

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Helena Nedorostová

Stanovení zinku v potravinových doplňcích
Determination of zinc in food supplements

Bakalářská práce

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

Praha, 2018

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 1. května 2018.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení zinku (zinečnatých iontů) v potravinových doplňcích pomocí atomové absorpční spektrometrie. Součástí práce je také porovnání mezi detekce dvou odlišných atomových spektrometrů. Cílem práce bylo zjistit optimální podmínky a vliv interferencí na stanovení zinku, nalézt vhodnou metodu pro převedení vzorku do roztoku, a také porovnat meze detekce u použitých přístrojů. Optimalizovanými parametry byla výška paprsku nad hranou hořáku, průtoková rychlost acetylenu, otočení hořáku, šířka spektrálního intervalu, typ plamene. Převedení pevného vzorku do roztoku bylo provedeno ve vodě za laboratorní i zvýšené teploty, v kyselině dusičné nebo kyselině dusičné s přísadkou peroxidu vodíku, též za zvýšené teploty. Analyzovány byly tyto potravinové doplňky: Centrum od A až po železo, Walmark-vápník, hořčík, zinek, Spektrum 50+, Calibrum 50 plus, Supradyn Energy Complex. Množství zinku v potravinových doplňcích bylo stanoveno na spektrometru GBC 933 AA v kolmém uspořádání. K porovnání meze detekce byly použity přístroje GBC 933 AA s výbojkou s dutou katodou a ContrAA 700 s xenonovou výbojkou. U obou přístrojů byl pro experiment použit plamen obsahující acetylen-vzduch. Pro stanovení zinku byla pomocí standardních roztoků vytvořena kalibrační křivka, z níž byly odečteny výsledné koncentrace analyzovaných vzorků. Ke zjištění meze detekce přístrojů byla použita sada měření standardního roztoku. Všechny experimentálně získané hodnoty byly statisticky zpracovány a stanovené množství zinku bylo porováno s hodnotami deklarovanými od výrobce potravinových doplňků. Na základě zjištěných údajů je možné konstatovat, že vliv vybraných interferentů na stanovení zinku pomocí atomové absorpční spektrometrie je s korekcí pozadí zanedbatelný a za účinný rozklad vzorku lze považovat použití samotné kyseliny dusičné nebo s přísadkou peroxidu vodíku za zvýšení teploty. Z výsledných meze detekce u spektrometrů GBC 933 AA (0,012 mg/l) a ContrAA 700 (0,023 mg/l) vyplývá, že atomový absorpční spektrometr GBC 933 AA umožňuje detekovat nižší koncentrace než ContrAA 700. Hlavním zjištěním této práce tedy je, že výsledky naší analýzy odpovídají hodnotám deklarovaným od výrobce a atomová absorpční spektrometrie je vhodná metoda pro stanovení zinku v potravinových doplňcích a lze ke stanovení použít oba uvedené přístroje.

Klíčová slova

Zinek, potravinové doplňky, atomová absorpční spektrometrie, rozklad vzorku, interference, mez detekce.

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Jakobovi Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu při zpracování této bakalářské práce a děkuji také své rodině za podporu při studiu.

Obsah

1	ÚVOD	- 7 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 8 -
2.1	Atomová absorpční spektrometrie (AAS).....	- 8 -
2.1.1	Experimentální uspořádání atomové absorpční spektrometrie.....	- 8 -
2.1.2	Plamenová atomová absorpční spektrometrie (F-AAS).....	- 10 -
2.1.3	Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie (ET-AAS).....	- 11 -
2.1.4	Hydridová atomová absorpční spektrometrie (HG-AAS)	- 11 -
2.2	Atomová emisní spektrometrie (AES)	- 12 -
2.2.1	Plamenová atomová emisní spektrometrie	- 13 -
2.3	Zinek	- 14 -
2.4	Doplňky stravy	- 15 -
2.5	Statistické zpracování výsledků	- 15 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 17 -
3.1	Charakteristika vzorků	- 17 -
3.2	Používané přístroje a zařízení, pracovní parametry	- 18 -
3.3	Používané chemikálie	- 20 -
3.4	Postup prací	- 20 -
4	VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE	- 22 -
4.1	Optimalizace experimentálních podmínek	- 22 -
4.2	Základní charakteristiky metod stanovení	- 28 -
4.2.1	Charakteristiky stanovení pomocí přístroje GBC 933 AA	- 28 -
4.2.2	Charakteristiky stanovení pomocí přístroje ContraAA 700	- 31 -
4.3	Interferenční studie	- 33 -
4.4	Analýza potravinových doplňků.....	- 34 -
5	ZÁVĚR	- 37 -
6	POUŽITÁ LITERATURA	- 38 -

Seznam uvedených zkratk a symbolů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
F-AAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie
ET-AAS	elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
HG-AAS	hydridová atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
ICP	indukčně vázané plazma
h	výška paprsku nad hranou hořáku [mm]
Q_v	průtoková rychlost acetylenu [m^3/h]
l	posunutí hořáku [mm]
α	otočení hořáku [$^\circ$]
$\Delta \lambda$	šířka spektrálního intervalu [nm]
c	koncentrace [mg/l]
λ	vlnová délka [nm]

1 ÚVOD

Zinek je chemický prvek vyskytující se v půdě, v rostlinách i u živočichů. Zinek se obecně vyskytuje v nízkých koncentracích, avšak jeho přítomnost je z hlediska mnoha faktorů klíčová. V lidském těle je důležitou strukturní složkou bílkovin a přispívá ke správné funkci imunitního systému. Hlavním zdrojem zinku je čerstvé maso, luštěniny nebo ořechy a jeho nesprávná koncentrace v těle se podílí na mnoha metabolických, chronických a imunitních onemocněních.

Pokud je příjem zinku z potravy nedostatečný, musí být nahrazen ve formě potravinových doplňků. V současné době je k dispozici celá řada doplňků stravy obsahující zinek, které lze stanovit různými analytickými metodami. V této bakalářské práci bylo pomocí atomové absorpční spektrometrie zjištěno množství zinku v pěti různých potravinových doplňcích. Součástí práce je také porovnání meze detekce dvou principem odlišných atomových absorpčních spektrometrů.

Cíl bakalářské práce

Hlavním cílem bakalářské práce bylo stanovení zinku (zinečnatých iontů) ve vybraných potravinových doplňcích pomocí atomové absorpční spektrometrie. Vzhledem k využití dvou atomových absorpčních spektrometrů s odlišnými zdroji záření a disperzním systémem, bylo dalším cílem práce porovnání dosažených mezí detekce u obou spektrometrů

Ke splnění hlavních cílů práce bylo potřeba optimalizovat podmínky měření, zjistit vliv interferencí na stanovení zinku v potravinových doplňcích a nalézt vhodný způsob převedení pevného vzorku do roztoku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je optickou metodou, která využívá měření absorbance elektromagnetického záření volnými atomy prvku. Hodnota naměřené absorbance pak závisí na koncentraci stanovovaného prvku. Z historického hlediska se jedná o poměrně mladou fyzikálně-chemickou metodu. První analytický atomový absorpční spektrometr sestrojil v roce 1953 Alan Walsh^{[1],[2]}.

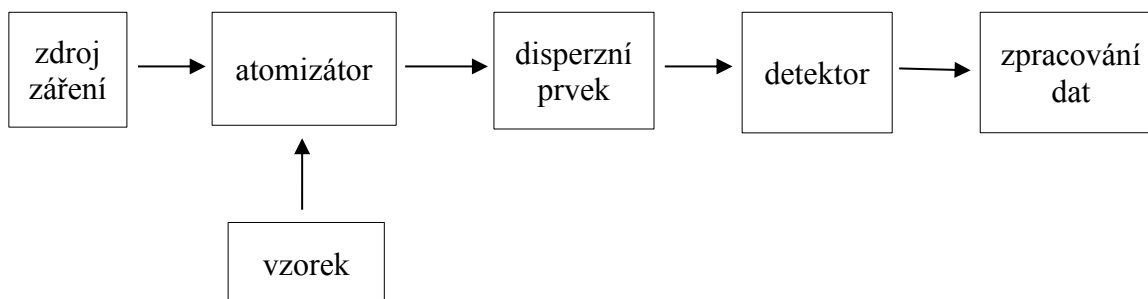
AAS je díky svému provedení řazena mezi relativní a srovnávací metody. Lze ji využít pro stanovení asi 70 prvků (hlavně kovů, ale i nekovů) a to pomocí různých variant. Jednotlivé varianty se rozdělují podle způsobu atomizace sledovaného prvku, a to na: plamenovou AAS (F-AAS), elektrotermickou AAS (ET-AAS) a hydridovou AAS (HG-AAS)^[5].

Při stanovování prvků, rozpuštěných ve vodném nebo nevodném rozpouštědle, se využívá výbojkou emitované záření o určité vlnové délce, která je specificky absorbována stanovovaným prvkem v základním atomárním stavu. Po absorpci záření o určité vlnové délce dochází k přechodu vnějších elektronů ze základního stavu do excitovaného^[3]. Přejít atomu zpět do základního energetického stavu je nezářivým procesem za účasti srážek s ostatními atomy. Výsledek stanovení tedy získáme porovnáním signálu roztoku vzorku se signálem roztoku standardu a tím zjistíme množství absorbovaného záření stanovovaným prvkem, které je přímo úměrné jeho koncentraci.

Díky své vysoké selektivitě a u některých variant provedení vysoké citlivosti (ET-AAS až v pg) se AAS používá v mnoha průmyslových a zdravotnických zařízeních. Slouží pro měření stopových koncentrací nebo také jako detektor pro různé separační (kapilární zónová elektroforéza) a průtoková (průtoková injekční analýza) měření^[2].

2.1.1 Experimentální uspořádání atomové absorpční spektrometrie

Přístroj pro AAS se skládá ze čtyř hlavních částí: zdroje primárního záření, absorpčního prostředí obsahující volné atomy v plynném stavu (atomizátor), monochromátoru a detekčního systému. Schéma atomového absorpčního spektrometru je zobrazeno na obr. 2.1.



Obr. 2.1: Schéma atomového absorpčního spektrometru.

