

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Vladimíra Jandovská

STANOVENÍ ŽELEZA V PIVU METODOU ATOMOVÉ ABSORPČNÍ  
SPEKTROSKOPIE

Determination of iron in beer using atomic absorption spectroscopy

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. Eva Tesařová

Školitel: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2014

## 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 vědom 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 1. června 2014.

Podpis

## Abstrakt

Obsahem této práce je vývoj a optimalizace metody stanovení obsahu železa v pivu bezplamenovou AAS jako citlivější alternativy k běžně používané plamenové AAS. Zatímco pro vodné roztoky byla vyvinutá metoda plně funkční, u reálných vzorků piva matriční efekty zcela znemožňovaly toto stanovení. Proto byla vyvinuta metoda přípravy vzorku, a to přečištění piva přes kolonku naplněnou adsorbentem Florisilem. Po této úpravě byly rušící látky odstraněny a mez detekce pro tento způsob stanovení byla stanovena šestkrát nižší než pro plamenovou AAS. Vzhledem k tomu, že v reálném vzorku byl naměřen o 30 % nižší obsah železa než pomocí plamenové AAS, je třeba danou metodu dále optimalizovat, což bude předmětem dalších experimentů.

## Abstract

This thesis describes the development and optimisation of a method for determination of iron in beer using electrothermal atomic absorption spectroscopy as a more sensitive option to routinely used flame atomic absorption spectroscopy. While a fully functional method has been developed for aqueous solutions, matrix effects in real beer samples made this determination impossible. Therefore, a method of sample preparation has been developed, beer purifying through column with adsorbent Florisil. After this adjustment the interfering substance was eliminated and the detection limit of ETAAS was six times lower than the detection limit of FAAS. The content of iron in the real beer sample using ETAAS was measured as 30 % lower than using FAAS, it is therefore necessary to optimise this method. This will be the subject of further experiments.

### Klíčová slova:

AAS, železo, pivo

### Keywords:

AAS, iron, beer

## Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. a Ing. Karlu Štěrbovi PhD za cenné rady a čas, který mi věnovali, při zpracování bakalářské práce.

# Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Atomová absorpční spektrometrie .....	8
2.1.1	Princip metody.....	8
2.1.2	Instrumentace .....	9
2.1.3	Interference.....	15
2.2	Pivo .....	18
2.3	Kovy v pivu .....	18
2.3.1	Železo v pivu .....	19
3	Experimentální část .....	21
3.1	Chemikálie .....	21
3.2	Vzorky .....	21
3.3	Přístroj .....	21
3.3.1	Parametry přístroje .....	22
3.4	Postup.....	22
3.4.1	Příprava standardů .....	22
3.4.2	Příprava vzorků .....	23
3.4.3	Příprava validačních roztoků .....	23
3.4.4	Nastavení přístroje.....	23
3.4.5	Postup měření .....	24
3.5	Výpočty .....	25
4	Výsledky .....	26
4.1	Optimalizace stanovení železa ve vodných roztocích .....	26
4.2	Optimalizace stanovení železa v pivu .....	28
4.2.1	Ředění.....	28
4.2.2	Metoda standardního přídatku .....	30
4.2.3	Odstranění rušivé matrice .....	31
4.3	Validace.....	32
4.3.1	Správnost .....	32
4.3.2	Stanovení LOD a LOQ (srovnání ETAAS a FAAS).....	33
5	Diskuze.....	35
6	Závěr .....	37

## Seznam zkratek

A	absorbance	
c	hmotnostní koncentrace	$\text{g dm}^{-3}$
c	rychlost světla ve vakuu	$\text{m s}^{-1}$
$E_i$	energie hladiny elektronu	J
$\Delta E$	rozdíl energií hladin	J
EDL	bezelektrodová výbojka	
ETA	elektrotermický atomizátor	
ETAAS	bezplamenná atomová absorpční spektrometrie	
FAAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie	
h	Planckova konstanta	6,626 176 J s
HCL	výbojka s dutou katodou	
l	délka absorpční vrstvy	m
LOD	limit detekce	
LOQ	limit kvantifikace	
N	počet atomů v jednotce objemu	$\text{dm}^{-3}$
n	počet měření	
RSD	relativní směrodatná odchylka	%
SD	směrodatná odchylka	
SW	software	
t	teplota	$^{\circ}\text{C}$
$x_i$	vypočtená hodnota	
$\bar{x}$	průměrná hodnota	
$\varepsilon_{\lambda}$	absorpční koeficient při vlnové délce $\lambda$	$\text{dm}^3 \text{mol m}^{-1}$
$\kappa$	atomový absorpční koeficient	$\text{m}^2$
$\lambda$	vlnová délka	m
$\nu$	frekvence záření	Hz
$\Phi$	tok záření zmenšený absorpcí	$\text{J s}^{-1}$
$\Phi_0$	původní tok záření	$\text{J s}^{-1}$

# 1 ÚVOD

Železo patří mezi důležité technologické prvky v pivu. Nejčastěji se obsah železa v pivu stanovuje plamenovou AAS<sup>1</sup>, která byla v této práci použita jako referenční metoda. Cílem práce bylo vyvinout metodu pro stanovení množství železa v pivu bezplamenovou AAS, která by byla citlivější.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie je analytická metoda založena na absorpci vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu<sup>2</sup>. Tuto metodu lze použít pro analýzu až šedesát kovových popř. polokovových prvků.

#### 2.1.1 Princip metody

Energie atomů v různých stavech je určena hlavně výskytem elektronu v určitých energetických hladinách<sup>3</sup>. Absorbuje-li atom záření, může dojít k přechodu elektronů ze základního stavu do vyšších energetických hladin. Pokud elektron excituje z určité hladiny  $E_1$  na hladinu s vyšší energií  $E_2$ , přijme množství energie odpovídající rozdílu energií těchto dvou hladin  $\Delta E$ .

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

$h$  – Planckova konstanta [6,626 176 J s]

$\nu$  – frekvence záření [ $s^{-1}$ ]

$c$  – rychlost světla ve vakuu [ $m s^{-1}$ ]

$\lambda$  – vlnová délka [nm]

Pro každý prvek je charakteristická vlnová délka absorbovaného záření a jeho intenzita. Právě proto je AAS metodou specifickou.

V ultrafialové a viditelné oblasti záření absorbují atomy kovů a některých polokovů. Ostatní nekovové prvky absorbují záření v oblasti menší než 190 nm, tedy ve vakuové UV oblasti<sup>2</sup>.

Při excitaci valenčních elektronů dojde k zeslabení absorbovaných vlnových délek a je možné pozorovat absorpční čárové spektrum (tmavé čáry na světlém pozadí)<sup>2</sup>. Atom má možnost být v řadě excitovaných stavů, protože sledovaná spektra obsahují mnoho čar.

Nejčastěji se v absorpčních spektrech uplatňují čáry rezonanční (dochází k rezonanci s optickým zářením vhodné frekvence<sup>4</sup>), což jsou čáry, které odpovídají přechodu elektronů ze základního stavu. Pro analytickou chemii se používají čáry odpovídající přechodu s největší pravděpodobností a tedy s největší citlivostí<sup>4</sup>.



Jako zdroj záření se používají stejné prvky, které chceme stanovovat, protože zdroj záření musí emitovat záření o vysoké energii. Prvek stejný se stanovovaným bude poskytovat záření o požadované vlnové délce. Vztah mezi emitovaným zářením zdroje a absorpcí záření vzorek popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot e^{-\kappa N l} \quad (2)$$

$\Phi$  – tok záření zmenšený absorpcí [ $\text{J s}^{-1}$ ]

$\Phi_0$  – původní tok záření [ $\text{J s}^{-1}$ ]

$\kappa$  – atomový absorpční koeficient [ $\text{m}^2$ ]

$N$  – počet atomů v jednotce objemu [ $\text{dm}^{-3}$ ]

$l$  – délka absorpční vrstvy [m]

po úpravě:

$$A = \frac{\log \Phi_0}{\Phi} = 0,434 \cdot \kappa \cdot N \cdot l \quad (3)$$

$A$  – absorbance

V kvantitativní analýze se běžně používá upravená rovnice, kde je naměřená hodnota absorbance přímo úměrná koncentraci stanovovaného prvku.

$$\lambda \quad A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (4)$$

$c$  – koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]

$\varepsilon_\lambda$  – absorpční koeficient při vlnové délce  $\lambda$  [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{m}^{-1}$ ]

V praxi se využívá metody kalibrační křivky nebo standardního přídatku u nestálých vzorků. Výhodou je, že není potřeba znát hodnotu absorpčního koeficientu.

## 2.1.2 Instrumentace

Standardní přístroj pro atomovou absorpční spektrometrii se skládá ze zdroje záření, atomizátoru, monochromátoru, detektoru a počítače.

