



**VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie  
Ústav analýzy potravin a výživy

---

**LABORATOŘ ANALÝZY POTRAVIN  
A PŘÍRODNÍCH PRODUKTŮ**

**Stanovení minerálních látek**  
*(metody: atomová absorpční spektrometrie,  
spektrofotometrie, titrace)*

---

*Garant úlohy: prof. Dr. Ing. Richard Koplík*

## Obsah

Náplň úlohy Výukové cíle úlohy Požadované vstupní znalosti	
Další znalosti rozvíjené při výuce.....	3
<b>STUDIJNÍ ČÁST</b> .....	4
<b>Příprava vzorku pro stanovení minerálních látek</b>	4
Rozklad na mokré cestě.....	4
Rozklad na suché cestě.....	5
<b>Titrační metody</b> .....	6
Argentometrické stanovení chloridových iontů.....	7
Merkurimetrické stanovení chloridových iontů.....	8
Komplexometrické (chelatometrické) stanovení hořčíku a vápníku.....	8
Manganometrické stanovení vápníku.....	9
<b>Spektrofotometrie</b> .....	10
Teorie.....	10
Využití spektrofotometrie pro stanovení minerálních látek.....	11
<b>Atomová absorpční spektrometrie</b> .....	13
Teorie.....	13
Využití AAS v analýze potravin.....	16
<b>Kontrolní otázky</b> .....	16
<b>PRACOVNÍ ČÁST</b> .....	18
Příprava vzorků potravin pro stanovení kovů rozkladem na suché cestě.....	18
Příprava vzorků potravin pro stanovení chloridů.....	22
Příprava vzorků potravin pro stanovení prvků mikrovlnným tlakovým rozkladem.....	23
Argentometrické stanovení chloridů v potravinách (obecný postup).....	26
Stanovení chloridů a chloridu sodného v pečivu.....	28
Spektrofotometrické stanovení fosforečnanů, kyseliny fosforečné nebo celkového fosforu.....	31
Stanovení mědi, zinku a železa v potravinách atomovou absorpční spektrometrií.....	37
Stanovení sodíku a draslíku v potravinách atomovou absorpční spektrometrií.....	42
Spektrofotometrické stanovení železa.....	47

Tento výukový text je určen k individuální přípravě na úlohu *Stanovení minerálních látek* v předmětu Laboratoř analýzy potravin a přírodních produktů pro posluchače bakalářského studia na FPBT. Obsahuje návody pro jednotlivé laboratorní práce. Pro učitele představuje širší „sbírku“ laboratorních prací, z nichž může učitel vybrat konkrétní náplň úlohy podle aktuálních možností a potřeb.

### **Náplň úlohy**

1. stanovení chloridů a chloridu sodného v pečivu (argentometrická titrace chloridů a stanovení sodíku metodou AAS)
2. spektrofotometrické stanovení fosforečnanů (stanovení kyseliny fosforečné v nápoji)

### **Výukové cíle úlohy**

1. osvojení správné pracovní techniky v odměrné analýze
2. procvičení potřebných chemických výpočtů
3. zvládnutí práce se spektrofotometrem a atomovým absorpčním spektrometrem
4. vyhodnocení výsledku analýzy ve vztahu k legislativně vymezeným mezním hodnotám

### **Požadované vstupní znalosti**

1. vyčíslování rovnic chemických reakcí
2. přepočty hmotnosti na látkové množství, hmotnostního zlomku na hmotnostní koncentraci, hmotnostní koncentrace na molární (látkovou) a naopak, příprava roztoků
3. princip odměrné analýzy, základní pojmy (odměrný roztok, titrace, titrační křivka, bod ekvivalence), výpočty v odměrné analýze, odměrné nádoby a práce s nimi
4. základní způsoby a podmínky (teploty, činidla) rozkladu biologických vzorků, bezpečnostní rizika při mineralizaci
5. srážecí reakce ve vodném prostředí, součin rozpustnosti, základní princip argentometrické titrace
6. princip spektrofotometrie, Lambertův-Beerův zákon
7. princip atomové absorpční spektrometrie

### **Další znalosti rozvíjené při výuce**

8. aplikace jednotlivých metod rozkladu pro stanovení různých prvků
9. principy argentometrických, komplexometrických a manganometrických titrací včetně způsobů indikace bodu ekvivalence a použití základních látek pro standardizaci odměrných roztoků
10. zásady práce ve spektrofotometrii, komplementarita barev, vztah mezi UV/VIS absorpčním spektrem a strukturou látky
11. základní části AA spektrofotometru, druhy plamenů užívaných v AAS, vyjadřování citlivosti v AAS, způsoby řešení ionizačních a chemických interferencí v plamenové AAS, aplikační možnosti AAS

S výjimkou bodů 1-3 (elementární znalosti) se studenti mohou s problematikou teoreticky seznámit, případně své předchozí znalosti upevnit přečtením studijní části tohoto učebního textu a své porozumění si pak prověřit pomocí kontrolních otázek.

# STUDIJNÍ ČÁST

Na následujících stranách jsou stručně shrnuta základní fakta o metodách analýzy minerálních látek a aniontů v potravinách včetně jejich principů. Celkový přehled o metodách stanovení minerálních látek

a stopových prvků naleznete v příslušné přednášce na adrese <http://web.vscht.cz/koplikr/> v části Analýza potravin a přírodních produktů.

## PŘÍPRAVA VZORKU PRO STANOVENÍ MINERÁLNÍCH LÁTEK

Příprava vzorku potravinářského nebo jiného biologického materiálu spočívá nejčastěji v rozkladu vzorku. Doporučené postupy rozkladu vzorků potravin jsou uvedeny v normě ČSN 56 0065 „Metody mineralizace vzorků před stanovením obsahu těžkých kovů v poživatinách“. Tato norma popisuje různé způsoby provedení rozkladu (mineralizace) na mokré cestě i na suché cestě. Postupy rozkladu **na mokré cestě** a použité mineralizační směsi jsou specifikovány s ohledem na složení analyzovaných vzorků. Norma připouští rozklad směsí  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{SO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$  i směsí  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{SO}_4+\text{HClO}_4$ . Pro **rozklad na suché cestě** je podle normy možné k ohřevu vzorků použít kromě muflové pece s teplotní regulací také topnou desku (elektrický vaříč), plynový kahan nebo mikromineralizátor. Norma doporučuje použití pomocného činidla (roztoku  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ), připouští však i postup, při kterém se pomocné činidlo ke vzorku nepřidává. Norma přitom nespecifikuje postupy a jejich varianty, které jsou vhodné ke stanovení konkrétních analytů.

### Rozklad na mokré cestě

Klasický způsob provedení rozkladu na mokré cestě spočívající v ohřevu směsi vzorku a kyselin v Kjeldahlově baňce v plameni kahanu se dnes v analytické praxi již téměř nepoužívá. Obvykle je nahrazován elektrickým ohřevem za definované teploty tepelného zdroje. Tepelný zdroj i rozkladné nádoby (zkumavky, kádinky, baňky) jsou z hlediska tvaru a velikosti voleny tak, aby byl zajištěn rychlý a rovnoměrný přestup tepla. Volbou navážky, potřebných činidel a jejich množství a zejména vhodným teplotním režimem je možné vypracovat postupy, které zajistí téměř dokonalý rozklad organické matrice vzorku. **Teplotní program rozkladu** vychází z teplot varu příslušných kyselin a z reaktivity složek, jejichž přítomnost ve vzorku předpokládáme. Např. pro přípravu vzorků většiny živočišných tkání a následné stanovení As, Cd, Cu, Pb, Se, Zn (případně i Hg) atomovou absorpční spektrometrií lze použít rozklad směsí  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{SO}_4+\text{HClO}_4$  při teplotách 110-200°C popsány v práci [1]. Pro různé materiály je třeba modifikovat navážku, použitá činidla (např. v případech, kdy mohou vznikat málo rozpustné sírany je třeba vypustit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Provedení rozkladu s kontrolovaným a pozvolným teplotním režimem je zpravidla také mnohem bezpečnější, než zmíněný klasický postup. I zde je však nutná nejvyšší opatrnost, zvláště při rozkladu vzorků směsí obsahující kyselinu chloristou (směs  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{SO}_4+\text{HClO}_4$  je bezpečnější, než směs  $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$ ). Klasické postupy mokré mineralizace uvedené v ČSN 56 00 65 lze tedy považovat pouze za orientační. Navíc norma neupozorňuje dostatečně na **rizika při práci s kyselinou chloristou** (nebezpečí exploze při rozkladu příliš velké navážky nebo při přehřátí reakční směsi).

---

[1] Salisbury C.D., Chan W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 218, 1985

Modernějším a rychlejším způsobem rozkladu je **rozklad tlakový** [2], tj. rozklad prováděný v uzavřeném systému (v uzavíratelných teflonových nebo křemenných reakčních nádobkách umístěných ve vnějším plášti). Navážka vzorku zpravidla odpovídá množství 0,2-0,5 g sušiny. Mineralizačním činidlem bývá většinou jen  $\text{HNO}_3$ , případně směs  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ . Ohřev může být realizován konvekcí nebo absorpcí mikrovlnné energie. Výhodou těchto postupů je **eliminace ztrát analytu, menší spotřeba reagensů a minimální kontaminace vzorku**. Vzhledem k menší navážce vzorku se tyto postupy používají zejména ve spojení s vysoce citlivými analytickými metodami, jako jsou AAS s elektrotermickou atomizací, ICP spektrometrie, případně metody elektrochemické rozpouštěcí analýzy. Aplikace plamenové AAS je většinou možná jen pro stanovení prvků zastoupených ve vyšších koncentracích (např. Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu). Některé typy mikrovlnných tlakových mineralizátorů umožňují kombinovat rozklad za atmosferického a zvýšeného tlaku. **Mikrovlnný tlakový rozklad** vzorků je ve srovnání s mineralizací za atmosferického tlaku podstatně rychlejší. V některých případech lze vzorek rozložit a zchladit na laboratorní teplotu již za 20 minut. Účinnost tlakového mikrovlnného rozkladu [3] je dostatečná pro analýzu získaných mineralizátů metodami atomové spektrometrie. Při aplikaci elektrochemických metod je však zpravidla nutné tyto postupy kombinovat s další úpravou, během které jsou totálně zoxidovány zbytkové organické látky. Příkladem použití takové kombinace je metoda AOAC 986.15 Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium and Zinc in Food, která pro stanovení Cd a Pb předepisuje tlakový rozklad 0,3 g vzorku s 5 ml  $\text{HNO}_3$  při  $150^\circ\text{C}$  následovaný odpařením digerátu a tavením se směsí  $\text{NaNO}_3+\text{KNO}_3$ . Z tuhého zbytku se pak připraví výluh v 0,5M  $\text{HNO}_3$  a prvky Cd a Pb se stanoví anodickou rozpouštěcí voltametrií.

### Rozklad na suché cestě

**Klasický rozklad vzorků na suché cestě** spočívá v oxidaci organické matrice atmosferickým kyslíkem za zvýšené teploty (nejčastěji  $450-550^\circ\text{C}$ ) a za atmosferického tlaku [4]. (Tento typ rozkladu je zcela nevhodný pro stanovení rtuti; stanovení arsenu a selenu lze uskutečnit za kontrolované teploty s přidavkem pomocného činidla  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ). Suchý rozklad zpravidla trvá několik desítek hodin. Rozklad se provádí v křemenných, skleněných nebo platinových nádobkách a probíhá ve čtyřech fázích: **sušení, zuhelnění, zpopelnění a rozpouštění popela** v roztoku minerální kyseliny. První tři fáze mohou být realizovány v jednom zařízení (teplotně programovatelná elektrická pec) nebo v různých zařízeních (sušárna, infralampa, topná deska, pec). Za nejkritičtější fázi procesu je považováno zuhelnění, při kterém může v důsledku průběhu exotermních dějů dojít k přehřátí vzorku (teplota uvnitř rozkládaného materiálu je pak vyšší než teplota tepelného zdroje). Při vysoké teplotě potom dochází ke ztrátám analytů těkáním. Platí to zejména pro halogenidy zinku, kadmia a olova. Proto je aplikace rozkladu na suché cestě u vzorků s mimořádně vysokým obsahem chloridů (např. solené potraviny) velmi problematická. V takových případech se pro stanovení těžkých kovů volí spíše rozklad na mokré cestě. U vzorků, které mají nezanedbatelný přirozený obsah chloridů, je vhodné pro stanovení olova a kadmia před zpopelněním konvertovat těkavé chloridy na méně těkavé sírany přidavkem kyseliny sírové [5] nebo roztoku  $\text{K}_2\text{SO}_4$  [6] ke vzorku. Zuhelnění pak probíhá zpravidla záhřevem na topné desce až do odkouření  $\text{SO}_3$  [7] nebo přímo v elektrické peci. V druhém případě je

[2] Jackwerth E., Gomišček S.: Pure & Appl. Chem. 56, 479, 1984

[3] Levine K.E. et al.: J. Anal. At. Spectrom. 14, 49, 1999

[4] Mader P. et al.: Talanta 43, 521, 1996

[5] Satzger R.D. et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65, 987, 1982

[6] Gajan R.J. et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65, 970, 1982; AOAC Method 982.23: Cadmium and Lead in Food. Anodic Stripping Voltammetric Method

[7] Adeloju S.B.: Analyst 114, 455, 1989

však nutné mít pec s vnitřními stěnami z materiálu, který nebude narušen parami oxidu siřového (křemen).

Při použití pomocného činidla  $Mg(NO_3)_2$  probíhá rozklad již v počátečních fázích v silně oxidačním prostředí (termickým rozkladem dusičnanu vzniká oxidující plyn oxid dusičitý), takže je možné minimalizovat ztráty těkavých prvků jako jsou arsen, selen nebo fosfor. Pomocné činidlo se aplikuje ve formě vodného (nebo ethanolového) roztoku, který se rozmíchá se vzorkem. Ze vzniklé suspenze se během sušení odpaří rozpouštědlo. Činidlo je také možné aplikovat ve formě krystalů  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , které se vmíchají do vzorku nebo se jimi vzorek převrství. Použití pomocného činidla omezuje kontakt vzorku se stěnami nádoby a tak snižuje ztráty analytu retencí ve stěně spalovacího kelímku nebo v nerozpustném silikátovém zbytku popela za vysokých teplot. Nevýhodou použití  $Mg(NO_3)_2$  nebo jiných pomocných činidel na bázi solí ( $K_2SO_4$ ,  $Mg(CH_3COO)_2$ ) je výrazně snížená životnost použitých křemenných kelímků nebo kádinek. Pokud mají být v mineralizátu stanoveny těžké kovy (zvláště Pb a Cd), je nutné pro pomocné činidlo používat velmi drahé vysoce čisté preparáty dusičnanu hořečnatého. Navíc vysoká koncentrace solí ve výsledném výluhu popela může působit potíže při stanovení některých prvků metodou AAS s elektrotermickou atomizací a metodou ICP-MS.

**Ztráty analytů**, ke kterým dochází během zuhelnění a zpopelnění jsou hlavní slabinou klasického suchého rozkladu. Velikost ztrát je závislá na matici vzorku a na teplotním režimu. Ztráty lze omezit především vhodně zvoleným teplotním programem. K úplnému rozkladu biologických materiálů bez použití pomocného činidla je nezbytné dosáhnout konečné teploty alespoň  $450^\circ C$ . Teploty nad  $550^\circ C$  jsou z hlediska ztrát riskantní. Bylo však prokázáno, že mnohem významnějším činitelem než maximální teplota rozkladu je rychlost ohřevu vzorku. Pomalé zvyšování teploty ve fázích zuhelnění a zpopelnění, které je možné realizovat např. na regulovatelné topné desce s otvory pro spalovací kelímky nebo v programovatelné peci, zabráňuje přehřátí nebo dokonce vzplanutí vzorku. Pro zpopelnění vzorků potravin s minimálními ztrátami Pb, Cd, Cu, Zn, Mn a Fe je doporučována rychlost nárůstu teploty  $50^\circ C/h$  [8] nebo dokonce jen  $20^\circ C/h$  [9] a maximální teplota  $450-520^\circ C$ .

Je zřejmé, že u tak málo robustní metody úpravy vzorku, jakou je zpopelnění, je popis způsobu provedení rozkladu na suché cestě uvedený v ČSN 56 0065 zcela nedostatečný. Norma připouští rozklad s dusičnanem hořečnatým i bez něj a nespecifikuje závazně jaké zařízení má být použito k ohřevu vzorků. Udává pouze maximální teplotu  $450^\circ C$  a zmiňuje se o postupném zvyšování teploty v peci. Rozklad podle normy, jehož provedení je ponecháno libovůli analytika, nemůže sám o sobě zajistit správnost analytických výsledků. Proto je nutné vypracovat podrobný jednoznačný postup a pro konkrétní kombinaci analytu a matrice je třeba jej validovat. V pracovní části jsou uvedeny dva velmi podobné standardní operační postupy založené na zpopelnění, které jsou určeny k úpravě vzorků potravin před stanovením některých kovů a před stanovením chloridových iontů. Oba vyhovují podmínkám stanoveným normou ČSN 56 0065.

## TITRAČNÍ METODY

Klasické chemické metody kvantitativní analýzy, tedy metody titrační a vážkové, je možné použít pouze pro stanovení makrosložek vzorku. Pokud jde o analýzu minerálních látek, jsou v potravinách titračními metodami snadno stanovitelné některé majoritní prvky a anionty (chloridové ionty, vápník, hořčík). Používají se k tomu argentometrické (případně merkurimetrické), komplexometrické nebo manganometrické titrace.