Mezi zdroje primárního záření patří například výbojky s dutou katodou, které slouží jako zdroj čárového spektra stanovovaného prvku. Katoda výbojky je zhotovena z materiálu obsahujícího stanovovaný prvek a je plněna inertním plynem (Ne, Ar). Ionty vzácného plynu přitahované ke katodě vyrážejí z jejího povrchu atomy stanovovaného prvku, které jsou dalšími srážkami excitovány. Poté je při přechodu excitovaných stanovovaných atomů do základního stavu emitováno charakteristické záření. Výbojka je napájena proudem 3-25 mA a mezi elektrody je vloženo vysoké napětí (200-600 V). Některé výbojky mohou být modifikované, a to přidáním emitoru elektronů. Tím se získá vyšší intenzita charakteristického záření než u klasických výbojek s dutou katodou. Dalším příkladem zdroje záření je bezelektrodová výbojka, která obsahuje křemennou baňku, naplněnou za nízkého tlaku (30-300 Pa) vzácným plynem a stanovovaným prvkem ve formě těkavé sloučeniny. Baňka je umístěna v cívce vysokofrekvenčního generátoru, který ji dodává energii (27 MHz) pro vytvoření stabilního prstencového výboje. Tyto výbojky mají o několik řádů vyšší intenzitu záření a delší dobu životnosti než výbojky s dutou katodou. Využívají se hlavně u prvků, jejichž analytické čáry leží v oblasti krátkovlnných spekter, obvykle pod 220 nm (As, Bi, Cd, Hg, K, Zn,...). Dalšími možnými zdroji primárního záření pro AAS jsou laserové diody a kontinuální zdroje^[25]. Mezi kontinuální zdroje patří xenonová výbojka, která díky svému speciálnímu uspořádání elektrod vytváří vysokou hustotu záření v celém spektrálním intervalu (185-900 nm). Výkon této lampy dosahuje až 300 W a teplota plasmy asi 10 000 K. Její výhodou je vysoká životnost, stabilní zářivý výkon a možnost využití pro stanovení velkého množství prvků^[29]. Techniky použité pro atomizaci vzorku jsou detailně popsány dále v textu

Jako disperzní prvek slouží v AAS monochromátor pokrývající interval vlnových délek 180 až 860 nm nebo také polychromátor. Disperzní prvek se používá v jedno nebo

dvou paprskovém systému a jeho součástí bývá vstupní a výstupní štěrbinu. Pro detekci záření se využívá především fotonásobič s přibližně 60 fotodiodami^[26].

2.1.2 Plamenová atomová absorpční spektrometrie (F-AAS)

Plamenová atomová absorpční spektrometrie je AAS, která pro atomizaci vzorku využívá energii plamene. Po nasátí kapalného vzorku do přístroje je s účinností 1-5 % ve zmlžovací komoře převeden na jemný aerosol. Vzniklý aerosol je nosným plynem transportován do plamene. Tam je rozpouštědlo vzorku (obvykle voda) odpařeno a zbylý vzorek je díky vysoké teplotě plamene atomizován. Zdrojem záření emitované charakteristické záření o určité vlnové délce je následně v ideálním případě absorbováno pouze stanoveným prvkem přítomným ve vzorku. Jednotlivé prvky absorbují záření specifických vlnových délek v UV nebo VIS oblasti. Záření absorbované plamenem obsahující vzorek se porovnává s absorpcí záření standardů o známé koncentraci. Lze tedy provést velmi přesnou kvantitativní analýzu jednoho prvku ve vzorku^{[3],[4]}.

Před měřením analyzovaného vzorku je potřeba optimalizovat podmínky, protože koncentrace volných atomů není v plamenu všude stejná. Plamenový profil, tedy rozložení volných atomů v celém plameni, se výrazně mění jak v horizontálním, tak i vertikálním směru, a je odlišný pro každý stanovený prvek. Optimalizuje se proto výška paprsku nad hranou hořáku, horizontální poloha hořáku, otočení hořáku, průtoková rychlost acetyleny a šířka štěrbinu monochromátoru.

V praxi se využívají především dva typy plamene. V prvním typu je spalována směs acetyleny a vzduchu a jeho teplota je 2200-2400 °C. Je vhodný pro stanovení asi 30 kovů, ale například u kovů alkalických zemin, molybdeny nebo cínu plamen není schopen prvky zcela atomizovat, neboť se jedná spíše o nízkoenergetický atomizační zdroj. Hliník, beryllium nebo titan pak neatomizuje vůbec (s velmi malou účinností). V tomto případě je třeba použít plamen využívající směs složenou z acetyleny a oxidu dusného, který dosahuje teploty 2600-2800 °C a lze s ním tedy atomizovat i stálejší prvky^{[3],[5]}. Naopak pro alkalické kovy není vhodný, neboť kromě účinné atomizace zde dochází i výrazné ionizaci, čímž se snižuje množství upotřebitelných atomů v základním atomárním stavu. Plamenová atomizace se realizuje pomocí celé řady různých druhů hořáků. Hořáky pro dvě výše zmíněné nejčastěji používané směsi se liší ve velikosti výstupní štěrbinu hořáku.

Díky své vysoké selektivitě, nízkým nákladům na provedení a vysoké toleranci vůči interferenčním vlivům nalézá plamenová atomová absorpční spektrometrie své uplatnění

jak v lékařství a farmacii tak i v průmyslu. Používá se například ke stanovení kovů v tělních tekutinách, v pitné nebo mořské vodě, v pivu, ve víně, v leteckém benzínu a mnoha dalších surovinách^[3].

2.1.3 Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie (ET-AAS)

Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie byla vynalezena v 60. letech 20. století, kdy byl proveden první známý pokus s tuhým Al_2O_3 . Přístroje pro ET-AAS využívají při stanovování elektrotermické atomizace vzorku grafitových kyvet^[6].

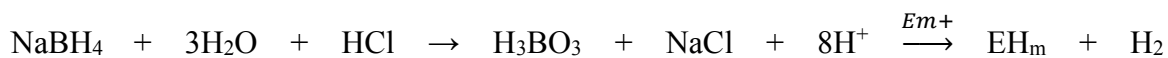
V praxi se do elektricky vodivých grafitových kyvet nanese asi 5-25 μl vzorku. Používaná kyveta se vzorkem je umístěna v elektrotermickém atomizátoru, kde je pak odporově vyhřívána podle konkrétního teplotního programu daného prvku. Nejprve je kyveta zahřívána 30-40 sekund na teplotu sušení (150 °C), aby bylo ze vzorku odpařeno rozpouštědlo. K odstranění matrice (těkavý organický materiál, anorganické soli) je pak teplota po dobu 30 sekund zvýšena na teplotu pyrolýzy (600 °C). Následně kyveta dosáhne na 5-10 sekund teploty atomizace (2000 až 2500 °C), kdy dojde k atomizaci vzorku a vlastnímu měření. Nakonec je kyveta vyčištěna, a to pomocí teploty čištění, která dosahuje 2700 °C a tím zajišťuje odstranění zbylého vzorku z kyvety. Po ochlazení je přístroj připraven na nové dávkování vzorku. Během zahřívacího cyklu je grafitová kyveta promývána argonovým plynem, aby nedošlo k jejímu spálení. V době měření je průtok argonu zastaven^[3].

Díky své vysoké citlivosti, nízkému detekčnímu limitu (0,01-1 $\mu\text{g/l}$), schopnosti analyzovat celý nadávkovaný vzorek a možnosti přímé analýzy pevných vzorků je ET-AAS moderní používanou metodou, která je o několik řádů citlivější než plamenová atomová absorpční spektrometrie. Mezi její nevýhody patří malý lineární dynamický rozsah, možné interference matrice a potřebná kompenzace pozadí. Hlavní využití našla ET-AAS v analytických laboratořích pro získání velmi přesných stanovení^[7].

2.1.4 Hydridová atomová absorpční spektrometrie (HG-AAS)

Hydridová atomová absorpční spektrometrie je metoda, která slouží pro generaci a atomizaci těkavých sloučenin, tzv. hydridů, které jsou následně pomocí atomové absorpční spektrometrie stanovovány. Stanovení probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku je vhodným způsobem převeden analyt z kapalné do plynné fáze (nejčastěji právě ve formě vzniklého hydridu stanovovaného prvku), v druhém kroku je tato sloučenina atomizována a stanovována. Nejúčinnější a nejčastější způsob generování hydridů je

chemickou cestou pomocí tetrahydridoboritanu sodného stabilizovaného roztokem NaOH v kyselém prostředí HCl. Dochází zde ke vzniku atomárního vodíku, který reaguje s analytem o určitém oxidačním čísle a vzniká tak hydrid společně s vodíkem.



Kdy E je analyt a m+ jeho oxidační číslo. Tímto způsobem lze získat hydridy s As, Bi, Sb, Se, Ge, Sn, Te a Pb^[8]. Vzniklý hydrid je poté unášen nosným plynem (argonem nebo dusíkem) do atomizátoru.

Jako atomizátor může být použit plamen, který je složený z argonu a vodíku nebo dusíku a vodíku. Vodík je v plamenu přítomen, protože vznikl při generování hydridů a je tedy před atomizací promíchán s nosným plynem. Druhou, používanější a citlivější atomizací je použití křemenné trubice ve tvaru T, která je elektricky nebo plamenem (acetylen-vzduch) vyhřívána na 700-1100 °C. Při jednotlivých atomizacích je potřebný přívod kyslíku, který reaguje při vysoké teplotě s H₂ a tím dojde ke vzniku vodíkových radikálů, které se pak srážejí společně s analytem, a tím dojde ke vzniku jednotlivých atomů. Ty jsou poté analyzovány klasickým způsobem v AAS spektrometru^{[8],[9]}.

Díky poměrně dlouhému setrvání atomů v optické dráze je měření s HG-AAS poměrně citlivé (asi jako u ET-AAS). Dalšími výhodami je oddělení analytu od matrice a poměrně nízká absorpce pozadí. Nevýhoda je v možnosti zkoumat pouze prvky schopné vytvářet hydridy a možnost interference. V dnešní době jsou kvůli nízké odolnosti křemene 1000-1100 °C hledány nové alternativy. Jedna z možností je použití safírové trubici na místo křemenné, protože safír má vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti, a to vysokou tvrdost, pevnost a stabilitu i při 2000 °C. Stále je ale nejvíce využívána elektricky vyhřívána křemenná trubice^{[9],[2]}.

2.2 Atomová emisní spektrometrie (AES)

Atomová emisní spektrometrie zkoumá a využívá záření vysílané excitovanými atomy nebo ionty prvků. Za objevitele této metody jsou považováni Gustav Kirchhoff a Robert Bunsen, kteří v 60. letech 19. století jako první excitovali Rb a Cs.

Principem metody je získat zkoumanou látku v excitovaném atomárním stavu, a to pomocí plamene, oblouku, jiskry, laseru, indukčně vázaného plazma (ICP) a dalších elementů, které vytvářejí vysoké teploty a stabilní plazma. Valenční elektrony atomů

setrvávají v excitovaném stavu jen velmi krátkou dobu a při přechodu do základního stavu vysílají polychromatické, avšak nespojité záření, které je následně rozloženo optickým zařízením na čárové spektrum (10 až 1500 nm). Poloha čar (vlnová délka) určuje kvalitativní složení a jejich intenzita pak udává kvantitativní údaj o vzorku. Celkově se tedy atomová emisní spektrometrie využívá hlavně ke kvalitativní a kvantitativní analýze^[2].