### 2.1.2.1 Zdroje záření

Zdroje primárního záření se stabilním zářivým tokem, poskytující dostatečně intenzivní úzké čáry bez deformace samoabsorpce a s minimálním pozadím nejlépe splňují podmínky pro měření atomovou absorpční spektrometrií<sup>3</sup>. Jako tyto zdroje se používají výbojky s dutou katodou, bezelektrodové výbojky nebo jiné speciální zdroje.

#### Výbojky s dutou katodou (HCL – hollow cathode lamps)

Tyto výbojky vysílají intenzivní a stabilní záření<sup>4</sup>, emitují čárové spektrum bez samoabsorpce a mají dostatečnou životnost<sup>3</sup>.

Výbojky s dutou katodou jsou zhotoveny z optického skla se zatavenými elektrodami a čelním okénkem, které propouští záření hlavních rezonančních čar<sup>3,4</sup>. Výstupní okénka jsou z optického křemene ( $\lambda$  do 240 nm), z UV-skla ( $\lambda$  od 240 do 300 nm) nebo z běžného optického skla ( $\lambda$  nad 300 nm). Katoda je tvořena jako dutý váleček z velmi čistého kovu, který je stanovován, z materiálu s chudým emisním spektrem s folií stanovovaného kovu na vnitřní straně katody, ze slitiny nebo ze sinatrovaných práškových materiálů pro špatně obrobitelné kovy. Používají se i víceprvkové katody. Kovy s vysokou teplotou tání s vrstvou práškového kovu s velkým povrchem (váže zbytky molekulárních plynů) je tvořena anoda. Celá výbojka je evakuována a naplněna inertním plynem (Ne, Ar).

V dutině katody dochází k nízkotlakému doutnavému výboji. Srážkami urychlených iontů s atomy vzácného plynu dojde k ionizaci při vloženém napětí a kladně nabitě ionty vzácného plynu z povrchu katody vyrazí atomy kovu, ty se srážkami s ionty a elektrony plazmatu dostanou do stavu excitace a při deexcitaci je uvolněno potřebné množství elektromagnetického záření.

#### Bezelektrodové výbojky (EDL – electrodeless discharge lamps)

Výbojky obsahuje baničku, válcového tvaru z křemene nebo ze skla, která je naplněná stejným prvkem, který chceme stanovit<sup>3</sup>. Prvky jsou ve formě směsi kovu a jeho těžké sloučeniny, nejčastěji halogenidu. Musí produkovat páry o vhodné tenzi při pracovní teplotě výbojky<sup>3</sup>. Evakuované výbojky jsou plněny inertním Ar, Ne nebo He.

Bezelektrodové výbojky mohou být excitovány radiovou frekvencí, u kterých je výboj těsně podél stěn a tím je minimalizována samoabsorpce rezonančních čar<sup>3</sup>, nebo mikrovlnnou

frekvencí. Ty mají složitější konstrukci, proto nejsou tolik rozšířené. Používají se hlavně pro prvky s čarami v oblasti vlnových délek menších než 220 nm, tedy selen, arsen, olovo a fosfor.

## Speciální zdroje

Jde o kontinuální zdroje jako vysokotlaké xenonové obloukové výbojky nebo polovodičové diody.

### 2.1.2.2 Atomizátor

Atomizátor přeměňuje stanovované prvky na atomární páru, což jsou volné atomy v základním, excitovaném nebo ionizovaném stavu<sup>3</sup>. Kromě poskytování co největší koncentrace volných atomů by měl být zachován poměr mezi koncentrací volných atomů a koncentrací stanovovaného prvku ve vzorku v celém pracovním rozsahu atomizátoru. Teplota atomizátoru by neměla překročit teplotu potřebnou k výraznější excitaci atomů, ale zároveň by měla dostačovat pro atomizaci prvku<sup>2</sup>. Používají se plamenové nebo bezplamenové atomizátory.

## Plamenové atomizátory

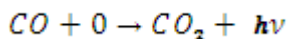
V plameni probíhá reakce mezi okysličovadlem a palivem, doprovázená intenzivním vývojem tepla a záření<sup>2</sup>. Kontrolu nad hořením, tvarem a polohou plamene zajišťuje hořák, do kterého se přivádí palivo i okysličovadlo<sup>4</sup>. Plamen by měl mít vlastní slabé záření a nízkou absorpci v pracovní oblasti spektra.

Při stanovení záleží na složení plyné směsi. Jako palivo se využívá propan, acetylen, vodík, jako okysličovadlo pak vzduch nebo oxid dusný. Používají stechiometrické plameny nebo plameny s nižším nebo vyšším obsahem paliva.

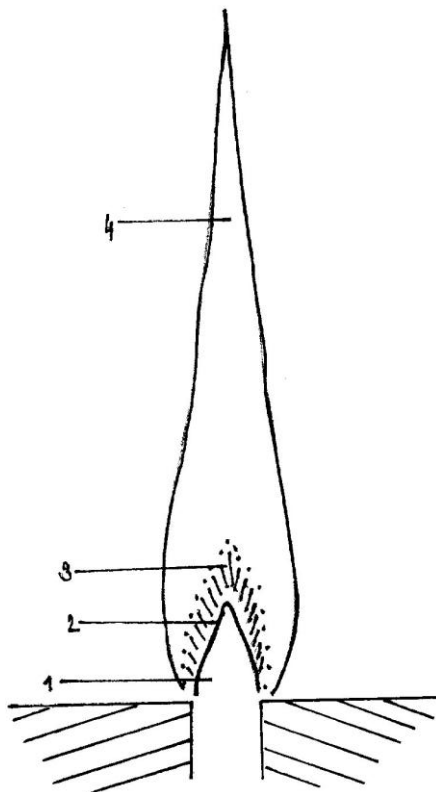
V AAS se nejčastěji používají laminární předmíchané plameny, kde se palivo a okysličovadlo předem promíchá<sup>2</sup>. Plyny v hořáku musí mít 2-3x větší rychlost než je

rychlost hoření, jinak by mohlo dojít k nestabilitě plamene, odfoukávání od hořáku nebo zhasnutí plamene nebo naopak k výbuchu<sup>4</sup>.

Plamen se skládá z několika reakčních zón – předehřívací, primární, mezireakční a sekundární<sup>2,3</sup>. Tyto zóny jsou znázorněné na obr 1. Plyny se v předehřívací zóně zahřívají na zápalnou teplotu. Primární zóna se zvětšuje s nadbytkem paliva a vznikají zde radikály. V sekundární reakční zóně probíhá difúzní hoření, dohořívání palivové směsi a plamen se zbarvuje do modrofialova. V této zóně probíhá zde reakce



a dochází k tvorbě oxidačních radikálů a molekul. Velmi úzká mezireakční zóna se nachází mezi primární a sekundární reakční zónou, kde v redukčních uhlovodíkových plamenech dochází ke vzniku redukčních radikálů a molekul. Zóna je zbarvena do žlutozelená ve směsi acetylen-vzduch, u plamene acetylen-oxid dusný je dočervena kvůli emisi CN radikálů. Tato zóna obsahuje velmi malou koncentraci kyslíku, proto je vhodná pro atomizaci prvků tvořící velmi stabilní oxidy.



Obr 1 Zóny plamene

1 – předehřívací zóna, 2 – primární reakční zóna, 3 – mezireakční zóna, 4 – sekundární reakční zóna

Stanovení vzorku v plameni závisí na výšce hořáku, která se nastavuje tak, aby paprsek procházel částí s největší hustotou atomární páry<sup>4</sup>. Pro různé prvky je výška nad hlavicí hořáku různá.

Kapalný vzorek se do atomizátoru dostává ve formě aerosolu drobných kapek zmlžovačem přes mlžnou komoru.

Běžně se používají pneumatické zmlžovače, u kterých se vzorek nasává působením plynu pod tlakem<sup>3</sup>. V mlžné komoře jsou jemné kapičky po smísení s topným plynem vedeny do hořáku a větší kapky se tamtéž tříští o skleněnou kuličku za vzniku menších kapiček. Některé se odpaří, některé odtékají v kondenzátu.

Kromě toho se užívá například ultrazvukový, elektrostatický nebo hydraulický vysokotlaký zmlžovač.

## Bezplamenové atomizátory

Nejčastěji používané elektrometrické atomizátory neboli ETA jsou vyhřívány elektrickým proudem. Jsou vyráběny z různých materiálů, různých konstrukcí a dosahují různých teplot. Používají se grafitové pícky, wolframové pásky nebo například drátky, slitiny z platiny nebo rhodia.

Pro elektrotermickou atomizaci analytu je potřeba ochranná atmosféra inertního plynu, argonu nebo dusíku, k zabránění oxidace vzdušným kyslíkem<sup>2</sup>.

Tyto atomizátory pracují při teplotním programu, který nejprve vzorek vysuší, čímž dojde k odpaření rozpouštědla, pak následuje rozklad matrice během žíhání a teprve potom dochází k atomizaci.

U grafitových kyvet se vzorek dávkuje buď přímo na vnitřní stěnu atomizátoru, nebo se v některých případech využívá platformy uvnitř trubice, na kterou se vzorek nadávkuje.

