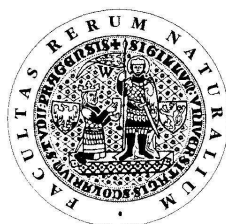


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Pavína Králová

Stanovení Se ve vybraných potravinových doplňcích pomocí
elektrochemického generování H_2Se a AAS
Determination of Se in selected food supplements using
electrochemical generation of H_2Se and AAS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Václav Červený Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. května 2012

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Václavu Červenému Ph.D za odborné vedení, rady, připomínky a v neposlední řadě za ochotu a trpělivost. Poděkování patří také rodině, která mě vždy finančně podporovala při studiu.

ABSTRAKT

Cílem předkládané práce bylo prověřit účinnost elektrochemického generování selenovodíku ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií při stanovení selenu v reálných vzorcích, konkrétně vybraných doplňcích stravy s deklarovaným obsahem selenu.

Nejprve byly optimalizovány pracovní podmínky elektrochemického generování selenovodíku. V optimalizované aparatuře byly proměřeny kalibrační závislosti pro Se^{IV} a Se^{VI} přičemž bylo zjištěno, že pro kvantitativní stanovení selenanů je třeba využít předredukce. Podmínky provedení předredukce Se^{VI} na Se^{IV} byly tedy rovněž optimalizovány a z dalších kalibračních závislostí (po provedené předredukci) byly určeny základní charakteristiky stanovení těchto specií selenu.

Na závěr byly stanoveny koncentrace Se v reálných vzorcích potravinových doplňků s deklarovanými obsahy Se^{IV} a Se^{VI} a byly diskutovány nežádoucí vlivy na takovéto stanovení.

Klíčová slova:

Atomová absorpční spektrometrie, elektrochemické generování těkavých sloučenin, předredukce, selen, potravinové doplňky

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to verify the efficiency of electrochemical generation of H_2Se in connection with atomic absorption spectrometry used to determination of selenium in real samples, specifically in selected food supplements with the declared content of selenium.

Firstly, working conditions of apparatus for electrochemical generation of H_2Se with atomic absorption spectrometry were optimized. Using these optimized conditions, calibration dependences for Se^{IV} a Se^{VI} were measured. It was found that for the quantitative determination of selenate, the prerelution step is needed. Therefore, prerelution of Se^{VI} to Se^{IV} was also optimized. After prerelution step, new calibrations were measured and figures of merit of determination of these selenium species were achieved from them.

In conclusion, concentrations of Se in real samples of selected food supplements with the declared contents of Se^{IV} and Se^{VI} were determined and interference effects for such determination have been discussed.

Key words:

Atomic absorption spectrometry, electrochemical generation of volatile compounds, prerelution, selenium, food supplements

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
1. Úvod.....	10
1.1. Cíle bakalářské práce	10
2. Teoretická část	11
2.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti selenu	11
2.2. Toxicita sloučenin selenu.....	11
2.2.1. Anorganické sloučeniny	12
2.2.2. Organické sloučeniny	12
2.3. Výskyt selenu v přírodě.....	12
2.3.1. Půda	13
2.3.2. Voda	13
2.3.3. Vzduch.....	13
2.3.4. Rostliny	14
2.3.5. Živočichové	14
2.4. Vliv selenu na lidské zdraví	15
2.4.1. Antioxidační vlastnosti selenu.....	15
2.4.2. Vliv na rozvoj karcinogeneze.....	15
2.4.3. Nedostatečný příjem selenu.....	16
2.5. Potraviny obsahující selen.....	16
2.5.1. Potraviny rostlinného původu	16
2.5.2. Potraviny živočišného původu	17
2.5.3. Potravinové doplňky.....	17
2.6. Atomová absorpční spektrometrie	17
2.6.1. Instrumentace pro AAS.	17
2.6.2. Lambertův – Beerův zákon	18
2.7. Techniky generování těkavých sloučenin	18
2.7.1. Chemické generování těkavých sloučenin	19
2.7.2. UV – fotochemické generování těkavých sloučenin.....	19
2.7.3. Elektrochemické generování těkavých sloučenin	19
2.7.4. Instrumentace pro EchG – AAS	20

2.7.4.1. Elektrochemická průtoková cela	20
2.7.4.2. Transportní systém	20
2.7.4.3. Atomizátor	20
2.7.4.4. Separátor fází	21
2.7.4.5. Zdroj konstantního proudu	21
2.7.4.6. Nosný plyn	21
2.7.4.7. Spojovací materiál	21
3. Experimentální část	22
3.1. Instrumentace	22
3.1.1. Cela	22
3.1.2. Aparatura pro kontinuální EcHG – AAS	23
3.2. Použité chemikálie	24
4. Výsledky a diskuze	26
4.1. Optimalizace pracovních podmínek elektrochemického generování	26
4.1.1. Koncentrace HCl v katolytu	27
4.1.2. Průtoková rychlost katolytu	28
4.1.3. Průtok nosného plynu	29
4.1.4. Generační proud	30
4.1.5. Teplota vyhřívání	31
4.2. Předredukce	32
4.3. Kalibrace	33
4.3.1. Kalibrace Se^{IV}	34
4.3.2. Kalibrace Se^{VI}	35
4.4. Analýza praktických vzorků potravinových doplňků	36
5. Závěr	39
Použitá literatura	40

Seznam zkratek a symbolů

A	Absorbance
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
anolyt	Roztok protékající anodovým prostorem generační cely
Ar	Argon
c	Koncentrace analytu
CHG	Chemické generování těkavých sloučenin
Cu ^{II}	Měďnatý iont
DDD	Doporučená denní dávka
EcHG	Elektrochemické generování těkavých sloučenin
E	Oxidačně – redukční potenciál
EDL	Bezelektroodová výbojka
ET – AAS	AAS s elektrotermickou atomizací
F – AAS	AAS s plamenovou atomizací
I	Generační elektrický proud
ICP – AES	Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
katolyt	Roztok protékající katodovým prostorem generační cely
<i>l</i>	Délka absorpčního prostředí
LDR	Lineární dynamický rozsah
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
M	Molární – odpovídající jednotkám koncentrace [mol.dm ⁻³]
PHG	Fotochemické generování těkavých sloučenin
ppb	koncentrace odpovídající jednotkám [ng.ml ⁻¹]
ppm	koncentrace odpovídající jednotkám [μg.ml ⁻¹]
QF – AAS	AAS s křemennými atomizátory
ROS	Reaktivní formy kyslíku
Se ^{IV}	Seleničitanový iont
Se ^{VI}	Selenanový iont

SeMet	Selenomethionin
SODs	Superoxiddismutázy
Tbl.	Tableta
VR	Volné radikály
WHO	Světová zdravotnická organizace
Zn ^{II}	Zinečnatý iont
κ	Atomový absorpční koeficient
Φ_0	Intenzita nezeslabeného toku záření
Φ	Intenzita záření prošlého analytem

1. Úvod

1.1. Cíle bakalářské práce

Tato bakalářská práce logicky navazuje na práce předchozí, nesnaží se však jen zaujmout nízkými mezemi detekce a stanovitelnosti při stanovení selenu ve vodách a modelových vzorcích. Cílem této práce je prozkoumat možnosti využití elektrochemického generování selenovodíku (H_2Se) pro stanovení selenu ve složitější matrici – vybraných potravinových doplňcích stravy a vitamínových preparátech.

Elektrochemické generování je v poslední době stále více využívaným způsobem generování těkavých sloučenin. Ve srovnání s chemickým generováním je zde potlačena řada nevýhod, např. se snižuje možnost kontaminace pomocí použitých chemikálií a tím dochází k případnému snížení meze detekce.

2. Teoretická část

2.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti selenu

Selen je poměrně vzácný polokov ze VI. A skupiny periodické tabulky prvků s protonovým číslem 34, relativní atomovou hmotností 78,96 a s bodem varu 685°C. Elektronová konfigurace tohoto prvku je o 2 p elektrony nižší, než je elektronová konfigurace následujícího vzácného plynu. Vyskytuje se v oxidačním čísle -2 (selenidy), 0 (elementární selen), 4 (seleničitany) a 6 (selenany). Vůči kovům a vodíku vystupuje s oxidačním číslem -2. Ve sloučeninách, v nichž tvoří elektropozitivní část, dává přednost oxidačnímu číslu 4 a pouze s fluorem upřednostňuje oxidační číslo 6.^{1,2,4}

Selen je svými chemickými vlastnostmi velmi podobný síře. Vyznačuje se afinitou k těžkým kovům, zejména kadmiu, zlatu a rtuti. Sloučeniny selenu se nachází v zemské kůře v koncentraci okolo 5 ppm a v přírodě většinou doprovází síru v sulfidických rudách ve formě selenidů.^{1,3}

Elementární selen se vyskytuje ve větším počtu alotropických modifikací, ve třech sytě červených monoklinických (jednoklonných) formách, v šedé krystalické formě a jako černý sklovitý selen.^{1,5} Šedý selen je polovodičem, který v temnu vede elektrický proud jen nepatrně, při osvětlení však dochází k tisícinásobnému vzrůstu vodivosti. Tohoto jevu se využívá při konstrukci fotočlánků (zařízení, která při změně světelného toku mění elektrický proud).^{2,3}

2.2. Toxicita sloučenin selenu

Toxické účinky selenu byly poprvé popsány ještě dávno předtím, než jej v roce 1817 Berzelius identifikoval jako prvek v kalu olověných komor na kyselinu sírovou. Již ve 13. století pozoroval Marco Polo během svých cest do západní Číny toxické účinky selenu u koní, které byly způsobeny rostlinami rostoucími na půdách bohatých na selen, kdy docházelo k sorpci selenu do těchto rostlin. Do roku 1950 byl selen považován za toxický prvek pro člověka, ale v roce 1958 Schwarz a Foltz popsali

vztah mezi přísunem selenu z potravin a prevencí nekrózy jater u krys. Význam příjmu selenu pro člověka byl objasněn v roce 1970, kdy byl prokázán vztah mezi onemocněním srdečního svalu a nedostatkem selenu.^{6,7}

Toxicita selenu závisí nejen na množství, ale také na chemické formě, ve které se nachází ve sloučeninách. Přiměřená denní dávka pro člověka staršího 19 let je 55 µg, při opakované dávce vyšší než 400 µg dochází ke vzniku selenózy.^{6,7}

2.2.1. Anorganické sloučeniny

Elementární selen a selenidy jsou z anorganických sloučenin selenu nejméně toxické. Seleničitany jsou nepatrně toxičtější v porovnání se selenany. Při otravě elementárním selenem zapáchá dech po česneku, dochází ke křečím, periferní cyanóze a může dojít až ke smrti v důsledku deprese.¹⁰

SeO₂ svojí toxicitou odpovídá oxidu arsenitému, je silně dráždivý a má senzibilizující účinek na imunitní systém.

