

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Vojtková

Stanovení vápníku v potravinovém doplňku.

Determination of calcium in food supplement.

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. František Opekar, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

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

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

V Praze dne 25. května 2015.

Lucie Vojtková

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Františku Opekarovi, CSc. za čas, trpělivost, cenné rady a připomínky při vedení práce. Dále děkuji RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. za pomoc při měření na atomovém absorpčním spektrometru.

Také děkuji mé rodině a příteli za velkou psychickou podporu.

Abstrakt

Tato práce se zabývá stanovením obsahu vápníku v potravinovém doplňku „Optisana“ různými analytickými metodami – chelatometrickou titrací, atomovou absorpční spektroskopií a kapilární zónovou elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí. Atomovou absorpční spektrometrií byly Ca^{2+} stanoveny v plameni acetylen – oxid dusný a acetylen – vzduch metodou standardního přídatku. Na laboratorně sestrojené elektroforetické aparatuře byla nejprve zjišťována elektroforetická mobilita modelového roztoku chloridu vápenatého při různém separačním napětí. Obsah Ca^{2+} byl stanoven rovněž metodou standardního přídatku. Výsledky získané těmito metodami byly porovnány s výsledky získanými chelatometrickou titrací. Výsledky získané kapilární zónovou elektroforézou a chelatometrickou titrací byly ve shodě s obsahem deklarovaným na etiketě doplňku. Atomová absorpční spektrometrie byla vyhodnocena jako nevhodná metoda pro stanovení vápníku v matrici námi analyzované tablety pro velký rozdíl mezi stanovenou a deklarovanou hodnotou.

Klíčová slova

Vápník, potravinový doplněk, chelatometrická titrace, atomová absorpční spektrometrie, kapilární elektroforéza.

Abstrakt

This paper deals with the determination of the calcium content in the food supplement "Optisana" via various analytical methods - complexometric titration, atomic absorption spectroscopy and capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. Ca^{2+} ions were determined by atomic absorption spectrometry in a flame of acetylene - nitrous oxide and acetylene - air by standard addition method. Electrophoretic mobility model of calcium chloride solution was determined at various separation voltages on laboratory constructed electrophoretic apparatus. Ca^{2+} content was also determined by standard addition method. The results obtained by these methods were compared with those obtained by the complexometric titration. The results obtained by capillary zone electrophoresis and by complexometric titration were in conformity with the content declared on the label of the supplement. Atomic absorption spectrometry was evaluated as an inappropriate method for determining the calcium in the matrix of tablets we analyzed because of a large difference between the found and the declared value.

Key words

Calcium, food supplement, chelatometric titration, atomic absorption spectrometry, capillary electrophoresis.

Obsah

1	Úvod	11
1.1	Charakteristika vápníku	11
1.2	Vápník v přírodě	11
1.3	Vápník ve výživě	12
1.4	Poruchy spojené s příjmem vápníku	13
1.5	Vitamín D	14
2	Teoretická část	15
2.1	Metody stanovení vápníku	15
2.1.1	Chelatometrické stanovení	16
2.1.1.1	Chelatometrická titrace	17
2.1.1.2	Metalochromní indikátory	17
2.1.2	Atomová absorpční spektroskopie (AAS)	18
2.1.3	Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	19
3	Experimentální část	22
3.1	Příprava vzorku	22
3.2	Chelatometrická titrace	22
3.2.1	Chemikálie	22
3.2.2	Standardizace EDTA - pracovní postup	23
3.2.3	Stanovení vápníku v tabletě potravinového doplňku - pracovní postup	23
3.3	Atomová absorpční spektroskopie	23
3.3.1	Aparatura	23
3.3.2	Chemikálie	23
3.3.3	Pracovní postup	24
3.4	Kapilární zónová elektroforéza	25
3.4.1	Aparatura	25
3.4.2	Chemikálie	26
3.4.3	Pracovní postup	26
3.5	Statistické vyhodnocení výsledků a použité vztahy	28

4	Výsledky	29
4.1	Chelatometrické stanovení	29
4.1.1	Standardizace EDTA	29
4.1.2	Stanovení vápníku v tabletě potravinového doplňku	29
4.2	Stanovení vápníku atomovou absorpční spektroskopií	31
4.3	Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	34
4.3.1	Zjištění elektroforetické mobility Ca^{2+} iontu měřením migračního času při různém separačním napětí	34
4.3.2	Stanovení vápníku metodou standardního přídatku	37
4.4	Srovnání výsledků	39
5	Závěr	40
6	Seznam použité literatury	41

Seznam zkratek

AAS	Atomic absorption spectroscopy – atomová absorpční spektroskopie
C4D	Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection – bezkontaktní vodivostní detekce
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing – kapilární izoelektrická fokusace
CITP	Capillary Isotachopheresis – kapilární izotachoforéza
CZE	Capillary Zone Electrophoresis – kapilární zónová elektroforéza
EDL	Electrodeless Discharge Lamp – bezelektroodová výbojka
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid – kyselina ethylendiamintetraoctová
EOF	Electroosmotic flow – elektroosmotický tok
ETA-AAS	Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry – atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F-AAS	Flame Atomization Atomic Absorption Spectrometry – atomová absorpční spektrometrie s plamennou atomizací
GC	Gas chromatography – plynová chromatografie
HLC	Hollow Cathode Lamp – výbojka s dutou katodou
HPCE	High-Performance Capillary Electrophoresis – vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IDA	Iminodiacetic acid – kyselina iminodioctová
NTA	Nitrilotriacetic acid – kyselina nitrilotrioctová
UV/C4D	Ultraviolet/Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection – ultrafialová/bezkontaktní vodivostní detekce

Seznam symbolů

c	analytická koncentrace
C	kapacita kondenzátoru
d	tloušťka kyvety
E	intenzita elektrického pole
F	Faradayova konstanta
g	gravitační zrychlení
h	výška hladiny
I	intenzita světla
k_n	tabelovaný koeficient pro určení směrodatné odchylky
K_n	tabelovaný koeficient pro určení intervalu spolehlivosti
l	délka kapiláry k detektoru
L	celková délka kapiláry
$L_{1/2}$	interval spolehlivosti
N	separační napětí
N_o	počet volných atomů
p	tlak
q	celkový náboj
r	poloměr iontu
R	rozpětí (ve statistice)
R	odpor roztoku (v elektroforéze)
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
t_{eof}	doba, za kterou projdou nenabitě látky k detektoru
t_{migr}	migrační čas
U	separační napětí
v	rychlost migrace
w_s	výsledný obsah
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
\bar{x}	průměrný výsledek
x_{max}	největší hodnota souboru analytických výsledků
x_{min}	nejmenší hodnota souboru analytických výsledků

ε	permitivita
ζ	zeta potenciál
η	viskozita
κ	atomový absorpční koeficient
λ	iontová vodivost
μ	elektroforetická pohyblivost

1 Úvod

1.1 Charakteristika vápníku

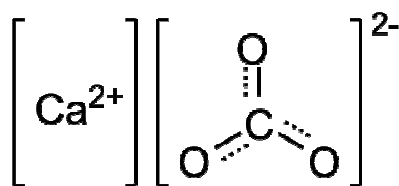
Vápník [latinsky Calcium], pochází z latinského výrazu Calx, což znamená vápno. V periodické soustavě prvků má označení Ca a patří do II. hlavní skupiny. Vyskytuje se pouze v oxidačním čísle II. Jeho molekulová hmotnost je $40,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ve valenční sféře má jen dva elektrony v orbitalu a preferuje iontovou vazbu [1].

Vápník lze charakterizovat jako lehký, stříbrolesklý, neušlechtilý kov, který je měkký a barví plamen cihlově červeně. Je dobrým redukčním činidlem. Používá se jako přísada do ložiskových kovů, v metalurgii slouží ke snižování obsahu kyslíku v tekuté oceli [2].

Je jedním z významných prvků kovů alkalických zemin. V přírodě je značně zastoupen, patří mezi nejrozšířenější kovy. Nachází se v minerálních vodách a v zemské kůře (3,4 %). Vápenaté ionty spolu s ionty Mg^{2+} způsobují tzv. tvrdost vody. Doporučená hodnota u pitné vody je v rozmezí $0,9 - 5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [1; 3].

1.2 Vápník v přírodě

Nejběžnější sloučeninou je uhličitan vápenatý (CaCO_3), který se v přírodě vyskytuje jako šesterečný kalcit (vápenec) a kosočtverečný aragonit. Je to krystalická nerozpustná látka, v medicíně používaná jako antacidum a při výrobě zubních past.



Obr. 1. Struktura uhličitanu vápenatého [4].

Další důležité sloučeniny jsou sádrovec $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, apatit $3 \text{ Ca}(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{Cl},\text{F})_2$ a fluorid CaF_2 . Kovový vápník se průmyslově připravuje elektrolýzou roztavených vápenatých solí – (halogenidů) podle *Solvaye* [1; 2; 4].

1.3 Vápník ve výživě

Vápník je v lidském organismu nenahraditelný, podílí se na metabolické přeměně látek, a je součástí anorganické kostní matrix. U dospělého člověka tvoří asi 2 % tělesné váhy (1,2 - 1,5 kg). Největší část vápníku je vázána v kostech a zubech (asi 99 %). Zde je ve formě hydroxyapatitu, jehož anorganická složka je tvořena z fosforu a vápníku $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$, nebo ve formě fluoroapatitu $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$. Tvoří mechanickou pevnost kosti. Zbylé procento vápníku je obsaženo v extracelulární tekutině a měkkých tkáních.