Jednou z nejpoužívanějších variant je atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (AES-ICP). Indukčně vázané plazma je vytvořeno v křemenné trubici radiofrekvenčním proudem, který prochází kovem indukční cívky. Tím vzniká elektromagnetické pole, které urychluje elektrony uvnitř trubice a ty předávají srážkami svoji energii atomům inertního plynu (Ar), ze kterého pak vzniká plazma. Při stanovování touto metodou se roztok vzorku nadávkuje do přístroje, kde je zmlžen a vzniklý aerosol je inertním plynem (většinou argonem) unášen k indukčně vázanému plazmatu. Zde je přiveden do plynného stavu, rozložen, atomizován a velmi často i ionizován. Následně jsou díky vysoké energii plazmatu valenční elektrony atomů excitovány do vyšších vrstev a jejich přechod zpět do základního stavu je doprovázen emisí fotonů. Vzniklé fotony jsou pak charakteristické pro určité prvky a jejich množství udává koncentraci prvku v roztoku^[10].

ICP je v dnešní době používáno hlavně díky své vysoké teplotě (7000-8000 K, snižuje vliv matrice), schopnosti atomizovat neb ionizovat velké množství prvků, a také díky svému vysokému detekčnímu limitu (0,1-100 ng/ml), velkému dynamickému rozsahu, přesnosti a schopnosti tolerance k vysoké koncentraci soli. ICP je také používáno jako zdroj iontů pro hmotnostní spektrometrii^{[10],[11]}.

2.2.1 Plamenová atomová emisní spektrometrie

Plamenová atomová emisní spektrometrie využívá k rozložení, atomizaci a excitaci vzorku plamen. Provedením je atomizace prvků stejná jako u F-AAS (viz. kap. 2.1.2). Rozdílem je pouze to, že plamen musí být zároveň i excitačním zdrojem. To je možné jen u prvků, které mají nízký excitační potenciál. Mezi tyto prvky se řadí alkalické kovy a kovy alkalických zemin. Z toho vyplývá, že rozsah použití metody je poměrně úzký^[2].

2.3 Zinek

Zinek je chemický prvek s atomovým číslem 30 a relativní molekulovou hmotností 65,409, který patří mezi d-prvky. Kompletní studii o zinku provedl jako první německý chemik Andreas Sigismund Marggraf (1746)^[12]. Zinek se vyskytuje v půdě, vodě, živých organismech, ale také tvoří společně s mnohými prvky (Cu, Au, Al, Pb, Hg, Mg,...) celou řadu slitin. Nejznámější a už ve středověku používanou je slitina zinku a mědi neboli mosaz.

Zinek patří mezi kovy a má modrobílou barvu s leskem, který se však při oxidaci na vzduchu ztrácí. Hodnota jeho teploty tání 420, °C i teploty varu 907 °C je na kovy poměrně nízká. Hustota zinku je 7,94 g / cm³. Díky své elektronové konfiguraci [Ar]4s² 3d¹⁰ patří mezi přechodné kovy a jeho elektronegativita ho řadí mezi elektropozitivní prvky^[27,28].

Zinek je v různých koncentracích zastoupen ve všech půdách, rostlinách i u živočichů a je potřebný v malých, ale kritických koncentracích^[13]. V lidském těle má pozici druhého nejhojnějšího stopového prvku hned po železu. Je důležitou strukturní složkou mnoha bílkovin a je zejména důležitý pro správnou funkci imunitního systému, ale také pro proliferaci, diferenciaci a syntézu DNA či RNA.

Nesprávná koncentrace zinku v těle se podílí na mnoha metabolických, chronických a imunitních onemocněních. Jako je diabetes, rakovina, malárie, pneumonie, demence, porucha růstu, či snížená funkčnost imunitních buněk (T- a B- lymfocyty)^[14].

Hlavním zdrojem zinku je čerstvé maso, měkkýši, luštěniny nebo ořechy. V lidském těle je asi 2-3 g zinku a jeho nejvyšší zastoupení najdeme ve svalech, kostech a játrech. Denní příjem zinku je pro určité části země odlišný a závisí na pohlaví, věku a hmotnosti^[22]. Za snižování koncentrace zinku v těle je také z části zodpovědná kyselina fytová, která je získávána z obilovin a luštěnin. Tvoří totiž se zinkem nestravitelné soli tzv. fytáty, které zabraňují zinku vstřebat se do těla a tkání.

Nedostatek zinku v těle díky podvýživě je jednou z hlavních příčin zdravotních komplikací v rozvojových zemích^[23]. V naší zemi by si na nedostatek zinku měli dát pozor hlavně vegetariáni, vegani a starší lidé.

Stanovení zinku lze provádět mnoha způsoby, a to pomocí F-AAS, ET-AAS, ICP-MS, XRF, ICP-AES nebo také voltametry. Kromě F-AAS je použití těchto technik v praxi velice nákladné. Její nevýhoda oproti ostatním je ale nízká citlivost stanovení^[15].

2.4 Doplnky stravy

Doplnkem stravy je potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu. Skládá se z koncentrovaných zdrojů vitamínů, minerálních látek a dalších látek s pozitivním nutričním nebo fyziologickým účinkem. Může být obsažen v potravinách nebo tabletách, které jsou určeny k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích^[16].

Potravinové doplňky lze nalézt v mnoha formách, jako například v tabletách, nápojích či prášku. Často ale není možné získat pouze jednu jedinou látku, ale jen její kombinaci s dalšími doplňky. Jejichž společný účinek však může být pro tělo toxický, nebo může dojít k předávkování, protože některé přípravky mohou obsahovat až 100násobek doporučené denní dávky^[24]. V mnoha případech je používání doplňků stravy pro tělo zbytečné a našemu tělu vůbec neprospívá. Zároveň je ale pro některé jedince dobrým placebem, díky kterému se udržují v dobrém psychickém stavu^[17].

Díky jednoduché notifikaci přípravků na Ministerstvu zdravotnictví, při které se neposuzuje jejich účinnost, je na českém trhu obrovské množství doplňků stravy, z nichž některé mohou být i životu nebezpečné. Proto by se v každém případě mělo požívání potravinových doplňků konzultovat s odborným lékařem^[18].

2.5 Statistické zpracování výsledků

Při hodnocení analytických metod a výsledků, získaných z velké části experimentálně, se využívá matematicko-statistických metod. Ty jsou vhodným nástrojem pro zkoumání systému v případech, kdy je nutno učinit objektivní závěr o celku složeného z velkého množství jednotek, přičemž z některých důvodů je možno prozkoumat jen malou, vybranou část tohoto celku^[19]. V této práci byly použité tyto statistické výpočty:

Aritmetický průměr (\bar{x}): je definován jako součet všech naměřených údajů vydělený jejich počtem.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Kde znak \sum symbolizuje součet hodnot x_i pro všechny možné hodnoty indexu i .

Směrodatná odchylka (s): je odmocnina z rozptylu (s^2), který je definován jako průměrná kvadratická odchylka měření od aritmetického průměru, přičemž při průměrování této odchylky dělíme číslem ($n - 1$).

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$
$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Variační koeficient (VK): slouží k posouzení relativní velikosti rozptýlenosti dat vzhledem k průměru. Využívá se k porovnání rozptýlenosti dat skupin měření stejné proměnné s různým průměrem^[20]. Je znám také jako opakovatelnost.

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$$

Limit detekce (LOD): je nejnižší koncentrace analytu, jejíž signál je spolehlivě odlišitelný od analytického šumu a lze ji detekovat. Vypočítá se jako trojnásobek šumu základní linie.

$$LOD = 3 \cdot s_{\text{šum}}$$

Šum základní linie byl vypočítán jako směrodatná odchylka 15krát opakovaného měření stejného vzorku s nízkou koncentrací analytu.

Limit stanovitelnost (LOQ): je nejnižší koncentrace, při níž může být analyt nejen spolehlivě detekován, ale také ho lze číselně vyjádřit s předem stanovenou nepřesností^[21]. Vypočítá se jako desetinásobek šumu základní linie.

$$LOQ = 10 \cdot s_{\text{šum}}$$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Charakteristika vzorků

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit koncentraci zinku ve vybraných potravinových doplncích. Pro experiment byly vybrány následující běžné dostupné potravinové doplňky (obr. 3.1).

Vzorek 1: „Centrum od A až po železo“ (Pfizer, spol. s r.o., ČR)

Přípravek centrum od A až po železo je určený k doplnění vitamínů a minerálů pro dospělé, které mají sníženou imunitu a nedostatek energie. Také slouží pro udržení zdravé kůže a chrání tělo před environmentálním stresem a jeho škodlivými účinky. Přípravek obsahuje kompletní a vyvážené složení vitamínů, minerálů a stopových prvků. Stanovovaná tableta má hmotnost 1,39 g a obsahuje 5 mg zinku ve formě oxidu zinečnatého.

Vzorek 2: „Walmark – Vápník, hořčík, zinek“ (Walmark, a.s., ČR)

Doplněk stravy Walmark – vápník, hořčík, zinek slouží pro optimální fungování lidského organismu. Zejména pak zajišťuje zdravý stav kostí, zubů, kůže a vlasů. Přípravek je vhodný pro děti od 3 let, dospělé, ale i v době těhotenství, při kojení či rekonvalescenci. Tableta je složena pouze z vápníku, hořčíku a zinku. Kdy zinek je zde zastoupen ve formě citrátu a glukonátu zinečnatého. Hmotnost tablety je 1,45 g a koncentrace zinku v tabletě činí 8,3 mg.

Vzorek 3: „Spektrum 50+“ (Walmark, a.s., ČR)

Spektrum 50+ je multivitaminový a multiminerální přípravek určen pro lidi ve stáří, kterým napomáhá k udržení fyzické a duševní vitality, k vstřebávání vápníku v zaživacím traktu a také k správné stavbě kostí. Doplněk stravy obsahuje kromě vitamínů a minerálů také ženšen, který podporuje činnost paměti. Zinek je zde zastoupen ve formě citrátu zinečnatého. Hmotnost tablet je 1,40 g a koncentrace zinku v tabletě činí 10 mg.

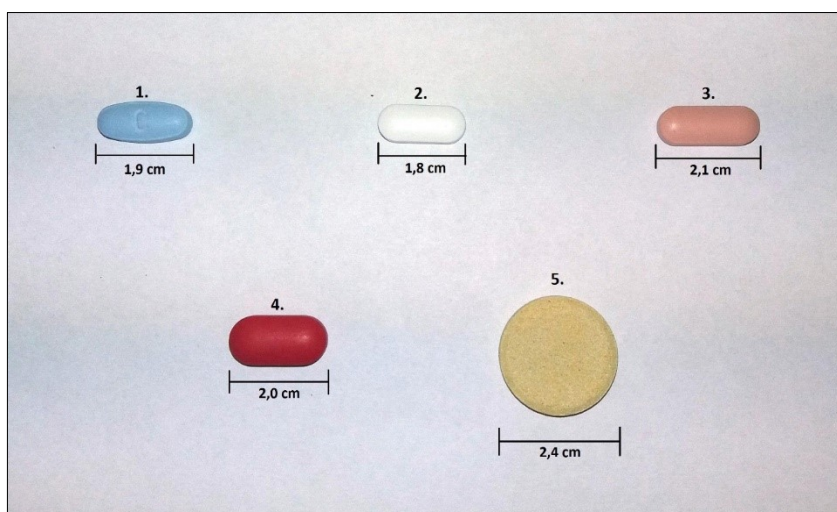
Vzorek 4: „Calibrum 50 plus“ (Zentiva a.s., ČR)

Přípravek Calibrum 50 plus je určen především pro lidi nad 50 let, kteří mají problém se špatným zažíváním a metabolismem, ale také pro kuřáky, při nevyvážené stravě, u ženy užívající antikoncepci nebo při nadměrné fyzické a duševní zátěži. Calibrum 50 plus obsahuje celkem 13 vitamínů, beta karoten, 15 minerálů, Ginkgo bilobu a ženšen. Zinek je

zde zastoupen ve formě minerálů. Hmotnost tablety je 1,66 g a koncentrace zinku v tabletě činí 15 mg.

