

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Veronika Švadlenová

Stanovení arsenu v pivu a surovinách pro jeho výrobu

Arsenic determination in beer samples and raw materials for its  
preparation

Diplomová práce

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

Praha 2017

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. srpna 2017

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi pomohly zpracovat tuto diplomovou práci. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. a Ing. Karlu Štěrbovi, Ph.D., z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, za cenné rady a poskytnutí vzorků k měření.

Velké díky patří také mému manželovi, rodičům a celé rodině za trpělivost a podporu během studií. Za pravopisnou korekci děkuji babičce Štěpánce.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce je věnována optimalizaci metody stanovení arsenu pomocí techniky chemického generování hydridů s AAS detekcí ve vzorcích piva a surovinách pro jeho výrobu. Obsah arsenu v pivu se obvykle pohybuje na stopové úrovni, nicméně je zapotřebí koncentraci tohoto prvku v pivu sledovat. Současně rutinně používaná metoda stanovení arsenu pomocí elektrotermické atomizace je časově i finančně náročná a málo citlivá, proto byla vyvinuta snaha o zefektivnění stanovení arsenu a vyvinutí rychlejší a levnější metody.

Pro stanovení arsenu byla optimalizována metoda generování těkavých hydridů s detekcí pomocí atomové absorpční spektrometrie. Byla optimalizována průtoková rychlost argonu na hodnotu  $75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , optimální průtoková rychlost reakčních činidel byla  $4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a vzorku  $5,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Při stanovení arsenu touto metodou byl jako redukční činidlo použit 3 %  $\text{NaBH}_4$  v 0,5 %  $\text{NaOH}$ , pro okyselení vzorku byla použita  $\text{HCl}$  naředěná 1:1 destilovanou vodou. S touto optimalizací parametrů bylo dosaženo LOD  $0,32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a LOQ  $1,05 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo vyzkoušeno stanovení arsenu ve vzorcích ječmene, sladu a pitné vody jakožto surovinách pro výrobu piva. Bylo zjištěno, že matrice piva je za daných podmínek nevhodná pro techniku generování těkavých hydridů díky bouřlivé reakci v separátoru fází, kterou se nepovedlo odstranit žádným z přípravných kroků. Byl zkoumán vliv předredukce, který pravděpodobně posiluje vliv některé z interferujících látek pro stanovení arsenu. Další část této práce byla tedy věnována studii interferencí a bylo popsáno několik prvků, které potlačují hodnotu naměřeného signálu pro arsen. Interferenční vliv lze potvrdit u selenu, antimonu, cínu, železa a olova.

## **Klíčová slova**

Atomová absorpční spektrometrie, chemické generování hydridu, interferenční vlivy, arsen, pivo, slad, ječmen

## **ABSTRACT**

This thesis describes the optimization of the method for determination of arsenic by the chemical hydride generation coupled with AAS detection in beer samples and raw materials for its preparation. The beer usually contain arsenic at ultratrace level, however, it is necessary to monitor the concentration of this element in the beer. The routinely used method for determination of arsenic is determination by electrothermal atomization. This approach is time consuming, expensive and less sensitive. It has been developer suitable determination of arsenic as a faster and less expensive method.

For this method there was optimized the flow rate of argon to 75 ml·min<sup>-1</sup>, the optimum flow rate for the reagents was 4.0 ml·min<sup>-1</sup> and for the sample 5.0 ml·min<sup>-1</sup>. 3 % NaBH<sub>4</sub> in 0.5 % NaOH was used as the reducing agent for the determination of arsenic, and HCl diluted 1:1 with distilled water was used to acidify the sample. With this parameter LOD was 0.32 µg·l<sup>-1</sup> and LOQ 1.05 µg·l<sup>-1</sup>. It has been tested the arsenic determination in samples of barley, malt and potable water as beer raw materials. It has been found that the beer matrix is unsuitable for the hydride generation technique due to a stormy reaction in the gas/liquid phase separator. The effect of pretreatment, which is likely to enhance the effect of some of the interfering substances for arsenic determination, has been examined. Another part of this work was focused on the study of interferences and several elements were described which suppress the value of the measured signal for arsenic. The interference effect was confirmed for selenium, antimony, tin, iron and lead.

## **Keywords**

Atomic absorption spectrometry, chemical hydride generation, interferences, arsenic, beer, malt, barley

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	absorbance
AAS	atomová absorpční spektrometrie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LDR	lineární dynamický rozsah
$V_{dc}$	objem dávkovací cívky
$v_{\xi}$	průtoková rychlost činidel
$c_x$	koncentrace látky x
BLK	blank – slepý vzorek
FIA	dávkování do proudu
HG	generování hydridů
MS	hmotnostní spektrometrie
ICP	indukčně vázaná plazma
HG-AAS	atomová absorpční spektrometrie s generováním hydridů
TS-FF-AAS	atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací, prekoncentrační trubicí a termosprejem (z anglického thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry)
GF-AAS	atomová absorpční spektrometrie s grafitovou trubicí (z anglického graphite furnace atomic absorption spectrometry)

# Obsah

1. ÚVOD .....	9
1.1. Cíle práce .....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1. AAS .....	10
2.2. Generování těkavých hydridů .....	11
2.2.1. Chemické generování .....	11
2.2.2. Elektrochemické generování .....	12
2.3. Pivo .....	13
2.3.1. Slad .....	13
2.3.2. Chmel .....	14
2.3.3. Voda .....	14
2.3.4. Kvasinky .....	14
2.3.5. Kovy v pivu .....	15
2.4. Arsen .....	16
2.4.1. Stanovení arsenu .....	17
2.4.2. Interference při stanovení arsenu .....	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
3.1. Přístrojové vybavení a instrumentace .....	19
3.2. Použité chemikálie .....	20
3.3. Příprava roztoků .....	21
3.4. Experimentální aparatura .....	22
3.5. Statistické zpracování výsledků .....	23
4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....	25
4.1. Optimalizace .....	25
4.1.1. Optimalizace průtokové rychlosti argonu .....	25
4.1.2. Optimalizace průtokové rychlosti reakčních činidel .....	26
4.1.3. Optimalizace koncentrace kyseliny chlorovodíkové .....	28
4.1.4. Optimalizace objemu dávkovací cívky .....	29
4.1.5. Optimalizace koncentrace NaBH <sub>4</sub> .....	30
4.2. Kalibrační závislost .....	31
4.3. Měření reálných vzorků .....	33
4.3.1. Ječmen a slad .....	33
4.3.2. Pitná voda .....	34

4.3.3.	Pivo .....	35
4.4.	Studie interferenčních vlivů.....	36
4.4.1.	Kyselina dusičná.....	36
4.4.2.	Železo.....	37
4.4.3.	Draslík .....	38
4.4.4.	Hořčík .....	38
4.4.5.	Vápník .....	38
4.4.6.	Zinek .....	38
4.4.7.	Selen .....	39
4.4.8.	Olovo .....	39
4.4.9.	Antimon .....	40
4.4.10.	Bismut.....	40
4.4.11.	Cín .....	41
5.	ZÁVĚR .....	42
6.	BIBLIOGRAFIE.....	43



# 1. ÚVOD

Pivo obsahuje kovy ovlivňující jeho vlastnosti, např. železo, které ovlivňuje vlastnosti jako je chuť, vůně, růst kvasinek a kvalita pění, také obsahuje kovy, které jsou prospěšné pro zdraví člověka, např. vápník, hořčík, draslík, ale i takové, které jsou toxické, např. arsen, olovo, kadmium, rtuť. Tyto kovy v pivu mohou primárně pocházet ze základních surovin pro výrobu piva, jako je ječmen, chmel, voda nebo např. z kvasinek. Obsah kovů v těchto surovinách je důsledek znečištění životního prostředí. Sekundárně se kovy do piva mohou dostat v průběhu výroby piva z použitých zařízení při výrobě, filtračních materiálů nebo nedodržením technologických postupů.

Obsah toxických kovů v pivě sice klesá až na stopovou úroveň, nicméně je zapotřebí koncentrace těchto látek v pivu sledovat. Pro stanovení arsenu byla v minulosti vyvinuta metoda stanovení pomocí elektrotermické AAS. Citlivost této metody však není dostatečná pro spolehlivé stanovení arsenu na koncentrační úrovni vyskytující se v pivu, nebo alespoň na koncentrační úrovni jeho povoleného limitu. Ten činí pro pitnou vodu  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [1].

## 1.1. Cíle práce

Vzhledem k předpokládané nízké koncentraci arsenu ve studovaných vzorcích byla zvolena technika generování těžkých sloučenin ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií. Cílem této práce byla tedy optimalizace a charakterizace metody stanovení arsenu a využití této metody pro stanovení obsahu arsenu v pivu a surovinách použitých pro jeho výrobu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. AAS

Atomová absorpční spektrometrie je metoda založená na absorpci vhodného elektromagnetického záření atomy vzorku v plynném stavu. Metoda slouží k elementární kvantitativní analýze kovových prvků nízkých koncentrací. Lze použít pro 60 prvků periodické tabulky.

Lambertův – Beerův zákon bývá dobře splněn pro koncentrace  $0,1 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  u plamenové atomizace, v jednotkách  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  u elektrotermické atomizace. Některé prvky (As, Sb, Bi, Ge, Sn, Pb atd.) se převádí s výhodou na těkavé hydridy. Jedná se o nesmírně citlivou metodu dosahující citlivostí  $\text{ng}$  na  $1 \text{ ml}$  vzorku a u elektrotermické atomizace lze detekovat až  $\text{pg}$  v dávce vzorku. Používá se například pro analýzu pitných a užitkových vod, v lékařství, potravinářství, ke sledování obsahu těžkých kovů v životním prostředí atd. [2]

K vlastnímu měření se využívá atomový absorpční spektrometr, vysoce selektivní a citlivý přístroj, který je složen z těchto hlavních částí: zdroj záření, atomizátor, disperzní (optický) systém, detektor.

Zdroj záření – jedná se vždy přímo o žhavený stanovovaný kov, který emituje záření ve formě atomových čar o přesně stejné vlnové délce, jakou je jen aktuálně stanovovaný prvek (analyt) schopen absorbovat, tedy vybudit své valenční elektrony do vyšších energetických hladin v rámci výběrových pravidel. Nejčastěji používané zdroje záření jsou: výbojka s dutou katodou, bezelektrodová výbojka, popř. superlampa; pro korekci nespecifické absorpce pozadí je používána deuteriová výbojka, popř. lepší a cenově málo dostupné systémy (Smith-Hieftje, korekce s použitím Zeemana jevu).

Atomizátor – část spektrometru kde dochází k absorpci primárního záření vzorkem a jeho následné atomizaci.

Disperzní (optický) systém – tvořen polopropustnými zrcadly, dutými zrcadly a ostřicími čočkami, odraznou (popř. Echelle) mřížkou (Ebertovým monochromátorem), dále také štěrbinami, jež vymezují jednu jedinou (dostatečně intenzivní) spektrální čáru stanovovaného prvku o dané spektrální šířce.

