VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI STANOVENÍ GERMANIA V POTRAVINÁCH

ANALYSIS OF GERMANIUM IN FOOD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE PETRA MUSILOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2009

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0360/2008**	Akademický rok:	**2008/2009**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Petra Musilová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)		
Vedoucí bakalářské práce:	**Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**		
Konzultanti bakalářské práce:			

Název bakalářské práce:

Možnosti stanovení germania v potravinách

Zadání bakalářské práce:

Vypracování literární rešerže o výskytu Ge v potravinách a o možnostech stanovení tohoto prvku různými analytickými metodami.

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

- -	- -	- -
Petra Musilová Student(ka)	Ing. Pavel Diviš, Ph.D. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

- -
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce pojednává o chemických, fyzikálních a léčebných vlastnostech germania. Jsou zde také popsány vhodné analytické metody pro stanovení germania.

ABSTRACT

This bachelor‘s thesis deals with chemical, physical and medical characteristics of germanium. It also describes suitable analytical methods for determination of germanium.

KLÍČOVÁ SLOVA

Germanium, ICP-OES, ICP-MS

KEYWORDS

Germanium, ICP-OES, ICP-MS

MUSILOVÁ, P. Možnosti stanovení Ge v potravinách. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Děkuji tímto mému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za poskytnuté připomínky a rady při vypracování této práce.

OBSAH

1. ÚVOD 9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 10
2. 1 Germanium 10
2. 1. 1 Historie 10
2. 1. 2 Fyzikální vlastnosti germania 10
2. 1. 3 Chemické vlastnosti germania 11
2. 1. 4 Sloučeniny germania 11
2. 1. 5 Výroba germania 14
2. 2 Germanium a zdraví 15
2. 2. 1 Toxicita germania 15
2. 2. 1. 1 Toxické účinky na lidský organismus 16
2. 2. 1. 2 Toxické účinky na zvířata 17
2. 3 Germanium jako polovodič 18
2. 4 Germanium v potravinách 18
2. 4. 1. Potravinové doplňky s obsahem Ge a jejich bezpečnost 20
2. 5 Metody stanovení germania 22
2. 5. 1 Všeobecné požadavky na metody ultrastopové analýzy 22
2. 5. 2 Rozklad vzorků 23
2. 5. 2. 1 Suchý rozklad 24
2. 5. 2. 2 Mokrý rozklad 25
2. 6 Vhodné metody pro stanovení germania 25
2. 6. 1 ICP-OES 26
2. 6. 1. 1 Charakteristika ICP-OES 26
2. 6. 1. 2 Princip ICP-OES 26
2. 6. 1. 3 Transport vzorku do plazmatu 27
2. 6. 1. 4 Odečtení emisních spekter 27
2. 6. 1. 5 Spektrální rozklad emitovaného záření 27
2. 6. 1. 6 Detektory 28
2. 6. 2 ICP-MS 29
2. 6. 2. 1 Charakteristika ICP-MS 29
2. 6. 2. 2 Princip ICP-MS 30
2. 6. 2. 3 Transport vzorku do plazmatu 30
2. 6. 2. 4 Omezující faktory 31
2. 6. 2. 5 Využití ICP-MS 31
2. 6. 3 AAS 35
2. 6. 3. 1 Charakteristika AAS 35
2. 6. 3. 2 Princip AAS 35
2. 6. 3. 3 Technický popis zařízení 35
2. 6. 3. 4 Transport vzorku do měrné cely 36
2. 6. 3. 5 Zdroje záření 37
2. 6. 3. 6 Atomizace vzorku 38

3. ZÁVĚR.....41
4. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 42
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....46

1. ÚVOD

Anorganické germanium je nezbytný prvek podobně jako železo nebo vápník. Je obsaženo v malém množství v mnoha rostlinách a v zemské kůře. Mendělejev v roce 1871 poprvé představil existenci germania. V roce 1886 Clemens A. Winkler, izoloval tento prvek z minerálu argyroditu a nazval ho na počest své vlasti Německa (latinsky Germania). Jeho vlastnosti jsou důležité pro elektrotechnický průmysl. V roce 1948 bylo germanium použito jako polovodič v tranzistorech a později v počítačových čipech. Současné studie ukázaly, že germanium je důležité pro lidský organismus. Lékaři a výzkumníci se snaží potvrdit, že germanium má podobné účinky jako selen a může mít význam jako nutriční doplněk.

Pro koncové stanovení germania se používají metody atomové nebo molekulové spektrometrie.

Germanium lze stanovit pomocí např. emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), atomové absorpční spektrometrie (ASS), případně absorpční spektrometrii v UV – VIS oblasti.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2. 1 Germanium

2. 1. 1 Historie

Existenci germania předpokládal už J. A. R. Newlands (1864). [1]
Chemické vlastnosti germania představil D. I. Mendělejev (1871). [2]

V roce 1886 Clemens A. Winkler, izoloval tento prvek z minerálu argyroditu a nazval ho na počest své vlasti Německa (latinsky Germania).[1]

2. 1. 2 Fyzikální vlastnosti germania

Germanium je křehká, tmavě šedá látka krystalizující v kubické soustavě (podobně jako diamant). Germanium je typickým polovodičem s nízkou elektrickou vodivostí, která závisí na teplotě.

V pevném skupenství se germanium chová jako polovodič, a to jak v krystalické tak v amorfní fázi. Naproti tomu v kapalném skupenství je germanium kovem.

Atomová hmotnost germania - Ge - je 72,59, elektronegativita 2,0, měrná hmotnost 5,323 g/cm^3, teplota tavení 937,4°C, teplota varu 2 830°C.[1,6,10,24]

Obrázek číslo 1 – Germanium

2. 1. 3 Chemické vlastnosti germania

Germanium je reaktivnější a elektropozitivnější než křemík. Vytváří sloučeniny v mocenství: Ge^{-4}, Ge^{+2} a Ge^{+4} .

