

STANOVENÍ ARSENU V OŘEŠÍCH POMOCÍ AAS – VERIFIKACE METODY A KVANTIFIKACE NEJISTOTY STANOVENÍ

DAVID MILDE a ADRIANA LINHARTOVÁ

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tr. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
david.milde@upol.cz*

Došlo 18.2.10, přepracováno 8.7.10, přijato 18.8.10.

Klíčová slova: arsen, atomová absorpční spektrometrie, verifikace metody, elektrotermická atomizace, generování hydridů

Úvod

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je stále považována za nejrozšířenější metodu stopové prvkové analýzy jednak proto, že pro celou řadu aplikací poskytuje uspokojivé detekční limity, a jednak pro relativně nízké pořizovací a provozní náklady. Cílem této práce bylo optimalizovat postup pro stanovení arsenu v biologickém materiálu (plodech ořechů) pomocí běžných atomizačních technik AAS (elektrotermické atomizace ETA-AAS a generování hydridů HG-AAS), najít vhodné podmínky pro stanovení arsenu, provést verifikaci metody a stanovit obsah arsenu ve vzorcích čtyř druhů ořechů. Distribuce biogenních, ale i toxických prvků v rostlinách včetně plodů je aktuálně řešená problematika a u ořechů nebyla zatím detailně popsána. Zde jsou shrnuty dosažené závěry pro arsen a jeho rozložení v ořechích.

Arsen patří mezi cizorodé (rizikové) prvky, které nepříznivě ovlivňují půdní úrodnost, růst rostlin nebo je jejich příjem rostlinami nežádoucí s ohledem na možnost ohrožení zdraví lidí a zvířat a dále mezi ty, jejichž hromadění v půdě je nežádoucí. V životním prostředí se všichni setkáváme s jistou nízkou hladinou expozice arsenem, která ale organismus nijak nepoškozuje a je prokázáno, že velmi nízké dávky arsenu v přijímané potravě jsou důležité a prospěšné¹.

Příjem arsenu rostlinami je spojen s jeho oxidačním stavem a druhem sloučeniny. Ve sladkovodních a suchozemských rostlinách je arsen přítomen z 60–72 % v anorganické formě, protože nemají systém schopný methylace arsenu. Rostlina přijímá arsen v pětimocné formě a následně ho konvertuje na trojmocný. Tolerance rostliny k arsenu závisí na druhu rostliny. Většina suchozemských rostlin má schopnost akumulace arsenu (až 8 mg na

kg sušiny). Rostliny, které nejsou rezistentní k arsenu, trpí sníženým růstem (hlavně kořenů) vedoucím až k úhynu².

AAS není ani nejlepší ani jediná metoda vhodná pro stanovení arsenu³. Záleží na druhu vzorku a na předpokládaných koncentracích kovů, která metoda bude nejvhodnější. Mezi metody, kterými lze poměrně levně a jednoduše stanovit arsen, patří metody spektrofotometrické, které dokáží rozlišit As(III) a As(V) a hodí se především ke stanovování arsenu ve vodách. Další metodou vhodnou ke stanovení arsenu je atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) v kombinaci s technikou generování hydridů (HG) nebo v kombinaci s kolekcí vymrazováním následovanou plynovou chromatografií. Dále sem patří také kombinace kapalinové chromatografie s generováním hydridů a detekcí buď pomocí atomové absorpce nebo fluorescence (HPLC-HG-AAS, HPLC-HG-AFS) a popsána byla i kombinace HPLC UV (rozklad ultrafialovým zářením) a zavedení do detekčního systému^{4,5}. Kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (HPLC-ICP-MS) je robustní technika s vynikajícími detekčními limity, která umožňuje identifikaci a kvantifikaci širokého spektra sloučenin arsenu a je v současnosti nejrozšířenější metodou stanovení těchto sloučenin. S úspěchem lze využít i kombinaci HPLC-ICP-MS s generováním hydridů. Další méně rozšířená metoda stanovení je GC-MS pro těkavé sloučeniny arsenu. Kapilární elektroforéza s UV nebo MS detekcí nedosahuje detekčních limitů dostatečně nízkých pro biologické vzorky. Stanovení arsenu lze provést i elektrochemickými metodami⁶ a neutronovou aktivační analýzou⁷.