Vápník dále ovlivňuje nervosvalovou dráždivost v tělních tekutinách a je kofaktorem při srážení krve (má vliv na přechod fibrinogenu na fibrin). Reguluje permeabilitu buněčných membrán v těle, sekreční činnost exokrinních žláz, stimuluje uvolňování neurotransmiterů a hormonů. Díky nedostatečnému příjmu vápníku z potravy je dnešní populace náchylnější na nemoci pohybového aparátu – osteoporózy a osteomalacie [5; 6].

Denní příjem vápníku v potravě se pohybuje mezi 600 - 1000 mg, příjem nad 2000 mg vápníku denně se nedoporučuje. U těhotných žen a lidí nad 50 let se potřeba vápníku zvyšuje, proto je jim doporučováno požívat minimálně 1200 mg vápníku v kombinaci s minimálně 20 μg vitamínu D denně. Z celkového přijatého množství se však vstřebává jen 5 – 50 %. Přibližně 50 – 70 % celkové denní potřeby je z mléka a mléčných výrobků, které jsou nejvydatnějším zdrojem. Vhodné jsou kysané mléčné výrobky, protože kyselé prostředí pomáhá zvyšovat vstřebávání vápníku. Nevhodné jsou tavené sýry, do kterých se z technologických důvodů přidávají fosforečné soli. Tyto soli vážou vápník a tak znemožňují jeho vstřebávání v organismu [7].

Kromě mléka jsou bohatými zdroji vápníku např. mák, sardinky, ořechy, kapusta, brokolice, fenykl, pórek, sezam, lískové ořechy, sója, zelené natě. Vápník obsahují i další potraviny, jako například špenát, angrešt a rybíz, ale díky přítomnosti oxalátů, fytátů a vlákniny se jeho vstřebatelnost snižuje. Lépe využitelným zdrojem jsou potraviny živočišného původu než původu rostlinného. K lepšímu vstřebávání vápníku přispívají citrát, monosacharidy a vyšší obsah bílkovin ve stravě. Výrazně se též na vstřebávání vápníku podílí kalcitriol, aktivní podoba vitamínu D [6; 7; 8].

Vápník se vylučuje střevem (80 %) a ledvinami (20 %). Stolicí se vylučuje vápník, který se neresorboval ve střevě. V ledvinách se filtruje pouze vápník ionizovaný. Vylučování ledvinami je rozhodujícím mechanismem, který ovlivňuje bilanci kalcia. V oblasti proximálního kanálku probíhá zpětná resorpce jak transcelulárně – 15 – 20 % (aktivní transport, vázaný na specifické kanály a přítomnost energie), tak paracelulárně – 80 – 85 % (pasivní transport). Ve vzestupném raménku Henleovy kličky se opět resorbuje vápník transcelulárně i paracelulárně. Parathormon i kalcitonin stimulují zpětnou resorpci transcelulární cestou v této oblasti nefronu. V distální části nefronu se na zpětné resorpci vápníku podílí vedle parathormonu a kalcitoninu i kalcitriol. Exkrece vápníku negativně ovlivňuje kofein, alkohol, bílkoviny živočišného původu, aminokyseliny obsahující síru a přílišné solení, které způsobují jeho zvýšené vylučování. Naopak vysoký výskyt fosforu a draslíku ve stravě vylučování vápníku snižuje [9; 10; 11].

V současné době je velkým trendem příjem vápníku a jiných důležitých látek v podobě potravinových doplňků, obsahujících vápenaté soli různých organických kyselin. Vyrábí se nejčastěji ve formě šumivých tablet. Optimální jsou takové preparáty, které obsahují kromě vápníku např. i vitamíny potřebné k jeho vstřebávání a ukládání do kostní hmoty [7].

1.4 Poruchy spojené s příjmem vápníku

Snížení plazmatické koncentrace iontů vápníku pod $2,25 \text{ mmol l}^{-1}$ se nazývá hypokalcemie. Nedostatek vápníku je způsoben sníženým přívodem Ca^{2+} ve stravě. Další příčinou hypokalcemie může být zvýšená potřeba Ca^{2+} (např. v těhotenství), deficit vitamínu D a jeho účinků, ale také deficit Mg^{2+} . Nízká hladina vápníku v krvi nemá z krátkodobého hlediska žádné příznaky, po delší době však může vyvolat specifická onemocnění postihující děti, ale i dospělé. U dětí se objevuje křivice, u starších lidí je charakteristická osteopenie, která se může vyvinout až v osteoporózu se zvýšeným rizikem zlomenin.

Koncentrace Ca^{2+} v plazmě nad $2,75 \text{ mmol l}^{-1}$ se nazývá hyperkalcemie (neboli intoxikace vápníkem). Je obvykle projevem zvýšené mobilizace Ca^{2+} z kostí nebo projevem dlouhodobého užívání vysokých dávek vápníkových doplňků, či nadbytku vitamínu D. Méně často je příčinou nadbytečný přívod vápníku ze stravy. Vysoká koncentrace vápníku může způsobit různé zdravotní potíže, jako je například svalová slabost, zácpa, či neuropsychické potíže (bolesti hlavy, deprese, poruchy spánku, halucinace, paranoia, dezorientace). Mezi další příznaky intoxikace patří nechutenství, zvracení, pankreatitida, ledvinové kameny a může také způsobit až selhání ledvin. Těžká hyperkalcemie (nad $3,5 \text{ mmol l}^{-1}$) bezprostředně ohrožuje život, postižený upadá do komatu [12].

1.5 Vitamín D

Vitamín D patří mezi vitamíny rozpustné v tucích. Vyskytuje se ve dvou formách – jako vitamín D_2 (*ergokalciferolum*) a D_3 (*cholecalciferol*). Struktury těchto forem se liší postraním řetězcem a dvojnou vazbou mezi atomy C12 a C13, fyziologicky ale fungují stejně. Z aktivního provitamínu D převažuje vznik formy D_3 . Primárně se tvoří UV zářením v kůži ze 7 – dehydrocholesterolu. Dalším zdrojem je potrava, např. rybí tuk. V játrech a v ledvinách se vitamín D_3 metabolizuje na biologicky aktivní metabolity *kalcidiol* (25-OH-D_3) a *kalcitriol* ($1,25\text{-OH-D}_3$). Kalcitriol je hormon, který podporuje v tenkém střevě vznik proteinu, který přenáší Ca^{2+} přes membránu enterocytů a tím zvyšuje jeho vstřebávání. Kalcitriol tedy zvyšuje koncentraci vápníku v krvi [13; 14].

2 Teoretická část

2.1 Metody stanovení vápníku

Vápník můžeme stanovit různými analytickými metodami, jako jsou např. manganometrie, izotachoforéza nebo potenciometrie.

Manganometrie patří mezi redoxní titrace. Ty jsou založeny na oxidačně-redukčních rovnováhách. Manganistan draselný (KMnO_4) je v kyselém prostředí silným oxidačním činidlem. Při titraci manganistanem draselným není zapotřebí indikátor, činidlo je samo intenzivně fialově zbarvené. První nadbytek činidla zbarví roztok růžově, takže stanovíme bod ekvivalence vizuálně. Standard pro standardizaci KMnO_4 je dihydrát kyseliny šťavelové $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [15].

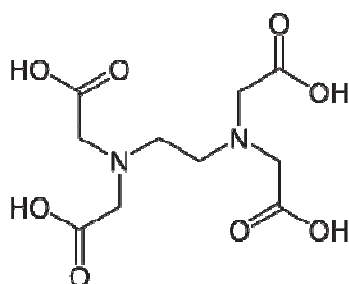
Izotachoforéza je elektromigrační separační metoda, při které se vnáší vzorek mezi dva elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů. Separují se buď jen kationty, nebo anionty. Ionty se vnáší mezi tzv. vedoucí a koncový elektrolyt, přičemž pohyblivosti dělených iontů vzorku musí být intermediární vzhledem k pohyblivosti vedoucího iontu vedoucího elektrolytu a koncového iontu koncového elektrolytu [16]. Směs iontů se dělí při stejnosměrném napětí za konstantního proudu. Ve stacionárním stavu se zóny pohybují stálou a všechny stejnou rychlostí. Po rozdělení jsou zóny velmi ostré a přímo na sebe navazují a díky samozaostřujícímu efektu nehrozí jejich promísení. Izotachoforéza se používá ke stanovení iontů vápníku ve vodách. Největší důraz je kladen na vody minerální, ale stanovuje se také ve vodách pitných, průmyslových a odpadních [17].

Potenciometrie je elektroanalytická metoda, založená na měření rovnovážného napětí elektrochemického článku, tvořeného indikační elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku a referenční elektrodou spojenou s roztokem solným můstkem. Měření se provádí za bezproudého stavu. Pokud je potenciál indikační elektrody funkcí aktivity analytu, můžeme provést přímé stanovení analytu z hodnot změřeného napětí. Toto stanovení se nazývá přímá potenciometrie [28]. Stanovení vápenatých iontů vápníkovou iontově selektivní elektrodou bylo použito např. ke stanovení vápníku v médiu pro kultivaci kostních buněk [19].

V rámci této bakalářské práce bylo použito komplexometrické stanovení, atomová absorpční spektrometrie (dále jen AAS) a kapilární zónová elektroforéza (dále jen CZE).