---

[8] Jorhem L.: J. AOAC Int. 76, 798, 1993

[9] DeBoer J.M.L., Maessen F.J.M.J.: Spectrochim. Acta 38B, 739, 1983

## Argentometrické stanovení chloridových iontů

Podstatou stanovení je srážecí reakce chloridového iontu se stříbrným iontem za vzniku bílého chloridu stříbrného:



V praxi se používá nejčastěji **stanovení podle MOHRA**, kdy se vzorek obsahující rozpustné chloridy titruje odměrným roztokem dusičnanu stříbrného. Indikace bodu ekvivalence je založena na další srážecí reakci stříbrného iontu s chromanovým iontem přidaným do titrované směsi jako chroman draselný. Reakce vyžaduje rozmezí pH 6,5-10. Při vhodné zvolené koncentraci chromanových iontů je k vysrážení červenohnědého chromanu stříbrného třeba vyšší koncentrace stříbrných iontů, takže trvalý vznik sraženiny nastává až po kvantitativním vysrážení chloridu stříbrného. Vyplyvá to z hodnoty **součinu rozpustnosti** ( $K_s = [\text{Ag}^+]^2 \cdot [\text{CrO}_4^{2-}] = 2,45 \cdot 10^{-12}$ ). Titruje se tedy roztok žlutě zbarvený chromanovým indikátorem, v němž vzniká bílá sraženina AgCl a v místě dopadu kapky odměrného roztoku také přechodně červenohnědá sraženina Ag<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>. Rozmícháním suspenze barevná sraženina rychle mizí. Když se spotřeba odměrného roztoku blíží bodu ekvivalence, pak při pomalé titraci a za intenzivního míchání směsi trvá zmizení červenohnědého zbarvení již delší dobu (2-3 s). Těsně za bodem ekvivalence se čistě žluté zbarvení suspenze trvale změní na slabě oranžové. **Výpočet:** látkové množství chloridových iontů v titrovaném podílu vzorku [mmol] se vypočte jako součin koncentrace [mol/l] a spotřeby [ml] odměrného roztoku AgNO<sub>3</sub>.

Další možností stanovení chloridů je **zpětná titrace podle VOLHARDA**. Ve vzorku se nejprve vysrážejí veškeré chloridy nadbytkem dusičnanu stříbrného; zbytkové množství stříbrných iontů se pak určí titrací odměrným roztokem thiokyanatanu (rhodanidu) draselného nebo amonného:



Za přítomnosti železité soli (síranu železito-amonného) je bod ekvivalence indikován vznikem červeně zbarvených thiokyanátových komplexů železa  $[\text{FeSCN}]^{2+}$ . Látkové množství chloridových iontů v podílu vzorku je rovno rozdílu celkového látkového množství stříbrných iontů a látkového množství thiokyanatanových iontů spotřebovaných při titraci:

$$n(\text{Cl}^-) = n(\text{Ag}^+) - n(\text{SCN}^-) = c(\text{Ag}^+) \cdot V(\text{Ag}^+) - c(\text{SCN}^-) \cdot V(\text{SCN}^-)$$

Pokud jsou objemy udány v ml a koncentrace v mol/l, výsledek vyjde v mmol. Hmotnost chloridových iontů nebo chloridu sodného v mg se vypočte jako součin látkového množství v mmol a příslušné molární hmotnosti ( $M(\text{Cl}) = 35,453 \text{ g/mol}$ ,  $M(\text{NaCl}) = 58,443 \text{ g/mol}$ ).

Při argentometrických titracích se obvykle používají **odměrné roztoky** AgNO<sub>3</sub> a NH<sub>4</sub>SCN o koncentracích 0,1 mol/l, případně 0,05 mol/l. Ke standardizaci odměrných roztoků obou látek slouží jako základní látka chlorid sodný.

## Merkurimetrické stanovení chloridových iontů

Merkurimetrické titrace, při kterých se pracuje s vysoce toxickými sloučeninami rtuti, se z bezpečnostních důvodů dnes používají už jen výjimečně. Merkurimetrické stanovení chloridů je založeno na tvorbě nedisociovaného chloridu rtuťnatého reakcí chloridových iontů vzorku s dusičnanem rtuťnatým jako titračním činidlem:



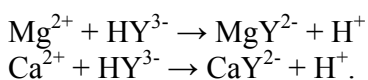
Chlorid rtuťnatý má povahu neutrálního komplexu s dosti vysokou konstantou stability  $\beta_2 = [\text{HgCl}_2] / ([\text{Hg}^{2+}][\text{Cl}^-]^2) = 3,02 \cdot 10^6$ . Při postupu podle VOTOČKA se používá k indikaci bodu ekvivalence srážecí indikátor nitroprusid sodný (dihydrát pentakyanonitrosylželezitanu sodného)  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . V čirém titrovaném roztoku vzniká těsně za bodem ekvivalence bílý zákal  $\text{Hg}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ .

V merkurimetrii se obvykle používá odměrný roztok  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  o koncentraci 0,1 mol/l. K jeho standardizaci se jako základní látka používá chlorid sodný.

## Komplexometrické (chelatometrické) stanovení hořčíku a vápníku

Při komplexometrických stanoveních iontů kovů se nejčastěji využívá tvorby komplexů kovů s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (zkratka EDTA, symbolický vzorec  $\text{H}_4\text{Y}$ ). Nejběžnější substancí pro přípravu odměrných roztoků je dihydrát disodné soli EDTA (komplexon III, chelaton 3,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Komplexon reaguje v závislosti na pH titrovaného roztoku v různých disociovaných formách  $\text{H}_2\text{Y}^{2-}$ ,  $\text{HY}^{3-}$  nebo  $\text{Y}^{4-}$  s iontem kovu vždy v molárním poměru 1:1. K indikaci bodu ekvivalence se používají různé metalochromní nebo metalofluorescenční indikátory. Výběrem indikátoru a vhodné stabilizované hodnoty pH titrovaného roztoku lze měnit selektivitu stanovení pro určitý kov.

**Stanovení součtu obsahů hořčíku a vápníku** se provádí v prostředí amoniakálního tlumivého roztoku při pH 10 obvykle na indikátor eriochromovou čern T:



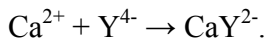
Při přímé titraci se vínově zbarvený roztok mění v bodě ekvivalence na čistě modrý. Používá se tuhý indikátor ve směsi s NaCl (1:100). Spotřeba odměrného roztoku chelatonu je úměrná součtu látkových množství obou kovů:

$$n(\text{Mg}^{2+}) + n(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}) \cdot V_1(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}).$$

V analytice vody je často určovaný parametrem tzv. **tvrdost vody** (součet koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů v milimolech na litr vzorku vody). Jednoduchým způsobem stanovení tvrdostí je přímá chelatometrická titrace na eriochromovou čern T.



**Stanovení samotného vápníku** se provádí v silně alkalickém prostředí roztoku KOH při pH 12. Za těchto podmínek se hořečnaté ionty vysrážejí jako  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Vápenaté ionty se pak stanoví titrací chelatonem:



K indikaci ekvivalence se použije fluorexon (kalcein) – metalofluorescenční indikátor, který tvoří s přebytkem vápenatých iontů žlutozeleně fluoreskující produkt. Při přímé titraci se tedy titruje roztok do vymizení žlutozelené fluorescence. Používá se směs fluorexonu a fenolftaleinu, jehož slabě fialové zbarvení vytváří vhodné pozadí, proti kterému je fluorescence lépe postřehnutelná. Spotřeba chelatonu zjištěná při titraci na fluorexon je úměrná množství vápenatých iontů:

$$n(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}) \cdot V_2(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y})$$

Množství hořčíku se vypočte diferenčně:

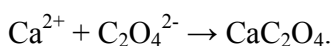
$$n(\text{Mg}^{2+}) = c(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}) \cdot (V_1(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}) - V_2(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}))$$

Přímou titraci lze použít pouze ve vzorcích, které neobsahují rušivé složky (především fosforečnany). Při stanovení hořčíku a vápníku v potravinách je nutné použít **zpětnou titraci**. Vychází se z výluhu popela vzorku, který se před stanovením upraví na patřičnou hodnotu pH. Při stanovení součtu obsahů hořčíku a vápníku se k pufrovanému alikvotnímu podílu popela přidá nadstechimrické množství chelatonu a nadbytek se pak stanoví zpětnou titrací odměrným roztokem  $\text{MgSO}_4$  na eriochromovou čern T z modrého do vínového zbarvení. Při stanovení vápníku se ke zalkalizovanému alikvotnímu podílu výluhu popela opět přidá nadstechimrické množství chelatonu a nadbytek volného chelatonu se stanoví titrací odměrným roztokem  $\text{CaCl}_2$  na fluorexon do vzniku žlutozelené fluorescence.

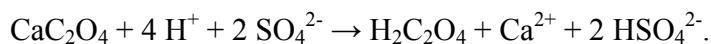
V chelatometrii se zpravidla používají **odměrné roztoky chelatonu 3** o koncentraci 0,02-0,05 mol/l. Odměrné roztoky hořečnaté a vápenaté soli se připravují z krystalického síranu hořečnatého rozpuštěním ve vodě a z uhličitanu vápenatého (základní látka) ve zředěné kyselině chlorovodíkové. Jako základní látky pro **stanovení titru chelatonu** slouží čisté kovy (zinek) nebo jejich definované sloučeniny (thiokyanatan dipyridinozinečnatý, chlorid olovnatý). Při stanovení titru je vhodné použít indikátor, se kterým budeme stanovovat obsah kovů ve vzorcích. Pro stanovení sumy  $\text{Mg}+\text{Ca}$  to splňuje eriochromová čern T, se kterou lze titrovat zinek rovněž s barevným přechodem z vínové do modré.

### **Manganometrické stanovení vápníku**

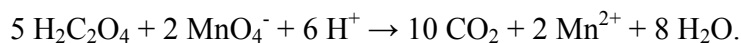
Tento postup lze použít např. pro stanovení vápníku v mléčných výrobcích. Z výluhu popela vzorku v kyselině chlorovodíkové se po zalkalizování amoniakem vápník vysráží šťavelanem amonným jako šťavelan vápenatý:



Sraženina se odfiltruje a důkladným promytím se odstraní nadbytek šťavelanových iontů. Pak se šťavelan vápenatý na filtru rozpustí ve zředěné kyselině sírové:



Uvolněná kyselina šťavelová se pak za horka v prostředí cca 0,7 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$  titruje odměrným roztokem manganistanu draselného:



Ze stechiometrie reakcí vyplývá vztah mezi množstvím vápníku a spotřebou [ml] odměrného roztoku manganistanu známé koncentrace [mol/l]:

$$n(\text{Ca}^{2+}) = (5/2) \cdot n(\text{MnO}_4^-) = 2,5 \cdot c(\text{MnO}_4^-) \cdot V(\text{MnO}_4^-) \quad [\text{mmol}].$$

Odměrný roztok  $\text{KMnO}_4$  se připravuje nejčastěji o přibližné koncentraci 0,02 mol/l. Protože po rozpuštění manganistanu v destilované vodě dochází po určitou dobu k vylučování  $\text{MnO}_2$  reakcí s organickými nečistotami ve vodě, čerstvě připravený roztok se k práci nehodí. Po několika dnech stání se roztok zfiltruje přes skleněnou fritu a stanoví se přesná koncentrace manganistanu. Jako základní látka se používá dihydrát šťavelové kyseliny.

## SPEKTROFOTOMETRIE

### Teorie

Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti, nazývaná obvykle krátce **spektrofotometrie**, je běžnou metodou kvantitativní analýzy absorbujících rozpustných látek organického i anorganického charakteru.

Spektrofotometrické stanovení absorbující látky rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle spočívá v zaznamenání úbytku světelného toku monochromatického záření při průchodu paprsku vrstvou měřeného roztoku. Měřený roztok musí být zcela čistý. Původní světelný tok  $\Phi_0$  paprsku o vlnové délce  $\lambda$  je absorpcí záření molekulami analytu zeslaben na hodnotu  $\Phi$ . Poměr světelných toků vystupujícího ze vzorku a vstupujícího do vzorku se nazývá **transmitance**  $\tau = \Phi / \Phi_0$ . V praxi je hodnota  $\Phi_0$  zjišťována fotometrickým měřením po průchodu paprsku kyvetou s rozpouštědlem, kdežto hodnota  $\Phi$  měřením po průchodu paprsku kyvetou s roztokem analytu v tomto rozpouštědle. Světelný tok po průchodu paprsku vzorkem vykazuje vůči koncentraci analytu  $c$  a tloušťce měřené vrstvy  $b$  (tloušťce kyvety) exponenciální pokles:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}.$$

Pro transmitanci analogicky platí

$$\tau = 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}.$$

Tyto rovnice vyjadřují **LAMBERTŮV-BEERŮV zákon**. Převedením do logaritmické stupnice lze zavést veličinu zvanou **absorbance**  $A = -\log \tau$ , pro kterou podle LAMBERTOVA-BEEROVA zákona platí lineární závislost na koncentraci:

$$A_\lambda = \log (\Phi_0/\Phi) = \varepsilon_\lambda \cdot b \cdot c. = a_\lambda \cdot b \cdot \rho.$$

Koeficienty  $\varepsilon_\lambda$  a  $a_\lambda$  jsou **molární absorpční koeficient** [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] resp. hmotnostní absorpční koeficient [ $\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] při konkrétní vlnové délce  $\lambda$  podle toho, zda je koncentrace vyjádřena jako molární (látková) koncentrace  $c$  [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] nebo hmotnostní koncentrace  $\rho$  [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ];  $b$  je tloušťka kvivety [ $\text{cm}$ ].

Absorbance je ve spektrofotometrii nejběžněji používanou veličinou. Kalibrační graf spektrofotometrické analýzy, tedy závislost změřené absorbance na koncentraci analytu, je přímka procházející počátkem souřadnic se směrnici, která je součinem (molárního) absorpčního koeficientu a tloušťky kvivety. (Hodnota absorpčního koeficientu při určité vlnové délce závisí na druhu rozpouštědla.) Lineární kalibrační závislost platí jen v oblasti malých koncentrací a pouze v případě, že měřené roztoky obsahují pouze jednu absorbující látku. Jinak je běžné, že graf závislosti absorbance na koncentraci se při vyšších koncentracích ohýbá k ose koncentrace. Při spektrofotometrické analýze zpravidla upravujeme postup a volíme ředění vzorků a tloušťku kvivety tak, aby se měřená absorbance vzorků a kalibračních roztoků pohybovala od 0,01 do 2,0.

Absorbance roztoku určité konkrétní látky je závislá na vlnové délce procházejícího záření. Závislost  $A$  (nebo  $\varepsilon$  nebo  $\tau$ ) na  $\lambda$  se nazývá **absorpční spektrum**. Nejběžnější zobrazení spektra je v souřadnicích  $A$  vs.  $\lambda$ . Ve spektru roztoku látky v daném rozpouštědle se objevují **absorpční pásy** (maxima na absorbanční křivce). Látky barevné absorbují záření ve **viditelné oblasti** (tj. v intervalu cca 400-780 nm); např. červeně zbarvené látky absorbují nejvíce zelené světlo (tj. záření s hodnotou  $\lambda$  500-550 nm), žluté látky absorbují nejvíce modré světlo ( $\lambda$  435-480 nm), modrozelené látky absorbují nejvíce červené světlo (620-760 nm). Příslušné dvojice barev (barva látky a barva světla, které je touto látkou pohlcováno) se označují jako **doplňkové (komplementární) barvy**. Pro analytické účely si obvykle z absorpčního spektra vybíráme absorpční pás s nejvyšším maximem a při vlnové délce tohoto maxima pak provádíme spektrofotometrické stanovení barevné látky.

Látky nebarevné mohou absorbovat část záření v **ultrafialové oblasti** (cca 200-400 nm). Kromě toho platí, že látky vykazující absorpci ve viditelné oblasti (tj. látky barevné) absorbují záření i v oblasti ultrafialové. V ultrafialové oblasti absorbuje záření mnoho různých organických sloučenin (areny, alifatické nenasycené sloučeniny, heterocyklické sloučeniny). Existence určitého absorpčního pásu ve spektru látky, ať v ultrafialové nebo viditelné oblasti, souvisí s přítomností určitého seskupení atomů v molekule, které se nazývá **chromofor**. Chromoforem může být např. dvojná vazba mezi atomy uhlíku (160-190 nm), systém konjugovaných dvojných vazeb uhlík-uhlík (dieny cca 220 nm, trieny cca 270 nm, tetraeny cca 300 nm atd.), karbonylová skupina (izolovaná 270 nm, v konjugaci 330 nm), aromatické jádro (izolované 200-210 nm a 254-285 nm, kondenzovaná jádra cca 220 nm a cca 280-300 nm), azoskupina (cca 340 nm a další pásy ve viditelné oblasti), nitroskupina (420-450 nm) či nitrososkupina (630-700 nm).