V případě ETA se vzorky dávkuje jednorázově, takže při měření pozorujeme přechodný signál neboli pulz. Velikost i doba trvání jsou závislé na typu konstrukce, druhu a množství analytu a důležitým faktorem je i teplota a vliv prostředí. Při plamenové AAS tento pulz nepozorujeme, protože vzorek je přiváděn kontinuálně a signál se měří neustále<sup>2,3</sup>.

### 2.1.2.3 Disperzní systém

Disperzní systém slouží k prostorové separaci záření se sledovanou rezonanční čarou, tedy čarou o vhodné vlnové délce. Běžně se užívají buď monochromátory, nebo interferenční filtry<sup>2</sup>. Monochromátor se skládá z výstupní štěrbin, disperzního prvku, výstupní štěrbin a pomocné optiky<sup>4</sup>. Disperzním prvkem bývají většinou odrazové mřížky, výjimečně hranoly, v rozsahu vlnových délek od 190 do 900 nm<sup>3</sup>.

Hranol rozkládá polychromatické záření na základě lomu světla na monochromatické záření o různých vlnových délkách. Volba materiálu na výrobu hranolu je závislá na požadované oblasti vlnových délek. V dnešní době najdeme hranoly už jen ve starších přístrojích.

Difrakční odrazové mřížky pracují na principu odrazu paprsků záření. Jsou konstruovány jako destičky různých velikostí z různých materiálů, do kterých jsou vryty malé vrypy stejné velikosti, které jsou umístěny dokonale rovnoběžně a s přesnou vzdáleností od sebe<sup>5</sup>. Tím je docíleno, že s dopadem paprsků na vrypy dojde k difrakci a v určitých úhlech odrazu dojde k interferenčnímu zesílení paprsků. Sklon stěn vrypů u klasických mřížek je dán tak, aby v rozsahu spektra bylo soustředováno co největší množství zářivé energie. Počet vrypů na jeden milimetr je dán oblastí spektra, pro kterou je mřížka určená, např. v ultrafialové až viditelné oblasti se používají mřížky se stovkami až tisíci vrypů na 1 mm, pro infračervenou oblast mají mřížky jen do stovek vrypů na 1 mm.

V atomové absorpční spektrometrii zdroj primárního záření emituje úzké čáry, není potřeba klást vysoké nároky na rozlišovací schopnost monochromátoru<sup>2,4</sup>.

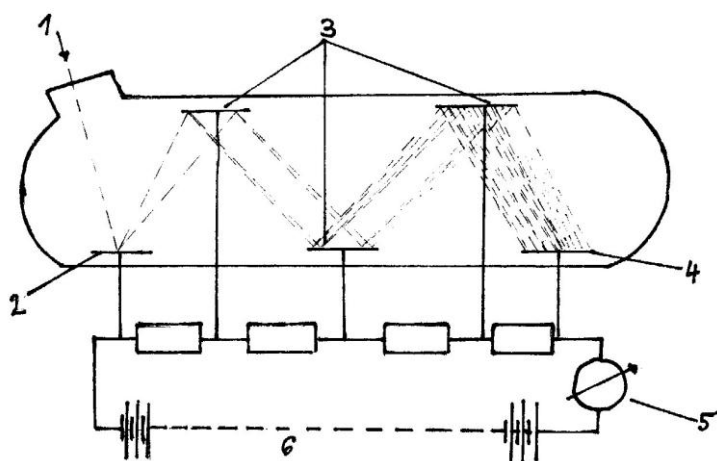
Štěrbin slouží k vymezení části paprsků. Šířka štěrbin se nastavuje tak, aby byla optimální velikost měřeného signálu a zároveň i intenzita pozadí.

### 2.1.2.4 Detektory

Detektory převádějí elektromagnetickou formu energie, tedy záření na energii elektrickou. V ultrafialové, viditelné a blízké infračervené oblasti záření se nejčastěji využívají fotonásobiče a to hlavně pro jejich vysokou citlivost. Jsou založené na vnějším fotoelektrickém efektu. Jednoduché schéma fotonásobiče se třemi dynodami je znázorněn na obr 2.

Hlavním komponentem je fotokatoda, ze které se při dopadu fotonu uvolní elektrony<sup>5</sup>. Ty jsou urychlovány elektrickým polem a přitahovány pomocnými elektrodami neboli dynodami.

Když elektron dopadne na první dynodu, vyrazí několik sekundárních elektronů. Ve fotonásobiči je obvykle soustava 9 – 13 dynod, přes které se tento proces opakuje až ke sběrné anodě<sup>4</sup>. Mezi katodou a anodou je registrován prošlý proud, který je díky dynodám několikanásobně vyšší.



Obr 2 Fotonásobič

1 – foton, 2 – fotokatoda, 3 – dynody, 4 – anoda, 5 – ampérmetr, 6 – zdroj

## 2.1.3 Interference

Interference jsou jevy, které vyvolávají systematické odchylky ve velikosti signálu analytu<sup>5</sup>. Pokud by měřený vzorek obsahoval pouze stejné množství analytu a stejné rozpouštědlo jako standardní roztok a neobsahoval by složky, z nich některé mohou vyvolat rušivé jevy, tedy interferenty/rušivé složky, naměřený signál obou roztoků by se shodoval.

Rušivé jevy dělíme na spektrální a nespektrální. Nespektrální interference odlišujeme u plamenové a bezplamenné atomizace.

### 2.1.3.1 Spektrální interference

V úzkém spektrálním intervalu čáry analytu se mohou vyskytovat rušivé absorpce, jejichž příčinou může být překryv čar, rozptyl záření a molekulární absorpce<sup>4</sup>.

Existují dvojice prvků, u kterých může dojít ke vzájemnému překrývání měřených čar<sup>4</sup>. Míra vzájemného rušení závisí na koncentraci jednotlivých prvků ve vzorku. Při odstranění

rušivého prvku z matrice nebo při volbě jiné spektrální čáry pro analyt je možné rušivý vliv eliminovat.

Rozptyl záření způsoben tvorbou jemných nevypařených pevných nebo kapalných částic může zapříčinit zdánlivou absorpci<sup>4</sup>. Tento jev se projevuje hlavně u krátkých vlnových délek. V případě plamenové AAS k rozptylu záření dochází v chladnějším plamenech, proto je vhodné použít pro potlačení toho jevu směs acetylen-oxid dusný<sup>3</sup>. Při použití bezplamenové techniky se může absorpce způsobená rozptylem záření projevovat jako kouř, který vzniká při atomizaci z málo těkavých látek, které nebyly odstraněny při pyrolýze, hlavně u biologických materiálů nebo s použitím kyseliny sírové nebo fosforečné, popřípadě při uvolňování grafitu ze stěny atomizátoru<sup>3</sup>. Rozptyl záření je možné téměř vždy minimalizovat korelací pozadí.

Široké pásy nebo jemná struktura úzkých píků může být projevem molekulární absorpce<sup>4</sup>. Tento rušivý vliv je podmíněn přítomností nedisociovaných molekul ve vzorku a projevuje se v celém rozsahu používaných vlnových délek<sup>5</sup>.

Rozptyl záření i molekulární absorpce způsobují tzv. nespecifickou absorpci neboli absorpci pozadí.

## Korekce pozadí

Absorpce pozadí se při měření přičítá k absorpci analytu. Pozitivní chyba může být problém hlavně u stopových analýz při měření s elektrotermickým atomizátorem<sup>5</sup>. Ke korekci pozadí se používá sekvenční způsob, kdy se v prvním kroku změří celková absorbance na vlnové délce stanovované látky. V druhém kroku se měřením zjistí pozadí na blízké čáře rezonanční čáry analytu. Ovšem prvek, jehož blízká čára je rezonanční, nesmí být obsažen ve vzorku<sup>4</sup>. Pro tento způsob korekce pozadí lze použít víceprvkovou výbojku.

Dále se korekce pozadí provádí pomocí zdroje kontinuálního záření, využitím Zeemanova jevu nebo metodou Smith-Hieftje.

Korekce pomocí zdroje kontinuálního záření je nejrozšířenější metodou. Měření se zakládá na střídání paprsků čárového a kontinuálního zdroje záření skrz absorpční prostředí s elektrickou modulací s posunem fáze<sup>3,5</sup>. Výbojka s dutou katodou emitující čárové spektrum analytu, měří celkovou absorpci. Deuteriová výbojka jako zdroj kontinuálního zdroje záření měří absorpci pozadí v požadovaném spektru. Výsledkem je rozdíl obou signálů, tedy hodnota odpovídající koncentraci analytu<sup>5</sup>. Ze spektra výbojky s dutou katodou se vymezí monochromátorem rezonanční čára analytu a z kontinua se vymezí pás. Intenzita záření obou



zdrojů je před začátkem záření nastaveno na stejnou hodnotu. Pokud změříme absorpci analytu pomocí HCL, bude intenzita záření snížena o hodnotu intenzity analytu. Při stejném měření deuteriovou výbojkou, bude snížení menší než 1 %, což je možno zanedbat<sup>4</sup>. Změříme-li pouze nespecifickou absorpci pozadí, snížení intenzity záření bude stejné u obou zdrojů. Deuteriovou výbojku lze použít ke korekci jen pro vlnové délky do 350 nm.

