

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Pavla Švecová

**STANOVENIE VYBRANÝCH STOPOVÝCH PRVKOV VO
VZORKÁCH KÁVY METÓDOU ICP-MS**

Stanovení vybraných stopových prvků ve vzorcích kávy metodou
ICP-MS

Determination of selected elements in coffee samples using ICP-MS
method

Bakalářská práce

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

Praha 2022

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 16. května 2022.

Pavla Švecová

Pod'akovanie

Rada by som sa pod'akovala RNDr. Jakobovi Hraníčkovi, PhD, za vedenie, čas, ochotu, trpezlivosť a poskytnutie odborných znalostí a rád, ktorými ma sprevádzal počas príprav. Pod'akovanie patrí tiež mojej rodine a priateľom za veľkú oporu a podporu, ktorou ma sprevádzali počas celého bakalárskeho štúdia.

Abstrakt SK

Bakalárska práca sa zaoberá stanovením vybraných stopových prvkov (mangán, meď, zinok, železo) vo vzorkách mletej a instantnej kávy. Analyzované boli štyri vzorky mletej kávy a jedna vzorka instantnej kávy. Vzorky boli rozložené mikrovlnným rozkladným zariadením a analyzované hmotnostnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou z hľadiska prvkového obsahu. Okrem stanovenia celkového množstva vybraných prvkov vo všetkých vzorkách kávy boli pre jednu vzorku mletej kávy uskutočnené dva dodatočné experimenty, ktorých cieľom bolo sledovanie vplyvu doby lúhovania kávy vo vriacej vode a vplyvu teploty vody na prvkový obsah výluhov.

Obsah stopových prvkov v analyzovaných vzorkách vykazuje pomerne široké rozmedzie koncentrácií v závislosti na prvku a druhu kávy. Koncentrácie prvkov dosahujú nasledujúce rozmedzia: mangán 7,58 – 34,4 µg/g, meď 0,21 – 13,6 µg/g, zinok 1,58 – 5,35 µg/g a železo 12,2 – 55,8 µg/g. Všeobecne najmenší obsah prvkov bol pozorovaný v prípade instantnej kávy, ktorá vďaka tomu nie je veľmi vhodným zdrojom stopových prvkov pre človeka.

Jedna vzorka mletej kávy bola podrobená dvom extrakčným experimentom vo vode. Získané výsledky pre oba experimenty ukazujú, že množstvo prvkov v mletej káve prevyšuje vyextrahované množstvo vo výluhoch. Sledovaním vplyvu doby lúhovania bolo zistené, že s rastúcou dobou lúhovania rastie aj množstvo vyextrahovaného prvku, čo platí pre všetky analyzované prvky okrem zinku.

Sledovaná bola aj závislosť teploty vody použitej pri lúhovaní kávy, zatiaľ čo doba extrakcie bola zvolená na 5 minút. Pri zvyšovaní teploty vody dochádza k postupnému poklesu koncentrácie prvkov v extraktoch. Pozorovanou závislosťou sa neriadi mangán, ktorého koncentrácia začína klesať až od teploty vody, ktorá predstavuje 70 °C.

Kľúčové slová

Indukčne viazaná plazma, hmotnostná spektrometria, mineralizácia na mokrej ceste, káva, stopové prvky, mangán, meď, zinok, železo

Abstrakt CZ

Bakalářská práce se zabývá stanovením vybraných stopových prvků (mangan, železo, měď, zinek) ve vzorcích mleté a instantní kávy. Byly analyzovány čtyři vzorky mleté kávy a jeden vzorek instantní kávy. Vzorky byly rozloženy mikrovlnným rozkladným zařízením a analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem z hlediska prvkového obsahu. Kromě stanovení celkového množství vybraných prvků ve všech vzorcích kávy, byly pro jeden vzorek mleté kávy uskutečněny dva dodatečné experimenty, u kterých bylo cílem sledování vlivu doby louhování kávy ve vroucí vodě a vlivu teploty vody na prvkový obsah výluhů.

Obsah stopových prvků v analyzovaných vzorcích vykazuje poměrně široké rozmezí koncentrací. Koncentrace kovů představují následující rozmezí: mangan 7,58 – 34,4 µg/g, měď 0,21 – 13,6 µg/g, zinek 1,58 – 5,35 µg/g a železo 12,2 – 55,8 µg/g. Obecně nejmenší obsah prvků byl pozorován v případě instantní kávy, která díky tomu není vhodným zdrojem stopových prvků pro člověka.

Jeden vzorek mleté kávy byl podroben dvěma extrakčním experimentům ve vodě. Získané výsledky pro oba experimenty ukazují, že množství prvků v mleté kávě převyšuje vyextrahované množství ve výluzích. Sledováním vlivu doby louhování bylo zjištěno, že se zvyšující dobou louhování roste i množství vyextrahovaného prvku, čímž se řídí všechny analyzované prvky kromě zinku.

Sledována byla i závislost teploty vody použité při louhování kávy, zatímco doba extrakce byla zvolena na 5 minut. S rostoucí teplotou dochází k postupnému snižování koncentrace prvků v extraktech. Pozorovanou závislostí se neřídí mangan, přičemž jeho koncentrace začíná klesat až od teploty vody, která dosahuje 70 °C.

Klíčová slova

Indukčně vázané plazma, hmotnostní spektrometrie, mineralizace na mokré cestě, káva, stopové prvky, mangan, měď, zinek, železo

Abstract EN

The main aim of this thesis is focused on the determination of selected elements (manganese, copper, zinc, iron) in trace levels in selected samples of grained and instant coffee. Four samples of grained coffee and one sample of instant coffee were taken for analysis. Firstly, all samples were digested in a microwave digestion system and then analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry to determine the concentration of selected elements. Except this, one sample of grained coffee was taken for two additional experiments. The aim of these experiments was to investigate the influence of the extraction time and temperature of water used for extractions, on the element concentrations in liquid phases.

The content of elements in the analysed samples shows relatively wide range of values (7.58 – 34.4, 0.21 – 13.6, 1.58 – 5.35 and 12.2 – 55.8 $\mu\text{g/g}$ for manganese, copper, zinc and iron, respectively). Generally, the lowest concentrations of all elements were detected in sample of instant coffee, which cannot be regarded as a valuable source of trace elements for humans.

The first additional experiment shows that the concentrations of elements in grained coffee is much higher than in its extractions. With increasing time of extraction, the concentration of elements increased as well (except of zinc).

The effect of the temperature of water used for extraction was also observed. Time of extraction was constant and given as 5 minutes. With the increasing temperature the concentration of elements decreases. This fact does not suit the manganese well. Manganese concentration is decreasing until the temperature of water 70 °C.

Key words

Inductively coupled plasma, mass spectrometry, wet mineralization, coffee, trace metals, manganese, copper, zinc, iron

Obsah

1	Úvod	- 9 -
1.1.	Ciele práce	- 9 -
2	Teoretická časť	- 10 -
2.1	Káva	- 10 -
2.1.1	Chemické zloženie a jeho analýza	- 10 -
2.1.2	Vplyv na konzumenta	- 11 -
2.2	Stopové prvky	- 11 -
2.3	Mangán	- 12 -
2.4	Meď	- 13 -
2.5	Zinok	- 14 -
2.6	Železo	- 15 -
2.7	Hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou	- 15 -
2.7.1	Princíp metódy	- 16 -
2.7.2	Inštrumentácia	- 16 -
2.8	Úprava vzoriek pred analýzou	- 20 -
3	Experimentálna časť	- 22 -
3.1	Použité prístroje	- 22 -
3.2	Použité chemikálie	- 22 -
3.3	Vzorky	- 22 -
3.4	Pracovný postup	- 24 -
4	Výsledky a diskusia	- 27 -
4.1	Mikrovlnný rozklad	- 27 -
4.2	Merací program ICP-MS	- 29 -
4.3	Kalibračné závislosti	- 29 -
4.4	Detekčné limity prvkov	- 32 -
4.5	Prvkový obsah vzoriek	- 33 -
4.6	Vplyv doby lúhovania	- 34 -
4.7	Vplyv teploty lúhovania	- 36 -
5	Záver	- 38 -
6	Použitá literatúra	- 39 -

Zoznam použitých skratiek a symbolov

BEC	koncentrácia na úrovni šumu (<i>Background Equivalent Concentration</i>)
c	koncentrácia
CPS	odozva prístroja (<i>Counts Per Second</i>)
DL	detekčný limit
ICP-MS	hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
m	hmotnosť
p	tlak
P	výkon
P_{max}	maximálny výkon magnetronu
PTFE	polytetrafluóretylén
SD	smerodajná odchýlka
t	čas
T	teplota
z	náboj

1 Úvod

Káva patrí k veľmi obľúbeným a často konzumovaným nápojom súčasnosti. Popularitu si získava svojou typickou chuťou, arómou a obsahom kofeínu, vďaka čomu pôsobí aj ako stimulačný nápoj. Predstavuje veľmi komplexnú zmes chemických zlúčenín. Patrí medzi bohaté zdroje antioxidantov a má mnoho pozitívnych účinkov na ľudské zdravie. Je tiež zdrojom minerálov a mnohých biologicky aktívnych látok.

Viacere štúdie sa zaoberali obsahom stopových prvkov v kávových nápojoch a extraktoch. Rozdiely v koncentráciách prvkov v mletej káve a pripravenom nápoji sú odlišné v závislosti na značke a druhu kávy, na spôsobe jej prípravy a na skúmanom prvku. Všeobecne možno konštatovať, že mletá káva obsahuje väčšie množstvo analyzovaných kovových prvkov ako jej extrakty.

Medzi stopové prvky patria mangán, meď, zinok a železo. Vystupujú ako kofaktory enzýmov a majú tiež štruktúrnu funkciu pri stabilizovaní proteínov. V ľudskom organizme majú často rozhodujúci význam pre zdravie.

Na určenie obsahu stopových prvkov vo vzorkách mletej a instantnej kávy je výhodné využiť metódu hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS). Technika umožňuje rýchlu multiprvkovú analýzu vzoriek, pričom je vhodná najmä pre kvapalné vzorky. Pri analýze pevných vzoriek je potrebná ich úprava pred vlastnou analýzou, ktorá najčastejšie zahŕňa rozklad vzorky v mikrovlnnom rozkladnom zariadení.

1.1. Ciele práce

Cieľom bakalárskej práce je využitie hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou na stanovenie obsahu vybraných stopových prvkov (mangán, meď, zinok, železo) v mletej a instantnej káve. Metóda ICP-MS bola použitá na určenie prvkového obsahu

- v jednotlivých vzorkách mletej a instantnej kávy,
- experimentu, ktorý sledoval vplyv doby lúhovania mletej kávy vo vriacej vode,
- experimentu, ktorý bol zameraný na určenie vplyvu teploty vody pri lúhovaní mletej kávy vo vode.