Detektor – nejčastěji se využívá fotonásobič, který střídavě měří intenzitu dopadajícího, atomizátorem prošlého, monochromatického záření a intenzitu pozadím zeslabeného záření z deuteriové výbojky; vlastní signál je pak rozdíl intenzit těchto dvou paprsků a platí pro něj Lambertův-Beerův zákon. [3]

## 2.2. Generování těkavých hydridů

Technika generování těkavých sloučenin je široce užívaná metoda k určení stopového či ultrastopového množství analytu. [5]

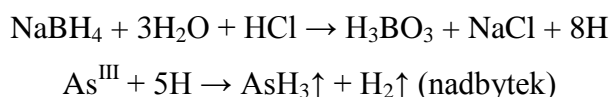
Metoda klasického chemického generování těkavých sloučenin, zavedená na přelomu šedesátých a sedmdesátých let minulého století za účelem překonání obtíží spojených s plamenovou atomizací sloučenin arsenu a selenu, je v současné době již intenzivně probádána a nalézá poměrně široké uplatnění při stanovení prvků tvořících těkavé sloučeniny, zejména hydridy. [4,5]

Je to velmi citlivá metoda, která umožňuje zakoncentrování analytu v absorpčním prostředí a spojuje výhody plamenové a elektrotermické atomizace. Také umožňuje separaci analytu od matrice vzorku, tj. omezení vlivu interferencí. Pomocí metody generování těkavých sloučenin je možné stanovit pouze prvky, které lze nějakým způsobem převést na těkavou formu. [3] Sedm typických prvků se přetváří na hydrid s  $\text{NaBH}_4$  - As, Sb, Bi, Te, Sn, Pb a Cd. [6] Sloučeniny těchto prvků patří mnohdy mezi výrazně toxické látky poškozující různé sféry životního prostředí. Tyto sloučeniny jsou schopny často již ve velice nízkých koncentracích způsobovat vážné otravy u osob vystavených jejich účinku. [7]

Dnes se nejčastěji využívá těkavá sloučenina hydrid, generována chemickou redukcí, obvykle v systému  $\text{NaBH}_4/\text{HCl}$ . Chemickou redukcí je možné získat hydridy selenu, telluru, arsenu, antimonu, bismutu, germania, cínu a olova, byly prováděny pokusy o generování hydridů india a thallia. [8]

### 2.2.1. Chemické generování

Reakce  $\text{NaBH}_4$  probíhá v prostředí minerální kyseliny. Nejčastěji se používá kyselina chlorovodíková. [9]



Technika chemického generování těkavých hydridů je v současnosti běžně využívána v analytických laboratořích, má ale svá rizika a úskalí, která souvisí zejména s použitím redukčního činidla.  $\text{NaBH}_4$  je sloučenina málo stabilní, její roztok se za laboratorní teploty rozkládá, musí být uchováván v lednici; pro práci by měl být připravován denně čerstvý a ve stabilizačním roztoku  $\text{NaOH}$ . Nevýhodou  $\text{NaBH}_4$  je také nedostačující čistota pro ultrastopové

analýzy (max. 99 %). Stopy iontů přechodných kovů přítomné v redukčním činidle se mohou projevit interferencemi. [8]

Pro vyloučení nežádoucích vlivů  $\text{NaBH}_4$  byl zaveden alternativní způsob elektrochemické generace těkavých sloučenin.

### 2.2.2. Elektrochemické generování

Elektrochemické generování těkavých hydridů představuje alternativní techniku přípravy těkavých hydridů, kdy místo redukčního činidla je redukce provedena průchodem elektrického proudu pouze v prostředí velmi čistých minerálních kyselin. Tím odpadá možnost kontaminace analyzovaného vzorku redukčním činidlem. To umožňuje dosažení velice nízkých hodnot mezi detekce a stanovitelnosti. Nesmírnou výhodou elektrochemického generování oproti chemickému je zejména srovnatelná účinnost generování těkavých sloučenin z různých oxidačních stavů stanovovaných prvků. Chemicky lze generovat těkavé sloučeniny pouze z nižších valencí (Se, Te), nebo je účinnost generování (pro dané uspořádání chemického generátoru) závislá na výchozí valenci prvku (As, Sb,...). V obou případech je pak pro vzorky obsahující vyšší mocenství analytu vhodná předřazená redukce. [9]

V minulosti byla vyvinuta technika elektrochemického generování těkavých sloučenin pro stanovení As, Se, Sb v různých vzorcích. Detekční limit těchto prvků ve vodných roztocích byl 0,45; 0,62 a 0,92  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . [10]

## 2.3. Pivo

Historie piva sahá až do sedmého tisíciletí před naším letopočtem, kdy první nápoj podobný dnešnímu pivu vznikl v Mezopotámii. V průběhu tisíciletí se samozřejmě stále vylepšovaly postupy a procesy, jimiž se tento nápoj vyráběl. [11]

Dnes se kvašením a jeho produkty zabývá kvasný průmysl, který je širokým odvětvím potravinářského průmyslu. Zahrnuje sladařství a pivovarnictví, lihovarství a výrobu lihovin, vinařství, droždářství, výrobu organických kyselin a rozpouštědel kvasnou cestou, výrobu léčiv a enzymů, vitamínů a dalších látek. Kvašení je anaerobní proces, kdy dochází k odbourávání cukrů za vzniku oxidu uhličitého a dalších látek podle typu reakce. Mezi nejčastěji používané patří lihové kvašení. Ve výrobních procesech je také důležité kvašení mléčné nebo máselné. [12]

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. [13]

Bylo popsáno, že pravidelná přiměřená konzumace piva snižuje vznik některých kardiovaskulárních chorob. 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 %. [14]

### 2.3.1. Slad

Jednou ze základních surovin pro výrobu piva je slad. Slady se vyrábějí klíčením ječmene, případně jiných obilovin, a jeho následným sušením, tzv. hvozdním. Slady dodávají pivu hlavní podíl extraktivních látek, které ovlivňují jeho základní fyzikálně-chemické, biochemické a organoleptické vlastnosti. [15] Např. ve vodě rozpustné proteiny extrahované z ječmene významně ovlivňují stabilitu a strukturu pěny piva. [16]

Kromě anorganických látek se ve sladu a ječmenu provádí např. stanovení vomitoxinu (deoxynivalenol). Tato jedovatá látka, vytvářená plísněmi, je častým kontaminantem zrna. Na úrovni buněk je hlavním toxickým účinkem inhibice syntézy bílkovin prostřednictvím vazby na ribosom. U živočichů již nízké koncentrace toxinu způsobují snížení imunitní funkce, snížený výkon a příjem potravy, který vede až k anorexii. Vyšší dávky vomitoxinu způsobují zvracení. [17]

Stanovení vomitoxinu v pšenici, ječmeni a sladu se provádí plynovou chromatografií s detektorem elektronového záhytu. Je popsána rychlá a spolehlivá metoda, kdy se vzorky extrahují směsí acetonitril–voda, extrakty se eluují přes sloupec C18, odpaří se do sucha a

derivatizují trimethylsilylimidazol-trimethylchlorosilanem. Tato metoda může určit přítomnost vomitoxinu v rozmezí od 0,2 – 40 mg·l<sup>-1</sup>. [18]

### 2.3.2. Chmel

Další surovinou pro výrobu piva je chmel. Chmel je rostlina, kterou lidstvo využívá k výrobě nápojů již po tisíciletí. Představuje jednu z hlavních a nenahraditelných surovin pro vaření piva. Dodává pivu charakteristickou nahořklou chuť a aroma. V gastronomii lze použít pro přípravu různých pokrmů. Také se využívá v cukrovarnictví k potlačení bakteriální kontaminace. V lékařství se využívají jeho sedativní, antioxidační a antiseptické vlastnosti. Je součástí mnoha fytofarmak. Chmel obsahuje látku, která je považována za nejúčinnější fytoestrogen. V současnosti se šlechtění nových odrůd chmele zaměřuje na větší obsah látek využitelných pro farmacii. [19]

Hořkost chmelu je způsobena specifickými kyselinami v něm obsaženými. Vzhledem k tomu, že příjemná a konzistentní hořkost je základním přívlastkem piva, je obsah kyselin v chmelu kontrolován. Nejpoužívanější způsob určení hořkých sloučenin je založen na spektrofotometrii, která měří absorbanci izooktanového extraktu okyseleného piva. Tento přístup však není zdaleka specifický, neboť měří všechny extrahované látky včetně sloučenin, které nejsou hořké. Z tohoto důvodu se stále častěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která umožňuje stanovení specifických sloučenin a tedy analýzu hořkosti chmele. [20]

### 2.3.3. Voda

Pivo obsahuje, dle druhu výrobku, až 80 % vody. Vlastnosti vody ovlivňují základní kvalitu a specifické vlastnosti piva. Pro výrobu se používají jak spodní vody (obsahují méně organických látek, mikroorganismů), tak vody povrchové (nutná úprava vody). Liší se obsahem rozpuštěných plynů i iontů. [21]

### 2.3.4. Kvasinky

Pivovarské kvasinky jsou jednobuněčné organismy, které mají schopnost přeměňovat zkvasitelné cukry na ethanol a oxid uhličitý. Kromě těchto hlavních produktů metabolismu vytvářejí i řadu vedlejších metabolitů jako jsou estery, vyšší alkoholy a kyseliny, které se významnou měrou podílejí na utváření sensorických vlastností piva. [22]

### 2.3.5. Kovy v pivu

Významné i stopové prvky kovů mají zvláštní funkci při výrobě a ovlivňují výsledný produkt. Některé kovy v pivu jsou důležité při fermentaci, protože dodávají vhodné prostředí pro růst kvasinek a ovlivňují jejich metabolismus. Další kovy např. železo ovlivňují zejména chuť piva.

Pivo obsahuje prvky, které jsou prospěšné pro zdraví člověka, např. vápník, hořčík, draslík, železo, ale i takové, které jsou toxické, např. arsen, olovo, kadmium, rtuť, ty však v pivu na rozdíl od ostatních nápojů a potravin nejsou obsaženy vůbec, nebo jen ve velmi nízkých koncentracích. To je způsobeno výrobou piva, která je považována za dekontaminační proces. Přesto jsou maximální koncentrace některých kovů v pivu kontrolovány.

Kovy se do piva mohou primárně dostat ze surovin, jako je ječmen a chmel nebo voda. Sekundárně se kovy do piva mohou dostat v průběhu výroby piva, z použitých zařízení při výrobě, filtračních materiálů nebo nedodržením daných postupů. Potencionálním zdrojem kontaminace piva mohou být také obaly jako plechovky, sudy a tanky, ve kterých je výsledný produkt skladován a přepravován. Obsah kovů je variabilní a závisí na kvalitě užitých substrátů, na typu vařeného piva a na zemi původu piva. [23]

Weiner ve své práci popsal metodu stanovení stopového množství kovů v pivu a vínu metodou atomové absorpční spektrometrie. Byla popsána metoda pro stanovení mědi s limitem stanovitelnosti  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Metoda pro stanovení železa nebyla tak citlivá v porovnání s mědí. Železo mohlo být touto metodou stanoveno pouze v koncentracích nad  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Při průzkumu hladiny zinku v pivu bylo zjištěno, že konzervované pivo obsahuje poměrně vyšší obsah zinku než lahvové pivo. [24]

V minulosti bylo také prováděno stanovení množství Cu, Mn, Pb a Zn v Brazílském pivu metodou TS-FF-AAS s LOQ 2,2, 18, 1,6 a  $0,9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Rozsah koncentrací získaných pro analyty ve vzorcích piva byl: Cu: 38,0-155  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Mn: 110-348  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Pb: 13,0-32,9  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a Zn: 52,7-226  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky byly porovnány s výsledky získanými metodou GFAAS a byly v souladu s 95 % úrovní spolehlivosti. [25]

## 2.4. Arsen

Arsen je ocelově šedý, křehký, krystalický kov se třemi alotropními formami – žlutou, černou a šedou. Na vzduchu se oxiduje na  $\text{As}_2\text{O}_3$ , který je cítit po česneku. Patří do páté skupiny periodické tabulky s relativní atomovou hmotností 74,92 a s teplotou tání při  $817^\circ\text{C}$ . V přírodě se vyskytuje vázaný v minerálech, nejčastěji jako realgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ), arsenolit ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) a auripigment ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ). [26]

Díky vysoké toxicitě svých sloučenin zastával arsen v historii roli známého jedu. Již od roku 1836 se používá takzvaná Marshova zkouška, která se stala první uznávanou analytickou zkouškou na přítomnost arsenu (konkrétně  $\text{As}_2\text{O}_3$ ). [27]

V moderní době jsou sloučeniny arsenu častým kontaminantem v životním prostředí. Arsen je spjatý především s horninami a sulfidickými rudami. Přírodní jevy jako jsou biologická a sopečná aktivita jsou zodpovědné za emisi arsenu do atmosféry, odkud se pohybem vzduchu nebo deštěm dostávají do vod nebo půdy, kde jsou pěstovány zemědělské produkty. Člověk je tedy arsenu nejčastěji exponován užíváním kontaminovaného zdroje pitné vody nebo častou konzumací některých složek potravy obsahujících vysoké koncentrace různých forem arsenu. Nejznámějšími příklady jsou ryby [28], rýže [29] a česnek [30].