### 2.1.3.2 Nespektrální interference

#### Interference transportu

Tyto interference jsou dány změnami rychlosti nasávání roztoku nebo změnami účinnosti zmlžování. Jejich vliv je možné minimalizovat při přípravě srovnávacích roztoků udržováním shodného složení se složením vzorků, aby rozdíly byly zanedbatelné<sup>3</sup>, protože rušivé vlivy jsou ovlivňovány vlastnostmi roztoků a to především viskozitou, povrchovým napětím tenzí par rozpouštědla nebo obsahem solí. Důležitý vliv má i účinnost desolvatace<sup>4</sup>.

#### Interference vypařování

Vznik méně těkavé sloučeniny jako například netěkavých solí zabraňující přechodu analytu do plynné fáze může zapříčinit snížení citlivosti při měření koncentrace analytu. Totéž může způsobit i disperze analytu v nadbytku těžko těkavého interferentu<sup>3,4</sup>. Naopak zvýšení signálu může nastat v důsledku zvýšení vypařování analytu v důsledku rozptylu analytu v těkavější složce.

Zabránit těmto interferencím lze optimalizací parametrů přístroje, zvýšením teploty plamene, přidávkem těkavějších sloučenin pro zvýšení disperze aerosolu nebo k tvorbě těkavé sloučeniny analytu<sup>4</sup>.

#### Interference v plynné fázi

Tyto rušivé vlivy ovlivňují disociaci a ionizaci. Může dojít k posunu rovnovah v plameni, mohou se tvořit nové molekuly a koncentrace volných atomů v plameni se může snižovat<sup>4</sup>.

Přídavkem nadbytku snadno ionizovatelného prvku například roztoku cesia lze těmto interferencím zabránit<sup>5</sup>.

## 2.2 Pivo

Historie piva sahá až do sedmého tisíciletí před naším letopočtem, kdy první nápoj podobný dnešnímu pivu vznikl v Mezopotámii<sup>6</sup>.

Pivo je alkoholický nápoj, který se vyrábí se fermentací mladiny, která vzniká varním procesem z ječného sladu a chmele. Pomocí pivovarských kvasinek vzniká z jednoduchých cukrů (glukosy a maltosy) alkohol a oxid uhličitý.

Pivo obsahuje až dva tisíce různých látek, z nichž nejvíce jsou zastoupené sacharidy, bílkoviny, dále minerály, rozpustná vláknina, vitaminy skupiny B, a také řada polyfenolických sloučenin, kterým jsou přisuzovány antioxidační, antikarcinogenní a antimikrobiální účinky. Bylo popsáno, že pravidelná přiměřená konzumace piva snižuje vznik některých kardiovaskulárních chorob<sup>7</sup>. 25 g alkoholu denně, což odpovídá necelému 1 litru 10% piva nebo zhruba 0,6 litrům 12% piva, snižuje riziko vzniku těchto onemocnění o 25 %. Toto porovnání bylo prováděno s lidmi, kteří alkohol nepijí vůbec nebo ho konzumují ve větší míře než je 25 g za den<sup>8</sup>.

## 2.3 Kovy v pivu

Pivo obsahuje kovy, které jsou prospěšné pro zdraví člověka, např. vápník, hořčík, draslík, železo, ale i takové, které jsou toxické, např. olovo, kadmium, rtuť, ty však v pivu na rozdíl od ostatních nápojů a potravin nejsou obsaženy vůbec nebo jen ve velmi nízkých koncentracích<sup>9</sup>. Tato skutečnost je dána způsobem výroby piva, který je považován za dekontaminační proces. Přesto jsou maximální koncentrace některých kovů v pivu kontrolovány.

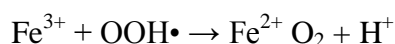
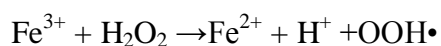
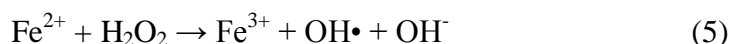
Kovy v pivu mohou primárně pocházet ze surovin, jako je ječmen a chmel nebo voda, dále pak např. z kvasinek<sup>9</sup>. Sekundárně se kovy do piva mohou dostat v průběhu výroby piva, z použitých zařízení při výrobě, filtračních materiálů nebo nedodřením daných postupů. Potencionálním zdrojem kontaminace piva mohou být také obaly jako plechovky, sudy a tanky, ve kterých je výsledný produkt skladován a přepravován. Z tohoto důvodu, minerální složení piva odráží složení použitých složek pro výrobu piva a odkazuje na procesy

v produkci piva. Obsah kovů je variabilní a závisí na kvalitě užitých substrátů, na typu vařeného piva a na zemi původu piva<sup>10</sup>.

### 2.3.1 Železo v pivu

Železo v pivu je důležitý stopový prvek, jehož koncentrace musí být sledována<sup>9</sup>, neboť železo ovlivňuje vlastnosti piva, jako je chuť, vůně, růst kvasinek a kvalita pění. Vysoká koncentrace železa v pivu může vést k omezení činnosti kvasinek a tím k vytvoření zákalu.

Kromě toho ionty železa působí katalyticky v oxidativních procesech probíhajících v pivu a tím se podílí na stárnutí a ovlivňování chuťové stálosti piva při jeho skladování<sup>10</sup>. Kyslík rozpuštěný v pivu vytváří v přítomnosti iontů železa reaktivní formy kyslíku ( $O_2^-$ ,  $OOH^\bullet$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ) Tyto procesy popisuje Fentonova reakce (5):



Tyto formy kyslíku jsou rozhodující pro stárnoucí procesy piva, protože ochotně reagují s různými organickými sloučeninami přítomnými v pivu, včetně polyfenolů, alkoholů, aminokyselin, mastných kyselin, iso -  $\alpha$  - kyselin,  $\alpha$  - kyselin a  $\beta$  - kyselin, čímž neustále mění sensorický profil a chuťovou stabilitu piva. Rychlost a úroveň tvorby sloučenin reaktivního kyslíku souvisí s množstvím iontů železa<sup>10</sup>.

Obsah železa je ovlivněn i kontaktem se železným zařízením a nádobami během výroby. Jako další zdroj je uváděna křemelina používaná k filtraci piva. Křemelina obsahuje určitý podíl vyluhovatelných látek, mezi které patří především ionty kovů<sup>11</sup>.

Železo v pivu se stanovuje nejčastěji plamenovou atomovou absorpční spektrometrií. Podle EBC<sup>1</sup> se měření provádí s použitím lampy s dutou katodou při 248,3 nm. Parametry metody jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab 1 Parametry metody FAAS (Flame atomic absorption spectroscopy) stanovené EBC

Parametr	$c \cdot 10^3$ g/dm <sup>-3</sup>
mez detekce	0,05
opakovatelnost	0,21
reprodukovatelnost	0,91

Dále je možné stanovit železo v pivu kromě jiných spektrometrických metod jako atomová emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou<sup>12</sup> i metodami nespektrometrickými, například metodou diferenční pulzní polarografie<sup>13</sup> nebo pomocí neutronové aktivační analýzy<sup>14</sup>.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

- Kyselina dusičná  $\text{HNO}_3$  65 %, suprapure (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Standardní roztok železa  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ,  $c(\text{Fe}) = 1000 \pm 2 \text{ mg/l}$  (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Palladium  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 / \text{HNO}_3$  ca. 15%,  $c(\text{Pd}) = 10,0 \pm 0,2 \text{ g/l}$  (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Kyselina L(+)-askorbová, crystal extra pure (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Dihydrogenfosforečnan draselný  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , kyselý, čistý (LACHEMA, Neratovice)
- Maltosa pro biochemii (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Florisil PR.  $\text{MgO} \cdot \text{SiO}_2$ , (Applied Science Laboratories Inc, Bedford, USA)
- Acetylen  $\text{C}_2\text{H}_2$ , rozpuštěný, (Messer Technogas s.r.o., Praha)
- Argon Ar, stlačený, čistota 4,8 (Messer Technogas, s.r.o., Praha)

### 3.2 Vzorky

- Gambrinus Original 10% výčepní lahvé

### 3.3 Přístroj

- Varian SpectrAA model AA240FS
- Atomizátor GTA (Graphite Tube Atomizer) 120
- Přídavný zdroj pro ultralampy (UltrAA Lamp)
- Software pro vyhodnocování získaných spekter SpektrAA (SW)
- Ultralampa s dutou katodou víceprvková pro Fe, Cu, Cr, Ni, Mn, Co (Varian)
- Automatický dávkovač PSD 120
- Grafitová trubice partition tubes (coated) – GTA 63-100012-00 (Varian)

### 3.3.1 Parametry přístroje

#### Plamenová AAS

- Vlnová délka - 248,3 nm
- Proud lampy – 10 mA
- Šířka štěrby - 0,2 nm
- Korekce pozadí - deuteriová lampa
- Doba měření vzorku – 2 s pro jedno opakování (prodleva 2 s před měřením)
- Počet měření jednoho vzorku – 3 měření v rámci jednoho stanovení
- Průtok paliva: vzduch - 13,5 l/min, acetylen - 2 l/min

#### Bezplamenová AAS

- Vlnová délka - 248,3 nm, 372,0 nm
- Proud lampy – 10 mA
- Šířka štěrby - 0,2 nm
- Korekce pozadí při 248,3 nm - deuteriovou lampou
- Dávkovaný objem vzorku - 10  $\mu$ m
- Počet měření jednoho vzorku – 3 nebo 6 měření v rámci jednoho stanovení, podrobně uvedeno ve výsledcích
- Průtok argonu - 0,3 l/min

## 3.4 Postup

### 3.4.1 Příprava standardů

Čisté nádobí pro ETAAS (electrothermal atomic absorption spectroscopy) bylo předem namáčeno na min. 12 hodin do 1% HNO<sub>3</sub>.