### Využití spektrofotometrie pro stanovení minerálních látek

Hydratované kationty některých přechodných kovů jsou barevné (kationty  $\text{Cr}^{3+}$  jsou zelenomodré,  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  zelené,  $\text{Co}^{2+}$  růžové,  $\text{Fe}^{3+}$  hnědočervené,  $\text{Cu}^{2+}$  modré). Také některé anionty, které ve vysokých oxidačních stupních vytvářejí přechodné kovy, jsou barevné (fialové ionty  $\text{MnO}_4^-$ , žluté  $\text{CrO}_4^{2-}$ , oranžové  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ). Molární absorpční koeficienty těchto kationtových akvakomplexů nebo aniontů jsou však příliš malé, takže citlivé spektrofotometrické stanovení neumožňují. Silně absorbující

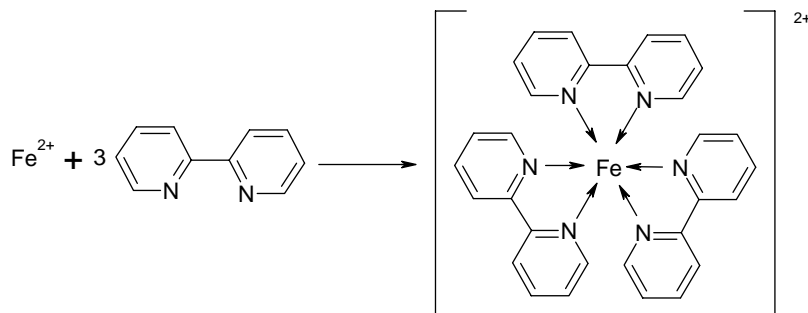
sloučeniny však vznikají např. některými komplexotvornými reakcemi kationtů nebo aniontů. Klasickým příkladem je vznik červeného komplexu trojmocného železa s thiokyanatanovými ionty:



Tato reakce se dříve běžně používala k důkazu, případně i stanovení železitých iontů.

Spektrofotometrické metody stanovení minerálních látek téměř vždy využívají nějaké **chromogenní (barvotvorné) reakce**. Většinou se jedná o reakce komplexotvorné, někdy spojené i se změnou oxidačního stupně analytu nebo složky činidla. V minulosti byly vypracovány spektrofotometrické metody pro stanovení téměř všech prvků a řada těchto postupů byla přizpůsobena také pro analýzu biologických materiálů a potravin. Většina těchto metod využívá reakce prvků v určitém oxidačním stupni s více či méně selektivními organickými komplexotvornými činidly. Některá činidla reagují se skupinou několika prvků za vzniku komplexů podobných spektrálních vlastností (např. tzv. zeleně zbarvené činidlo dithizon poskytuje červený komplex nejen s olovem, ale podobně zbarvené produkty i s mědí, zinkem, kadmíem, rtuť, bismutem a dalšími kovy). V těchto případech je pro dosažení selektivity nutné přesné nastavení reakčních podmínek, případně je třeba některé rušivé prvky maskovat jinými činidly, nebo je dokonce nutné analyt nebo naopak rušivý prvek separovat. Vzhledem ke značné složitosti a pracnosti těchto postupů se dnes tyto metody již téměř nepoužívají. Výjimkami jsou metody pro stanovení železa a fosforu.

Pro **stanovení železa** v potravinách se využívá reakce železnatých iontů s 2,2'-bipyridylem nebo 1,10-fenanthrolinem nebo bathofenanthrolinem. Reakci s bipyridylem vystihuje rovnice:



Reakce probíhá ve slabě kyselém prostředí za přítomnosti redukčního činidla (hydroxylamin hydrochlorid) asi 30 minut. Měří se absorbance červeně zbarveného roztoku při 522 nm ( $\epsilon_{522} = 8700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Reakce je téměř specifická, výsledek však může být mírně ovlivněn přítomnými fosforečnany, zvláště při hodnotách  $\text{pH} > 4$ .

Nejběžnější metoda **stanovení fosforu** spočívá ve vzniku barevného produktu zvaného **molybdenová modř**. Kyselý mineralizát vzorku obsahující kyselinu fosforečnou jako jedinou sloučeninu fosforu se uvede do reakce s přebytkem molybdenanových iontů. Přitom vzniká kyselina molybdatofosforečná  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$  a její redukcí pak molybdenová modř, tj. směs heteropolykyselin pětimocného a šestimocného molybdenu. Absorbanci, která je úměrná koncentraci fosforu, lze měřit v širokém rozmezí vlnových délek 650-840 nm.

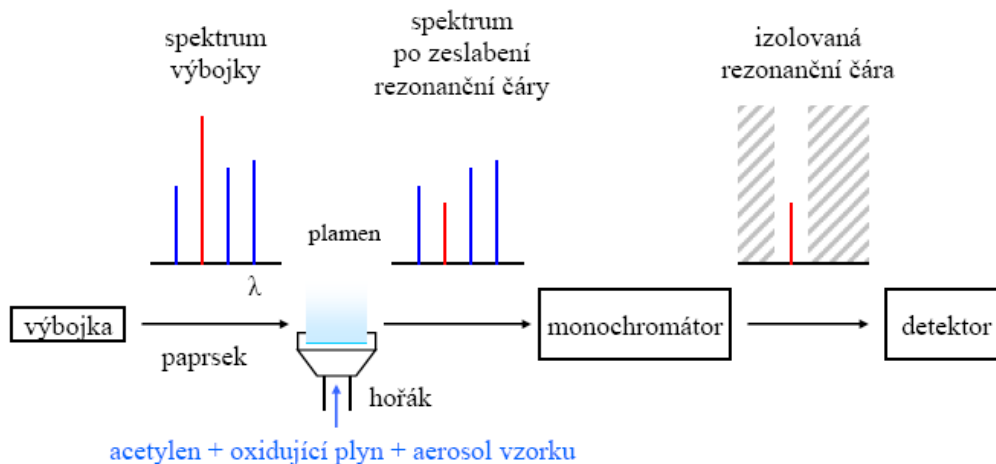
**Správnost výsledku spektrofotometrického stanovení** založeného na předchozí chemické reakci závisí na stupni konverze stanovovaného prvku na barevnou látku, nejčastěji komplex. Stálá, případně úplná konverze je zajištěna za určitých specifikovaných podmínek reakce (rozmezí koncentrace analytu, koncentrace činidel, pH roztoku, doba reakce, teplota). Metoda není vždy vůči malým odchylkám v těchto parametrech zcela robustní; např. absorpce molybdenové modři je stálá jen v určitém rozmezí koncentrací kyseliny sírové. Proto je nezbytné důsledně dodržovat pracovní postup a další **zásady práce**. Je-li např. reakcí činidla s určitým podílem vzorku získán velmi intenzivně zbarvený roztok, jehož absorpce leží mimo kalibrační rozsah, není přípustné tento roztok pro účely měření ředit rozpouštědlem, ale je nutné připravit nový roztok barevného produktu z menšího alikvotního podílu vzorku. Měřený roztok musí být vždy čirý.

## ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

### Teorie

AAS je jednou z nejčastěji užívaných metod kvantitativní prvkové analýzy. Umožňuje v podstatě stanovení téměř všech kovových prvků a dále stanovení boru a křemíku. V laboratorním cvičení se studenti seznámí pouze s plamenovou AAS. Další techniky AAS (elektrotermická AAS, hydridová technika) se používají pro stanovení stopových až ultrastopových množství prvků, resp. pro některé speciální účely (stanovení, As, Se, Sb).

Atomová absorpční spektrometrie je založena na měření absorpce charakteristického monochromatického záření volnými atomy určitého prvku v základním energetickém stavu. V klasickém atomovém absorpčním spektrometru jde o měření zeslabení rezonanční spektrální čáry z emisního spektra daného prvku. Zdrojem záření je obvykle **výbojka s dutou katodou** ze stanovovaného prvku, která vysílá čárové spektrum prvku. V tomto spektru je jedna **rezonanční čára** nebo několik rezonančních čar a dále čáry nerezonanční. Čáry mají šířku několika pikometrů. Intenzita rezonanční spektrální čáry je zeslabena absorpcí volnými atomy daného prvku. Nerezonanční čáry atomovou absorpcí nevykazují. **Atomizace** vzorku, tj. rozpad větších částic na molekuly a následně na atomy, probíhá za vysoké teploty, které se dosahuje hořením v plameni nebo elektrickým ohřevem. Plamenový nebo jiný **atomizátor** představuje absorpční prostředí, v němž dochází k atomové absorpci. Ta se v zásadě řídí LAMBERTOVÝM-BEEROVÝM zákonem. Měří se tedy **absorbance** (tj. logaritmus poměru původní intenzity spektrální čáry k intenzitě po zeslabení). Při plamenové atomizaci se vzorek přivádí do přístroje kontinuálně jako aerosol zmlžováním nasávaného kapalného vzorku. Po průchodu paprsku atomizátorem (absorpčním prostředím) je rezonanční čára izolována **monochromátorem**, který vymezení v okolí čáry propustný **spektrální interval** o šířce nejčastěji 0,2-1 nm. Intenzita spektrální čáry je pak zaznamenána detektorem záření. Situaci vystihuje obrázek 1.



Obr. 1  
Zjednodušené schéma měření v atomové absorpční spektrometrii

Podle LAMBERTOVA-BEEROVA zákona je okamžitá absorbance přímo úměrná jednak okamžité koncentraci volných atomů daného prvku v měřené zóně plamene, jednak délce atomizačního prostředí. Pro dosažení patřičné citlivosti jsou tedy hořáky pro AAS konstruovány jako štěrbinové se štěrbinou o délce 5-10 cm. (Otočením hořáku do kolmého směru se dosáhne snížení citlivosti a rozšíření pracovního rozsahu.) V plamenové AAS se absorbance vzorků a kalibračních roztoků zpravidla snímá několik sekund v několika opakováních (např. 3 čtení po 3 s) a určuje se průměrný signál. Kalibrace jsou v AAS v důsledku odchylek od LAMBERTOVA-BEEROVA zákona mírně zakřiveny. Lineární průběh kalibrace je zachován jen v oblasti malých koncentrací.

Dnes se v plamenové AAS používají jen dva **druhy plamenů**: plamen vzduch-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> a plamen N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Podle poměru průtoků oxidujícího plynu a paliva může být plamen oxidační (tj. chudý na palivo), stechiometrický nebo redukční (bohatý na palivo). Plamen **vzduch-acetylén** mívá obvykle teplotu 2000-2200 °C a používá se při stanovení snadno atomizovatelných prvků (alkalické kovy, Mg, případně i Ca, některé přechodné prvky jako Mn, Fe, Co, Ni, platinové kovy, Cu, Ag, Au, Zn, Cd a nepřechodné kovy jako Pb, Sn a Bi). Vyšší teplota, cca 2600-2900 °C, může být dosažena v plameni **oxid dusný-acetylén**, který se proto používá ke stanovení prvků, které tvoří termicky stabilní sloučeniny a obtížně se atomizují. Jde hlavně o nekovy a polokovy (B, Si, Ge, As, Se), kovy alkalických zemin, kovy ze skupiny skandia, titanu, vanadu a chromu, dále lanthanoidy a nepřechodné kovy Al a Ga. (Tento výčet ovšem neznamená, že všechny tyto prvky jsou v potravinách a biologických vzorcích stanovitelné plamenovou AAS. Koncentrace většiny ze jmenovaných prvků jsou zde natolik malé, že k jejich případnému stanovení je třeba použít mnohem citlivější metodu.)

Plamenová AAS umožňuje stanovení prvků ve vodných roztocích (případně i v roztocích v organických rozpouštědlech vyjma rozpouštědel chlorovaných) nejčastěji v koncentracích řádu desetin až desítek µg/ml. **Citlivost stanovení** jednotlivých prvků je různá. Je-li u jednoho prvku k dispozici více rezonančních spektrálních čar, citlivosti měření na různých čarách se rovněž liší, a to často velmi významně. V analýze potravin a biologických materiálů zpravidla používáme nejcitlivější spektrální čáru. V plamenové AAS se obvykle citlivost vyjadřuje nepřímou jako tzv. **charakteristická koncentrace**. Má-li měřený prvek v roztoku charakteristickou koncentrací, pak přístroj naměří po nasátí do plamene absorbanci 0,0044 (absorbance 0,0044 odpovídá transmitanci 0,99, tedy situaci, kdy je měrný paprsek zeslaben o 1 % intenzity). Čím je charakteristická koncentrace nižší, tím je citlivost

měření vyšší. Charakteristická koncentrace je určitou mezí, pod kterou bývá analýza již méně spolehlivá. Hodnota charakteristické koncentrace určitého prvku na určité spektrální čáře dosažená za optimalizovaných podmínek je přibližně stejná pro různé modely atomových absorpčních spektrofotometrů (pokud jsou vybaveny srovnatelným spektrálním zdrojem). Mez stanovitelnosti konkrétního měření je závislá nejen na charakteristické koncentraci, ale především na kvalitě spektrálního zdroje a na době snímání absorbance. Obvykle je mez stanovitelnosti nižší než charakteristická koncentrace. Tabulka 1 udává charakteristické koncentrace pro některé prvky.

Tab. 1

Charakteristické koncentrace a pracovní rozsahy měření v plamenové AAS pro vybrané prvky

Prvek	Plamen	$\lambda$ (nm)	Charakteristická koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	Optimální pracovní rozsah ( $\mu\text{g/ml}$ )
Na	vzduch-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	589,0	0,004	0,05-0,7
Mg	vzduch-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	285,2	0,003	0,05-0,4
Al	N <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	309,3	0,6	5-100
Fe	vzduch-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	248,3	0,05	0,2-8
Cu	vzduch-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	324,7	0,025	0,1-5
Zn	vzduch-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	213,9	0,008	0,1-1,4
Pb	vzduch-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	217,0	0,08	2-20

**Atomizace** analytu v plamenové AAS je výsledkem sledu postupných přeměn vzorku v systému zmlžovač-hořák. Z nasávaného kapalného vzorku (obvykle vodného roztoku) se ve zmlžovači vytváří aerosol drobných kapiček rozptýlených v palivové směsi (směs vzduch-acetylén nebo oxid dusný-acetylén). Účinnost tvorby aerosolu v běžném pneumatickém zmlžovači je malá (cca 10 %). Aerosol se stabilizuje průchodem mlžnou komorou a vstupuje do šterbinovitého hořáku. Při vysoké teplotě hoření dochází k velmi rychlému vypaření rozpouštědla z kapek aerosolu a vzniká aerosol tuhých částic. Ty se následně rozpadají na atomy jednotlivých prvků. Volné atomy analytu pak vyvolávají atomovou absorpci v té zóně plamene, kterou prochází měrný paprsek. Proces postupných změn částic v plameni však může pokračovat také ionizací analytu. Volné atomy prvku M přecházejí ztrátou elektronu na ionty M<sup>+</sup>. Vzniklé ionty již neabsorbují rezonanční čáru. Proto je **ionizace analytu** v AAS nežádoucím jevem. K ionizaci mají sklon prvky s nízkou ionizační energií, tj. hlavně alkalické kovy a kovy alkalických zemin. K ionizaci dochází při vyšších teplotách plamene. Teplota závisí na druhu plamene a složení palivové směsi. Rovněž se liší v jednotlivých výškových zónách plamene. K potlačení ionizace analytu se ke vzorku přidává sloučenina snadno ionizovatelného prvku čili **deionizační činidlo**. Nejčastěji se jedná o CsCl nebo KCl přidávaný v koncentracích řádu jednotek mg/ml do vzorků i do kalibračních roztoků.

Pokud jde o **správnost stanovení**, je plamenová AAS poměrně neproblematickou metodou. Nicméně v některých případech může být při měření v plameni vzduch-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> snížena účinnost atomizace v důsledku rušivého chemického působení matrice. Typickým příkladem **chemické interference** je účinek fosforečnanů, síranů, křemičitanů nebo vliv nadbytku hliníku nebo titanu při stanovení hořčíku a vápníku v plameni vzduch-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Při stanovení vápníku a hořčíku v potravinách jsou fosforečnany ve vzorku vždy přítomny a jejich rušivý vliv je velmi významný. Je vyvolán vznikem termostabilních fosfátů vápníku resp. hořčíku v plameni. Tento rušivý vliv lze potlačit, přidá-li se ke vzorku tzv. **uvolňovací činidlo**. Nejčastěji se používá lanthanitá sůl přidávaná v koncentraci 2-10 mg/ml La do všech vzorků a kalibračních roztoků.

## Využití AAS v analýze potravin

Plamenovou AAS se při analýzách potravin stanovují nejčastěji

- sodík a draslík v plameni vzduch-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (a za přítomnosti deionizačního činidla)
- hořčík a vápník
  - v plameni vzduch-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> za přítomnosti uvolňovacího činidla (La) nebo
  - v plameni N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> za přítomnosti deionizačního činidla (CsCl nebo KCl)
- některé prvky první a druhé přechodné řady (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, případně Cd) v plameni vzduch-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>
- hliník v plameni N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>., případně cín (jako kontaminant z plechových obalů potravin) v obou typech plamene.

Pro stanovení stopových prvků esenciálních (např. Mo, Se) nebo toxických (As, Cd, Pb), případně dalších prvků (Al) je obvykle plamenová AAS nedostatečně citlivá. Pro tyto účely se používá buď **AAS s elektrotermickou atomizací**, případně **hydridová technika AAS** nebo některé další metody atomové spektrometrie (emisní a hmotnostní spektrometrie s ICP).

## KONTROLNÍ OTÁZKY

Poznámka: soubor těchto kontrolních otázek prověřuje míru osvojení a porozumění vyložené látce v plném rozsahu; ve vstupním testu k laboratorní úloze se objeví pouze otázky jednodušší, které se týkají základních požadovaných znalostí (viz str. 3).

1. Která činidla se používají pro rozklad vzorků na mokré cestě? Jaká bezpečnostní rizika hrozí při použití této metody rozkladu?
2. Jaké výhody ve srovnání s mineralizací v otevřeném systému má tlakový rozklad? Jaká omezení pro použití tlakového rozkladu platí?
3. Z jakých fází (kroků) se skládá postup klasického rozkladu na suché cestě? Jaká maximální teplota se zde obvykle používá?
4. Které prvky lze a které nelze správně stanovit v biologickém materiálu po klasickém rozkladu na suché cestě?
5. Jak je definován součin rozpustnosti?
6. Kation B<sup>+</sup> tvoří s aniontem A<sup>-</sup> málo rozpustnou sloučeninu BA, která má součin rozpustnosti  $K_S = 10^{-8}$ . Vypočtete kolik mg sloučeniny BA je obsaženo v jednom litru jejího nasyceného roztoku, jestliže sloučenina má molární hmotnost  $M = 100$  g/mol.
7. Které odměrné roztoky a které základní látky se používají v argentometrii a merkurimetrii?
8. Uveďte alespoň jeden způsob indikace bodu ekvivalence při titračním stanovení chloridů. Vysvětlete chemický princip tohoto stanovení.
9. Co je komplexon III (chelaton 3) a v jakém molárním poměru kationty kovů s komplexonem reagují?
10. Co je tvrdost vody, v jakých jednotkách se vyjadřuje a jak se stanovuje?