Experimentální část

Chemikálie

Kalibrační roztoky byly připravovány ze zásobního roztoku arsenu Astatol (Analytika s.r.o., Praha, ČR), o koncentraci $1,000 \pm 0,005 \text{ g l}^{-1}$. K rozkladu ořechů byla použita HNO_3 (67%, Analytika SD pro stopovou analýzu, Analytika s.r.o., Praha, ČR) a H_2O_2 (30%, p.a., Analytika s.r.o., Praha, ČR). Jako redukční činidlo pro generování hydridů byl použit 0,5% roztok NaBH_4 (98%, Sigma-Aldrich, Německo) v 0,5% roztoku NaOH (p.a., Lachema, ČR). Při předredukci As pro generování hydridů byla použita HCl (37%, pro polovodiče, Analytika s.r.o., Praha, ČR), KI (p.a., Chemapol, Praha, ČR), hydroxylaminhydrochlorid (p.a. pro AAS, Sigma-Aldrich, Německo), askorbová kyselina (Analytika s.r.o., Praha, ČR) a L-cystein (p.a., Reachim, Rusko). Modifikátory matrice byly připravovány ředěním a mícháním následujících chemikálií: $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (2 g l^{-1} v 5% HNO_3), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (1 g l^{-1} v H_2O) $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (10 g l^{-1} v H_2O), askorbová kyselina (10 g l^{-1} v H_2O) všechny od Analytika s.r.o., Praha, ČR.

Původ vzorků

V této práci byly analyzovány dva druhy lískových ořechů (líska obecná z obce Zákřov a líska turecká rostoucí podél frekventované komunikace na tř. Svobody, Olomouc), dále plody podzemnice olejné (zakoupeny v obchodním řetězci Kaufland, Olomouc, země původu USA) a vlašské ořechy z ořešáku královského (obec Ostravice, CHKO Beskydy). Z každé lokality bylo odebráno několik vzorků, které byly poté vysušeny na vzduchu a skladovány při laboratorní teplotě. Rozložené vzorky byly před analýzou skladovány v lednici. Jako referenční materiál pro verifikaci metody bylo použito sušené jahodové listí QCM 03 (MetranalTM, Analytika s.r.o., Praha, ČR) s certifikovaným množstvím arsenu $0,26 \pm 0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ (údaj za $\pm$ je kombinovaná rozšířená nejistota), což odpovídá koncentracím arsenu v reálných vzorcích.

Použité přístroje

K rozkladu vzorků byl použit tlakový mikrovlnný mineralizátor Uniclever II (Plazmatronika, Polsko). Všechna měření byla prováděna na dvoupaprskovém atomovém absorpčním spektrometru Avanta Σ (GBC, Austrálie) s deuteriovou korekcí pozadí, vybaveném výbojkou s dutou katodou pro arsen (SpectrAA Lamp, Austrálie) i superlampou (Photron, Austrálie). Vyhodnocení dat bylo provedeno statistickým programem QC Expert 3.1 (Trilobyte s.r.o., ČR).