2 Teoretická časť

2.1 Káva

Káva patrí medzi najčastejšie konzumované nápoje na svete. Ako surovina pre výrobu kávy slúžia upravené semená plodov kávovníku, ktorý pochádza z rodu *Coffea*.

Medzi hospodársky významné druhy kávovníkov patria *Coffea arabica* (kávovník arabský) a *Coffea canephora*, známe pod názvami arabika a robusta. Arabika je káva získaná zo vždyzeleného tropického kra alebo stromu, ktorého plod je elipsovitého tvaru. Rastie vo výškach od 1300 do 1800 metrov nad morom. Voči vonkajším vplyvom je robusta odolnejšia ako arabika a je dobre prispôsobená podmienkam nížin tropického podnebia. Semená sú menšie ako pri arabike a poskytujú kávu nižšej kvality. Rastie v tropických nížinách do nadmorskej výšky 1500 metrov¹.

Výživová hodnota kávy je nepatrná a preto patrí medzi pochutiny. Hlavným dôvodom konzumácie kávy je jej povzbudivý účinok kofeínu na nervovú sústavu.

2.1.1 Chemické zloženie a jeho analýza

Chemické zloženie zelenej kávy závisí na mnohých faktoroch. Zelená káva obsahuje 10 – 15 % bielkovín, 10 – 15 % tuku, 6 – 12 % sacharidov, 9 – 12 % vody a 0,3 – 2,8 % kofeínu. Obsah kofeínu významne závisí na botanickom druhu kávovníku, pričom arabika obsahuje v priemere 1,2 % a robusta 2,2 % kofeínu v sušine².

Káva predstavuje značne komplikovanú organickú maticu a metodologický prístup pre multiprvkovú analýzu spektrometrickými metódami zahŕňa typicky rozklad vzorky na mokrej ceste za pomoci rôznych zmesí koncentrovaných kyselín, prípadne kyseliny dusičnej s peroxidom vodíka alebo samotnou kyselinou dusičnou³.

Analýza prvkového zloženia kávy je vhodná pomocou metódy atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) alebo hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS). Obe metódy sú vhodné, avšak z časového hľadiska je výhodnejšie použitie metódy ICP-MS⁴.

Mnoho štúdií sa zaoberalo analýzou prvkového zloženia kávy. Medzi ne patrí aj štúdia, ktorá analyzovala obsah minerálneho zloženia kávy na základe použitej metódy prípravy kávy, aj obyčajné vylúhovanie kávy vo vriacej vode. Najvyšší obsah prvkov vo

výluhoch v prípade jednoduchej extrakcie, ktorými sa zaoberá aj bakalárska práca, bol v prípade mangánu, menší v železe, zinku a najnižší pri medi⁵.

Z inej štúdie zaoberajúcej sa analýzou brazílskej kávy vyplýva, že z pohľadu množstva stopových prvkov v zrnách vykazuje najväčšie zastúpenie železo, následne mangán, meď a zinok⁶. V ďalšej štúdii skúmajúcej kávu z Etiópie bol pre prvky železo, meď a zinok pozorovaný trend, ktorý možno interpretovať ako absorpčný efekt kávy, čím dochádza k znižovaniu koncentrácie týchto prvkov vo výluhoch⁷.

Autori poľskej štúdie zaoberajúcej sa koncentráciou vybraných prvkov v zelenej a praženej káve publikovali, že všetky analyzované prvky prešli aj do nápoja, avšak v rôznych množstvách. Z vyššie uvedených prvkov vykazoval najväčšie percento extrakcie zinok, následne železo a meď⁸.

2.1.2 Vplyv na konzumenta

Konzumácia kávy každoročne narastá vďaka preukázaným pozitívnym účinkom na zdravie človeka. Káva poskytuje prevenciu pred rôznymi typmi ochorenia, akými sú cukrovka 2. typu, niektoré druhy rakoviny, poškodenie pečene, neurologické a srdcovocievne ochorenia. Konzumácia kávy je tiež spájaná s pozitívnymi účinkami na tráviaci trakt a črevnú mikrobiotu⁹. Nedávne štúdie tiež poukazujú na možnú ochranu pred mozgovými zmenami, ktoré sú spojené s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. Iná štúdia poukazuje na zníženie rizika vzniku obezity pri konzumácii kávy¹⁰.

Niektoré štúdie spájajú nadmernú konzumáciu kávy s negatívnymi účinkami. Pri konzumácii viac ako piatich šálok kávy denne môže dôjsť k zvýšenému riziku vzniku koronárnych srdcových ochorení o 40 až 60%. Konzumácia veľkého množstva kávy tiež nie je odporúčaná tehotným ženám, pretože zvyšuje riziko potratu¹¹.

2.2 Stopové prvky

Ľudské telo tvorí dvadsaťtri prvkov, ktoré majú dôležité fyziologické funkcie. Jedenásť z nich možno zaradiť do kategórie stopových prvkov vďaka ich nevyhnutnosti a obmedzenému množstvu v tele človeka. Medzi stopové prvky patria aj prechodné kovy mangán, meď, zinok a železo. Pre človeka sú potrebné v nižších koncentráciách (všeobecne menej ako 100 mg denne) oproti makroprvkom, ktoré sú potrebné vo

väčších množstvách.

V biologických systémoch sú stopové kovové prvky najčastejšie viazané na proteíny, nazývané metaloproteíny. Takto viazané kovy sú súčasťou enzymatických procesov, majú štruktúrnú funkciu, prípadne využívajú proteín na transport na konkrétne miesto v organizme. Sú súčasťou aktívnych centier enzýmov, stabilizujú ich terciárnu a kvartérnu štruktúru a zapájajú sa do vytvárania slabo viazaných komplexov so substrátom, čo prispieva k jeho vhodnej orientácii pri katalytickej reakcii. Katióny kovov s nespárovanými elektrónmi sprostredkujú redoxné procesy vďaka ich reverzibilným zmenám oxidačného stavu na základe prenosu elektrónu medzi substrátom a kofaktorom. Príkladom je aj superoxid dizmutáza obsahujúca meď alebo mangán v aktívnom centre. Enzým redukuje superoxidový anión na peroxidový, pričom oxiduje ďalší superoxidový anión za vzniku molekulového kyslíka¹².

Mangán, meď, zinok a železo patria medzi stopové prvky, ktoré sú potrebné pre udržiavanie bunkovej aktivity¹³. Sú nevyhnutné pre rast rastlín, avšak v oveľa menšom množstve ako primárne nutrienty dusík, fosfor, síra a draslík. Pokiaľ sú prítomné vo vyšších koncentráciách, môže dochádzať k vzniku reaktívnych kyslíkových radikálov, ktoré môžu spôsobiť deštrukciu buniek.

Stopové prvky sa podieľajú na takmer všetkých metabolických a bunkových funkciách, medzi ktoré patria energetický metabolizmus, primárny a sekundárny metabolizmus, ochrana bunky, génová regulácia a mnohé ďalšie¹⁴.

2.3 Mangán

Mangán je prechodný kov, ktorý sa nachádza v štvrtej perióde a siedmej skupine periodického systému prvkov s odpovedajúcou elektrónovou konfiguráciou v základnom stave $[\text{Ar}] 3d^5 4s^2$. Prvá ionizačná energia odpovedá hodnote 7,43 eV.

Mangán a jeho biochemická aktivita

Mangán sa vyskytuje v rôznych oxidačných stavoch, najčastejšie ako Mn^{II} , Mn^{III} a Mn^{IV} . Patrí k esenciálnym prvkom, ktoré sú nevyhnutné pre rastliny, živočíchy a človeka a zúčastňuje sa na mnohých metabolických funkciách. V proteínoch vystupuje ako katalyticky účinný kov a ako aktivátor enzýmov. Katalytická aktivita je

patrná napríklad pri fotolýze vody v svetelnej fáze fotosyntézy. Medzi mangánovo aktivované enzýmy patria jablčný enzým, izocitrát dehydrogenáza a karboxykináza¹⁴.

Na homeostázu mangánu má priamy vplyv aj železo, pretože oba kovy sa do organizmu dostávajú cez transferínový transportér a ióny Mn^{3+} sa viažu na rovnaké miesto ako ióny Fe^{3+} . Oba kovy sa vyznačujú afinitou k mobilferínu, intercelulárnej molekule viažucej kovy. Pri nedostatku železa je množstvo transportérov v membránach erytrocytov zvýšené, aby sa maximalizovala jeho absorpcia. Výsledkom procesu je nevyhnutné zvýšenie absorpcie mangánu v gastrointestinálnom trakte a jeho obsahu v mozgu¹⁵.

Zdroje mangánu v potrave sú obilniny, ryža, čaj a orechy¹². Nedostatočný denný príjem mangánu môže byť spojený s mnohými zdravotnými následkami vďaka jeho dôležitosti v enzymatických procesoch. Nadmerné množstvo mangánu sa môže akumulovať v mozgu a spôsobovať neurotoxicitu¹⁵.

2.4 Med'

Med' je prechodný kov, ktorý sa nachádza v štvrtej perióde a jedenástej skupine periodického systému prvkov. Jej elektrónová konfigurácia v základnom stave odpovedá $[Ar] 3d^{10} 4s^1$. Prvá ionizačná energia medi má hodnotu 7,73 eV.

Med' a jej biochemická aktivita

Med' je esenciálny prvok, ktorý je nevyhnutný pre fotosyntézu, mitochondriálne dýchanie, uhlíkový a dusíkový metabolizmus, poskytuje ochranu pred oxidatívnym stresom, atď. Za fyziologických podmienok existuje v dvoch oxidačných stavoch Cu^I a Cu^{II} , pričom dochádza k vzájomným premenám jednej formy na druhú. Med' tak môže vystupovať ako redoxné činidlo v biochemických reakciách. Táto skutočnosť však robí med' potenciálne toxickým prvkom¹⁶, pretože jej ióny sú schopné katalyzovať produkciu voľných radikálov, čo vedie k poškodeniu proteínov, DNA a iných biomolekúl. Na ochranu pred intoxikáciou je väčšina iónov medi viazaná v proteínoch, napríklad metalotioneínoch¹⁴.

V ľudskom tele predstavuje nevyhnutný prvok pre tvorbu spojivových tkanív, nervových obalov a kostí. Je súčasťou mnohých oxidáz, v ktorých plní funkciu

redukovadla a zúčastňuje na tvorbe molekulárneho kyslíka. Za dobrý zdroj medi v strave je považovaná pečeň, ustrice, orechy, semienka, tmavá čokoláda a celozrnné výrobky.