Kalibrační roztoky i standardní roztoky pro FAAS byly připraveny ředící řadou do 100ml nebo 50ml odměrných baněk ze standardního roztoku železa  $c(\text{Fe}) = 1000 \text{ mg/l}$  v 1% HNO<sub>3</sub>. Kalibrační roztoky pro FAAS měly koncentraci 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, 5,0 mg/l.

Pro kalibrační křivku v ETAAS byly zásobní roztoky železa o koncentracích 5  $\mu\text{g/l}$  a 250  $\mu\text{g/l}$ . Automatický dávkovač připravil kalibrační řadu o koncentracích 1  $\mu\text{g/l}$ , 3  $\mu\text{g/l}$

a 5 µg/l ze zásobního roztoku 5 µg/l a kalibrační řadu o koncentracích 25 µg/l, 50 µg/l a 100 µg/l ze zásobního o koncentraci 250 µg/l. Objemy jednotlivých roztoků byly řízeny pomocí příslušného softwaru.

### 3.4.2 Příprava vzorků

Vzorky piva byly vždy nejprve odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut, poté byly naředěny deionizovanou vodou. Během optimalizace ETAAS metody bylo použito ředění piva 2x, 5x, 10x a 20x. Pro FAAS bylo podle původní metody EBC<sup>1</sup> pivo ředěno vždy 2x.

Pro přečistění vzorků piva byl používán Florisil v dávkování 0,5 g adsorbentu na 5 ml piva umístěný do skleněné kolonky. Florisil byl před použitím přečištěn 10 ml 1% HNO<sub>3</sub> pod tlakem tak, aby ve skleněné koloně s Florisilem zbylo co nejméně kyseliny.

### 3.4.3 Příprava validačních roztoků

Validační roztoky byly připraveny pro zjištění správnosti metody ETAAS jako tři sady standardních roztoků železa o koncentracích 25 µg/l, 50 µg/l a 100 µg/l. Pro zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti byly použity slepé vzorky, tedy 1% roztok kyseliny dusičné.

### 3.4.4 Nastavení přístroje

Optimalizace přístroje při plamenové atomizaci byla prováděna pomocí standardního roztoku železa o koncentraci 2,5 mg/l a optimalizační parametry jako poloha lampy a poloha hořáku. U bezplamenové metody byla optimalizována poloha atomizátoru. V obou případech byly parametry nastavovány tak, aby signál dosahoval nejvyšší hodnoty. V tabulce 2 je uveden teplotní program bezplamenového atomizátoru.

Tab 2 Teplotní program měření ETAAS

krok	proces	t °C
1	sušení	85
2	sušení	95
3	sušení	120
4	žihání	700
5	žihání	700
6	omezení proudění plynu	700
7	atomizace	2300
8	atomizace	2300
9	čištění květy maximálním množstvím plynu	2300

### 3.4.5 Postup měření

Při měření kalibračních roztoků i vzorků plamenovou AAS byla po signalizaci přístrojem kapilára pro převod roztoků do zmlžovače ponořena do kalibračního roztoku nebo vzorku a tímto způsobem byla třikrát změřena absorbance pro jeden roztok. Při použití bezplamenové techniky byly vzorky umístěny do automatického dávkovače. Vzorky byly proměřeny třikrát nebo šestkrát (viz výsledky). Výslednou absorbanci a přepočet na koncentraci automaticky prováděl SW. S výjimkou slepého vzorku jsou vždy uvedené absorbance výsledkem rozdílu naměřené absorbance a absorbance slepého vzorku. Při stanovování obsahu železa metodou standardního přídatku jsou uvedené absorbance výsledkem rozdílu naměřené absorbance s přídatkem standardu a absorbance vzorku bez přídatku.

Při měření pomocí bezplamenového atomizátoru bylo automaticky přidáváno 10 µl do měřící květy roztok Pd ( $c(\text{Pd}) = 1 \text{ g/l}$ ) s 0,02 g kyseliny askorbové jako modifikátor pro zlepšení citlivosti měření.



## 3.5 Výpočty

Při vyhodnocování získaných dat byly použity následující výpočty

Průměr  $\bar{x} = \sum_{i=1}^n x_i$

Směrodatná odchylka  $SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

Relativní směrodatná odchylka (%)  $RSD = SD/\bar{x}$

Mez detekce byla vypočítána jako trojnásobek směrodatné odchylky a mez stanovitelnosti jako desetinásobek směrodatné odchylky slepého vzorku, tedy:

Limit detekce  $LOD = 3 \cdot SD_{\text{sumu}}$

Limit kvantifikace  $LOQ = 10 \cdot SD_{\text{sumu}}$

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizace stanovení železa ve vodných roztocích

Pro stanovení koncentrace železa bezplamenovou atomizací byla v manuálu k spektrofotometru Varian<sup>15</sup> uvedena doporučená vlnová délka 248,3 nm pro srovnávací vodné roztoky o koncentracích 0, 3 a 6 µg/l. Při této vlnové délce odpovídá koncentraci 6 µg/l absorbance 0,2. Vzhledem k takto vysoké citlivosti měření se za těchto podmínek nepodařilo sestavit kalibrační křivku. Kalibrační roztoky dané koncentrační úrovně měly velký rozptyl hodnot absorbancí. Absorbance prvního bodu kalibrační křivky o koncentraci železa 0 g/l, tedy slepého vzorku měla, vysokou hodnotu, což značí pravděpodobnou kontaminaci z prostředí. Tak vysoká hodnota znemožňuje další měření. Získané hodnoty jsou uvedené pro informaci v tabulce 3. Uvedené hodnoty absorbancí roztoků o koncentraci 1, 3, 5 µg/l byly získány odečtením absorbance slepého vzorku od naměřených absorbancí těchto kalibračních roztoků.

Tab 3 Kalibrace v rozsahu 0 - 5 µg/l při 248,3 nm

$c \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	A *	RSD %
0	0,3964	3,2
1	0,0442	77,7
3	0,1056	13,3
5	0,1673	7,3

\* průměrná hodnota (n=3)

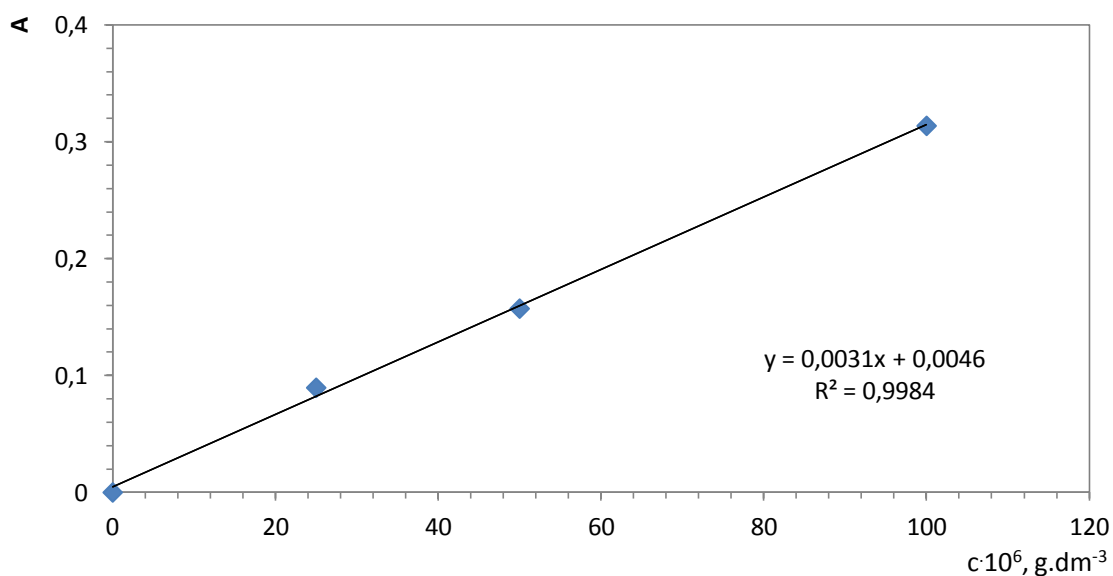
Pro další měření byla zvolena méně citlivá rezonanční čára o vlnové délce 372,0 nm a koncentrace srovnávacích roztoků byla zvýšena na 25, 50 a 100 µg/l. Při této vlnové délce není třeba použít deuteriovou lampu pro korekci pozadí. V tabulce 4 jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbancí kalibračních roztoků.

