1,58±0,02	0,91±0,04
24	<LOD	2,99±0,01	1,56±0,02	1,25±0,03
25	<LOD	21,55±0,04	1,63±0,03	1,39±0,03
26	0,45±0,08	2,10±0,05	1,53±0,03	0,44±0,02
27	<LOD	0,59±0,03	1,90±0,03	1,74±0,02
28	<LOD	0,16±0,03	1,67±0,01	0,90±0,02
29	<LOD	0,72±0,03	1,58±0,02	0,90±0,06
30	<LOD	<LOD	1,59±0,04	0,59±0,06
31	<LOD	<LOD	1,59±0,02	0,51±0,02
32	<LOD	<LOD	1,58±0,02	0,59±0,02
33	<LOD	0,45±0,04	1,76±0,02	0,96±0,10
34	<LOD	17,21±0,41	1,78±0,03	3,25±0,37
35	<LOD	<LOD	1,65±0,04	0,96±0,02
36	<LOD	0,36±0,01	14,48±1,34	1,23±0,01
37	<LOD	<LOD	1,74±0,03	0,97±0,03
38	<LOD	1,21±0,06	1,77±0,03	1,76±0,03

Chrom byl detekován jen v několika málo extraktech. Nejvyšší koncentrace byla naměřena ve vzorku číslo 13 a 23, což je rajské jablko a mrkev. V rajském jablku i mrkvi byla naměřena totožná koncentrace chromu a to $0,60 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Vzorky u nichž nebylo možné hodnotu naměřit, měli koncentraci chromu nižší, než je mez detekce, tedy nižší, než $0,001 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (označeno <LOD).

Koncentraci manganu bylo již možné naměřit ve více vzorcích. Výrazně nejvyšší koncentrace byla naměřena ve vzorku číslo 25, tedy v zázvoru, kde byla koncentrace $21,55 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a také 34 což je galgán červený, v tomto vzorku byla koncentrace $17,21 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. V některých z dodaných vzorků nebylo možné koncentraci naměřit, jelikož byla nižší než mez detekce (označeno <LOD), tedy nižší než $0,002 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Měď byla prokázána ve všech měřených vzorcích. Výrazně nejvyšší koncentrace byla zjištěna ve vzorku číslo 36 – ve špenátu, kde byla koncentrace $14,48 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Obsah zinku byl také naměřen ve všech sledovaných vzorcích. Nejvyšší koncentrace zinku byla u vzorku číslo 34, což je galgán červený, konkrétně $3,25 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

V případě železa nebyl naměřen jeho obsah ani v jednom ze vzorků. Všechny hodnoty byly nižší, než je mez detekce, což je v případě železa $0,012 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo stanovit obsah vybraných prvků (měď, zinek, železo, mangan, chrom) v 36 extraktech z ovoce a zeleniny. Metodou pro toto stanovení byla atomová absorpční spektrometrie s plamenovou ionizací.

Nejprve byly určeny optimální podmínky pro stanovení jednotlivých prvků – byla sledována závislost výšky paprsku nad hranou hořáku a vybrána ta s nejvyšší odezvou. Následně byly stanoveny základní charakteristiky měření – citlivost, mez detekce a stanovitelnosti, lineární dynamický a pracovní rozsah.

Důležité bylo také vhodné naředění vzorků stabilizačním roztokem, kde bylo nakonec zvoleno ředění pětkrát. Takto naředěné vzorky byly nakonec analyzovány. V každém ze vzorků bylo stanoven, zda daný prvek obsahuje, případně v jakém množství.