S chlórem a fluórem reaguje za normální teploty, s párami síry tvoří GeS. Po mírném zahřátí Cl_2 a Br_2 vzniká chlorid germaničitý ($GeCl_4$) a bromid germaničitý ($GeBr_4$). Se zahřátým germaniem reagují alkylhalogenidy za vzniku organogermaničitých halogenidů.

Germanium netvoří karbidy, a proto se může tavit v grafitových kelímcích.

Pokud není přítomno oxidační činidlo, nereaguje s vodou ani se zředěnými kyselinami a alkalickými hydroxidy. Na vzduchu se oxiduje na oxid germaničitý (GeO_2) za vzniku červeného žáru. Rozpouští se v horké koncentrované kyselině sírové a kyselině dusičné:

$Ge + 2H_2SO_4 \rightarrow GeO_2 + 2SO_2 + 2H_2O$

$Ge + 4HNO_3 \rightarrow GeO_2 + 4NO_2 + 2H_2O$ **1,5,7**

2. 1. 4 Sloučeniny germania

Germanium je v zemské kůře značně vzácným prvkem. Průměrný obsah činí pouze 5 - 7 ppm (mg/kg). V mořské vodě je jeho koncentrace mimořádně nízká, pouze 0,07 mikrogramu germania v jednom litru. Předpokládá se, že ve vesmíru připadá na jeden atom germania přibližně 30 milionů atomů vodíku.

V horninách se vyskytuje vždy pouze jako příměs v rudách zinku a stříbra, ale bývá obsaženo jako stopová příměs v mnoha ložiscích uhlí. Z minerálů se velmi vzácně setkáme se směsným sulfidem, stříbra a germania *argyroditem* o složení $Ag_8Ge\ S_6$.**1,2,5,6**

German (germanovodík, GeH_4)

Připravuje se reakcí chloridu germaničitého s tetrahydridohlinitanem litným:

$GeCl_4 + LiAlH_4 \rightarrow GeH_4 + LiAlCl_4$ nebo reakcí oxidu germaničitého (GeO_2) s tetrahydridoboritanem sodným ($NaBH_4$). Germany jsou méně těkavé než silany. Na rozdíl od SiH_4 a SnH_4 v kontaktu se vzduchem nevzplane. Je netečný k vodným roztokům kyselin nebo 30 % vodného roztoku hydroxidu. V kapalném NH_3 vystupuje jako kyselina za tvorby iontů NH_4^+ a GeH_3^-. Reaguje v něm s alkalickými kovy za vzniku $MgeH_3$ (bílé krystalické látky). Vyšší germany se připravují působením tichého elektrického výboje na GeH_4.

Halogengermany (GeH_xX_{4-x}; X = Cl, Br, I; x = 1, 2, 3)

Jsou to bezbarvé, těkavé reaktivní kapaliny. Připravují se reakcí GeH_4 s HX.

<u>Halogenidy germanaté (GeX_2)</u>

Jsou méně stálé než halogenidy germaničité s redukčními vlastnosti.

Fluorid germanatý (GeF_2)

Připraví se působením fluoridu germaničitého (GeF_4) na práškové Ge při teplotě 150 až 300°C. Je to těkavá bílá látka.

Chlorid germanatý ($GeCl_2$)

Vzniká vedením par chloridu germaničitého ($GeCl_4$) přes zahřáté kovové germanium: $GeCl_4 + Ge \rightarrow 2GeCl_2$. Je to pevná látka, která je velmi citlivá k vlhkosti a vzdušnému kyslíku. Reaguje s vodou za vzniku kyseliny chlorovodíkové $GeCl_2 + H_2O \rightarrow GeO + 2HCl$ a s kyslíkem za vzniku oxidu germaničitého a chloridu germaničitého $2GeCl_2 + O_2 \rightarrow GeO_2 + GeCl_4$. Za chladu je téměř bezbarvý a zahříváním se barví oranžově. Při 313 K se slučuje s plynným HCl na trichlorgerman ($GeHCl_3$). Trichlorgerman je bezbarvá dýmající kapalina.

Bromid germanatý ($GeBr_2$)

Připravuje se redukcí bromidu germaničitého ($GeBr_4$) zinkem (Zn) nebo působením přebytku bromovodíky na germanium při 400°C. Je to pevná žlutá látka, která se rozpouští v lihu a acetonu. Při 150°C disproporcionuje na Ge a $GeBr_4$: $2GeBr_2 \rightarrow Ge + GeBr_4$. Hydrolyzuje se na žlutý hydroxid germanatý: $GeBr_2 + 2H_2O \rightarrow Ge(OH)_2 + 2HBr$.

Jodid germanatý (GeI_2)

Připravuje se redukcí jodidu germaničitého (GeI_4) vodným roztokem kyseliny trihydrogenfosforné (H_3PO_2) v přítomnosti HI, které brání hydrolýze. Sublimací se získávají jasně oranžové krystaly, které jsou na suchém vzduchu stálé.

<u>Halogenidy germaničité (GeX_4)</u>

Připravují se přímou reakcí prvků nebo působením vodného roztoku halogenidu (HX) na oxid germaničitý (GeO_2). Halogenidy germaničité snadno hydrolyzují.

Fluorid germaničitý (GeF_4)

Vzniká reakcí oxidu germaničitého s kyselinou fluorovodíkovou: $GeO_2 + 4HF \rightarrow GeF_4 + 2H_2O$. Je to plynná a jedovatá látka. Silným ochlazením se kondenzuje na bílou vločkovitou látku, která při zahřátí sublimuje, aniž by tála. Vodou hydrolyzuje na oxid germaničitý a kyselinu hexafluorogermaničitou: $2GeF_4 + 2H_2O \rightarrow GeO_2 + H_2[GeF_6] + 2HF$.