Vzorek 5: „Supradyn Energy Complex“ (Bayer s.r.o., ČR)

Šumivý doplněk stravy Supradyn Energy Complex je určen pro dospělé a děti od 6 let. Obsahuje celou řadu vitamínů, minerálů a stopových prvků, které tělu dodávají energii, udržují správnou funkci metabolismu a podporují imunitní systém. Zinek je zde zastoupen ve formě citronanu zinečnatého. Hmotnost tablety je 4,56 g a koncentrace zinku v tabletě činí 6 mg.



Obr. 3.1: Fotografie jednotlivých analyzovaných potravinových doplňků. Vzorky 1-5.

3.2 Používané přístroje a zařízení, pracovní parametry

Optimalizace podmínek a jednotlivá měření byly provedeny na níže uvedených spektrometrech připojených k počítači pro vyhodnocování získaných dat.

Spektrometr GBC 933 AA

Pro stanovení koncentrace zinku v jednotlivých potravinových doplncích, pomocí atomové absorpční spektrometrie, byl použit spektrometr GBC 933 AA (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Australia). Zdrojem záření byla výbojka s dutou katodou pro stanovení zinku. Vlnová délka použitá při měřeních byla 213,9 nm a proud výbojky dosahoval 5 mA. Všechny analýzy byly provedeny s plamenem acetylen-vzduch.

Po optimalizaci podmínek byly jednotlivé experimenty prováděny při 5 mm výšce paprsku nad horní hranou hořáku, průtokové rychlosti acetylenu 1,8 l/min a šířce spektrálního intervalu 0,2 nm. Fotografie spektrometru je na obr. 3.2.



Obr. 3.2: Spektrometr GBC 933 AA (pořízeno v laboratoři)

Spektrometr ContrAA 700

Pro porovnání citlivosti spektrometru GBC 933 AA byl použit spektrometr ContrAA 700 (Analytikjena, ChromSpec spol. s r.o.). Zdrojem záření je zde xenonová výbojka a vlnová délka použitá při měřeních byla 213,9 nm. Podobně jako v předchozím případě byl použit plamen acetylen-vzduch.

Všechna měření byla provedena za doporučených podmínek, a to při šířce spektrálního intervalu 3 px, výšce paprsku nad horní hranou hořáku 6 mm a průtoku acetylenu 0,83 l/min. Fotografie spektrometru je na obr. 3.3.



Obr. 3.3: Spektrometr ContrAA 700 (pořízeno v laboratoři)

3.3 Používané chemikálie

Zásobní roztok zinku ($c = 1,0 \text{ g/l}$, ANALYTIKA, spol. s.r.o.), standardní roztok zinku ($c = 1,0 \text{ mg/l}$), stabilizační roztok $\text{H}_2\text{O} + \text{HNO}_3$ (příprava: 5 ml HNO_3 (65% p.a., Lachner ČR) do 1000 ml destilované vody), deionizovaná voda, zásobní roztok hořčíku ($c = 1,0 \text{ g/l}$, ANALYTIKA, spol. s.r.o.), zásobní roztok vápníku ($c = 1,0 \text{ g/l}$, ANALYTIKA, spol. s.r.o.), zásobní roztok draslíku ($c = 1,0 \text{ g/l}$, ANALYTIKA, spol. s.r.o.), zásobní roztok železa ($c = 1,0 \text{ g/l}$, Marck, spol. s.r.o.), zásobní roztok mědi ($c = 1,0 \text{ g/l}$, BAKER ANALYZED), peroxid vodíku 30% p.a. nestabilizovaný (Lachner ČR), kyselina dusičná 65%, p.a. (Lachner ČR).

3.4 Postup prací

Stanovení optimálních podmínek

Před měřením vlastního vzorku musely být na přístroji nejprve zjištěny optimální podmínky, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti. Všechny optimální hodnoty byly naměřeny s roztokem zinku, který byl připraven ze zásobního roztoku ($1,0 \text{ g/l}$) a měl koncentraci $1,0 \text{ mg/l}$. Použitá vlnová délka při jednotlivých měřeních byla $213,9 \text{ nm}$ a proud lampy dosahoval 5 mA .

Při měřeních byla stanovena optimální výška paprsku nad hranou hořáku, průtoková rychlost paliva (acetylenu), horizontální poloha hořáku, otočení a typ hořáku, šířka spektrálního intervalu a také typ plamene. Za optimální podmínky byly považovány ty, které po grafickém zpracování vykazovaly nejvyšší signál.

Kalibrace AAS

Pro kalibraci byla připravena sada 13-ti roztoků o koncentraci $0,010$; $0,050$; $0,10$; $0,25$; $0,50$; $1,0$; $2,5$; $5,0$; 10 ; 25 ; 50 ; 100 a 250 mg/l . Prvních 10 roztoků bylo proměřeno s paralelně procházejícím paprskem záření při různé šířce spektrálního intervalu. Následně bylo všech 13 roztoků proměřeno v kolmém uspořádání hořáku při šířce spektrálního intervalu $0,2 \text{ nm}$. Nakonec byly vybrány dvě různé koncentrační hladiny roztoků pro paralelní i kolmé uspořádání hořáku, a to o koncentraci $0,050$ a $2,5 \text{ mg/l}$ pro paralelní uspořádání a $0,50$ a 50 mg/l pro kolmé uspořádání. Každý z roztoků byl měřen 15krát a z naměřených výsledků byla vypočítána směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka, průměrná hodnota signálu, opakovatelnost, limit detekce a limit stanovitelnosti.

Kalibrace přístroje ContrAA 700

Na přístroji ContrAA 700 byly naměřeny kalibrace při různých šířkách spektrálního intervalu (1, 3, 5 a 11 pixelů). Pro experiment byly použity standardní roztoky zinku o koncentraci 0,010; 0,050; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 a 100 mg/l. Poté byla vybrána optimální šířka spektrálního intervalu (3 pixely), při které byly 15krát naměřeny absorbance roztoků o koncentraci 0,050 a 2,5 mg/l. Nakonec byly výsledky zpracovány a byla z nich určena základní charakteristika AAS pro přístroj ContrAA 700.

Interferenční studie

Pro zjištění vlivu interferencí byly použity roztoky zinku obsahující vždy jednu interferující látku. Vybranými prvky pro možnou interferenci byly draslík, hořčík, železo, měď a vápník. Při experimentu byly do 100 ml odměrných baněk vytvořeny sady čtyř roztoků o různé koncentraci interferenčních prvků, kdy v připravovaném roztoku byla koncentrace zinku vždy 10,0 mg/l a každý roztok obsahoval pouze jednu interferenční složku.

Koncentrace hořčíku, draslíku a železa v roztocích zinku byla 0; 1,0; 10 a 100 mg/l. Pro měď byla připravovaná koncentrace 0; 1,0; 10 a 50 mg/l a pro vápník 0; 10; 100 a 500 mg/l. Všechny vytvořené roztoky byly proměřeny v kolmém uspořádání hořáku a při optimálním nastavení přístroje. Nakonec byly všechny experimentálně získané výsledky zpracovány a vyhodnoceny.

Příprava a analýza potravinových doplňků

Jednotlivé potravinové doplňky byly zváženy na analytických vahách 2004 MP (Sartorius, ČR), a to nejprve v celku a následně po redukci pomocí třecí misky s tloučkem. Celkem byly provedeny 4 rozklady, a to ve vodě za laboratorní i zvýšené teploty, v kyselině dusičné a v kyselině dusičné s peroxidem za zvýšené teploty. Při rozkladu ve vodě byly jednotlivé tablety převedeny do 100 ml odměrné baňky. U analýzy s kyselinou dusičnou byly vzorky nejprve rozloženy v 30 ml 65 % kyselině dusičné a po zahřátí na 60 °C byly doplněny do 100 ml vodou. Při posledním rozkladu s kyselinou dusičnou a peroxidem byly vzorky rozloženy v 30 ml 65 % kyselině dusičné a v 10 ml 30 % peroxidu vodíku a po zahřátí na 60 °C byly doplněny do 100 ml vodou. Všechny vzorky pak byly 10krát zředěny a analyzovány na přístroji GBC 933 AA bez i s korekcí pozadí. Nakonec byly všechny naměřené hodnoty vyhodnoceny a statisticky zpracovány.

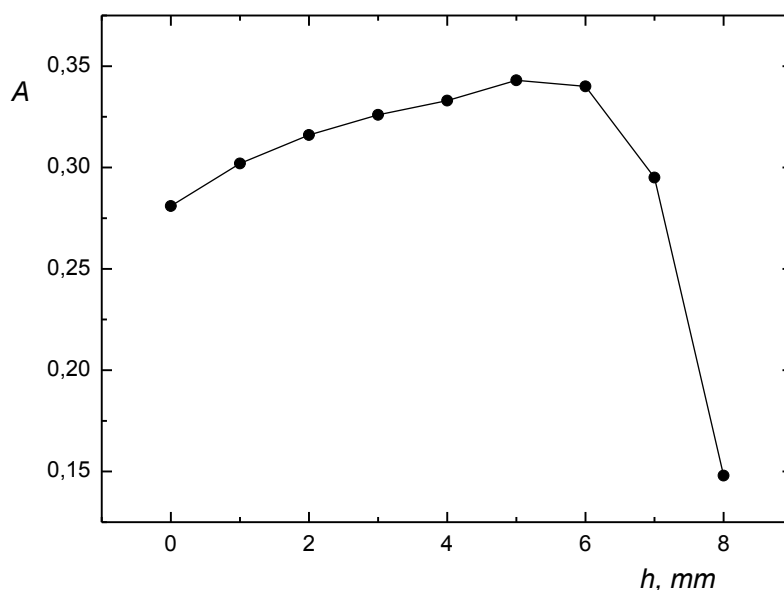
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

4.1 Optimalizace experimentálních podmínek

V následující části bude popsána optimalizace jednotlivých podmínek pro stanovení zinku pomocí atomové absorpční spektrometrie s využitím přístroje GBC 933 AA. Není-li uvedeno jinak, všechna měření byla provedena 3krát, jako výsledky měření jsou uvedeny mediány a směrodatné odchylky jednotlivých měření jsou vyjádřeny pomocí chybových úseček.