Nedostatok medi u človeka je zriedkavý, avšak môže byť spôsobený nadmerným príjmom zinku. Chronická toxicita medi je tiež ojedinelá a je najčastejšie spájaná s poškodením pečene. Akútna toxicita sa prejavuje v gastrointestinálnom trakte bolesťami brucha, kŕčami, nevoľnosťou a zvracaním¹².

2.5 Zinok

Zinok je kov nachádzajúci sa v štvrtej perióde a dvanástej skupine periodického systému prvkov. Elektrónová konfigurácia v základnom stave disponuje plne zaplneným valenčným orbitálom: [Ar] 3d¹⁰ 4s². Jeho prvá ionizačná energia odpovedá hodnote 9,39 eV. Ako stopový prvok je druhý najzastúpenejší po železe¹⁷.

Zinok a jeho biochemická aktivita

Zinok má dôležitú funkciu pri vývoji semienok rastlín. Rastliny, ktoré vykazujú nedostatok zinku zrejú s oneskorením. Jeho deficit sa negatívne prejavuje aj pri procese fotosyntézy, kedy dochádza k narúšaniu aktivity karbonát anhydrázy, enzýmu, ktorý je zodpovedný za fixáciu oxidu uhličitého v C4 rastlinách. Narúša sa aj aktivita Cu-Zn superoxid dizmutázy a enzýmov, ktoré sa podieľajú na pentózo-fosfátovej dráhe¹⁴.

Úloha, ktorú každý kov zohráva v tele závisí na jeho chemickej štruktúre a na molekule, v ktorej je kov viazaný. Zinok vo forme iónu Zn²⁺ nemá nespárované elektróny, čo znemožňuje jeho pôsobenie v redoxných procesoch. Pôsobí ako antioxidant, pričom nahrádza kovy katalyzujúce reakcie voľných radikálov, napríklad železo¹².

Pre ľudský metabolizmus ide o veľmi dôležitý stopový prvok, ktorý je súčasťou veľkého množstva enzýmov, napomáha pri skladaní proteínov a pri regulácii génovej expresie¹⁷. Zinok možno nájsť v červenom mäse a hydine, fazuli, orechoch, morských plodoch (ustrice sú bohaté na zinok), raňajkových cereáliách a mliečnych produktoch.

Nedostatočný príjem zinku je spojený s nízkym obsahom medi v organizme, so zmenou funkcií železa, s oslabením imunity a nízkymi hladinami HDL cholesterolu¹².

2.6 Železo

Železu prislúcha rovnako štvrtá perióda a ôsma skupina v periodickom systéme prvkov a jeho elektrónová konfigurácia odpovedá $[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$. Ide o najdôležitejší stopový prvok pre človeka. Prvá ionizačná energia železa predstavuje 7,90 eV.

Železo a jeho biochemická aktivita

Množstvo železa v pôde je približne 10^5 -krát väčšie ako v rastlinách, ktoré v nej rastú. Napriek pomerne vysokému obsahu v zemskej kôre ide o anomáliu, ktorá je spôsobená slabou dostupnosťou iónov železa v prítomnosti kyslíka, najmä pri stredne vysokých až vysokých hodnotách pH¹⁸.

Železo je redoxne aktívny kov a primárne sa zúčastňuje na fotosyntéze v dôsledku jeho vysokého obsahu v chloroplastoch. Účasť je patrná aj pri mitochondriálnom dýchaní, asimilácii dusíka a obrany proti patogénom¹⁴.

Všeobecne sa železo nachádza v štyroch skupinách proteínov: hemoproteíny (hemoglobín, myoglobín), FeS proteíny (akonitáza), proteíny pre transport a uchovávanie železa (transferín, feritín) a rôzne enzýmy¹². Najväčší obsah železa má hemoglobín a viac ako polovica celkového obsahu železa v ľudskom tele je obsiahnutá práve v tomto proteíne¹⁹. Vhodným potravinovým zdrojom železa sú cereálie, semenka, strukoviny, ovocie, zelenina a mliečne produkty¹².

Nedostatok železa spôsobuje chudokrvnosť, pomerne často sa vyskytujúce ochorenie v populácii. Málokedy spôsobuje smrť, ktorá je často spájaná s nízkou hladinou saturácie dostupného transferínu¹⁹.

2.7 Hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou

Hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou je analytická spektrálna metóda, ktorá sa používa na analýzu prvkového zloženia vzoriek. Možno ňou stanoviť až 80 prvkov z periodického systému prvkov²⁰. Veľkou výhodou metódy je jej schopnosť uskutočniť multiprvkovú analýzu v stopových množstvách, ktoré sa pohybujú v škále ppt. Vyznačuje sa tiež schopnosťou analýzy izotopického zastúpenia prvkov.

Oblasť, v ktorej je metóda ICP-MS najviac využívaná, je environmentálna

oblasť, ktorá využíva možnosť stanovenia stopového množstva prvkov v rôznych maticiach vzoriek²¹. Použitie nachádza aj v geologických a biomedicínskych odvetviach²².

Metóda ICP-MS umožňuje simultánnu multiprvkovú analýzu už počas jedného merania. Vyznačuje sa tiež krátkym časom analýzy a jednoduchou prípravou vzoriek a pracuje s malými množstvami vzoriek²³.

2.7.1 Princíp metódy

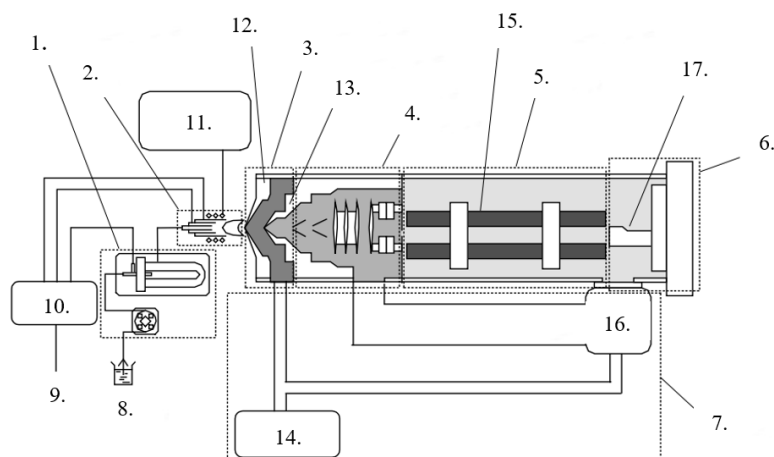
Spektrálna technika kombinuje indukčne viazanú plazmu ako zdroj kladne nabitých častíc a hmotnostný spektrometer, ktorý vzniknuté ióny detekuje²⁴.

Plazma je kvazineutrálny plyn nabitých a neutrálnych častíc, ktoré vykazujú kolektívne správanie²⁵. Jej úlohou v metóde ICP-MS je ionizácia vzorky²³, čím slúži ako iónový zdroj²⁶. Z hľadiska tvrdosti ionizačných techník patrí medzi tvrdé ionizácie, pretože jej dôsledkom je kompletná fragmentácia molekúl vzorky. Ako plazmový plyn sa najčastejšie používa argón²¹. V dôsledku výboja v ňom prebieha sušenie a odparovanie, pary sa atomizujú a voľné atómy sú excitované a ionizované²⁵.

Ióny v plynej fáze sú následne transportované do hmotnostného analyzátora, ktorý rozdeľuje ióny na základe hodnoty pomeru ich hmotnosti m a náboja z . Rozdelené ióny sú detekované iónovým detektorom, ktorý vytvára elektrické signály. Tie sú prevedené na hmotnostné spektrum²⁶, ktoré predstavuje závislosť zastúpenia iónov na hodnote pomeru m/z , prípadne na charakteristike, ktorá s týmto pomerom súvisí. Os závislej premennej sa často označuje len ako hmotnosť, ktorá však nie je skutočným predmetom merania²⁷.

2.7.2 Inštrumentácia

Medzi základné súčasti bežného prístroja ICP-MS patrí plazmový zdroj, expanzná komora a vlastný hmotnostný spektrometer. Ten je tvorený iónovou optikou, hmotnostným analyzátorom (najčastejšie kvadrupólovým) a detektorom²⁴. Schému prístroja zobrazuje *Obr. 2.1*.

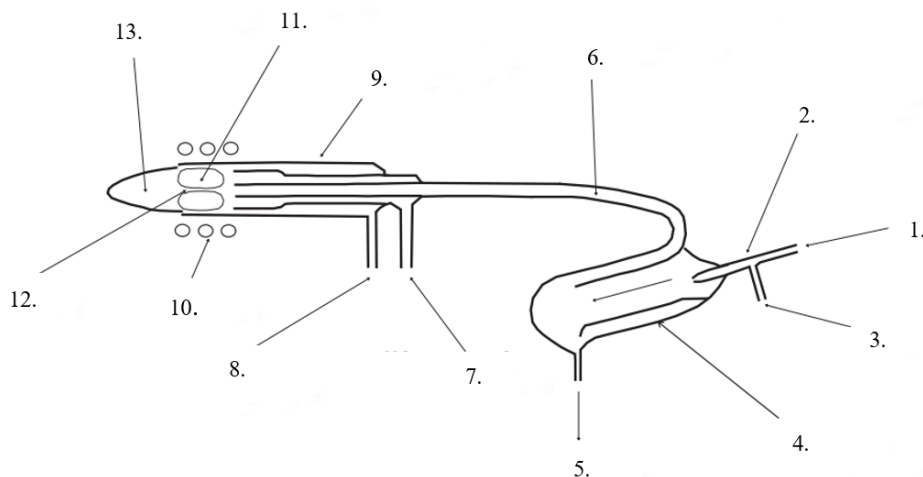


Obr. 2.1 – schéma prístroja ICP-MS (prevzaté a upravené²⁸)

1. Zavádzanie vzorky; 2. Indukčne viazaná plazma; 3. Rozhranie; 4. Iónová optika; 5. Analyzátor; 6. Detektor; 7. Vákuum; 8. Vzorka; 9. Prúd Ar; 10. Plynový regulátor; 11. Rádiofrekvenčný generátor; 12. Vzorkovací kužeľ; 13. Zberací kužeľ; 14. Rotačná pumpa; 15. Kvadrupólový hmotnostný filter; 16. Turbomolekulárna pumpa; 17. Elektrónový násobič

Príprava vzorky pre analýzu je jednoduchá. Vzorka sa rozpustí v rozpúšťadle, najčastejšie v kyselinách (dusičná, chlorovodíková) alebo zásadách (hydroxid amónny). Metóda je navrhnutá pre meranie kvapalných vzoriek, avšak možno ňou analyzovať aj pevné vzorky. Rozklad môže byť uskutočnený za laboratórnej teploty, pričom pri pevných vzorkách možno využiť rozklad vo vysokotlakovom mikrovlnnom rozkladnom zariadení²³.