Chlorid germaničitý ($GeCl_4$)

Je to bezbarvá kapalina: $Ge + 2Cl_2 \rightarrow GeCl_4$. Důležitý meziprodukt při přípravě organogermaničitých sloučenin.

Bromid germaničitý ($GeBr_4$)

Tvoří bezbarvé krystalky.

Jodid germaničitý (GeI_4)

Tvoří oranžové krystalky, které se vodou rozkládají mnohem prudčeji než chlorid a proto na vzduchu silně dýmají.

Sulfidy

Sulfid germanatý (GeS)
Připravuje se redukcí sulfidu germaničitého (GeS_2) kyselinou trihydrogenfosfornou (H_3PO_2). Tepelně nejstálejší sloučeninou GeII. Ve vodě je nerozpustný.

Sulfid germaničitý (GeS_2)
Připravuje se přímým slučováním prvků nebo působením sirovodíku na okyselený roztok germaničitanu. Je to ve vodě nerozpustná bílá látka, která se nehydrolyzuje. Rozpouští se v roztocích alkalických sulfidů za vzniku trigermaničitanů: $GeS_2 + Na_2S \rightarrow Na_2GeS_3$ a $GeS_2 + 2Na_2S \rightarrow Na_4GeS_4$.

Oxidy

Oxid germanatý (GeO)
Připravuje se zahříváním směsí práškovitého Ge a GeO_2 za teploty 1000°C. Je to žlutá, snadno sublimující látka. Zahříváním žlutého GeO se získá tmovohnědý GeO. Obě formy GeO mají redukční schopnosti a nad 700°C disproporcionují na Ge a GeO_2 $2GeO \rightarrow Ge + GeO_2$.

Oxid germaničitý (GeO_2)
Připravuje se žíháním germania nebo redukcí germania koncentrovanou kyselinou dusičnou: $Ge + 4HNO_3 \rightarrow GeO_2 + 4NO_2 + 2H_2O$. Je to bílá tuhá látka, která je ve vodě málo rozpustná. Reaguje se zásaditějšímu oxidy – vznikají germaničitany:
$GeO_2 + CaO \rightarrow CaGeO_3$ – germaničitan vápenatý
$2Li_2O + GeO_2 \rightarrow Li_4GeO_4$ – germaničitan tetrahlinitý
$Na_2O + 2GeO_2 \rightarrow Na_2Ge_2O_5$ – digermaničitan disodný **1,5,6,8,10**

Germanit ($Cu_{13}Fe_2Ge_2S_{16}$ – Cu 51,76 %; 7,00 %; Ge 9,10 %; S 32,14 %)
Bledý prošedivělý, až růžový minerál s tvrdostí 4, který byl objeven roku 1922. Typické oblasti výskytu jsou Argentina, Kongo, Finsko, Francie, Řecko, Namíbie a Rusko.

Renierit $(Cu, Zn)_{11}(Ge, As)_2Fe_4S_{16}$ – Zn 21,72 %; Fe 13,49 %; Cu 24,95 %; Ge 6,58 %; As 2,26 %; S 30,99 %)
Bronzově žlutý, kaštanově hnědý až zčernale šedý s tvrdostí 4 až 5. Typické oblasti výskytu jsou Argentina, Rakousko, Bulharsko, Kongo, Francie, Itálie, Kazachstán, Namíbie a Rusko.

Germanocolusit $Cu_{26}V_2(Ge, As)_6S_{32}$
Tvrdost minerálu je 4,5 až 5. Minerál byl objeven v roce 1992. Typické oblasti výskytu jsou Kazachstán, Namíbie a Rusko.

Colusit $Cu_{12\text{-}13}V(As,Sb,Sn,Ge)_3S_{16}$
Jako bronz zbarvené, kovové čtyřúhelníkové krystaly v bílém mramoru. Typická oblast výskytu USA (Leonardovy doly v Montaně), Itálie (Val Bona, Carrara).

Polkovicit $(Fe,Pb)_3(Ge,Fe)_{1-x}S_4$

Šedý až hnědý s tvrdostí 3 až 4, který byl objeven roku 1975. Typická oblast výskytu je Polsko (Lower Silesia, Legnica, Lubin-Sieroszowice, Polkowice).

Morozeviczit $(Pb,Fe)3Ge_{1-x}S_4$

Šedý až hnědý s tvrdostí 3 až 4, který byl objeven roku 1975. Typická oblast výskytu je Polsko (Lower Silesia, Legnica, Lubin-Sieroszowice, Polkowice).[19,21]

Argyrodit

Vzácný minerál ze skupiny solí sirných, krystalizuje v osmistěnech nebo dvanáctistěnech kosočtverečných, často srostlých dvojčatně podle plochy oktaédru. Jest vidu kovového, černý neb ocelově šedý, naběhlý narudle nebo fialově, na vrypu šedočerný. Tvrdost 2-3, hustota 6,1-6,3. Jest sulfogermsnát stříbrnatý se 76,53% stříbra, 6,42 germania, 17,05 síry, obsahuje přimíšeno též něco rtuti a železa. Vyskytuje se u Freiberka v Sasku a Potosi v Bolivii a jest památný tím, že v něm roku 1886 Cl. Winkler objevil nový prvek germanium, Mendělejevem předpověděné ekasilicium. Fr. Sl-k.[18]

2. 1. 5 Výroba germania

Jediné průmyslově využívané ložisko germanitu je v Kongu (Kinshassa), které patří k nejbohatším zdrojům germania na světě. Hlavními zdroji výroby germania jsou však meziprodukty při výrobě zinku a popely po spalování některých druhů uhlí. Například uhlí z plzeňské pánve obsahuje 20 až 70 g Ge v 1 tuně.