Výška paprsku nad hranou hořáku

Prvním optimalizovaným parametrem této techniky byla výška paprsku procházejícího nad hranou hořáku. Pro tento experiment byla použita koncentrace zinku 1,0 mg/l a byly proměřeny výšky paprsku v rozmezí 0-8 mm s intervalem 1 mm. Získané výsledky jsou uvedeny na obr. 4.1.



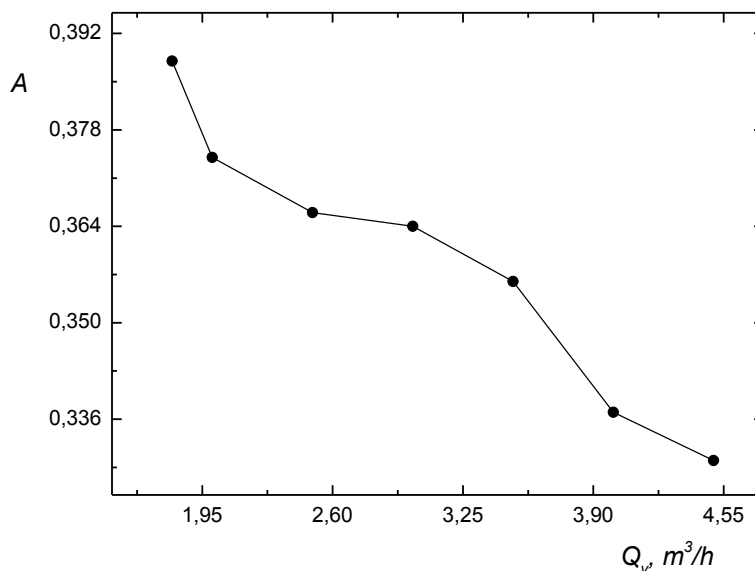
Obr. 4.1: Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku

$Q_v = 3,0$ l/min, $c_{Zn} = 1,0$ mg/l, $\Delta \lambda = 0,5$ nm

Z naměřených výsledků je patrné, že nejvyšší koncentrace volných atomů v základním stavu se vyskytovala ve výšce 5 mm nad hranou hořáku, a že s dalším nárůstem výšky paprsku docházelo k prudkému poklesu signálu. Proto byla hodnota 5 mm dále použita jako optimální.

Průtoková rychlost acetylenu

Pro zjištění optimálního průtoku acetylenu byl opět použit roztok zinku o koncentraci 1,0 mg/l. Na přístroji pak byly naměřeny jednotlivé absorbance při průtoku acetylenu v rozmezí 1,8-4,5 l/min. Získané výsledky jsou uvedeny na obr. 4.2.

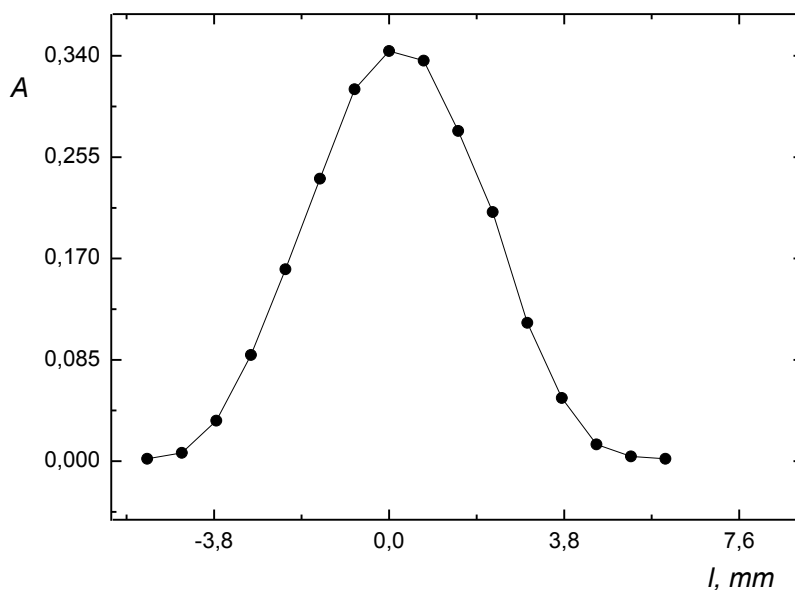


Obr. 4.2: Stanovení optimálního průtoku acetylenu
 $h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $c_{\text{Zn}} = 1,0 \text{ mg/l}$, $\Delta \lambda = 0,5 \text{ nm}$

Z grafu vyplývá, že nejvyšší signál byl zaznamenán při průtoku acetylenu 1,8 l/min. S největší pravděpodobností by však při nižším průtoku byla citlivost přístroje ještě vyšší, ale při tomto nastavení by plamen nevzplanul. Proto nemohly být další hodnoty naměřeny a za optimální průtokovou rychlost acetylenu je v dalším měření považována hodnota 1,8 l/min.

Horizontální poloha hořáku

Informace o optimální horizontální poloze hořáku nelze nastavit na přístroji, proto byly v našem experimentu zjištěny pomocí pravítka. Celkové posunutí hořáku bylo 1,5 cm, a to pomocí dvaceti otáček regulačního šroubu. Výsledky získané měřením nalezneme na obr. 4.3.



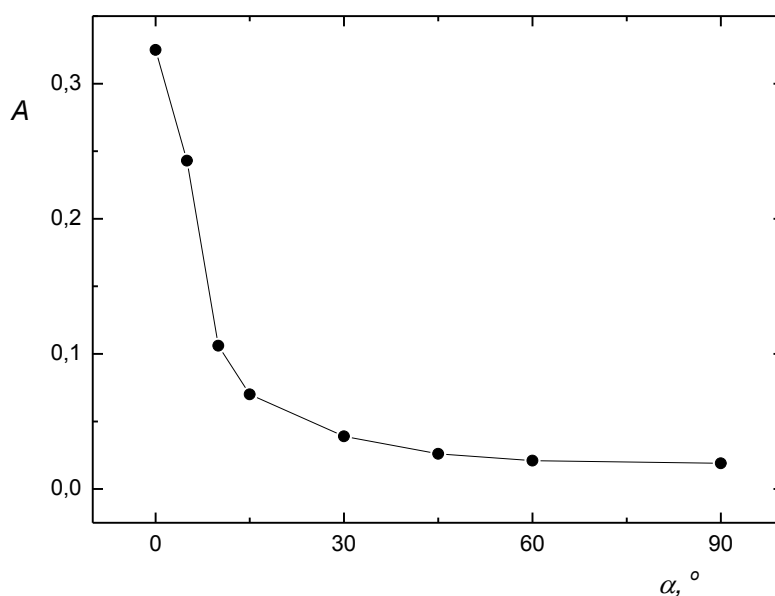
Obr. 4.3: Optimalizace horizontální polohy hořáku

$$h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}, c_{\text{Zn}} = 1,0 \text{ mg/l}, Q_v = 1,8 \text{ l/min}, \Delta \lambda = 0,5 \text{ nm}$$

Z naměřených výsledků vyplývá, že nejvyšší citlivost přístroje byla zjištěna přesně v místě průchodu paprsku záření středem plamene. Při vychýlení hořáku na jednu nebo druhou stranu signál výrazně klesal.

Otočení hořáku

Čtvrtá optimalizace se vztahovala na polohu hořáku k procházejícímu paprsku, a to pro stupeň otočení o 0°, 5°, 10°, 15°, 30°, 45°, 60° a 90° od jeho paralelního uspořádání. Výsledné signály jsou pak zobrazeny na obr. 4.4.



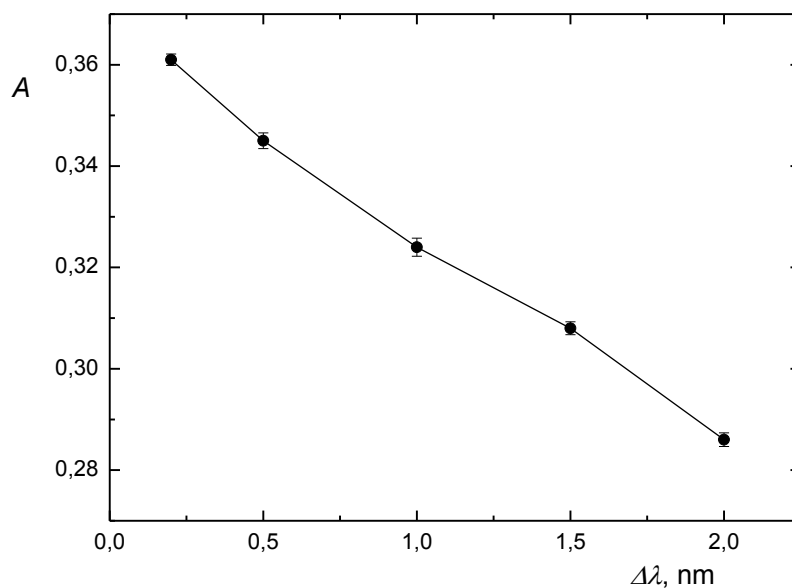
Obr. 4.4: Stanovení optimálního otočení hořáku

$h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $c_{\text{Zn}} = 1,0 \text{ mg/l}$ $Q_v = 1,8 \text{ l/min}$, $\Delta \lambda = 0,5 \text{ nm}$

Již předem se předpokládalo, že při úhlu 0° bude měření nejcitlivější, protože změnou úhlu hořáku dochází ke snížení délky absorbované zóny. Po grafickém zpracování bylo viditelné, že náš předpoklad byl správný, a proto se hořák ponechal na 0° i pro další měření.

Šířka spektrálního intervalu

Pro zjištění optimální šířky spektrálního intervalu byl opět použit roztok zinku o koncentraci $1,0 \text{ mg/l}$ a následně byly proměřeny šířky spektrálního intervalu v rozmezí $0,2\text{-}2 \text{ nm}$. Výsledky měření jsou zaznamenány na obr. 4.5

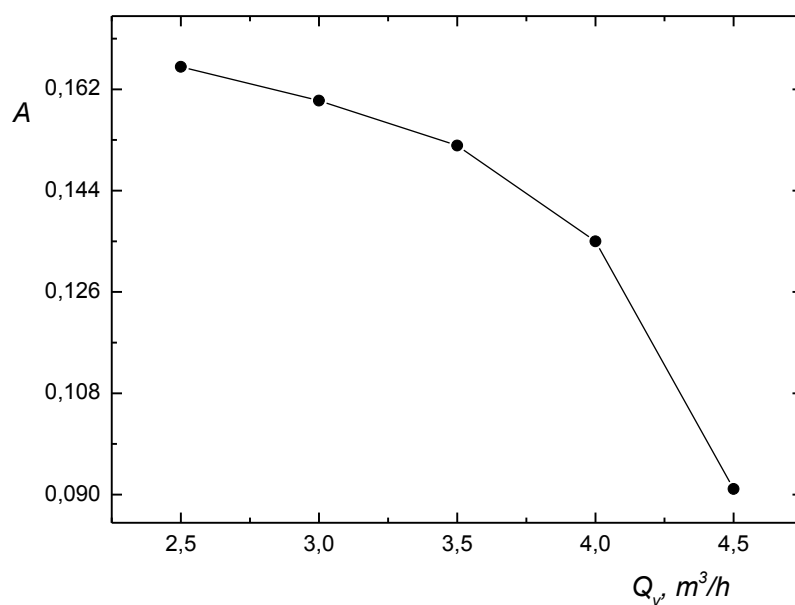


Obr. 4.5: Optimalizace šířky spektrálního intervalu
 $h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $c_{\text{Zn}} = 1,0 \text{ mg/l}$, $Q_v = 1,8 \text{ l/min}$

Z grafu lze vyčíst, že optimální šířka spektrálního intervalu byla 0,2 nm a že při dalším zvyšování jeho hodnoty dosahovala měření nižších citlivostí.