Ke kontaminaci zdrojů pitné vody dochází také díky přirozenému výskytu anorganického arsenu v podloží. Již více než deset let je známo, že mělké trubkové studny v Bangladéši jsou často kontaminovány koncentracemi arsenu na úrovni, která je škodlivá pro lidské zdraví. Průměrné množství arsenu v pitné vodě se v této zemi pohybuje kolem  $500 \mu\text{g l}^{-1}$ . Další studie ukazují, že problémy s arsenem v podzemních vodách / pitné vodě se vyskytují v mnoha dalších zemích po celém světě, například v USA a Číně. [31]

Další cestou expozice arsenu jsou riziková zaměstnání (skláři, výrobci polovodičů, papírenský průmysl) a expozice pracovníků manipulujících s materiály obsahující vysoké koncentrace sloučenin As. Mezi tyto patřila dříve i krmiva pro dobytek a dnes jde převážně o pesticidy, konzervanty dřeva a léčiva, která cíleně využívají toxicity těchto sloučenin jako např. antiparazitika či chemoterapeutika [32].

Arsen se do těla vstřebává po požití tlustým střevem. Pokud dojde k akutní otravě organismu nastává nevolnost, křeče v oblasti žaludku, těžký průjem, periferní neuropatie až selhání ledvin a plic. V těchto případech lze otravu zjistit z moči do 2 dní od expozice [33].

Naopak chronické otravy zanechávají následky genotoxické, karcinogenní a působí dlouhodobý oxidativní stres, který poškozují za čas kůži, játra a další vnitřní orgány. Jelikož je



arsen schopen překonat placentární bariéru, lze ho považovat i za teratogenní. Jedním ze známých příznaků otravy arsenem je tvorba tzv. Meesových proužků na nehtech [34].

#### 2.4.1. Stanovení arsenu

V minulosti bylo popsáno mnoho způsobů stanovení arsenu a jeho sloučenin. Andreae popsal metodu stanovení různých forem arsenu v přírodních vodách. Arsen je ze vzorku vypařován pomocí stripování plynem. Arsen je následně oddělen plynovou chromatografií a detekován spektrofotometricky nebo plamenově ionizačním detektorem s detekčním limitem několik  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . [35]

Stanovení arsenu metodou generování těkavých hydridů popsali ve své práci Thompson a Thomerson, kteří kromě arsenu generovali i bismut, germanium, olovo, antimon, selen, cín a telur. Hydrid byl generován přidáním 1 % borohydridu sodného k okyselenému vzorku. Uvolněné hydridy byly vedeny přímo do 17 cm dlouhé křemenné trubice, která byla vyhřívána v plamenu acetylen – vzduch. Výhodami tohoto systému jsou jeho jednoduchost, vysoká citlivost, rychlost analýzy a skutečnost, že nejsou potřeba prostředky pro korekci pozadí. [36]

FIA technika s generováním těkavých hydridů byla také použita v Bengálu a Bangladéši, oblastech s vysokou kontaminací, pro stanovení arsenu ve vodě a biologických materiálech. Přesnost metody byla vyhodnocena spikováním reálných matric známým množstvím arsenu. [37]

Wang s kolegy se zabýval stanovením arsenu ze slin lidí žijících v Číně, v oblasti, která je kontaminována arsenem. Cílem práce bylo posouzení úrovně expozice arsenu a použít vzorky slin jako nový biomarker pro stanovení expozice arsenu. Celková analýza arsenu byla provedena ve vzorcích slin a moči u 70 obyvatel vystavených expozici arsenu v pitné vodě a stanovení bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s indukčně vázanou plazmou a s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru. [38]

Dále je také popsáno stanovení arsenu voltametricky metodou diferenčně pulzní anodickou stripping voltametrií s limitem detekce  $0,19 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . [39,40]

#### 2.4.2. Interference při stanovení arsenu

Při stanovování konkrétního analytu je důležité mít informace o případných interferujících látkách, které mohou zkreslovat výsledky měření. V případě arsenu byly v minulosti prováděny studie porovnávající interferenční účinky kationtů, aniontů a kyselin pomocí AAS. Pierce ve své práci porovnával účinky interferentů během tří technik atomizace:

generace hydridu, atomizace v plameni a elektrotermická atomizace v grafitové kyvetě. Studie ukázala významné rozdíly v interferujících účincích mezi třemi použitými technikami. [41]

Odstraňování nežádoucího vlivu interferentů je možné pomocí maskovacích technik. Byla popsána minimalizace interferencí některých kovových iontů při stanovení arsenu metodou AAS s generováním těkavých hydridů. Byl použit thiosemikarbazid a 1,10 – fenanthrolin jako maskovací činidla pro snížení interference Cu, Ni, Pt a Pd. Malá interference byla pozorována u Cu, ale silné potlačení Ni, Pt a Pd bylo úspěšně eliminováno těmito maskovacími činidly. [42]

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Přístrojové vybavení a instrumentace

- atomový absorpční spektrometr Pye Unicam 939 (Unicam, UK)
- výbojka s dutou katodou pro stanovení As (s vlnovou délkou 273 nm, napájecí proud 10 mA, šířka spektrálního intervalu 0,5 nm)
- křemenný atomizátor (dutá trubice tvaru „T“, atomizační rameno délky 170 mm s vnitřním průměrem 12 mm a střední část délky 60 mm s vnitřním průměrem 2 mm) umístěn v externě vyhřívaném bloku (RMI, ČR)
- peristaltická pumpa MasterFlex (Cole-Palmer Instrument Company, USA)
- průtokové (čerpací) hadičky (TYGON, Sigma-Aldrich, UK) – použity byly hadičky blue/blue s vnitřním průměrem 1,65 mm (odpovídá průtokové rychlosti 4,0 ml·min<sup>-1</sup>) a green/green s vnitřním průměrem 1,85 mm (odpovídá průtokové rychlosti 5,0 ml·min<sup>-1</sup>)
- digitální plynový průtokoměr s rozsahem 0–500 ml·min<sup>-1</sup> (Cole-Parmer, USA)
- hydrostatický separátor fází vlastní výroby
- mikrovlnná trouba – Microwave Digestion System – Multiwave go (Anton Paar, Canada) se sadou rozkladných kyvet
- ultrazvuková lázeň Elmasonic E30H (P-LAB a.s., Praha)

### 3.2. Použité chemikálie

- NaOH, čistota p.a.; Mr = 39,99 (Lachema Brno, ČR)
- As – standardní roztok navázaný na kyselině arseničné v HNO<sub>3</sub>, c = 998 ± 2 mg·l<sup>-1</sup>, (MERCK, Německo)
- Tetrahydridoboritan sodný NaBH<sub>4</sub>, čistota ≥ 99 %, (SIGMA-ALDRICH, USA)
- HCl 30 %, (MERCK, Německo)
- HNO<sub>3</sub> 65 %, pro analýzu EMSURE® ISO (Merck Millipore, USA)
- K – vodný kalibrační roztok KNO<sub>3</sub>, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,99 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)
- Fe – standardní roztok Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> v HNO<sub>3</sub>, c = 998 ± 2 mg·l<sup>-1</sup>, (MERCK, Německo)
- Ca – vodný kalibrační roztok CaCO<sub>3</sub> v 2 % HNO<sub>3</sub>, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,995 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)
- Se – vodný kalibrační roztok Se, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,999 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)
- Zn – vodný kalibrační roztok Zn v 2 % HNO<sub>3</sub>, c = 1,000 ± 0,005 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,995 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)
- Mg – standardní roztok Mg v 2 % HNO<sub>3</sub>, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,95 %
- Sb – vodný kalibrační roztok Sb v 2 % HNO<sub>3</sub>, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,99 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)
- Pb – standardní roztok Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, v HNO<sub>3</sub>, c = 998 ± 2 mg·l<sup>-1</sup>, (MERCK, Německo)
- Sn – vodný kalibrační roztok Sn, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,99 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)
- Bi – vodný kalibrační roztok Bi, c = 1,000 ± 0,002 g·l<sup>-1</sup>, čistota = 99,99 % (ANALYTIKA s.r.o., Praha)

### 3.3.Příprava roztoků

- *Příprava 3% NaBH<sub>4</sub> v 0,5% NaOH*

Bylo naváženo 0,5 g NaOH a rozpuštěno v malém množství destilované vody. Do roztoku byly následně přidány 3 g NaBH<sub>4</sub> a roztok byl doplněn na celkový objem 100ml.

- *Příprava roztoků As*

Ze zásobního roztoku As o koncentraci 1,0 g·l<sup>-1</sup> bylo odpipetováno 100 μl a roztok byl doplněn na objem 100 ml destilovanou vodou. Tímto ředěním byl získán zásobní roztok o koncentraci 1 mg·l<sup>-1</sup>. Z takto připraveného zásobního roztoku bylo dále prováděno ředění na nižší koncentrace.

- *Příprava reálných vzorků ječmene a sladu k měření*

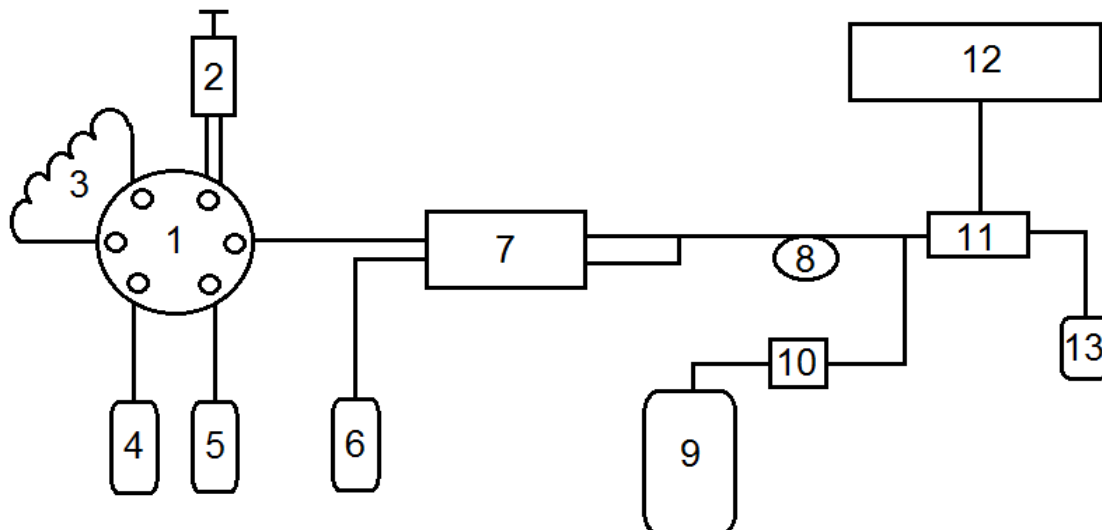
Ze vzorku ječmene nebo sladu byl navážen 1 g do rozkladné kyvety. Dále bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny dusičné a vzorky se hodinu rozkládaly v mikrovlnné troubě při nastaveném programu rozkladu (optimalizován dříve). Vzorek z rozkladné kyvety byl následně kvantitativně převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou.

- *Příprava reálných vzorků piva k měření*

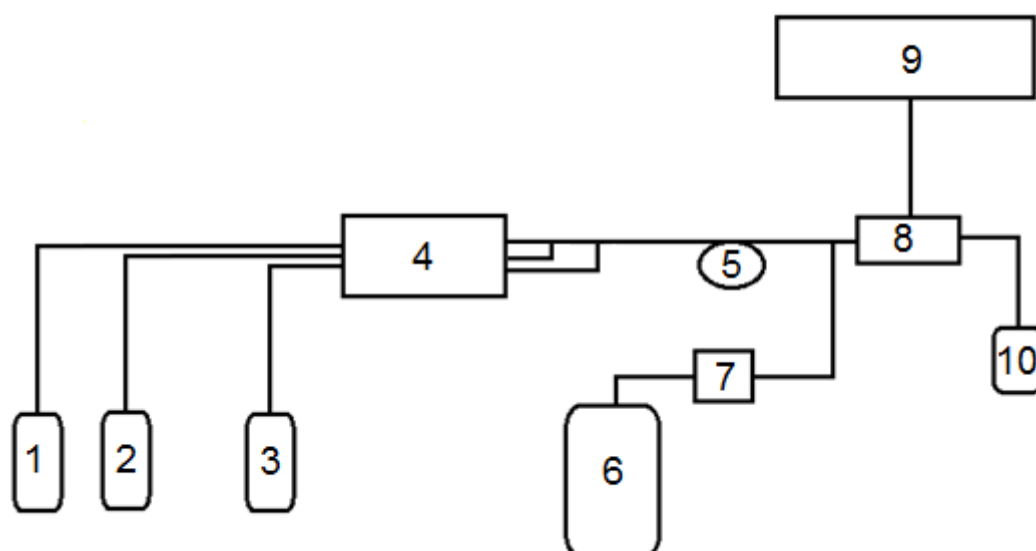
100ml vzorku piva bylo nejprve na 20 minut vloženo do ultrazvukové lázně, z důvodu odstranění přebytečného CO<sub>2</sub>. Poté byl vzorek přefiltrován přes filtrační papír a byla přidána kapka oktanolu pro potlačení pění vzorku. Takto připravený vzorek byl dále ředěn destilovanou vodou v poměru 1:1.