Zdroj pro výrobu germania může vznikat při zpracování výchozích surovin zinku. Germanium se koncentruje nejvíce do prachů, zbytků z retort a do louženců. Tyto suroviny se zpracovávají na germanium takto: Rozpustí se v kyselině sírové a ze získaných roztoků se vycementují zinkovým prachem Cu, Ge a As. Sráž se znovu rozpustí v kyselině sírové a cementace se opakuje. Druhá sráž obsahuje asi 7 % Ge. Z tohoto koncentrátu se získá germanium jako těkavý chlorid $GeCl_4$. Spolu s $GeCl_4$ destiluje též $AsCl_3$, který se odstraňuje z destilátu v rektifikačni koloně. Čistý $GeCl_4$ se hydrolyzuje na $GeO_2.xH_2O$, který se po filtraci při teplotě 150 až 200°C zbavuje vody a přechází na bezvodý kysličník GeO_2.

Dalším zdrojem germania jsou popely a prachy vznikající při spalováni uhlí -germanium se vyrábí z popílku kotlů s pásovými rošty. Germanium se koncentruje do jemných podílů popílku, který se zachycuje elektrostatickými odlučovači. Pohybuje-li se výchozí obsah v uhlí mezi 30 a 60 g Ge/t, lze tímto způsobem získat popílek obohacený na 0,5 až 1 % Ge. Germanium je v popílku vázáno převážně v rozpustné formě, takže z něho lze oddělit chlorid germaničitý $GeCl_4$ destilaci z prostředí 9 N kyseliny chlorovodíkové. Před vlastni destilaci se germanium zkoncentruje do poletavého prachu přetavením popílku v cyklónové peci, čímž se dosahuje 10 až 15násobného obohaceni při vysoké loužitelnosti kyselinou solnou.

Z promytého a vysušeného kysličníku se vyrobí kovové germanium redukci vodíkem při teplotě 600 až 700 °C. Redukuje se v elektrické peci vodíkem, bez obsahu kyslíku.

Vyrobené kovové germanium se musí dále čistit zónovou rafinaci tak, aby celkové množství nečistot nepřesáhlo 10-5 %.

Zónová rafinace je v podstatě frakční krystalizace z taveniny. Germanium, uložené v grafitové nebo křemenné lodičce a umístěné v křemenné trubce, se buď ve vakuu, nebo vodíku roztavuje topným článkem tak, aby žárová zóna tavení postupovala rychlostí několika cm/h. Atomy germania začnou krystalovat, zatímco většina nečistot zůstává v tavenině a pohybuje se spolu se žárovou zónou. Pro ohřev se používá vysokofrekvenčního ohřevu.

V zónově rafinované tyči germania jsou nečistoty pouze v okrajích, a ty se pak odříznou. Opakováním zónové rafinace (6 až 10krát) se získá germanium, kterého se používá k tažení germaniových monokrystalů. Ty byly základem pro výrobu polovodičových prvků.

Další metodou získávání vysoce čistého germania je frakční destilace těkavého chloridu germaničitého $GeCl_4$.[7]

2. 2 Germanium a zdraví

2. 2. 1 Toxicita germania

Běžné sloučeniny germania zřejmě nejsou toxické. Oxid germaničitý a sulfid germaničitý jsou málo rozpustné. Některé sloučeniny germania mají schopnost komplexovat cukry. Germanovodíky jsou považovány za nebezpečné jedy, které mohou způsobovat hemolýzu krve. [11]

Aby bylo možno toxicitu měřit a srovnávat, byla zavedena speciální stupnice označovaná zkratkou LD (z anglického Lethal dose - smrtelná dávka). Nejčastěji je možno setkat se s variantou LD_{50}. Podle Asaie je organická forma germania velmi bezpečná. LD_{50} pro germanium, jak bylo testováno na zvířatech, je 10 g/kg živé váhy. Vědečtí odborníci předložili výsledky analýz zkušebních testů na zvířatech, které dokazovaly, že organicky vázané germanium je bezpečné pro člověka dokonce v desítkách gramů denně. První test potvrzující bezpečnost germania byl proveden v šedesátých letech 20. století. Kromě toho u germania nebyla prokázána žádná karcinogenita.

Klinické efekty a bezpečnost organicky vázaného germania potvrdil Asai mnoha pokusy. Výzkum byl prováděn na akutní a chronickou toxicitu. Tato zpráva ukazuje, že organicky vázané germanium nemá žádné toxické vlastnosti ani v extrémně vysokých dávkách, což potvrzují i práce uveřejněné v japonském časopise Pharmacometrics. Germanium bylo z organismu vyloučeno přes zažívací ústrojí během 20 až 30 hodin.

Anorganicky vázané germanium je stabilní proti vyšší teplotě, vlhkosti a světlu. Při aplikaci výživové terapie nejsou vedlejší účinky závazné a zmizí při zastavení dávkování. Nepatrné zarudnutí a vyrážky kůže se vyskytují jen asi u 2 % pacientů.

Vyrážka po ošetření germaniem představuje tělesnou reakci vyvolanou působením germania, protože kůže je významný detoxikační orgán. Výrobci testující sloučeniny organicky vázaného germania ve svých laboratořích před uvedením do distribuce pro výrobu potravinových doplňků z hlediska čistoty na 99,999 % hladině čistoty.[12]

Potravinové doplňky obsahují organicky vázané germanium musí být opatřeny atestem, popřípadě potvrzením příslušného orgánu o zdravotní nezávadnosti. V České republice v současné době nejsou doplňky organicky vázaného germania povolené.

2. 2. 1. 1 Toxické účinky na lidský organismus

Tabulka 1 – Údaje o toxicitě germania na člověka.