SeOCl₂ má podobné vlastnosti jako yperit, způsobuje špatně se hojící puchýře.

H₂Se patří mezi nejtoxičtější sloučeniny selenu, poškozují játra, ledviny, pokožku a dýchací cesty.^{7,8,9}

2.2.2. Organické sloučeniny

Organické formy selenu jsou toxické až při vysokých koncentracích. Za nejtoxičtější organickou sloučeninu je považován selenocystein, jehož toxicita je srovnatelná s toxicitou seleničitanů. Obecně platí, že methylované sloučeniny jsou méně toxické než původní sloučenina. Například methylselenocystein je méně toxický než selenocystein.⁵

2.3. Výskyt selenu v přírodě

Koloběh selenu v životním prostředí začíná v půdě, kde je primárním zdrojem zemská kůra. V půdě se vyskytuje mnoho sloučenin selenu, ale pouze sloučeniny rozpustné ve vodě mohou v životním prostředí cirkulovat.¹¹ Rozdělení primárně závisí na pH, E a biologické dostupnosti.⁵ Z půdy se selen dostává do vody

a do rostlin, které mohou sloužit jako zdroj potravy pro některé živočichy. Rostliny a mikroorganismy mají schopnost methylovat elementární selen z půdy, odkud se vypařováním dostává do ovzduší a ve formě dešťových srážek zpět od půdy.^{5,11}

2.3.1. Půda

Nejdůležitějším přírodním zdrojem selenu je půda, do které se dostává zvětráváním a vyluhováním z podložních hornin zemské kůry.¹¹ Rozdělení selenu v půdě závisí na dvou skupinách činitelů. První skupinou jsou faktory nezávislé na podnebí (reliéf, mateřské horniny), druhou skupinou pak biologické a klimatické podmínky.¹² Obvyklý obsah selenu v půdě je 0,06 – 1,8 ng.g⁻¹.¹³

2.3.2. Voda

V podzemních a mořských vodách převládá selen ve formě selenanů.⁵ Koncentrace selenu se zvyšuje s vysokým nebo naopak nízkým pH, kdy dochází k přeměně na sloučeniny více rozpustné ve vodě.^{11,14} Celková koncentrace selenu v přírodních vodách se vyskytuje v rozmezí 0,1 – 400 ppb⁻¹.¹³ Na některých územích dosahují koncentrace selenu v podzemních vodách až 6000 ppb. Přípustná koncentrace selenu v pitné vodě je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) 10 ppb. Ve většině případů je toto množství mnohem menší, najdou se ale i takové lokality, kde je koncentrace selenu v pitných vodách mnohem vyšší. Příkladem jsou některé oblasti Číny s půdami bohatými na selen, kde může dosahovat koncentrace až 160 ppb.^{11,14}

2.3.3. Vzduch

Selen se dostává do ovzduší ve formě selenovodíku, který je produkován rostlinami, dále jako elementární selen a ve formě částic jako sleničitany a selenany.¹⁴ Selenovodík se rychle oxiduje na vodu a elementární selen.⁵ Koncentrace selenu v ovzduší jsou velmi nízké, udává se pouze několik ng.m⁻³.¹³ Množství selenu se ve většině měst pohybuje v rozmezí 0,1 – 10 ng.m⁻³, v blízkosti měděných tavících pecí může být koncentrace vyšší.¹⁴

2.3.4. Rostliny

Rostliny obsahující selen jej získávají z půdy, kde se vyskytuje ve formě seleničitanů a selenanů. Selenany převažují v alkalických půdách a jsou rychleji asimilovány rostlinami. Naopak v kyselých půdách je selen ve formě seleničitanů, které zde vytvářejí komplexy s Fe^{3+} . Tyto komplexy jsou biologicky hůře využitelné pro rostliny.¹⁵ V rostlinných tkáních je selen metabolizován podobným způsobem jako síra a nahrazuje atomy síry v cysteinu a methioninu za tvorby selenocysteinu a selenomethioninu.¹⁶ Rostliny mohou snadno zabudovat selenomethionin do proteinů na místo methioninu. Z tohoto důvodu je hlavní formou selenu vyskytující se v rostlinách.^{11,18}

Množství selenu v rostlinách závisí nejen na jeho koncentraci v půdě, ale také na druhu rostliny.¹⁷ Některé druhy rostlin mají schopnost akumulovat selen (Se) ve svých tkáních. Některé druhy jej akumulují v množství úměrném koncentraci Se v půdě, jiné mají schopnost jej akumulovat ve vyšším množství a pak existují také druhy rostlin, které Se neakumulují i přesto, že se v půdě nachází v dostatečném množství.¹⁹ Rostliny dělíme na *primární akumulátory selenu*, které jsou schopny akumulovat Se v mnohem vyšším množství, než je jeho obsah v půdě.²⁰ Do této skupiny patří například některé druhy kozinců (*Astragalus*) či rostliny rodu *Stanleya* a *Morinda*.¹⁹ Druhou skupinou jsou *sekundární akumulátory selenu*, tyto druhy rostlin akumulují Se v množství úměrném jeho obsahu v půdě. Mezi tyto rostliny se řadí například brokolice, zelí, česnek či cibule. Poslední skupinou jsou rostliny neakumulující Se, mezi takové rostliny patří některé druhy obilnin, například pšenice, žito nebo ječmen.^{11,19,20}

2.3.5. Živočichové

Obsah Se v živočišných tkáních závisí na potravě, kterou konzumují. Zvířata živená krmivem s nízkým obsahem Se mají relativně nízké koncentrace ve tkáních a produktech, například ve vejcích a mléce, zatímco živočichové s dostatkem Se v potravě poskytují produkty s vyšší koncentrací. Nejvíce Se se hromadí ve vnitřnostech (ledviny a játra). Na rozdíl od rostlin, kde převažuje Se ve formě selenomethioninu, je převládající formou Se u zvířat selenocystein.¹⁸

2.4. Vliv selenu na lidské zdraví

2.4.1. Antioxidační vlastnosti selenu

Selen je důležitou součástí antioxidačního ochranného systému organismu, který zabraňuje vzniku volných radikálů (VR).

Volné radikály jsou atomy, molekuly či ionty s alespoň jedním nepárovým elektronem v elektronovém obalu, které jsou schopné samostatné existence. VR jsou velmi reaktivní, reagují nejen s dalšími VR, ale i s ostatními látkami v organismu, což může způsobovat poškození buněčných struktur. VR se řadí mezi reaktivní formy kyslíku (ROS).²¹ ROS se za normálních podmínek tvoří v organismu v malém množství a ochranné mechanismy jej dokáží zpracovat. Dojde – li k porušení této rovnováhy, například vlivem oxidačního stresu či alkoholu, může u člověka dojít ke vzniku různých onemocnění (ateroskleróza, diabetes mellitus, zhoubné novotvary).^{21,22,23}

Antioxidační ochranné mechanismy dělíme do dvou skupin, na enzymatické a neenzymatické. Principem enzymaticky řízených reakcí je přenos elektronu a molekul s aktivním kyslíkem za vzniku méně nebezpečných sloučenin. Do této skupiny se řadí superoxiddismutázy (SODs), katalázy a glutathion peroxidázy.^{11,22} Do druhé skupiny se řadí vitamíny C a E. Vitamín E snižuje potřebu selenu, jelikož brání ztrátám Se z organismu a udržuje jej v aktivní formě.^{11,23}

2.4.2. Vliv na rozvoj karcinogeneze

Epidemiologické studie ukázaly inverzní vztah mezi přísunem Se a výskytem některých druhů rakoviny. Hladina Se v krvi nebo krevní plazmě je u pacientů s rakovinou nižší, než u zdravých jedinců.²⁴ Protinádorový účinek závisí na formě, ve které se Se vyskytuje v organismu. Seleničitany mají v porovnání se selenomethioninem (SeMet) vyšší protinádorový účinek. Je to způsobeno metabolismem SeMet, který se stává součástí proteinů a pouze malé množství se může přeměnit na látky s protinádorovou aktivitou.²⁵ Vysoké dávky seleničitanů vedou k přeměně na selenotrisulfid, který inhibuje proteosyntézu a zvyšuje apoptózu.¹¹ Nejsilnější protinádorový účinek mají methylované sloučeniny, zejména methylselenol.^{26,28}

Některé studie ukazují statisticky významné zvýšení výskytu rakoviny jícnu

a žaludku u pacientů s nízkou hladinou Se v organismu, naopak žádný takovýto vztah nebyl prokázán u pacientů s rakovinou plic.²⁷ Je důležité si uvědomit, že hranice mezi prospěšností a toxicitou Se pro lidský organismus jsou si velmi blízké, proto není vhodné přijímat Se v nadměrných dávkách.²⁷

2.4.3 Nedostatečný příjem selenu

Selen je pro organismus nepostradatelný prvek, při jehož nedostatku dochází u člověka k rozvoji různých onemocnění. Tato onemocnění nejsou způsobena pouze nedostatkem Se, většinou jsou spojena i s dalšími příčinami. Nejznámějším onemocněním je Keshanská choroba. Různé studie ukazují zvýšený výskyt rakoviny a srdečních onemocnění ve spojení s nedostatkem Se. U novorozenců s nedostatkem Se a vitamínu E ve stravě byl prokázán zvýšený výskyt syndromu náhlého úmrtí novorozenců.^{14,18}

Keshanská choroba byla poprvé pozorována v oblasti Keshan v severozápadní Číně. Toto onemocnění se vyskytuje ve všech oblastech s nedostatkem Se. Tato choroba postihuje zejména děti v předškolním věku a ženy v plodném věku ze zemědělských rodin.²⁸ Toto onemocnění postihuje zejména srdce. Ve spojení s tímto onemocněním jsou pozorovány také patologické změny slinivky břišní a cirhóza jater. Při chronické formě onemocnění je častou příčinou úmrtí „porcelánová choroba srdeční“, kdy má srdce našedivělou barvu.^{11,28} Vznik tohoto onemocnění je podmíněn virovou infekcí, která se v dnešní době už příliš nevyskytuje, jelikož na trhu existuje množství výrobků obsahující selen, které jsou dostatečně účinné.¹¹