### 3.4. Experimentální aparatura

Měření probíhalo pomocí AAS s aparaturou viz Obr. 3.1. Nejprve byla vyzkoušena aparatura s dávkovací smyčkou a v dalším kroku byla použita aparatura s kontinuálním dávkováním vzorku.



**Obr.3.1.:** Schéma AAS aparatury. 1 – šesticestný ventil, 2 – dávkovací píst, 3 – dávkovací smyčka, 4 – nosný tok HCl, 5 a 13 – odpad, 6 – NaBH<sub>4</sub> v NaOH, 7 – peristaltická pumpa, 8 – reakční cívka, 9 – nosný plyn argon, 10 – plynový průtokoměr, 11 – separátor fází, 12 – křemenný atomizátor



**Obr.3.2.:** Schéma upravené aparatury s kontinuálním dávkováním vzorku 1 – vzorek, 2 – nosný tok HCl, 3 – NaBH<sub>4</sub> v NaOH, 4 – peristaltická pumpa, 5 – reakční cívka, 6 – nosný plyn argon, 7 – plynový průtokoměr, 8 – separátor fází, 9 – křemenný atomizátor, 10 – odpad

Vzorek, kyselina chlorovodíková a tetrahydridoboritan sodný byly kontinuálně dávkovány pomocí peristaltické pumpy. Vzorek byl po průchodu peristaltickou pumpou okyselován kontinuálně přiváděným roztokem HCl. K takto okyselenému vzorku byl dále přivedeno redukční činidlo NaBH<sub>4</sub>. Směs putovala do reakční cívky, kde vzorek kvantitativně reagoval s redukčním činidlem za vzniku hydridu arsenu. Za reakční cívkou byl ještě přiveden nosný plyn (argon), který ze separátoru fází unášel plynnou směs do křemenného atomizátoru. V křemenném atomizátoru byl hydrid arsenu atomizován na atomární páru, což jsou volné atomy prvku v základním, excitovaném nebo ionizovaném stavu a docházelo k detekci arsenu pomocí AAS.

### 3.5. Statistické zpracování výsledků

Každé měření, tedy i chemická analýza, je zatíženo určitou chybou. V této práci bylo každé měření provedeno třikrát. Z těchto hodnot byl vybrán medián jako střední hodnota naměřeného signálu a ze všech naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka, která je zobrazována jako chybová úsečka v grafických zobrazeních.

#### *Medián*

Medián je střední hodnotou měření. Výsledky se seřadí podle velikosti – při lichém počtu je medián prostřední hodnota, při sudém počtu aritmetický průměr dvou prostředních. Je vhodné jej využívat k odhadu střední hodnoty při malém počtu analytických výsledků<sup>(4)</sup>.

#### *Směrodatná odchylka*

Odhadnutá směrodatná odchylka charakterizuje šířku intervalu, v němž se mohou vyskytnout výsledky opakovaného měření.

$$s = k_n R$$

$k_n$  je tabelovaný koeficient a  $R = x_{max} - x_{min}$  je rozpětí (rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty  $x$ ). Čím je směrodatná odchylka menší, tím je výsledek měření přesnější<sup>(4)</sup>.

#### *Mez detekce*

Mez detekce (LOD) je nejnižší hodnota měření, při které můžeme určit, že se daný analyt vyskytuje ve vzorku. Její hodnota je trojnásobek hodnoty směrodatné odchylky šumu.

Pro účely této práce byla mez detekce vypočtena následovně:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_r}{k}$$

Kde LOD je mez detekce,  $s_r$  je relativní směrodatná odchylka vypočtená z hodnot desetkrát naměřeného blanku,  $k$  je směrnice získaná z kalibrační přímky

### ***Mez stanovitelnosti***

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší hodnota měření, při které jsme schopni určit koncentraci analytu ve vzorku. Její hodnota je desetinásobek hodnoty směrodatné odchylky šumu.

Pro účely této práce byla mez stanovitelnosti vypočtena následovně:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_r}{k}$$

Kde LOQ je mez stanovitelnosti,  $s_r$  je relativní směrodatná odchylka vypočtená z hodnot desetkrát naměřeného blanku,  $k$  je směrnice získaná z kalibrační přímky.

### ***Opakovatelnost***

Opakovatelnost je odchylka metody při měření stejným způsobem jedním pracovníkem se stejnými činidly na tomtéž přístroji.

V této práci bylo naměřeno deset hodnot absorbancí pro roztok arsenu o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z naměřených hodnot byla vypočtena relativní směrodatná odchylka, která byla podělena aritmetickým průměrem naměřených hodnot. Výsledek byl vyjádřen procentuálně.



## 4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

### 4.1. Optimalizace

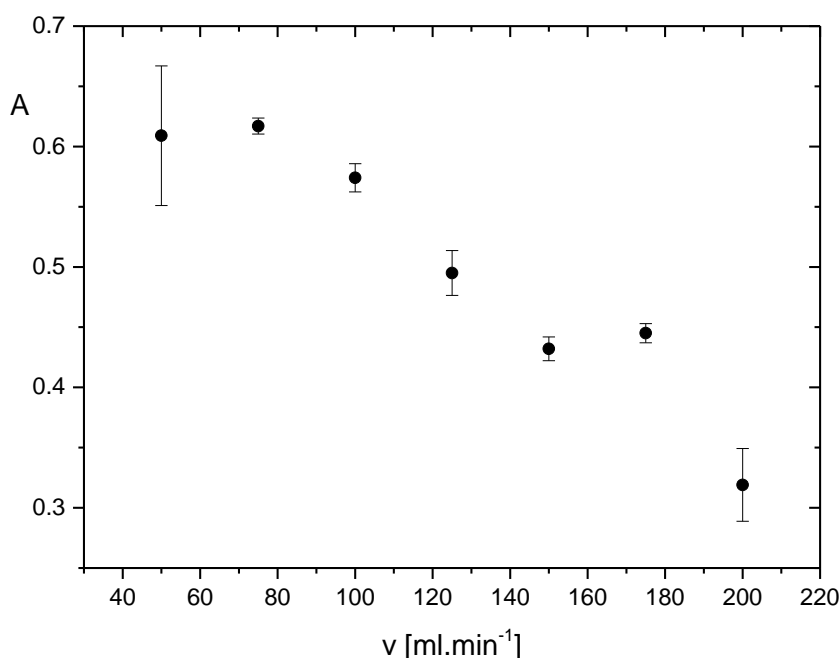
Prvním úkolem z hlediska důležitosti bylo najít optimální parametry pro stanovení arsenu metodou generování těkavých hydridů. Byly hledány podmínky měření, při kterých bylo dosaženo nejvyšší citlivosti měření. Optimalizovány byly hodnoty průtokových rychlostí elektrolytu a nosného plynu, koncentrace kyseliny a redukčního činidla, objem dávkovací cívky a šířka spektrálního intervalu.

Nejprve byla optimalizována šířka spektrálního intervalu. Měření bylo prováděno při šířkách 0,2; 0,5 a 1 nm. Nejvyšší absorbance byla získána při hodnotě 0,5 nm. Naopak při šířce 0,2 nm nebyl naměřen žádný signál.

#### 4.1.1. Optimalizace průtokové rychlosti argonu

Argon vstupuje do aparatury po reakci okyseleného vzorku s  $\text{NaBH}_4$  a unáší těkavé sloučeniny do křemenného atomizátoru. Při nízké průtokové rychlosti argonu nedochází ke kontinuálnímu vstupu vzorku do atomizátoru a naopak při vysoké průtokové rychlosti argonu může dojít k unášení vzorku z atomizátoru ještě před stanovením.

Pro tuto optimalizaci byly vyzkoušeny průtokové rychlosti argonu  $50\text{--}200\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  s krokem po  $25\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pro měření bylo použito redukční činidlo 0,7 %  $\text{NaBH}_4$  v 0,5 %  $\text{NaOH}$ , průtoková rychlost činidel  $3,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , koncentrace standardního roztoku arsenu  $100\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace kyseliny chlorovodíkové  $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $500\ \mu\text{l}$ .



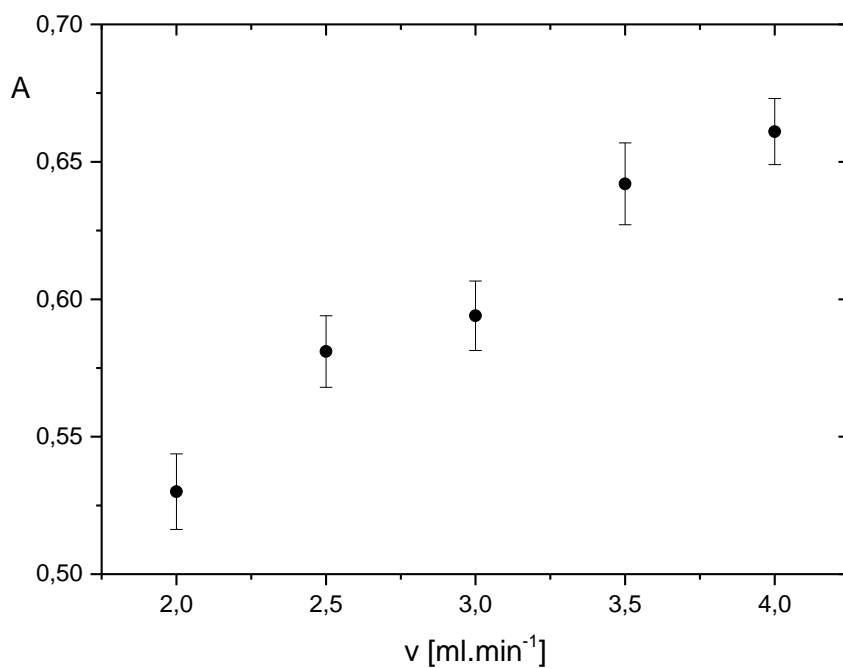
**Obr. 4.1.:** Závislost absorbance na rychlosti průtoku argonu

$c_{NaBH_4} = 0,7\%$  v  $0,5\%$   $NaOH$ ;  $v_{\xi} = 3,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{HCl} = 0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $V_{dc} = 500\text{ }\mu\text{l}$ ;  $c_{As} = 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Z grafu je patrné, že nejvyšší absorbance bylo dosaženo s průtokovou rychlostí 50 a  $75\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . U průtokové rychlosti  $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  byla pozorována vyšší hodnota směrodatné odchylky, proto byla jako optimální průtoková rychlost zvolena hodnota  $75\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### 4.1.2. Optimalizace průtokové rychlosti reakčních činidel

Vzorek, kyselina a redukční činidlo jsou unášeny do separátoru fází pomocí peristaltického čerpadla. Při nízké průtokové rychlosti činidel dochází k poklesu absorbance, z důvodu pomalejšího vstupu vzorku do separátoru. Při vysoké průtokové rychlosti je naopak vzorek unášen do odpadu dříve, než se stihnou separovat těkavé hydridy a část vzorku se vůbec nedostane do křemenného atomizátoru. Cílem této optimalizace bylo zjistit optimální hodnotu průtokové rychlosti analytu. Byly proměřeny hodnoty  $2,0 - 4,0\text{ s}$  krokem  $0,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pro měření bylo použito redukční činidlo  $0,7\%$   $NaBH_4$  v  $0,5\%$   $NaOH$ , průtoková rychlost argonu  $75\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , koncentrace standardního roztoku arsenu  $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace kyseliny chlorovodíkové  $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $500\text{ }\mu\text{l}$ .