Předmět	Koncový bod	Dávka	Délka	Celková dávka	Poznámka
5 případů	Ledvinová dysfunkce	-	4 – 6 měsíců	42 – 59 do 240 – 250 g GeO_2	**32**
18 případů	Ledvinové selhání	-	4 – 36 měsíců	16 – 328 g Ge	Sloučeniny organicky vázaného germania **33**
5-letý chlapec	Mnohonásobné selhání orgánů	30 – 70 mg/den	24 měsíců	21, - 51,1 GeO_2 (15,2 – 35,5 g Ge)	**34**
25-letý muž	Totální ledvinové selhání	50 – 350 mg/den	8 měsíců	30 g GeO_2 (20,84 g Ge)	[35]
36-letý muž	Selhání ledvin	70 – 140 mg/den	13 měsíců	40 g GeO_2 (27,78g Ge)	[35]
Dospělá žena	Ledvinové poškození	250 mg/den laktát – citrát germanium	12 roky	32,1 g Ge	[36]
43-letá žena	Totální prudká mléčná acidóza	2,25 g laktát – citrát germanium	2 měsíce	25 g Ge	[37]
55-letá žena	Totální selhání ledvin	-	19 měsíců	47 g Ge	Neznámá směs [38]
63-letá žena	Ledvinové selhání, vnější neuropatie, anorexie, zvracení, zánět plic a úmrtí	36 mg/den	6 roků	78,84 g Ge	[39]

2. 2. 1. 2 Toxické účinky na zvířata

Tabulka 2 – Údaje o toxicitě germania na zvířata

Předmět	Koncový bod	Dávka	Délka	NOAEL/LOAEL	Poznámka
kuřata	Zmenšené přežití ve skupině – 1000 ppm. Zvětšený růst ve skupině – 10 ppm, ale zmenšený výkon ve vyšších dávkách	1 – 1000 ppm Ge v pitné vodě		10 mg/kg Ge	[40]
krysy	Redukované přežití	10, 100 nebo 1000 mg/kg germaničitan sodný ve stravě nebo vodě	4 týdny	NOAEL = 10 mg/kg	[41]
Skupina 5 samic krys Wistar	Hromadění Ge v ledvinách, patologické poškození ledvinové tkáně	150 mg/kg GeO_2 nebo 240 mg/kg Ge - 132	10 týdnů	LOAEL (GeO_2) = 150 mg/kg NOAEL (Ge – 132) = 240 mg/kg	[33]
Skupina 30 krys Wistar	Zmenšená tělesná váha, mírná ledvinová dysfunkce	1 g/den Ge - 132	6 měsíců	LOAEL = 1 g/den	[42]
Krysy Wistar	Efekty: fibróza a buněčný průnik se stal zřetelný v GeO_2 skupině	150 mg/kg GeO_2 nebo 240 mg/kg Ge – 132	24 týdnů + 16 týdnů na zotavení	-	[43]
Samec krysy Lewis	Ztráta hmotnosti, zvětšení váhy orgánů. Zvýšení boichemických ukazatelů pro dysfukční ledvinové změny	150 mg/kg GeO_2	13 týdnů nebo 4 týdny zotavení	LOAEL = 150 mg/kg	[44]
Švýcarské myši	Redukce tělesné hmotnosti, snížení nádorů u šetřených zvířatech	5 µg/l Ge jako germaničitan sodný v pitné vodě (1,92 µg Ge/kg/den)	Střední délka života	LOAEL	[45]

2. 3 Germanium jako polovodič

Podle chemického složení rozlišujeme polovodivé prvky (Ge, Si, Se) a polovodivé sloučeniny (dvousložkové – binární, např. GaAs a trojsložkové – ternární).

Podle struktury dělíme polovodiče na krystalické (Ge, Si) a amorfní (oxidy, sulfidy, atd.).

V praxi mají největší význam krystalické polovodiče, přesněji řečeno jejich monokrystaly. [14]

Dodá-li se většinou čtyrmocnému základnímu materiálu (např. germanium) pětimocný prvek, dochází v elektrickém poli k předávání elektronů do základního materiálu, a vzniká tím elektrický proud. [46]