Plazmový zdroj tvorí zmlžovač, zmlžovacia komora, plazmový horák, indukčná cievka a rádiofrekvenčný generátor²⁴. Vzorka je pumpovaná prietokom približne 1 ml/min peristaltickou pumpou do zmlžovača, kde je prevedená na jemný aerosól argónovým plynom, ktorého prietok je okolo 1 l/min. Jemné kvapôčky aerosólu, ktoré tvoria približne 1 – 2 % vzorky, sú oddelené od väčších kvapôčok v zmlžovacej komore²². Ide o veľmi dôležitý krok, pretože plazma je neúčinná pre väčšie disociované kvapky. Tie vychádzajú zo zmlžovacej komory vplyvom gravitácie do odpadu, zatiaľ čo jemný aerosól je transportovaný do plazmovej hlavice cez vzorkovací injektor²³. Plazmový zdroj spolu s jeho časťami zobrazuje Obr. 2.2.

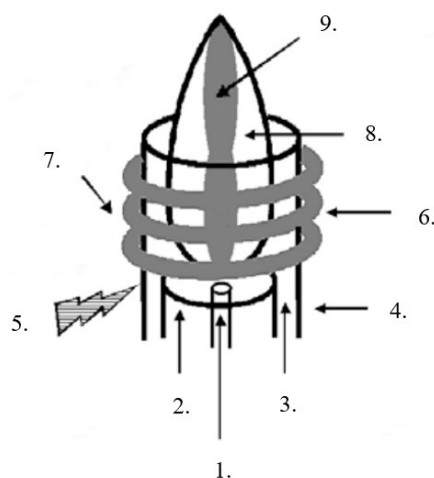


Obr. 2.2 – schéma plazmového zdroja (prevzaté a upravené²⁴)

1. Vzorka; 2. Zmlžovač; 3. Prívod Ar do zmlžovača; 4. Zmlžovacia komora; 5. Odpad; 6. Zmlžená vzorka; 7. Prídavný prúd Ar; 8. Chladiaci prúd Ar; 9. Horák; 10. Rádiofrekvenčná cievka; 11. 10 000 K; 12. 8 000 K; 13. 6 000 K

Plazma sa vytvára na konci horáku, ktorý tvoria tri sústredené kremenné trubice, pričom každou trubicou tečie rôzne veľký prúd argónu. Vnútornej trubice, injektor, obsahuje aerosól vzorky v argónovej hmle, ktorý prináša vzorku do plazmy. Vonkajšia chladiaca trubica obsahuje argón, ktorý slúži ako chladiaca vrstva, aby zabránil roztaveniu hlavice. Koniec horáku je obklopený indukčnou cievkou spojenou s rádiofrekvenčným generátorom²³. Experimentálne usporiadanie je zobrazené na Obr. 2.3. Vznik plazmy je podmienený fluktuáciami elektrického poľa, ktoré plazmu budia a udržiavajú v prostredí cievky. Konštrukcia cievky ovplyvňuje vlastnosti plazmy²⁴. Spolu s tokom argónového plynu prechádzajúceho horákom je aplikovaný aj Teslov induktor (vysokonapäťový výboj), ktorý ionizuje frakciu argónových atómov, čím sa generujú ióny a elektróny. Tie sú v hlavici ovplyvňované elektromagnetickým poľom, urýchlené a dochádza k ich kolíziám s ďalšími atómami argónu. Ak majú prebytočnú energiu, ďalšie atómy argónu sú tiež ionizované, čím podporujú tento kaskádovitý proces. Pohyb elektrónov a iónov generuje veľmi veľké množstvo tepla a teplota výslednej plazmy na konci trubice môže dosahovať hodnotu až 10 000 K²³. Výboj má prstencovitý tvar, ktorý je dosiahnutý vhodnou kombináciou rozmerov plazmovej hlavice, frekvencie elektromagnetického poľa a dostatočnej rýchlosti prúdenia nosného plynu. Prerazením výboja vznikne kanál o priemere 3 – 4 mm, do ktorého je zavedený aerosól bez

ovplyvnenia účinnosti indukčnej väzby a prenosu energie²⁵.



Obr. 2.3 – indukčne viazaný plazmový výboj (prevzaté a upravené²⁵)

1. Nosný plyn s aerosólom; 2. Stredný plazmový plyn; 3. Vonkajší plazmový plyn; 4. Plazmová hlavica; 5. Elektrická iskra – iniciácia výboja; 6. Indukčná cievka; 7. Elektromagnetické pole; 8. Indukčná oblasť; 9. Centrálny (analytický) kanál

Ióny z plazmy sú vedené do hmotnostného spektrometra cez expanznú komoru, ktorá je tvorená dvomi kovovými kužeľmi, vzorkovacím a zberacím²². Ide o tzv. deliče tlaku, ktorých materiál musí mať dobrú tepelnú vodivosť a musí byť inertný voči používaným rozpúšťadlám²⁴. Umožňujú prenos iónov do iónovej optiky. Expanzná komora predstavuje najkritickejšie miesto pre ICP-MS, pretože ióny v nej musia byť efektívne transportované z plazmy, ktorá pracuje za atmosférického tlaku do oblasti hmotnostného spektrometra, ktorý pracuje za veľmi nízkeho tlaku (okolo 10^{-5} Pa)²². Po tom, ako sa ióny dostanú do komory, dôjde k ich nadzvukovej expanzii, čím vzniká tzv. voľný lúč. Ióny sú extrahované zberacím kužeľom do hlavnej expanznej komory, ktorá pracuje za veľmi nízkeho tlaku blízko vákuu, pričom tento tlak je udržiavaný pomocou turbomolekulárnej pumpy²³.

Ióny analytu prechádzajú cez iónovú optiku tvorenú elektrostatickými šošovkami, ktoré ich fokusujú do kvadrupólového hmotnostného analyzátora²⁰. Iónová optika tiež zabraňuje, aby sa do detektora dostali fotóny alebo neutrálne častice (napr. neionizované komponenty matrice)²³. Fotóny sú v prípade ICP-MS zdrojom šumu

a signálovej nestability, ak sa dostanú k detektoru. Preto sa do stredu iónového lúča umiestňuje malá kovová doska, tzv. pohlcovač fotónov, ktorá odráža fotóny od detektora. Katióny pritom nie sú pohlcovačom odrazené a dostávajú sa do detektora²⁰.

Iónový lúč obsahujúci ióny analytu a matrice prechádza do hmotnostného analyzátoru. Pracuje za hlbokého vákua, ktoré je udržiavané ďalšou turbomolekulárnou pumpou. Najčastejšie používaným hmotnostným analyzátorom v ICP-MS je kvadrupólový²². Pozostáva zo štyroch elektród umiestnených do štvorca. Rozdelenie iónov kvadrupólom je možné vďaka privedeniu striedavého a jednosmerného prúdu na elektródy. Pri špecifickej kombinácii oboch potenciálov prejde analyzátorom len určitý ión so stabilnou trajektóriou a vhodným pomerom hmotnosti a náboja²⁹. Frekvencia oscilácií polarít na tyčiach je konštantná, mení sa amplitúda napätia na elektródach²⁴. Ióny, ktoré stabilnú trajektóriu pri danej kombinácii nemajú, narazia na elektródu a sú eliminované²⁹.

Konečným procesom je konvertovanie iónov, ktoré prešli analyzátorom na elektrický signál detektorom²². Najpoužívanejším detektorom je elektrónový násobič. Katióny narazia na prvú dynódu, na ktorú je privedené vysoké napätie. Dopad spôsobí emisiu mnohých elektrónov z jej povrchu. Tie dopadajú na ďalšiu dynódu, z ktorej vyrazia ďalšie elektróny, čím dochádza k sekundárnej emisii. Celý kaskádovitý proces sa opakuje, až kým nedôjde k vzniku signálu, ktorý je možné zmerať. Týmto spôsobom detektor generuje merateľný signál už na základe dopadu jedného iónu na detektor. Výsledkom je vysoká analytická citlivosť a bežný limit detekcie sa pohybuje v škálach nmol/l pre väčšinu prvkov. Konkrétna hodnota závisí aj na type stanovovaného prvku a matrice²³.

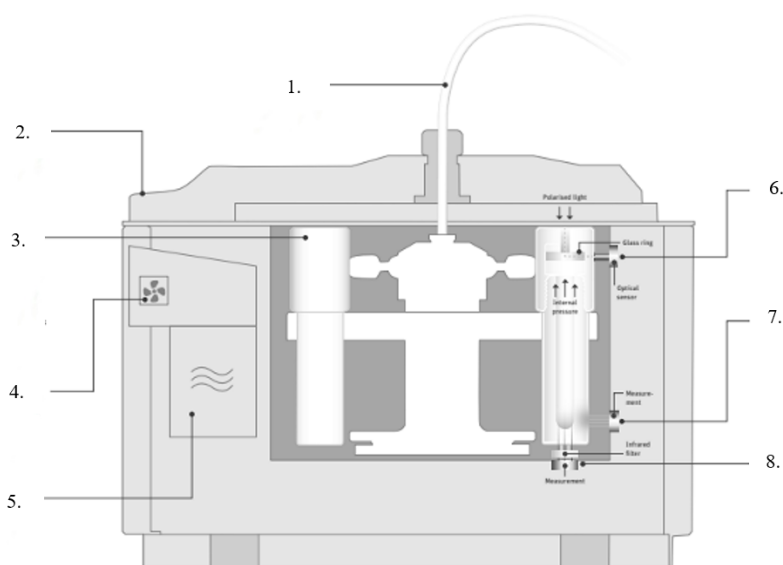
2.8 Úprava vzoriek pred analýzou

Vzorka je pred vlastným meraním upravená. Pri nedeštruktívnych metódach je analyzovaná neupravená vzorka, pri deštruktívnych je pred analýzou úplne rozložená. Vo všeobecnosti sú častejšie používané deštruktívne metódy.

Vzorka sa rozloží rozpustením vo vode alebo pôsobením iných chemických činidiel. V praxi sa využíva rozklad pôsobením silných anorganických kyselín, rozklad tavením, sintráciou, prípadne mineralizácia na suchej alebo mokrej ceste.

Mineralizácia spočíva v deštrukcii organickej matrice, ktorá je prevedená na

jednoduché anorganické zlúčeniny. Pyrolýza, mineralizácia na suchej ceste, sa uskutočňuje zahrievaním vzorky na vysokú teplotu, pričom prvky viazané v organických zlúčeninách prechádzajú na jednoduché anorganické plyny. Mineralizácia na mokrej ceste využíva pôsobenie kyselín a ich zmesí za zvýšenej teploty a tlaku a je uskutočňovaná v mineralizátoroch³⁰. Príkladom je zariadenie uvedené na *Obr. 2.4*. Rozklad je uskutočnený v rozkladných PTFE nádobách, ktoré sú zahrievané pomocou mikrovln produkovaných magnetronom. Rozkladné nádoby sú odolné voči kyselinám, vrátane kyseliny fluorovodíkovej³¹.