2.5. Potraviny obsahující selen

2.5.1. Potraviny rostlinného původu

Množství Se v rostlinách závisí na jeho množství v půdě (v Číně se vyskytuje Se v kukuřici, rýži a sojových bobech od 0.005 do 45 mg/kg¹⁴), při jeho nedostatku lze tento problém řešit pomocí hnojiv. Toto řešení je však krátkodobé, proto vědci vyvíjejí dlouhodobější řešení, která by vedla ke zvýšení využití a akumulace Se v rostlinách.¹⁶ Mezi rostliny s vysokým obsahem Se se řadí například brokolice, česnek, para ořechy či obilí.³⁰

2.5.2. Potraviny živočišného původu

Obsah Se v živočišných tkáních je závislý na potravě. Pro zvýšení obsahu se Se uměle přidává do krmiv. Mezi živočichy s nejvyšším obsahem Se se řadí ryby, vepřové, hovězí a kuřecí maso.¹⁸

2.5.3. Potravinové doplňky

Definice doplňků stravy je uvedena v zákoně o potravinách i ve směrnici Evropské unie. Jedná se o potraviny určené k přímé spotřebě, jež slouží k doplnění běžné stravy. Od potravin pro běžnou spotřebu se liší vysokým obsahem vitamínů, minerálních látek nebo jiných látek s výživovým či fyziologickým účinkem. U těchto doplňků je potřeba dodržovat doporučené denní dávky (DDD), pro selen je DDD 200 µg.³¹

2.6. Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších fyzikálně – chemických analytických metod. Za objevitele této metody je považován Alan Walsh, který sestrojil v roce 1953 první atomový absorpční spektrometr.

Základním principem této metody je detekce elektromagnetického záření volných atomů prvků nacházejících se v plynném stavu. Volné atomy prvků absorbují fotony o různé energii. Tato energie je charakteristická pro každý druh atomu a počet absorbovaných fotonů je úměrný koncentraci stanovovaných atomů ve vzorku. Touto metodou lze stanovit více než 60 různých prvků.^{29,32,34}

2.6.1. Instrumentace pro AAS

Zdroje záření produkují záření o takové vlnové délce, které jsou atomy analytu schopny absorbovat. Nejčastěji používaným zdrojem je výbojka s dutou katodou zhotovená z křemene se zatavenými elektrodami. Výbojka je evakuována a naplněna čistým monoatomickým plynem (Ne nebo Ar). Důležitou součástí je dutá katoda obsahující stanovovaný prvek ve velmi čistém stavu. Dalšími používanými systémy jsou bezelektrodové výbojky (EDL), xenonové obloukové výbojky a laserové polovodičové diody.

Atomizátory jsou zařízení schopná převádět analyt na volné atomy v základním energetickém stavu, jež jsou schopné pohlcovat záření ze zdroje. Podle typu použitého atomizátoru rozdělujeme atomizaci na plamenovou (F – AAS) a elektrotermickou atomizaci (ET – AAS). Všechny typy atomizátorů lze využít při generování těkavých sloučenin, i když pro jejich atomizaci se nejčastěji používá křemenný atomizátor (QF – AAS).

Disperzní systém je tvořen zrcadly a monochromátorem (odraznou mřížkou, štěrbinami apod.). Vstupní štěrbinou vstupuje paprsek do monochromátoru, kde dopadá na mřížku, která rozkládá záření do různých směrů podle vlnových délek. Při vhodném natočení mřížky prochází přes výstupní štěrbinu úzký pás spektra a dopadá na detektor.

Detektor umožňuje převod energie záření na lépe měřitelnou veličinu, nejčastěji na elektrický proud. V dnešní době se nejčastěji využívají fotonásobiče a polovodičové detektory. Funkce fotonásobiče je založena na vnějším fotoelektrickém jevu. Při dopadu fotonů na fotokatodu dojde k vyražení elektronů z katody a elektrony jsou urychlovány elektrickým napětím mezi jednotlivými dynodami. Při dopadu urychlených elektronů na dynodu dochází k emisi většího počtu elektronů, které dopadají na anodu.^{29,32,33}

2.6.2. Lambertův – Beerův zákon

Při průchodu elektromagnetického záření vhodné vlnové délky vzorkem dochází k pohlcení části tohoto záření. Mezi původním tokem záření Φ_0 a tokem záření zmenšeného absorpcí analytem Φ platí Lambertův – Beerův zákon:

$$A = \log \Phi_0 / \Phi = \kappa \cdot c \cdot l,$$

kde A je absorbance, Φ_0 je intenzita původního toku záření, Φ je intenzita záření prošlého analytem, κ je atomový absorpční koeficient, c je koncentrace analytu, l je délka absorpčního prostředí.^{29,32}

2.7. Techniky generování těkavých sloučenin

Techniky generování těkavých sloučenin lze rozdělit dle způsobu, kterým tyto sloučeniny vznikají na chemické (CHG), fotochemické (PHG) a elektrochemické generování (ECHG). Nejčastěji při generování dochází ke vzniku hydridů.

2.7.1. Chemické generování těkavých sloučenin

K tvorbě hydridů dochází redukcí analytu tetrahydroboritanem sodným (NaBH_4) v neutrálním a kyselém prostředí. Na tento způsob generování má rušivé vlivy přítomnost analytu v nevhodné formě pro redukcí, přítomnost heterogenní fáze (uhlíkaté zbytky z biologických materiálů) a přítomnost anorganických iontů. Dalšími nevýhodami této metody je vysoká cena redukčního činidla a také jeho nestabilita, proto je CHG stále více nahrazováno EcHG.²⁹

2.7.2. UV - fotochemické generování těkavých sloučenin

V přítomnosti nízkomolekulárních organických kyselin (HCOOH , CH_3COOH) dochází působením UV záření k přeměně např. seleničitanových iontů na těkavé sloučeniny (např. H_2Se , selenokarbonyl), které jsou dále transportovány k atomizátoru a detekovány pomocí AAS.³⁹

2.7.3. Elektrochemické generování těkavých sloučenin

Elektrochemické generování je alternativní metodou přípravy těkavých hydridů, kde k redukcí analytu, místo působením redukčního činidla, dochází průchodem elektrického proudu v prostředí velmi čistých minerálních kyselin. Tím odpadá možnost kontaminace vzorku nedostatečně čistým redukčním činidlem. Výhodami této metody jsou možnost dosažení nízkého limitu detekce a stanovitelnosti a úspora drahých redukčních činidel. EcHG lze použít v kombinaci s různými analytickými detekčními technikami, jako je AAS s křemennými atomizátory (QF – AAS), AAS s elektrotermickými atomizátory (ET – AAS), atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) či atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – AES).³⁵

Základní reakční mechanismus elektrochemického generování hydridů se skládá ze tří kroků probíhajících na povrchu katody. Nejprve dochází k depozici analytu na povrchu elektrody a k redukcí na oxidační stav 0, v následujícím kroku dochází k reakci redukovaného analytu s atomárním vodíkem generovaným na povrchu katody za vzniku hydridu. Posledním krokem je desorpce vzniklého hydridu z povrchu elektrody.³⁶

2.7.4. Instrumentace pro EcHG-AAS

2.7.4.1 Elektrochemická průtoková cela

V prostoru elektrochemické průtokové cely dochází ke vzniku těkavých sloučenin. Cela je rozdělena na dvě základní části, na katodový a anodový prostor, které jsou od sebe odděleny iontově výměnnými membránami (Nafion 117, Nafion 112) či keramickou porézní trubicí. Katodový a anodový prostor bývá nejčastěji zhotoven z plexiskla, teflonu nebo polypropylenu. Tyto prostory od sebe často bývají odděleny teflonovým těsněním, aby byla zvýšena těsnost cely.^{32,35}

Elektrody mohou být z různých materiálů, katoda se nejčastěji vyrábí z platiny, olova, skelného uhlíku, retikulárního skelného uhlíku a pyrolytického grafitu. V důsledku silného oxidačního prostředí při elektrolýze je na výrobu anody používána platina, která je za těchto podmínek inertní.³⁵

Nejčastěji využívaným typem cely je tenkovrstvá elektrochemická cela podle Lima a Brockmanna, uvedená na Obr. 3.1.

2.7.4.2. Transportní systém

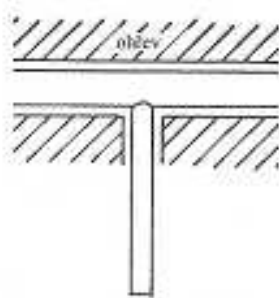
Systém zajišťující přívod analytu a katolytu do elektrolytické cely je tvořený multikanálovou peristaltickou pumpou a transportními hadičkami. Rychlost průtoku lze libovolně měnit podle požadovaných podmínek.

2.7.4.3. Atomizátor

Atomizace hydridů může probíhat několika způsoby: atomizace v difúzním plameni Ar (N₂) – H₂, v elektrotermickém atomizátoru, v plamínku uvnitř křemenné trubice, ve vyhřívané křemenné trubicí.

Atomizační krok by měl splňovat určitá kritéria: kompletní přeměna na volné atomy analytu, odolnost volných atomů vůči přítomným interferentům, dlouhá doba pobytu volných atomů v atomizátoru a minimální šum pozadí.^{32,38}

Jedním z používaných druhů atomizátorů je elektricky vyhřívaný křemenný atomizátor ve tvaru „T“ (Obr. 2.2.). Tento typ atomizátoru se skládá ze dvou na sebe kolmých základních částí – přívodního ramene a optického ramene, které se nachází v ose optického měřícího paprsku.



Obr. 2.2. Elektricky vyhříváný křemenný atomizátor²⁹

2.7.4.4. Separátor fází

Separátory fází slouží k oddělení plyných hydridů a vodíku od kapalné fáze. Separátory fází lze rozdělit do několika skupin: membránové separátory, separátory využívající rozdílu specifické hmotnosti a separátory fází s nuceným odtahem.²⁹

2.7.4.5. Zdroj generačního proudu

Jako zdroj generačního proudu lze použít libovolný stabilizovaný zdroj dostupný v laboratoři, umožňující dosáhnout potřebného generačního proudu.