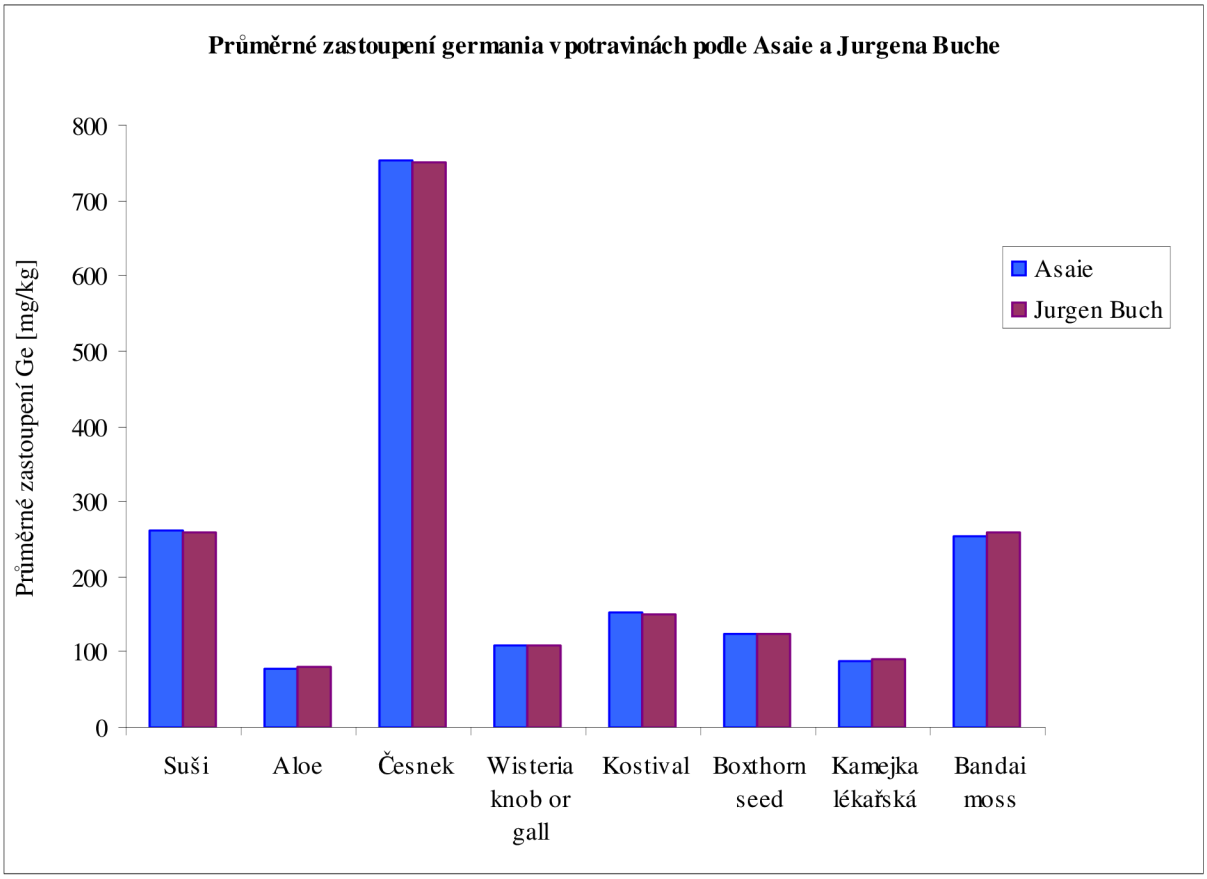
2. 4 Germanium v potravinách

Organické germanium (jež bylo nalezeno v některých vzorcích česneku česneku, řeřiše, ječmenu, aloe, ženšenu, ginsengu), pomáhá okysličovat mozkové buňky, odstraňuje odpadní vodík. Výborný detoxikant - váže se s jedovatými kovy jako je rtuť, olovo, chlorované bifenyly a společně s jedy se do 24 hodin vyloučí. Germanium v organické formě (v kombinaci s Bis-Carboxyethylem v základu echinacea) je nejmocnější imunitní stimulační látka, která odstraňuje i viry a bakterie (například chřipky, salmonely...). Podle výzkumných zpráv tento prvek napomáhá také při léčbě rakoviny, artritidy, poruch žláz s vnitřní sekrecí... Germanium, jako polovodičový prvek, dokonce uvolňuje v těle specifické elektrické proudy, které napomáhají k hojení ran či zlomenině kostí nastavením "rovnovážného stavu tělní elektřiny". Doporučená dávka je 25-30 mg denně. (Pro odstranění nemoci se bere 1 až 1,5 gramů denně).[15]

Dále jsou uvedeny některé nemoci, při jejichž léčbě bylo pozitivně testováno organicky vázané germanium : rakovina – prostaty, plic, vaječníků, krku, tlustého střeva, prsa, dělohy; leukémie; revmatický zánět a revmatismus; cukrovka; malárie; astma; stařecká osteoporóza; duševní poruchy – depresivní stavy, schizofrenie; zažívací poruchy – zánět žaludku, vředy, chřipka; srdeční poruchy – angína, kornatění cév, mrtvice, infarkt, myokardu; poruchy oběhu – Raynauldova nemoc, Parkinsonova choroba, mozková skleróza; pleťové vyrážky – bradavice, kuří oka, vyrážky, úpal, opary, epilepsie, oční vady.[9]

Shoeder a Balassa publikovali, že germanium je biologicky prakticky všude přítomné v roce 1967. Zkoumali všechny druhy biologického materiálu. Mořské produkty (ústřice, škeble, garnáty, lososy, tuňáky, atd.), maso (kuřecí, hovězí, vepřové, jehněčí), mléčné výrobky, obilí (žito, oves, pšenice), zeleninu (mrkev, brokolici, květák, rajče, papriky, atd.), ořechy, oleje, kočičí krmivo, cigarety (turecké a kanadské) a nápoje (čaj, káva, kakao). Výsledky ukázaly, že germanium bylo přítomné ve většině potravin v stopovém množství. Jen ve škeblích, konzervovaném tuňáku byla průměrná zastoupení vyšší (až 4,67 mg/kg) a Welshova rajčatová šťáva obsahovala více než 2 mg/kg. Pozdější analýzy, používající citlivější metody, potvrdily pouze stopová množství v rostlinách užívaných v ˇčínské medicíně. Výzkumní pracovníci používali bezplamennou AAS kombinovanou s extrakcí organickými rozpouštědly. Tato analýza je citlivější než dříve užívané analýzy Asaiem nebo Schroederem.

Kořen ženšenu vybraný na základě Asaiovy zprávy obsahoval méně než 6mg/kg. Získané výsledky ukazují, že léčivé rostliny obvykle obsahují malé množství germania a naznačují, že nemůže být spojení mezi farmakologickými efekty z léčivých rostlin a obsahem germania. Analytické hodnoty v tomto experimentu byly mnohem nižší než oznámil Asai nebo Schroeder. Metoda používaná Asaiem není blíže specifikovaná. Měření Schroedera byla založena na měření absorpčních spekter s fenylfluoronem jako barevným činidlem. Tato spektrometrie (detekční limit 0,5mg/kg) má nízkou citlivost, takže získané hodnoty 0,1 až 1,0 mg musí být považované za nespolehlivé. Proto by bylo nutné obsah germania v dalších biologických materiálech znovu stanovit citlivější metodou. Zprávy o vysokém obsahu germania v určitých rostlinách a bylinkách, včetně česneku a ženšenu, se začaly objevovat také ve vědeckých časopisech. Výsledky získané Asaiem byly zkorigovány citlivějšími metodami, aby se předešlo chybným informacím, které byly publikovány v médiích. Hodnoty takto získané nepředstavují léčebné dávky, které určil Asai ve své publikaci. [9] Asai předpokládal, že germanium je přítomno v mnoha různých rostlinách, ale množství se liší v závislosti na tom, kde rostliny rostly.[12]



Graf 1 – Průměrné zastoupení germania v potravinách podle Asaie [22] Jurgena Buche, New Hampshire Glowlife Health Seminars.[23]

2. 4. 1. Potravinové doplňky s obsahem Ge a jejich bezpečnost

Bylo už uvedeno, organicky vázané germanium se zdá být poměrně bezpečné. Jediné známé vedlejší účinky po požití organicky vázaného germania jsou menší podráždění kůže potvrzené na 2 až 3 % pacientů a zvýšení tělesné teploty u pacientů se sníženou imunitou. Anorganické formy germania mohou mít toxické účinky. V česneku, ženšenu, aloe a dalších rostlinách jsou poměrně vysoká zastoupení germania. Zastoupení nejsou však tak velká, aby byly účinná na zdravotní lidí. Proto jsou potravinové doplňky s obsahem germania dražší než přirozené výživové zdroje a syntetizované sloučeniny s organicky vázaným germaniem (Ge-132) představují nejlepší zdroje tohoto prvku.