11. Vysvětlete princip zpětné titrace.
12. Jaké základní látky se používají při komplexometrických stanoveních?
13. Vysvětlete chemickou podstatu manganometrického stanovení vápníku.
14. Definujte absorbanci. Na čem závisí hodnota absorpce roztoku absorbující látky. Uveďte kvantitativní vztah a specifikujte v něm zahrnuté veličiny.
15. Vymezte přibližně intervalem vlnových délek ultrafialovou oblast a oblast viditelného záření? Uveďte příklad dvojice komplementárních barev.
16. Na čem závisí hodnota molárního absorpčního koeficientu určité látky? Co je absorpční spektrum?
17. Jaké zásady je nutné, v zájmu dosažení správných výsledků, dodržovat při spektrofotometrické analýze?
18. Z jakých částí se skládá atomový absorpční spektrofotometr? Čím je při současné atomizaci několika prvků ve vzorku zajištěna prvková selektivita AAS?
19. Jaké druhy plamenů se používají v AAS a čím se liší? Jaké procesy probíhají při atomizaci vzorku v plameni?
20. Co je charakteristická koncentrace prvku?
21. U kterých prvků je při stanovení plamenovou AAS nutné potlačit jejich ionizaci a proč? Jakou látku lze použít jako deionizační činidlo?
22. Jak lze potlačit rušivý vliv matrice při stanovení vápníku a hořčíku v biologických vzorcích plamenovou AAS? Jaká složka vzorku v tomto případě působí jako interferent? Jaké látka se zpravidla užívá jako uvolňovací činidlo?
23. Jaké jsou aplikační možnosti plamenové AAS?

# PRACOVNÍ ČÁST

## PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ KOVŮ ROZKLADEM NA SUCHÉ CESTĚ

### 1. POUŽITELNOST METODY

Metodu lze aplikovat pro stanovení kovových prvků v tuhých nebo polotuhých vzorcích potravin a potravinářských surovin s nižším obsahem chloridů. Správnost výsledků byla potvrzena pro stanovení Cd, Pb, Cu, Zn, Ni, Co, Mn a Fe analýzou certifikovaných referenčních materiálů 12-2-01 (hovězí játra), 12-2-03 (vojtěška), 12-2-04 (pšeničná mouka) a SRM 1515 (Apple Leaves) a účastí v mezilaboratorních testech. Použity byly voltametrické metody, spektrofotometrie a atomová absorpční spektrometrie. Metoda je zvláště vhodná pro následnou analýzu voltametrickými metodami. Metoda je nevhodná pro stanovení těkavých kovů (Hg, Tl), metaloidů (As, Se) a kovů tvořících v prostředí  $\text{HNO}_3$  málo rozpustné sloučeniny (Sn). Pro stanovení těchto prvků je třeba použít tlakový rozklad (Hg, Tl, As, Se), rozklad na mokré cestě směsí  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HClO}_4$  za atmosferického tlaku (As, Se, Sn) nebo zpopelnění s přidavkem  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (As, Se). V případě vzorků s vysokým obsahem chloridů (solené potraviny, instantní polévky, směsi koření a soli apod.) je nutné i pro stanovení Cd, Pb, Cu a Zn použít některý z rozkladů na mokré cestě nebo solubilizaci vzorku kyselou hydrolyzou.

### 2. PRINCIP METODY

Teplotně programovaným ohřevem vzorků umístěných ve skleněných nebo křemenných kádinkách v elektrické peci za přístupu vzduchu dojde k zuhelnění a zpopelnění organické matrice vzorku. Maximální teplota rozkladu je  $450^\circ\text{C}$ . Ze získaného popela se připraví výluh zředěnou kyselinou dusičnou nebo chlorovodíkovou.

### 3. POUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

- analytické váhy
- elektrická programovatelná pec Labotherm L9/S
- 100 ml kádinky (vysoké) ze skla Simax nebo 50 ml kádinky z křemenného skla
- hodinová skla
- 10 ml pipeta nedělená
- topná deska s regulovaným ohřevem
- 50 ml nebo 100 ml odměrné baňky tř. A se zátkami
- stříčka s demineralizovanou (případně destilovanou) vodou
- polyethylenové (PE) nebo polypropylenové (PP) lahvičky se šroubovacím uzávěrem (60-150 ml)

*Poznámka:* veškeré nádobí musí být čištěno běžným mytím v destilované vodě a dekontaminováno loužením ve zředěném roztoku  $\text{HNO}_3$  (1:10) po dobu minimálně 24 hodin. Doporučená doba loužení je tři týdny. Vyloužené nádobí je umyto demineralizovanou vodou, usušeno a do použití by mělo být uschováno v uzavřených plastových sáčcích.

#### 4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Používají se chemikálie o čistotě alespoň p.a., vhodnější jsou chemikálie čistoty puriss. p.a. nebo ekvivalentní, případně chemikálie čistoty Suprapur nebo ekvivalentní. K loužení nádobí se používá roztok kyseliny dusičné připravený z koncentrované kyseliny dusičné p.a. K přípravě roztoků, k rozpouštění a ředění vzorků se používá demineralizovaná voda. Destilovanou vodu lze použít jen tehdy, je-li znám obsah nečistot v destilované vodě a tento obsah je zanedbatelný ve srovnání s očekávanou koncentrací analytu ve vzorku.

- kyselina dusičná 65% p.a. (MERCK) nebo kyselina vyšší čistoty (v dávkovači)
- cca 1M roztok HNO<sub>3</sub> (35 ml konc. HNO<sub>3</sub> se v 500 ml odměrné baňce zředí demineralizovanou vodou, doplní se vodou po značku a obsah baňky se promíchá)
- kyselina chlorovodíková 36% p.a. (MERCK) nebo kyselina vyšší čistoty
- cca 1M roztok HCl (43 ml 36% HCl nebo 53 ml 30% HCl se v 500 ml odměrné baňce zředí demineralizovanou vodou, doplní se vodou po značku a obsah baňky se promíchá)

#### 5. PRACOVNÍ POSTUP

***Důležitá poznámka:*** *Vzhledem k časové náročnosti provádějí studenti pouze závěrečnou fázi, tj. přípravu výluhu popela (bod 5.4). Studenti dostanou na začátku práce již zpopelněné vzorky a slepé pokusy připravené postupem dle 5.1 až 5.3. Vyučující sdělí studentům údaje o vzorku nebo vzorcích (druh materiálu, navážky, obsah sušiny nebo vlhkosti).*

##### 5.1 Čištění a příprava pece

Před rozkladem vzorků je vhodné pec zbavit nečistot pocházejících ze vzorků nebo materiálů žíhaných v peci dříve. Toho se dosáhne ohřevem pece na teplotu 800°C (nárůst 10 hodin, prodleva 4 hodiny) při zapnutém odtahu digestoře. Po vychladnutí je pec připravena k použití.

##### 5.2 Odvážení vzorků

Do čistých kádinek se odvažují analytické vzorky s přesností 0,1 mg. Množství vzorku (navážka) se řídí obsahem vody a očekávaným obsahem analytu. Minimální navážka pro reálné vzorky potravin je ekvivalentní 1g sušiny, maximální navážka je ekvivalentní 25 g sušiny. Z každého analytického vzorku se zpravidla zpracovávají dvě paralelní navážky. Pouze ve zvláštních případech se z každého vzorku připravuje více navážek (3 až 5). Ke každé sérii společně zpopelněvaných vzorků se paralelně zpracovávají alespoň 4 slepé pokusy (kádinky bez navážky).

***Poznámka:*** *Kapacita pece je 16-18 kádinek. Vhodné uspořádání: ke každé čtveřici navážek připojit dva slepé pokusy.*

### **5.3 Sušení, zuhelnění a zpopelnění vzorků**

PRÁCE SE PROVÁDÍ V DIGESTOŘI!

Označené kádinky se vzorky a příslušné množství označených prázdných kádinek (slepé pokusy) se vloží do chladné elektrické pece. Pec se uzavře a odstartuje se teplotní program uvedený v tabulce 2. Zapne se odtah digestoře.

*Poznámka:* u vzorků s obsahem vody nad 70% je při navážce větší než 10 g vhodné před rozkladem provést vysušení v sušárně při teplotě 100 °C. Do sušárny se vkládají rovněž slepé pokusy.

Tab. 2

Krok	Teplota [°C]	Doba nárůstu [h]	Prodleva [h]
1	200	9	1
2	300	5	1
3	400	5	1
4	450	1	16

Doba potřebná k provedení této části rozkladu je 39 hodin. Z teploty 450°C pec chladne asi 8 hodin. Pak je možné kádinky vyjmout. Kádinky se okamžitě přikryjí hodinovými skly.

*Poznámka:* pokud jsou kádinky vloženy do porcelánových misek, je možné je vyjmout z pece bezprostředně po ukončení teplotního programu uchopením misky do kelímkových kleští. Kádinky se položí na asbestovou podložku, přikryjí se hodinovými skly a nechají zchladnout na laboratorní teplotu.

Po vychladnutí se kádinky označí příslušným kódem vzorku a do každé kádinky přidá se ze stříčky asi 1 ml demineralizované vody a 1 ml 65% HNO<sub>3</sub> (z dávkovače). Kádinky přikryté hodinovými skly se umístí na topnou desku a zahřívají se (při zapnutém odtahu digestoře) až do odpaření do sucha. Krátkodobě je možné v závěrečných fázích odpařování sejmout hodinová skla.

Po úplném odpaření do sucha se kádinky (bez hodinových skel) vloží do vychladlé pece a vzorky se zahřívají dle teplotního programu v tabulce 3.

Tab. 3

Krok	Teplota [°C]	Doba nárůstu [h]	Prodleva
1	300	2	10 min
2	350	1	10 min
3	400	1	10 min
4	450	1	4 h

Po ukončení programu se kádinky vyjmou z pece, přikryjí se hodinovými skly a označí kódem vzorku. Pokud se nepřipravuje okamžitě výluh popela, označené kádinky se uloží v krabici s víkem. Zabrání se tak kontaminaci vzorků prachem.

#### **5.4 Příprava výluhu popela** (provádějí studenti)

##### PRÁCE SE PROVÁDÍ V DIGESTOŘI!

Do kádinek s popely vzorků se odpipetuje po 10 ml 1M roztoku  $\text{HNO}_3$  nebo  $\text{HCl}$  (viz poznámka na konci odstavce), kádinky se přikryjí hodinovými skly a zahřívají se na topné desce téměř k varu. Po vychladnutí se kondenzát na hodinových sklech opláchne proudem vody ze stříčky do kádinky a obsah kádinky se kvantitativně převede s malým množstvím destilované vody do 50 ml nebo 100 ml odměrné baňky označené kódem vzorku (baňka se nedoplňuje!). Pak se do kádinek odpipetuje po 10 ml 1M roztoku příslušné kyseliny a po přikrytí hodinovými skly se kádinky zahřívají cca 10 minut na topné desce. Po vychladnutí a opláchnutí hodinových skel se obsah každé kádinky převede do příslušné odměrné baňky. Výluhy popelů se pak doplní destilovanou vodou po značku. Analogicky se připravují slepé pokusy. Pokud se analýza výluhů neprovádí tentýž týden, je vhodnější výluh popela přelit do čisté a suché PE nebo PP láhve. U vzorků s velkým podílem nerozpustného popela se výluhy popela i příslušné slepé pokusy filtrují řídkým nebo středně hustým bezpopelným filtračním papírem.

*Poznámka: Výluh se zpravidla připravuje do zředěné  $\text{HNO}_3$ . Pro spektrofotometrické stanovení Fe je ale nezbytné připravovat výluh ve zředěné  $\text{HCl}$ .  $\text{HCl}$  je také vhodnější pro rozpouštění popelů vzorků s velmi vysokým obsahem železa a manganu (čajové lístky) nebo vzorků s velmi vysokým obsahem fosforu. Je-li výluh popela určen ke stanovení mědi voltametrickou metodou je naopak z důvodu vyšší citlivosti výhodnější připravit výluh ve zředěné  $\text{HNO}_3$ .*

PO SKONČENÍ PRÁCE STUDENTI UMYJÍ NÁDOBÍ PODLE POKYŇŮ UČITELE.

#### **Příprava vzorků potravin pro stanovení kovů rozkladem na suché cestě: časový snímek práce**

Operace	Přibližná spotřeba času (h)	Poznámka
Příprava nádobí a pomůcek	0,5	
Čištění pece (vypálení a chladnutí)	22	Provádí se pouze po delším odstavení pece nebo poté, kdy byla pec používána k jiným účelům
Navážení vzorků	1	
Vysušení	2	Není nutné u všech vzorků
Zuhelnění a zpopelnění	39	
Chladnutí pece	8	Tohoto času lze využít pro úpravu vzorků ve stádiu šedého popela kyselinou dusičnou a odpaření
Dokončení rozkladu	9,5	
Chladnutí vzorků	0,5	
Příprava výluhů	1-3	
Úklid a mytí nádobí	1-2	
Celkem	62,5-87,5	Práci je třeba rozložit do 3-4 dnů

*Poznámka: v rámci laboratorního cvičení studenti provádějí pouze konečnou fázi přípravy (výluh popela). Přibližná spotřeba času pro přípravu šesti výluhů (4 popely + 2 slepé pokusy) je 1 hodina.*

## PŘÍPRAVA VZORKŮ POTRAVIN PRO STANOVENÍ CHLORIDŮ

Příprava vzorku potravinářského nebo jiného biologického materiálu spočívá ve zpopelnění v elektrické peci při postupně rostoucí teplotě. Z popela se připravuje výluh horkou vodou a zředěnou kyselinou dusičnou. Vzhledem k časové náročnosti provádějí studenti pouze přípravu výluhu popela. Studenti dostanou na začátku práce již zpopelněné vzorky a slepé pokusy připravené následujícím postupem:

1. navážení vzorku do 100 ml kádinky ze skla Simax (pro slepé pokusy se použije kádinka bez navážky),
2. vysušení, zuhelnění a zpopelnění podle teplotního programu v tabulce 4

Tab. 4

Krok	Teplota [°C]	Doba nárůstu [h]	Prodleva [h]
1	200	9	1
2	300	5	1
3	400	5	1
4	450	1	16

3. po vychladnutí přidavek 1 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a odpaření do sucha na topné desce,
4. ohřev v elektrické peci (2-4 hodiny při 450°C).

Skupina studentů dostane dvojici takto připravených popelů stejného vzorku a jeden nebo více slepých pokusů. Učitel sdělí studentům druh materiálu, navážky, případně další údaje o vzorku.

### Příprava výluhu popela (provádějí studenti)

Činidla a pomůcky: 1M roztok HNO<sub>3</sub>, pipeta 5 ml, stříčka s destilovanou vodou, odměrné baňky 50 ml se zátkami, fix na sklo, topná deska.

### Postup

**PRÁCI PROVÁDĚJTE V DIGESTOŘI!** Do kádinek s popely vzorků se přidá po cca 20 ml destilované vody, kádinky se přikryjí hodinovými skly a zahřívají se na topné desce až je dosaženo mírného varu. Po vychladnutí se kondenzát na hodinových sklech opláchne proudem vody ze stříčky do kádinky a obsah kádinky se kvantitativně převede s malým množstvím destilované vody do 100 ml odměrné baňky označené kódem vzorku (baňka se nedoplňuje!). Pak se kádinka vypláchne 5 ml 1M roztoku kyseliny dusičné a výplach se kvantitativně převede do příslušné odměrné baňky. Roztok se pak doplní destilovanou vodou po značku (do 100 ml).

Poznámka: U vzorků s velkým podílem nerozpustného popela se výluh popela filtruje řídkým nebo středně hustým bezpopelným filtračním papírem.

**PO SKONČENÍ PRÁCE STUDENTI UMYJÍ NÁDOBÍ PODLE POKYŇŮ UČITELE.**

# PŘÍPRAVA VZORKŮ POTRAVIN PRO STANOVENÍ PRVKŮ MIKROVLNNÝM TLAKOVÝM ROZKLADEM

## 1. POUŽITELNOST METODY

Metodu lze aplikovat pro stanovení kovů, polokovů a některých nekovů v tuhých, polotuhých i kapalných vzorcích potravin a biologických materiálů. Správnost výsledků stanovení As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, V a Zn byla potvrzena analýzou certifikovaných referenčních materiálů CRM 281 Rye grass, SRM 1515 Apple Leaves, SRM 1568a Rice Flour, SRM 1570a Spinach Leaves SRM 1577b Bovine Liver. Ke stanovení byla použita atomová absorpční spektrometrie a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Metoda je nevhodná pro stanovení rtuti a halogenů. Mineralizáty získané touto metodou nelze bez dalších úprav použít pro spektrofotometrické nebo voltametrické stanovení prvků.

## 2. PRINCIP METODY

Vzorek se solubilizuje programovaným mikrovlnným ohřevem v uzavřené teflonové nádobce s kyselinou dusičnou. Většina organických látek je přitom zoxidována. Teplota je během rozkladu udržována pod nastaveným limitem (250-300 °C). Řízení procesu je založeno na snímání tlaku. Při překročení horního limitu dojde okamžitě k přerušení dodávky energie, v okamžiku poklesu tlaku pod spodní limit se přívod energie obnoví. Výsledkem je čirý roztok vhodný po zředění k analýze metodami atomové spektrometrie.