Obr. 2.4 – schéma mikrovlnného rozkladného zariadenia (prevzaté a upravené ³²)

1. Odvod plynov; 2. Ochranný uzáver; 3. Tlaková rozkladná nádoba; 4. Chladič; 5. Magnetron; 6. Optický systém na kontrolu tlaku; 7. Systém na kontrolu teploty nádoby; 8. Systém na kontrolu teploty v celom prístroji pomocou infračerveného žiarenia

3 Experimentálna časť

3.1 Použité prístroje

- Mikrovlnné rozkladné zariadenie Speedwave Xpert (Berghof, Nemecko)
- Hmotnostný spektrometer s indukčne viazanou plazmou 7900 ICP-MS (Agilent, USA)

3.2 Použité chemikálie

- kyselina dusičná HNO₃ 67-69%, analpure (ANALYTIKA, spol. s r.o., Česká republika) na mikrovlnný rozklad a prípravu roztokov
- peroxid vodíka H₂O₂ 30%, p.a.+ (ANALYTIKA, spol. s r.o., Česká republika) na mikrovlnný rozklad
- interný štandard INTMIX01-250 (Bi, In, Sc, Tb, Y) o koncentrácii analytov 10 mg/l, matrica 5% HNO₃ (v/v) (ANALYTIKA, spol. s r.o., Česká republika)
- viacprvkový certifikovaný referenčný materiál AN9094MFN-250 (As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Zn) o koncentrácii analytov 100 mg/l, matrica 0,2% HF + 5% HNO₃ (v/v) (ANALYTIKA, spol. s r.o., Česká republika) použitý na prípravu kalibračných roztokov
- kyselina dusičná HNO₃ ≥ 65%, Semiconductor grade (HONEYWELL, Germany) na prípravu roztokov pre dodatočné experimenty
- ladiaci roztok pre ICP-MS o koncentrácii 1 µg/l Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y v 2wt% HNO₃ (Agilent, USA)
- deionizovaná voda (0,055 µS) pripravená zariadením Milli-QPLUS (Millipore, USA) a použitá na riedenie vzoriek a prípravu roztokov

3.3 Vzorky

Pre účely bakalárskej práce bolo vybraných 5 vzoriek kávy, z ktorých štyri predstavovali vzorky mletých káv pôvodom z rôznych krajín a piata instantnú kávu. Tri vzorky mletých káv boli zadovážené v predajni spoločnosti Oxalis, spol. s r. o, pričom

boli namleté priamo v predajni. Mletá káva značky Lavazza bola kúpená v mletej podobe.

Vzorka č. 1: Brazília Santos

Pražená zrnková plantážna káva, pôvodom z Brazílie, 100% arabika od spoločnosti Oxalis, spol. s r.o.. Ide o zmes káv z fariem Capoeira a Colonia dos Pinheiros, ktoré sa nachádzajú v regióne Sul de Minas. Obsah kofeínu je stredný.

Vzorka č. 2: Etiópia Sheka Forest

Pražená zrnková plantážna káva, pôvodom z Etiópie, 100% arabika od spoločnosti Oxalis, spol. s r.o.. Premytá káva z oblasti Sheka Forest v Biosférickej rezervácii zapísanej na zozname UNESCO. Pochádza z farmy Gamadro, ktorú vedie Anbaw Abeto Kekilo. Obsahuje vysoké množstvo kofeínu.

Vzorka č. 3: Kolumbia Supremo Medellin

Pražená zrnková plantážna káva, pôvodom z Kolumbie, 100% arabika od spoločnosti Oxalis, spol. s r.o.. Vyznačuje sa väčším zrnom, pochádza prevažne od súkromných pestovateľov. Úrodná pôda a vhodné podnebie vo výške 1500 až 2000 metrov sú zárukou veľmi dobrých podmienok pre kvalitnú produkciu. Jej obsah kofeínu je stredný.

Vzorka č. 4: Lavazza Crema e Gusto

Lavazza Crema e Gusto od talianskej spoločnosti Lavazza S.p.A.. Ide o zmes, ktorú tvorí 30% arabiky a 70% robusty, pričom zrná arabiky pochádzajú zo Strednej a Latinskej Ameriky a zrná robusty z Afriky a Ázie. Pražená je v talianskom Turíne. Zmes je vhodná pre moka kanvice, klasické kanvice alebo na prípravu filtrovanej kávy.

Vzorka č. 5: Nescafé Classic

Instantná káva pôvodom z Brazílie od spoločnosti Nestlé. Vzniká zo starostlivo vybraných zrn, ktoré sa najprv opražia, namelú a pridaním vody sa z nich získa kávový extrakt. Potom sa voda nechá odpariť a výsledná zmes sa šetrne usuší. Počas výroby prechádza dvojitým filtrovaním. Káva je zmesou arabiky a robusty.

3.4 Pracovný postup

Rozklad vzoriek kávy

Jednotlivé vzorky kávy boli rozložené v mikrovlnnom rozkladnom zariadení Speedwave Xpert. Z každej vzorky bolo na analytických váhach navážených približne 180 mg na rozklad. Následne boli navážky presypané z vážiacich lodičiek do rozkladných patrón DAP-60 tak, aby celá navážka bola na dne nádoby. Do každej patróny boli pridané 4 ml 67-69% kyseliny dusičnej a 4 ml 30% peroxidu vodíka. Vnútorne steny nesmeli obsahovať kvapky vzorky, pri prípadnej kontaminácii stien bola vzorka spláchnutá dodatočným malým množstvom kyseliny dusičnej. Šiesta patróna obsahovala len zmes kyseliny a peroxidu a slúžila ako blank. Po pridaní činidiel bolo potrebné počkať približne 10 minút, aby prebehli prípadné spontánne reakcie, ktoré by v prístroji mohli rušiť rozklad vzoriek. Patróny boli následne vložené do rotoru prístroja tak, aby každá druhá pozícia rotoru ostala voľná, čo predstavuje usporiadanie pre rozklad šiestich vzoriek. Na patrónu, ktorá obsahovala najväčšie množstvo vzorky, bolo nasadené viečko na meranie tlaku, pretože pri vzorke, ktorá má najvyššiu hmotnosť je najväčšia pravdepodobnosť explózie a je teda vhodné sledovať aktuálnu hodnotu tlaku v tejto patrónke. Teplotný program rozkladu vzoriek kávy bol nastavený podľa parametrov uvedených v *Tab. 3.1*.

Tab. 3.1 – parametre mikrovlnného rozkladu vzoriek kávy

Číslo kroku	T °C	p bar	t_1 min	t_2 min	P %
1	145	30	5	5	40
2	200	35	5	10	40
3	50	25	1	10	0

T – maximálna dosiahnutá teplota daného kroku, p – maximálny dosiahnutý tlak daného kroku, t_1 – čas dosiahnutia teploty T , t_2 – čas udržiavania teploty T , P – výkon magnetronu

Po uskutočnení rozkladu a ochladení patrón boli patróny opatrne otvorené, aby došlo k uvoľneniu zvyškového tlaku v nádobách. Všetky vzorky kávy boli vo forme čírych priehľadných roztokov následne preliate do čistých a suchých vialiek. Steny

patrón boli opláchnuté deionizovanou vodou. Obsah vialiek bol následne doplnený na 30 ml deionizovanou vodou, pričom bol pripravený aj blank. Patróny boli ponechané na vychladnutie pri laboratórnej teplote a následne naplnené 5% kyselinou dusičnou na opláchnutie a ponechané v digestore do ďalšieho dňa.

Príprava roztoku interného (vnútorného) štandardu

Na prípravu roztoku interného štandardu bol použitý certifikovaný referenčný materiál pre ICP INTMIX01-250. Koncentrácia prvkov bola 200-krát zriedená. Do 100 ml deionizovanej vody bolo pridaných 0,5 ml interného štandardu. Následne boli pridané 2 ml kyseliny dusičnej, pričom roztok bol dobre premiešaný.

Príprava kalibračných roztokov

Kalibračné roztoky boli pripravené z viacprvkového referenčného materiálu AN9094MFN, ktorého obsah prvkov odpovedá koncentrácii 100 mg/l. Pracovný roztok bol pripravený 100-násobným zriedením, čím bol získaný roztok o koncentrácii 1,0 mg/l. Z neho boli pripravené kalibračné roztoky o koncentráciách 200; 40; 8,0; 2,0 a 0,0 µg/l, pričom posledný roztok slúžil ako blank. Každý roztok obsahoval aj 1 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej. Celkový objem roztokov predstavoval 50 ml.

Lúhovanie vzoriek mletej kávy

Sledovanie závislosti doby lúhovania kávy

Navážka 1,00 g vzorky č. 1 bola zaliata 25 ml deionizovanej vody o teplote 100 °C. Celkovo boli uskutočnené štyri merania, pričom doby lúhovania vzoriek odpovedali 1; 2,5; 5,0 a 10 minútam. Po uplynutí príslušnej doby lúhovania bola suspenzia prefiltrovaná cez filtračný papier do skúmavky. Roztok bol následne okyslený 1 ml 65% koncentrovanej kyseliny dusičnej a doplnený na výsledný objem 50 ml. Filtračné zvyšky boli ponechané na usušenie v digestore, premiestnené na čisté Petriho misky a prikryté.

Sledovanie závislosti teploty vody pri lúhovaní kávy

Navážka 1,00 g vzorky č. 1 bola zalievaná 25 ml deionizovanej vody o rôznych teplotách, ktoré predstavovali 20, 50, 70, 80 a 90 °C, pričom doba lúhovania vzoriek bola stanovená na 5 minút. Postup prípravy výsledných roztokov a sušenia filtračných zvyškov bol analogický ako v predchádzajúcom prípade. Zároveň bol pripravený aj blank, ktorý obsahoval deionizovanú vodu a 1 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej o celkovom objeme 50 ml.

4 Výsledky a diskusia

Nasledujúca kapitola podáva prehľad dosiahnutých výsledkov rozkladu vzoriek a uskutočnených extrakčných experimentov z hľadiska ich prvkového obsahu. Zobrazuje aj kalibračné závislosti pre jednotlivé prvky a odpovedajúce detekčné limity. Výsledky sú diskutované a zároveň porovnané s výsledkami v článkoch, ktoré sa zaoberali podobnou problematikou.