Pracovní postup

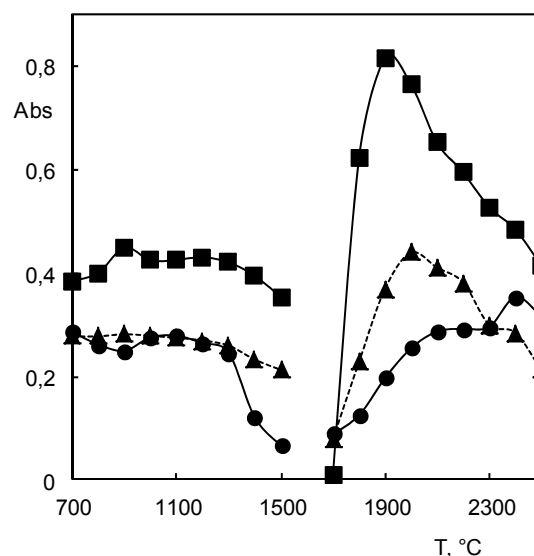
Každý plod ořechu byl lehce ořten demineralizovanou vodou navlhčenou buničinnou vatou pro odstranění externí kontaminace a byl rozdělen zvlášť na skořápku, slupku a jádro. Vzorky se navažovaly do teflonových mineralizačních kelímků a po přidání směsi HNO_3 a H_2O_2 se v mikrovlnném mineralizátoru rozkládaly ve třech krocích: 2 min 70 % výkonu a poté 30 s na 0 %, 2 min 90 % výkonu, 30 s na 0 %, 10 min na 100 % výkon. Maximální rozmezí tlaků pro rozklad bylo 42–45 atmosfér. Po mineralizaci se vzorky nechaly v teflonových kelímčích odpařit do sucha a následně se odparky kvantitativně převedly do 10ml odměrných baněk a doplnily demineralizovanou vodou.

Výsledky a diskuse

V této práci jsou prezentovány dvě skupiny výsledků. První část se věnuje optimalizaci podmínek pro obě používané atomizační techniky za použití mineralizátů vzorků ořechů. Dále byly z výsledků analýz referenčního materiálu vyhodnoceny jednotlivé validační charakteristiky.

Elektrotermická atomizace

U této atomizační techniky byly analyzované roztoky mineralizovaných vzorků dávkovány do grafitové kyvety



Obr. 1. Rozkladné a atomizační křivky získané při měření mineralizátů vzorků ořechů pro různé modifikátory; ● $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, ■ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ s askorbovou kyselinou, ▲ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

s platformou (pyro-coated graphite furnace tube, RMI, s.r.o., Lázně Bohdaneč, ČR). Nejprve byla provedena optimalizace teplotních programů pro následující kombinace modifikátorů: $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ s $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ s $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ s askorbovou kyselinou. Rozkladné a atomizační křivky jsou na obr. 1. Výsledné teplotní programy shrnuje tab. 1. Dále bylo porovnáváno, zda je lepší použít pro stanovení arsenu touto technikou výbojku s dutou katodou nebo superlampu. Byla sledována kvalita signálu (jeho tvar, výška a míra překorigování) a citlivost (směrnice kalibrační přímky). Přestože citlivost pro superlampu byla dvojnásobná ve srovnání s výbojkou s dutou katodou, lepších výsledků z hlediska kvality signálu bylo dosaženo pro výbojku s dutou katodou, a proto byla použita i pro všechna následující měření. Mezi optimalizované parametry patřila také vlnová délka emitovaná ze zdroje záření. Měření bylo standardně prováděno při vlnové délce 193,7 nm. Použití alternativní vlnové délky 189,0 nm pro směsný modifikátor $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ nepřineslo zlepšení, u reálných vzorků bylo pozorováno vyšší pozadí a ve větší míře se projevilo překorigování pozadí.

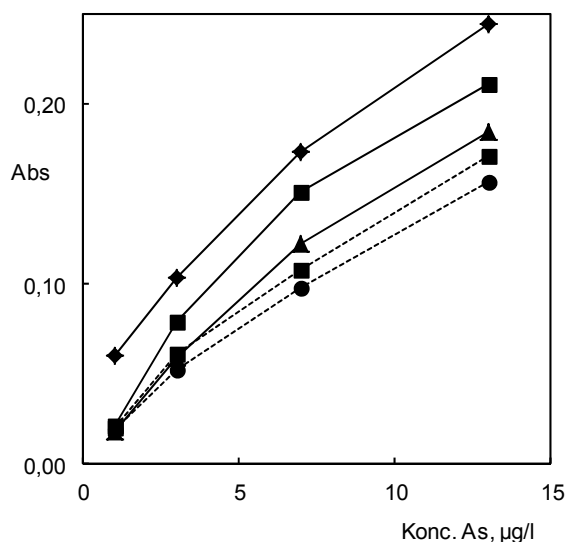
Generování hydridů

Jedním z prvních kroků optimalizace techniky bylo nalezení vhodné teploty v křemenném atomizátoru. V intervalu 930–1010 °C byly proměřovány vybrané kalibrační roztoky. Nejvyšších hodnot absorbance bylo dosaženo pro teplotu 930 °C – viz obr. 2.