Jako prevence je doporučován denní příjem 25 až 100mg. V případě chronických symptomů virových onemocnění a potravinových alergií, Anderson doporučil svým pacientům 300 až 500 mg denně. Asai často doporučoval svým pacientům, kteří byli vážně nemocní denní dávky 1 až 2g.[9]

Sloučeniny s organicky vázaným germaniem jsou:

Ge – 132

Triviální název ,,Ge - 132‘‘ představuje organokovovou sloučeninu na bázi kyslíku, uhlíku a vodíku sumární vzorec $[(HOOCCH_2CH_2Ge)_2O_3]n$, (bis-carboxyethyl germanium sesquioxide). V roce 1967 byl poprvé syntetizován Asiem. Dnes je nejvíce používanou formou organicky vázaného germania v USA a Japonsku.[20]

Sanumgerman

Triviální název ,,Sanumgerman‘‘ představuje směs laktátu a citrátu germania. Jde o produkt organicky vázaného germania, vyráběný firmou Sanum – Kehlbeck v Německu. Tato společnost udržovala kontakt se společností Asaie, a podílela se na výzkum sloučenin germania více než 10 let.

Zájem o vývoj směsí organicky vázaného germania vzrostl s výzkumem léčby rakoviny. Seeger zkoumal metabolické procesy na buněčné úrovni, které způsobily, že normální buňky se stali rakovinotvorné. Jeho pátrání po elektronových akceptorních látkách, které by vrátily rakovinotvorné buňky do normálu, ho přivedli k Asaiovu organicky vázanému germaniu (Ge-132). Zjistil, že je velmi účinné. Blízký vztah mezi Seegerem a zakladatelem firmy Sanum-Kehlbeck, Heinrichem Kehlbeckem se prohluboval rozsáhlým výzkumem zaměřeným na vývoj účinného organicky vázaného germania v laboratořích Sanum. Sanumgerman byl po 10let velmi užíván lékaři po celé Evropě.

Spirogermanium

Triviálně označovaná látka ,,Spirogermanium‘‘ bylo syntetizováno Rice a spolupracovníky. [13] Patentovaná práva vlastní Unimed Inc., USA. Zjištěná data potvrdily výsledky obdobné jako při testování organicky vázaného germania (Ge – 132 a Sanumgermanu). Tato směs byla

vyvinuta jako forma léku a ne jako nutriční doplněk. Léčivo vykazovalo určitou přechodnou neurológickou toxicitu, což vedlo k pozastavení jeho distribuce. Spirogermanium není v současné době dostupné na trhu.[9]

Obrázek číslo 2 – Germa 100

Obrázek číslo 3 – Ge - 132

Obrázek číslo 4 – Organic Germanium

2. 5 Metody stanovení germania

Položení teoretických základů některých analytických metod a rozvoj instrumentální techniky umožnilo rozvoj souboru analytických metod a zvláštních postupů, které se souhrnně označují jako stopová, případně ultrastopová elementární analýza.

Těmto metodám je společná schopnost detekce a stanovení analytů na velmi nízkých hladinách zastoupení ve sledovaných matricích.

Je zřejmé, že žádná doposud existující a prakticky použivatelná metoda nesplňuje všechny tyto požadavky současně. Jednotlivé vhodné metody se méně či více blíží svými parametry k této ideální představě. Tato kritéria však naznačují trendy, kterými se ubírá a pravděpodobně bude ubírat rozvoj v oblasti instrumentální techniky pro elementární stopovou analýzu.[25]

2. 5. 1 Všeobecné požadavky na metody ultrastopové analýzy

Na posouzení vhodnosti analytické metody na stopovou a ultrastopovou analýzu je nutné jednotlivé metody hodnotit z hlediska určitých kritérií, přičemž je často nezbytný kompromis mezi požadavky a možnostmi, většinou vzhledem na meze detekce, rychlost analýz, koncentrační omezení, variabilita vzorků, skupenský stav, ekonomické relace apod..

Dále je nutno vzít v úvahu selektivitu metody, různorodost zastoupení stanovovaných prvků, náchylnost ke kontaminaci, spolehlivost dosahovaných výsledků a nutnost úpravy vzorků před analýzou.

Spolu s těmito kritérii vystupují do popředí i další neoddělitelné aspekty. Jedním z nich je zabezpečení dostatečné čistoty, jak pracovního prostředí, používaných standardů, pomocných chemikálií, které zahrnují i čistotu vody, tak i vhodných laboratorních materiálů a pomůcek. To co je dostatečně čisté pro jednu metodu, ale nemusí vyhovovat jiné metodě(např. ICP-OES v porovnání s ETA-ASS).[25]

2. 5. 2 Rozklad vzorků

Významnou součástí celého analytického postupu je příprava vzorků k měření. Pro stanovení obsahu prvků je třeba odebrané vzorky před vlastním měřením obvykle vysušit, homogenizovat a převést do roztoku.