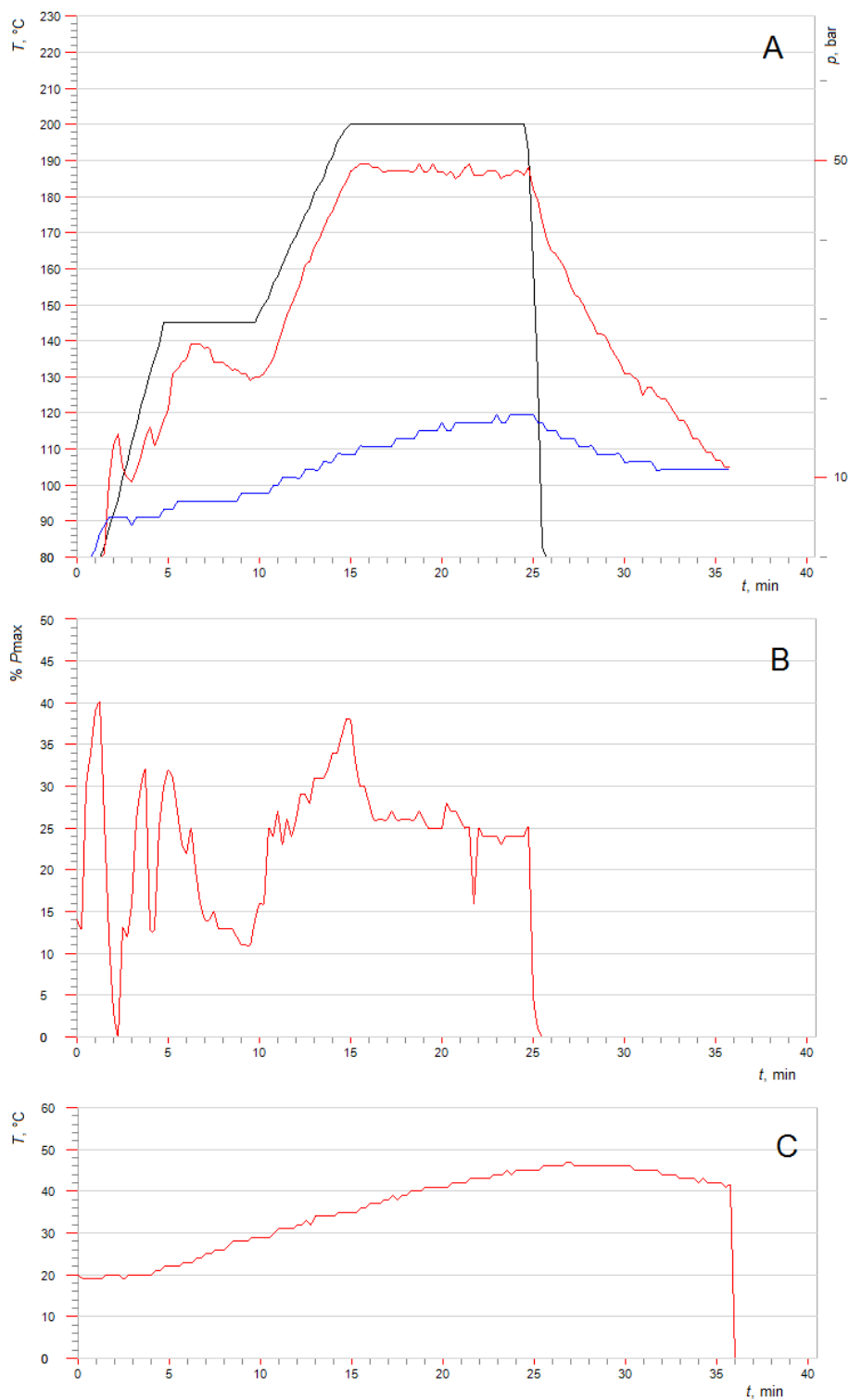
4.1 Mikrovlnný rozklad

V mikrovlnnom rozkladnom zariadení Speedwave Xpert bol uskutočnený rozklad vzoriek kávy spolu s blankom. Parametre rozkladného procesu boli nastavené podľa odporúčania výrobcu pre mikrovlnný rozklad kávy a sú uvedené v *Tab. 3.1*. Počas rozkladu bol sledovaný časový priebeh maximálnej teploty a tlaku krokov pre každú patrónu spolu s percentuálnym výkonom magnetronu. Zároveň bola monitorovaná teplota vonkajšieho povrchu patrón. Vzorky boli kompletne rozložené a získané vo forme čírych roztokov, ktoré neobsahovali nečistoty.

Graf A na *Obr. 4.1* popisuje časový priebeh teploty na ľavej strane a tlaku na pravej strane. Čierna krivka predstavuje časovú závislosť nastavenej teploty v priebehu rozkladu podľa parametrov uvedených v *Tab. 3.1* a červená krivka odpovedá časovému priebehu reálnej teploty. Časovú závislosť tlaku popisuje modrá krivka. V porovnaní s nastavenými hodnotami tlaku (uvedených v *Tab. 3.1*) možno pozorovať, že nastavené hodnoty tlaku neboli experimentálne dosiahnuté, pretože maximálna hodnota tlaku nebola vyššia ako 20 bar. To však nemalo negatívny vplyv na účinnosť rozkladu.

Časový priebeh percentuálneho výkonu magnetronu v priebehu rozkladu zobrazuje graf B v *Obr. 4.1*.

Graf C na *Obr. 4.1* ukazuje časový priebeh teploty vonkajšieho povrchu rozkladných patrón.



Obr. 4.1 – závislosti parametrov rozkladného zariadenia na čase pri teplotnom programe

A: nastavená teplota (čierna), časový priebeh reálnej teploty (červená) a tlaku (modrá); B: závislosť percentuálneho výkonu magnetronu na čase; C: závislosť teploty plášťa a patrón na čase

4.2 Merací program ICP-MS

Hmotnostným spektrometrom s indukčne viazanou plazmou 7900 ICP-MS boli namerané údaje, ktoré boli použité na ďalšie vyhodnocovanie.

Program prístroja bol určený na meranie prvkov s nasledujúcimi izotopmi: ^{54}Fe , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu a ^{66}Zn . S uvedenými izotopmi analyzovaných prvkov bol súčasne meraný aj izotop ^{45}Sc , ktorý slúžil ako porovnávací prvok (vnútorný alebo interný štandard). Pre vlastnú analýzu bol vybraný len jeden izotop pre každý prvok.

Merací program prístroja bol nastavený na meranie blanku celkom 10-krát. Následne boli zmerané kalibračné závislosti pre vybrané izotopy stanovovaných prvkov. Po zmeraní kalibračných kriviek bol určený celkový prvkový obsah všetkých rozložených vzoriek. Na záver bol zmeraný prvkový obsah roztokov pre sledovanie vplyvu doby lúhovania kávy a roztokov pre sledovanie vplyvu teploty vody.

Analýza bola uskutočnená v triplikátoch. Meranie bolo uskutočnené v „no-gas“ móde a v „He-móde“ (mód so zavedeným héliom v reakčnej/kolíznej cele), pričom pre analýzu prvkového zloženia vzoriek a oboch experimentov boli vybrané hodnoty namerané v „no-gas“ móde. Hodnoty koncentrácií namerané v oboch módoch boli zrovnateľné.

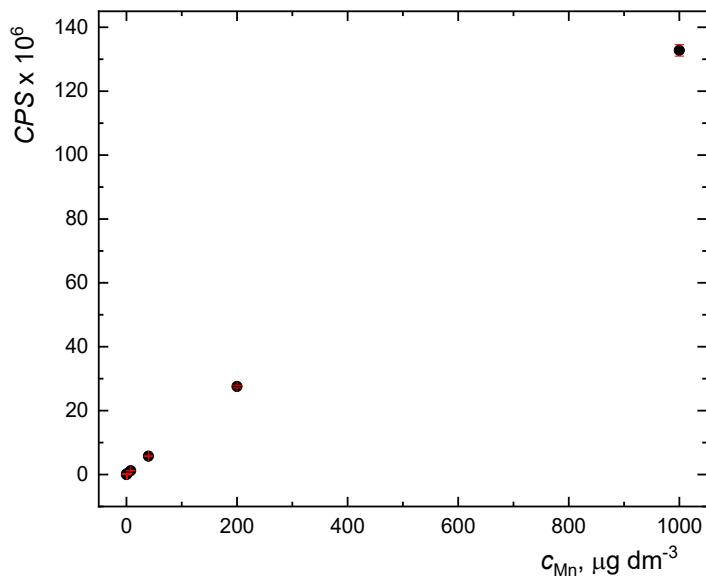
4.3 Kalibračné závislosti

Pre analyzované prvky boli namerané hodnoty na určenie kalibračných závislostí. Tie boli vykreslené ako závislosť CPS na koncentrácii c každého prvku. Pri polyizotopických prvkoch bol po vyhodnotení možných interferencií vybraný jeden izotop s najmenšou mierou interferencií s inými časticami, ktoré bolo možné predpokladať v priebehu analýz.

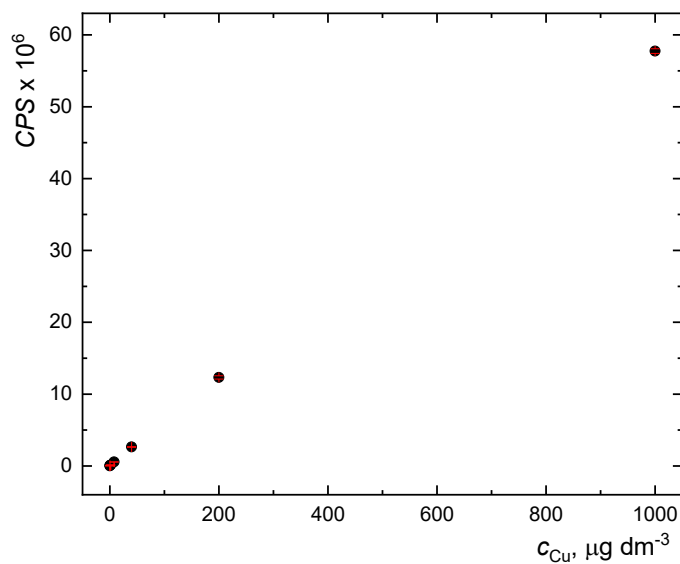
Mangán je monoizotopický prvok, ktorého jediný stabilný izotop vyskytujúci sa v prírode je ^{55}Mn . V argónovej plazme je ionizovaný približne z 93 %, vďaka čomu môže slúžiť aj ako interný štandard, pokiaľ nie je analyzovaným prvkom. Získanú kalibračnú závislosť zobrazuje *Obr. 4.2*.