Tabulka I

Teplotní program pro stanovení As ve vzorcích ořechů při použití různých modifikátorů

Krok	Teplota [°C]	Doba nárůstu [s]	Doba držení teploty [s]	Inertní plyn
Ohřev	120	1	10	Ar
NÁSTRÍK				
Sušení	150	10	25	Ar
Rozklad	1100 ^a /900 ^b /1200 ^c	5	20	Ar
Rozklad	1100 ^a /900 ^b /1200 ^c	0	1	–
Atomizace	2400 ^a /2100 ^b /2100 ^c	max. rychlost	2	–
Čištění	2700	1	5	Ar

^a Modifikátor Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂, ^b modifikátor Ni(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂, ^c modifikátor Pd(NO₃)₂ + askorbová kyselina

Obr. 2. Absorbance kalibračních standardů při různých teplotách atomizace v křemenné trubici; —●— 930 °C, —■— 950 °C, —▲— 970 °C, —■— 990 °C, —●— 1010 °C

Dále bylo třeba zvolit vhodné činidlo pro předredukci. Mezi ověřovaná činidla patřil roztok jodidu draselného (při následujících hmotnostních zlomcích 0,02; 0,2; 0,4 a 1 %), 1% roztok jodidu draselného v kombinaci s 0,5% roztokem askorbové kyseliny a hydroxylaminhydrochloridem (1% KI s 1% hydroxylaminhydrochloridem), 0,05% a 1% roztok L-cysteinu. Kritériem pro výběr vhodného předredukčního činidla byly naměřené koncentrace v referenčním materiálu jahodového listí. Kombinace KI a askorbové kyseliny poskytovala nejlepší shodu výsledků s certifikovanou hodnotou, a proto byla použita pro analy-

zu reálných vzorků. Předredukce mineralizovaných a do sucha odpařených vzorků byla prováděna následujícím způsobem: do 10ml odměrné baňky se ke 3 ml vzorku přidalo 3 ml koncentrované HCl a 4 ml redukčního činidla, takto upravený vzorek se před analýzou nechal stát hodinu při laboratorní teplotě. Stejným způsobem byla prováděna předredukce kalibračních standardů.

Stanovení arsenu v reálných vzorcích

Pro každý studovaný druh ořechu byla provedena analýza 8–10 vzorků. Arsen byl stanoven v jednotlivých částech – skořápce, slupce a jádře. Statistické zpracování naměřených hodnot v jednotlivých částech ořechů bylo vzhledem k nízkému počtu hodnot ($n = 8–10$) provedeno Hornovým postupem analýzy malých výběrů⁸. Získaná data pro obě atomizační techniky shrnuje tab. II. Arsen nepatří mezi běžně stanovené prvky v ořechích a to znemožňuje srovnání s literárními údaji, kde jsou práce věnující se minerálnímu složení ořechů zaměřeny zejména na makro a výjimečně i některé mikroprvky. Na spolehlivost prezentovaných dat lze tedy usuzovat jen ze získaných validačních dat a analýzy referenčního materiálu. Množství arsenu v různých částech ořechů naměřeného metodou HG-AAS se převážně shodovalo s hodnotami, které byly získány měřením metodou ETA-AAS. Statistickým testováním shodnosti na hladině významnosti $\alpha = 5 \%$, byla potvrzena shoda mezi výsledky těchto dvou atomizačních technik pro koncentrace arsenu ve skořápkách. U slupky se shoda nepotvrdila pouze pro lísku tureckou, u ostatních ořechů byla potvrzena.