2.1.1 Chelatometrické stanovení

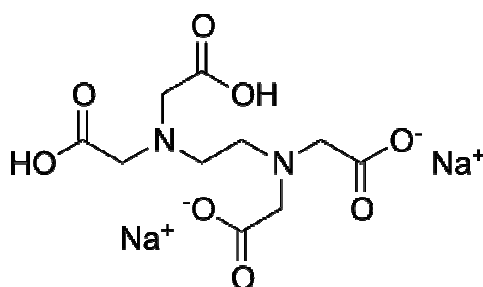
Z literatury známe kolem 100 aminopolykarboxylových kyselin „komplexonového typu“, které mají v molekule alespoň jednu komplexotvornou skupinu – N (CH₂COOH)₂. Pouze několik z nich lze využít jako odměrné činidlo. Nejjednoduššími takovými kyselinami jsou kyselina iminodioctová (IDA) a kyselina nitrilotrioctová (NTA). Z hlediska koordinační chemie je výhodnější kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA; chelaton II), která tvoří mnohem stabilnější komplexy (cheláty).



Obr. 2. Struktura chelatonu II [20].

EDTA tvoří s většinou kationtů prakticky okamžitě bezbarvé komplexy, které jsou rozpustné ve vodě a jen nepatrně disociují. Zbarveny jsou jen komplexy s barevnými kationty. Všechny komplexy mají složení 1:1.

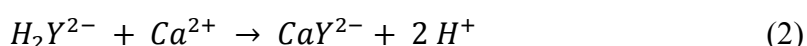
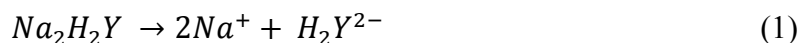
EDTA byla poprvé připravena v roce 1935. Jako čtyřsytná kyselina tvoří čtyři řady solí, nejvýznamnější jsou pak soli disodné, označující se jako chelaton III [21].



Obr. 3. Struktura chelatonu III [20].

2.1.1.1 Chelatometrická titrace

V chelatometrii je odměrným činidlem roztok chelatonu III, disociující v roztoku za tvorby dihydrogenethylendiamintetraoctanového aniontu (H_2Y^{2-}) jak je vidět v rovnici (1). Tento aniont vytváří s dvojmocnými, trojmocnými a čtyřmocnými kationty kovů stálé komplexy. Při titraci chelatonem III je nutné titrovaný roztok pufovat, protože se zde uvolňují vodíkové kationty, které by vznikající komplex rozkládaly dle následující rovnice (2)



Konec titrace se při chelatometrických titracích indikuje vhodným metalochromním indikátorem, který se chová jako ligand a vytváří s titrovanými kationty kovu před bodem ekvivalence barevný komplex. V bodě ekvivalence je indikátor vytěsněn z komplexu chelatonem III, který indikuje konec titrace změnou zbarvení [22].

2.1.1.2 Metalochromní indikátory

K indikaci bodu ekvivalence při chelatometrickém stanovení vápníku se nejčastěji používají tyto indikátory:

- a) Eriochromčern T - sodná sůl (1-hydroxy-2-naftylazo)-6-nitro-2-nafto-4-sulfonové kyseliny, patřící mezi azobarviva. Při pH 10 tvoří s vápníkem červeně zbarvené chaláty, volná forma iontu HI^{2-} má v roztoku modré zbarvení. Používá se k určování hořčíku společně s vápníkem ve vodě v prostředí Schwarzenbachova pufru. Samotný roztok vápníku bez stop hořčíku dává méně zřetelný přechod.
- b) Murexid – amonná sůl kyseliny purpurové. Používá se ke stanovení Ca^{2+} , ale také niklu, kobaltu a mědi. V alkalickém prostředí je při pH 12 růžový, volný indikátor je modrofialový.
- c) Fluorexon (calcein) – substituovaný fluorescein. Tento metalofluorescenční indikátor se používá jak indikátor pro vápník v silně alkalickém prostředí. Barevný přechod při titraci vápníku je ze zelené do hnědé. Při pH nad 12 v přítomnosti vápníku indikátor žlutozeleně fluoreskuje, po skončení titrace je výsledný roztok slabě růžový.

Pokud je čistota Chelatonu III nebo přesná koncentrace dostupného roztoku neznáma, je vhodné se o titru přesvědčit standardizací. V tom případě je vhodným základním primárním standardem dusičnan olovnatý.

Pro stanovení titru EDTA lze použít různých látek. Nejčastěji používaný je uhličitán vápenatý, který lze získat velmi čistý, lze jej snadno vysušit a není hygroskopický. Nevhodný je síran hořečnatý, který snadno větrá. Za nejvhodnější se považuje chlorid nebo dusičnan olovnatý, případně čistý kovový zinek [21].

2.1.2 Atomová absorpční spektroskopie (AAS)

Atomová absorpční spektroskopie je optická srovnávací metoda založená na měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků v plynném stavu. Každý prvek absorbuje záření, které je pro něj charakteristické, a které odpovídá energii potřebné k převedení atomů do excitovaného stavu. Intenzita záření absorbovaná vzorkem závisí na koncentraci absorbujících částic a tloušťce vrstvy, kterou paprsek prochází. Pro absorpci platí obecně Lambertův-Beerův zákon (3):

$$I = I_0 e^{-\kappa N_0 d} \quad (3)$$

kde I_0 a I je intenzita světla před a po průchodu vrstvou o tloušťce d , κ je atomový absorpční koeficient pro danou čáru, N_0 je počet volných atomů daného prvku v jednotce objemu.

Měřenou veličinou je absorbance A (4):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = 2,303 \kappa N_0 d \quad (4)$$

Přístroj pro AAS se skládá ze zdroje primárního záření, absorpčního prostředí obsahujícího volné atomy analyzovaného prvku v plynném prostředí, monochromátoru pro izolaci absorbovaného záření a detekčního systému [23].

Ze zdroje primárního záření (nejčastěji výbojka s dutou katodou) vystupuje emisní záření prvku. Po průchodu absorpčním prostředím, kde atomy prvku absorbují určité vlnové délky dopadajícího záření, izoluje monochromátor vybranou vlnovou délku světla. V detektoru je detekováno zeslabení toku původního záření.

Jako nejpoužívanější zdroj primárního záření se používají výbojky s dutou katodou (HLC), kde je katoda vyrobena z vysoce čistého sledovaného kovu. Dalším zdrojem jsou bezelektrodové výbojky (EDL) a laditelné barvivové lasery.

K absorpci primárního záření vzorkem dochází v tzv. atomizátoru, který převádí stanovované prvky z kapalné do plynné fáze. Atomizátor musí poskytovat co nejvyšší koncentraci volných atomů v základním energetickém stavu. Atomizaci je možné provádět v plameni (F – AAS), elektrotermicky (ETA – AAS) nebo v křemenných atomizátorech.

Při plamenové atomizaci (F – AAS) se využívá směs paliva (acetylén) a okysličovadla (vzduch nebo oxid dusný). K zavádění kapalného vzorku do plamene se používá pneumatických zmlžovačů, ve kterých dochází k vytvoření aerosolu. Účinnost zamlžovače závisí na rychlosti proudění oxidantu a vlastnostech rozpouštědla a pohybuje se okolo 10 %. Nevýhodou této metody je značná spotřeba vzorku.

Při elektrotermické atomizaci (ETA – AAS) se dávkuje malé množství vzorku do odporově vyhřívané kyvety. Ta je vyhřívána průchodem elektrického proudu v atmosféře čistého argonu. Vzorek je dávkován pomocí mikrodávkovače. Nadávkovaný vzorek absorbuje primární záření. Výsledný signál má tvar píku. Kvantitu vyhodnocujeme měřením výšky nebo plochy píku. Hlavní výhodou ETA – AAS oproti F – AAS je značné zvýšení citlivosti a snížení detekčního limitu až o 3 řády [24].

2.1.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) patří společně s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a plynovou chromatografií (GC) k nejvíce používaným separačním technikám.

Spolu se zónovou elektroforézou, izoelektrickou fokusací (CIEF), izotachoforézou (CITP), elektroforézami prováděnými v síťových prostředích (agarosová a polyakrylamidová gelová elektroforéza, SDS elektroforéza, bioafinitní elektroforéza), elektrokinetickou chromatografií a elektrochromatografií řadíme CZE mezi elektromigrační separační metody. Tyto metody se souhrnně označují pojmem kapilární elektroforéza nebo také vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) [16].

V CZE se separují ionty na základě své elektroforetické mobility. Elektrický náboj je elektrostaticky přitahován k opačně nabitě elektrodě. Rychlost migrace v [m s^{-1}] nabitě částice v elektrickém poli závisí na jeho elektroforetické pohyblivosti μ_e [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] a na intenzitě elektrického pole E [V m^{-1}]:

$$v = \mu_e E \quad (5)$$

Intenzita elektrického pole E v separační kapiláře je vyjádřena jako podíl napětí U vloženého na elektrody a délky kapiláry L podle rovnice (6):

$$E = \frac{U}{L} \quad (6)$$

Pohyblivost μ_e popisuje rovnice (7):

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

kde q je náboj iontu, r poloměr iontu a η [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$] viskozita roztoku.