Tab 4 Kalibrace v koncentračním rozsahu 0 – 100 µg/l při při 372,0 nm

$c \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	A*	RSD %
0	0,0492	8,5
25	0,0896	5,5
50	0,1573	1,4
100	0,3137	0,8

\*průměrné hodnoty (n=3)

Společně se změnou vlnové délky se dále zavedla opatření omezující kontaminaci z prostředí (kyvety na vzorky byly máčeny minimálně na 12 hodin do 1% kyseliny dusičné, byl zakryt větrací vývod nad bezplamenovým atomizátorem a po dobu měření byl přes automatický dávkovač a stojan na vzorky umístěn ochranný poklop). To vedlo ke zmenšení relativní směrodatné odchylky (viz tabulka 4), z hodnoty jednotlivých naměřených absorbancí v závislosti na koncentracích železa bylo již možné sestrojít kalibrační křivku, která je uvedena na obr 3. Tato křivka měla již lineární charakter, determinační koeficient křivky je 0,9984. Po změně vlnové délky na 372,0 nm poskytoval roztok o koncentraci 63 µg/l absorbanci 0,2. Citlivost tedy poklesla 10x. Počet opakování jednoho vzorku bylo zvýšeno ze tří na šest, protože při prvním měření byla většinou získaná absorbance 2-3x vyšší než ostatní naměřené hodnoty a při šesti opakovaných měřeních ji bylo možné vyloučit jako odlehlou hodnotu.



Obr 3 Kalibrační křivka

## 4.2 Optimalizace stanovení železa v pivu

Při měření odplyněného piva bez další úpravy citlivost měření klesla a následující měření vodných i jiných roztoků neposkytovalo odezvu. To ukazuje na fakt, že se v pivu vyskytují látky, které mění vlastnosti povrchu grafitové kyvety.

Jako možné rušivé látky byly vytipovány maltosa a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , neboť se v pivu vyskytují ve významných koncentracích. V tabulce 5 jsou koncentrace železa, které byly stanovovány ve srovnávacích roztocích a vodných roztocích standardu o koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$  s přidavkem možné rušivé látky. Po změření každé z těchto látek byl vždy změřen srovnávací roztok o koncentraci 50  $\mu\text{g/l}$  pro kontrolu citlivosti grafitové kyvety. 0,5 % roztok maltosy nevykazoval významné rušivé vlivy při samotném stanovení standardního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$  a neměl dopad ani na následující stanovení dalších vzorků. V případě 0,02% roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se koncentrace standardu snížila více než o třetinu, ale na stanovení následujících vzorků tato sloučenina neměla vliv.

Tab 5 Vliv přidavku maltosy a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na stanovení koncentrace železa

Měření	Referenční $c^* \cdot 10^6$ $\text{g/dm}^{-3}$	přídavek	Naměřená $c^* \cdot 10^6$ $\text{g/dm}^{-3}$	RSD %
1	100	-	108,21	6,3
2	100	maltosa	99,11	1,1
3	50	-	55,27	5,0
4	100	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	61,72	13,7
5	50	-	48,24	1,9

\*průměrné hodnoty (n=6)

Dalším krokem bylo nalézt způsob, jak nežádoucí efekty eliminovat. Pro odstranění interferencí byly testovány následující vlivy: vliv ředění, vliv kalibrační metody a vliv úpravy vzorku před měřením.

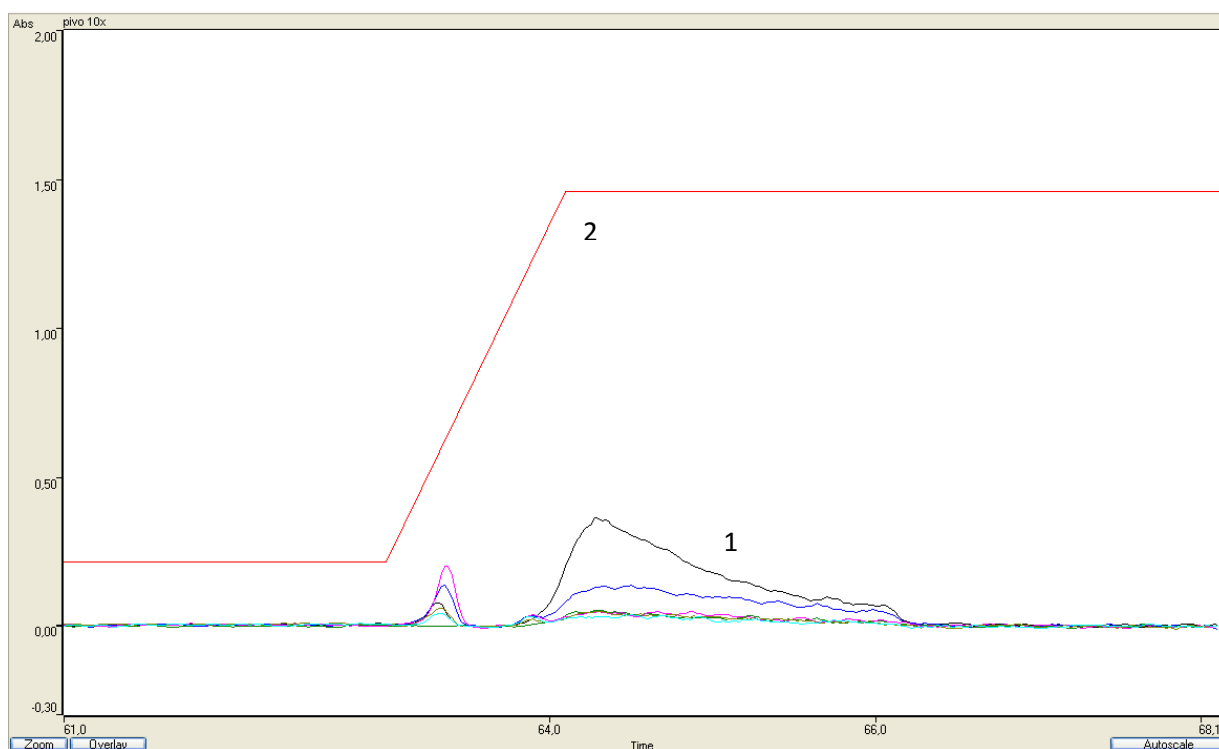
### 4.2.1 Ředění

Pro stanovení obsahu železa v pivu byly zvoleny tři úrovně ředění piva: 2x, 5x a 10x. Při opakovaném měření (n=6) koncentrace železa jednoho vzorku piva měly jednotlivé odezvy klesající tendenci (tabulka 6). Obr 4 ukazuje závislost absorbance na čase u vzorku 10x

zředěného piva. Ve srovnání s obr 5 znázorňující závislost absorpance vodného standardního roztoku železa o koncentraci 50 µg/l na čase je křivka značně rozmytá a kromě píku železa se objevuje i další pík. Po jednorázovém měření vzorku piva citlivost měření klesla tak, že bylo nutné vyměnit grafitovou celu.