## 3. POUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

- mineralizátor Ertec Magnum II
- teflonové mineralizační nádoby s víčkem a Ti membránou
- analytické váhy
- dávkovač kyseliny
- odměrné baňky 50 ml nebo 100 ml se zátkami
- nálevka

## 4. CHEMIKÁLIE

- Kyselina dusičná 65 %, čistota p.a. nebo vyšší (Suprapur) v dávkovači

## 5. PRACOVNÍ POSTUP

### 5.1 Úprava vzorku a volba navážky

*Poznámka:* Protože mikrovlnným tlakovým rozkladem lze mineralizovat jen poměrně malé navážky, u některých vzorků je vhodné před rozkladem provést homogenizaci nebo alespoň upravit velikost částic materiálu. Homogenizace však nesmí způsobit kontaminaci materiálu stanoveným prvkem. Mletí nožovým mlýnem nebo homogenizace v nožovém mixéru může vnést do vzorku stopová množství chromu, vanadu, niklu, molybdenu a železa.

Kompaktní tuhé materiály (např. pečivo, čokoláda, sýry, živočišné tkáně, ovoce a zelenina) je vhodné předem nakrájet na plátky nebo kostky plastovým nožem nebo nastrouhat s použitím skleněného struhadla, aby bylo možné z materiálu odvážit dávku asi 0,5-3 g. Odvažované nebo odměřované množství vzorku volíme podle tabulky 5.

Tab. 5  
Doporučená maximální množství vzorků

Typ materiálu	Maximální hmotnost (navážka) nebo objem vzorku
Obiloviny (obilné zrno, vločky, mouky)	0,5 g
Pečivo (bez přidaného tuku)	0,8 – 1 g*
Ořechy, olejnatá semena	0,4 g
Luštěniny	0,5 g
Ovoce (kromě avokáda)	1,5 – 2 g*
Zelenina	2 – 3 g*
Koření	0,4 g
Kakao, čokoláda	0,4 g
Mléko polotučné	10 ml
Mléko plnotučné	5 ml
Sýry	1 – 2 g*
Vaječná hmota	1,5 – 2 g*
Tuky	0,2 – 0,3 g
Maso, uzeniny, vnitřnosti, ryby	0,8 g**

\* u vzorků s vyšším obsahem sušiny nebo vyšším obsahem tuku volíme menší navážku

\*\* pro rozklad vyšších navážek je nutné upravit program rozkladu

**POZOR! PŘEKROČENÍ DOPORUČENÉ MAXIMÁLNÍ NAVÁŽKY MŮŽE VÉST BĚHEM ROZKLADU K PRUDKÉMU NÁRŮSTU TLAKU, NÁSLEDNĚ AŽ K PROTRŽENÍ VÍČKA A POJISTNÉ TITANOVÉ MEMBRÁNY.**

## **5.2 Rozklad vzorku**

PRÁCE SE PROVÁDÍ V DIGESTOŘI.

K navážce ve 110 ml teflonové nádobce se dávkovačem přidají 3 ml konc. HNO<sub>3</sub> a směs se opatrně promíchá krouživým pohybem nádoby. Nádobka se uzavře víčkem a vloží se spolu s ocelovým kroužkem do ocelového pouzdra mineralizátoru. Mineralizátor se zapne hlavním spínačem na přední straně přístroje. Rozsvítí se displej řídicí jednotky, na kterém se schematicky zobrazuje nádobka a aktuální hodnoty tlaku a teploty. Přístroj je nastaven na program rozkladu uvedený v tabulce 6.

Na víčko rozkladné nádoby se položí titanová membrána a pouzdro se uzavře masivní ocelovou hlavicí. Hlavice se po vhodném pootočení zatlačí směrem dolů a znovu se pootočí vpravo. Pak se poloha hlavice zajistí proti nechtěnému pootočení vlevo zasunutím ocelového kolíku v horizontálním



směru. Speciálním klíčem se otáčí maticí v horní části hlavice dokud se z řídicí jednotky neozve zvukový signál. Pak se otevře přívod chladicí vody, dotykem ocelového pouzdra se zkontroluje funkčnost chlazení a pouzdro s hlavicí se přikryje cylindrickým krytem z průhledného plastu; (případně lze na horní část hlavice našroubovat válcovou pojistnou nádobu pro expanzi vzorku v případě protržení víčka). Stiskem tlačítka START/STOP na řídicí jednotce se zahájí rozklad.

Tab. 6  
Program mikrovlnného tlakového rozkladu

Krok	Doba ohřevu	Výkon	Tlakový limit horní/ spodní	Teplotní limit horní/spodní
1	2 min	50 % (175 W)	2,0 / 1,7 MPa*	150 / 145 °C
2	2 min	60 % (210 W)	3,0 / 2,7 MPa	200 / 195 °C
3	2 min	70 % (245 W)	4,0 / 3,7 MPa	250 / 245 °C
4	4 min	80 % (280 W)	4,5 / 4,2 MPa	250 / 245 °C
Chlazení (10 min)				

\* přístroj udává tlak v barech (1 bar = 0,1 MPa)

Během rozkladu displej řídicí jednotky zobrazuje okamžitou hodnotu teploty a tlaku uvnitř nádoby. Při překročení horního limitu tlaku nebo teploty se vypne mikrovlnné pole a v důsledku stálého přívodu chladicí vody teplota a tlak uvnitř nádoby poklesnou. V okamžiku, kdy tlak nebo teplota klesne pod spodní limit, dodávka mikrovlnné energie je obnovena. Tím jsou fyzikální podmínky rozkladu regulovány a vzorek je před koncem rozkladu udržován těsně pod mezní teplotou nebo pod mezním tlakem.

Po skončení programu ohřevu vzorek 10 minut chladne. Teplota zpravidla klesne pod 50 °C. Pokud displej ukazuje teplotu pod 50 °C a tlak 15 až 16 bar, je možné otevřít ocelový plášť rozkladné nádoby. Pomocí klíče se otáčí maticí v horní části hlavice vlevo. Matice se potočí několikrát vždy asi o ¼ otočky. Tím dojde k mírnému nadzvednutí hlavice a tedy i víčka nádoby, čímž se uvolní část plyných produktů. Uvnitř plastového cylindrického krytu je možné pozorovat hnědě zbarvený nitrosní plyn (NO<sub>2</sub>). Vývěvou je tento plyn rychle odsát z prostoru mezi ocelovým pláštěm a plastovým krytem a pak je možné maticí znovu pootočit vlevo. Tak se pokračuje, dokud již není patrný únik hnědého plynu. Pak je možné sejmut plastový kryt, vytáhnout pojistný kolík a opatrně pootočit ocelovou hlavicí vlevo a hlavicí sejmut. Po odstranění titanové membrány se vyjme teflonová nádobka s víčkem z pouzdra, víčko se opatrně nadzvedne, čímž se uvolní zbytky nitrosního plynu. Pak se víčko sejme, jeho vnitřní část se opláchne proudem demineralizované vody ze stříčky do nádoby a obsah nádoby se kvantitativně převede s použitím nálevky do odměrné baňky o objemu 50 ml nebo 100 ml. (Po doplnění demineralizovanou vodou je zbytková koncentrace HNO<sub>3</sub> v 50 ml odměrné baňce cca 0,8 mol/l, ve 100 ml odměrné baňce cca 0,4 mol/l.)

**PO SKONČENÍ PRÁCE SE UZAVŘE SE PŘÍVOD CHLADICÍ VODY A PŘÍSTROJ SE VYPNE.**

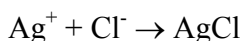
## ARGENTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHLORIDŮ V POTRAVINÁCH (OBEČNÝ POSTUP)

### 1. POUŽITELNOST METODY

Metodu lze používat pro potravinářský materiál univerzálně. Ke stanovení se vzorek připraví zpopelněním a výluhem popela v horké vodě a ve zředěné kyselině dusičné (str. 22).

### 2. PRINCIP METODY

Stanovení chloridů titrací roztokem dusičnanu stříbrného je založeno na vzniku nerozpustného chloridu stříbrného:



Při titraci podle MOHRA se jako indikátor používá chroman draselný, který tvoří s nadbytkem stříbrných iontů červenohnědou sraženinu  $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ . Titruje se tedy žlutý roztok (zabarvený přidaným chromanem) a během titrace se nejprve tvoří zákal, později sraženina bílého  $\text{AgCl}$ . Červenohnědé zbarvení chromanu stříbrného vzniká v titrované směsi před bodem ekvivalence jen přechodně a mícháním mizí. Hodnota pH titrovaného roztoku by měla ležet v intervalu 6,5-10.

### 3. ČINIDLA

- odměrný roztok 0,1 M  $\text{AgNO}_3$  známého titru
- 0,5 M roztok  $\text{NaHCO}_3$
- 5%-ní roztok  $\text{K}_2\text{CrO}_4$

### 4. POMŮCKY

- titrační baňky 250 ml
- pipety 10ml a 20 ml
- kádinka pro plnění byrety odměrným roztokem  $\text{AgNO}_3$
- kádinka pod byretu
- byreta

### 5. PRACOVNÍ POSTUP

#### 5.1 Příprava a standardizace odměrného roztoku cca 0,1M $\text{AgNO}_3$

Do 250 ml kádinky se odváží 17,0 g  $\text{AgNO}_3$  čistoty p.a., navážka se rozpustí ve 100 ml destilované vody a roztok se kvantitativně převede do 1000 ml odměrné baňky, baňka se doplní destilovanou vodou po značku a po uzavření zátkou se její obsah promíchá.

Titř odměrného roztoku se stanoví opakovanou titrací známého množství  $\text{NaCl}$  takto: do titrační baňky se odpipetuje 20,00 ml přesně 0,1M roztoku  $\text{NaCl}$  (příprava: navážka 2,9222 g vysušeného preparátu

NaCl čistoty p.a. se rozpustí v destilované vodě, roztok se převede do 500 ml odměrné baňky, doplní destilovanou vodou po značku a promíchá, přidá se asi 80 ml destilované vody a 5-10 kapek 5% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>. Roztok se za stálého míchání po kapkách titruje 0,1 M roztokem AgNO<sub>3</sub> do vniku trvalého hnědo-oranžového zbarvení. Koncentrace AgNO<sub>3</sub> v odměrném roztoku se vypočítá ze vztahu  $c_{\text{Ag}} = 0,1 \cdot 20 / V_{\text{Ag}}$  [mol/l], kde  $V_{\text{Ag}}$  je průměrná spotřeba odměrného roztoku AgNO<sub>3</sub> v ml.

### **5.2 Stanovení chloridů ve vzorku**

Z výluhu popela se odpipetuje alikvotní podíl 10,00 ml do titrační baňky přidá se asi 90 ml destilované vody a roztok se zneutralizuje přidávkem 1 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> (kontrola výsledného pH). Po přidávku 5-10 kapek 5% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> se roztok za stálého míchání po kapkách titruje 0,1 M roztokem AgNO<sub>3</sub> do vniku trvalého hnědo-oranžového zbarvení.

### **5.3. Výpočet a vyjádření výsledku**

Obsah chloridových iontů ve vzorku v hmotnostních procentech

$$p(\text{Cl}^-) = 35,453 \cdot V_t \cdot c_{\text{Ag}} \cdot V_{\text{Ag}} / (10 \cdot V_a \cdot m_v)$$

obsah chloridu sodného v hmotnostních procentech

$$p(\text{NaCl}) = 58,443 \cdot V_t \cdot c_{\text{Ag}} \cdot V_{\text{Ag}} / (10 \cdot V_a \cdot m_v)$$

$V_t$  je celkový objem výluhu popela (=100 ml)

$V_a$  je alikvotní objem výluhu popela pipetovaný k titračnímu stanovení (= 10 ml)

$c_{\text{Ag}}$  je přesná koncentrace odměrného roztoku AgNO<sub>3</sub> [mol/l]

$V_{\text{Ag}}$  je průměrná spotřeba odměrného roztoku AgNO<sub>3</sub> [ml]

$m_v$  je navážka vzorku [g].

Obsah NaCl vyjádřete v hmotnostních % a hmotnostních % sušiny. Učitel Vám sdělí druh materiálu, navážku (navážky) a obsah vody (resp. sušiny) v původním vzorku.

## STANOVENÍ CHLORIDŮ A CHLORIDU SODNÉHO V PEČIVU

### 1. POUŽITELNOST METODY

Metodu lze používat pro stanovení rozpustných chloridů v pečivu.

### 2. PRINCIP METODY

Ze vzorku se připraví vodný výluh. Část výluhu se uchová pro stanovení sodíku plamenovou AAS. Ze zbývající části výluhu se odstraní bílkoviny spolusrážením pomocí CARREZOVÝCH činidel. Po deproteinaci se ve filtrátu stanoví chloridové ionty argentometrickou titrací podle MOHRA (viz str. 7).

### 3. ČINIDLA

- odměrný roztok 0,05 M  $\text{AgNO}_3$  známého titru
- 0,5 M roztok  $\text{NaHCO}_3$
- 5%-ní roztok  $\text{K}_2\text{CrO}_4$
- CARREZOVO čínidlo I: 53 g  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se rozpustí v destilované vodě a doplní na 500 ml
- CARREZOVO čínidlo II: 110 g  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se rozpustí ve vodě, okyselí se 3 ml koncentrované kyseliny octové a doplní destilovanou vodou na 500 ml

### 4. POMŮCKY

- titrační baňky 250 ml
- pipety 10 ml a 20 ml
- kádinka pro plnění byrety odměrným roztokem  $\text{AgNO}_3$
- kádinka pod byretu
- byreta 10 ml

### 5. PRACOVNÍ POSTUP

#### 5.1 Příprava a standardizace odměrného roztoku cca 0,05 M $\text{AgNO}_3$

Do 250 ml kádinky se odváží 8,5 g  $\text{AgNO}_3$  čistoty p.a., navážka se rozpustí ve 100 ml destilované vody a roztok se kvantitativně převede do 1000 ml odměrné baňky, baňka se doplní destilovanou vodou po značku a po uzavření zátkou se její obsah promíchá. Roztok se uchovává v láhvi z tmavého skla.

Titration odměrného roztoku se stanoví opakovanou titrací známého množství  $\text{NaCl}$  takto: do titrační baňky se odpipetuje 5,00 ml přesně 0,05M roztoku  $\text{NaCl}$  (příprava: navážka 1,4611 g vysušeného preparátu  $\text{NaCl}$  čistoty p.a. se rozpustí v destilované vodě, roztok se převede do 500 ml odměrné baňky, doplní destilovanou vodou po značku a promíchá), přidá se asi 80 ml destilované vody a 1 ml 5%  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Roztok se za stálého míchání po kapkách titruje 0,05 M roztokem  $\text{AgNO}_3$  do vniku trvalého hnědo-oranžového zbarvení. Koncentrace  $\text{AgNO}_3$  v odměrném roztoku se vypočítá ze vztahu  $c_{\text{Ag}} = 0,05 \cdot 5 / V_{\text{Ag}}$  [mol/l], kde  $V_{\text{Ag}}$  je průměrná spotřeba odměrného roztoku  $\text{AgNO}_3$  v ml.

### Poznámky k použití byrety:

- používá se byreta o objemu 10 ml
- před použitím se vyzkouší funkčnost a těsnost kohoutu byrety, případně se kohout rozebere a na zábrus se nanese malé množství Ramsayova tuku (správně namazaný zábrus zprůhlední)
- byretu je třeba předem vypláchnout odměrným roztokem a pak znovu naplnit; při těchto úkonech stojí pod byretou odpadní kádinka
- odměrný roztok se ze zásobní láhve přelije do čisté a suché kádinky, ze které se pak byreta plní pomocí nálevky; naplněná byreta včetně části pod kohoutem nesmí obsahovat vzduchové bubliny (pokud se bublina objeví, odstraní se vypuštěním části roztoku úplným otevřením kohoutu)
- po naplnění byrety nad horní rysku se odstraní nálevka a hladina odměrného roztoku (spodní meniskus) se upraví na nulovou rysku těsně před zahájením titrace; případná kapka odměrného roztoku visící na špičce byrety se před titrací odstraní
- při titraci se zpravidla kohout byrety ovládá levou rukou, pravá rukou se krouživým pohybem promíchává obsah titrační baňky
- po ukončení práce se byreta důkladně vypláchne destilovanou vodou.

### **5.2 Příprava extraktu vzorku a jeho deproteinace**

Do konické baňky s uzávěrem se odváží přesně asi 5 g pečiva předem rozkrájeného na kostky o velikosti cca 1 cm. Přidá se 100 ml destilované vody, baňka se uzavře a její obsah se asi 3 minuty intenzivně protřepává. Obsah baňky se pak převede do zvláštní kádinky, ve které se směs scedí pomocí sítka umístěného na středové tyči stlačením vzorku. Kapalina nad sítkem se pak zfiltruje přes středně hustý filtrační papír (č. 389) do 250 ml odměrné baňky. Konická baňka, ve které probíhala extrakce, se ještě třikrát vypláchne cca 40 ml destilované vody a každý podíl výplachové vody se přidá do kádinky se zbytkem vzorku a kapalina se znovu scedí a zfiltruje do téže odměrné baňky. Filtrát v odměrné baňce se doplní destilovanou vodou po značku, baňka se uzavře a její obsah se promíchá. Z čirého extraktu se odpipetuje nedělenou skleněnou pipetou 25 ml (tj. jedna desetina objemu) do zvláštní čisté a suché plastové lahvičky s uzávěrem a tento roztok se uchová pro stanovení sodíku metodou AAS.

