

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Aneta Fajgarová

STOPOVÁ SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU V NÁPOJÍCH
Trace speciation analysis of arsenic in beverages

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Praha 2016

Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci s Oddělením stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. jako součást výzkumného záměru RVO: 68081715 a s podporou programu MŠMT Kontakt II, č. projektu LH 15174.

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 18. srpna 2016

.....
Aneta Fajgarová

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce bylo stanovení toxikologicky významných specií arsenu ve vybraných nápojích (pivo, víno a jablečné šťávy) s minimální úpravou vzorků, pomocí selektivního generování hydridů, jejich záchytu vymrazováním v kapalném dusíku a detekcí pomocí atomové absorpční spektrometrie.

Ve všech vzorcích byl nalezen pouze anorganický arsen, obsahy methyl substituovaných specií byly pod mezí detekce. Zvolená metoda je vhodná pro speciální analýzu arsenu v nápojích. Meze detekce jsou dostatečně nízké a stanovení není ovlivněno matricí vzorku. Výsledky byly také v dobré shodě se stanovením celkového obsahu arsenu po mineralizaci metodou ICP-MS.

Jelikož není určen žádný maximální obsah arsenu v nápojích, stanovené koncentrace byly porovnány s limitem pro pitnou vodu ($10 \mu\text{g l}^{-1}$). Všechny vzorky limit splnily, až na jeden vzorek jablečné šťávy, který limit přesáhl asi dvojnásobně.

Klíčová slova

speciální analýza, atomová absorpční spektrometrie, generování hydridů, arsen, nápoje

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to determine the toxicologically important arsenic species in beverages (beer, wine and apple juice) with minimal sample preparation.

Determination of arsenic species was performed by selective hydride generation of arsenic hydrides with cryogenic collection under liquid nitrogen and detection by atomic absorption spectrometry.

In all the samples only inorganic arsenic was found, methyl substituted species were below the limit of detection. The method is suitable for speciation analysis of arsenic in beverages. Detection limits are low enough, the determination is not influenced by the sample matrix. The results were also in good agreement with the determination of total arsenic after mineralization by ICP-MS.

Since there is no specified maximum arsenic content in beverages, measured concentrations were compared with the limit for drinking water ($10 \mu\text{g l}^{-1}$). All samples were under this limit, except for one sample of apple juice, which arsenic content was about twice higher.

Key words

speciation analysis, atomic absorption spectrometry, hydride generation, arsenic, beverages

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky k bakalářské práci.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. za odborné konzultace a všestrannou pomoc.

Velké poděkování patří Josefu Fajgarovi, mé rodině a kamarádům za podporu při studiu.

Obsah

Seznam zkratk	7
1 Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Atomová absorpční spektrometrie	9
2.2 Chemické generování hydridů	10
2.3 Arsen	10
2.3.1 Toxikologické vlastnosti arsenu.....	10
2.3.2 Arsen v potravinách	11
3 Experimentální část.....	12
3.1 Přístroje a pomůcky.....	12
3.2 Chemikálie	12
3.3 Standardní roztoky	12
3.4 Pracovní roztoky	13
3.5 Analyzované vzorky a jejich příprava.....	13
3.5.1 Vzorky piva.....	13
3.5.2 Vzorky červenéhovína.....	14
3.5.3 Vzorky jablečných šťáv.....	14
3.6 Stanovení ICP-MS.....	14
3.7 Použitá aparatura	15
3.8 Postup měření	16
3.9 Zpracování naměřených dat	17
4 Výsledky.....	18
4.1 Stanovení arsenu v pivě.....	18
4.2 Stanovení arsenu ve víně.....	20
4.3 Stanovení arsenu v jablečných šťávách.....	23
4.4 Srovnání s ICP - MS.....	25
5 Závěr.....	27
6 Seznam použité literatury	28

Seznam zkratk a symbolů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
HG	generování hydridů
CT	kryogenní past (cryotrapping)
HG-AAS	atomová absorpční spektrometrie s generováním hydridů
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iAs	anorganický arsen (arsenitan + arseničnan)
MAs	monomethylarsen (monomethylarsenitan + monomethylarseničnan)
DMAs	dimethylarsen (dimethylarsenitan + dimethylarseničnan)
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
c	koncentrace
Mr	relativní molekulová hmotnost
n	počet měření

1 Úvod

Velké množství prací popisuje stanovení arsenu v životním prostředí. Avšak část, která se zabývá potravinami je stejně důležitá. Zájem je o stanovení obsahu anorganického arsenu v potravinách, zejména rýži, tam je nedávný důkaz, že koncentrace může být vysoká, dále pak zeleniny, ovoce a ovocné šťávy, pivo a víno, mouka, kukuřice a pšenice.

Anorganický arsen je považován za nejtoxičtější formu arsenu v potravinách a krmivech a je klasifikován jako karcinogen. Organické formy arsenu jsou obecně méně toxické, nebo dokonce netoxické, např. většina arsenu v rybách se vyskytuje ve formě netoxického arsenobetainu.

Obtíž s konkrétní analýzou může spočívat ve fázi přípravy vzorku, např. účinnost extrakce, obsah alkoholu v matrici, nerozpuštěné částice nebo pění vzorku při analýze. Technika generování hydridů (HG), jejich zachytu vymrazováním v kapalném dusíku s je dnes dobře známá. Hlavní výhody jsou separace analytu od matrice, snížení možných interferencí a dostatečná citlivost. ICP-MS má lepší dynamický rozsah, citlivost lepší o několik řádů, možnost stanovovat více prvků současně. Nevýhody jsou naopak vyšší pořizovací a provozní náklady a vliv matrice vzorku vyžaduje mineralizaci.

Cílem práce je ověřit vhodnost jednoduché metody založené na generování hydridů a vymrazování s detekcí AAS pro speciální analýzu arsenu ve vzorcích nápojů – piva, vína a jablečných šťáv.

2 Teoretická část

2.1 Atomová absorpční spektroskopie

Principem atomové absorpční spektrometrie je absorpce elektromagnetického záření vlnové délky specifické pro daný analyt. Pokud se zvýší množství volných atomů analytu v pozorovaném objemu, dojde k vyšší absorpci. Měřením absorbance záření můžeme provést kvantitativní stanovení měřeného analytu.

Vzorku musí být dodána dostatečná energie, aby došlo k atomizaci na volné atomy. Zvolením správných podmínek atomizace zůstanou atomy v základním stavu, a tedy jsou schopné absorbovat světlo dané vlnové délky produkované výbojkou.

Rychlost a přesnost stanovení atomové absorpční spektrometrie z ní činí jednu z nejoblíbenějších metod pro stanovení kovů¹.