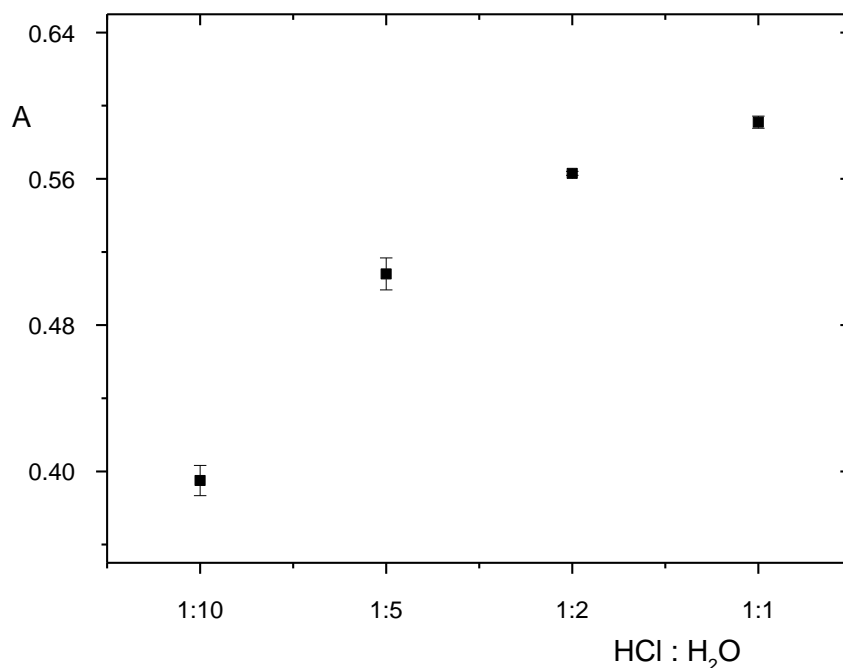
**Obr. 4.2.:** Optimalizace průtokové rychlosti reakčních činidel

$$c_{\text{NaBH}_4} = 0,7 \% \text{ v } 0,5 \% \text{ NaOH}; v_{\text{Ar}} = 75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}; c_{\text{HCl}} = 0,1\text{M}; V_{\text{dc}} = 500 \mu\text{l}; c_{\text{As}} = 100 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Závislost absorbance na průtokové rychlosti roste, proto byla zvolena jako optimální hodnota  $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Vyšší průtokové rychlosti nebyly vyzkoušeny z důvodu kapacity čerpacího systému.

### 4.1.3. Optimalizace koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Pomocí kyseliny chlorovodíkové byl okyselován vzorek před reakcí s  $\text{NaBH}_4$ . Byly vyzkoušeny následující poměry kyseliny chlorovodíkové s destilovanou vodou 1:10; 1:5; 1:2 a 1:1. Pro měření bylo použito redukční činidlo 0,7 %  $\text{NaBH}_4$  v 0,5 %  $\text{NaOH}$ , průtoková rychlost činidel  $4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , koncentrace standardního roztoku arsenu  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , průtoková rychlost argonu  $75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $500 \mu\text{l}$ .



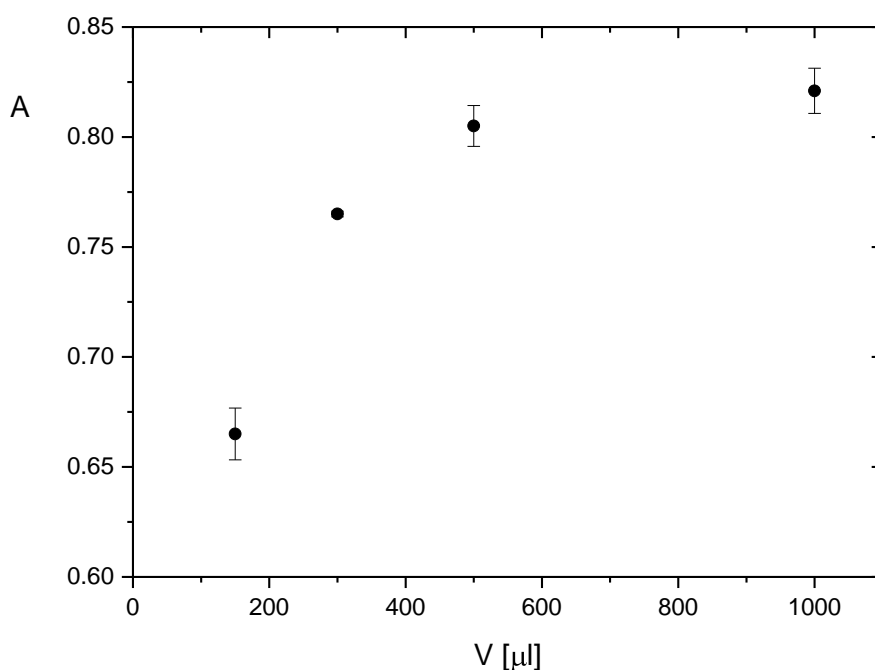
**Obr. 4.3.:** Optimalizace koncentrace HCl

$c_{\text{NaBH}_4} = 0,7 \%$  v  $0,5 \%$   $\text{NaOH}$ ;  $v_{\text{Ar}} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $V_{\text{dc}} = 500 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{c}} = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{\text{As}} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací kyseliny chlorovodíkové signál stoupá. Z tohoto důvodu byla jako optimální hodnota zvolena kyselina naředěná 1:1 s destilovanou vodou.

#### 4.1.4. Optimalizace objemu dávkovací cívky

Vzorek byl dávkován pomocí peristaltického čerpadla přes šesticečný dávkovací ventil z dávkovací cívky. V dalším experimentu byl proto optimalizován objem dávkovací cívky. Objemy dávkovacích cívek použitých při této optimalizaci byly 150; 300; 500 a 1000  $\mu\text{l}$ . Pro měření bylo použito redukční činidlo 0,7 %  $\text{NaBH}_4$  v 0,5 %  $\text{NaOH}$ , průtoková rychlost činidel 4,0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , koncentrace standardního roztoku arsenu 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , průtoková rychlost argonu 75  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a kyselina chlorovodíková v poměru 1:1.



**Obr. 4.4.:** Optimalizace objemu dávkovací cívky

$c_{\text{NaBH}_4} = 0,7\% \text{ v } 0,4\% \text{ NaOH}$ ;  $v_{\text{Ar}} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\text{HCl } 1:1$ ;  $v_c = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{\text{As}} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Z grafu je patrné, že s rostoucím objemem dávkovací cívky roste i absorbance. Vzhledem k dostatečnému množství vzorku bylo další měření provedeno bez dávkovací cívky, kdy byl vzorek dávkován kontinuálně. Byly vyzkoušeny tři průtokové rychlosti vzorku: 4,0; 5,0 a 9,0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Výsledky měření jsou shrnuty v tab. 4.1.

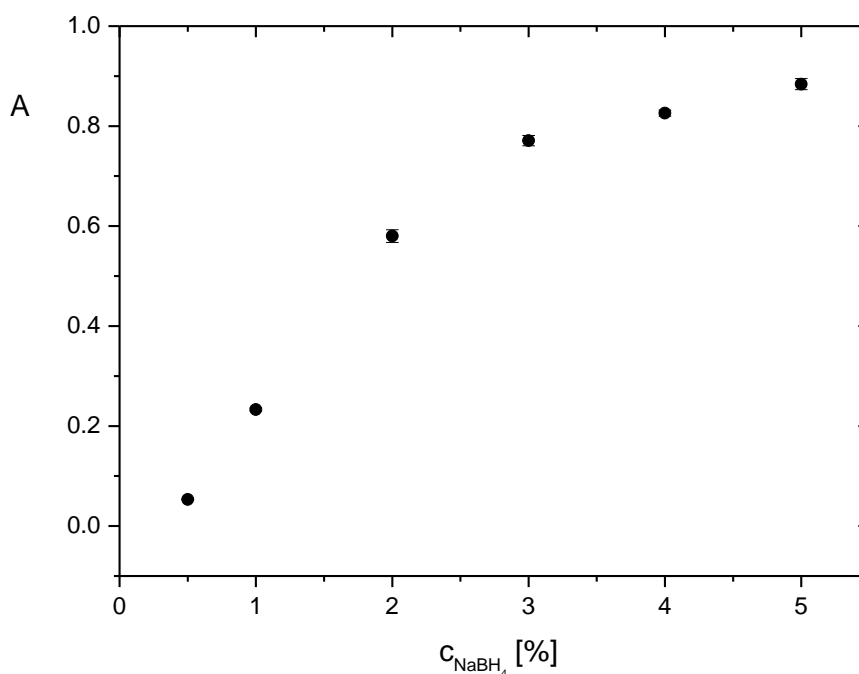
**Tab. 4.1.** Naměřené hodnoty absorbancí v závislosti na průtokové rychlosti vzorku

$v$ [ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	A
4,0	0,567
5,0	0,615
9,0	0,609

Pro dávkování vzorku bylo při všech dalších experimentech zvoleno uspořádání s kontinuálním dávkováním a průtokovou rychlostí  $5,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### 4.1.5. Optimalizace koncentrace $\text{NaBH}_4$

$\text{NaBH}_4$  vstupuje do reakce po okyselení vzorku a působí jako redukční činidlo. Tvoří se těkavý hydrid, který je ze separátoru fázi unášen do atomizátoru, kde je detekován. Roztoky  $\text{NaBH}_4$  byly připraveny v koncentracích 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 % a rozpuštěny v 0,5 %  $\text{NaOH}$ . Pro měření byla použita průtoková rychlost činidel  $4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , koncentrace standardního roztoku arsenu  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , průtoková rychlost argonu  $75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a kyselina chlorovodíková v poměru 1:1.



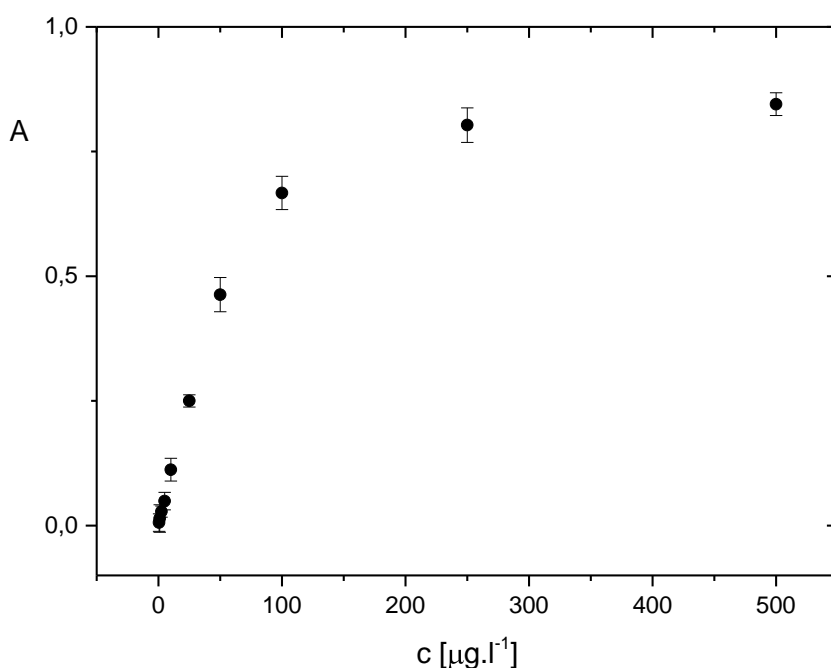
**Obr. 4.5.:** Optimalizace koncentrace  $\text{NaBH}_4$

$v_{\text{Ar}} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\text{HCl}$  1:1;  $v_c = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{\text{As}} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Z grafu je patrné, že se vzrůstající koncentrací borohydridu, vzrůstá i hodnota absorbance. Nicméně rozdíl mezi 3 % a 5 % NaBH<sub>4</sub> není již tak výrazný, proto bylo přihlédnuto k úspoře chemikálie vzhledem k vysoké ceně borohydridu. Jako optimální hodnota byl tedy zvolen 3 % NaBH<sub>4</sub>.