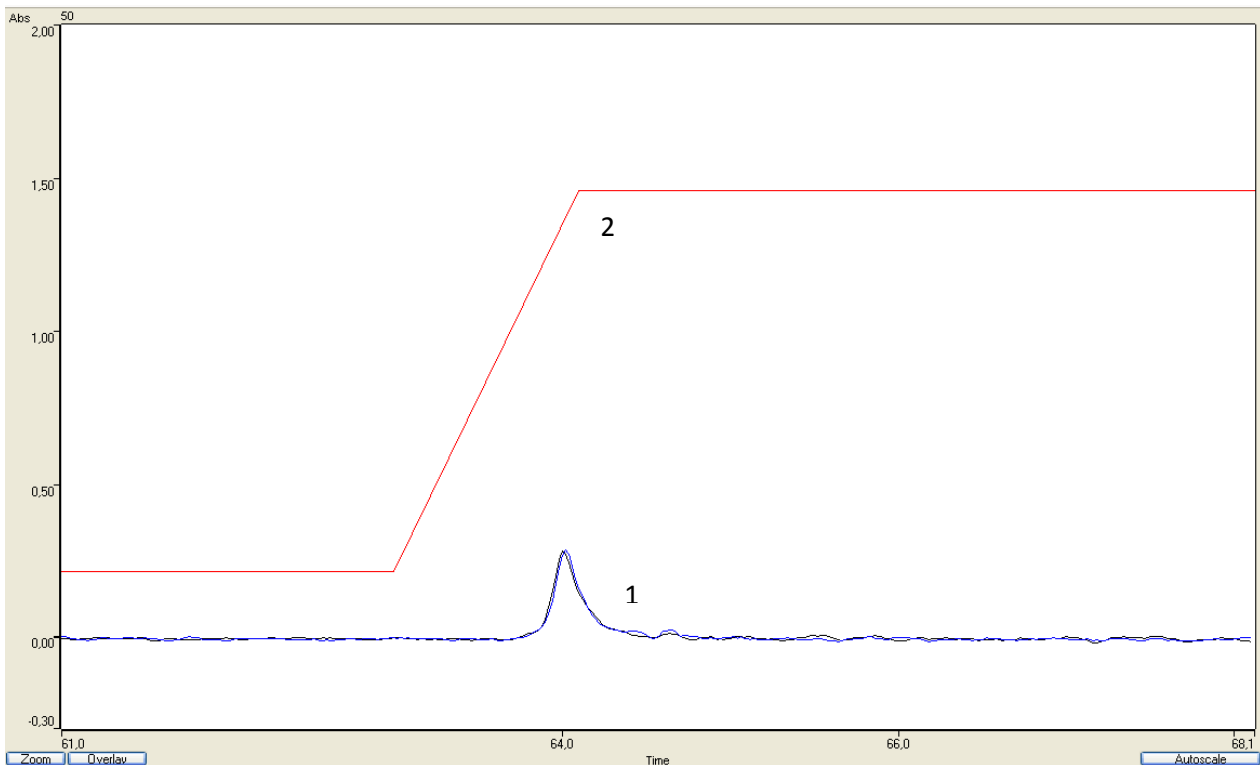
Tab 6 Jednotlivé naměřené hodnoty absorpance v 10x zředěném pivu

Měření	A
1	0,3117
2	0,1508
3	0,0870
4	0,0098
5	0,0029
6	-0,0076



Obr 4 Závislost absorpance 10x zředěného piva na čase (interval mezi 61,0 - 68,1 s)  
 – klesající tendence jednotlivých naměřených absorpance vzorku piva – křivka 1  
 Teplotní gradient (700 - 2300 °C) – křivka 2

Zdroj: SW SpetrAA



Obr 5 Závislost absorbance standardního roztoku železa ( $c(\text{Fe}) = 50 \mu\text{g/l}$ ) na čase (interval 61,0 - 68,1 s) – křivka 1  
Teplotní gradient (700 - 2300 °C) – křivka 2

Zdroj: SW SpectrAA

Obdobný trend byl sledován v případě 2x a 5x zředěného vzorku piva (data nejsou uvedena). Jelikož u desetinásobného ředění piva se interference projevovaly, bylo zvoleno dvacetinásobné zředění. Ani to ovšem nestačilo na odstranění matričních efektů (data nejsou uvedena). Proto bylo nutné hledat jinou metodu pro odstranění rušivých vlivů.

## 4.2.2 Metoda standardního přídávku

Metoda kalibrační křivky je vhodná pro vzorky, u kterých lze zanedbat vlivy matrice. U vzorků, u nichž jsou vlivy matrice výrazné, je možné stanovit koncentraci analytu metodou standardního přídávku. K 10  $\mu\text{l}$  vzorku 10x zředěného bylo přidáno přesné množství standardního roztoku o koncentraci 50  $\mu\text{g/l}$  pomocí automatického dávkovače. U vzorku piva naměřené absorbance a tedy i koncentrace železa tohoto vzorku měly stejný sestupný charakter jako v předchozím případě. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. Opět byla nutná její výměna.

Tab 7 Jednotlivé absorbance naměřené metodou standardního přídatku v 10x zředěném pivu

Měření	A
1	0,1302
2	0,0466
3	0,0247
4	0,0209
5	0,0106
6	0,0058

### 4.2.3 Odstranění rušivé matrice

Další možností bylo odstranit ze vzorku piva složky, které svými rušivými vlivy ovlivňují stanovení nejen samotného vzorku piva, ale i vzorků následujících a kvůli nimž bylo nutné měnit grafitovou kyvetu. Pivo bylo přečištěno přes kolonku naplněnou Florisilem. Florisil je pevná granulovitá pórovitá látka na bázi oxidu křemičitého. Používá se jako adsorbent pro polární látky v nepolárních matricích. Tento adsorbent lze využít i jako stacionární fázi v chromatografických kolonách. Měřením bylo zjištěno, že před tím, než se použije Florisil pro odstranění rušivých látek, je nutné přečistit samotný adsorbent, protože jinak může být obsah železa ve vzorku piva navýšen železem obsaženým v nečistotách ve Florisilu. V tabulce 8 jsou naměřené koncentrace železa ve vzorcích piva 10x a 5x zředěných. Z těchto vzorků byly odstraněny interferenty pomocí nepřečištěného Florisilu. Tyto hodnoty lze porovnat s hodnotami koncentrací železa naměřené ve 2x zředěném vzorku piva zbaveného rušivých látek Florisilem přečištěným 1% kyselinou dusičnou. Ředění 1:1 bylo zvoleno kvůli menšímu projevu případných zbylých nečistot z adsorbentu v koncentrovanějším roztoku železa v pivu. Použitím Florisilu se podařilo odstranit nežádoucí efekty, které způsobovaly znehodnocení grafitové kyvety, a podařilo se získat konstantní hodnotu signálu a došlo ke zlepšení RSD (tabulka 8).

Tab 8 Měření koncentrací železa v přečištěném pivu

vzorek	ředění	adsorbent	$c^* \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	RSD %
pivo	10x	Florisil	430,14	34,6
pivo	5x	Florisil	99,27	51,4
pivo	2x	čistý Florisil	41,49	14,5

\*průměrné hodnoty (n=6)

## 4.3 Validace

### 4.3.1 Správnost

V tabulce 9 jsou naměřené hodnoty koncentrace železa ve třech sadách validačních roztoků pro ověření správnosti metody. Všechny naměřené hodnoty se od skutečných koncentrací železa neliší o více než 15 %. Pro stanovování analytu ve stopových množstvích je patnáctiprocentní chyba přijatelná.

Tab 9 Naměřené hodnoty koncentrace železa v porovnání s referenčními hodnotami

referenční $c^* \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	naměřená $c^* \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	RSD %	Správnost %
25	23,0	2,0	92,3
25	22,2	4,4	89,0
25	26,9	1,1	92,9
50	44,8	4,3	89,7
50	46,6	1,3	93,3
50	43,7	1,9	87,6
100	89,2	5,4	89,2
100	87,2	1,9	87,2
100	85,7	2,2	85,7

\*průměrná hodnota (n=6)



### 4.3.2 Stanovení LOD a LOQ (srovnání ETAAS a FAAS)

Pro stanovení LOD a LOQ byly opakovaně desetkrát měřeny roztoky slepého vzorku. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10 společně s průměrnou hodnotou výsledné koncentrace a směrodatné odchylky pro metodu ETAAS a FAAS.

Vypočtené hodnoty meze detekce (LOD, limit of detection) a meze stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification) jsou uvedeny v tabulce 11.

Linearita nebyla stanovována ani u jedné metody, protože při měření FAAS je kalibrační křivka železa zakřivená. Při vyhodnocování je naměřená kalibrace SW automaticky prokládána křivkou a tím je zakřivení kompenzováno.

Tab 10 Porovnání ETAAS a FAAS metod (průměr a směrodatné odchylky)

Číslo měření	Slepý vzorek	Slepý vzorek
	ETAAS $c \cdot 10^6$ $\text{g/dm}^{-3}$	FAAS $c \cdot 10^6$ $\text{g/dm}^{-3}$
1	0,251	2,0
2	0,588	0,6
3	0,196	2,3
4	0,354	2,9
5	0,978	1,9
6	0,199	-0,8
7	0,367	1,7
8	0,502	2,0
9	0,417	-0,9
10	0,386	0,2
Průměr	<b>0,424</b>	<b>1,2</b>
SD	<b>0,231</b>	<b>1,3</b>

\*průměrné hodnoty (n=6)

Hodnoty metodou FAAS byly získány z validačního protokolu VÚPS

Tab 11 Porovnání parametrů ETAAS a FAAS metod

metoda	SD $c \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	LOD $c \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>	LOQ $c \cdot 10^6$ g/dm <sup>-3</sup>
ETAAS	0,23	0,69	2,31
FAAS	1,3	4,0	13

Hodnoty FAAS byly získány z validačního protokolu VÚPS

Mez detekce pro bezplamenovou metodu byla stanovena na 0,69 µg/l a mez stanovitelnosti byla stanovena na 2,31 µg/l. Tyto hodnoty jsou v porovnání s limitem detekce a kvantifikace u plamenové metody téměř 6x nižší.

V závěrečném experimentu byl na stejném vzorku piva porovnán vliv přečištění Florisilem na stanovení koncentrace železa v pivu a současně byly porovnány metody FAAS a ETAAS (tabulka 12). V případě použití plamenové metody byly výsledné koncentrace železa stejné u přečištěného i nepřečištěného piva. Hodnota koncentrace železa v přečištěném pivu změřeném metodou ETAAS byla zhruba o třetinu nižší v porovnání s hodnotami naměřenými metodou FAAS. To by mohlo být způsobeno přítomností fosfátů v pivu (viz. tabulka 5).