Základní konstrukční prvky atomového absorpčního spektrofotometru jsou *zdroj záření*, který emituje záření o vlnové délce, kterou stanovované atomy samy absorbují, *absorpční prostředí*, kde vznikají volné atomy analytu, *monochromátor* k izolaci záření vhodné vlnové délky primárního záření a *detektor*, který mění proud fotonů (zářivý tok) na měřitelný elektrický signál².

Atom absorbuje záření určité vlnové délky, proto je třeba použít zdroj, ze kterého vychází pouze specifické vlnové délky, které stanovovaný atom absorbuje. Nejčastějšími primárními zdroji záření jsou výbojky s dutou katodou a bezelektrodové výbojky³.

Bezelektrodové výbojky jsou skleněné baňky plněné inertním plynem s vhodným množstvím kovu nebo soli prvku, který je stanovován. Baňka je umístěna v cívce, která je součástí radiofrekvenčního generátoru, který dodává energii k vytvoření stabilního výboje. Produkováno je charakteristické emisní spektrum daného kovu, které je intenzitou až o řád vyšší než u výbojky s dutou katodou⁴.

Absorpční prostředí je realizováno atomizátorem, který převádí stanovované prvky z roztoku vzorku na atomy plynu v základním stavu. Atomizaci je možné provést v plamenu, elektrotermicky nebo v křemenných atomizátorech při technice generování těkavých sloučenin³.

2.2 Chemické generování hydridů

Podstatou je převedení analyzovaného prvku na jeho těkavý hydrid, který se přivede do proudu inertního plynu a následně dochází k atomizaci. Výhodou je separace analytu od matrice a to vede ke zvýšení citlivosti a k omezení možných interferencí⁵.

Jako redukční činidlo se prakticky výhradně používá tetrahydridoboritan sodný⁶.

Pro stanovení celkového množství As ve vzorku je vhodné provést předredukci pětimocných forem As na jejich trojmocné formy vhodným redukčním činidlem, jako je L-cystein. Pětimocné formy iAs ve vzorku zreagují s L-cysteinem na trojmocné a spolu s trojmocnými formami přítomnými ve vzorku jsou vygenerovány v podobě arsenu⁷. Těkavé arsany jsou zachyceny ve vymrazovací trubici, poté jsou jednotlivé arsany při zahřívání odděleny a podle svého bodu varu postupně odcházejí do detektoru. Jako atomizátory se nejčastěji používají vyhřívané křemenné trubice, nebo jejich pokročilá verze- multiatomizátor⁸.

2.3 Arsen

Arsen je polokov, který se vyskytuje v různých organických a anorganických formách, obvykle jako pětimocný arsen (arzeničnan, iAs^V), trojmocný arsen (arzenitan, iAs^{III}) a jednotlivé methylované formy arsenu (monomethylarsen (MMA), dimethylarsen (DMA), trimethylarsen (TMA)). V přírodě je arsen v nízkých koncentracích běžnou součástí hornin, půd a vod. Biologickou aktivitou a zvětráváním se arsen uvolňuje z hornin a půdy do podzemních a povrchových vod. Kontaminace pitné vody arsenem je celosvětový problém. V současné době v ČR neexistují žádné maximální limity pro arsen v potravinách. Pro pitnou vodu je nejvyšší dovolená koncentrace stanovena Světovou zdravotnickou organizací (WHO) na $10 \mu g l^{-1}$. Lidská činnost také přispěla ke zvýšení hladiny arsenu v životním prostředí. Například těžba a tavení kovů, nebo v zemědělství při použití arsenu jako součást hnojiv nebo prostředků na ochranu dřeva. V současné době není v EU dovoleno používat pesticidy, které obsahují arsen⁹.

2.3.1 Toxikologické vlastnosti arsenu

Sloučeniny arsenu jsou vysoce jedovaté, a to jak akutně tak chronicky¹⁰. Mezi příznaky akutní otravy arsenem se řadí neurologické problémy, zvracení, průjem a bolesti břicha¹¹. Některé jsou prokázány mutageny, karcinogeny a teratogeny. Za netoxickou sloučeninu je považován arsenobetain, který je hojně přítomen v mořských plodech a

rybách¹⁰, v potravinách pozemského původu převládá anorganická forma arsenu (iAs^V a iAs^{III}) a jednotlivé methylované druhy arsenu.

Obecně jsou anorganické sloučeniny arsenu toxičtější než organické, dále arsenité specie jsou považovány za toxičtější než arzeničné⁹.

2.3.2. Arsen v potravinách

Arsen je prvek, jehož koncentrace musí být sledována. Světová zdravotnická organizace doporučila tolerovatelný týdenní příjem anorganického arsenu 0,015 mg kg⁻¹ tělesné hmotnosti. Pro arsen byly bezpečnostní limity stanoveny pro anorganické formy. Podobně, pro rtuť byl stanoven bezpečnostní limit pro organickou formu (methylrtuť)¹². Zjištění koncentrace potenciálně toxických prvků a sloučenin v potravinách je ve veřejném zájmu a tak výrobci potravin vyžadují rychlé, spolehlivé metody pro přesné určení koncentrace těchto kontaminujících látek v potravinách a nápojích¹³. Ve většině zemí včetně EU a ČR je celková koncentrace arsenu sledována pouze v pitné vodě (10 µg l⁻¹). Shrnutí legislativních limitů pro obsah arsenu v potravinách bylo nedávno publikováno v souhrnném článku¹⁴. Obsah arsenu ve víně nedávno získal více pozornosti. Koncentraci arsenu ve víně může ovlivnit mnoho faktorů, například typ půdy, klimatické podmínky, používání insekticidů a výrobní procesy. Bylo publikováno, že výrobky amerických vinařství obsahovaly vyšší koncentrace arsenu¹⁵. Pro víno je v platnosti předpis International Organisation of Vine and Wine omezující maximální obsah As na 200 µg l⁻¹ (cit. ¹⁶), pro pivo je doporučená koncentrace do 200 µg l⁻¹ (cit. ¹⁷). Navrhovaný předpis americké Food and Drug Administration pro anorganický arsen v jablečných šťávách je 10 µg l⁻¹ (cit. ¹⁶). V ČR byl maximální přípustný obsah arsenu v ovoci a ovocných šťávách stanoven vyhláškou 305/2004 Sb na 0,2 mg kg⁻¹, tato vyhláška ovšem byla zrušena v roce 2012.