Verifikace metody a odhad nejistoty

Pro techniku elektrotermické atomizace byla preciznost vypočtena jako relativní směrodatná odchylka z 8 nezávislých měření referenčního materiálu a činila 8,4 %, což lze pro elektrotermickou atomizaci považovat za uspo-

Tabulka II

Intervalové odhady koncentrací As v analyzovaných vzorcích určené analýzou malých výběrů (mg kg^{-1})

Druh ořechu	Atomizační technika	Skořápka	Slupka	Jádro
Líska obecná	ETA	$0,04 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,08$	< LOD ^a
	HG	$0,02 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,04$	$0,04 \pm 0,01$
Líska turecká	ETA	$0,04 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,05$
	HG	$0,06 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$
Podzemnice olejná	ETA	$0,20 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,26$	< LOD
	HG	$0,23 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,32$	$0,04 \pm 0,04$
Vlašský ořech	ETA	$0,04 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$	< LOD
	HG	$0,03 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$

^a LOD – mez detekce

kojivý výsledek. Pravdivost techniky byla obdobně vyhodnocena z 8 vzorků referenčního materiálu. Průměrná hodnota měření byla $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ a směrodatná odchylka činila $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$. Naměřená koncentrace arsenu v referenčním materiálu se pohybuje v intervalu rozšířené kombinované nejistoty certifikované hodnoty. Přítomnost vychýlení byla ověřována testem výtěžnosti, při kterém bylo provedeno 6 měření s přidavkem známé koncentrace As ke vzorkům referenčního materiálu. Průměrná výtěžnost dosáhla 89,8 % se směrodatnou odchylkou 1,5 %. Mezilehlá preciznost této atomizační techniky byla určena jako relativní směrodatná odchylka ze 35 měření referenčního materiálu v průběhu 9 měsíců a činí 10,3 %.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vyhodnoceny přímou metodou analytu z kalibrační závislosti v programu QC Expert 3.1 a dosáhly hodnot $1 \text{ } \mu\text{g As}$ v kg sušiny a $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. V používaném rozsahu koncentrací 2–10 mg l^{-1} byla ověřena linearita kalibrační závislosti.

Pro zjištění preciznosti u techniky generování hydridů bylo provedeno 8 analýz referenčního materiálu (včetně rozkladu a předredukce) a preciznost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka činila 3,9 %. Pravdivost techniky byla určena stejně jako u techniky ETA-AAS z 8 analýz referenčního materiálu. Průměrná hodnota arsenu dosahovala $0,24 \text{ mg kg}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$. Stejně jako ETA-AAS poskytuje HG-AAS pravdivé výsledky, naměřené hodnoty se pohybují v intervalu rozšířené kombinované nejistoty certifikované hodnoty. Přítomnost vychýlení byla ověřována testem výtěžnosti, při kterém bylo provedeno 6 měření s přidavkem známé koncentrace As ke vzorkům referenčního materiálu. Průměrná výtěžnost dosáhla 93,5 % se směrodatnou odchylkou 2,1 %. Mezilehlá preciznost určena jako relativní směrodatná odchylka ze všech měření referenčního materiálu ($n = 29$) v průběhu 9 měsíců vyjádřena v procentech činí 5,4 %.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny při-

mou metodou analytu z kalibrační závislosti v programu QC Expert 3.1 a dosáhly $0,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ a $0,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Při vyhodnocování koncentrací v neznámých vzorcích byla používána kvadratická kalibrační závislost.

Odhad standardní kombinované (u_c) a rozšířené nejistoty stanovení arsenu technikami ETA-AAS a HG-AAS byl proveden metodikou „shora dolů“ s využitím všech výsledků analýz referenčního materiálu a modifikovaného postupu pro kvantifikaci nejistot v environmentálních laboratořích publikovaného v technické zprávě 537 NORD-TEST⁹. Standardní kombinovaná nejistota byla získána propagací dvou základních složek: nejistoty certifikované hodnoty koncentrace referenčního materiálu ($u(c_{RM})$) a nejistoty vychýlení ($u(odchylka)$) zjištěné z opakovaných měření tohoto referenčního materiálu. Obě složky nejistoty byly převedeny na směrodatné odchylky, zpropagovány a vynásobeny koeficientem pokrytí $k = 2$ pro výpočet rozšířené nejistoty.

$$u_c = \sqrt{s(RM)^2 + u(odchylka)^2} \quad (1)$$

$$u(odchylka) = \sqrt{odchylka^2 + \left(\frac{s(RM)}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(c_{RM})^2} \quad (2)$$

kde u_c je kombinovaná standardní nejistota, $s(RM)$ výběrový odhad směrodatné odchylky opakovaných měření RM, $u(c_{RM})$ standardní nejistota RM (z certifikátu), $odchylka$ rozdíl průměru opakovaných měření RM a certifikované hodnoty.