2.7.4.6. Nosný plyn

Nosný plyn slouží k transportu těkavého hydridu do atomizátoru. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující příslušný plyn. Nejčastěji používané plyny jsou argon a dusík. Rychlost průtoku lze regulovat podle potřeb analýzy.

2.7.4.7. Spojovací materiál

Spojovací materiál zajišťuje spojení jednotlivých částí aparatury. Nejčastěji je tvořen teflonovými hadičkami.

3. Experimentální část

3.1. Instrumentace

Pro experimentální část této bakalářské práce byly použity následující přístroje a zařízení:

Atomový absorpční spektrometr Varian SPECTR AA-300A (Varian, Austrálie). Zdrojem primárního záření byla výbojka s dutou katodou pro Se (Photron, Austrálie). Pro měření byl zvolen napájecí proud 6 mA, šířka spektrálního intervalu 1 nm a vlnová délka 196 nm.

Atomizace hydridů byla prováděna uvnitř křemenného atomizátoru ve tvaru „T“ externě vyhřívaného na teplotu 950 °C jednotkou EHA 10 (RMI, ČR), umístěného v optické ose atomového absorpčního spektrometru. Délka optického ramene 170 mm, zúžená část uprostřed o délce 60 mm s vnitřním průměrem 6 mm a průměrem přívodního ramene 4 mm.

Jako zdroj generačního proudu byl využit LPS 303 (Amrel, Taiwan).

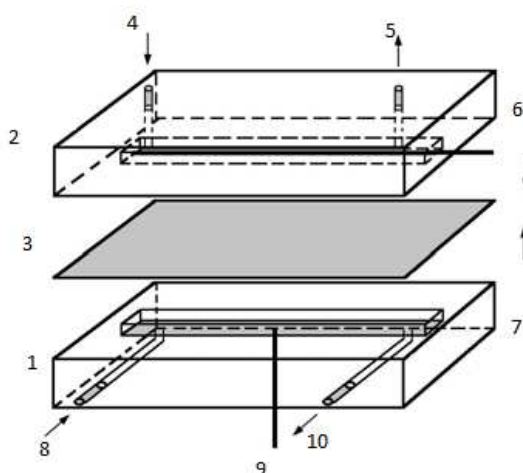
Anolyt a katolyt byly čerpány pomocí peristaltické kanálové pumpy Masterflex (Cole Parmer, USA) s tygonovými čerpacími hadičkami.

Průtok nosného plynu byl regulován pomocí průtokoměru 112-02 (Cole Parmer, USA).

K oddělení vzniklých hydridů od matrice byl použit hydrostatický separátor fází laboratorní konstrukce.

3.1.1. Cella

V průběhu měření této bakalářské práce byla použita tenkovrstvá průtoková elektrochemická generační cella (Obr. 3.1.).



Obr. 3.1. Tenkovrstvá průtoková generační cela³⁷

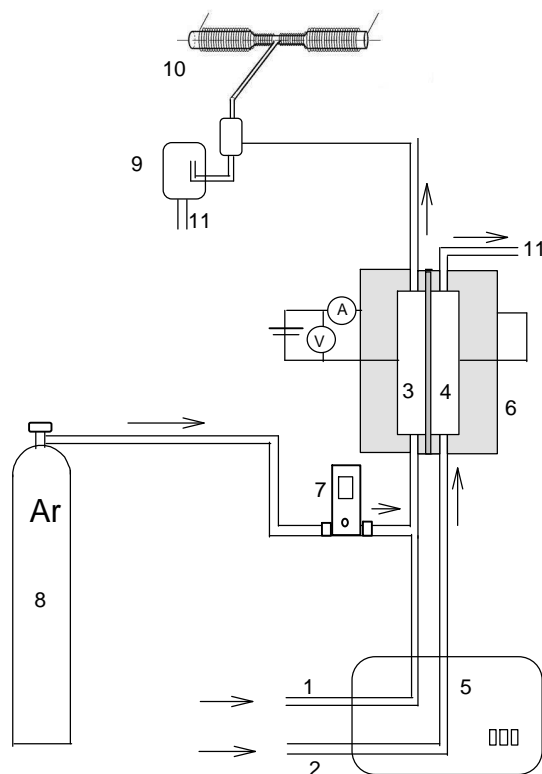
*1 – anodový prostor, 2 – katodový prostor, 3 – Nafionová membrána,
4 – přívod katolytu, 5 – odvod do separátoru fází a atomizátoru, 6 – olověná katoda, 7 –
platinová anoda, 8 – přívod anolytu, 9 – měděný kontakt anody, 10 – odpad*

Tato cela je vyrobena z plexiskla, skládá se z katodového a anodového prostoru o vnitřních objemech 900 μl , které jsou od sebe odděleny pomocí Nafionové membrány (Aldrich, USA). Obě poloviny cely jsou pevně spojeny pomocí 6 šroubů, pro zvýšení těsnosti je mezi obě poloviny cely vloženo teflonové těsnění. Anoda je tvořena platinovým plíškem o tloušťce 0,3 mm (99,99 %, povrch 300 mm^2 , Safina, ČR), katoda je tvořena olověným drátkem o průměru 1 mm (povrch 345 mm^2 , 99,99 %, Good – Fellow, Velká Británie).

3.1.2. Aparatura pro kontinuální ECHG – AAS

Katolyt a anolyt byly přiváděny do tenkovrstvé průtokové cely pomocí peristaltické pumpy a tygonových hadiček. Po nasátí vzorku byly hadičky vždy promyty čistým roztokem katolytu. Před vstupem do tenkovrstvé průtokové cely byl do vzorku (popř. katolytu) zaváděn nosný plyn (argon). Na povrchu katody docházelo ke generování selenovodíku za tvorby nadbytku vodíku. Vzniklý hydrid byl unášen pomocí vodíku a nosného plynu do separátoru fází, kde docházelo k oddělení plynné a kapalné fáze. Plynná fáze byla vedena nosným plynem do atomizátoru, kde docházelo za přítomnosti H_2 a stop O_2 k atomizaci selenovodíku. Zbytky katolytu a anolytu prošlé celou byly odváděny do odpadu.

Aparatura pro kontinuální ECHG – AAS je na Obr. 3.2.



Obr. 3.2. Schéma aparatury pro kontinuální ECHG-AAS

- 1 – *přívod katolytu*, 2 – *přívod anolytu*, 3 – *katoda*, 4 – *anoda*,
 5 – *peristaltická pumpa*, 6 – *tenkovrstvá průtoková cela*, 7 – *průtokoměr*,
 8 – *nosný plyn*, 9 – *separátor fází*, 10 – *atomizátor*, 11 – *odpad*

3.2. Použité chemikálie

Zásobní roztoky Se^{IV} a Se^{VI} o koncentraci 10 ppm byly připraveny přesným navážením standardů (Sigma – Aldrich, USA, čistota $\text{Se}^{\text{IV}} > 99,0 \%$, $\text{Se}^{\text{VI}} 99,999 \%$) a naředěním deionizovanou vodou na potřebnou koncentraci. Deionizovaná voda byla připravena zařízením Milli Q_{PLUS} (Millipore, USA).

Pracovní roztoky pak byly připraveny naředěním zásobních roztoků katolytem.

Jako anolyt byl používán roztok 2M H_2SO_4 (95 – 97 %) (Merck, Německo), jako katolyt 0,5M roztok HCl (37 %) o čistotě Suprapure (Merck, Německo).

Reálné vzorky byly vybrány z přípravků komerčně dostupných na trhu –

GS Vitamin E, Selen, Zinek; GS Extra Strong Multivitamin; Med Pharma Selen; Calibum Multivitamin s minerály a activinem.

K čištění křemenného atomizátoru a separátoru fází byl použit roztok kyseliny dusičné (Merck, Německo) zředěné v poměru 1:1 deionizovanou vodou.

Jako nosný plyn byl používán 99,998 % Argon (Linde Technoplyn, ČR).

4. Výsledky a diskuze

Tato bakalářská práce je zaměřená na zkoumání možností stanovení selenu v potravinových doplncích, ve kterých se selen vyskytuje v různých formách, zejména jako Se^{IV} , Se^{VI} a ve formě kvasnic obohacených selenem.

V první části práce byly hledány optimální podmínky elektrochemického generování selenovodíku. Zjištěné optimální podmínky byly poté použity pro další měření. Výslednou citlivost stanovení ovlivňovaly následující parametry: koncentrace HCl v katolytu a jeho průtoková rychlost, průtoková rychlost nosného plynu a velikost vloženého generačního proudu. Nakonec byl proměřen vliv teploty na citlivost stanovení.

Za optimálních podmínek pro EchG byly proměřeny kalibrační závislosti pro Se^{IV} a Se^{VI} . Z důvodu relativně nízké citlivosti stanovení Se^{VI} a tedy vysokých hodnot meze detekce a stanovitelnosti bylo před vlastním měřením vzorků potřeba optimalizovat předredukci. V této práci byly zkoumány různé postupy předredukce pro zjištění nejvhodnějších podmínek tohoto kroku. S použitím optimalizovaného předredukčního kroku byly získány nové kalibrační závislosti, ze kterých byly poté zjištěny mez detekce, mez stanovitelnosti, citlivost, opakovatelnost a lineární dynamický rozsah.

V závěrečné části práce byly analyzovány jednotlivé vybrané potravinové doplňky za účelem zjištění, zda lze navrhnutou metodu použít pro stanovení obsahu Se^{IV} a Se^{VI} v takových vzorcích.