Pro speciální analýzu arsenu se často používají separační metody s velmi citlivou prvkově specifickou detekcí, nejčastěji pomocí ICP-MS. Hojně využívaná separační metoda pro speciální analýzu arsenu je iontově výměnná a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)¹⁸. U některých vzorků je nutné provést extrakci, kterou doprovází nebezpečí nedokonalé účinnosti¹², nebo dokonalou filtraci vzorku, aby nedošlo k ucpaní kolony¹³. Další možností speciální analýzy jsou metody založené na generování hydridů. Většina analýz s generováním hydridů je spojována s atomovou absorpční nebo atomovou fluorescenční spektrometrií, zatímco atomová emisní spektroskopie (AES) je využívána v menší míře¹⁶.

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a pomůcky

- Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 800, Perkin Elmer (USA)
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7700x, Agilent Technologies (USA)
- Analytické váhy ABT 220-5DMs přesností 0,01 mg (Kern, Německo)
- Předvážky 600-2r s přesností 0,01 g (Kern, Německo)
- Automatické pipety (Biohit, Finsko)
- Laboratorní zdroj napětí (Electro-Automatik GmbH & Co. KG, Německo)
- Průtokoměry (Omega Engineering, USA)
- Mineralizační zařízení UltraWAVE (Milestone, Itálie)

3.2 Chemikálie

- deionizovaná voda získaná pomocí zařízení Ultrapur (Watrex, USA)
- L-cystein hydrochlorid monohydrát ($C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$; Mr = 176; Merck, Německo)
- hydroxid draselný, chemicky čistý (KOH; Mr = 56,11; Lachner, ČR)
- hydroxid sodný, chemicky čistý (NaOH; Mr = 39,99; Lachner, ČR)
- tetrahydridoboritan sodný, tabletovaný po 1 g, ($NaBH_4$, Mr = 37,83; Sigma-Aldrich, Německo)
- Trizma® hydrochlorid ($NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$; Mr = 157,6; Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina dusičná, 65% (HNO_3 ; Mr = 63,01; Merck, Německo)
- Triton ® X 100 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Antifoam B (Sigma-Aldrich, Německo)
- vodík, 99,95 %, (SAID, ČR)
- helium, 99,998 %, (SAID, ČR)

3.3 Standardní roztoky

- Zásobní roztok iAs o koncentraci 1000 mg l^{-1} byl připraven rozpuštěním oxidu arsenitého (As_2O_3 ; Mr = 197,84; Lachema, ČR) v 10% hydroxidu draselném
- Zásobní roztok MAs o koncentraci 1000 mg l^{-1} byl připraven rozpuštěním hexahydrátu metylarseničnanu disodného ($Na_2CH_3AsO_3 \cdot 6 H_2O$; Mr = 291,99; Chem Service, USA) v deionizované vodě
- Zásobní roztok DMAs o koncentraci 1000 mg l^{-1} byl připraven z kyseliny

dimethylarseničné ($C_2H_7AsO_2$; $M_r = 137,99$; Stream Chemicals, USA) v deionizované vodě.

Tyto zásobní standardní roztoky byly dále přesně zředěny deionizovanou vodou na koncentraci 10 mg l^{-1} . Z těchto zásobních roztoků byl přesným ředěním deionizovanou vodou připraven směsný standard (iAs, MAs, DMAs) o koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. Ze směsného standardu byly ředěním 0,2% kyselinou dusičnou připraveny kalibrační standardy o koncentracích 0,5; 1 a $2 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. Roztoky byly připravovány každý den čerstvé.

3.4 Pracovní roztoky

- Tetrahydridoboritan sodný 1% (m/v) v 0,1% hydroxidu draselném (m/v). Roztok byl připravován denně čerstvý. Při měření vzorků piva byl do tohoto roztoku přidán Antifoam B (500 μl 10% (v/v) na 100 ml roztoku) proti pění.
- TRIS pufr o koncentraci 0,75 mol/l a $\text{pH} = 6$ upraveno pomocí 10% hydroxidu draselného (m/v).
- Roztok L-cysteinu 4% (m/v). U vzorků piva byl přidán Triton® X 100 (5 ml 10% (v/v) na 25 ml roztoku) a Antifoam B (2,5 ml 10% (v/v) na 25 ml roztoku). Roztok L-cysteinu byl připravován vždy čerstvý a byl používán jako předredukční činidlo.

Standardy a slepé vzorky s ním reagovaly v poměru 1:1 alespoň jednu hodinu před měřením.

- Roztok vnitřního standardu telluru o koncentraci $200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ pro ICP-MS, byl připraven zředěním 10 mg l^{-1} standardního roztoku telluru v 0,2% kyselině dusičné.

3.5 Analyzované vzorky a jejich příprava

3.5.1 Vzorky piva

- Velkopopovický Kozel Premium (ČR)
- Budweiser Budvar světlé výčepní (ČR)
- Tsingtao (Čína)
- Corona Extra (Mexiko)
- Gambrinus Original (ČR)

Vzorky piva byly nejdříve odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Roztok L-cysteinu (4%), kde byl přidán Triton® X 100 a Antifoam B, byl ještě zředěn

deionizovanou vodou v poměru 1:1. Vzorky byly smíchány s tímto naředěným roztokem L-cysteinu v poměru 1:4 a ponechány reagovat minimálně jednu hodinu.

3.5.2 Vzorky červeného vína

- Merlot 2014 (Bzenec – ČR)
- Modrý Portugal 2014 (Boršice – ČR)
- Cabernet Sauvignon 2014 (Chile)
- Shiraz Cabernet 2013 (Austrálie)
- Merlot 2014 (Kalifornie)
- Shiraz 2014 (Francie)
- Sangiovese a Cabernet Sauvignon 2014 (Itálie)

Vzorky vína byly naředěny 2% (m/v) roztokem L-cysteinu v poměru 1:9 a ponechány předredukci alespoň jednu hodinu.

3.5.3 Vzorky jablečných šťáv

- Relax – 100% jablečná šťáva
- Hello – 100% čerstvě vylisovaná jablečná šťáva
- Toma – 100% jablečná šťáva
- Hello – 100% jablečná šťáva
- Naše Bio – 100% jablečná šťáva s dužinou
- Pfanner – 100% jablečná šťáva
- Happy Day – 100% jablečná šťáva
- Sunny – 100% jablečná šťáva

Jablečné šťávy byly ředěny 2% (m/v) roztokem L-cysteinu v poměru 1:4 a ponechány předredukci alespoň jednu hodinu před měřením.