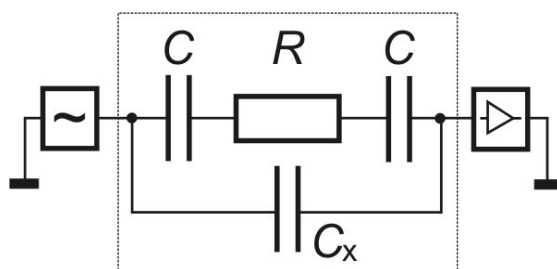
Z výše uvedené rovnice je zřejmé, že hlavními faktory ovlivňujícími iontovou mobilitu jsou rozměry molekuly a náboj. U slabých kyselin a zásad závisí na hodnotách pK a hodnotě pH vyvíjecího pufru. Čím je pH vyšší, tím větší je negativní náboj na vnitřní stěně kapiláry a tím je rychlejší elektroosmotický tok, který je dalším zásadním faktorem působícím v CZE. Tento jev působí elektricky řízený tok kapaliny v kapiláře. Lineární rychlost elektroosmotického toku (EOF) je popsána rovnicí (8):

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \zeta E \quad (8)$$

kde ε je permitivita, ζ je zeta potenciál, η je viskozita roztoku [25].

Velmi oblíbenou metodou je CZE zejména pro účinnost dosahující až miliónů teoretických pater, malou spotřebu analyzovaného vzorku a také malou spotřebu mobilní fáze. Tato metoda má tedy malé provozní náklady. Protože se používá separační kapilára s malým průměrem, mohou se používat detekční cely pouze o srovnatelných rozměrech s vnitřním průměrem kapiláry. V opačném případě by došlo ke snížení celkové účinnosti separace v důsledku rozmytí separovaných zón [26].

V této bakalářské práci byla použita bezkontaktní vodivostní detekční cela. Tato cela obsahuje dvě elektrody izolované od testovaného roztoku. Na jednu z elektrod je přiváděn střídavý signál o vhodné frekvenci (zpravidla sinusového průběhu) a signál prošlý roztokem (střídavý proud) je snímán druhou elektrodou. Signál je usměrněn, zesílen a registrován. Zjednodušený náhradní obvod bezkontaktní impedanční cely je na obr. 4.



Obr. 4. Zjednodušený náhradní obvod bezkontaktní impedanční cely a její připojení ke zdroji vysokofrekvenčního signálu a k měřidlu signálu prošlého celou [27].

C jsou kapacity kondenzátorů, které se vytváří mezi elektrodou a roztokem, v nichž je dielektrikem materiál oddělující elektrodu od roztoku, R je odpor roztoku v prostoru mezi elektrodami a C_x je parazitní kapacita umožňující přenos elektrického signálu mezi elektrodami mimo roztok, tj. po povrchu či uvnitř dielektrika. Velikost měřeného proudu prošlého detekční celou (analytický signál) závisí na impedanci cely [27].

V CZE je problém s dávkováním, protože vzorek je dávkován z nádoby se vzorkem přímo na počátek separační kapiláry. Nadávkované množství je závislé na vlastnostech separačního prostřední i na matici vzorku. Proces dávkování se tak může stát zdrojem potenciálních chyb. Vzhledem k malému vnitřnímu průměru kapiláry se dávkuje vzorek v jednotkách desetin až jednotek nanolitru. Nejběžnějším způsobem dávkování je hydrodynamické dávkování, při kterém je vzorek dávkován za pomoci tlaku nad vzorkem. Méně často se používá dávkování elektrokinetické, u kterého je množství nadávkovaného analytu závislé na jeho mobilitě i na vodivosti použité matrice. V této bakalářské práci bylo zvýšení hydrodynamického tlaku v nádobce se vzorkem realizováno tak, že nádobka se vzorkem byla na definovanou dobu zvednuta do určité výšky ν oproti výstupnímu konci kapiláry v koncové elektrodové nádobce. Vzorek byl nadávkován tlakovým rozdílem:

$$\Delta p = \Delta h \rho g \quad (9)$$

kde Δh je výškový rozdíl hladin kapaliny v nádobce vzorku a v elektrodové nádobce s výstupním koncem kapiláry (obvykle 5 – 10 cm), ρ je hustota roztoku vzorku a g je gravitační zrychlení. Dávkování je tedy ovlivněno subjektivním přístupem experimentátora [28].

3 Experimentální část

3.1 Příprava vzorku

Vzorkem pro jednotlivé metody stanovení vápníku byly šumivé tablety Vápník + vitamín D3 „Optisana“ (Krüger) získané v běžné obchodní síti. Dle etikety obsahuje 1 tableta 500 mg Ca. Jedna tableta potravinového doplňku byla rozpuštěna v asi 50 ml 0,2M HNO₃. Po jejím rozpuštění byly z roztoku odstraněny bublinky plynu 10ti minutovou sonikací. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 100,0ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Tento roztok, obsahující dle informace na etiketě 5 mg·ml⁻¹ Ca, byl použit ke stanovení vápníku použitými metodami a nazýván dále základním roztokem.

3.2 Chelatometrická titrace

3.2.1 Chemikálie

Chelaton III dihydrát, p. a. (Lach:ner); indikátory - xylenolová oranž 1:100 s NaNO₃ (Lachema); eriochromčern T 1:100 s NaCl; pevný urotropin, p. a. (Lach:ner); Schwarzenbachův pufr (pH = 10, směs NH₄Cl + HN₄OH); dusičnan olovnatý, p. a. (Lach:ner); HNO₃, p. a. 65% (Lach:ner), deionizovaná voda (Milli-Q Plus, Millipore, USA).

Pro titraci byl připraven roztok chelatonu III ($c = 0,05 \text{ mol l}^{-1}$); roztok HNO₃ ($c = 1 \text{ mol l}^{-1}$ a $c = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$).

3.2.2 Standardizace EDTA - pracovní postup

Roztok chelatonu III byl standardizován na dusičnan olovnatý podle R. Přibila [4]. Bylo odváženo asi 0,13 g dusičnanu olovnatého přesně. Přesné navážky jsou uvedeny v tabulce 1. Dusičnan byl rozpuštěn v 50 ml vody okyselené několika kapkami 1M HNO₃. Po přidání xyleneolové oranže bylo upraveno pH tuhým urotropinem do vzniku fialového zabarvení. Roztok byl titrován odměrným roztokem chelatonu III do citronově žlutého zabarvení. V tab. 1 je uvedena spotřeba a přesně vypočítané výsledné koncentrace roztoku chelatonu III.

3.2.3 Stanovení vápníku v tabletě potravinového doplňku - pracovní postup

Do titrační baňky byly pístovou pipetou odpipetovány 3,0 ml základního roztoku vzorku, přidáno cca 50 ml destilované vody, 10 ml Schwarzenbachova pufru a eriochromčerrň T jako indikátor. Tento roztok byl titrován roztokem chelatonu III z růžového do modrého zabarvení. V tab. 2 jsou uvedeny spotřeby chelatonu a přesně vypočítaný obsah vápníku v jedné tabletě.

3.3 Atomová absorpční spektroskopie

3.3.1 Aparatura

Měření byla prováděna na přístroji AAS 3 (Carl Zeiss, Jena), při vlnové délce 422,7 nm, šířce štěrbiny 0,50 nm a žhavicím proudem výbojky 9 mA. Stanovení byla prováděna v plameni acetylen – oxid dusný o průtoku acetylenu 180 l/hod a oxidu dusného 65 l/hod, přístroj byl nulován na deionizovanou vodu. Za stejných podmínek bylo provedeno měření i v plameni acetylen – vzduch.

3.3.2 Chemikálie

Dusičnan draselný, p. a (Lachema), roztok KNO₃ ($c = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ K}^+$); roztok standardu ASTASOL-Ca ($c = 0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, Analytika spol s.r.o.).

3.3.3 Pracovní postup

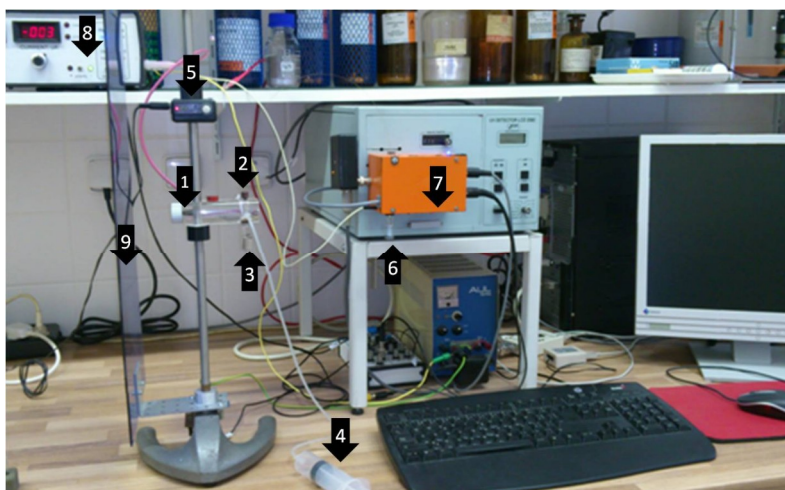
Roztok vápníku pro měření metodou standardního přídatku byl připraven přefiltrováním základního roztoku tablety. Pístovou pipetou bylo pipetováno 0,40 ml tohoto roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku, což odpovídá koncentraci asi $0,02 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do čtyř 50ml odměrných baněk pak bylo postupně napipetováno skleněnou pipetou 2,5 ml takto připraveného roztoku, aby výsledná koncentrace vápníku byla asi $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 10,0 ml roztoku KNO_3 (výsledná koncentrace $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Do první baňky nebyl přidán standardní roztok o koncentraci $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, do druhé bylo přidáno 0,5 ml tohoto roztoku, do třetí baňky 1,0 ml a do čtvrté 1,5 ml tohoto roztoku. Všechny baňky byly doplněny po rysku vodou, takže koncentrace standardu Ca^{2+} v kalibračních roztocích byla $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Spektrofotometr udával hodnotu průměru ze tří měření s příslušnou směrodatnou odchylkou. Získaná experimentální data jsou v tab. 3 a 5.