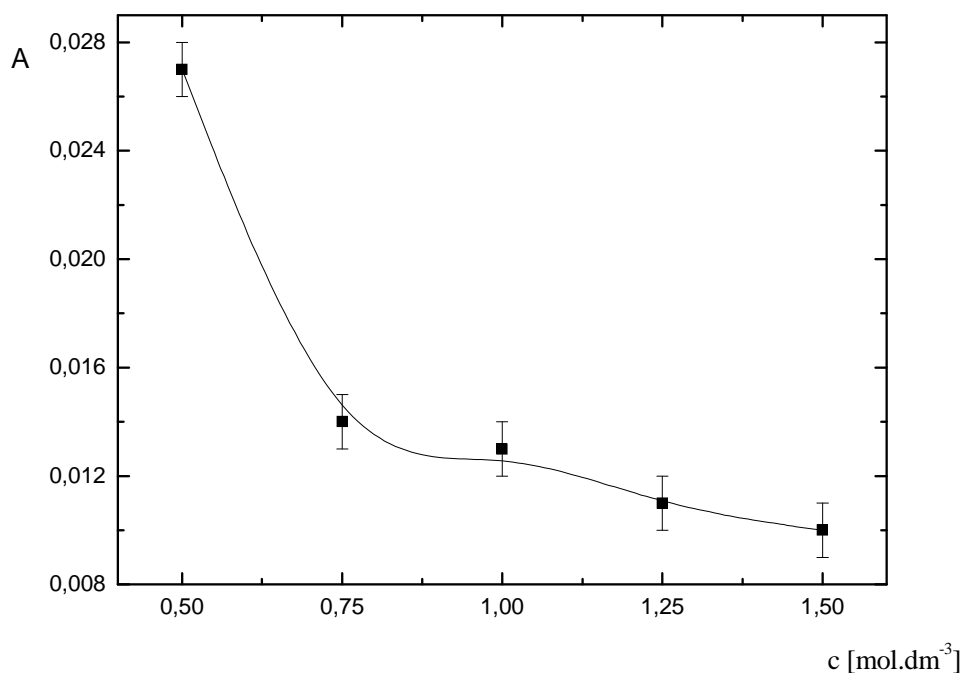
4.1. Optimalizace pracovních podmínek elektrochemického generování

Hlavním cílem optimalizace byla snaha získat co nejvyšší citlivost a nejnižší hodnoty meze detekce stanovení Se metodou EchG – AAS.

4.1.1. Koncentrace HCl v katolytu

Prvním zkoumaným parametrem byla koncentrace HCl v katolytu. Závislost absorbance na tomto parametru byla proměřena v rozmezí koncentrací HCl od $0,50 \text{ mol.dm}^{-3}$ do $1,50 \text{ mol.dm}^{-3}$ a je vidět na Obr. 4.1. Z této závislosti je patrné, že nejvyššího signálu bylo dosaženo při koncentraci HCl $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$, proto byla tato koncentrace zvolena jako optimální a byla použita pro další měření.

Při nižší koncentrací HCl již klesla vodivost katolytu natolik, že používaný zdroj nedokázal udržet generační proud (další klíčový parametr) na nastavené hodnotě.

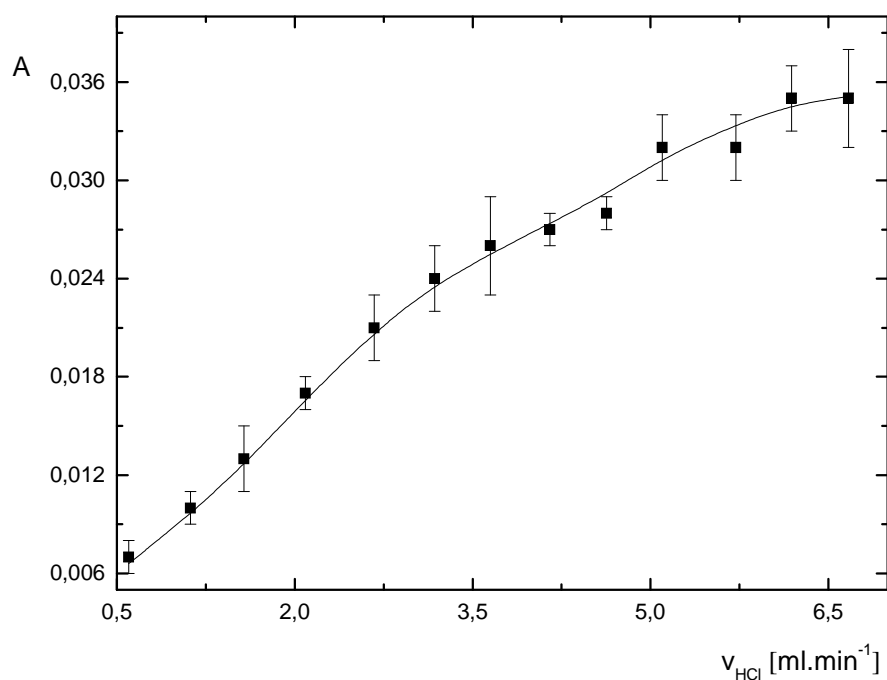


Obr. 4.1. Závislost absorbance na koncentraci HCl v katolytu

$$V_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}, I = 1 \text{ A}, v_{vz} = 1 \text{ ml.min}^{-1}, t = 950 \text{ }^\circ\text{C}, c_{Se(IV)} = 5 \text{ ppb}$$

4.1.2. Průtoková rychlost katolytu

Dalším optimalizovaným parametrem byla průtoková rychlost katolytu (vzorku), která byla testována v rozmezí od $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ do $6,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Grafický záznam je na Obr. 4.2. Z této závislosti je patrné, že se stoupající průtokovou rychlostí katolytu roste naměřený signál stále pomaleji. Pro další měření byla zvolena průtoková rychlost $6,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a spotřebou vzorku a elektrolytů.

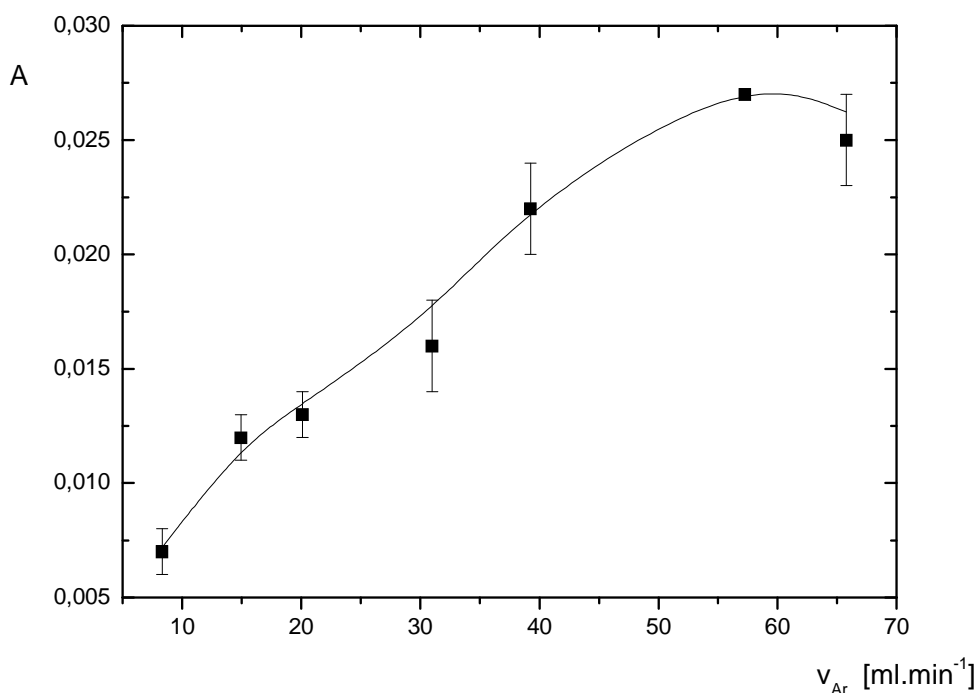


Obr. 4.2. Závislost absorpance na průtokové rychlosti katolytu

$$v_{Ar} = 67 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}, I = 1 \text{ A}, c_{kat} = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, t = 950 \text{ }^\circ\text{C}, c_{Se(IV)} = 5 \text{ ppb}$$

4.1.3. Průtok nosného plynu

Jako inertní nosný plyn byl využíván argon. Průtoková rychlost argonu byla proměřována v rozsahu od $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ do $66 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Grafická závislost naměřeného signálu je vidět na Obr. 4.3. Z této závislosti je patrné, že nejvyššího signálu bylo dosaženo při průtoku $57 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kdy byl nejučinnější transport H_2Se do atomizátoru. Při vyšších průtocích argonu již absorbance klesala vlivem naředění Se v plynné fázi a také urychlením odvodu analytu z dráhy měřícího optického paprsku.

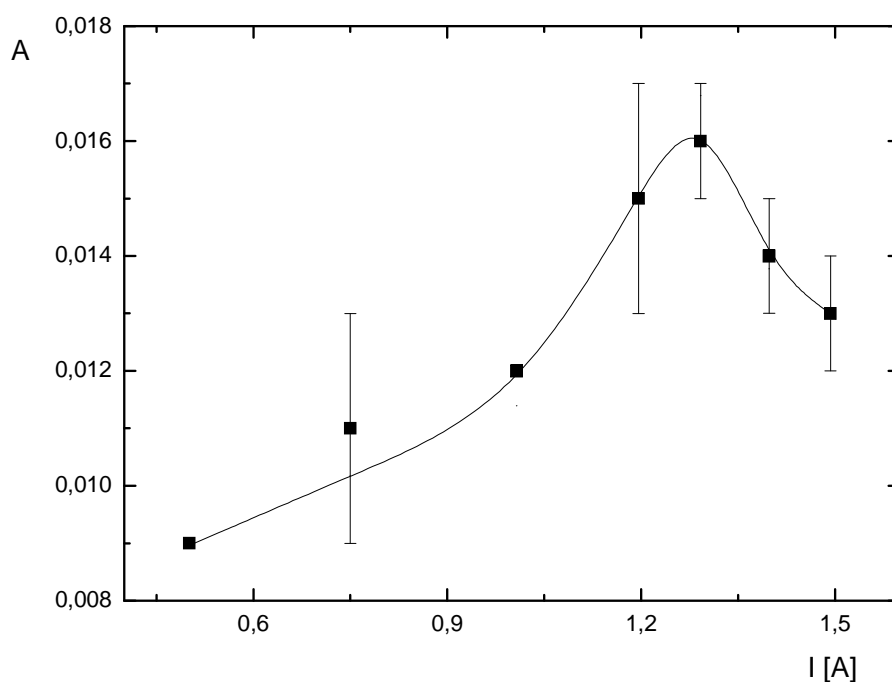


Obr. 4.3. Závislost absorbance na průtoku nosného plynu

$$I = 1 \text{ A}, v_{kat} = 6,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}, c_{kat} = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, t = 950 \text{ }^\circ\text{C}, c_{Se(IV)} = 5 \text{ ppb}$$

4.1.4. Generační proud

Dalším optimalizovaným parametrem byl generační proud, který byl proměřován v rozmezí od 0,5 do 1,5 A. Z důvodu potřeby vysušení přívodního ramene atomizátoru došlo k posunutí jeho vnějšího vyhřívání a nepodařilo se ho umístit do původní polohy, proto jsou tyto výsledky při stejných odpovídajících podmínkách nižší, jak je vidět na Obr. 4.4. Z této závislosti je patrné, že maximálního signálu bylo dosaženo při generačním proudu 1,3 A.