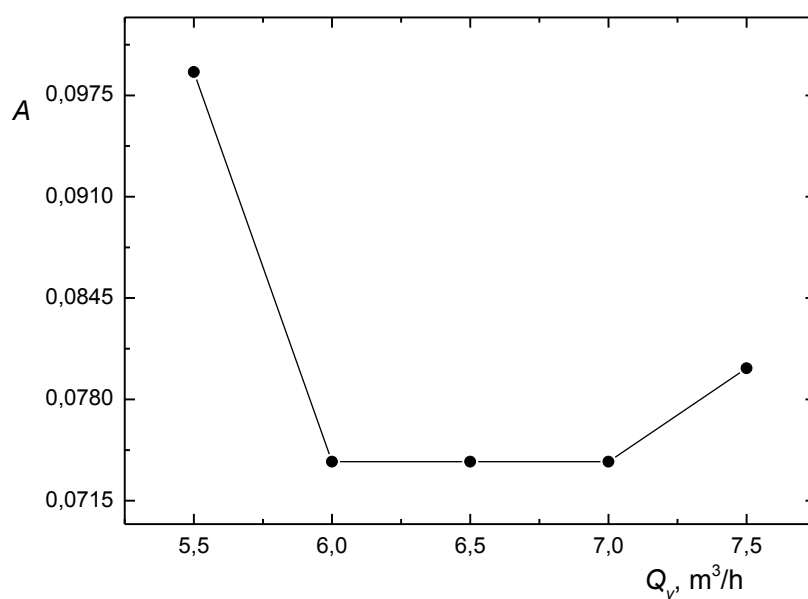
Typ hořáku a plamene

Posledním optimalizovaným parametrem na přístroji GBC 933 AA byl typ hořáku a plamene. Měření bylo provedeno s hořákem pro acetylen-oxid dusný, na kterém byly vyzkoušeny oba typy plamene (acetylen-vzduch, acetylen-oxid dusný) při různé výšce hořáku a průtoku acetyleny. Výsledky měření jsou zaznamenány na obr. 4.6, 4.7 a 4.8.



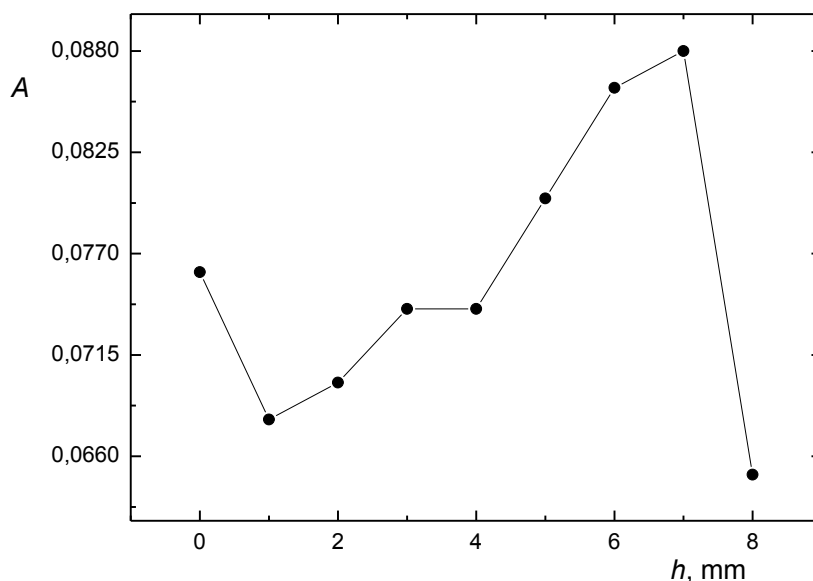
Obr. 4.6: Citlivost měření pro hořák acetylen-oxid dusný a plamen acetylen-vzduch při změně průtoku acetyleny.

$h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $c_{\text{Zn}} = 1,0 \text{ mg/l}$, $\Delta \lambda = 0,2 \text{ nm}$



Obr. 4.7: Citlivost měření pro hořák acetylen-oxid dusný a plamen acetylen-oxid dusný při změně průtoku acetyleny.

$h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $c_{\text{Zn}} = 1 \text{ mg/l}$, $\Delta \lambda = 0,2 \text{ nm}$



Obr. 4.8: Citlivost měření pro hořák acetylen-oxid dusný a plamen acetylen-oxid dusný při změně výšky plamene.
 $c_{Zn} = 1 \text{ mg/l}$, $Q_v = 1,8 \text{ l/min}$, $\Delta \lambda = 0,2 \text{ nm}$

Po porovnání naměřených výsledků s obr. 4.1 a 4.2 je jasné, že za optimální a také dále používaný typ hořáku a typ plamene je ten pro acetylen-vzduch, protože jeho citlivost dosahuje nejvyšších hodnot.

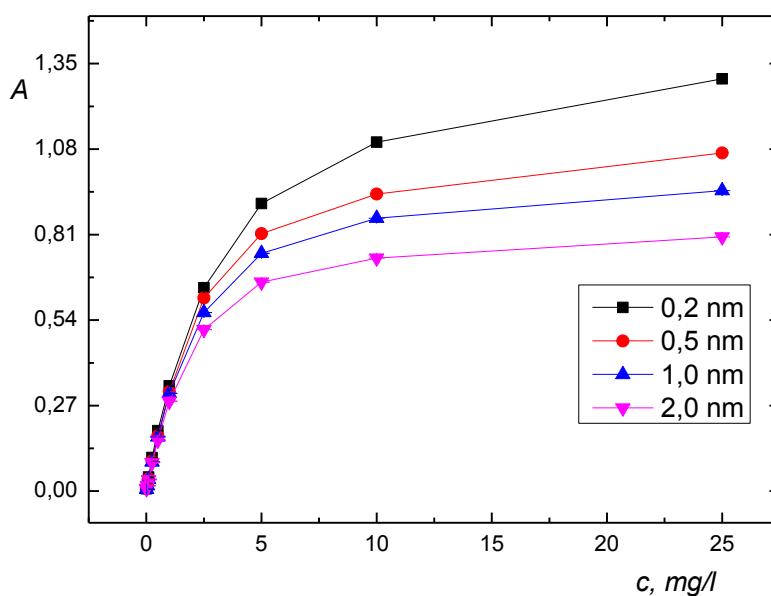
4.2 Základní charakteristiky metod stanovení

V dalším kroku bylo přistoupeno ke kalibraci a základní charakteristice atomové absorpční spektrometrie dvou různých spektrometrů. Není-li uvedeno jinak všechna měření byla provedená opět 3krát, jako výsledky jsou uvedeny mediány a jako směrodatné odchylka chybové úsečky.

4.2.1 Charakteristiky stanovení pomocí přístroje GBC 933 AA

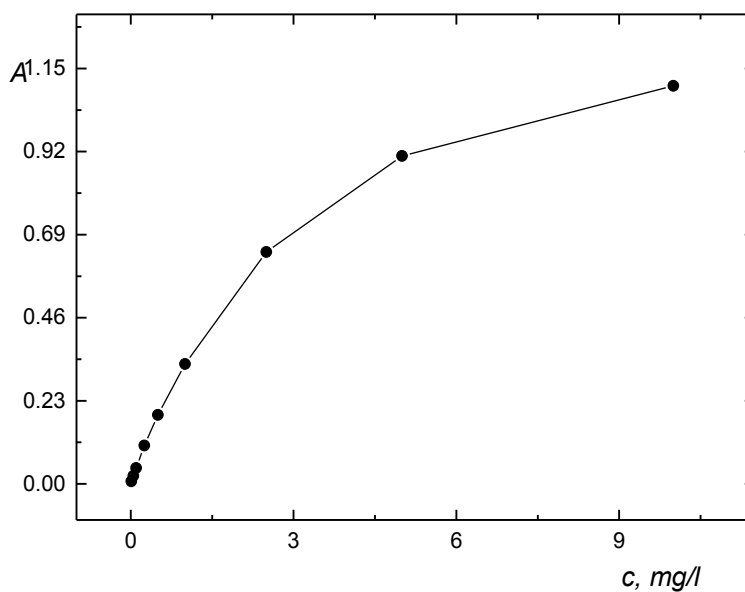
Kalibrace AAS při paralelním uspořádání hořáku k procházejícímu paprsku

Při první kalibraci přístroje GBC 933 AA byly použity roztoky o koncentraci 0,010; 0,050; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10 a 25 mg/l, které byly proměřeny při různé šířce spektrálního intervalu (0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 nm) v paralelním uspořádání hořáku k procházejícímu paprsku. Výsledné kalibrační křivky jsou znázorněny na obr. 4.9.



Obr. 4.9: Kalibrace AAS při různé šířce spektrálního intervalu – paralelní uspořádání
 $h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $Q_v = 1,8 \text{ dílku ml/min}$, $\Delta \lambda = 0,2 \text{ nm}$

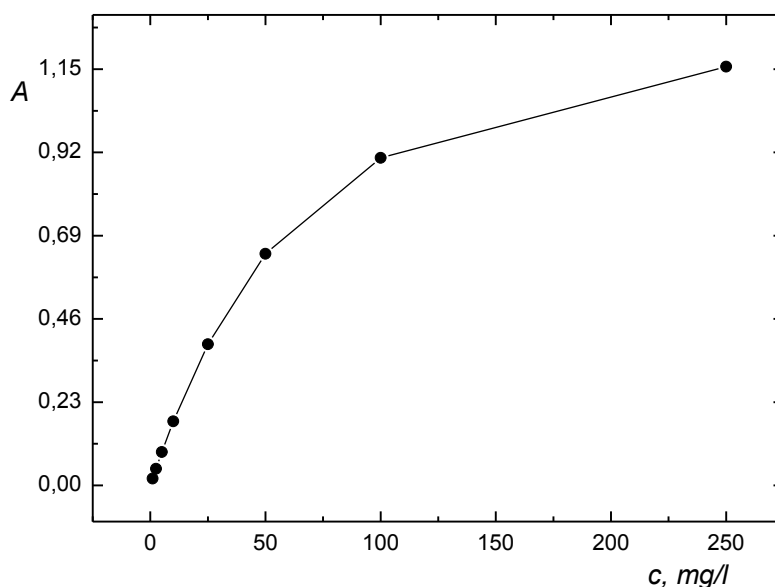
Z grafického zpracování vyplývá, že šířka spektrálního intervalu výrazně neovlivňuje výsledky měření, zejména pak jeho citlivost v lineární části kalibrační závislosti. Při výpočtech základních charakteristik však byla použita lineární část kalibrační přímky se spektrálním intervalu 0,2 nm (obr. 4.10).