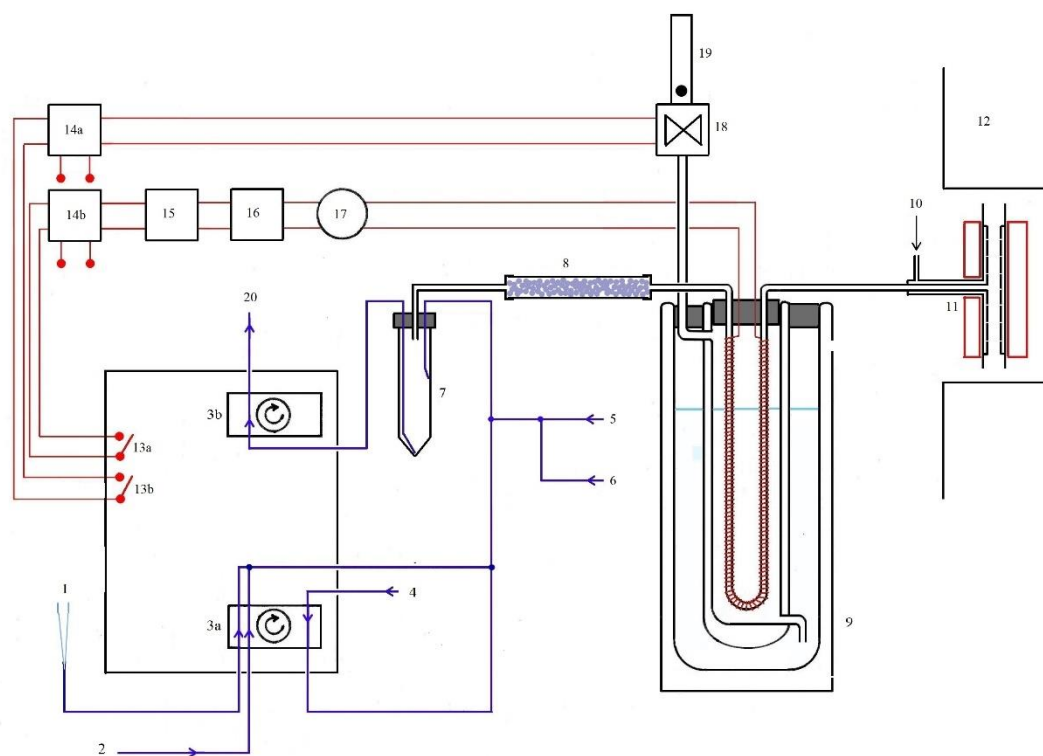
3.6 Stanovení ICP-MS po mineralizaci

Do křemenných zkumavek bylo přesně naváženo (pipetováno) asi 1,25 g vybraných vzorků, ke kterým bylo přidáno 2,5 ml koncentrované kyseliny dusičné (65%). Takto připravené vzorky byly následně umístěny do zařízení UltraWAVE. Zařízení bylo

natlakováno dusíkem na hodnotu 35,2 bar a následovalo postupné zahřívání. Po dobu dvaceti minut postupně na teplotu 200 °C, poté se deset minut držela teplota 200 °C a nakonec postupné chládnutí na teplotu 22 °C. Po skončení mineralizace byly vzorky kvantitativně převedeny do vialek a doplněny deionizovanou vodou na 25 ml. Stanovení bylo provedeno na ICP-MS spektrometru Agilent 7700x s heliovou kolizní celou. Průběh měření byl kontrolován kontinuálním přidáváním vnitřního standardu (Te 200 µg l⁻¹). Data byla zaznamenána pomocí software Agilent Mass Hunter. Dále byla exportována do programu MS Excel, kde byla zpracována.

3.7 Použitá aparatura

Aparatura pro generátor napojený na kryogenní past byla sestavena na základě předchozích prací^{8,19}. Schéma aparatury je uvedeno na obr. 3.1.



Obr. 3.1: Schéma použité aparatury HG-CT-AAS. 1 – zásobník na vzorek, 2 – přívod TRIS pufru, 3a,3b – peristaltické pumpy, 4 – přívod tetrahydridoboritanu sodného, 5 – přívod helia, 6 – přívod vodíku, 7 – separátor fází, 8 – sušící trubice s hydroxidem sodným, 9 – kryogenní past s kapalným dusíkem, 10 – přívod vzduchu, 11 – multiatomizátor, 12 – AAS, 13a,13b – spínače, 14a,14b – vypínače, 15 – autotransformátor, 16 – oddělovací transformátor, 17 – voltmetr, 18 – ventil pro řízení hladiny dusíku, 19 – rotametr, 20 – odpad

3.8 Postup měření

Vzorek byl dávkován pomocí automatické pipety do zásobníku (obrázek 3.1) a to tím způsobem, že 500 µl vzorku bylo nadávkováno do zásobníku, odkud bylo toto množství odčerpáno pomocí peristaltické pumpy do systému. Pro kvantitativní převedení analytu byl poté zásobník ještě propláchnut 500 µl deionizované vody. Vzorek se nejprve smíchal s TRIS pufrem o pH 6 a poté s roztokem tetrahydridoboritanu (redukční činidlo). Vzniklé plynné arsany byly odděleny od kapaliny v separátoru fází a přes sušící trubici naplněnou hydroxidem sodným putovaly do kryogenní pasti a dále do atomizátoru. Druhá peristaltická pumpa byla využita na odčerpání kapalné fáze ze separátoru. Kryogenní past byla složena z dlouhé křemenné U-trubice, která byla omotána odporovým drátem. U-trubice byla uzavřena ve skleněné dvouplášťové vakuované nádobě s vývody nahoře a dole a ponořena do kapalného dusíku v Dewarově nádobě. Horní ventil na ovládání hladiny kapalného dusíku byl řízený počítačem. Pokud byl ventil otevřen, kapalný dusík dosahoval nejvyšší hladiny a U-trubice byla chlazena. Po ukončení generování hydridů se tento ventil uzavře, kapalný dusík je vytlačen a zapne se postupný ohřev U-trubice napětím 25 V, které bylo regulováno pomocí laboratorního zdroje.