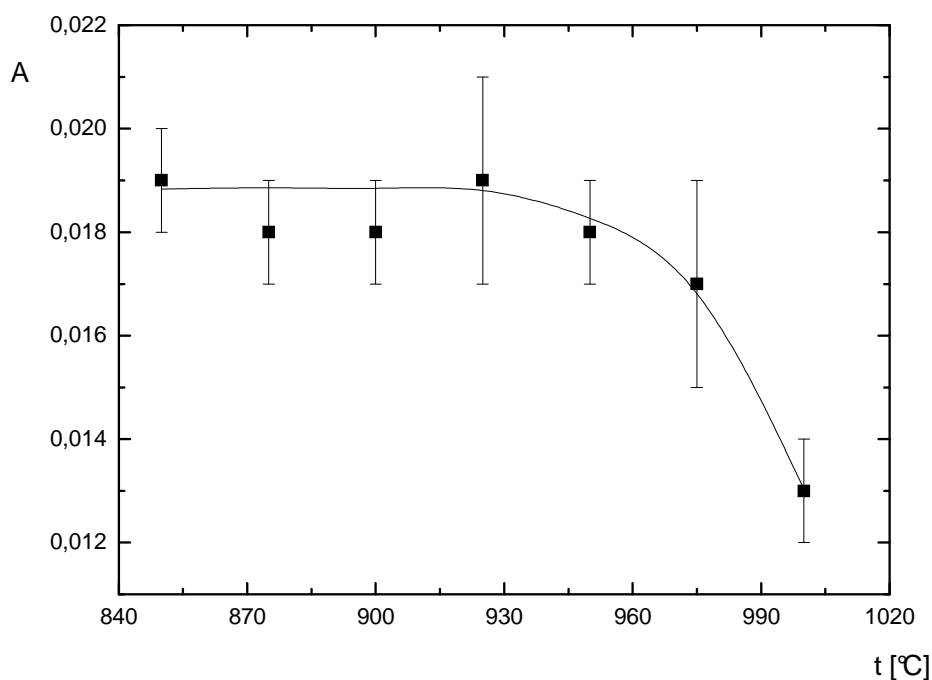
Obr. 4.4. Závislost absorbance na hodnotě generačního proudu

$$v_{Ar} = 57 \text{ ml.min}^{-1}, v_{kat} = 6,2 \text{ ml.min}^{-1}, c_{kat} = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}, t = 950 \text{ }^{\circ}\text{C},$$

$$c_{Se(IV)} = 5 \text{ ppb}$$

4.1.5. Teplota vyhřívání

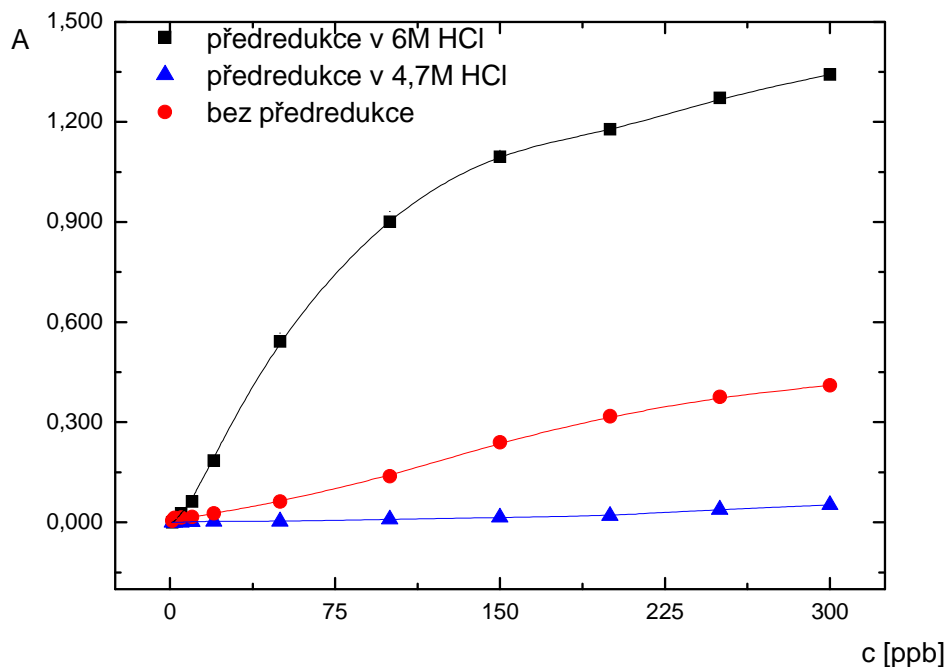
Posledním testovaným parametrem v rozmezí od 850°C do 1000°C byla teplota vyhřívání atomizátoru. Grafická závislost naměřených hodnot je na Obr. 4.5. Z této závislosti je patrné, že teplota vyhřívání atomizátoru nemá až do teploty 975°C vliv na poskytovaný signál. Při teplotě nad 975°C dochází ke snížení citlivosti. Jako optimální teplota byla pro další měření zvolena hodnota 950°C, která je pro toto stanovení obvyklá.



Obr. 4.5. Závislost absorpance na teplotě vyhřívání atomizátoru
 $v_{Ar} = 57 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{kat} = 6,2 \text{ ml.min}^{-1}$, $c_{kat} = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$, $I = 1,3 \text{ A}$,
 $c_{Se(IV)} = 5 \text{ ppb}$

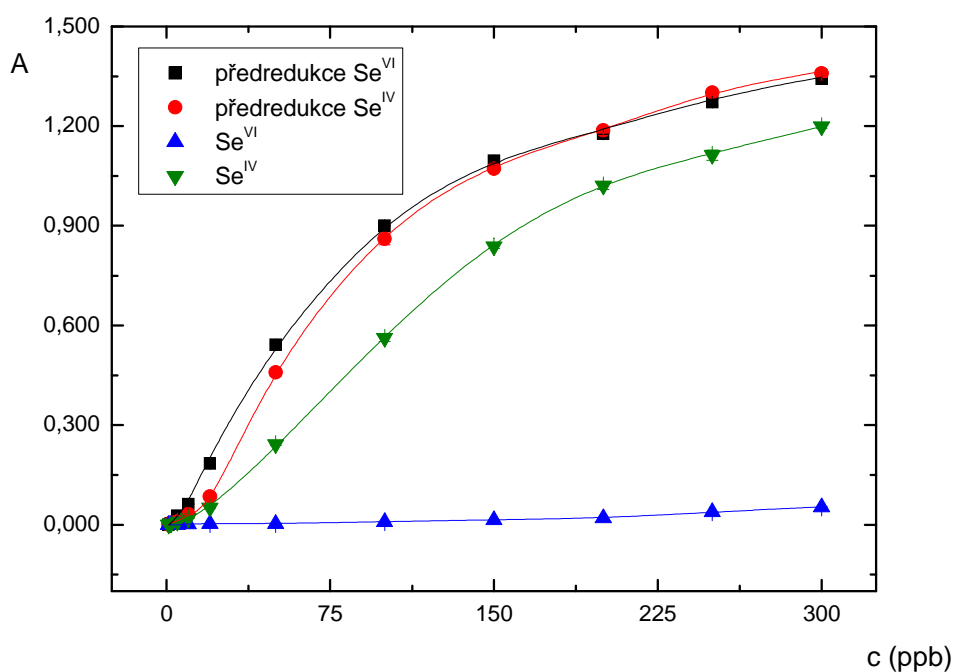
4.2. Předredukce

Z důvodu vysoké meze detekce a stanovitelnosti pro Se^{VI} byla před proměřením kalibračních závislostí optimalizována předredukce. Nejprve byla provedena v prostředí 4,7M HCl dle článku ⁴¹. Roztok Se^{VI} o koncentraci 10 ppm byl zahříván na teplotu 90 °C po dobu 60 minut. Tato koncentrace kyseliny nebyla dostatečná pro zredukování veškerého Se^{VI} , proto byla zvýšena koncentrace HCl. Druhý způsob předredukce byl prováděn v prostředí 6M HCl, ostatní parametry předredukce zůstaly nezměněny. Kalibrační závislosti pro jednotlivé způsoby předredukce jsou přiloženy na Obr. 4.6. Pro předredukci vzorků obsahujících Se^{VI} byla použita předredukce v prostředí 6M HCl. Po provedení předredukce byly získané hodnoty porovnány s naměřenými hodnotami pro Se^{IV} . Při porovnání bylo zjištěno, že Se^{IV} poskytuje nižší signál, proto byla provedena předredukce také u Se^{IV} . Provedenou předredukci bylo ověřeno, že část Se^{IV} ve standardu samovolně zoxidovala na Se^{VI} . Porovnání naměřených závislostí je znázorněno na Obr. 4.7. Před vlastním měřením kalibračních závislostí byla vždy provedena předredukce obou forem selenu.