## 4.2. Kalibrační závislost

Po optimalizaci parametrů byly připraveny roztoky pro kalibrační závislost. Rozsah koncentrací arsenu byl 0,5 - 500 µg·l<sup>-1</sup>. Pro měření bylo použito redukční činidlo 3 % NaBH<sub>4</sub> v 0,5 % NaOH, průtoková rychlost činidel 4,0 ml·min<sup>-1</sup>, průtoková rychlost argonu 75 ml·min<sup>-1</sup> a kyselina chlorovodíková zředěná v poměru 1:1.

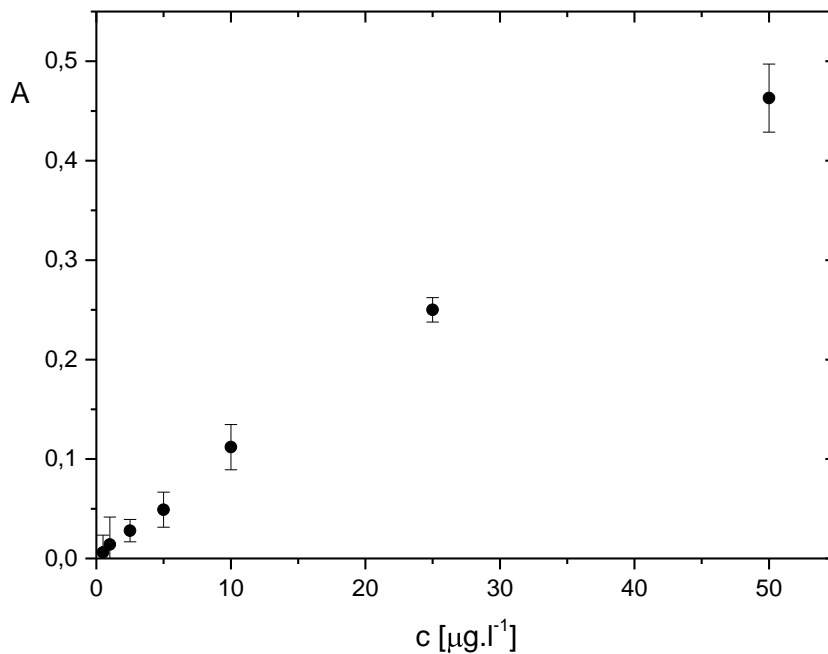


**Obr. 4.5.:** Kalibrační závislost 0,5 - 500 µg·l<sup>-1</sup>

$v_{Ar} = 75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $HCl$  1:1;  $v_c = 4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $c_{NaBH_4} = 3 \%$  v 0,5 % NaOH

Z grafu je patrné, že kalibrační závislost je lineární do koncentrace 50 µg·l<sup>-1</sup>. Od koncentrace 100 µg·l<sup>-1</sup> již hodnoty signálu pro arsen stoupají exponenciálně. Pro účely měření je nadále použita lineární kalibrační závislost s nejvyšší hodnotou absorbance 50 µg·l<sup>-1</sup>.

Lineární část kalibrační závislosti je zobrazena na obr. 4.6. Pro tuto kalibrační závislost byl vypočítán LOD, LOQ a opakovatelnost, dále byla určen korelační koeficient a citlivost metody. Všechny charakteristiky kalibrační závislosti jsou shrnuty v tab. 4.2.



**Obr. 4.6.:** Lineární část kalibrační závislosti  $0,5-50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

$v_{Ar} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\text{HCl } 1:1$ ;  $v_c = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c_{\text{NaBH}_4} = 3 \%$  v  $0,5 \%$   $\text{NaOH}$

**Tab. 4.2.** Charakteristiky kalibrační závislosti

Charakteristika	hodnota	jednotka
Mez detekce	0,32	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	1,05	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Opakovatelnost	2,19	%
Lineární dynamický rozsah	0,5 - 50	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Korelační koeficient	0,9947	
Citlivost	0,0095	$\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$



### 4.3. Měření reálných vzorků

V další části této práce byla pozornost věnována měření reálných vzorků piva a surovin pro jeho výrobu. Mezi základní suroviny patří ječmen, slad a pitná voda. Vzorky pro měření poskytl výzkumný ústav pivovarský a sladařský.

#### 4.3.1. Ječmen a slad

Ječmen je surovina, ze které se máčením, klíčením a následným sušením získává slad. Tento proces se provádí proto, aby se rozštěpily v sladu uložené polysacharidy na jednoduché sacharidy vhodné ke kvašení.

Pro měření byly použity jeden vzorek sladu (č.1) a tři vzorky ječmene (č.2-4). Od každého vzorku byl navážen 1 g do rozkladné kyvety. Dále bylo přidáno 5 ml kyseliny dusičné a vzorky se nechaly hodinu rozkládat v mikrovlnné troubě. Vzorek byl převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

**Tab. 4.3.** Výsledky měření reálných vzorků

Číslo vzorku	Absorbance	c [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
1	0,009	0,61 $\pm$ 0,04
2	0,020	1,4 $\pm$ 0,1
3	0,013	0,91 $\pm$ 0,05
4	0,013	0,91 $\pm$ 0,03

V případě reálných vzorků byla koncentrace arsenu na hranici meze stanovitelnosti, proto bylo další měření provedeno ze spikované matrice. Ke vzorkům bylo uměle přidáno 10  $\mu\text{l}$  standardního roztoku arsenu o koncentraci 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledná koncentrace spikované matrice byla tedy 10  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tab. 4.4.:** Výsledky měření reálných vzorků ve spikované matrici

Číslo vzorku	Absorbance	c [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
1	0,193	16,9 $\pm$ 0,2
2	0,150	13,0 $\pm$ 0,6
3	0,120	10,3 $\pm$ 0,3
4	0,106	9,08 $\pm$ 0,5

Nejvyšší koncentrace arsenu ve spikované matrici byla naměřena ve vzorku sladu a to  $6,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , což v případě navážky 1 g vzorku odpovídá hodnotě  $0,069 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Výsledné hodnoty koncentrací v reálných vzorcích sladu a ječmene nepřesáhly limit pro arsen v pitné vodě.

Vzhledem k nízké hodnotě absorpance posledního vzorku vyvstala otázka, zda  $\text{HNO}_3$ , ve které je rozkládán vzorek, neovlivňuje měření. Výsledky měření vlivu  $\text{HNO}_3$  viz 4.4.1.

### 4.3.2. Pitná voda

Pitná voda je základní surovinou pro výrobu piva. Tato složka tvoří nejvyšší podíl výsledného produktu (až 80%), proto byla v této části výzkumu zaměřena pozornost na měření koncentrace arsenu v pitné vodě použité pro výrobu piva. Zároveň byl při tomto měření vyzkoušen vliv předredukce arsenu, kdy je analyt převeden do anorganické formy s optimálním oxidačním číslem pro efektivní generování jeho těkavé sloučeniny. Pro arsen se jedná o formu  $\text{As}^{\text{III}}$ . Předredukce arsenu byla provedena tak, že k 16 ml vzorku bylo přidáno 2 ml KI a 2 ml HCl. Vzorky byly ponechány hodinu při laboratorní teplotě. Nejprve byla naměřena kalibrační závislost bez předredukce a následně změřen vzorek pitné vody a vzorek ve spikované matrici o koncentraci arsenu  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Poté byla naměřena kalibrační závislost s předredukovanými standardy a následně předredukovaný vzorek pitné vody a vzorek ve spikované matrici o koncentraci arsenu  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tab. 4.5.:** Výsledky měření standardů a vzorků bez předredukce a s následnou předredukcí

$c_{\text{As}} [\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	signál	signál
	bez předredukce	s předredukcí
2,5	0,025	0,031
5,0	0,045	0,047
10	0,122	0,125
20	0,227	0,250
vzorek	0,016	0,001
vzorek + spike	0,129	0,118

Při porovnání výsledných absorpací naměřených ve standardních roztocích bez předredukce a s předredukcí je patrný mírný nárůst hodnot. Výraznější nárůst nebyl očekáván, vzhledem k tomu, že standardní roztoky byly připraveny ze standardního zásobního roztoku a demineralizované vody, tudíž by se zde arsen neměl vyskytovat v jiné formě než jako  $\text{As}^{\text{III}}$ .

U vzorků pitné vody byl naopak očekáván nárůst hodnot absorbancí, nebo získání stejné hodnoty absorbance v případě, že by se ve vzorku jiná forma arsenu nevyskytovala. Naopak ale došlo k poklesu absorbance jak u vzorku, tak u spikované matrice. Tento fakt poukazuje na možnost, že při použití této metody existují interferenty, které mohly být aktivovány, nebo mohla být zesílena jejich účinnost při zavedení předredukčního kroku. V závislosti na tomto zjištění byla zavedena další kapitola této práce, pojednávající o studii možných interferenčních vlivů.

#### 4.3.3. Pivo

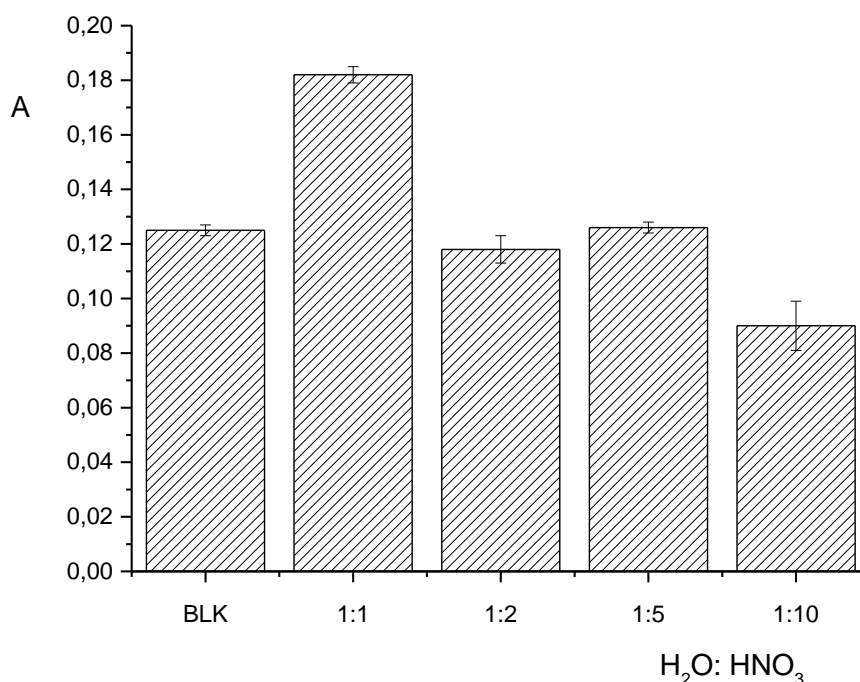
Vzorky piva byly nejprve upraveny pro účely měření. Vzorek piva byl na 20 minut vložen do ultrazvukové lázně, z důvodu odstranění CO<sub>2</sub>. Poté byl vzorek přefiltrován přes filtrační papír a byla přidána kapka oktanolu. Oktanol zabraňuje pění vzorku. Ovšem i přes to docházelo k pění vzorku v separátoru fází, což znemožňovalo měření. Bylo vyzkoušeno i měření vzorků zředěných v různých poměrech, ovšem se stejnými výsledky. Vzhledem k těmto problémům nebylo možné dále pokračovat v měření piva jako matrice. Měření by vyžadovalo jinou konstrukci aparatury, především větší separátor fází, který nebyl k dispozici.

## 4.4. Studie interferenčních vlivů

Během předchozích měření došlo k několika podezřením z ovlivnění výsledných hodnot interferenčními vlivy. Proto byla zavedena kapitola zabývající se studií interferenčních vlivů. Kromě zkoumání vlivu  $\text{HNO}_3$  byl proměřen vliv několika dalších prvků periodické tabulky.