Obr. 4.10: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci zinku – paralelní uspořádání
 $h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $Q_v = 1,8 \text{ dílku ml/min}$, $\Delta \lambda = 0,2 \text{ nm}$

Kalibrace AAS při kolmém uspořádání hořáku k procházejícímu paprsku

Při této kalibraci bylo použito 12 roztoků v kolmém uspořádání hořáku k procházejícímu paprsku. Koncentrace roztoků byla 0,10; 0,050; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100 a 250 mg/l a všechny experimentálně zjištěná data jsou zobrazeny v grafu (obr. 4.11) pod textem.



Obr.4.11: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci zinku – kolmé uspořádání
 $h_{\text{hořáku}} = 5 \text{ mm}$, $\Delta \lambda = 0,2$, $v_{\text{ac.}} = 1,8 \text{ dílku ml/min}$

Lineární část z výsledné kalibrační křivky pak byla použita pro výpočet základních charakteristik metody při kolmé orientaci hořáku k procházejícímu paprsku.

Základní charakteristika

Pro základní charakteristiku metody byla použita lineární část z kalibračních křivek (obr. 4.10, 4.11) a také 15krát opakované měření roztoků o koncentraci 0,05 a 2,50 mg/l pro paralelní uspořádání a 0,50 a 50 mg/l pro kolmé uspořádání hořáku k procházejícímu paprsku. Výsledkem bylo zjištění směrodatné odchylky, opakovatelnosti, citlivosti, limitu detekce, limitu stanovitelnosti a také lineárního dynamického rozsahu. Všechny údaje jsou zaznamenány v tabulce č. 4.1.

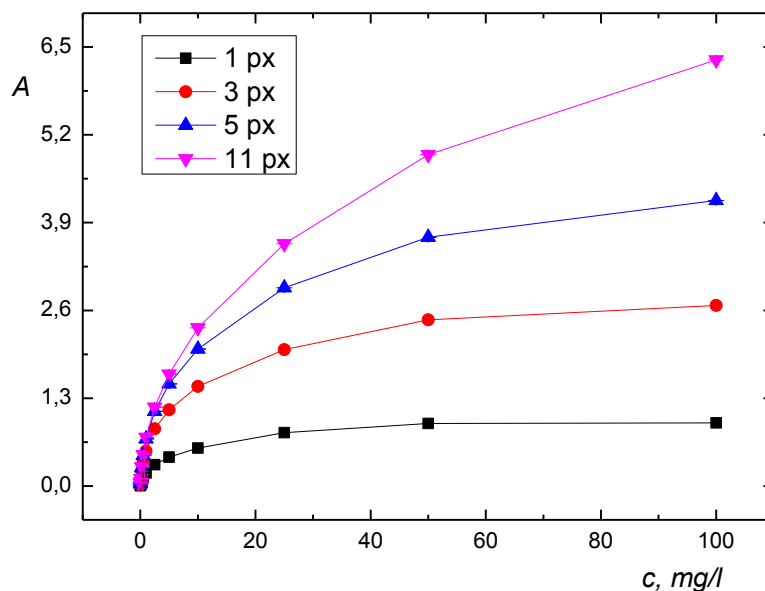
Tabulka 4.1: Shrnutí základní charakteristiky metody AAS (GBC 933AA)

Charakteristika	Paralelní uspořádání	Kolmé uspořádání
opakovatelnost [%]	0,493	0,426
citlivost [l/mg]	0,415	0,0210
mez detekce [mg/l]	0,012	0,069
mez stanovitelnosti [mg/l]	0,039	0,23
lineární dynamický rozsah [mg/l]	0,012-2,5	0,069-25

4.2.2 Charakteristiky stanovení pomocí přístroje ContrAA 700

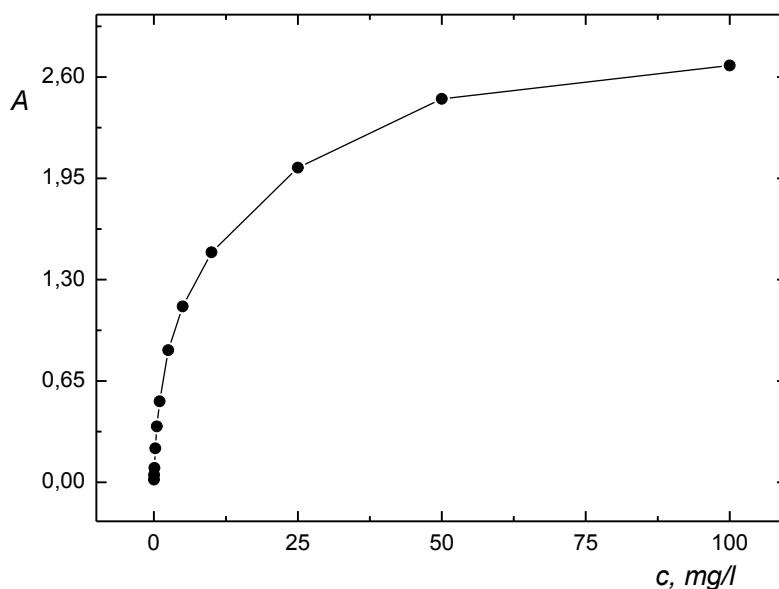
Kalibrace AAS při paralelním uspořádání hořáku k procházejícímu paprsku

Při kalibraci přístroje ContrAA 700 byly použity roztoky o koncentraci 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25, 50 a 100 mg/l, které byly proměřeny při různé šířce spektrálního intervalu (1, 3, 5 a 11 pixelech) v paralelním uspořádání hořáku. Výsledné kalibrační křivky jsou znázorněny na obrázku 4.13.



Obr.4.13: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci zinku při různé šířce spektrálního intervalu, paralelní uspořádání, plamen acetylen-vzduch, $h_{\text{hořáku}} = 6 \text{ mm}$, $Q_v = 0,83 \text{ l/min}$, $\lambda = 213,857$,

Z grafu vyplývá, že šířka spektrálního intervalu viditelně ovlivňuje výsledky měření. Pro náš experiment byla vybrána kalibrační křivka se šířkou spektrálního intervalu 3 pixely (obr. 4.14), protože citlivost tohoto měření je pro náš experiment dostačující.



Obr.4.14: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci zinku při šířce spektrálního intervalu 3 pixely, paralelní uspořádání, plamen acetylen-vzduch, $h_{\text{hořáku}} = 6 \text{ mm}$, $v_{\text{ac.}} = 0,83 \text{ l/min}$, $\lambda = 213,857$.

Základní charakteristika ContrAA 700

Pro základní charakteristiku přístroj ContrAA 700 byla použita lineární část kalibrační křivky se spektrálním intervalem 3 pixely (obr. 4.14) a také 15krát opakované měření roztoků o koncentraci 0,05 a 2,5 mg/l v paralelním uspořádání hořáku. Výsledkem bylo zjištění směrodatné odchylky, opakovatelnosti, citlivosti, limitu detekce, limitu stanovitelnosti a také lineárního dynamického rozsahu. Všechny výsledné údaje jsou zaznamenány v tabulce č. 4.2.

Tabulka 4.2: Shrnutí základní charakteristiky přístroje ContrAA 700

Charakteristika ContrAA 700	Hodnota
směrodatná odchylka	0,006
opakovatelnost [%]	0,694
citlivost [l/mg]	0,704
mez detekce [mg/l]	0,023
mez stanovitelnosti [mg/l]	0,077
Lineární dynamický rozsah [mg/l]	0,023-0,5

Při porovnání mezi detekce obou experimentálně odlišných spektrometrů (tabulky 4.1 a 4.2) lze konstatovat, že spektrometr GBC 933 AA je citlivější než spektrometr ContrAA 700.

4.3 Interferenční studie

Při interferenčních studiích byl zjišťován vliv přítomného prvku v roztoku na citlivost a přesnost měření roztoku zinku pomocí AAS na přístroji GBC 933 AA. Pro experiment byly použity standardní roztoky obsahující 10,0 mg/l zinku a různé koncentrace (viz. 3.4, Interferenční studie) vždy jednoho z vybraných testovaných interferentů (K, Mg, Fe, Cu a Ca).

Z výsledků studie bylo zjištěno, že přítomnost železa v roztoku zinku nevytváří žádné interference a přítomnost hořčíku a vápníku způsobuje kolísavou interferenci, avšak změna signálu byla menší než 5 %. Z toho lze usoudit, že tyto tři prvky obsažené v roztoku nám přesnost při stanovení zinku pomocí AAS zásadně neovlivní. Na druhou stranu rostoucí koncentrace draslíku nebo mědi v roztoku zinku způsobila zvýšení odezvy a díky tomu můžeme předpokládat, že tyto dva prvky mohou snižovat přesnost měření. Přítomnost draslíku o koncentraci 100 mg/l ovlivní výsledek o 12,6 % a přítomnost mědi o koncentraci 50 mg/l o 11,9 %.

4.4 Analýza potravinových doplňků

Rozklad vzorku ve vodě za laboratorní a zvýšené teploty

První z rozkladů byl proveden ve 100 ml vody za laboratorní i zvýšené teploty. Analyzovány byly 10krát zředěné vzorky, a to při výšce plamene 5 mm, průtokové rychlosti acetylenu 1,8 l/min, vlnové délce 213,9, napájecím proudem lampy 5,0 mA, šířce spektrálního intervalu 0,2 nm a při kolmém uspořádání hořáku s plamenem obsahující směs acetylen-vzduch. Výsledky experimentu jsou zpracovány v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3: Experimentálně zjištěné a výrobcem uvedené množství zinku v tabletách, při rozkladu ve vodě

Vzorky	Množství zinku v tabletě uvedená výrobcem [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě při rozkladu za studena [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě při rozkladu za tepla [mg]
Vzorek 1	5,0	0,060 ± 0,01	0,050 ± 0,01
Vzorek 2	8,3	0,83 ± 0,04	1,14 ± 0,05
Vzorek 3	10	6,7 ± 0,10	8,50 ± 0,05
Vzorek 4	15	0,67 ± 0,06	0,10 ± 0,02
Vzorek 5	6,0	5,8 ± 0,13	6,74 ± 0,09

Z naměřených výsledků vyplývá, že dobře rozpustná tableta ve vodě je Supradyn Energy Complex (vzorek 5), který má při rozkladu za zvýšené teploty vyšší koncentraci zinku, než je uvedená v příbalovém letáku od výrobce. Tento jev mohl být způsoben zakonzentrováním vzorku při jeho tepelné úpravě nebo také vyšší koncentrací zinku v tabletě. Méně ve vodě rozpustný potravinový doplněk je Spektrum 50+ (vzorek 3). Také u něho platí, že při rozkladu za zvýšené teploty se koncentrace zinku v roztoku zvýší. Vzorky 1, 2 a 4 (Centrum od A až po železo, Vápník-hořčík-zinek a Calibrum 50 plus) jsou ve vodě za laboratorní i zvýšené teploty rozpustné jen velmi omezeně. Lze tedy konstatovat, že rozklad námi vybraných potravinových doplňků ve vodě a následné stanovení zinku není příliš vhodné. Tento postup může být použit pouze pro potravinový doplněk Supradyn Energy Complex.