Obr. 4.6. Kalibrační závislost pro jednotlivé způsoby předredukce Se^{VI}

$$v_{Ar} = 57 \text{ ml.min}^{-1}, v_{kat} = 6,2 \text{ ml.min}^{-1}, c_{kat} = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}, I = 1,3 \text{ A}, t = 950^{\circ}\text{C}$$



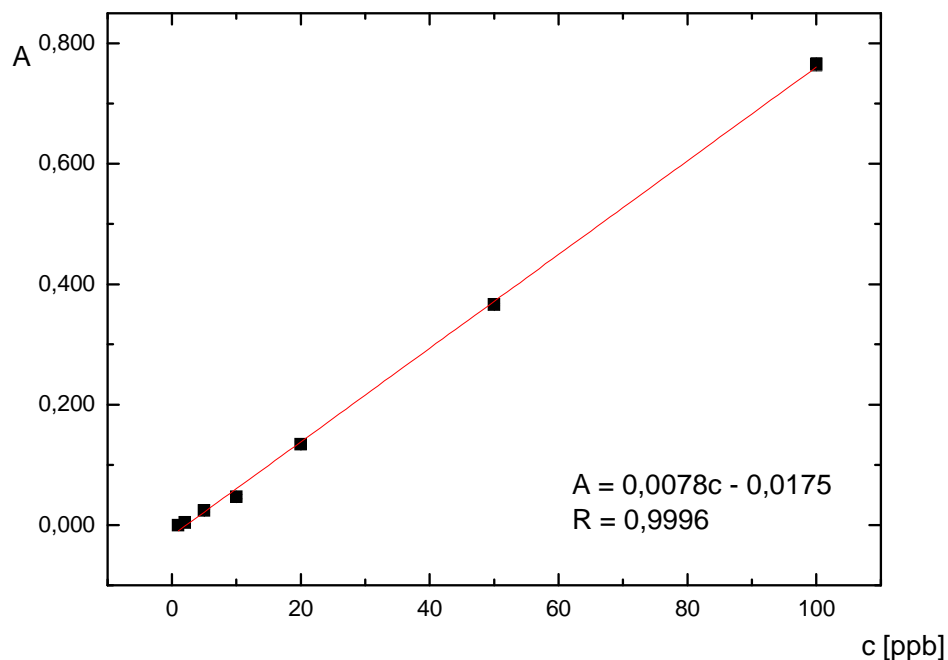
Obr. 4.7. Kalibrační závislost Se^{IV} a Se^{VI} před redukcí a po redukcí
 $v_{Ar} = 57 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{kat} = 6,2 \text{ ml.min}^{-1}$, $c_{kat} = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$, $I = 1,3 \text{ A}$, $t = 950 \text{ }^\circ\text{C}$

4.3. Kalibrace

Po zjištění optimálních podmínek pro elektrochemické generování H₂Se a předredukce Se^{VI} na Se^{IV} byly proměřeny kalibrační závislosti pro Se^{IV} a Se^{VI}. Z důvodu poškození Nafionové membrány byly po jejím vyměnění proměřeny nové kalibrační závislosti Se^{IV} a Se^{VI} po předredukci, které byly využity pro stanovení reálných vzorků.

4.3.1. Kalibrace Se^{IV}

Kalibrační závislost Se^{IV} byla proměřena v rozsahu 1 až 200 ppb. Její lineární část je uvedena na Obr. 4.8.



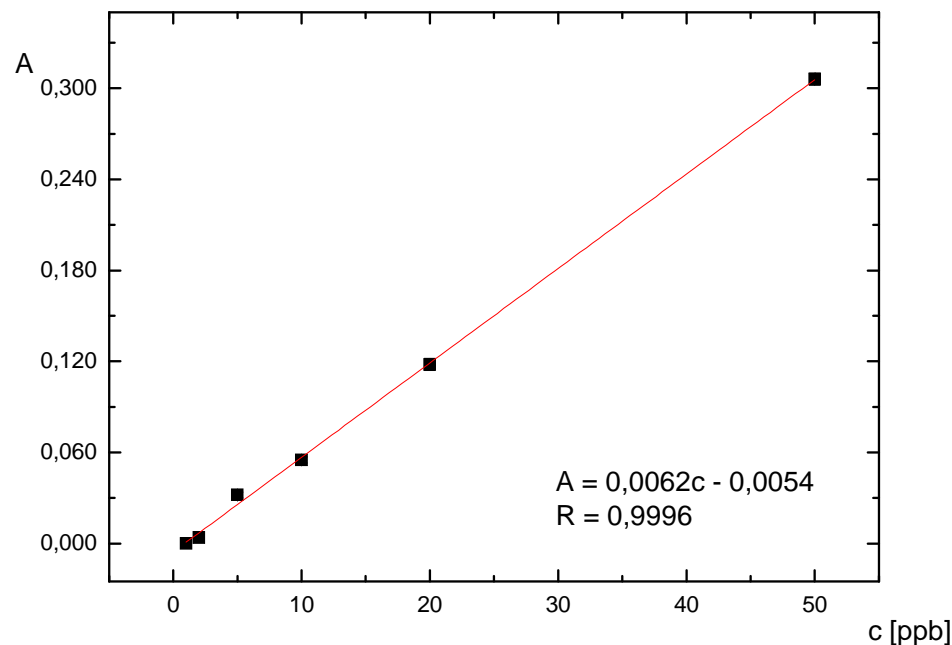
Obr. 4.8. Lineární část kalibrační závislosti pro stanovení Se^{IV}

$$v_{Ar} = 57 \text{ ml.min}^{-1}, v_{kat} = 6,2 \text{ ml.min}^{-1}, c_{kat} = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}, I = 1,3 \text{ A}, t = 950^\circ\text{C}$$

Z uvedených kalibračních závislostí byly určeny mez detekce 5,6 ppb a mez stanovitelnosti 13,4 ppb Se^{IV} . Pro koncentraci Se^{IV} 50 ppb byla také stanovena opakovatelnost (1,2 %), vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka v procentech.

4.3.2. Kalibrace Se^{VI}

Kalibrační závislost Se^{VI} byla proměřena v rozsahu 1 až 200 ppb. Její lineární část je znázorněna na Obr. 4.9.



Obr.4.9. Lineární část kalibrační závislosti pro stanovení Se^{VI}

$$v_{Ar} = 57 \text{ ml.min}^{-1}, v_{kat} = 6,2 \text{ ml.min}^{-1}, c_{kat} = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}, I = 1,3 \text{ A}, t = 950^\circ\text{C}$$

Z této kalibrační závislosti byly stanoveny mez detekce 2,7 ppb a mez stanovitelnosti 6,8 ppb. Pro koncentraci Se^{VI} 5 ppb byla určena opakovatelnost (1,5 %), opět jako relativní směrodatná odchylka.

Tab. 4.3. shrnuje základní charakteristiky stanovení Se^{IV} a Se^{VI} . Při vzájemném porovnání mezí detekce, mezí stanovitelnosti a citlivosti nebyly pozorovány příliš významné rozdíly, je však možné vyslovit domněnku, že původní substance seleničitanu byla pravděpodobně nesprávně skladována, proto byly pro stanovení Se^{IV} dosaženy nepatrně horší hodnoty.

Tab. 4.3. Porovnání charakteristik stanovení Se^{IV} a Se^{VI}

	Se^{IV}	Se^{VI}
LOD (ppb)	5,6	2,7
LOQ (ppb)	13,4	6,8
citlivost (ml.ng^{-1})	0,0078	0,0062
opakovatelnost (%)	1,2	1,5
LDR (ppb)	13,4 – 100	6,8 – 50

4.4. Analýza praktických vzorků potravinových doplňků

Po optimalizaci pracovních podmínek a proměření kalibračních závislostí bylo přistoupeno k analýze reálných vzorků – potravinových doplňků obsahujících selen. Zvolené doplňky jsou komerčně dostupné bez lékařského předpisu. V této bakalářské práci byly analyzovány 4 reálné vzorky. Přehled vzorků je shrnut v Tab. 4.4. Obsah selenu v každém vzorku byl stanoven ve dvou opakováních.

První vzorek obsahující seleničitan sodný byl rozkládán dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo rozpuštění požadovaného množství tablet v destilované vodě, druhým způsobem rozpuštění v 6M HCl a následně zahřívání po dobu 60 min na 90°C za účelem předredukce případného Se^{VI} .

Zbýlé tři vzorky obsahující selenan sodný byly připraveny vždy rozpuštěním požadovaného množství tablet v 6M HCl a zahřívány po dobu 60 min na 90°C. Tímto krokem byla zajištěna redukce Se^{VI} na Se^{IV} .

Tab. 4.4. Přehled reálných vzorků

Vzorek	Forma Se	Deklarovaný obsah [ng.tbl^{-1}]	Výrobce
E.S. Multiv.	IV	55	GS
Vit. E, Se + Zn	VI	50	GS
Selen	VI	100	Med Pharma
Multivitamin	VI	50	Calibrium

Naměřené hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou shrnuty v tabulce. 4.5.

Tab. 4.5. Naměřené hodnoty pro reálné vzorky

	Opak.	Standardní přídavek			Kalibrační přímka			
		A_{VZ}	A_{SP}	C_O [ng.ml ⁻¹]	$C_{N(SP)}$ [ng.ml ⁻¹]	$C_{T(SP)}$ [μg.tbl ⁻¹]	$C_{N(K)}$ [ng.ml ⁻¹]	$C_{T(K)}$ [ng.tbl ⁻¹]
E.S. Multiv. (H ₂ O)	1	0,108	0,227	2,75	2,75	55,0	1,64	32,8
	2	0,120	0,173	2,75	6,79	135,8	1,80	35,9
E.S.Multiv.	1	0,147	0,228	2,75	5,55	110,9	2,15	43,0
	2	0,088	0,269	2,75	1,49	29,9	1,38	27,6
Selen	1	0,004	0,370	3,00	0,10	1,6	0,45	7,2
	2	0,008	0,317	3,00	0,23	3,8	0,64	10,6
Vit. E,Se+Zn	1	0,016	0,401	3,00	0,38	6,1	1,01	14,8
	2	0,031	0,412	3,00	0,72	12,0	1,72	28,7
Multivitamin	1	0,081	0,263	3,00	3,90	65,1	4,10	68,4
	2	0,079	0,273	3,00	3,58	59,5	4,00	66,5

A_{VZ} – absorbance vzorku bez standardního přídávku, A_{SP} – absorbance vzorku se standardním přídávkem, C_O – očekávaná koncentrace Se, $C_{N(SP)}$ – naměřená koncentrace Se metodou standardního přídávku, $C_{T(SP)}$ – naměřená koncentrace Se na tabletu metodou standardního přídávku, $C_{N(K)}$ – naměřená koncentrace Se metodou kalibrační křivky, $C_{T(K)}$ – naměřená koncentrace Se na tabletu metodou kalibrační křivky, Opak. – opakování

Na stanovení selenu metodou EchG – AAS mají velký vliv anorganické interferenty, které lze rozdělit do tří hlavních skupin: silná oxidační činidla, ionty přechodných a vzácných prvků a ostatní hydridotvorné prvky. Největší rušivý vliv mají ionty přechodných kovů, zejména Zn^{II} a Cu^{II}. Interference těchto iontů závisí na jejich koncentraci v roztoku. Tento vliv se začíná projevovat tehdy, je – li poměr koncentrací Se a Cu^{II} (Zn^{II}) 1:100. Snížení citlivosti mohou způsobit také sodné a železité ionty.⁴⁰

K dalšímu snížení citlivosti vede přítomnost mastných látek a nedokonalé rozpuštění organické matrice, což může způsobit sorpci Se a tím dojde k zamezení jeho detekce pomocí EchG – AAS.