Do 250 ml odměrné baňky se zbylými 225 ml extraktu se přidají 2 ml CARREZOVA činidla I a 2 ml CARREZOVA činidla II. Po přidavku každého činidla se obsah baňky promíchá krouživým pohybem. Po 10 minutách stání se směs s vyloučenou sraženinou hexakynoželeznanu zinečnatého opět doplní po značku destilovanou vodou a promíchá. Pak se suspenze zfiltruje přes středně hustý filtrační papír (č. 389) do další konické baňky. Ve filtrátu se stanoví titračně chloridové ionty.

### **5.3. Stanovení chloridů**

Do 250 ml titrační baňky se odpipetuje 75 ml filtrátu deproteinovaného extraktu; přidavkem cca 1 ml 0,5M NaHCO<sub>3</sub> se upraví pH roztoku na 7-9 (kontrola indikátorovým papírkem). Po přidavku 1 ml 5 % K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> se směs za stálého míchání po kapkách titruje odměrným roztokem 0,05M AgNO<sub>3</sub> známé koncentrace do trvalého oranžově-žlutého zbarvení. Titrace se provádí celkem třikrát. Je-li při první titraci spotřebováno více než 10 ml odměrného roztoku, pro další titrace se pipetuje menší objem filtrátu (např. 50 ml) a směs se před titrací zředí patričným objemem destilované vody.

#### **5.4. Stanovení sodíku**

Primární extrakt se před analýzou metodou AAS pětkrát až desetkrát ředí, přičemž se přidává deionizační činidlo CsCl (výsledná koncentrace Cs 2 mg/ml) a kyselina chlorovodíková (výsledná koncentrace 0,1M). Stanovení je popsáno na str. 42-46.

#### **5.5. Výpočet, vyjádření výsledku a jeho zhodnocení**

Celkové látkové množství chloridových iontů ve vzorku se vypočte takto:

$$n(\text{Cl}^-) = (V_1/V_2) \cdot (V_3/V_4) \cdot c(\text{AgNO}_3) \cdot V(\text{AgNO}_3) \quad [\text{mmol}]$$

$V_1$  je objem primárního extraktu (=250 ml)

$V_2$  je zbytkový objem primárního extraktu po oddělení dávky pro stanovení sodíku (=225 ml)

$V_3$  je objem zředěného deproteinovaného extraktu ( $=V_1 = 250$  ml)

$V_4$  je alikvotní objem deproteinovaného extraktu pipetovaný k titraci (=75 ml).

$V(\text{AgNO}_3)$  je průměrná spotřeba odměrného roztoku [ml] a  $c(\text{AgNO}_3)$  je jeho koncentrace [mol/l].

$$\text{Hmotnost chloridů ve vzorku je } m(\text{Cl}^-) = n(\text{Cl}^-) \cdot M(\text{Cl}^-) \quad [\text{mg}]$$

$M(\text{Cl}^-)$  je molární hmotnost chloru (= 35,453 g/mol).

$$\text{Látkový obsah chloridových iontů ve vzorku je } x(\text{Cl}^-) = n(\text{Cl}^-) / m_v \quad [\text{mmol/g}]$$

$m_v$  je navážka vzorku pečiva v gramech.

$$\text{Látkový obsah sodíku je } x(\text{Na}^+) = f_z \cdot \rho(\text{Na}^+) \cdot V_1 / (M(\text{Na}^+) \cdot m_v) \quad [\text{mmol/g}]$$

$f_z$  je zředovací poměr při ředění primárního extraktu před stanovením sodíku (obvykle  $f_z = 10$ )

$\rho(\text{Na}^+)$  je hmotnostní koncentrace sodíku ve zředěném primárním extraktu stanovená metodou AAS [mg/l]

$V_1$  je objem primárního extraktu dosazený v litrech (=0,25 l)

$M(\text{Na}^+)$  je molární hmotnost sodíku (=22,9898 g/mol) a

$m_v$  je navážka vzorku pečiva v gramech.

Zaokrouhlené hodnoty látkových obsahů chloridových iontů a sodíku se porovnají. Menší z obou hodnot je totožná s látkovým obsahem chloridu sodného. Z látkového obsahu chloridu sodného  $x(\text{NaCl})$  se pak vypočte procentní obsah chloridu sodného:

$$p(\text{NaCl}) = x(\text{NaCl}) \cdot M(\text{NaCl}) / 10 \quad [\%]$$

$M(\text{NaCl})$  je molární hmotnost chloridu sodného (=58,443 g/mol).

Výsledek zaokrouhlete na tři platné číslice a zhodnoťte ho ve vztahu k ustanovení Nařízení ES 1924/2006, které připouští označit potravinu za potravinu s nízkým obsahem sodíku/soli v případě, je-li obsah sodíku maximálně 0,12 % (resp. obsah soli maximálně 0,305 %). Dále rozhodněte, zda analyzovaný výrobek musí mít na obalu vyznačen obsah soli. Vyhláška 113/2005 Sb. tuto povinnost předepisuje u výrobků s obsahem soli nad 2,5 % s výjimkou dehydrovaných výrobků, ochucovadel, omáček a dresinků.

# SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FOSFOREČNANŮ, Kyseliny fosforečné nebo celkového fosforu

## 1. POUŽITELNOST A PŮVOD METODY

Metoda byla převzata z literatury [10-12] a lze ji použít pro stanovení fosforečnanů, kyseliny fosforečné resp. celkového fosforu ve vodách, v biologických materiálech i potravinách.

## 2. PRINCIP METODY

U vzorků s biologickou matricí se přítomné sloučeniny fosforu převedou na kyselinu fosforečnou mineralizací směsí kyseliny dusičné a sírové. Kyselina fosforečná poskytuje v kyselém prostředí s molybdenanovými ionty kyselinu molybdatofosforečnou  $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ . Redukcí kyseliny molybdatofosforečné vzniká směs heteropolykyselin pěti- a šestimocného molybdenu označovaná jako molybdenová modř. Absorbance produktu reakce je úměrná koncentraci fosforečnanů. Složení molybdenové modři a tudíž i její absorpční spektrum závisí na druhu redukčního činidla a na reakčních podmínkách (koncentrace reaktantů, acidita roztoku, teplota, doba reakce). Vlnová délka používaná k měření se u různých postupů pohybuje v intervalu 650 až 840 nm. Používaná redukční činidla jsou např. chlorid cínatý, hydrazin, askorbová kyselina, hydrochinon, 1-amino-2-naftol-4-sulfonová kyselina, metol (*p*-N-methylamino fenol) ve směsi se siřičitanem apod.

Molybdatofosforečná kyselina existuje ve dvou modifikacích: žluté a bezbarvé. Nejvyšší citlivosti stanovení je dosaženo při použití  $SnCl_2$ , který redukuje obě formy molybdatofosforečné kyseliny (slabší redukovaadla reagují pouze se žlutou formou). Nevýhodou použití  $SnCl_2$  je však omezená stálost činidla a horší robustnost postupu. Proto se častěji využívá askorbová kyselina nebo hydrazin. Citlivost stanovení může být zvýšena extrakcí barevného produktu do organického rozpouštědla (např. do butanolu).

Stanovení fosforu založené na vzniku molybdenové modři není zcela specifické. Sloučeniny arsenu v oxidačním stupni V a dále sloučeniny křemíku a germania tvoří s molybdenanem analogické produkty. Vzhledem k minimálnímu výskytu těchto látek v biologických materiálech (ve srovnání s téměř všudypřítomnými fosforečnany) lze tyto rušivé vlivy zanedbat.

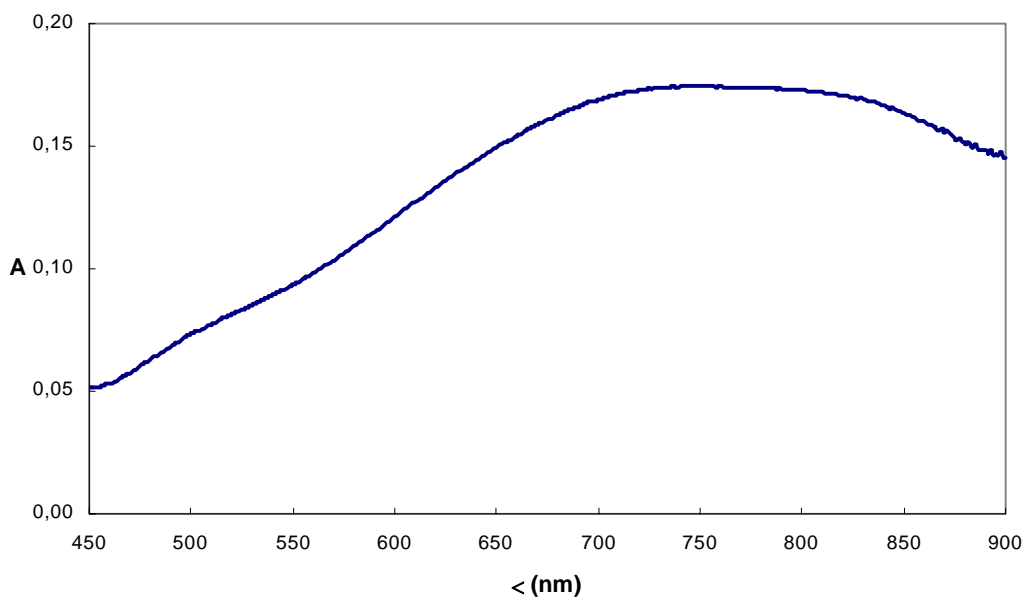
U jiných vzorků vhodná úprava reakčních podmínek umožňuje selektivní stanovení fosforečnanů vedle srovnatelného množství interferentů. Na druhé straně je možné tvorby molybdenové modři využít i pro stanovení arsenu (resp. arseničnanu) po separaci arsenu od fosforu.

V dále uvedeném postupu stanovení fosforečnanů se jako redukční činidlo využívá síran železato-amonný. Redukce železnatými ionty probíhá rychle (do 5 minut), bez nutnosti záhřevu a vzniklé modré zbarvení je stále minimálně po dobu pěti hodin. Absorpční spektrum roztoku (viz obrázek 2) vykazuje velmi „ploché“ maximum při vlnové délce cca 750 nm.

[10] Malát M.: Absorpční anorganická fotometrie, Academia Praha 1973

[11] Narasaraju T.S.B, Singh R.P., Rao V.L.N.: Fresenius Z. Anal. Chem. 251, 300, 1970

[12] Karvánek M, Eisenberger B., Suong D.N.: Krmivářství a služby 14, 141-3, 1978



Obr. 2

Absorpční spektrum roztoku fosfomolybdenové modři,  $c(\text{PO}_4^{3-}) = 50 \mu\text{mol/l}$ ,  $b = 1 \text{ cm}$

### 3. POUŽÍVANÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE

- 100 ml kádinky vysoké
- hodinová skla
- topná deska s nastavitelnou teplotou a hliníkovým blokem s otvory pro kádinky
- 10 × odměrná baňka 50 ml (z toho 4 ks pro přípravu kalibračních roztoků)
- automatická pipeta 1-5 ml + špičky
- 3 × pipeta 5 ml
- 1 × odměrný válec 50 ml
- 1 × balónek
- spektrofotometr
- rektangulární skleněné kyvety 1 cm

### 4. CHEMIKÁLIE, ČINIDLA A ROZTOKY

- destilovaná nebo demineralizovaná voda
- kyselina sírová 96 %, p.a.
- kyselina dusičná 65 %, p.a.



- dihydrogenfosforečnan amonný, p.a.
- molybdenan amonný, tetrahydrát, p.a.
- síran železnato-amonný, hexahydrát (Mohrova sůl), p.a.
- zásobní roztok fosforečnanu  $c = 100$  mmol/l (0,5752 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  se rozpustí v kádince asi ve 20 ml vody, roztok se kvantitativně převede do 50 ml odměrné baňky, okyselí se 1 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a doplní se vodou po značku).
- pracovní roztok fosforečnanu  $c = 1$  mmol/l (do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 1,00 ml zásobního roztoku o koncentraci 100 mmol/l a doplní se vodou po značku).
- 5,4 mol/l (tj. 30 % v/v) roztok kyseliny sírové (do 600 ml kádinky s 250 ml vody se za stálého míchání přidá po malých dávkách celkem 150 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , směs se průběžně ochlazuje ve vodní lázni, po vychladnutí se roztok převede do 500 ml odměrné baňky a opatrně se doplní vodou po značku a po dalším vychladnutí se doplní po značku).
- 7 % roztok molybdenanu amonného (do plastové láhve se odváží 35 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 465 ml vody, směs se zamíchá a nechá se rozpouštět přes noc; rozpouštění lze urychlit sonikací).
- 14 % roztok síranu železnato – amonného (do plastové láhve se odváží 35 g  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 215 ml vody; směs se okyselí přidávkem 1 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , výsledný roztok má světle zelenomodrou barvu; činidlo je stálé asi 1 týden).

## 5. PRACOVNÍ POSTUP

### 5.1. Příprava vzorků k analýze

#### a) Příprava vzorků rozkladem

#### *PRÁCE SE PROVÁDÍ V DIGESTOŘI !*

Do 100 ml kádinek se odváží s přesností na 0,1 mg takové množství vzorku, které odpovídá cca 0,2-0,5 g sušiny. Po přidávku 10 ml 65 % kyseliny dusičné a 5 ml 96 % kyseliny sírové se kádinky přikryjí hodinovými skly a vloží se do otvorů kovového bloku topné desky. Teplota topné desky se nastaví na 90°C, po 2 hodinách se zvýší na 120 °C, a po dalších 3 hodinách na 140 °C. Poté se kádinky nechají vychladnout, přidají se 2 ml kyseliny dusičné a pokračuje se v ohřevu při 140°C 1 hodinu a dále při 160 °C 2 hodiny a při 180 °C 2 hodiny. Vzhled vzorků se postupně mění: ustává vývoj hnědých nitrosních plynů a roztok se odbarvuje. Pokud je odbarvení roztoku přechodné a roztok při vyšších teplotách znovu ztmavne, není rozklad ještě dokončen. V tom případě se vzorky nechají vychladnout a přidají se další 2 ml kyseliny dusičné a opakuje se ohřev s pomalu se zvyšující teplotou od 160 do 200 °C až do odbarvení roztoku. Jestliže vzorek znovu ztmavne, přidávek  $\text{HNO}_3$  a ohřev se znovu opakuje.\*

\* *Poznámka:* U některých vzorků nelze ve směsi  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$  dosáhnout úplného rozkladu. Pak je nutné použít pro dokončení rozkladu účinnější mineralizační činidlo – kyselinu chloristou. Po 2 hodinách ohřevu při  $180^\circ\text{C}$  se k vychladlému vzorku přidají 2 ml 65 %  $\text{HNO}_3$  a 1 ml 70 %  $\text{HClO}_4$  a vzorek se zahřívá při  $180^\circ\text{C}$  1 hodinu a při  $200^\circ\text{C}$  1 hodinu. POUŽITÍ KYSELINY CHLORISTÉ JE VŠAK NEBEZPEČNÉ (RIZIKO EXPLOZE), A PROTO V LABORATORNÍM CVIČENÍ NENÍ DOVOLENO.

Po ukončení rozkladu a úplném vychladnutí se opláchne proudem vody ze stříčky kondenzát na spodní straně hodinového skla do kádinky a opatrně se přidá ještě asi 5 ml vody. Kádinky se pak zahřívají bez hodinových skel při  $110\text{--}150^\circ\text{C}$  do úplného odpaření vody. Přitom se ze vzorků odstraní zbytky kyseliny dusičné, která ruší spektrofotometrické stanovení fosforečnanů. Po zchladnutí se mineralizáty kvantitativně převedou do 50 ml odměrných baněk a doplní demineralizovanou vodou po značku. Analogickým způsobem se připraví slepé vzorky.

#### b) Příprava vzorků ředěním

Některé kapalně vzorky s vysokým obsahem anorganických sloučenin fosforu (např. limonády jako Coca-Cola) lze analyzovat bez rozkladu. Vzorek je nutné před dávkováním do odměrné baňky (viz odstavec 5.2) zbavit rozpuštěného oxidu uhličitého.

### **5.2. Příprava kalibračních roztoků a roztoků vzorků**

Kalibrace se provádí v rozsahu do  $80 \mu\text{mol/l PO}_4^{3-}$ . Jednotlivé kalibrační roztoky mají koncentrace 0; 20; 40 a  $80 \mu\text{mol/l}$ . Do sady čtyř 50 ml odměrných baněk se odpipetuje 0; 1,0; 2,0 a 4,0 ml pracovního roztoku fosforečnanu ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ). Objem roztoků v baňkách se upraví vodou na cca 25 ml, přidá se 5 ml  $5,4 \text{ mol/l}$  roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5 ml roztoku molybdenanu a 5 ml roztoku síranu železnato-amonného. Po přidávku každého roztoku se obsah baněk kruživým pohybem zamíchá. Odměrné baňky se doplní vodou po značku, uzavřou zátkami a jejich obsah se promíchá.

Při stanovení fosforečnanů v mineralizovaných vzorcích se do 50 ml odměrných baněk pipetuje podle předpokládaného obsahu analytu 2-15 ml zředěného mineralizátu. Roztoky se okyselí  $5,4 \text{ mol/l H}_2\text{SO}_4$ . Dávkovaný objem roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  je závislý na pipetovaném objemu vzorku a určí se z tabulky 7.

Tab. 7

Objem mineralizátu	2 ml	5 ml	10 ml	15 ml
Objem $5,4 \text{ M H}_2\text{SO}_4$	4,3	3,3	1,7	0

Po okyselení se objem roztoku upraví vodou na cca 25 ml a dále se postupuje jako při kalibraci. Slepé vzorky se připraví stejným postupem jako vzorky.