3.4 Kapilární zónová elektroforéza

3.4.1 Aparatura

Měření byla prováděna na laboratorně zhotovené elektroforetické aparatuře, viz obr. 5. Tato aparatura byla složena z plastového bločku (1), kde byl upevněn dávkovací konec separační kapiláry (Polymicro Technologies, USA), o celkové délce kapiláry 61 cm, délce kapiláry k detektoru 53 cm a vnitřním průměru kapiláry 75 μm (2). V tomto bločku byla upevněna i vialka (3) se vzorkem či pufrem a hadička z injekční stříkačky (4) umožňující zvýšit tlak vzduchu nad hladinu roztoku v dávkovací nádobce při promývání kapiláry. Nad bločkem byl umístěn časovač s čidlem (5), nastavený na přesnou dobu dávkování. Dávkovací zařízení bylo upraveno tak, že umožnilo dávkování ručním způsobem, tj. zvednutím dávkovacího konce kapiláry k tomuto časovači. Výstupní konec kapiláry byl v pufru v koncové nádobce (6). Pro detekci vápníku byla použita bezkontaktní vodivostní detekce C^4D , tj. jedna část duálního detektoru, UV/ C^4D (7). Separační napětí bylo odebíráno z vysokonapěťového zdroje (8) (upravený zdroj Spellman CZE 2000); měření byla prováděna při napětích 17 – 30 kV. Z bezpečnostních důvodů nebylo možno připojit elektrody na vysoké napětí do té doby, než byla uzavřena ochranná plexisklová dvířka (9) zamezující kontaktu obsluhy s částí aparatury pod vysokým napětím.



Obr. 5. Laboratorní elektroforetická aparatura.

1 – plastový bloček, 2 – separační kapilára, 3 – vialka se vzorkem, 4 – injekční stříkačka, 5 – časovač, 6 – koncová nádobka, 7 – detektor, 8 – vysokonapěťový zdroj, 9 – ochranná plexisklová dvířka

3.4.2 Chemikálie

Separáčnı pufr byl roztok 20 mM kyseliny 2 - morfolinoethansulfonov (MERCK) + 20 mM L-Histidinu (MERCK). Dalšími roztoky byly chlorid vpenat (Lachema) a standardnı roztok ASTASOL-Ca ($c = 0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$; Analytika spol s.r.o.)

3.4.3 Pracovnı postup

Křemenn kapilára byla před zaatkem měření aktivována 0,1 M NaOH, jenž byl v kapiláre ponechán asi 10 minut a poté 10 minut vymýván deionizovanou vodou a nsledne byla kapilára propláchnuta pufrem. Kapilára zůstala naplnn pufrem při spuštenm separanım napětí do ustálení odezvy detektoru. Poté byl do kapiláry hydrodynamicky dávkován roztok vzorku.

Před dvkovnım byla vialka s pufrem vyměněna za vialku se vzorkem. Vzorek byl dávkován zvednutm dvkovcıho konce kapiláry do definované výšky nad vstupnı konec na stanovenou dobu. Dávkováno bylo zvednutm kapiláry o 10 cm na dobu 12 s. Po nadávkování byla vyměněna vialka se vzorkem za vialku se separanım pufrem a bylo spuštěno vysoké napětí a nastartována separace. Po separaci vzorku byla kapilára vždy promyta separanım pufrem.

Nejprve byla zjištovna elektroforetick mobilita Ca^{2+} iontu při různém separanım napětí. Modelový roztok chloridu vápenatého o koncentraci $0,8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ byl měřen při napětí 17; 20; 22; 24 a 30 kV. Elektroforetick mobilita byla vypoıtna podle vztahů (9) – (11) [29], separanıı uinnost byla vypoıtna ze vztahu (14). Zıskana experimentální data a výsledky jsou v tab. 7 a 8.

$$\mu_i = \frac{l \cdot L}{t_{migr} \cdot U} \quad (9)$$

$$\mu_{eof} = \frac{l \cdot L}{t_{eof} \cdot U} \quad (10)$$

$$\mu_{eff} = \mu_i - \mu_{eof} \quad (11)$$

kde μ_i je aktuální mobilita iontu [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$], μ_{eof} je mobilita zóny bez náboje [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$], μ_{eff} je efektivní mobilita [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$], t_{migr} je migranıı as pıslušneho iontu [s], t_{eof} je doba za kterou dojdou neiontove látky k detektoru („water-gap“) [s], l je délka kapiláry k detektoru [cm], L je celková délka kapiláry [cm] a U je separanıı napětí [V].

Rovnice (9) a (10) lze upravit do tvaru

$$U = \frac{l \cdot L}{\mu} \cdot \frac{1}{t} \quad (12)$$

Závislostí U na $1/t$ je přímka, z jejíž směrnice lze určit μ . Teoretickou efektivní mobilitu lze určit ze vztahu (13) [30]

$$\mu_{eff} = \frac{\lambda}{F} \quad (13)$$

kde λ je iontová vodivost Ca^{2+} iontu ($59,5 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) a F Faradayova konstanta.

Separční účinnost N byla vyjádřena jako počet teoretických pater

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{migr}}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (14)$$

kde $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky. Experimentální data a výsledky jsou v tab. 9.

Při stanovení vápenatého iontu bylo pístovou pipetou pipetováno 0,40 ml základního roztoku do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku, což odpovídá koncentraci asi $0,02 \text{ mg ml}^{-1}$. Do každé 10ml odměrné baňky bylo pipetováno 0,4 ml tohoto roztoku vzorku tak, aby zde byl roztok vzorku vápníku o koncentraci asi $0,8 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. První baňka obsahovala jen vzorek vápníku. Do druhé baňky bylo přidáno 100 μl , do třetí 200 μl a do čtvrté 400 μl standardního roztoku vápníku, takže koncentrace standardu v jednotlivých baňkách byla $0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, $2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a $4 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Všechny baňky byly doplněny po rysku deionizovanou vodou. Měření bylo pro každou sadu roztoků provedeno čtyřikrát při napětí 20 kV.

Pík kationtu byl zaznamenán bezkontaktní vodivostní detekcí. Ve vyhodnocovacím programu CSW 1.7 (DataApex) byl odečten migrační čas, plocha a výška píku. Experimentální data a výsledky jsou v tab. 10.

3.5 Statistické vyhodnocení výsledků a použité vztahy

Pro statistické zpracování výsledku byly použity následující vztahy [31]:

Rozpětí:

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (15)$$

Směrodatná odchylka:

$$s = k_n \cdot R \quad (k_n = 0,485) \quad (16)$$

Relativní směrodatná odchylka:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (17)$$

Interval spolehlivosti:

$$L = K_n \cdot R \quad (K_n = 0,72) \quad (18)$$

V instrumentálních metodách byla použita kalibrační metoda standardního přídatku a obsahu vápníku c [g/tbl] z lineárních kalibračních grafů byl vypočítán ze vztahu:

$$c = \frac{\text{úsek}}{\text{směrnice}} \cdot \text{ředění} \quad (19)$$

Srovnání výsledků metod bylo provedeno pomocí Welchova t testu $(t_4 = 3,18)$ [32].

4 Výsledky

4.1 Chelatometrické stanovení

Obecně bylo chelatometrické stanovení podrobně popsáno v kapitole 2.1.

4.1.1 Standardizace EDTA

Roztok chelatonu III byl standardizován výše popsaným způsobem. Experimentální data a výsledná koncentrace jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Standardizace chelatonu III.

	Navážka $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ [g]	Spotřeba chelatonu III [ml]	Koncentrace [mol/L]	Faktor
1	0,1321	7,75	0,0515	1,030
2	0,1324	7,80	0,0513	1,026
3	0,1315	7,70	0,0516	1,032
4	0,1329	7,80	0,0514	1,028
\bar{x}	0,1322	7,76	0,0515	1,029

4.1.2 Stanovení vápníku v tabletě potravinového doplňku

Spotřeba chelatonu III pro stanovení obsahu vápníku v tabletě potravinového doplňku a vypočítaný obsah vápníku je uveden v tab. 2.

Tab. 2: Chelatometrické stanovení vápníku v tabletě.