V této bakalářské práci byly použity dva vzorky multivitaminů od různých

výrobci. Prvním vzorkem byl GS Extra Strong Multivitamin obsahující seleničitan sodný. Tento vzorek byl připravován rozpuštěním příslušného počtu tablet v destilované vodě, druhým způsobem bylo rozpuštění tablet v 6M HCl a zahřátí na 90°C po dobu 60 min. V obou případech došlo k naměření různých koncentrací selenu. Tyto hodnoty byly ovlivněny nerozpuštěnou maticí, kdy pravděpodobně došlo k sorpci selenu na částice matrice. Další snížení citlivosti bylo způsobeno přítomností Zn^{II} a Cu^{II} , které se vyskytují v tabletách ve vysoké koncentraci ve srovnání s koncentrací selenu ($c_{Zn(II)} = 10 \text{ mg/tbl}$, $c_{Cu(II)} = 1 \text{ mg/tbl}$, $c_{Se(IV)} = 55 \mu\text{g/tbl}$). K dalšímu snížení citlivosti mohla vést přítomnost železitých iontů, které jsou součástí oxidu železitého používaného jako barviva do tablet.⁴⁰

Druhým vzorkem byl Calibrum s multivitaminem a activinem. Vzorek byl rozpouštěn v 6M HCl a zahříván. V průběhu zahřívání došlo k rozpuštění převážného množství matrice, čímž byl snížen její vliv na stanovení Se. Toto stanovení mohlo být ovlivněno přítomností Zn^{II} a Cu^{II} , ale v tomto přípravku se nenacházejí v tak vysoké koncentraci, jako u předchozího vzorku, proto byl tento vzorek ovlivněn interferencemi nejméně.

Třetím vzorkem byl vzorek Med Pharma Selen, který byl rozpouštěn v 6M HCl a zahříván stejným způsobem, jako předchozí vzorky. Přestože byl vzorek zahříván v silně kyselém prostředí, došlo pouze k minimálnímu rozpuštění tablet. Z tohoto důvodu došlo k minimální detekci selenu ve vzorku. Selen zůstal navázán na částicích matrice a tím byla znemožněna jeho detekce.

Posledním vzorkem byly kapsle GS Vitamin E, Selen, Zinek. V těchto kapslích se jako nosič používají různé druhy olejů (palmový, kokosový, sojový) a včelí vosk. Po rozpuštění kapslí v 6M HCl a následném zahřívání, zůstala na povrchu vrstva mastných látek, které způsobují snížení citlivosti stanovení selenu. Po odebrání této vrstvy a proměření vzorků bylo zjištěno, že převážná část selenu zůstala navázána na těchto odebraných mastných látkách.

5. Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá stanovením selenu pomocí elektrochemického generování těžkých sloučenin ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií.

V první části této práce byla provedena optimalizace pracovních podmínek elektrochemického generování selenovodíku. Po nalezení optimálních podmínek byly provedeny různé způsoby předredukce Se^{VI} , který nebylo možné detekovat pro nízkou citlivost jeho stanovení bez předredukce.

V další části práce byly proměřeny kalibrace pro Se^{IV} a Se^{VI} byly zjištěny základní charakteristiky jejich stanovení.

V závěrečné části této práce byly určovány obsahy Se v reálných vzorcích navrhovanou metodou. Výsledky byly získány metodou standardního přídatku a metodou kalibrační křivky. U získaných výsledků byl diskutován vliv možných interferencí na stanovení selenu metodou EcHG – AAS.

Použitá literatura

1. Greenwood, N. N; Earnshaw, A.: Chemistry of the elements, Second Edition, University of Leeds, Butterworth Heinemann, Oxford 1998
2. Remy, H.: Anorganická chemie I, 12. vydání, Nakladatelství technické literatury, n. p., Praha (1972)
3. Kulveitová, H.: Chemie II, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ostrava (2007)
4. Mikulčák, J.; Klimeš, B.; Široký, J.; Šůla, V.; Zemánek, F.: Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy, Státní pedagogické nakladatelství, n. p., Praha (1989)
5. Barceloux, D. G.: Selenium, Clinical Toxicology, **37(2)**, 145–172 (1999)
6. Dodig, S.; Čepelak, I.: The facts and controversies about selenium, Acta Pharm. **54**, 261–276 (2004)
7. Dubová, Z.: Stanovení forem rtuti a selenu ve vybraných materiálech, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno (2008)
8. Rusek, V.: Základy toxikologie, Univerzita Pardubice, Pardubice (2001)
9. Horák, J.; Linhart, I.; Klusoň, P.: Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, Praha (2004)
10. Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R.: Chemical Warfare Agents, Toxikology a Treatment, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex (2007)
11. Vašková, P: Selen v lidské výživě, Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno (2006)
12. Tan, J.; Zhu, W.; Wang, W.; Li, R.; Hou, S.; Wang, D.; Yang, L.: Selenium in soil and endemic diseases in China, The Science of the Total Environment **284**, 227 – 235 (2002)
13. Conde, J. E.; Sanz Alaejos, M.: Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters, Chem. Rev. **97**, 1979-2003 (1997)
14. Otruvo, J.; Fawell, J. K.; Giddings, M.; Jackson, P.; Magara, Y.; Festo Ngowi, A. V.; Ohanian, E.: Selenium in Drinking-water, World Health Organization, Ženeva (2011)

15. Spallholz, J. E.; Hoffman, D. J.: Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds, *Aquatic Toxicology*, **57**, 27-37 (2002)
16. Hawkesford, M. J.; Zhao, F.: Strategies for increasing the selenium content of wheat, *Journal of Cereal Science*, **46**, 282 – 292 (2007)
17. Thavarajah, D.; Vandenberg, A.; George, G. N.; Pickering, I. J.: Chemical Form of Selenium in Naturally Selenium-Rich Lentils (*Lens culinaris* L.) from Saskatchewan, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7337-7341 (2007)
18. Reilly, C.: *Selenium in Food and Health*, Second Edition, Springer Science+Business Media, New York (2006)
19. Terry, N.; Zayed, A. M.; de Souza, M. P.; Tarum, A.S.: Selenium in Higher Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 401 – 432 (2000)
20. Adamcová, K.: *Selen v mateřském mléce*, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno (2010)
21. Racek, J.; Holeček, V.: Enzymy a volné radikály, *Chem. Listy*, **93**, 774 – 780 (1999)
22. Wu, D.; Cederbraum, A. I.: Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage, *Alcohol Research & Health*, **27**(4), 277 – 284 (2003)
23. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W: *Harperova Biochemie*, 23. vydání, Nakladatelství H+H, Jihlava (2002)
24. Whanger, P. D.: Selenium and its relationship to cancer: an update†, *British Journal of Nutrition*, **91**, 11–28 (2004)
25. Ip. C.: Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention, *J. Nutr.*, **128**, 1845 – 1854 (1998)
26. Finley, J. W.; Ip,C.; Lisk, D. J.; Davis, C. D.; Hintze, K. J.; Whanger, P. D.: Cancer-Protective Properties of High-Selenium Broccoli, *J. Agric. Food Chem.*, **49** (5), 2679-2683 (2001)
27. Germ, M.; Stibilj, V.; Kreft, I.: Metabolic Importance of Selenium for Plants, *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, **1**(1), 91-97 (2007)
28. Li, Y.; Peng,T.; Yang, Y.; Niu,C.; Archard, L. C; Zhang,H.: High prevalence of enteroviral genomic sequences in myocardium from cases of endemic cardiomyopathy (Keshan disease) in China, *Heart*, **83**, 696–701 (2000)

-
29. Komárek, J.: Atomová absorpční spektrometrie, Masarykova univerzita v Brně, Brno (2004)
 30. Thiry, C.; Ruttens, A.; De Temmerman, L.; Schneider, Y.; Pussemier, L.: Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food, *Food Chemistry*, **130**, 767–784 (2012)
 31. Michalová, I.: Doplnky stravy, Sdružení českých spotřebitelů, o. s., Praha (2007)
 32. Kramulová, B. :Speciační analýza sloučenin selenu, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha (2011)
 33. Cantle, J .E.: Atomic Absorption Spectrometry, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (1982)
 34. Becker – Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Huang, M. D.; Okruss, M.; Radziuk B.: Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: A historical perspective, *Spectrochimica Acta Part B*, **61**, 1015–1030 (2006)
 35. Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; Šíma, J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod, *Chem. Listy* 103, 652-660 (2009)
 36. Denkhaus, E.; Beck, F.; Bueschler, P.; Gerhard, R.; Golloch, A.: Electrolytic hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of antimony, arsenic, selenium, and tin – mechanistic aspects and figures of merit, *Fresenius J Anal Chem*, **370**, 735–743 (2001)
 37. Hraníček, J.: Miniaturizace průtokových elektrochemických cel pro generování těkavých sloučenin, Univerzita Karlova v Praze, Praha (2005)
 38. Dědina, J.: Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizér, *Spectrochimica Acta Part B*, **62**, 846–872 (2007)
 39. Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV Vapor Generation for Determination of Selenium by Heated Quartz Tube Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Chem.*, **75**, 2092 – 2099 (2003)

-
40. Bolea, E.; Laborda, F.; Belarra, M. A.; Castillo, J. R.: Interferences in electrochemical hydride generation of hydrogen selenide, *Spectrochimica Acta Part B*, **56**, 2347 – 2360 (2001)
 41. Näykki, T.; Perämäki, P.; Kujala, J.; Mikkonen, A.: Optimization of a flow injection hydride generation atomic absorption spectrometric method for the determination of arsenic, antimony and selenium in iron chloride/sulfate-based water treatment chemici, *Analytica Chimica Acta*, **439**, 229 – 238 (2001)