Při analýze kapalných nemineralizovaných vzorků se vzorek odváží přímo do 50 ml odměrné baňky (odpipetuje se 0,2-0,5 ml odplyněného nápoje a zjistí se přírůstek hmotnosti). Po úpravě objemu vodou na 25 ml se pak v této baňce vyvolá barvotvorná reakce přidávkem 5 ml 5,4 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 ml roztoku molybdenanu a 5 ml roztoku železnaté soli. Baňka se pak doplní vodou po značku, uzavře zátkou a obsah se promíchá. Současně je třeba připravit slepý pokus na korekci vlastního zbarvení vzorku. Do další 50 ml odměrné baňky se dávkuje stejné množství vzorku, 5 ml 5,4 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a doplní se vodou po značku.

### **5.3. Měření**

K měření kalibračních roztoků (0; 20; 40; 80 μmol/l), vzorků a slepého vzorků se přistupuje ihned po dokončení přípravy roztoků. Časová prodleva mezi přípravou a měřením až do 5 hodin však není na závadu. Měří se absorbance roztoků při vlnové délce 700 nm v 1 cm kyvetě proti srovnávací kyvetě s vodou. Při měření je vhodné použít šířku spektrálního intervalu 1,5 nm nebo větší. Hodnoty absorbance kalibračních roztoků se vynesou do grafu proti koncentraci fosforečnanu v μmol/l. Kalibrační funkce se volí ve tvaru  $y = a + b x$  (grafem funkce je přímka, která obecně neprochází počátkem souřadnic). Z absorbancí vzorků a slepých vzorků se z kalibračního grafu odečtou resp. z kalibrační funkce vypočítají příslušné koncentrace fosforečnanu v měřených roztocích.

Při analýze vzorků limonád připravovaných ředěním je třeba změřit také absorbanci slepého pokusu vlastního zbarvení vzorku. Tato absorbance se pak odečte od absorbance vzorku a z difference absorbancí se určí na základě kalibrace korigovaná koncentrace.

### **5.4. Výpočet a vyhodnocení výsledku**

Od zjištěné koncentrace fosforečnanu se odečte průměrná koncentrace fosforečnanu ve slepém vzorku. Obsah analytu se vyjádří buď jako hmotnostní zlomek fosforečnanu (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), kyseliny fosforečné (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) nebo fosforu (P) v mg/kg a vypočítá se pro každý vzorek ze vztahu

$$w = (V_v/V_a) \cdot 0,05 \cdot (c - c_b) \cdot M / m_v \quad [\text{mg/kg}]$$

$c$  je koncentrace fosforečnanu ve vzorku určená z absorbance roztoku vzorku nebo z difference absorbancí (vzorek- slepý pokus vlastního zbarvení) [μmol/l]

$c_b$  je průměrná koncentrace fosforečnanu ve slepých vzorcích (jen u vzorků připravovaných rozkladem) [μmol/l]

$M$  je molární hmotnost příslušného analytu ( $M(\text{PO}_4^{3-})=94,971$ ,  $M(\text{H}_3\text{PO}_4) = 97,995$ ,  $M(\text{P}) = 30,974$  g/mol)

$m_v$  je navážka vzorku [g]

$V_a$  je alikvotní objem mineralizátu pipetovaný ke stanovení [ml].

$V_t$  je celkový objem mineralizátu,  $V_t = 50$  ml.

Ze dvou až tří paralelních výsledků se vypočte průměrná hodnota. Výsledek se zaokrouhlí na tři platné číslice. V případě stanovení kyseliny fosforečné v nápoji se výsledek porovná s přípustným množstvím. Nejvyšší přípustné množství kyseliny fosforečné (přídavná látka E 338) v ochucených nealkoholických nápojích stanovené Vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 je 700 mg/kg (vyjádřeno jako  $P_2O_5$ ).

# STANOVENÍ MĚDI, ZINKU A ŽELEZA V POTRAVINÁCH ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIÍ

## 1. POUŽITELNOST A PŮVOD METODY

Metoda je vhodná pro stanovení mědi, zinku a železa v potravinách i jiných matricích biologického původu. Při analýze materiálů s obsahem <0,2 mg/kg (např. rafinované oleje) je nutné zpracovat velkou navážku vzorku. K přípravě vzorků lze použít rozklad na suché cestě, rozklad na mokré cestě za atmosferického tlaku, tlakový rozklad nebo mikrovlnný tlakový rozklad kyselinou dusičnou nebo solubilizaci hydrolýzou vzorku zředěnou kyselinou chlorovodíkovou nebo dusičnou. Metoda byla adaptována podle údajů z literatury [13] a podmínkami vyhovuje normám ČSN 56 0076 Stanovení mědi, olova, zinku a kadmia v poživatinách metodou atomové absorpce a ČSN ISO 9526 Ovoce, zelenina

a výrobky z nich - Stanovení obsahu železa plamenovou atomovou absorpční spektrometrií.

## 2. PRINCIP METODY

Kapalný vzorek je zmlžován do plamene  $C_2H_2$ -vzduch a je měřena absorpce záření volnými atomy mědi, zinku, resp. železa na rezonančních čáře 324,7 nm, 213,9 nm resp. 248,3 nm.. Koncentrace prvků v analyzovaných roztocích se z naměřených absorbancí určují metodou kalibrační křivky.

## 3. POUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

- atomový absorpční spektrometr GBC Avanta P s kompresorem a tlaková láhev s čistým acetylenem
- 25 ml odměrné baňky nebo 50 ml odměrné baňky pro ředění vzorků
- 5 ml nedělené pipety pro ředění vzorků
- 100 ml odměrné baňky skleněné (4 ks) a polypropylenové (1 ks) pro přípravu kalibračních roztoků
- pipety 200-1000  $\mu$ l a 1-5 ml
- stříčka s demineralizovanou vodou

*Poznámka: veškeré nádobí musí být čištěno běžným mytím v destilované vodě a dekontaminováno loužením ve zředěném roztoku  $HNO_3$  (1:10) po dobu minimálně 24 hodin. Doporučená doba loužení je tři týdny. Vyloužené nádobí je umyto demineralizovanou vodou, usušeno a do použití by mělo být uschováno v uzavřených plastových sáčcích.*

## 4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo vyšší a demineralizovaná voda.

- standardní roztok Cu o koncentraci 1000 mg/l (matrice 0,5M  $HNO_3$ ), MERCK, katal. číslo 1.19786.500 nebo ekvivalentní roztok

---

[13] Rowe C.J.: Food Analysis by Atomic Absorption Spectroscopy, Varian Techtron, Springvale 1973

- standardní roztok Zn o koncentraci 1000 mg/l (matrice 0,5M HNO<sub>3</sub>), MERCK, katal. číslo 1.19806.500 nebo ekvivalentní roztok
- standardní roztok Fe o koncentraci 1000 mg/l (matrice 0,5M HNO<sub>3</sub>), MERCK, katal. číslo 1.19781.500 nebo ekvivalentní roztok
- zásobní roztok k přípravě standardů pro AAS o koncentraci Cu, Zn a Fe 100 mg/l (10 ml standardního roztoku Cu 1000 mg/l, 10 ml standardního roztoku Zn 1000 mg/l, 10 ml standardního roztoku Fe 1000 mg/l se odpipetuje do 100 ml odměrné baňky, okyselí 1 ml 65 % HNO<sub>3</sub> a doplní se demineralizovanou vodou po značku. Baňka se uzavře zátkou, její obsah se promíchá a přelije do 150 ml PP láhve se šroubovacím uzávěrem. Láhev se opatří štítkem, na kterém je uvedeno datum přípravy roztoku. Doba použitelnosti je 1 rok)
- 1M roztok HNO<sub>3</sub> nebo HCl: připraví se ředěním koncentrovaných kyselin demineralizovanou vodou.

## 5. PRACOVNÍ POSTUP

Výchozími vzorky jsou obvykle mineralizáty původních vzorků připravených rozkladem na suché cestě (viz str. 18-21) nebo mikrovlnným tlakovým rozkladem (str. 23-25). Vzorky nápojů lze většinou analyzovat bez rozkladu.

### 5.1 Ředění vzorků

Ředění výluhů popela před měřením je zpravidla nutné jen pro stanovení zinku. V případě stanovení mědi a železa lze očekávat, že ředění bude nezbytné u jen u vzorků s vysokým obsahem (játra, některé houby, čaj) pokud byla mineralizována větší navážka. V tom případě se roztoky vzorků před měřením ředí pětkrát až desetkrát. Roztoky slepých vzorků se nikdy neředí. Koncentrace prvků v měřených roztocích nesmějí přesáhnout 1,1 násobek koncentrace nejvyššího kalibračního standardu (2 µg/ml Cu, 1 µg/ml Zn, 4 µg/ml Fe).

#### Postup při ředění vzorků

Do vhodných odměrných baněk se odpipetují roztoky podle schématu v tabulce 8.

Tab. 8

	Zředovací poměr 5	Zředovací poměr 10
Odměrná baňka	25 ml	50 ml
Roztok vzorku	5 ml	5 ml
1M roztok HNO <sub>3</sub> nebo HCl	4 ml	9 ml
Demineralizovaná voda	do 25 ml	do 50 ml

*Poznámka: druh kyseliny (HNO<sub>3</sub> nebo HCl) se řídí druhem kyseliny, která tvoří matrici roztoku mineralizátu. Výše popsany způsob ředění zachovává přibližně 0,2M koncentraci kyseliny i ve zředěných vzorcích.*

## **5.2 Příprava kalibračních roztoků**

Kalibrační blank se připravuje do 100 ml PP odměrné baňky a slouží k nastavení nulové absorbance přístroje. Jednotlivé standardy se připravují do 100 ml skleněných odměrných baněk. Kalibrační roztoky se připravují ze zásobního roztoku kovů. Způsob přípravy je zřejmý z následujícího schématu v tabulce 9.

Tab. 9

	Blank	Standard 1 Cu Standard 1 Zn	Standard 2 Cu Standard 2 Zn	Standard 3 Cu Standard 3 Zn Standard 1 Fe	Standard 4 Cu - Standard 2 Fe	- - Standard 3 Fe
ml konc. kyseliny	1,3 (HNO <sub>3</sub> ) nebo 1,7 (HCl)	1,3 (HNO <sub>3</sub> ) nebo 1,7 (HCl)	1,3 (HNO <sub>3</sub> ) nebo 1,7 (HCl)	1,3 (HNO <sub>3</sub> ) nebo 1,7 (HCl)	1,3 (HNO <sub>3</sub> ) nebo 1,7 (HCl)	1,3 (HNO <sub>3</sub> ) nebo 1,7 (HCl)
ml roztoku Cu, Zn, Fe (100 mg/l)	0	0,20	0,50	1,00	2,00	4,00
demineralizovaná voda	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml
Výsledná koncentrace a označení odměrky	0 0	0,2 µg/ml 0,2	0,5 µg/ml 0,5	1 µg/ml 1,0	2 µg/ml 2,0	4 µg/ml 4,0

*Poznámka: Výsledná koncentrace kyselin v takto připravených je asi 0,2M. Při jiném způsobu přípravy vzorku (např. mineralizaci na mokré cestě) musí kalibrační roztoky obsahovat stejné množství zbytkových kyselin (nebo jiných složek) jako roztoky vzorků.*

## **5.3 Příprava atomového absorpčního spektrometru k měření**

- Vložení příslušné lampy do zásobníku lamp
- zapnutí přístroje a řídicího počítače, kontrola tabulky lamp, načtení metody měření
- kontrola nastavení žhavicího proudu lampy
- kontrola dalších parametrů metody (doporučené parametry jsou uvedeny v dalším odstavci)
- kontrola vloženého hořáku (používá se hořák pro plamen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-vzduch s 10 cm šěrbinou, šěrbinou se protáhne čistící karta)
- nastavení geometrie lampy na maximální energii a nastavení optimálního napětí na fotonásobiči
- kontrola průchodu měrného paprsku nad hořákem
- kontrola rotační polohy hořáku: při stanovení Cu, Zn a Fe je hořák nastaven rovnoběžně s optickou osou
- nastavení doporučené výšky pozorování, seřízení vertikální polohy hořáku (možno optimalizovat před první kalibrací)
- kontrola hladiny v odpadní nádobě
- zapnutí vzduchového kompresoru a otevření přívodu vzduchu, případně otevření hlavního ventilu tlakové láhve se vzduchem (výstupní tlak 300-400 kPa)
- otevření hlavního ventilu tlakové láhve s acetylenem (výstupní tlak 55-96 kPa)
- zapnutí odtahu
- zapálení plamene a určení sací rychlosti při nasávání vody.

## 5.4 Měření

Po přípravě spektrometru k měření a případné optimalizaci lze přikročit k vlastnímu měření. Podmínky stanovení Cu, Zn a Fe atomovou absorpční spektrometrií jsou shrnuty v tabulce 10. Pro měření daného prvku je nutné v řídicím počítači otevřít tři soubory:

- soubor samotné metody měření (otevřít příslušný soubor \*.mth),
- vzorkový soubor definující sekvenci, v jaké budou jednotlivé roztoky (kalibračních roztoky a roztoky vzorků) měřeny (otevřít např. soubor Samples1.sam)
- výsledkový soubor, do kterého jsou ukládána naměřená data (vytvořit \*.res).

Po startu měření je nutné nastavit nulovou hodnotu absorbance při nasávání kalibračního blanku. Následuje měření standardů a po dokončení kalibrace měření jednotlivých vzorků včetně slepých vzorků. Mezi jednotlivými roztoky se sací kapilára přístroje ponoří na několik sekund do kádinky s demineralizovanou vodou. Výsledky měření jsou udány vypočtenou koncentrací vyjádřenou v  $\mu\text{g/ml}$ , průměrnou absorbancí a relativní směrodatnou odchylkou.

Tab. 10

	Cu	Zn	Fe
Proud lampy	3-4 mA	3-5 mA	6 mA
Vlnová délka	324,7 nm	213,9 nm	248,3 nm
Šířka spektrálního intervalu	0,5 nm	0,5 nm	0,2 nm
Korekce pozadí	ano	ano	ano
Vyhodnocení signálu	integrace	integrace	integrace
Integrační doba	3 s	3 s	3 s
Počet replik	3	3	3-5
Časová konstanta	0,2 s	0,2 s	0,2-0,5 s
Druh kalibrace	„Conc Least Squares“ (nelineární metoda nejmenších čtverců)		
Koncentrace kalibračních roztoků	0,2; 0,5; 1,0; 2,0 $\mu\text{g/ml}$	0,2; 0,5; 1,0 $\mu\text{g/ml}$	1,0; 2,0; 4,0 $\mu\text{g/ml}$
Plamen	vzduch-acetylen	vzduch-acetylen	vzduch-acetylen
Vertikální poloha hořáku (výška pozorování)	3-5 mm	3-5 mm	11 mm
Průtok vzduchu	10 l/min	10 l/min	10 l/min
Průtok acetylenu	1,0-1,2 l/min	1,0-1,2 l/min	1,6-2,0 l/min

*Poznámka:* Při normální rotační poloze hořáku je pro dosažení přesných výsledků třeba nastavit horizontální polohu hořáku tak, aby paprsek procházel právě nad štěrbinou. Poloha hořáku, průtoky plynů a nastavení zmlžovače (ovlivňuje sací rychlost) jsou parametry, které lze optimalizovat. Při optimalizaci se nasává roztok obsahující příslušný prvek (např. pro Cu 4-5  $\mu\text{g/ml}$ ) a změnou parametru se nastaví maximální absorbance (předem je nutné nastavit nulovou absorbanci při nasávání blanku). Zpravidla se nemění průtok vzduchu. Po seřízení zmlžovače na maximální citlivost je sací rychlost obvykle v rozmezí 7-8 ml/min.



## 5.5 Výpočet

Obsah prvku v mg/kg v jednotlivém vzorku se vypočte ze vztahu:

$$w = (f_z \cdot \rho - \rho_0) \cdot V / m_v \quad [\text{mg/kg}]$$

$\rho$  je hmotnostní koncentrace prvku ve zředěném vzorku [ $\mu\text{g/ml}$ ]

$f_z$  je použitý zředovací poměr při ředění vzorku

$\rho_0$  je průměrná hmotnostní koncentrace prvku v sérii příslušných slepých vzorků [ $\mu\text{g/ml}$ ]

$V$  je objem mineralizátu nebo výluhu popela vzorku nebo objem vzorku jinak připraveného k analýze [ml]

$m_v$  je navážka vzorku [g].

Z výsledků paralelně provedených analýz téhož vzorku se vypočítá aritmetický průměr, případně odhad směrodatné odchylky. Výsledek se vyjadřuje na tři platné číslice.

### Stanovení mědi, zinku a železa v potravinách atomovou absorpční spektrometrií: časový snímek práce

Operace	Přibližná spotřeba času (h)	Poznámka
Úvodní výklad	0,5-1	
Příprava nádobí a pomůcek	0,25	
Příprava vzorků -výluh popela	1-2	podle počtu vzorků
Ředění vzorků	0-0,25	
Příprava kalibračních roztoků	0,25	
Výklad obsluhy AAS a příprava spektrometru k měření	1	
Kalibrace a analýza vzorků	0,25	
Úklid a mytí nádobí	0,5-1	
Celkem	3,75-6	

# STANOVENÍ SODÍKU A DRASLÍKU V POTRAVINÁCH ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIÍ

## 1. POUŽITELNOST A PŮVOD METODY

Metoda je vhodná pro stanovení sodíku a draslíku v potravinách i jiných matricích biologického původu. K přípravě vzorků lze použít rozklad na suché cestě, rozklad na mokré cestě za atmosferického tlaku, tlakový rozklad nebo mikrovlnný tlakový rozklad kyselinou dusičnou nebo solubilizací hydrolýzou vzorku zředěnou kyselinou chlorovodíkovou nebo dusičnou. Metoda byla adaptována podle údajů z literatury [13] a podmínkami vyhovuje normě ČSN EN 1134 (56 0405) Ovocné a zeleninové šťávy – Stanovení obsahu sodíku, draslíku, vápníku a hořčíku atomovou absorpční spektrometrií (AAS).