Spotřeba chelatonu III [ml]	Obsah vápníku [g/tbl]
6,90	0,474
6,95	0,477
7,00	0,481
6,95	0,477

Statistické zpracování výsledků čtyř opakovaných titrací:

$$\bar{x} = \underline{0,477 \text{ g/tbl}}$$

$$s = 0,485 \cdot 0,007 = 0,003$$

$$s_r = \frac{0,003}{0,477} \cdot 100\% = 0,63\%$$

$$L_{1/2} = 0,72 \cdot 0,007 = \underline{0,001}$$

Výsledný obsah vápníku v tabletě potravinového doplňku w_s , stanovený chelatometrickou titrací je

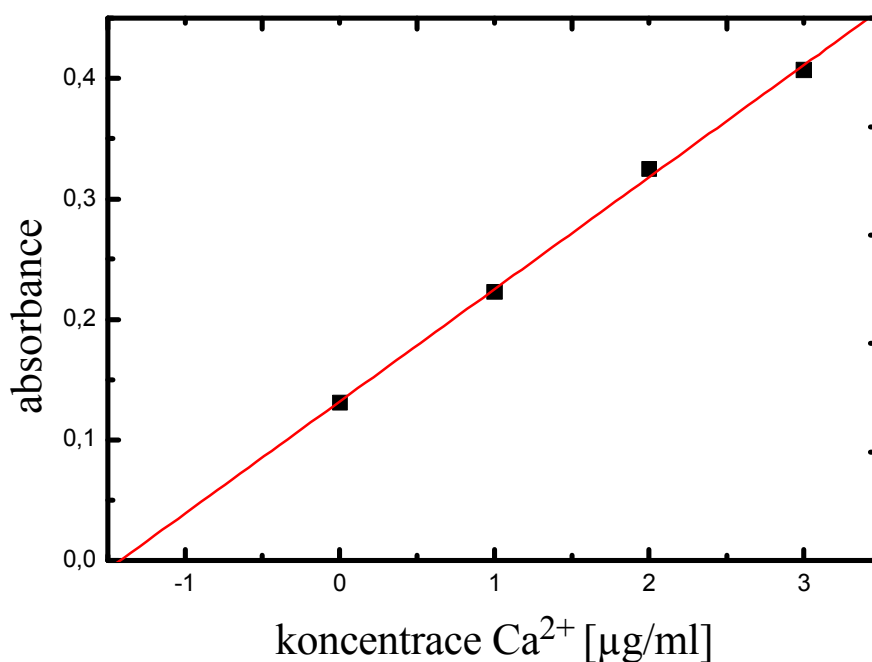
$$w_s = \bar{x} \pm L_{1/2} = \underline{0,477 \pm 0,001 \text{ g/tbl}}$$

4.2 Stanovení vápníku atomovou absorpční spektroskopií

Stanovení vápníku metodou AAS bylo popsáno výše. Změřená data absorbance v plameni acetylen – oxid dusný jsou uvedena v tab. 3, pro plamen acetylen – vzduch jsou data uvedena v tab. 5. Výsledný obsah vápníku stanovený touto metodou v plameni acetylen – oxid dusný je uveden v tab. 4, pro plamen acetylen – vzduch v tab. 6.

Tab. 3: Experimentální data pro stanovení vápníku metodou atomové absorpční spektroskopie v plameni acetylen – oxid dusný.

Vzorek	Vzorek + 1 $\mu\text{g/ml}$	Vzorek + 2 $\mu\text{g/ml}$	Vzorek + 3 $\mu\text{g/ml}$
0,137	0,257	0,358	0,468
0,132	0,250	0,349	0,457
0,130	0,245	0,343	0,448
0,128	0,242	0,337	0,447



Obr. 6: Příklad kalibrační přímky pro stanovení vápníku metodou atomové absorpční spektroskopie. Přímka bude vypadat shodně pro plamen acetylen – oxid dusný i plamen acetylen – vzduch.

Tab. 4: Parametry kalibrační přímky vápenatého iontu v plameni acetylen – oxid dusný atomové absorpční spektrometrie sestavené ze čtyř kalibračních bodů, viz obr. 6.

Směrnice	Úsek	Obsah vápníku [g/tbl]
0,1094 ($\pm 0,003$)	0,1409 ($\pm 0,005$)	0,644
0,1074 ($\pm 0,003$)	0,1359 ($\pm 0,005$)	0,633
0,1052 ($\pm 0,002$)	0,1337 ($\pm 0,004$)	0,635
0,1052 ($\pm 0,002$)	0,1307 ($\pm 0,005$)	0,621

Příklad výpočtu:

$$c = \frac{\text{úsek}}{\text{směrnice}} \cdot \text{ředění} = \frac{0,1409}{0,1094} \cdot \left(100 \cdot \frac{100}{0,4} \cdot \frac{50}{2,5}\right) = \underline{0,644 \text{ g/tbl}}$$

Statistické zpracování výsledků čtyř opakovaných měření plamen acetylen – oxid dusný:

$$\bar{x} = \underline{0,633 \text{ g/tbl}}$$

$$s = 0,485 \cdot 0,023 = 0,011$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{0,011}{0,633} \cdot 100\% = 1,74\%$$

$$L_{1,2} = 0,72 \cdot 0,010 = \underline{0,007}$$

Výsledný obsah vápníku v tabletě potravinového doplňku, w_z , stanovený atomovou absorpční spektrometrií při použití plamene acetylen – oxid dusnatý

$$w_s = \tilde{x} \pm L_{1,2} = \underline{0,633 \pm 0,007 \text{ g/tbl}}$$

Tab. 5: Experimentální data pro stanovení vápníku metodou atomové absorpční spektroskopie v plameni acetylen – vzduch.

	Vzorek	Vzorek + 1 $\mu\text{g/ml}$	Vzorek + 2 $\mu\text{g/ml}$	Vzorek + 3 $\mu\text{g/ml}$
1	0,040	0,071	0,097	0,123
2	0,039	0,070	0,095	0,121
3	0,039	0,070	0,095	0,121
4	0,039	0,070	0,095	0,122

Tab. 6: Parametry kalibrační přímky vápenatého iontu v plameni acetylen – vzduch atomové absorpční spektrometrie sestavené ze čtyř kalibračních bodů, viz obr. 6.

Směrnice	Úsek	Obsah vápníku [g/tbl]
0,0275 ($\pm 0,001$)	0,0415 ($\pm 0,002$)	0,755
0,0271 ($\pm 0,001$)	0,0406 ($\pm 0,002$)	0,749
0,0271 ($\pm 0,001$)	0,0406 ($\pm 0,002$)	0,749
0,0274 ($\pm 0,001$)	0,0404 ($\pm 0,002$)	0,737

Příklad výpočtu:

$$c = \frac{\text{úsek}}{\text{směrnice}} \cdot \text{ředění} = \frac{0,0415}{0,0275} \cdot \left(100 \cdot \frac{100}{0,4} \cdot \frac{50}{2,5}\right) = \underline{0,755 \text{ g/tbl}}$$

Statistické zpracování výsledků čtyř opakovaných měření plamen acetylen – vzduch:

$$\bar{x} = \underline{0,748 \text{ g/tbl}}$$

$$s = 0,485 \cdot 0,018 = 0,009$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{0,009}{0,748} \cdot 100\% = 1,20\%$$

$$L_{1,2} = 0,72 \cdot 0,009 = \underline{0,006}$$

Výsledný obsah vápníku v tabletě potravinového doplňku, w_z , stanovený atomovou absorpční spektrometrií při použití plamene acetylen – vzduch

$$w_s = \tilde{x} \pm L_{1,2} = \underline{0,748 \pm 0,006 \text{ g/tbl}}$$

Jak je vidět z výsledků obou měření, složení plamene má vliv na změřenou koncentraci vápníku ve vzorku.

4.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

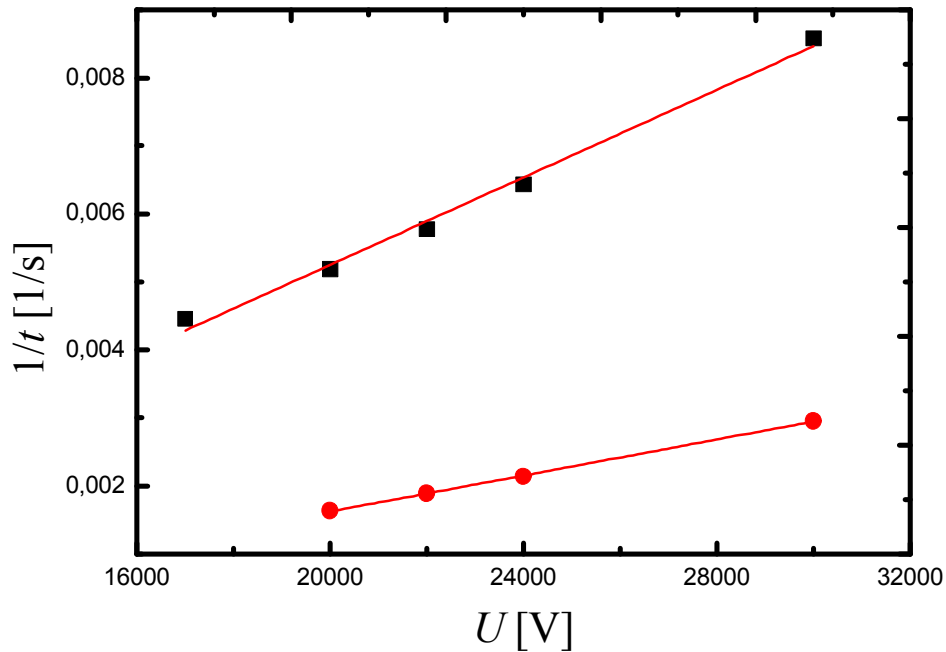
Obecně byla popsána CZE v kapitole 2.3.