Parametry HG-CT-AAS pro samotná měření jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tab. 3.1: Nastavení HG-CT-AAS

Lampa	As bezelektrodová výbojka,
	390 mA
Korekce pozadí	Deuteriová
Teplota multiatimizátoru	900 °C
Průtok pracovních roztoků, ml/min	1
Průtok nosného He, ml/min	75
Průtok H ₂ , ml/min	15
Průtok vzduchu do multiatomizátoru, ml/min	35
Doba čtení, s	58

3.9 Zpracování dat

Data byla zaznamenána pomocí programu Perkin Elmer AAwinlab, dále exportována do programu MS Excel, kde byla integrována a dále zpracována. Byla provedena vždy minimálně dvě měření pro standardy a slepé vzorky a dvě měření vždy dvou paralelně připravených vzorků. U metody standardního přídávku byly měřeny tři hodnoty. Výsledky měření v této práci jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. U sestrojených grafů je znázorněn bod roven aritmetickému průměru a chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

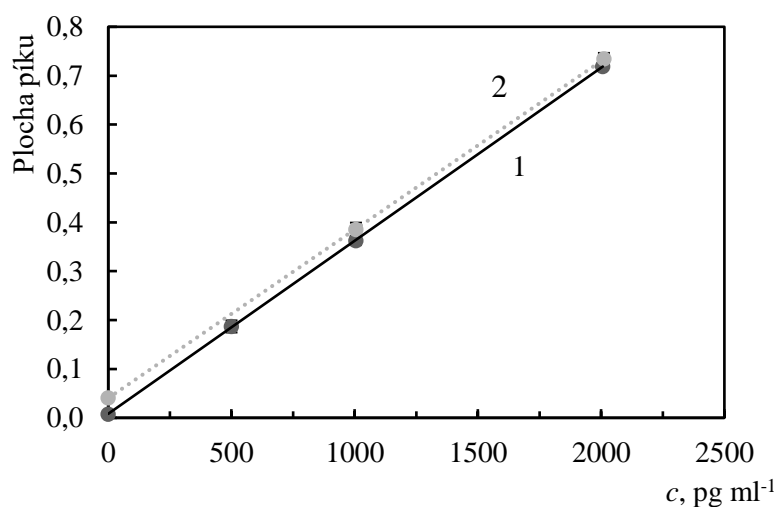
4 Výsledky

Metoda kalibrační křivky je vhodná pouze pro vzorky, u kterých lze zanedbat vliv matrice. U vzorků, u nichž jsou vlivy matrice výrazné, je možné stanovit koncentraci analytu metodou standardního přídávku.

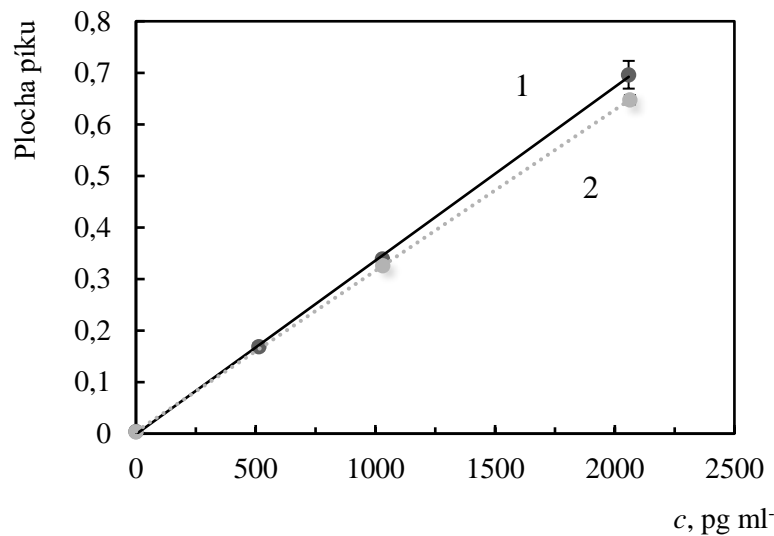
Pro stanovení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly opakovaně měřeny roztoky slepého vzorku ($n = 10$). Hodnoty LOD pro jednotlivé specie byly spočítány jako koncentrace odpovídající třem směrodatným odchylkám slepého vzorku a hodnoty LOQ jako koncentrace odpovídající deseti směrodatných odchylek slepého vzorku. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 4.1, 4.3, 4.5.

4.1 Stanovení arsenu v pivě

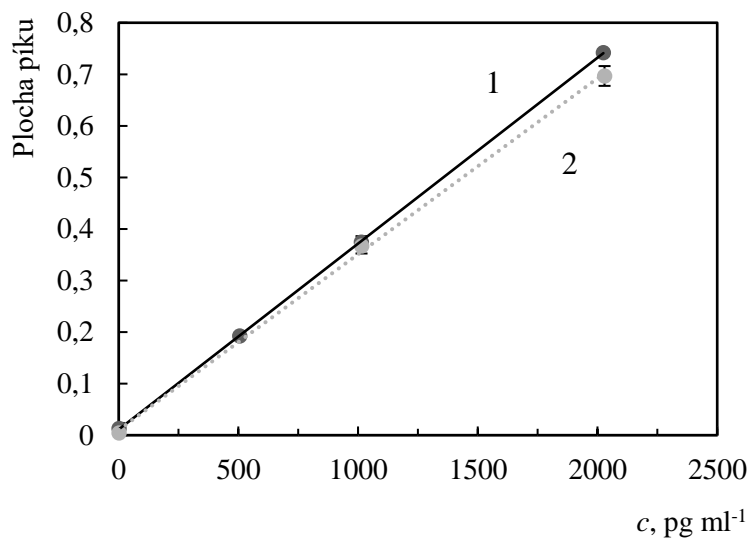
Stanovení metodou standardního přídávku bylo provedeno pro srovnání směrnic kalibračních křivek, jestli je možné zanedbat vliv matrice. Vzorky se standardním přídávkem byly připraveny tak, že k 1 ml vzorku piva 5x zředěného bylo přidáno přesné množství standardního směsného roztoku o koncentraci $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Vzorky byly předredukovány roztokem L-cysteinu. Vzorky piva byly odplyněny, přesto při analýze pěnilo, což komplikovalo stanovení. To bylo vyřešeno přidáním roztoku Triton® X 100 a Antifoam B do vzorku a Antifoam B do roztoku NaBH_4 . Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační grafy (Obr. 4.1a, b, c). Hodnoty LOD a LOQ přepočtené na koncentraci analytu ve vzorku jsou uvedeny v tabulce 4.1.



Obr. 4.1a: Kalibrační závislost plochy píku iAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek piva se standardním přídávkem.



Obr. 4.1b: Kalibrační závislost plochy píku MAS na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek piva se standardním přídatkem.



Obr. 4.1c: Kalibrační závislost plochy píku DMAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek piva se standardním přídatkem.

Kalibrační závislosti jsou lineární, směrnice přímky pro standard a vzorek se standardním přídatkem se liší maximálně o 7 %, matrice tedy neovlivňuje stanovení. Nalezené koncentrace pěti vzorků piv jsou uvedeny v tabulce 4.2, žádný vzorek nepřekročil limit maximálního obsahu As pro pitnou vodu, dva vzorky byly pod mezí stanovitelnosti.