Meď patrí medzi diizotopické prvky. Izotop ^{63}Cu vykazuje zastúpenie 69,15 % a izotop ^{65}Cu 30,85 % z celkového množstva medi vyskytujúcej sa v prírode. Pre

potreby bakalárskej práce boli použité hodnoty namerané pre izotop ^{65}Cu , pretože v prípade izotopu ^{63}Cu máme pomerne silnú interferenciu s časticou NaAr, ktorá dosahuje až 99,6 %. V argónovej plazme je meď ionizovaná takmer z 90 %. Kalibračnú závislosť medzi uvádza Obr. 4.3.



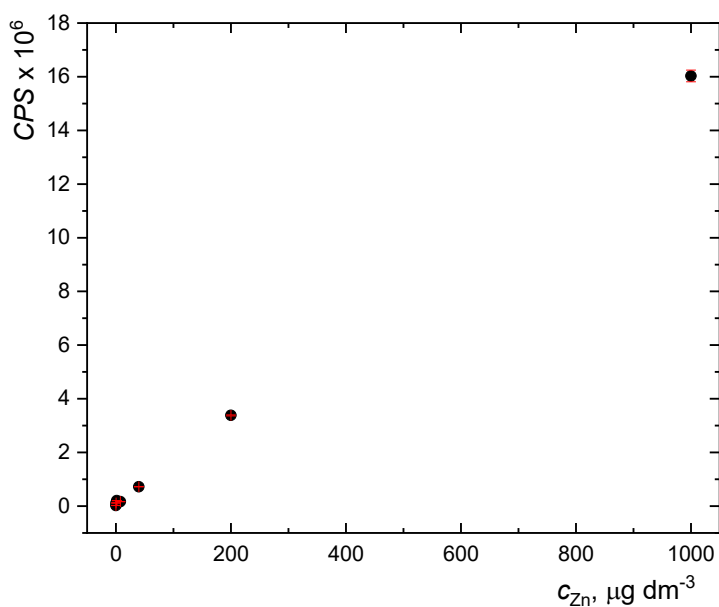
Obr. 4.2 – kalibračná závislosť pre ^{55}Mn



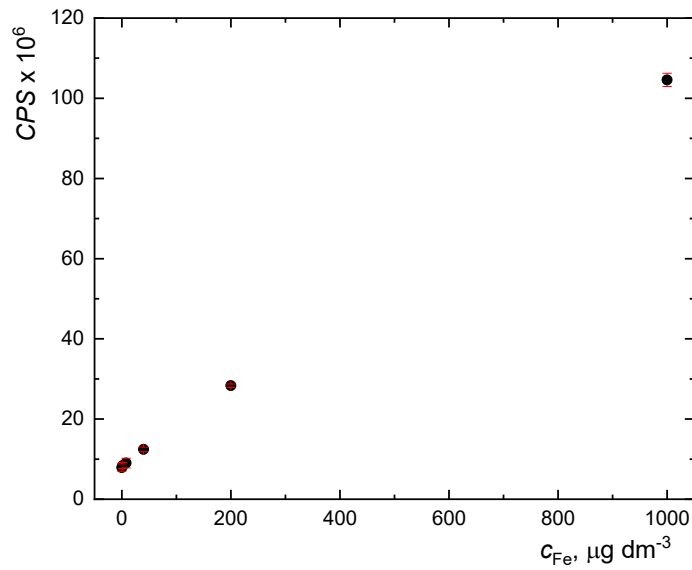
Obr. 4.3 – kalibračná závislosť pre ^{63}Cu

Zinok je polyizotopický prvok a má celkovo 5 izotopov vyskytujúcich sa v prírode. Najväčšie zastúpenie má ^{64}Zn (48,27 %), ďalej ^{66}Zn (27,98 %), ^{68}Zn (19,02 %), ^{67}Zn (4,1 %) a ^{70}Zn (0,63 %). Pre analýzu bol zvolený izotop ^{66}Zn , pretože má najmenej interferencií s časticami o rovnakej hodnote m/z . V argónovej plazme je ionizovaný z 33 %. Kalibračná závislosť je zobrazená na *Obr. 4.4*.

Železo patrí tiež medzi polyizotopické prvky. Najrozšírenejší izotop je ^{56}Fe (91,75%), ďalej ^{54}Fe (5,85%), ^{57}Fe (2,12%) a ^{58}Fe (0,28%). Pre účely bakalárskej práce bol vybraný izotop ^{56}Fe , ktorého kalibračná závislosť je zobrazená na *Obr. 4.5*. Približne 86 % železa je ionizovaných v argónovej plazme, pričom je obtiažne stanoviť všetky izotopy konvenčnou metódou.



Obr. 4.4 – kalibračná závislosť pre ^{66}Zn



Obr. 4.5 – kalibračná závislosť pre ^{56}Fe

Z kalibračných závislostí pre jednotlivé prvky boli získané kalibračné rovnice, ktorých prehľad uvádza Tab. 4.1. V tabuľke sú tiež uvedené hodnoty parametra R.

Tab. 4.1 – rovnice získaných kalibračných závislostí pre analyzované prvky a hodnoty parametra R

Prvok	rovnica	R
Mn	$y = 0,1336x + 0,0199$	1,0000
Cu	$y = 0,0582x + 0,0202$	1,0000
Zn	$y = 0,0161x + 0,0240$	1,0000
Fe	$y = 0,0975x + 7,8024$	1,0000

4.4 Detekčné limity prvkov

Pre jednotlivé prvky bol zmeraný blank celkom 10-krát. Z odpovedajúcich hodnôt CPS bol vypočítaný priemer, smerodajná odchýlka a jej trojnásobná a desaťnásobná hodnota. Boli tiež určené hodnoty detekčných limitov pre stanovované

prvky a hodnoty koncentrácií na úrovni šumu. Výsledné hodnoty zobrazuje *Tab. 4.2*. Z nej je patrné, že zo všetkých stanovovaných prvkov má najvyššiu hodnotu detekčného limitu železo, čo potvrdzuje skutočnosť, že tento prvok môže byť významným interferentom a môže byť prítomné ako nečistota alebo kontaminant v mnohých chemikáliách.

Tab. 4.2 - hodnoty priemeru signálov, smerodajných odchýlok, ich trojnásobná a desaťnásobná hodnota pre stanovované prvky, detekčný limit a koncentrácie na úrovni šumu

Prvok	Priemer CPS	SD	3·SD	10·SD	DL μg/l	BEC μg/l
Mn	23214	390	1170	3901	0,010	0,15
Cu	62320	1928	5783	19275	0,037	0,35
Zn	42393	11017	33052	110174	0,073	1,49
Fe	8467552	112411	337233	1124109	1,257	80,01

4.5 Prvkový obsah vzoriek

Koncentrácie prvkov v rozložených vzorkách sú uvedené v *Tab. 4.3*.

Tab. 4.3 – prvkový obsah rozložených vzoriek kávy

Vzorka	<i>c</i> Mn μg/g	<i>c</i> Cu μg/g	<i>c</i> Zn μg/g	<i>c</i> Fe μg/g
1	31,6 ± 0,14	13,6 ± 0,08	4,68 ± 0,05	26,8 ± 0,58
2	13,3 ± 0,29	10,6 ± 0,17	4,53 ± 0,06	20,0 ± 0,54
3	34,4 ± 0,23	13,3 ± 0,23	5,35 ± 0,02	25,8 ± 0,06
4	18,9 ± 0,17	12,4 ± 0,08	4,02 ± 0,03	55,8 ± 0,32
5	7,58 ± 0,08	0,21 ± 0,00	1,58 ± 0,02	12,2 ± 0,33

Z výsledných koncentrácií uvedených vyššie je zrejmé, že prvkový obsah vo vzorkách mletých káv vykazuje pomerne široké rozmedzie hodnôt. Koncentrácia

prvkov vo vzorke instantnej kávy sa hodnotami výrazne odlišuje od hodnôt pre mleté vzorky.

Rôzny prvkový obsah vo vzorkách môže byť spôsobený mnohými faktormi. V prípade použitých vzoriek môže byť jedným z nich aj rozdielna krajina pôvodu každej vzorky. Najvyššiu koncentráciu mangánu a zinku obsahuje vzorka kávy z Kolumbie, najviac medi sa nachádza vo vzorke brazílskej kávy a najvyšším obsahom železa disponuje vzorka kávy značky Lavazza. Najnižšiu koncentráciu všetkých prvkov vykazuje instantná káva Nescafé Classic.

Získané výsledky pre vzorku brazílskej kávy (vzorka č. 1) boli porovnané so štúdiou ⁶, ktorá sa zaoberala prvkovou analýzou brazílskej praženej mletej kávy. Autori publikovali, že najvyššie zastúpenie vykazuje železo, následne mangán, meď a zinok. V porovnaní s experimentálne zistenými hodnotami uvedenými v *Tab. 4.3* pre vzorku č. 1 možno konštatovať, že najväčšie zastúpenie vykazuje mangán, následne železo, meď a zinok. Z hľadiska nameraných hodnôt je zistené množstvo mangánu v štúdiu takmer zhodné s našim výsledkom, zatiaľ čo železo bolo namerané vo viac než dvojnásobne nižšej koncentrácii ako v porovnávannej štúdiu. Obsah medi a zinku bol tiež nameraný v nižšej koncentrácii oproti hodnotám v štúdiu.

Hodnoty pre vzorku kávy z Etiópie (vzorka č. 2) boli porovnané so štúdiou ⁷, ktorá sa tiež zaoberala analýzou prvkového zloženia etiópskej kávy. Experimentálne hodnoty uvedené v *Tab. 4.3* udávajú poradie pre koncentráciu prvkov nasledovne: Fe > Mn > Cu > Zn. V štúdiu je poradie pre železo a mangán zhodné s výsledkami z bakalárskej práce. Obsah medi a zinku je rôzny v závislosti na značke etiópskej kávy, pričom sa vyskytujú vo veľmi podobných koncentráciách. V článku boli pre každý prvok určené vyššie koncentrácie ako v bakalárskej práci.

4.6 Vplyv doby lúhovania

Jedným z cieľov bakalárskej práce bolo aj sledovanie vplyvu doby lúhovania mletej kávy vo vriacej vode na prvkový obsah extraktov. Tento experiment bol uskutočnený len pre vzorku č. 1 (mletá káva pôvodom z Brazílie). Výsledné hodnoty koncentrácií jednotlivých prvkov uvádza *Tab. 4.4*.

Pre názornejšiu predstavu vyextrahovaného množstva prvku po danú dobu lúhovania mletej kávy boli údaje z *Tab. 4.4* použité na výpočet percentuálneho

množstva extrakcie na totálny prvkový obsah jednotlivých vzoriek, ktorý je uvedený v *Tab. 4.3*. Výsledky sú uvedené v *Tab. 4.5*.