4.3.1 Zjištění elektroforetické mobility Ca^{2+} iontu měřením migračního času při různém separačním napětí

Byly změřeny migrační časy při různých separačních napětích a z nich vypočteny závislosti $1/\text{Ca}^{2+} t_{\text{migr}}$ a $1/t_{\text{eof}}$ uvedené v tab. 7. Z těchto hodnot byl sestrojen graf závislosti $1/t_{\text{migr}}$ a $1/t_{\text{eof}}$ na separačním napětí U , který je na obr. 7. Ze získaných směrnic uvedených v tab. 6, byla podle rovnice (11) vypočítána efektivní mobilita. Pro porovnání byla podle rovnice (13) vypočtená teoretická hodnota mobility z tabelovaných hodnot vodivostí iontů. Experimentální a vypočítaná mobilita jsou téměř shodné.

Tab. 7: Experimentální data pro určení elektroforetických mobilit.

U [V]	I [μA]	$\text{Ca}^{2+} t_{\text{migr}}$ [s]	$1/\text{Ca}^{2+} t_{\text{migr}}$ [1/s]	t_{eof} [s]	$1/t_{\text{eof}}$ [1/s]
17 000	5	224,40	0,0044563	633,30	0,0015790
20 000	7	192,90	0,0051840	612,18	0,0016335
22 000	7	173,22	0,0057730	529,98	0,0018869
24 000	8	155,40	0,0064350	467,82	0,0021376
30 000	10	116,52	0,0085822	338,58	0,0029535



Obr. 7: Závislost reciproké hodnoty migračního času, t_{migr} (čtverečky) a rychlosti elektroosmotického toku, t_{eof} (puntíky) na separačním napětí.

Směrnice závislostí $1/t_{migr}$ a $1/t_{eof}$ z obr. 7 jsou uvedeny v tab. 8, kde jsou i vypočítané příslušné mobility. Efektivní mobilita byla vypočtena podle rovnice (11).

$$\mu_{eff} = \mu_i - \mu_{eof} = 10,43 \cdot 10^{-4} - 4,28 \cdot 10^{-4} = \underline{\underline{6,15 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}}}$$

Tab. 8: Vypočtená mobilita v závislosti na velikosti napětí dle rovnice (9) a (10).

	směrnice	$\mu [\text{cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}]$
$1/t_{migr}$	$3,226 \cdot 10^{-7}$	$10,43 \cdot 10^{-4}$
$1/t_{eof}$	$1,324 \cdot 10^{-7}$	$4,28 \cdot 10^{-4}$

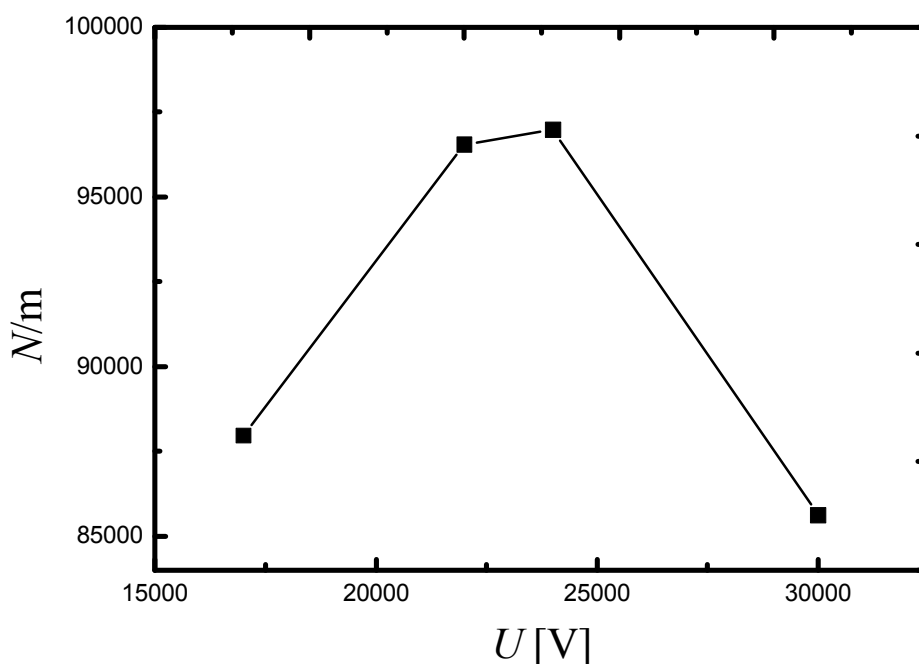
Teoretická hodnota mobility podle rovnice (13)

$$\mu_{eff} = \frac{\lambda}{F} = \frac{59,5}{96\,485} = \underline{\underline{6,17 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}}}$$

Dále byla zjišťována separační účinnost dle rovnice (14). Experimentální data a vypočítané hodnoty počtu teoretických pater jsou v tab. 9. Na obr. 8 je závislost počtu teoretických pater na separačním napětí. Se zvyšujícím se napětím separační účinnost roste, ale jen do určité míry. Při velmi vysokém napětí protéká kapilárou vyšší proud, generuje se více Jouleova tepla. Zóny látek, kde je zóna Ca^{2+} iontu, se rozšiřují, takže separační účinnost klesá.

Tab. 9: Experimentální data získaná vyhodnocením elektroferogramů při různém napětí. Vypočítaný počet teoretických pater a separační účinnost vyjádřená jako počet teoretických pater na jednotku délky.

U [V]	Ca^{2+} t_{migr} [s]	$w_{(1/2)}$ [s]	N	N/m
17 000	224,40	2,28	53 664	87 974
22 000	173,22	1,68	58 896	96 551
24 000	155,40	1,50	59 161	96 985
30 000	116,52	1,20	52 233	85 628



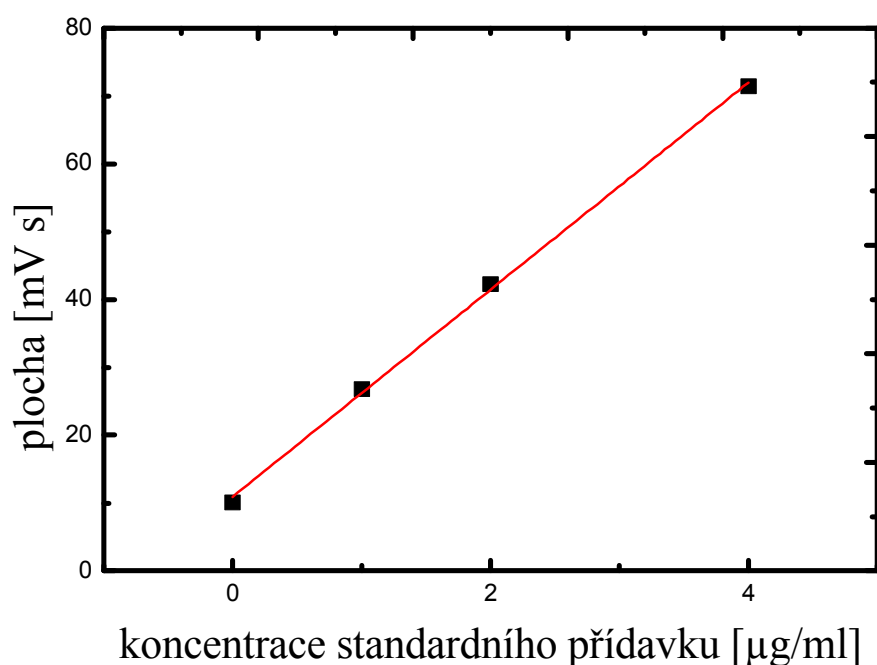
Obr. 8: Závislost separační účinnosti na napětí

4.3.2 Stanovení vápníku metodou standardního přidavku

Byly měřeny čtyři sady měření, výsledky první sady měření jsou pro ilustraci uvedeny v tab. 10. Z těchto výsledků byl vytvořen graf na obr. 9 a získány směrnice a úsek kalibrační přímky. Z takto určených dat byla dle rovnice (19) vypočítána koncentrace Ca^{2+} ve vzorku. Další sady měření byly zpracovány stejným způsobem, výsledné parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 11.

Tab. 10: Medián naměřených experimentálních hodnot ze čtyř opakovaných měření pro stanovení obsahu vápníku metodou standardního přidavku. Příklad experimentálních dat jedné sady měření.

	Ca^{2+} t_{migr} [s]	A [mV s]	h [mV]
vzorek	188,82	10,0727	6,351
Vzorek+ 1 st	189,24	27,9804	12,400
Vzorek + 2 st	190,20	42,2929	15,942
Vzorek + 3 st	189,96	60,6969	19,391



Obr. 9: Příklad kalibrační přímky plochy píku pro stanovení vápníku metodou standardního přidavku, měřenou kapilární zónovou elektroforézou.

Tab. 11: Parametry kalibračních přímek ploch píku vápenatého iontu stanovené kapilární zónovou elektroforézou.