Tab. 4.1: Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro vzorky piva

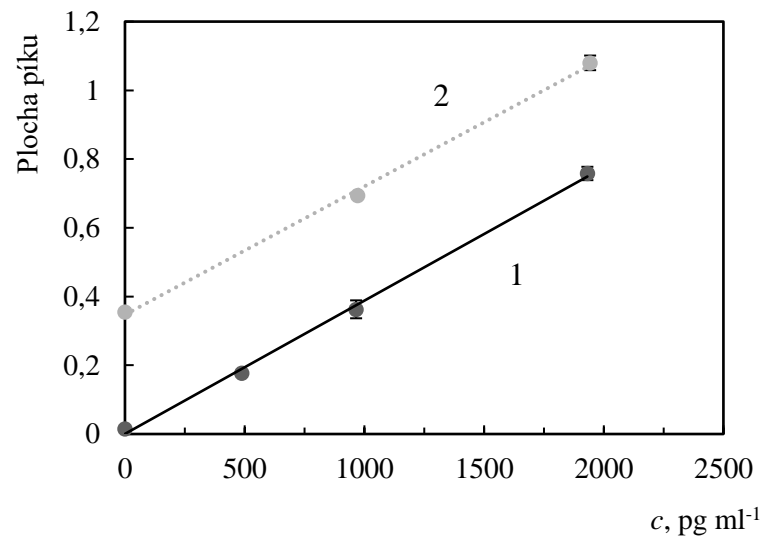
	LOD, $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g l}^{-1}$
iAs	0,15	0,50
MAs	0,28	0,94
DMAs	0,24	0,81

Tab. 4.2: Nalezená koncentrace iAs v pivě.

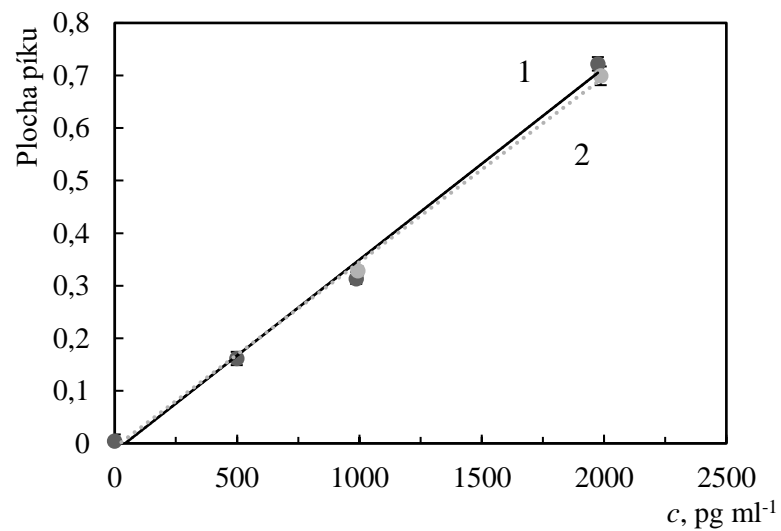
Vzorek	Koncentrace iAs ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Velkopopovický Kozel Premium	< LOQ
Budweiser Budvar světlé výčepní	< LOQ
Tsingtao	$2,23 \pm 0,10$
Corona Extra	$2,11 \pm 0,10$
Gambrinus Original	$1,66 \pm 0,06$

4.2 Stanovení arsenu ve víně

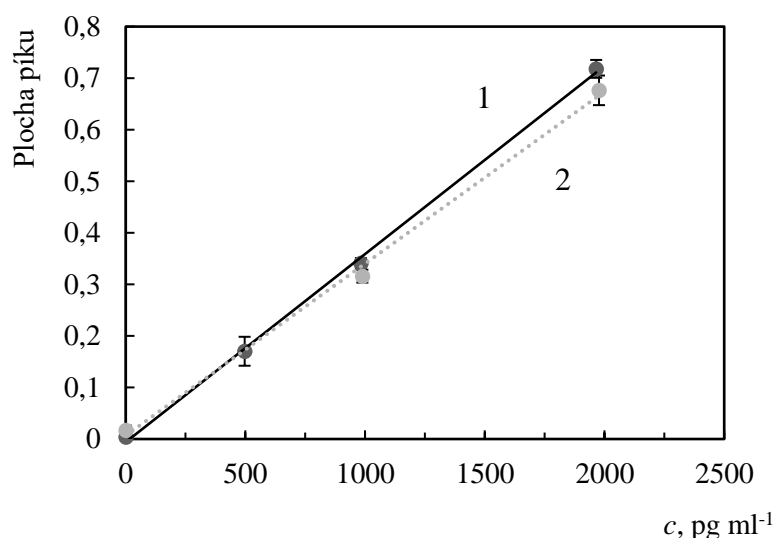
Stanovení metodou standardního přídávku bylo provedeno pro srovnání směrnice kalibračních křivek, jestli je možné zanedbat vliv matrice. Vzorky se standardním přídávkem byly připraveny tak, že k 0,5 ml vzorku vína 10x zředěného bylo přidáno přesné množství standardního směsného roztoku o koncentraci $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Vzorky byly předredukovány roztokem L-cysteinu. Vyšší obsah alkoholu ve vzorku by mohl způsobit problémy při atomizaci, ale to bylo vyvráceno, jelikož byly zaznamenány stejné signály s a bez sušící trubice, která byla naplněna hydroxidem sodným. Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační grafy (Obr. 4.2a, b, c). Hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tabulce 4.3.



Obr. 4.2a: Kalibrační závislost plochy píku iAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek vína se standardním přídatkem.



Obr. 4.2b: Kalibrační závislost plochy píku MAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek vína se standardním přídatkem.



Obr. 4.2c: Kalibrační závislost plochy píku DMAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek vína se standardním přídatkem.

Kalibrační závislosti jsou lineární, směrnice přímek se liší maximálně o 9 %, matrice ani obsah alkoholu ve vzorcích tedy výrazně neovlivňuje stanovení. Nalezené koncentrace sedmi vzorků vín jsou uvedeny v tabulce 4.4, žádný vzorek nepřekročil limit maximálního obsahu As pro pitnou vodu, dva vzorky byly pod mezi stanovitelnosti a jeden vzorek nedosáhl ani meze detekce.