Tab. 4.4 – vplyv doby lúhovania

<i>t</i>	<i>c</i> Mn	<i>c</i> Cu	<i>c</i> Zn	<i>c</i> Fe
min	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
1,0	14,0 ± 0,1	0,55 ± 0,01	3,50 ± 0,02	1,30 ± 0,03
2,5	14,7 ± 0,1	0,64 ± 0,00	3,83 ± 0,03	1,28 ± 0,03
5,0	15,5 ± 0,1	0,68 ± 0,01	1,82 ± 0,04	1,39 ± 0,06
10	16,3 ± 0,2	0,68 ± 0,00	1,96 ± 0,01	1,51 ± 0,06

Tab. 4.5 – percento extrakcie prvkov pre sledovanie doby lúhovania

<i>t</i>	Mn	Cu	Zn	Fe
min	%	%	%	%
1,0	44,3	4,1	74,8	4,8
2,5	46,3	4,7	81,9	4,8
5,0	48,9	5,0	38,6	5,2
10	51,5	5,0	42,0	5,6

Takmer všetky prvky vykazujú miernu závislosť ich extrakcie na dobe lúhovania vo vriacej vode, pričom z údajov v *Tab. 4.4* a *Tab. 4.5* možno pozorovať, že vyextrahované množstvo prvkov rastie s rastúcou dobou lúhovania. Výnimkou je zinok, ktorého množstvo je pri 5 minútach lúhovania vo vriacej vode viac ako dvojnásobne nižšie ako v prípade lúhovania pri 2,5 minútach.

Článok ⁵ sa zaoberá porovnávaním obsahu prvkov v kávových zrnách a ich výluhoch. Doba extrakcie predstavovala 5 minút, pričom pri prvkoch Cu, Zn a Fe bol pozorovaný trend, ktorý je označovaný ako tzv. špongiový efekt kávy. Tieto prvky vykazovali pomerne vysoké zastúpenie v zrnách, ale vo výluhoch bola ich koncentrácia podstatne nižšia. V našom prípade možno pozorovať, že zinok je pomerne silno extrahovaný oproti ostatným prvkom a meď a železo majú podobné percento extrakcie. Špongiový efekt kávy možno teda pripísať na základe meraní hlavne železu a medi.

4.7 Vplyv teploty lúhovania

Posledným sledovaným faktorom bola teplota použitej deionizovanej vody na lúhovanie mletej vzorky kávy č. 1. Hodnoty nameraných koncentrácií pre analyzované prvky a ich izotopy zobrazuje *Tab. 4.6*.

Tab. 4.6 – vplyv teploty lúhovania

<i>T</i> °C	<i>c</i> Mn µg/g	<i>c</i> Cu µg/g	<i>c</i> Zn µg/g	<i>c</i> Fe µg/g
20	15,4 ± 0,2	1,10 ± 0,00	3,03 ± 0,02	3,42 ± 0,03
50	15,4 ± 0,2	0,77 ± 0,01	2,42 ± 0,02	2,07 ± 0,10
70	15,7 ± 0,1	0,74 ± 0,00	2,25 ± 0,02	1,76 ± 0,04
80	15,2 ± 0,2	0,72 ± 0,00	2,10 ± 0,02	1,60 ± 0,05
90	14,9 ± 0,1	0,66 ± 0,00	2,47 ± 0,02	1,56 ± 0,04

Uvedené hodnoty boli prepočítané na celkové množstvo prvku vo vzorkách mletej kávy, čím bolo opäť zistené percento extrakcie pre jednotlivé prvky v závislosti na teplote vody. Výsledky zobrazuje *Tab. 4.7*.

Tab. 4.7 – percento extrakcie prvkov pre vplyv teploty vody počas lúhovania

<i>T</i> °C	Mn %	Cu %	Zn %	Fe %
20	48,6	8,1	64,7	12,7
50	48,8	5,7	51,8	7,7
70	49,8	5,4	48,1	6,5
80	48,1	5,3	44,7	6,0
90	47,0	4,9	52,8	5,8

Z uvedených hodnôt vyplýva, že s rastúcou teplotou vody dochádza k poklesu vyextrahovaného množstva prvkov. Avšak pri mangáne pozorujeme trend, ktorý naznačuje, že pri teplote vody do 70 °C dochádza k zvýšeniu vyextrahovaného množstva mangánu vo výluhu. S ďalším zvyšovaním teploty začína množstvo mangánu

vo výluhoch znovu klesať. Zinok vykazuje tiež pomerne nepravidelný nárast a pokles vyextrahovaného množstva vo vode v závislosti na jej teplote.

Pri laboratórnej teplote vody dochádza k extrakcii najväčšieho množstva v prípade medi, zinku a železa. Pri zvyšovaní teploty vody nepozorujeme zvyšovanie hodnôt.

Meď a železo sa radia veľmi podobným trendom. Množstvo extrakcie pri zvýšení teploty vody o 30 °C sa prejaví výraznejším znížením množstva extrahovaného prvku. S ďalším zvyšovaním teploty o 10 °C možno pozorovať miernejší pokles hodnôt.

5 Záver

Ciele práce boli splnené. Bol stanovený obsah vybraných stopových prvkov vo všetkých vzorkách mletej aj instantnej kávy pomocou spektrálnej metódy hmotnostnej detekcie s indukčne viazanou plazmou. Namerané hodnoty sa nenachádzali pod limitom detekcie pre jednotlivé prvky. Instantná káva nie je veľmi bohatým zdrojom analyzovaných stopových prvkov. V porovnaní so štúdiami, ktoré sa zaoberali podobnou problematikou, bol nameraný nižší obsah stanovovaných prvkov vo vybraných vzorkách mletej kávy v porovnaní s hodnotami uvedených v článkoch.

Sledovaním vplyvu doby lúhovania mletej kávy a vplyvu teploty vody počas lúhovania boli získané údaje o obsahu prvkov vo výluhoch. Všetky prvky prešli v rôznych koncentráciách zo vzoriek do výluhov. Všetky prvky okrem zinku vykazujú závislosť na dobe lúhovania mletej kávy vo vriacej vode, pričom ich obsah v extraktoch sa postupne zvyšuje. Z pohľadu závislosti prvkového obsahu na teplote vody pri lúhovaní pozorujeme pre meď a železo postupný pokles množstva vyextrahovaného prvku, pričom zinok nevykazuje závislosť na teplote vody pri lúhovaní. Percento extrakcie mangánu spočiatku rastie a pri teplote vody okolo 70 °C dochádza k jeho postupnému poklesu.

6 Použitá literatura

1. Tauferová, A., Ošťádalová, M., Javůrková, Z., Petrášová, M. & Čáslavková, P. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II.* Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014.
2. Kadlec, P. *Technologie potravin. II.* Vysoká škola chemicko-technologická, 2002.
3. Pohl, P. *et al.* Response surface methodology assisted development of a simplified sample preparation procedure for the multielement (Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn) analysis of different coffee brews by means of inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* **241**, 1–10 (2022).
4. Jarošová, M., Milde, D. & Kuba, M. Elemental analysis of coffee: A comparison of ICP-MS and AAS methods. *Czech Journal of Food Sciences* **32**, 354–359 (2014).
5. Janda, K. *et al.* Mineral composition and antioxidant potential of coffee beverages depending on the brewing method. *Foods* **9**, 1–16 (2020).
6. Debastiani, R. *et al.* Elemental analysis of Brazilian coffee with ion beam techniques: From ground coffee to the final beverage. *Food Research International* **119**, 297–304 (2019).
7. Ashu, R. & Chandravanshi, B. S. Concentration levels of metals in commercially available Ethiopian roasted coffee powders and their infusions. *Bull Chem Soc Ethiop* **25**, 11–24 (2011).
8. Adler, G., Nędzarek, A. & Tórz, A. Concentrations of selected metals (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Al, Ni, Pb, Cd) in coffee. *Zdravstveno Varstvo* **58**, 187–193 (2019).
9. de Melo Pereira, G. v. *et al.* Chemical composition and health properties of coffee and coffee by-products. *Advances in Food and Nutrition Research* **91**, 65–96 (2020).
10. Albals, D., Al-Momani, I. F., Issa, R. & Yehya, A. Multi-element determination of essential and toxic metals in green and roasted coffee beans: A comparative study among different origins using ICP-MS. *Science Progress* **104**, 1–17 (2021).
11. Nędzarek, A. *et al.* Concentrations of heavy metals (Mn, Co, Ni, Cr, Ag, Pb) in

- coffee. *Acta Biochimica Polonica* **4**, 623–627 (2013).
12. Fraga, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 235–244 (2005).
 13. Rajkowska, M. & Protasowicki, M. Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophic level in Northwestern Poland. *Environmental Monitoring and Assessment* **185**, 3493–3502 (2013).
 14. Hänsch, R. & Mendel, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 259–266 (2009).
 15. Avila, D. S., Puntel, R. L. & Aschner, M. Manganese in Health and Disease. *Met Ions Life Sci* **13**, 199–227 (2013).
 16. Pilon, M., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Gogolin, K. A. & Ye, H. Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 256–263 (2006).
 17. Saper, R. B. & Rash, R. Zinc: An Essential Micronutrient. *American family physician* **79**, 768–772 (2009).
 18. Graham, R. D. & Stangoulis, J. C. R. Trace Element Uptake and Distribution in Plants. *The Journal of Nutrition* **133**, 1502–1505 (2003).
 19. Miller, J. L. Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, 1–14 (2013).
 20. Al-Hakkani, M. F. Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP–MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. *SN Applied Sciences* **1**, 1–15 (2019).
 21. Pröfrock, D. & Prange, A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: A review of challenges, solutions, and trends. *Applied Spectroscopy* **66**, 843–868 (2012).
 22. Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners. Practical Guide to ICP-M*. CRC Press, 2008.
 23. Wilschefski, S. C. & Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical Biochemist Reviews* **40**, 115–133 (2019).
 24. Mihaljevič, M., Strnad, L. & Šebek, O. Využití hmotnostní spektrometrie s

- indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické Listy* 123–130 (2004).
25. Matoušek, T. Generování hydridů ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2015.
 26. Urban, P. L. Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374**, 1–5 (2016).
 27. Glish, G. L. & Vachet, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003 2:2 **2**, 140–150 (2003).
 28. Agilent Technologies, Inc. *The Agilent 7800/7900 ICP-MS Hardware Maintenance Manual*. (2019).
 29. Miller, P. E. & Denton, M. B. The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts. *Journal of Chemical Education* **63**, 617–623 (1986).
 30. Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P. & Plzák, Z. *Základní analytická chemie*. Nakladatelství Karolinum Univerzita Karlova, Praha, 2003.
 31. Berghof Products + Instruments GmbH. *Speedwave Xpert Mikrovlnný mineralizační systém*.
 32. Berghof Products + Instrument GmbH. *Speedwave Xpert The Professional*. dostupné z URL:
https://www.dijkstra.net/media/catalog/category/berghof_speedwave_xpert.pdf