Měřená sada	Úsek	Směrnice	Obsah vápníku [g/tbl]
1	10,922 ($\pm 0,796$)	15,261 ($\pm 0,348$)	0,437
2	12,873 ($\pm 6,228$)	18,031 ($\pm 4,824$)	0,446
3	10,677 ($\pm 2,401$)	16,350 ($\pm 1,865$)	0,408
4	11,237 ($\pm 1,483$)	15,190 ($\pm 1,150$)	0,462

Příklad výpočtu:

$$c = \frac{\text{úsek}}{\text{směrnice}} \cdot \text{ředění} = \frac{10,922}{15,261} \cdot \left(100 \cdot \frac{100}{0,4} \cdot \frac{10}{0,4}\right) = \underline{0,437 \text{ g/tbl}}$$

Statistické zpracování výsledků čtyř opakovaných měření:

$$\bar{x} = \underline{0,438 \text{ g}}$$

$$s = 0,485 \cdot 0,054 = 0,026$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{0,026}{0,438} \cdot 100\% = 5,94\%$$

$$L_{1,2} = 0,72 \cdot 0,026 = \underline{0,019}$$

Výsledný obsah vápníku v tabletě potravinového doplňku, w_s , stanovený kapilární elektroforézou

$$w_s = \tilde{x} \pm L_{1,2} = \underline{0,438 \pm 0,019 \text{ g/tbl}}$$

4.4 Srovnání výsledků

Velmi častou metodou pro určení anorganických iontů je atomová absorpční spektrometrie, proto byla použita pro srovnání výsledků s kapilární elektroforézou.

V plameni acetylen – oxid dusný vyšel obsah vápníku 0,633 g na tabletu, v plameni acetylen - vzduch dokonce 0,748 g na tabletu. Protože deklarovaný obsah vápníku na tabletu je 0,500 g, tyto výsledky jsou zřejmě chybné a atomová absorpční spektrometrie byla vyhodnocena jako nevhodná metoda pro stanovení vápníku v matici námi analyzované tablety.

Historickou metodou stanovení vápníku v roztoku je chelatometrická titrace. Titrace je metoda přesná, avšak subjektivní. Pro naše účely srovnání metod s kapilární zónovou elektroforézou však byla dostačující. Chelatometricky bylo v tabletě stanoveno 0,477 g vápníku. Toto odpovídá 95,5 % deklarovaného obsahu na obalu tablety.

Kapilární zónovou elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí byl stanoven obsah vápníku metodou standardního přídávku. Obsah vápníku byl 0,438 g na jednu tabletu, což odpovídá 88,4 % deklarovaného obsahu na obalu tablety.

Pro ověření shodnosti výsledků získaných chelatometrickou titrací a kapilární zónovou elektroforézou byl použit Welchův t test. Byl použit online calculator [32], který srovnal metody a vyhodnotil pravděpodobnost shodnosti výsledků. Výsledek $t = 3,415$ pro stupeň volnosti 3 je větší než kritická hodnota $t = 3,18$.

Bylo zjištěno, že hodnota Welchova t testu pro srovnání různých metod je větší než kritická hodnota, proto je odlišnost výsledků statisticky významná. Toto je způsobeno použitím rozdílných metod. Není možno říct, která metoda je správnější, protože není známa skutečná hodnota obsahu vápníku.

5 Závěr

Kapilární zónovou elektroforézou byla určena elektroforetická mobilita modelového Ca^{2+} iontu měřením migračního času při různém separačním napětí. Tato hodnota se shoduje s hodnotou vypočítanou z tabulek.

Dále byla zjištěna účinnost separační kolony při rozdílném separačním napětí.

Stanovení obsahu vápníku v tabletě potravinového doplňku bylo provedeno chelatometrickou titrací, atomovou absorpční spektrometrií a kapilární zónovou elektroforézou. Pro vyhodnocení výsledků atomovou absorpční spektrometrií a kapilární zónovou elektroforézou byla použita metoda standardního přídávku. Chelatometrickou titrací a kapilární zónovou elektroforézou se podařilo určit obsah vápníku blízký hodnotě uvedené na etiketě potravinového doplňku. Vzhledem k tomu, že není známa skutečná hodnota obsahu vápníku v doplňku, jen hodnota uvedená na etiketě, nelze otestovat shodu nalezených výsledků se správnou hodnotou. Tyto metody lze však považovat za vhodné ke stanovení vápníku v potravinových doplncích.

Atomovou absorpční spektrometrií se nám nepodařilo určit obsah vápníku v tabletě. Tento neúspěch byl zřejmě způsoben tím, že atomová absorpční spektrometrie nedokáže potlačit vliv matrice. Při této metodě nedochází k separaci látek, proto zde interferovaly další látky, které potravinový doplněk obsahoval. Jako nejpravděpodobnější se jeví hypotéza karamelizace sladidla na žhavicí výbojce, která by mohla způsobit falešnou vyšší koncentraci.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo vyzkoušení stanovení obsahu vápníku v praktickém vzorku – v tabletě potravinového doplňku, různými analytickými metodami - kapilární zónovou elektroforézou, atomovou absorpční spektrofotometrií a chelatometrickou titrací. Tento cíl byl splněn.

6 Seznam použité literatury

- [1] Lukeš, I.: *Systematická anorganická chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2009, ISBN 978-246-1614-8
- [2] Kulveitová, H.: *Prvky 2. skupiny – s2 Kovy alkalických zemin*; Vysoká škola Báňská, Ostrava 2006, ISBN 978-80-248-1322-6
- [3] FAO: Chapter 11. *Calcium*, (2015-05-15)
Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/004/Y2809E/y2809e0h.htm>
- [4] Wikipedia: *Calcium carbonate*, (2015-05-15)
Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_carbonate
- [5] Pánek, J; Pokorný, J; Dostálová, J.: *Základy výživy a výživová politika*, VŠCHT, Praha 2002, ISBN 80-7080-468-8
- [6] Deutsche Gesellschaft für Ernährung: *Referenční hodnoty pro příjem živin*, Společnost pro výživu, Praha 2011, ISBN 978-80-254-6987-3
- [7] Česká průmyslová zdravotní pojišťovna: *Zdroje vápníku*, (2015-05-15)
Dostupné z: <http://www.cpzp.cz/clanek/305-0-Zdroje-vapniku.html>
- [8] Ledvina, M.; Stoklasová, A.; Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny II*, nakladatelství Karolinum, Praha 2009, ISBN 80-246-0850-2
- [9] Wilhelm, Z. *Co je dobré vědět o vápníku*, (2015-05-15)
Dostupné z: <http://solen.cz/pdfs/lek/2007/04/09.pdf>
- [10] Fialová, L.; Vejražka, M.: *Metabolismus vápníku a fosforu. Praktické cvičení z lékařské biochemie. Všeobecné lékařství*, (2015-05-15)
Dostupné z: http://che1.lf1.cuni.cz/html/Kost-teorievseobecni0910%20_3_.pdf
- [11] Sibernagl, S.; Agamemnon, D.: *Atlas fyziologie člověka*, nakladatelství Grada, Praha 2004, ISBN 80-247-0630-X

[12] Veselý, O.: *Poruchy koncentrace iontů vápníku v plazmě – hypokalcémie a hyperkalcémie*, (2015-05-15)

Dostupné z: <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki2/?p=7377>

[13] Hynie, S.: *Speciální farmakologie - Hormony a vitamíny*, nakladatelství Karolinum, Praha 2002, ISBN 80-246-0416-7

[14] Lüllman, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*, nakladatelství Grada, Praha 2007, ISBN 978-80-247-1672-5

[15] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2003, ISBN 80-246-0553-8

[16] Kašička, V.: *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*, Chem. Listy 91, 320 - 329 (1997)

[17] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*, nakladatelství P. Klouda, Ostrava 2003, ISBN 80-86369-07-2

[18] Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2005, ISBN 80-246-1146-5

[19] Morais, S.; Carvalho, G. S.; Sousa, J. P.: *Potentiometric determination of total and ionized calcium in osteoblast-like cell culture medium*, Electroanalysis, Dec 1996, vol. 8, s. 1174-1178, ISSN 1040-0397

[20] Wikipedia: *Chelatometrie*, (2015-05-04)

Dostupné z: <http://de.wikipedia.org/wiki/Chelatometrie>

[21] Přibil, R.: *Komplexometrie*, SNTL, Praha 1977, ISBN 04-621-77

[22] *Základní praktika z analytické chemie*, ©Katedra analytické chemie, UK v Praze 2004

[23] Zýka, J a kolektiv: *Analytická příručka II*, SNTL, Praha 1980, ISBN 04-602-80

[24] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I.*, nakladatelství Karolinum, Praha 1997, ISBN 80-246-0776-X

- [25] Tagliaro, F.; Manetto, G.; Crivellente, F.; Smith, F. P.: *A Brief introduction to capillary electrophoresis*, Forensic Science International 92, 75 – 88 (1998)
- [26] Tůma, P.; Opekar, F.; Jelínek, I.: *Vodivostní vláknový detektor pro kapilární elektroforézu*, Chem. Listy 93, 533 - 535 (1999)
- [27] Opekar, F.; Štulík, K.: *Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok-znovuzrození bezkontaktních impedančních metod*, Chem. Listy 104, 1148 – 1154 (2010)
- [28] Kadlecová, T.; Opekar, F.; Tůma, P.: *Usnadněné hydrodynamické dávkování vzorku do separační kapiláry v laboratorních elektroforetických aparaturách*, Chem. Listy 107, 486 – 490 (2013)
- [29] Štulík, K.; kolektiv: *Analytické separační metody*, nakladatelství Karolinum, Praha 2004, ISBN 80-246-0850-9
- [30] Dvořák, J.; Koryta, J.; Boháčková, V.: *Elektrochemie*, nakladatelství Academia, Praha 1966, ISBN 21-150-66
- [31] Coufal, P.; Bosáková, Z.; Čabala, R.: *Seminář z analytické chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2007, ISBN 978-80-246-1400-7
- [32] Quick Calcs: *t test calculator* (2015-05-12)
Dostupné z: <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=50>