Pro techniku ETA-AAS byla standardní kombinovaná nejistota 18,3 % a rozšířená nejistota 36,6 %. U techniky HG-AAS byla získána hodnota standardní kombinované nejistoty 12,6 % a hodnota rozšířené nejistoty byla 25,2 %. Z propagovaných složek nejistoty má vyšší hodnotu nejistota certifikované hodnoty koncentrace arsenu v referenčním materiálu.

Závěr

V naší práci se podařilo optimalizovat a verifikovat (validovat v omezeném rozsahu) metodu pro stanovení stopových množství arsenu v biologických vzorcích. Kombinovaná rozšířená nejistota se podle atomizační techniky pohybuje v intervalu 25–35 %. Technika elektrotermické atomizace svými detekčními limity postačuje stanovení arsenu ve skořápkách a slupkách studovaných ořechů, pro některá jádra není dostačující. Časově náročnější technika hydridové generace umožňuje vzhledem ke svým detekčním limitům stanovení arsenu ve všech částech ořechů. Nejvyšší koncentrace arsenu byly nalezeny ve slupkách ořechů a nejnižší v jejich jádrech. Podobné rozložení bylo nalezeno i pro ostatní těžké kovy¹⁰ a pravděpodobně svědčí o ochranném mechanismu rostlin, který brání distribuci toxických kovů do jádra (tj. části, která slouží k rozmnožování).

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu v rámci projektu MSM6198959216.

LITERATURA

1. Frank J., Krachler M., Shotyk W.: *Anal. Chim. Acta* 530, 307 (2006).
2. Soudek P.: *Chem. Listy* 100, 323 (2006).
3. Welz B., Sperling M.: *Atomic Absorption Spectrometry*, 3. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 1999.
4. Száková J., Mihaljevič M. a Tlustoš P.: *Chem. Listy* 101, 397 (2007).
5. Hagarová I.: *Chem. Listy* 101, 768 (2007).

6. Mays D. E., Hussam A.: *Anal. Chim. Acta* 646, 6 (2009).
7. Maihara V. A., Moura P. L., Catharino M. G., Castro L. P., Figueira R. C. L.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 278, 395 (2008).
8. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*. Academia, Praha 2004.
9. Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M.: *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*. Nordtest Report TR 537, Espo 2004.
10. Jánošová M.: *Diplomová práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2005.

D. Milde and A. Linhartová (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Determination of Arsenic in Nuts by AAS – Method Verification and Uncertainty Estimation**

This work focuses on optimisation of arsenic determination in nuts by AAS and in-house validation including the estimation of uncertainty using the top-down approach. All samples were digested by microwave mineralisation prior to analysis. Optimisation of conditions for electrothermal atomization (temperature program, modifiers, radiation source) and hydride generation (reduction reagent, atomization temperature) was performed. Both techniques were subsequently applied to determination of As in different parts of several types of nuts. The results of the in-house validation and uncertainty estimation obtained by analysis of certified reference materials are shown.

ERRATA

V Chemických listech 07/2011 na str. 538 byl uveden nesprávný název instituce autorů. Na tomto místě uveřejňujeme správné znění:

OPTIMALIZACE STANOVENÍ STOPOVÝCH KONCENTRACÍ JODU V POVRCHOVÝCH VODÁCH METODOU ICP-MS

**MARTIN ŠEDA^a, JAROSLAV ŠVEHLA^a, JAN
TRÁVNÍČEK^a, VLASTA KROUPOVÁ^a, KAREL
FIALA^b a MARIE SVOZILOVÁ^b**

^a Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice,

^b Agrovýzkum Rapotín s.r.o.

svehla@zf.jcu.cz, m_seda@centrum.cz