Tab 12 Srovnání koncentrací železa v pivu různými postupy

postup	$c^* \cdot 10^{-6}$ g/l	RSD %
A	60	1,5
B	60	14,6
C	41,49	28,5

A – původní pivo odplyněné, 2x zředěné, změřeno metodou FAAS

B – odplyněné pivo, 2x zředěné, přečištěno Florisilem, změřeno metodou FAAS

C – odplyněné pivo, 2x zředěné, přečištěno Florisilem, změřeno metodou ETAAS

## 5 DISKUZE

Při stanovování koncentrace železa plamenovou AAS je mez detekce 0,0036 mg/l a mez stanovitelnosti 0,012 mg/l. Cílem bylo těchto hodnot dosáhnout i s použitím bezplamenové techniky nebo tyto parametry zlepšit, především citlivost, neboť při měření koncentrace železa plamenovou metodou se u řady světlých piv pohybujeme na hraně limitu detekce.

U metod stanovující stopová množství analytu je vždy problémem kontaminace. Při optimalizaci bezplamenové metody bylo zjištěno vysoké množství železa v prostředí, což se projevilo jako vysoké absorbance u slepých vzorků. Bylo nutné zavést taková opatření, která by tuto kontaminaci omezovala. Byla zvolena méně citlivá rezonanční čára, kyvety na vzorky byly máčeny minimálně na 12 hodin do 1% kyseliny dusičné, byl zakryt větrací vývod nad bezplamenovým atomizátorem a po dobu měření byl přes automatický dávkovač a stojan na vzorky umístěn ochranný poklop. Při neustálém dodržování těchto opatření kontaminace poklesla na úroveň neovlivňující měření.

Dalším problémem byly rušivé látky v pivu, které způsobovaly poškození grafitové kyvety do té míry, že musela být často měněna. Podle R. Svendsen a W. Lund<sup>16</sup> lze tento jev potlačit dostatečným zředěním piva, v jejich případě 1:9. Naše výsledky toto nepotvrdily, naopak došlo k poklesu absorbance i u dvacetinásobně naředěného vzorku piva.

Dalším postupem bylo odstranění interferentů pomocí sorbentu Florisil. Pro separaci interferenčních látek od analytu lze také využít chromatografii s výměnou iontů. R. Svendsen a W. Lund<sup>16</sup> využívají pro stanovení iontů v pivu iontově výměnnou chromatografii separaci iontů kovů včetně železa podle toho, v jaké sloučenině jsou kovy navázané. Před samotnou separací stanovují celkové množství kovu v pivu bezplamenovou AAS. Po extrakci přes iontoměniče (paralelně přes katex a anex), stanovili sumu těchto látek, která dosahovala 81 % celkového množství železa stanovené před separací.

Florisil má oproti iontoměniči tu výhodu, že není náchylný na vysychání a nemusí se před použitím aktivovat. Při separaci přes iontoměniče se navážou kladně nebo záporně nabitě sloučeniny obsahující železo, může tedy docházet ke ztrátám u sloučenin železa se záporným nábojem v případě separace přes katex, u sloučenin železa s kladným nábojem v případě separace přes anex nebo u nenabitých sloučenin železa v případě separace přes katex i anex.

Snížená výtěžnost metody ETAAS oproti metodě FAAS (tabulka 12) může být způsobena i interferencí fosfátů vyskytujících se v pivu. Například při stanovování arsenu v pivu metodou ETAAS se využívají k odstranění rušivých vlivů fosfátů molybdenan amonný, který

vytvoří sraženinu, jenž tyto interference nezpůsobuje. Tato možnost již není předmětem této práce, bude testována v rámci další práce.

Při stanovování kovů v pivu se v některých metodách využívá rozklad organické matrice oxidačním činidlem, nejčastěji koncentrovanou minerální kyselinou v kombinaci s peroxidem vodíku<sup>10</sup>. I. Matsushige a Elisabeth de Oliveira<sup>14</sup> tento rozklad prováděli při 90 - 95 °C po dobu třech hodin. Méně časově náročný postup zvolili Viñas et al.<sup>17</sup>, kteří k mineralizaci matrice vzorků piva před měřením použili mikrovlnné rozkladné zařízení.

Dalším řešením odstranění nežádoucích vlivů při stanovení železa by mohlo být zvýšení teploty mineralizace. V manuálu pro přístroj Varian SpektrAA<sup>15</sup> je uvedena maximální teplota žíhání pro stanovení železa 800 °C. R. Svendsen a W. Lund<sup>16</sup> stanovovali celkové množství železa při mineralizační teplotě pro rozklad matrice 900 °C po dobu 20 sekund, ovšem na přístroji Perkin - Elmer 5000 Zeeman.

## 6 ZÁVĚR

Podařilo se optimalizovat metodu pro stanovení stopového množství železa ve vodných standardních roztocích pomocí bezplamenného atomové absorpční spektrometrie. Mez detekce bezplamenové AAS byla stanovena na 0,69  $\mu\text{g/l}$  železa, což je hodnota téměř šestkrát nižší než hodnota meze detekce u plamenové AAS. Při porovnání bezplamenové a plamenové atomové absorpční spektrometrie se musí brát v úvahu, že měření pomocí jednotlivých metod bylo prováděno při různých vlnových délkách a pozadí bylo měřeno pouze u plamenové metody. Za daných podmínek a časové dotace k provádění experimentu se nepodařilo metodu zcela optimalizovat pro stanovování železa v pivu.

# Zdroje

- 1 EBC Analysis Committee: *European Brewery Convention Analytica – EBC*. 5 vydání, vyd. Nürnberg, Fachverlag Hans Carl, 2010
- 2 Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2 vydání, vyd. Ostrava, Pavel Klouda, 2003
- 3 Hejtmánek, M.; Koliňová, D.; Musil, J.; Rubeška, I.; Sychra, V.: *Atomová absorpční spektrometrie*. vyd. Praha, Ediční středisko VŠCHT, 1979
- 4 Komárek, J.: *Atomová absorpční spektrometrie*. vyd. Brno, Masarykova univerzita v Brně, 2000
- 5 Rychlovský P.: *Spektrální analytické metody*. Vyd. Praha, Univerzita Karlova v Praze
- 6 Dlouhá historie piva. In: *European Food Information Council* [online]. 2002 [cit. 2014-02 27]. Dostupné z: <http://www.eufic.org/article/cs/page/FTARCHIVE/artid/piva/>
- 7 Alkohol a zdraví ve světle současných vědeckých výzkumů. TISKOVÁ ZPRÁVA ČSPS. *České pivo* [online]. Praha, 2008 [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: <http://www.ceske-pivo.cz/alkohol-zdravi-ve-svetle-soucasnych-vedeckych-vyzkumu>
- 8 Corrao, G.; Rubbiati, L.; Bagnardi, V.; Zambon, A.; Poikalainen, K.: Alcohol and coronary heart disease. *Addiction* **95**:10, 1505-1523 (2000)
- 9 Sancho, D.; Blanco, C.A.; Caballero, I.; Pascual, A.: Free iron in pale, dark and alcohol-free commercial lager beer. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**:6, 1142-1147 (2011)
- 10 Pohl, P.: Determination and fractionation of metals in beer a review. *Food Additives and Contaminants* **25**:6, 693-703 (2008)
- 11 Čejka, P.; Kellner, V.; Čulík, J.; Jurková, M.; Horák, T.; Raktoš, M.: Obsah a význam kovů v křemelině. *Kvasný průmysl* **50**:4, 97-101 (2004)
- 12 Matsushige, I.; de Oliveira, E.: Determination of trace elements in Brazilian beers by ICP-AES, *Food Chemistry* **47**, 205-207 (1993)
- 13 Vázquez Diaz, M. E.; Jiménez Sánchez, J. C.; Callejón Mochón, M.; Guiraúm Pézer, A.: Differential-pulse Polarographic Determination of Iron in Acids, Waters, Fruit Juices and Wines. *Analyst* **119**, 1571-1574 (1994)
- 14 Krausová, I.; Kucera J.; Dostalek P.; Potesil V.: Analysis of elements present in beers and brewing waters by neutron activation analysis. *Analysis of elements present in beers and brewing waters by neutron activation analysis* [online]. 2011, roč. 43, č. 29 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: [http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:43063198](http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:43063198)
- 15 Agilent Technologies, Inc.: *Analytical Method for Graphite Tube Atomizers*. 7. vydání, Vyd. Austalie, Agilent Technologies, Inc. 2007
- 16 Svendsen, R.; Lund, W.: Speciation of Cu, Fe and Mn in beer using ion exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* **125** 1933-1937 (2000)

17 Viñas et al.: Determination of Cadmium, Aluminium, and Copper in Beer and Products Used in Its Manufacture by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of AOAC International* **85**:3, 736-743 (2002)