Tab. 4.3: Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro vzorky vína

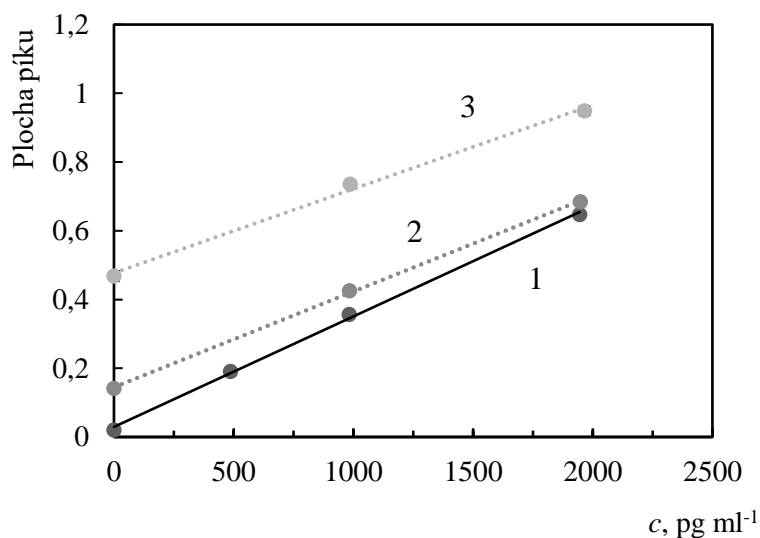
	LOD, $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g l}^{-1}$
iAs	0,30	1,01
MAs	0,57	1,89
DMAs	0,48	1,69

Tab. 4.4: Nalezená koncentrace iAs ve víně.

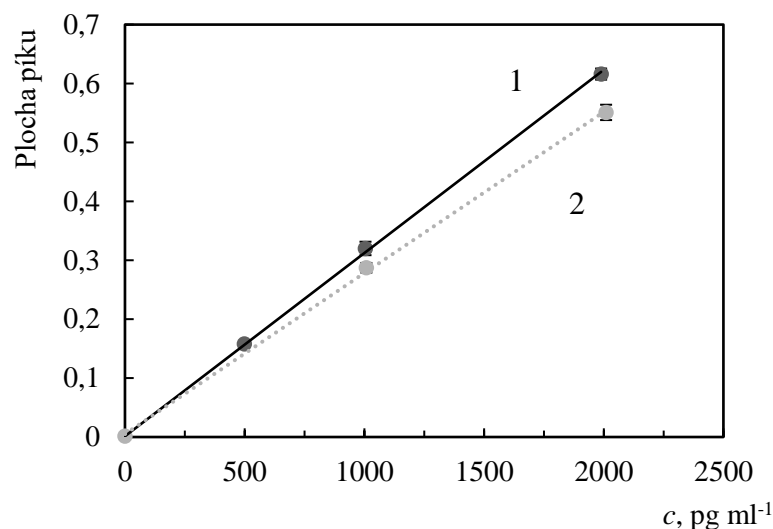
Vzorek	Koncentrace iAs ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Merlot (ČR)	$2,09 \pm 0,31$
Modrý Portugal (ČR)	< LOD
Cabernet Sauvignon (Chile)	$3,13 \pm 0,15$
Shiraz Cabernet (Austrálie)	< LOQ
Merlot (Kalifornie)	$8,45 \pm 0,12$
Shiraz (Francie)	$1,34 \pm 0,13$
Sangiovese a Cabernet Sauvignon (Itálie)	< LOQ

4.3 Stanovení arsenu v jablečných šťávách

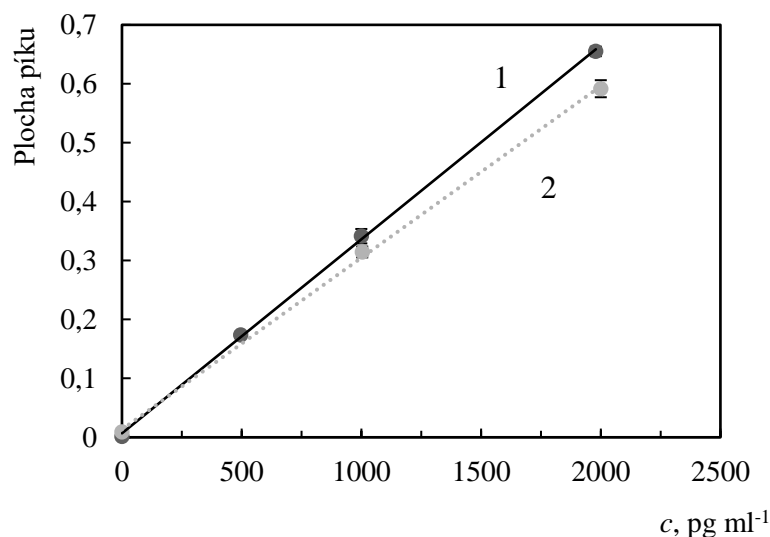
Stanovení metodou standardního přídavku bylo provedeno pro srovnání směrnice kalibračních křivek, jestli je možné zanedbat vliv matrice. Vzorky se standardním přídavkem byly připraveny tak, že k 1 ml vzorku jablečné šťávy 5x zředěné bylo přidáno přesné množství standardního směšného roztoku o koncentraci $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Vzorky byly předredukovány roztokem L-cysteinu. Obsah arsenu u jablečných šťáv s dužinou byl stejný, ať už byl vzorek přefiltrován či nikoliv. U metody HG-CT-AAS tedy není filtrace vzorku nutná a tím se analýza zjednodušuje a zrychluje. Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační grafy (Obr. 4.3a, b, c). Hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tabulce 4.5.



Obr. 4.3a: Kalibrační závislost plochy píku iAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek jablečné šťávy (Sunny) se standardním přídavkem, 3 – vzorek jablečné šťávy (Happy Day) se standardním přídavkem.



Obr. 4.3b: Kalibrační závislost plochy píku MAS na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek jablečné šťávy se standardním přídatkem. Třetí křivka není zobrazena – je shodná s druhou.



Obr. 4.3c: Kalibrační závislost plochy píku DMAs na koncentraci standardů. 1 – standard, 2 – vzorek jablečné šťávy se standardním přídatkem. Třetí křivka není zobrazena – je shodná s druhou.

Kalibrační závislosti jsou lineární, směrnice přímek se liší o 11 - 24 %. U vzorků jablečných šťáv je vliv matrice na stanovení větší, ale přesto bylo dosaženo přijatelných výsledků. Pro budoucí práci by bylo vhodné případné použití vyššího zředění vzorků. Nalezené koncentrace osmi vzorků jablečných šťáv jsou uvedeny v tabulce 4.6, pouze jeden vzorek překročil limit maximálního obsahu As pro pitnou vodu a ostatní vzorky by limit pro pitnou vodu splnily. Jeden vzorek byl pod mezí detekce metody.

Tab. 4.5: Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro vzorky jablečných šťáv

	LOD, $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g l}^{-1}$
iAs	0,15	0,50
MAs	0,28	0,94
DMAs	0,24	0,81

Tab. 4.6: Nalezená koncentrace iAs v jablečných šťávách.