## 2. PRINCIP METODY

Kapalný vzorek je zmlžován do plamene  $C_2H_2$ -vzduch a je měřena absorpce záření volnými atomy sodíku resp. draslíku rezonančních čáře 589,0 nm resp. 766,5 nm. Analyzované vzorky i kalibrační roztoky musejí obsahovat deionizační činidlo CsCl. Koncentrace prvků v analyzovaných roztocích se z naměřených absorbancí určují metodou kalibrační křivky.

## 3. POUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

- atomový absorpční spektrometr GBC Avanta P s kompresorem a tlaková láhev s čistým acetylenem
- 10 ml odměrné baňky nebo 25 ml odměrné baňky pro ředění vzorků
- 100 ml odměrná baňka polypropylenová a 50 ml odměrné baňky polypropylenové (3 ks) pro přípravu kalibračních roztoků
- pipety 200-1000  $\mu$ l a 1-5 ml
- stříčka s demineralizovanou vodou

*Poznámka: veškeré nádobí musí být čištěno běžným mytím v destilované vodě a dekontaminováno loužením ve zředěném roztoku  $HNO_3$  (1:10) po dobu minimálně 24 hodin. Doporučená doba loužení je tři týdny. Vyloužené nádobí je umyto demineralizovanou vodou, usušeno a do použití by mělo být uschováno v uzavřených plastových sáčkách.*

## 4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo vyšší a demineralizovaná voda.

- Standardní roztok Na o koncentraci 1000 mg/l (matrice 0,5M  $HNO_3$ ), MERCK, katal. číslo 1.70238.500 nebo ekvivalentní roztok
- Standardní roztok K o koncentraci 1000 mg/l (matrice 0,5M  $HNO_3$ ), MERCK, katal. číslo 1.70230.500 nebo ekvivalentní roztok

[13] Rowe C.J.: Food Analysis by Atomic Absorption Spectroscopy, Varian Techtron, Springvale 1973

- Směsný zásobní roztok Na a K o koncentraci 500 mg/l: do čisté a suché plastové lahvičky se šroubovacím uzávěrem se odpipetují stejné objemy (např. 10 + 10 ml) standardních roztoků sodíku a draslíku (1000 mg/l) a obsah lahvičky se promíchá
- 1% roztok Cs: do suché a čisté platové láhve se šroubovacím uzávěrem se odváží 1,27 g CsCl (čistoty p.a. nebo Suprapur) a 98,73 g demineralizované vody a směs se promíchá.
- 1M roztok HNO<sub>3</sub> nebo HCl: připraví se ředěním koncentrovaných kyselin demineralizovanou vodou.

## 5. PRACOVNÍ POSTUP

Výchozími vzorky jsou obvykle mineralizáty původních vzorků připravených rozkladem na suché cestě (viz str. 18-21) nebo mikrovlnným tlakovým rozkladem (str. 23-25). Vzorky nápojů lze většinou analyzovat bez rozkladu. Pro účel stanovení chloridu sodného lze analyzovat i vodný extrakt ze vzorku potraviny.

### 5.1 Ředění vzorků

Ředění kapalných vzorků (tj. výluhů popela ve zředěné HCl nebo zředěné HNO<sub>3</sub> nebo mineralizátů připravených tlakovým mikrovlnným rozkladem nebo vodných extraktů tuhých vzorků nebo vzorků kapalných materiálů) se provádí v odměrných baňkách o objemu 10 ml. Při ředění se přidává deionizační činidlo v takovém množství, aby výsledná koncentrace cesia byla 2 mg/ml. Vzorek se okyseluje kyselinou chlorovodíkovou (vodné extrakty nebo výluhy popela ve zředěné HCl) na koncentraci 0,1 mol/l nebo se ředěním a přidávkem 1M HNO<sub>3</sub> upraví koncentrace kyseliny dusičné (u vzorků rozkládaných kyselinou dusičnou) také na hodnotu 0,1 mol/l.

Do 10 ml odměrných baněk se odpipetují roztoky podle schématu v tabulce 11:

Tab. 11

	Zředovací poměr 5	Zředovací poměr 10	Zředovací poměr 20
Roztok vzorku	2 ml	1 ml	0,5 ml
Roztok CsCl (1 % Cs)	2 ml	2 ml	2 ml
1M roztok HNO <sub>3</sub> nebo HCl	1 ml 1M HCl (pro vodný extrakt) nebo 0,6 ml 1M HCl (pro výluh popela v 0,2M HCl) nebo 0,2 ml 1M HNO <sub>3</sub> (pro mineralizát se 3 ml HNO <sub>3</sub> /100 ml)	1 ml 1M HCl (pro vodný extrakt) nebo 0,8 ml 1M HCl (pro výluh popela v 0,2M HCl) nebo 0,6 ml 1M HNO <sub>3</sub> (pro mineralizát 3 ml HNO <sub>3</sub> /100 ml)	1 ml 1M HCl (pro vodný extrakt) nebo 0,9 ml 1M HCl (pro výluh popela v 0,2M HCl) nebo 0,8 ml 1M HNO <sub>3</sub> (pro mineralizát 3 ml HNO <sub>3</sub> /100 ml)
Demineralizovaná voda	do 10 ml	do 10 ml	Do 10 ml

## **5.2 Příprava kalibračních roztoků**

Kalibrační blank se připravuje do 100 ml PP odměrné baňky a slouží k nastavení nulové absorbance přístroje. Jednotlivé standardy se připravují do 50 ml PP odměrných baněk. Kalibrační roztoky se připravují ze směšného roztoku sodíku a draslíku (500 mg/l). Způsob přípravy je zřejmý ze schématu v tabulce 12.

Tab. 12

	Blank	Standard 1	Standard 2	Standard 3
ml 1M HCl nebo HNO <sub>3</sub>	10	5	5	5
ml roztoku CsCl (1 % Cs)	20	10	10	10
ml roztoku Na, K (500 mg/l)	0	0,50	1,00	2,00
demineralizovaná voda	do 100 ml	do 50 ml	do 50 ml	do 50 ml
Výsledná koncentrace a označení odměrky	0	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
	0	5	10	20

*Poznámka: Výsledná koncentrace kyselin v takto připravených standardech je asi 0,1M. Při jiném způsobu přípravy vzorku (např. mineralizaci na mokré cestě) musí kalibrační roztoky obsahovat stejné množství zbytkových kyselin (nebo jiných složek) jako roztoky vzorků.*

## **5.3 Příprava atomového absorpčního spektrometru k měření**

- Vložení příslušné lampy do zásobníku lamp
- zapnutí přístroje a řídicího počítače, kontrola tabulky lamp, načtení metody měření
- kontrola nastavení žhavicího proudu lampy
- kontrola dalších parametrů metody (doporučené parametry jsou uvedeny v dalším odstavci)
- kontrola vloženého hořáku (používá se hořák pro plamen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-vzduch s 10 cm štěrbinou, štěrbinou se protáhne čistící karta)
- nastavení geometrie lampy na maximální energii a nastavení optimálního napětí na fotonásobiči
- kontrola průchodu měrného paprsku nad hořákem
- kontrola rotační polohy hořáku: při stanovení vyšších koncentrací Na a K (do 20 µg/ml) se hořák otočí kolmo na optickou osu, při měření stopových koncentrací (do 0,5 µg/ml u sodíku a do 1,5 µg/ml u draslíku) je hořák nastaven rovnoběžně s optickou osou
- nastavení doporučené výšky pozorování (10 mm), seřízení vertikální polohy hořáku (možno optimalizovat před první kalibrací)
- kontrola hladiny v odpadní nádobě
- zapnutí vzduchového kompresoru a otevření přívodu vzduchu, případně otevření hlavního ventilu tlakové láhve se vzduchem (výstupní tlak 300-400 kPa)
- otevření hlavního ventilu tlakové láhve s acetylenem (výstupní tlak 55-96 kPa)
- zapnutí odtahu
- zapálení plamene a určení sací rychlosti při nasávání vody.

## 5.4 Měření

Po přípravě spektrometru k měření a případné optimalizaci lze přikročit k vlastnímu měření. Podmínky stanovení Na a K atomovou absorpční spektrometrií jsou shrnuty v tabulce 13. Pro měření daného prvku je nutné v řídicím počítači otevřít tři soubory:

- soubor samotné metody měření (otevřít příslušný soubor Na.mth a K.mth),
- vzorkový soubor definující sekvenci, v jaké budou jednotlivé roztoky (kalibračních roztoky a roztoky vzorků) měřeny (otevřít např. soubor Samples1.sam)
- výsledkový soubor, do kterého jsou ukládána naměřená data (vytvořit \*.res).

Po startu měření je nutné nastavit nulovou hodnotu absorbance při nasávání kalibračního blanku. Následuje měření standardů a po dokončení kalibrace měření jednotlivých vzorků včetně slepých vzorků. Mezi jednotlivými roztoky se sací kapilára přístroje ponoří na několik sekund do kádinky s demineralizovanou vodou. Výsledky měření jsou udány vypočtenou koncentrací vyjádřenou v  $\mu\text{g/ml}$ , průměrnou absorbancí a relativní směrodatnou odchylkou.

Tab. 13

	Na	K
Proud lampy		
Vlnová délka	589,0 nm	766,5 nm
Šířka spektrálního intervalu	0,5 nm	0,5 nm
Korekce pozadí	ne	ne
Vyhodnocení signálu	integrace	integrace
Integrační doba	3 s	3 s
Počet replik	3	3
Časová konstanta	0,2 s	0,2 s
Druh kalibrace	„Concentration least square“ (nelineární metoda nejmenších čtverců)	
Koncentrace kalibračních roztoků	5,0; 10,0; 20,0 $\mu\text{g/ml}$ při kolmé poloze hořáku nebo 0,1; 0,2; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ při přímé poloze hořáku	5,0; 10,0; 20,0 $\mu\text{g/ml}$ při kolmé poloze hořáku nebo 0,2; 0,5; 1,0 $\mu\text{g/ml}$ při přímé poloze hořáku
Vertikální poloha hořáku (výška pozorování)	10 mm	10 mm
Průtok vzduchu	10 l/min	10 l/min
Průtok acetylenu	1,7-1,9 l/min při kolmé poloze hořáku nebo 1,0-1,2 l/min při přímé poloze hořáku	1,7-1,9 l/min při kolmé poloze hořáku nebo 1,0-1,2 l/min při přímé poloze hořáku

## **5.5 Výpočet**

Obsah prvku v mg/kg v jednotlivém vzorku se vypočte ze vztahu:

$$w = (f_z \cdot \rho - \rho_0) \cdot V / m_v \quad [\text{mg/kg}]$$

$\rho$  je hmotnostní koncentrace prvku ve zředěném vzorku [ $\mu\text{g/ml}$ ]

$f_z$  je použitý zředovací poměr při ředění vzorku

$\rho_0$  je průměrná hmotnostní koncentrace prvku v sérii příslušných slepých vzorků [ $\mu\text{g/ml}$ ]

$V$  je objem mineralizátu nebo výluhu popela vzorku nebo objem vzorku jinak připraveného k analýze [ml]

$m_v$  je navážka vzorku [g].

Z výsledků paralelně provedených analýz téhož vzorku se vypočítá aritmetický průměr, případně odhad směrodatné odchylky. Výsledek se vyjadřuje na tři platné číslice.

## SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ ŽELEZA V POTRAVINÁCH

### 1. POUŽITELNOST A PŮVOD METODY

Metoda je vhodná pro stanovení železa ve všech potravinářských materiálech se středním a vyšším obsahem železa. Byla modifikována podle normy ČSN 56 0075 Stanovení železa v poživatinách. K přípravě vzorku ke stanovení železa se používá nejčastěji rozklad na suché cestě. Je možné použít i rozklad na mokré cestě směsí  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ .

*Poznámka: při analýze vzorků připravených rozkladem na suché cestě je třeba výluh popela připravovat s použitím zředěné kyseliny chlorovodíkové. Přítomnost kyseliny dusičné nebo jiných oxidovadel při spektrofotometrickém stanovení železa ruší.*

### 2. PRINCIP METODY

Metoda využívá tvorby červeně zbarveného komplexu železnatých iontů s 2,2'-bipyridylem ve slabě kyselém prostředí. Z absorpance roztoku při vlnové délce 522 nm se z kalibrační křivky určí hmotnost železa v roztoku.

### 3. POUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

- spektrofotometr
- skleněné rektangulární kyvety o tloušťce 1 cm nebo 2 cm
- 5 ml a 10 ml nedělené pipety
- 1, 2 a 5 ml dělené pipety
- stříčka s destilovanou vodou
- 50 ml odměrné baňky

### 4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- standardní roztok Fe o koncentraci 1000 mg/l (matrice 0,5M  $\text{HNO}_3$ ), MERCK, katal. číslo 1.19781.0500 nebo ekvivalentní roztok
- pracovní roztok Fe o koncentraci 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (připraví se odpipetováním 2,0 ml standardního roztoku Fe do 200 ml odměrné baňky, přidávkem 10 ml 6M HCl a doplněním demineralizovanou vodou po značku), roztok je použitelný 2 měsíce
- 10 % roztok kyseliny chlorovodíkové
- 0,1% roztok 2,2'-bipyridylu
- 10 % roztok hydroxylamin hydrochloridu
- 20 % roztok octanu amonného

## 5. PRACOVNÍ POSTUP

### 5.1 Kalibrace stanovení železa

Do sady 50 ml odměrných baněk označených čísly 0, 10, 20 až 60 se odpipetuje po 3 ml 10% roztoku HCl a postupně rostoucí objem pracovního roztoku železa o koncentraci 10 µg/ml: 0,00; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 a 6,00 ml (tj. dávkuje se 0 až 60µg Fe). Pak se upraví celkový objem v odměrkách na 10 ml destilovanou vodou (přidavky destil. vody: 7; 6; ... až 1 ml). Následují přidavky 1 ml 10 % roztoku hydroxylamin hydrochloridu, 4 ml 0,1 % roztoku 2,2'-bipyridylu a 10 ml 20 % roztoku octanu amonného. Po přidavku posledního činidla roztoky zružovějí. Pak se odměrky doplní destilovanou vodou po značku, zazátkují se a jejich obsah se důkladně promíchá. Po 30 minutách se změří absorbance připravených kalibračních roztoků při vlnové délce 522 nm v 1 cm nebo 2 cm kyvetě proti destilované vodě. Naměřené absorbance se zapíše do tabulky podle vzoru:

$m_{\text{Fe}}$ [µg]	$A$	$\Delta A = A - A_0$
0	0,003	0
10	0,067	0,064
20	0,130	0,127
30	...	...
40	...	...

Hodnoty  $\Delta A$  (tj. absorbance zmenšené o absorbanci nulového roztoku) se vynesou proti hmotnosti železa do grafu na milimetrový papír (měřítko na ose x: 2 cm na 10 µg, měřítko na ose y: 5 cm na 0,1A). Jednotlivými body se proloží přímka procházející počátkem souřadnic. Kalibrační graf se popíše podmínkami měření ( $\lambda=522$  nm,  $b=1$  nebo 2 cm,  $V=50$  ml) a datem práce. Je možné také graficky zpracovat kalibraci v počítači a k protokolu přiložit vytištěný graf.

### 5.2 Stanovení železa ve vzorku

Studenti obdrží dvojici paralelně připravených výluhů popela z téhož vzorku (roztoky jsou označeny číslem a písmenem např. 1a, 1b) a současně dvojici slepých pokusů (označení např. B1,B2). Z připravených výluhů popela a slepých vzorků se do jednotlivých 50 ml odměrných baněk odpipetuje nedělenou pipetou vhodný alikvotní podíl (10 ml vzorku nebo v případě vzorků s vyšším obsahem železa 5 ml vzorku a dále 5 ml destilované vody). Následuje přidavek jednotlivých činidel počínaje roztokem hydroxylamin hydrochloridu (viz výše). Další postup je stejný, jako při kalibraci. Měření probíhá za stejných podmínek (stejná tloušťka kyvety). Naměřené hodnoty absorbance vzorků se zmenší o průměrnou absorbanci slepého pokusu. Z těchto diferencí se z kalibračního grafu odečtou hmotnosti železa v alikvotních podílech vzorku v µg.

### 5.3 Vyjádření výsledku a výpočet

Vypočtete obsah železa ve vzorku potravin, jejíž popel jste obdrželi, v mg/kg a v mg/kg sušiny. Druh vzorku, navážky a obsah vody resp. sušiny ve vzorku Vám sdělí vyučující asistent.

Výpočet:  $w_{\text{Fe}} = (V_t \cdot m) / (V_a \cdot m_v)$  [mg/kg]



$m$  je hmotnost Fe v alikvotním podílu odečtená z kalibrační křivky [ $\mu\text{g}$ ]

$V_t$  je celkový objem výluhu popela (50 nebo 100 ml)

$V_a$  je alikvotní objem výluhu popela (10 nebo 5 ml)

$m_v$  je navážka vzorku [g].

Z paralelních výsledků se vypočte aritmetický průměr a průměrný obsah se přepočte na sušinu:

$$w_{\text{Fe}}' = 100 \cdot w_{\text{Fe}} / (100 - p_{\text{H}_2\text{O}}) \quad [\text{mg/kg sušiny}]$$

$p_{\text{H}_2\text{O}}$  je obsah vody (vlhkosti) ve vzorku [%].