Rozklad vzorku v kyselině dusičné za tepla

Druhý rozklad vzorků byl proveden v 65 % kyselině dusičné za zvýšené teploty. Stejně jako v předchozím případě byl vzniklý roztok 10krát zředěn a analyzován při stejných optimálních podmínkách jako při rozkladu ve vodě. Jednotlivá experimentálně získaná množství zinku v tabletách jsou uvedena v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4: Experimentálně zjištěné a výrobcem uvedené množství zinku v tabletách, při rozkladu v kyselině dusičné za tepla. Měřeno s korekcí i bez korekce pozadí.

Vzorky	Množství zinku v tabletě uvedená výrobcem [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě bez korekce pozadí [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě s korekcí pozadí [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě s korekcí pozadí [mg/g tablety]
Vzorek 1	5,0	5,37 ± 0,12	5,26 ± 0,09	3,95
Vzorek 2	8,3	9,87 ± 0,18	8,71 ± 0,09	6,10
Vzorek 3	10	11,09 ± 0,19	10,26 ± 0,19	7,48
Vzorek 4	15	18,79 ± 0,18	17,58 ± 0,07	10,62
Vzorek 5	6,0	6,77 ± 0,40	6,13 ± 0,11	1,36

Z tabulky 4.4 vyplývá, že atomová absorpční spektrometrie, s využitím rozkladu analytů v kyselině dusičné, je vhodná pro stanovení koncentrace zinku v potravinových doplncích. Výsledky, které blíže korelují s výrobcem, odpovídají analýze s korekcí pozadí. To odpovídá možným interferencím, které zvýšily absorbanci u analýzy bez korekce pozadí. Z výsledků lze také usoudit, že rozklad proběhl zcela, a že naměřené koncentrace jsou vyšší než hodnoty deklarované výrobcem. To mohlo být způsobeno zakonzentrováním vzorku při rozkladu nebo vyšší koncentrací zinku v tabletě, protože v příbalovém letáku je uvedena průměrná hodnota množství zinku v tabletě.

Rozklad vzorku v kyselině dusičné a peroxidu za tepla

Poslední rozklad byl proveden v 65 % kyselině dusičné a 30 % peroxidu vodíku. Po rozkladu a doplnění do 100 ml odměrné baňky vodou, byl roztok 10krát zředěn a analyzován při optimálních podmínkách. Výsledky experimentu jsou uvedené v tabulce 4.5

Tabulka 4.5: Experimentálně zjištěné a výrobcem uvedené množství zinku v tabletách, při rozkladu v kyselině dusičné a peroxidu vodíku za tepla. Měřeno s korekcí i bez korekce pozadí.

Vzorky	Množství zinku v tabletě uvedená výrobcem [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě bez korekce pozadí [mg]	Stanovené množství zinku v tabletě s korekcí pozadí [mg]	[mg/g tablety]
Vzorek 1	5,0	5,96 ± 0,19	5,16 ± 0,15	3,71
Vzorek 2	8,3	11,39 ± 0,08	8,48 ± 0,16	5,84
Vzorek 3	10	10,26 ± 0,12	9,73 ± 0,06	6,94
Vzorek 4	15	19,47 ± 0,43	16,9 ± 0,11	10,20
Vzorek 5	6,0	7,41 ± 0,14	6,23 ± 0,20	1,37

Z experimentu vyplývá, že tento rozklad je vhodný pro stanovení zinku v potravinových doplncích, ale dochází u něho ke zvýšení vlivu interferencí. Proto je při analýze nutné použít korekci pozadí, díky které je pak stanovení velice přesné. Výsledné hodnoty jsou stejně jako u předchozího měření vyšší než hodnoty deklarované výrobcem. Důvodem může být zakoncentrování vzorku při jeho rozkladu nebo také vyšší koncentrace zinku v tabletě, protože potravinové doplňky nejsou považovány za léky a při jejich schvalování se nekontroluje, zda obsahují jednotlivé složky v deklarovaném množství.

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovení zinečnatých iontů ve vybraných potravinových doplňcích pomocí atomové absorpční spektrometrie, a také porovnání mezi detekce dvou experimentálně odlišných atomových absorpčních spektrometrů.

Před stanovením reálných vzorků byly optimalizovány podmínky měření a provedeny interferenční studie. Optimalizovanými parametry byla výška paprsku nad hranou hořáku, průtoková rychlost acetyleny, otočení hořáku, šířka spektrálního intervalu, typ hořáku a typ plamene. Při interferenčních studiích bylo zjištěno, že vybrané interferenty (K, Mg, Fe, Cu a Ca) při deuteriové korekci pozadí zásadně neovlivňují výsledky stanovení.

Reálné vzorky byly před samotnou analýzu převedeny do roztoku. Rozklad vzorku byl proveden ve vodě za laboratorní i zvýšené teploty, v samotné kyselině dusičné i v kyselině dusičné s přídavkem peroxidu vodíku za zvýšené teploty. Z experimentálně získaných hodnot bylo zjištěno, že optimálního rozkladu vzorku je dosaženo v samotné kyselině dusičné nebo s přídavkem peroxidu vodíku za zvýšené teploty.

Stanovené množství zinku v jednotlivých potravinových doplňcích bylo při optimálním rozkladu a korekci pozadí stejné nebo vyšší jako hodnoty deklarované od výrobce. Důvody zvýšení koncentrace zinku ve vzorku mohly být způsobeny zakoncentrováním vzorku při jeho rozkladu nebo také vyšší koncentrací zinku v tabletě, protože potravinové doplňky nejsou považovány za léky a při jejich schvalování se nekontroluje, zda obsahují jednotlivé složky v deklarovaném množství.

U atomových absorpčních spektrometrů použitých při experimentech byla díky opakovanému měření dvou roztoků o různé koncentraci zjištěna základní charakteristika přístrojů. Mezi základní charakteristiku patří směrodatná odchylka, opakovatelnost, citlivost, mez detekce a mez stanovitelnosti. Výsledky měření ukázaly, že přístroj GBC 933 AA má nižší mez detekce než přístroj ContrAA 700 a lze s ním detekovat nižší koncentrace.

V této bakalářské práci bylo zjištěno, že atomová absorpční spektrometrie je vhodná analytická metoda pro stanovení zinku v potravinových doplňcích a lze ke stanovení použít oba uvedené přístroje.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Walsh A., *Atomic absorption spectroscopy: Stagnant or pregnant*. Analytical Chemistry 46 (1974), 698-708
- 2) Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P., *Spektrometrické analytické metody I.*, Karolinum Praha 2004
- 3) *Atomic absorption spectrometry*. Royal Society of Chemistry. URL https://www.kau.edu.sa/Files/130002/Files/6785_AAs.pdf (accessed 3.2.18)
- 4) García R., Báez A.P., *Atomic absorption spektrometry (AAS)*. Atomic absorption spectroscopy. InTech (2012)
- 5) Amos M.D., Willis J.B., *Use of high-temperature pre-mixed flames in atomic absorption spectroscopy*. Spectrochimica Acta Vol.22 (1966), 1325-1343
- 6) L'vov B.V., *On the way from the activation model of solid decomposition to the thermochemical model*. Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 116 (2015) 1-18
- 7) Burylin M.Y., Pupyshev A.A., *Development of electrothermal atomic absorption spectrometry in 2005-2016*. Journal of Analytical Chemistry 72 (2017), 935-946
- 8) Nakahara T., *Applications of hydride generation techniques in atomic absorption, atomic fluorescence and plasma*. Progress in analytical atomic spectroscopy 6 (1983) 163-223
- 9) Musil S., Dědina J., *A sapphire tube atomizer for on-line atomization and in situ collection of bismuthine for atomic absorption spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 28 (2013), 593-600
- 10) Hou X., Bradley T.J., *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry*. Encyclopedia of Analytical Chemistry (2000), 9468-9485
- 11) Mermet J.M., *Is it still possible, necessary and beneficial to perform research in ICP-atomic emission spectrometry?*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 20 (2005), 11-16
- 12) Ben-Menahem A., *Historical Encyclopedia of Natural and Mathematical Sciences, Volume 2*, Springer 2009

- 13) Sadeghzadeh B., Rengel Z., *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops (2011), 335-375
- 14) Ibs K.H., Rink L., *Zinc-Altered Immune function*. The Journal of Nutrition, Volume 133 (2003), 1452S-1456S
- 15) Shrivastava K., Dewanganb K., Ahmedc A., *Surfactant-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of zinc in environmental water samples using flame atomic absorption spectrometry*. Analytical Methods 8 (2016), 5519-5525
- 16) *Zákon č. 110/1997 Sb., Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů § 2*
- 17) Slomski A., *Multivitamins Offer No Protection to Brains or Hearts*. JAMA (2014), 311(4), 311-349
- 18) Procházková P., *Doplňky stravy a zdravotní tvrzení*. (2012) URL http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/17/09_zdravotni_tvrzeni.pdf (accessed 3.12.18).
- 19) Volka, K., kolektiv., *Analytická chemie II*, VŠCHT Praha 1995, 224-236.
- 20) Hendl, J., *Přehled statistických metod zpracování dat*, Portál 2004, 93-97.
- 21) Armbruster D.A., Pry T., *Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation*. The Clinical Biochemist Reviews 29 (2008), S49-S52.
- 22) Plum L.M., Rink L., Haase H., *The essential toxin: impact of zinc on human health*. International journal of environmental research and public health 7 (2010), 1342-1365.
- 23) Magallanes-López A.M., Hernandez-Espinosa N., Velu G., Posadas-Romano G., Ordoñez-Villegas V.M.G., Crossa J., Ammar K., Guzmán C., *Variability in iron, zinc and phytic acid content in a worldwide collection of commercial durum wheat cultivars and the effect of reduced irrigation on these traits*. Food Chemistry, Volume 237(2017), 499-505.
- 24) Bellows L., Moore R., Gross A., Anderson J., Roach J., Dell'Orto M., Wilken K., *Dietary supplements: vitamins and minerals*, (2014)
- 25) Helán, V., kolektiv, *Automatická spektrometrie*, 2 Theta 1998, 140-144

- 26) Kellner R., Mermet J.M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H.M., *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science, Second Edition*, Wiley-VCH 2004, 632-653
- 27) Trotman-Dickenson A.F., *Comprehensive inorganic chemistry*, Pergamon Press 1973, Volume 4, 187-253
- 28) Vohlídka J., Julák A., Štulík K., *Chemické a analytické tabulky*. Grada 1999, 28-85
- 29) Welz, B., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., 2005. *High-Resolution Continuum Source AAS, The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH 2005, 31-34