Předem stanovené cíle práce tedy byly splněny.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Němcová, I.; Čermáková L.; Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004.
- [2] Černohorský T.; Jandera P.: *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997.
- [3] Svanberg S.: *Atomic and molecular spectroscopy: basic aspects and practical applications*. 4th, rev. ed. New York: Springer, 2004.
- [4] Kolektiv autorů: *Automatická spektrometrie*. Český Těšín: THETA, 1998.
- [5] Lajunen L. H. J.; Perämäki P.: *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*. 2th edition. University of Oulu, Finland: The Royal Society of Chemistry, 2004.
- [6] Sanz-medel A.; Pereiro R.: *Atomic Absorption Spectrometry: An Introduction*. 2nd Edition. New York: Momentum Press, 2014.
- [7] Kodíček M.; Valentová O.; Hynek R.: *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018.
- [8] Kasper H.; *Výživa v medicíně a dietetika*. Praha, Grada 2015
- [9] Barceloux, D. G.; Barceloux D.: Chromium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* **37:2**, 173-194 (1999)
- [10] Shanker, A. K.; Cervantes, C.; Loza-Tavera, H.; Avudainayagam, S.: Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31:5**, 739-753 (2005).
- [11] Bencko, V.; Cikrt, M.; Lener, J.: *Toxické kovy v pracovním a životním prostředí člověka*, Praha., Avicenum 1984.
- [12] Holzbecher, Z.; Churáček, J.: *Analytická chemie*, SNTL/Alfa, Bratislava 1987.
- [13] Scheiber I.; Dringen R.; Mercer J.F.B.: Copper: Effects of Deficiency and Overload. In: *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*. Sigel A., Sigel H., Sigel R. (eds) *Metal Ions in Life Sciences*, vol 13. Springer, Dordrecht, 2013, p. 359-387

- [14] Velíšek J.; Hajšlová J.: *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. 2009.
- [15] Yruela I.: Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. **17**:1 145-156 (2005).
- [16] Stock, J. T.: The genesis of electrogravimetry. *Bulletin for the History of Chemistry* **7**:17 (1990).
- [17] Horák J.: *Hemochromatóza*. Praha: Grada. 2010.
- [18] Coulter T. P.: *Food: the chemistry of its components*. 4th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2002.
- [19] Aschner, M.; Erikson K.: Manganese. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. **8**:3, 520–521 (2017)
- [20] Lingane, J. J.; Karplus, R.: New method for determination of Manganese. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. **18**:3., 191-194. (1946)
- [21] Brewer, P. G.; Spencer, D. W.: Colorimetric determination of manganese in anoxic waters. *Limnology and oceanography*. **16**:1, 107 – 110. (1971)
- [22] Broadley, M.R.; White, P.J.; Hammond, J.P.; Zelko, I.; Lux, A.: Zinc in plants. *New Phytologist*, **173**:4, 677-702 (2007)
- [23] Eckschlager K.; Kodejš Z.; Horsák I.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. Praha: SNTL. Česká matice technická (SNTL). 1980.
- [24] Ševčík J. G. K.: *Měření a výsledky v analytické chemii*. Český Těšín: 2 Theta. 2009.
- [25] Procházka B.: *Biostatistika pro lékaře: principy základních metod a jejich interpretace s využitím statistického systému*. Praha: Karolinum. 2015.
- [26] Mošna F.: *Základní statistické metody*. Praha: Univerzita Karlova v Praze - Pedagogická fakulta. 2017.
- [27] Neubauer J.; Sedlačík M.; Kříž O.: *Základy statistiky: aplikace v technických a ekonomických oborech*. 2., rozšířené vydání. Praha: Grada. 2016.

- [28] Plzák Z., 2007. *Metodický list 7: Detekční schopnost analytické metody, mezdetekce, mez stanovitelnosti*. [online] Ústí nad labem: Eurachem, 201. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/user-files/files/metodicky-list-7-2018.pdf>. [cit. 2020-04-03]
- [29] Pohanka, M.: 2010. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy.*, **79**:2, 60-63 (2010)
- [30] Budowle, B.; Schutzer, S., E.; Morse, S., A.: Criteria for validation of methods in microbial forensics, *Applied and environmental microbiology*, **74**:18, 5599-5607, (2008)