### 4.4.1. Kyselina dusičná

V závislosti na měření reálných vzorků vznikl podnět k měření závislosti a signálu pro arsen na hodnotě koncentrace  $\text{HNO}_3$ . Pro toto měření byly připraveny 4 roztoky arsenu o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  v roztocích různě koncentrované kyseliny dusičné a jeden kontrolní vzorek roztoku arsenu připravený pouze v destilované vodě bez přídavku  $\text{HNO}_3$ . Závislost absorbance na hodnotě koncentrace je vyobrazena na Obr. 4.7.



**Obr. 4.7.:** Vliv koncentrace  $\text{HNO}_3$  na hodnotu absorbance

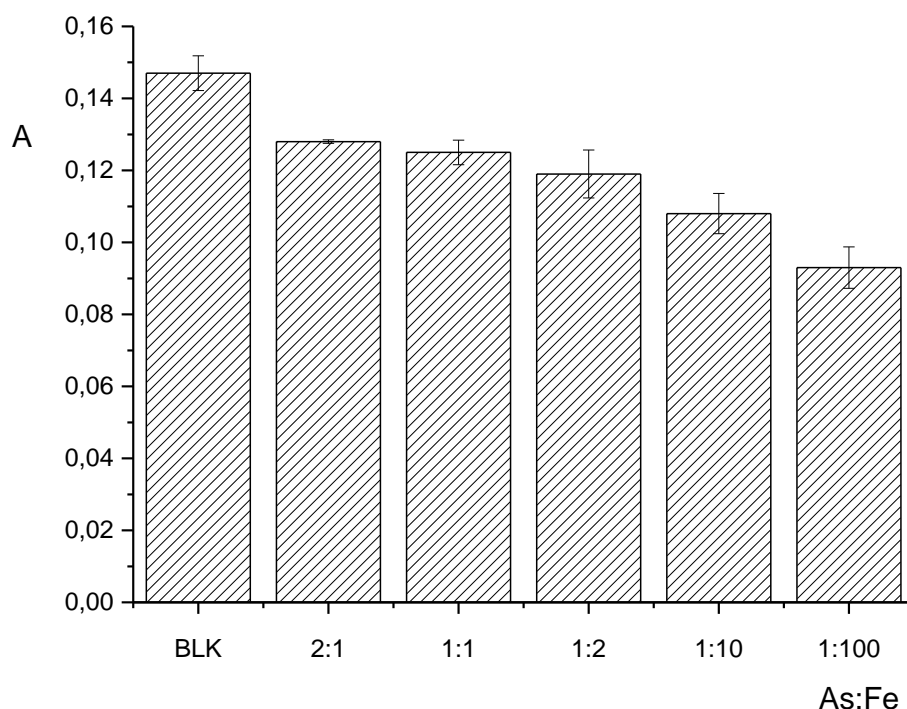
$$v_{Ar} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}; \text{HCl } 1:1; v_c = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}, c_{NaBH_4} = 3 \% \text{ v } 0,5 \% \text{ NaOH}; c_{As} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že negativní vliv  $\text{HNO}_3$  v na hodnotu absorbance nelze jednoznačně potvrdit. Při poměru 1:1 stoupla hodnota naměřeného signálu o 30 %. Naopak při poměru 1:10 signál poklesl o 28 %. Při nižších koncentracích má tedy  $\text{HNO}_3$  pozitivní vliv na chemické generování arsenu.

#### 4.4.2. Železo

Železo v pivu je důležitý stopový prvek, neboť ovlivňuje vlastnosti piva, jako je chuť, vůně, růst kvasinek a kvalita pění. [19]

Vzhledem k tomu, že se jedná o tak významný prvek obsažený v pivu, byl zkoumán interferenční vliv na stanovení arsenu. Bylo připraveno pět roztoků o stejné koncentraci arsenu a různých koncentrací železa v poměrech As:Fe 2:1; 1:1; 1:2; 1:10, 1:100 a byla měřena absorbance takto připravených roztoků.



**Obr. 4.8.:** Vliv železa na chemické generování arsenu

$v_{Ar} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $HCl \text{ } 1:1$ ;  $v_{\zeta} = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{NaBH_4} = 3\% \text{ v } 0,5\% \text{ NaOH}$ ;  
 $c_{As} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Z grafu je patrné, že interferenční vliv železa můžeme potvrdit, ovšem tato interference není nijak výrazná. Při totožné koncentraci obou prvků je při generování arsenu pokles absorbance o 12 %. V případě poměru As:Fe 1:100 je pokles absorbance 40 %, což je pokles výraznější. Nicméně nepředpokládáme tak vysoký obsah železa v pivu vzhledem k tomu, že vysoké koncentrace železa mohou vést k omezení činnosti kvasinek a následně k vytvoření zákalu výsledného produktu.

#### 4.4.3. Draslík

Draslík je zástupce skupiny alkalických kovů a v pivu se jedná o velmi významnou látku. Obsah draslíku v pivu se pohybuje kolem 300–600 mg·l<sup>-1</sup> což odpovídá 20 % doporučené denní dávky draslíku.

Při měření vlivu draslíku na chemické generování arsenu nebyly potvrzeny žádné interference, ani při stonásobně vyšší koncentraci draslíku oproti arsenu. Draslík tedy můžeme vyloučit ze seznamu interferentů.

#### 4.4.4. Hořčík

Další významná látka obsažená v pivu je hořčík, zástupce skupiny kovů alkalických zemin. Hořčík se v pivu běžně vyskytuje v koncentracích 90–120 mg·l<sup>-1</sup> což odpovídá přibližně 45 % doporučené denní dávky hořčíku.

Stejně jako u draslíku, tak ani u hořčíku nebyl potvrzen vliv na chemické generování hydridu ani při vyšších koncentracích oproti arsenu. Hořčík je tedy další prvek, který můžeme vyloučit ze seznamu interferentů.

#### 4.4.5. Vápník

Vápník je jeden z nejvýznamnějších kovů alkalických zemin. Ve vodě společně s hořčíkem způsobuje přechodnou tvrdost vody. Při měření interferencí bylo zjištěno, že vápník neinterferoval až do poměru As:Ca 1:100, kdy byl zjevný pokles 20 % oproti původnímu signálu pro arsen. Interferenční vliv vápníku sice nemůžeme vyloučit, ale nebude zařazen ani do významných interferentů.

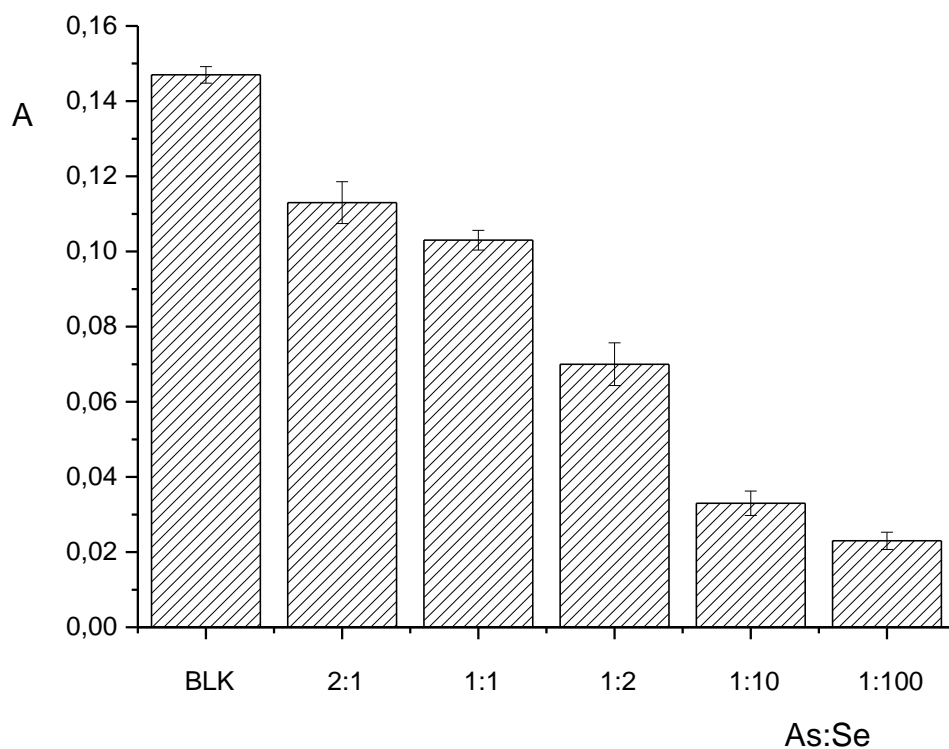
#### 4.4.6. Zinek

Zinek je zástupce skupiny přechodných kovů, který se vyskytuje v pivu a jeho přítomnost v organismu je nezbytnou podmínkou pro správné fungování řady enzymatických systémů.

Při měření bylo zjištěno, že zinek nemá vliv na chemické generování arsenu. Pokles absorbance nebyl pozorován ani u vysokých absorbancí, proto můžeme zinek vyloučit ze seznamu interferentů.

#### 4.4.7. Selen

Selen je významný hydridotvorný prvek, proto bylo očekáváno, že při chemickém generování bude soutěžit s olovem o redukční činidlo. Z obr. 4.9. je patrné že předpoklady se potvrdily a selen výrazně snižuje hodnotu signálu arsenu. Selen je tedy jeden z nejvýznamnějších interferentů při chemickém generování arsenu.



Obr. 4.9.: Vliv selenu na chemické generování arsenu

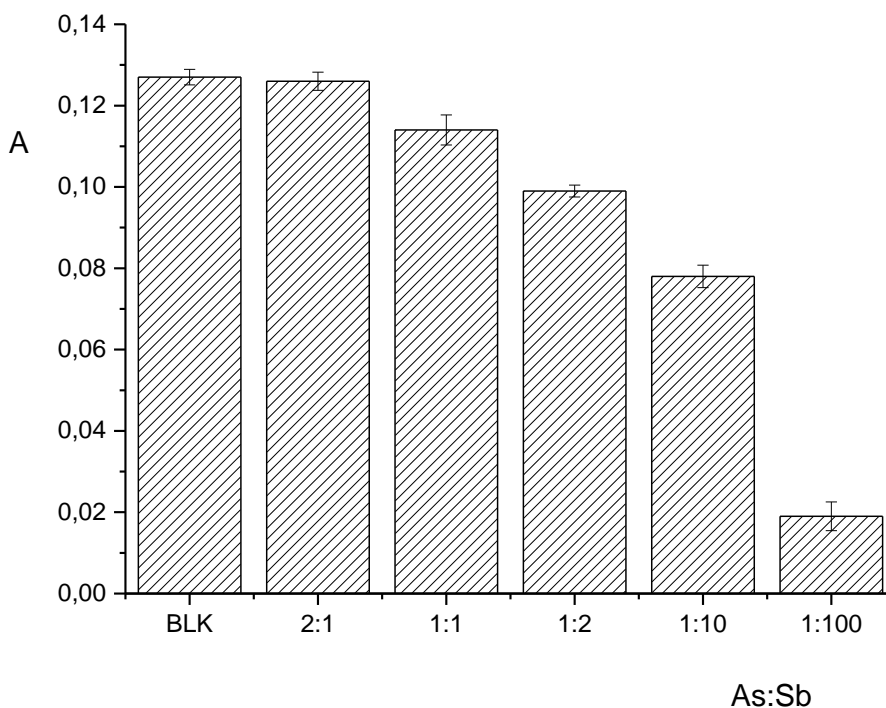
$v_{Ar} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $HCl \text{ } 1:1$ ;  $v_{\xi} = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{NaBH_4} = 3\% \text{ v } 0,5\% \text{ NaOH}$ ;  
 $c_{As} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

#### 4.4.8. Olovo

Olovo je další ze skupiny hydridotvorných prvků u kterých se očekává vyšší interference. V tomto případě však tato teorie nebyla zcela potvrzena. U všech přídavek koncentrace olova byl stejný pokles naměřeného signálu pro arsen a to o 20 %. U tohoto prvku tedy není úbytek signálu závislý na koncentraci. Olovo můžeme zařadit do skupiny interferentů s nepříliš vysokým významem, vzhledem k nízkému úbytku signálu.