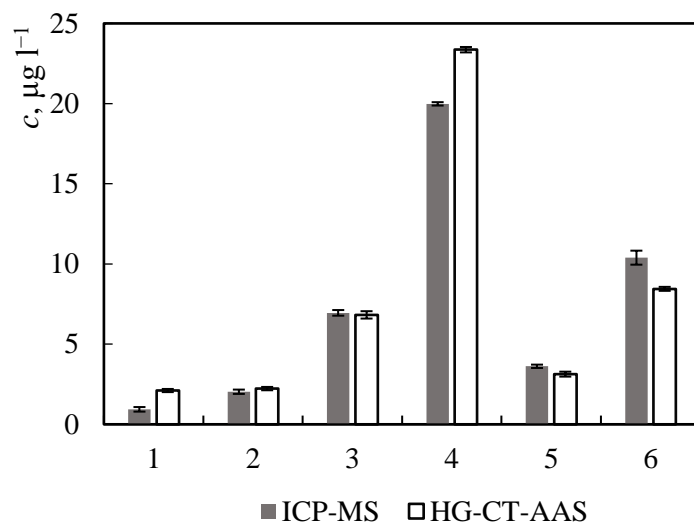
Vzorek	Koncentrace iAs ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Relax	$1,67 \pm 0,07$
Hello	$8,19 \pm 0,13$
Toma	$0,53 \pm 0,12$
Hello „2“	$23,36 \pm 0,17$
Naše Bio	< LOD
Pfanner	$0,53 \pm 0,11$
HappyDay	$6,82 \pm 0,23$
Sunny	$1,69 \pm 0,08$

4.4 Srovnání s ICP - MS

Vybrané vzorky s vyšším obsahem anorganického arsenu stanovené metodou HG-CT-AAS byly pro kontrolu analyzovány i pomocí ICP-MS po mineralizaci, kde byl stanovován celkový arsen. V tabulce 4.7 jsou meze detekce a kvantifikace tohoto postupu. Metodou HG-CT-AAS bylo dosaženo podobných mezí detekce, navíc však poskytuje speciální informaci a provozní náklady jsou výrazně nižší. Z obrázku 4.4 vyplývá, že obsahy arsenu stanovené oběma metodami jsou v dobré shodě. Dále se potvrzuje, že vzorky nápojů skutečně obsahují pouze anorganickou formu arsenu, další sloučeniny arsenu se v těchto vzorcích nevyskytují.

Tab. 4.7: Mez detekce a kvantifikace metody ICP-MS.

LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0,33
LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	1,10



Obr. 4.4: Porovnání celkového obsahu As metodou ICP-MS a obsahu iAs stanoveného metodou HG-CT-AAS u vybraných nápojů. 1 – pivo Corona Extra, 2 – pivo Tsingtao, 3 – jablečná šťáva Happy Day, 4 – jablečná šťáva Hello „2“, 5 – červené víno Cabernet Sauvignon, 6 – červené víno Merlot.

5 Závěr

Cílem této práce bylo stanovení toxikologicky významných specií arsenu v nápojích (pivo, víno a jablečné šťávy). Bylo zjištěno, že vzorky obsahují jen anorganický arsen. Methylované sloučeniny nebyly detekovány. Obsah arsenu byl porovnáván s limitem pro pitnou vodu ($10\mu\text{g l}^{-1}$). Všechny vzorky tento limit splnily, až na jeden vzorek jablečné šťávy, který limit přesáhl asi dvojnásobně. Nalezené koncentrace anorganického arsenu metodou HG-CT-AAS a celkový obsah arsenu stanoven pomocí ICP-MS po mineralizaci shodují. Metoda HG-CT-AAS je tedy vhodnou metodou pro analýzy arsenu v nápojích. Je instrumentálně jednoduchá a dostatečně citlivá, dosahuje srovnatelných mezí detekce jako ICP-MS, a provozní náklady jsou nižší. Navíc poskytuje informaci o speciaci arsenu ve vzorku.

6 Seznam použité literatury

1. Beaty, R. D.; Kerber, J. D.: *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. 2nd ed. Norwalk, The Perkin-Elmer Corporation 1993.
2. Kaňa, A.; Mestek, O.: *Atomová absorpční spektrometrie*. Dostupné z <http://old.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf> [cit. 25.4.2016]
3. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2010.
4. Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I. 2.* vyd. Praha, Karolinum 2004.
5. Dědina, J.; Fara, M.; Kolihová, D.; Korečková, J.; Musil, J.; Plško, E.; Sychra, V.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Praha, Česká spektroskopická společnost 1987.
6. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, Wiley 1995.
7. Frank, J.; Krachler, M.; Shotyk, W.: Determination of arsenic in peat samples using HG-AFS and L-cysteine as pre-reductant. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **21**:2, 204-207 (2006).
8. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **63**:3, 396-406 (2008).
9. European Food Safety Authority. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA Journal* **12**:3 (2014).

10. Maher, B.: Foreword: Research front - Arsenic biogeochemistry. *Environmental Chemistry* **2**:3, 139-140 (2005).
11. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals. *Metallomics* **4**, 881-892 (2012).
12. Herce-Pagliai, C.; González, G.; Camean, A. M.; Repetto, M.: Presence and distribution of arsenical species in beers. *Food Additives and Contaminants* **16**:6, 267 – 271 (1999).
13. Tanoshima, M.; Sakai, T.; McCurdy, E.: Arsenic speciation analysis in apple juice using HPLC-ICP-MS with the Agilent 8800 ICP-QQQ. *Agilent Technologies* (2012).
14. Petursdottir, A. H.; Sloth, J. J.; Feldmann, J.: Introduction of regulations for arsenic in feed and food with emphasis on inorganic arsenic, and implications for analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* **407**, 8385–8396 (2015).
15. Wilson, D.: Arsenic content in american wine. *Journal of Environmental Health* **78**, 16-22 (2015).
16. Tanabe, C. K.; Hopfer, H.; Gilleland, G.; Liba, A.; Ebeler, S. E.; Nelson, J.: Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation – microwave plasma – atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **31**:6, 1223–1227 (2016).
17. Melo-Coelho, N. M.; Parrilla, C.; Cervera, M. L.; Pastor, A.; de la Guardia, M.: High performance liquid chromatography—atomic fluorescence spectrometric determination of arsenic species in beer samples. *Analytica Chimica Acta* **482**, 73–80 (2003).
18. Komorowicz, I.; Barańkiewicz, D.: Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry – Last decade review. *Talanta* **84**, 247–261 (2011).

19. Matoušek, T.; Currier, J. M.; Trojánková, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; Gonzalez-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at picogram levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**, 1456-1465 (2013).