#### 4.4.9. Antimon

Antimon je další zástupce hydridotvorných prvků. Tomu, že bude s arsenem interferovat nasvědčuje také to, že oba prvky patří do stejné skupiny periodické tabulky. Výsledná interference je zobrazena na obr. 4.10. Nejvyšší interference bylo dosaženo při poměru As:Sb 1:100, což odpovídalo poklesu signálu o 85%.



**Obr. 4.10.:** Vliv antimonu na chemické generování hydridu

$v_{Ar} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $HCl$  1:1;  $v_c = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{NaBH_4} = 3\%$  v 0,5%  $NaOH$ ;  $c_{As} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

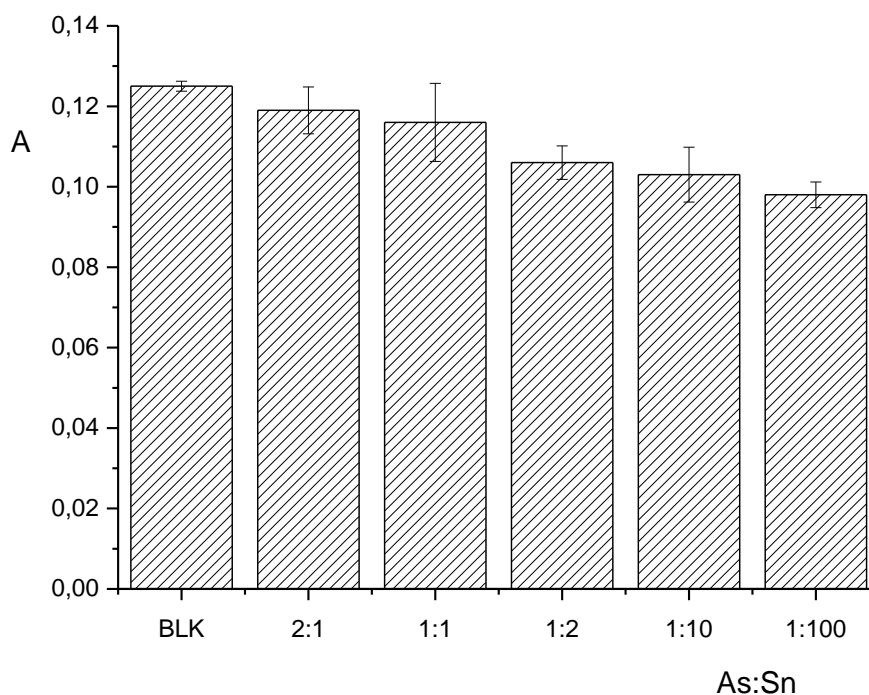
#### 4.4.10. Bismut

U bismutu byly předpokládány obdobné interference jako u předešlých hydridotvorných prvků. Bismut ovšem nevykazoval žádné interference až do poměru As:Bi 1:100, kdy byl zaznamenán pokles signálu o 25 %. Bismut tedy interferuje při stanovení arsenu až při stonásobně vyšších koncentracích.



#### 4.4.11. Cín

Cín je dalším zástupcem hydridotvorných prvků u kterého se očekával interferující vliv na chemické generování arsenu. Z obr. 4.11. je patrné, že hodnota signálu pro arsen klesá s rostoucí koncentrací cínu. Pokles je ovšem velice pozvolný a při stonásobně vyšší koncentraci cínu oproti arsenu je pokles signálu o 20 %.



**Obr. 4.11.:** Vliv cínu na chemické generování arsenu

$v_{Ar} = 75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $HCl$  1:1;  $v_c = 4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $c_{NaBH_4} = 3\%$  v 0,5%  $NaOH$ ;  $c_{As} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

## 5. ZÁVĚR

Pro stanovení arsenu byla optimalizována metoda generování těkavých hydridů s detekcí pomocí atomové absorpční spektrometrie. Byla optimalizována průtoková rychlost argonu na hodnotu  $75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , optimální průtoková rychlost reakčních činidel byla  $4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a vzorku  $5,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Při stanovení arsenu touto metodou byl jako redukční činidlo použit 3 %  $\text{NaBH}_4$  v 0,5 %  $\text{NaOH}$ , pro okyselení vzorku byla použita  $\text{HCl}$  naředěná 1:1 destilovanou vodou. S touto optimalizací parametrů bylo dosaženo LOD  $0,32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a LOQ  $1,05 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo vyzkoušeno stanovení arsenu ve vzorcích ječmene, sladu a pitné vody jakožto surovinách pro výrobu piva. Bylo zjištěno, že matrice piva je za daných podmínek nevhodná pro techniku generování těkavých hydridů díky bouřlivé reakci v separátoru fází, kterou se nepovedlo odstranit žádným z přípravných kroků. Byl zkoumán vliv předredukce, který pravděpodobně posiluje vliv některé z interferujících látek pro stanovení arsenu. Další část této práce byla tedy věnována studii interferencí a bylo popsáno několik prvků, které potlačují hodnotu naměřeného signálu pro arsen. Interferenční vliv lze potvrdit u selenu, antimonu, cínu, železa a olova.

## 6. BIBLIOGRAFIE

1. Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Příl.1 Mikrobiologické, biologické, fyzikální, chemické a organoleptické ukazatele pitné vody a jejich hygienické limity.
2. Klouda, P.: Moderní analytické metody. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava, *Nakladatelství Pavel Klouda* 2003
3. Welz, B.; Sperling, M.: Atomic Absorption Spektrometry, 3. vyd. *Wiley*, Weinheim (1999)
4. Dědina, J. a kol: Vybrané metody analytické atomové spektrometrie. Československá spektroskopická společnost, Sekce optické atomové spektroskopie, Praha 1987
5. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *John Wiley*, Chichester 1995
6. Zheng, Ch.; Ma, Q.; Wu, L.; Hou, X.; Sturgeon, R. E.: UV photochemical vapor generation – atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation elements, *Microchemical Journal* 95:1, 32-37 (2010)
7. Paleček, J.; Palatý, J.: Toxikologie, hygiena a bezpečnost práce v chemii, *VŠCHT*, Praha (1994)
8. Šíma, J.; Rychlovský, P.: Konstrukce kombinované cely pro elektrochemickou generaci těkavých sloučenin v metodě AAS. *Chemické Listy* 92, 676–679 (1998)
9. Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; Šíma, J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod. *Chemické Listy* 103, 652–660 (2009)

10. Lin, Y.; Wang, X.; Yuan, D.; Yang, P.; Huang, B.; Zhixia, Z.: Flow injection – electrochemical hydride generation technique for atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 7, 287–291 (1992)
11. Hornsey, I. S.: A history of beer and brewing. *The Royal Society of Chemistry* 2003
12. Dyr, J.: Kvasná chemie a technologie I. *SNTL Praha* 1965
13. Fidler, M.; Kolářová, L.: Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické Listy* 103, 232–235 (2009)
14. Corrao, G.; Rubbiati, L.; Bagnardi, V.; Zambon, A.; Poikolainen, K.: Alcohol and coronary heart disease. *Addiction* 95:10, 1505–1523 (2000)
15. Cejpek, K.: Vonné a chuťové složky sladů. *Chemické Listy* 108, 426–435 (2014)
16. Perrocheau, L.; Rogniaux, H.; Boivin, P.; Marion, D.: Probing heat–stable water–soluble proteins from barely to malt and beer. *Proteomics* 5:11 2849–2858 (2005)
17. Rotter, B. A.: Invited Review: Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48, 1-34 (1996)
18. Tacke, B. K; Casper, H.H.: Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 79:2, 472-475 (1996)
19. Kutňák, M.: Vlastnosti a využití chmele a chmelového extraktu. Zlín: *Universita Tomáše Bati ve Zlíně* 2011.
20. Jaskula, B.; Goiris, K.; Rouck, G.D.; Aerts, G; Cooman, L.D.: Enhanced Quantitative Extraction and HPLC Determination of Hop and Beer Bitter Acids. *Journal of institute of brewing*. 113:4, 381-390 (2007)
21. Hasík, T.: Svět piva a piva světa. *Grada Publishing, Praha* 2013

22. Briggs, D. E.; Boulton, Ch. A.; Brookes, P.A.; Stevens, R.: *Brewing Science and practice. Woodhead Publishing* 2004
23. Pohl, P.: Determination and fractionation of metals in beer. *Food Additives and Contaminants* 25:6, 693-703 (2008)
24. Weiner, J. P.; Taylor, L.: Determination of Metals in Beer and Wine by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Journal of the Institute of Brewing.* 75:2, 97–206 (1969)
25. Nascentes, C. C.; Kamogawa, M. Y.; Fernandes, K. G.; Arruda, M. A. Z; Nogueira, A.R.A.; Nóbrega, J. A.: Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta.* 60:5, 749-753 (2005)
26. Adriano, D. C.: Arsenic. *Trace Elements in Terrestrial Environments.* 219–261, 2001
27. Webster, S. H.: The development of the Marsh test for arsenic. *J. Chem. Educ.* 24, 487 (1947).
28. Cullen, W. R.; Reimer, K. J.: Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89:4, 713–764 (1989)
29. Meharg, A. A.: Arsenic in rice – understanding a new disaster for South-East Asia. *Trends in Plant Science* 9:9, 415-417 (2009)
30. Mariela, F. H. S.; Matos-Reyes, M. N.; Cervera, M. L.; Costa-Ferreira, S. L.; Guardia, M.: Screening of Toxic Inorganic Arsenic Species in Garlic. *Food analytical methods.* 4:4, 447–452 (2011)
31. Van Halem, D.; Bakker, S. A.; Amy, G. L.; Van Dijk, J. C.: Arsenic in drinking water: A worldwide water quality concern for water supply companies. *Civil Engineering and Geosciences. Delft University of Technology.* 2009
32. Florea, A. M.; Büsselberg, D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals* 19:4, 419-427 (2006)

33. Ratnaike, R. N.: Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal* 79:933, 391–396 (2003)
34. Hall, A. H.: Chronic arsenic poisoning. *Toxicology Letters* 128, 69–72 (2002)
35. Andreae, M. O.: Determination of arsenic species in natural waters. *Analytical chemistry*. 49:6 820–823 (1977)
36. Thompson, K. C.; Thomerson D. R.: Atomic-absorption studies on the determination of antimony, arsenic, bismuth, germanium, lead, selenium, tellurium and tin by utilising the generation of covalent hydrides. *Analyst*. 99, 595–601 (1974)
37. Samanta, G.; Chowdhury, R. T; Mandal, B. K; Biswas, B. K.; Chowdhury, U. K.; Basu, G. K.; Chanda, Ch. R.; Lodh, D.; Chakraborti, D.: Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry for Determination of Arsenic in Water and Biological Samples from Arsenic-Affected Districts of West Bengal, India, and Bangladesh. *Microchemical Journal*. 62:1, 174-191 (1999)
38. Wang, D.; Shimoda, Y.; Wang, S.; Wang, Z.; Liu, J.; Liu, X.; Jin, H.; Gao, F.; Tong, J.; Yamanaka, K.; Zhang, J.; An, Y.: Total arsenic and speciation analysis of saliva and urine samples from individuals living in a chronic arsenicosis area in China. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 22:1, 140–176 (2017)
39. Sun, Y. Ch.; Mierzwa, J.; Yang, M.: New method of gold-film electrode preparation for anodic stripping voltammetric determination of arsenic (III and V) in seawater. *Talanta*. 44:8, 1379–1387 (1997)
40. Forsberg, G.; O'Laughlin, J. W.; Megargle, R.G.; Koirtiyhann, S.R.: Determination of arsenic by anodic stripping voltammetry and differential pulse anodic stripping voltammetry. *Analytical chemistry*. 47:9, 1586–1592 (1975)
41. Pierce, F. D.; Brown, H.R.: Comparison of inorganic interferences in atomic absorption spectrometric determination of arsenic and selenium. *Analytical chemistry*. 49:9, 1417–1422 (1977)

42. Kirkbright, G. F.: Taddia M.: Application of masking agents in minimizing interferences from some metal ions in the determination of arsenic by atomic absorption spectrometry with the hydride generation technique. *Analytica Chimica Acta*. 100, 145-150 (1978)