Sušení závisí na složení rostlinného materiálu a jeho stabilitě. Velkou opatrnost vyžadují vzorky s vysokým obsahem těkavých aromatických látek a zároveň s vysokou vlhkostí. Nejšetrnější je sušení lehce zakrytých vzorků filtračním papírem na vzduchu, dále lyofilizace nebo sušení za sníženého tlaku. Stanovení vlhkosti se provádí ve zvláštním podílu vzorku za použití lyofilizátoru, vakuové sušárny nebo i laboratorní horkovzdušné sušárny opět se zřetelem na stabilitu materiálu.

Způsob homogenizace je různý podle dalšího postupu zpracování. U zelených částí rostlin je běžné pouze pokrájení nebo nastříhání, obilná zrna nebo semena se mohou použít i celá. Další možností je homogenizace v tříštivých mlýncích nebo mixérech, která se provádí buď u čerstvého materiálu (např. hlízy brambor, houby, apod.) nebo po zmražení či vysušení.

Rozklad vzorků, ať už úplný nebo částečný, je velmi důležitým krokem celého pracovního programu a je dán cílem dalšího zpracování. Pro potřeby některých analytických postupů se provádí postupná extrakce, zejména se zaměřením na sledování biologicky využitelných forem jednotlivých elementů. Pro úplný rozklad je však nutné převést, pokud možno beze ztrát do roztoku, všechny požadované prvky tak, aby před měřením byly uvolněny z různých forem a vazeb. Výhodou je také alespoň částečné odstranění složek osnovy vzorku, které mohou působit rušivě.

Hlavní složkou rostlinného materiálu zůstává organická hmota, k jejíž destrukci je nutné překonat vysoké aktivační energie. Metody rozkladu lze podle postupu rozdělit na tři základní skupiny:

- rozklad na suché cestě
- rozklad na mokré cestě
- ostatní metody rozkladu (pro účely analýzy rostlin se prakticky nevyužívají, mohou však být součástí předchozích postupů)

2. 5. 2. 1 Suchý rozklad

Klasický suchý rozklad probíhá na vzduchu, v otevřeném systému za atmosférického tlaku. Skládá se ze čtyř základních kroků:

- sušení
- zuhelnění
- zpopelnění
- postupná extrakce

Sušení

Způsob sušení závisí na stabilitě materiálu. U některých systémů není nutné provádět sušení předem, dá se využít jako první krok rozkladu vzorku. Pokud je nutné vzorek předsušit, použijeme některý z předchozích uvedených způsobů.

Zuhelnění

Zuhelnění je nekritičtější krokem rozkladu na suché cestě. Vzorek je při něm vystaven teplotám 200 až 400°C, při kterých dochází k silně exotermním rozkladným reakcím organické hmoty. Vzniklé reakční teplo se velmi špatně odvádí z místa svého vzniku, protože matrice vzorku není tepelně vodivá. Velmi podrobně se tímto problémem zabýval Mader a kol., který navrhl převedení fáze zuhelnění na topnou desku a vhodně volený teplotní režim s pozvolným nárůstem teploty maximálně do 360°C. Lze pracovat buď s velmi pomalým nárůstem teploty nebo rychlejší nárůst proložit řadou časových prodlev.[26]

Zpopelnění

Zpopelnění je proces, při kterém se přidává pomocné činidlo. Zpopelnění rostlinných materiálů se obvykle provádí při teplotách 450 – 500°C s ohledem na stanovení těkavých prvků, přičemž se konečné teploty dosahuje opět pozvolným nárůstem. Při cílové teplotě jsou vzorky ponechány 10 až 16 hodin, s výhodou přes noc. Krok zpopelnění je často třeba zopakovat.

Postupná extrakce

Postupná extrakce popela se provádí zředěnými minerálními kyselinami (kyselina dusičná). Účinnost postupné extrakce je možné zvýšit umístěním nádobek s popelem na několik minut do ultrazvukové lázně, případně přidáním malého množství koncentrované HNO_3 v počáteční fázi.

Do pracovního postupu se při klasickém suchém rozkladu téměř vždy zařazuje tzv. pomocné činidlo s oxidačními schopnosti, jehož funkcí je zvýšení účinnosti rozkladu. Pro většinu rostlinných materiálů se používá HNO_3 nebo $Mg(NO_3)_2$, někdy v kombinaci s MgO. Asi polovina postupů aplikuje pomocné činidlo po vysušení vzorku před zuhelňováním – v tomto případě se nejčastěji jedná o několik mililitrů 10% roztoku $Mg(NO_3)_2$. Výhodou tohoto postupu je vznik objemového popela a tím potlačení interakce analytu se stěnami nádoby. Značnou nevýhodou je však významné zkrácení životnosti kyvet při použití ETA AAS. Druhá polovina přidává pomocné činidlo až po skončeném zpopelnění – zde se jedná prakticky výlučně o koncentrovanou HNO_3. Opakovaný krátký krok zpopelnění je pak vlastně oxidačním tavením.

Aplikace kyseliny v této fázi je výhodná i proto, že při ní dochází k prolomení krusty, která se někdy na povrchu vzorku vytvoří a brání přístupu vzdušného kyslíku ze zbytku dosud nerozloženého vzorku.

2. 5. 2. 2 Mokrý rozklad

Klasickým mokrým rozkladem rozumíme působení směsi koncentrovaných minerálních kyselin při atmosférickém tlaku za zvýšené teploty, jejíž maximální hodnota je daná bodem varu použité směsi kyselin.

Obecně může mokrý rozklad probíhat v otevřeném systému s konvenčním či mikrovlnným ohřevem nebo v systému uzavřeném, opět s ohřevem konvenčním nebo mikrovlnným. Pro konvenční ohřev slouží elektricky vyhřívané zdroje tepla s termostatem, např. topná deska, kovový blok, hnízdo, písková lázeň. K ohřevu reakční směsi dochází hlavně konvekcí. Použití zpětného chladiče značně sníží nejen spotřebu kyselin, ale i možnost ztrát analytu.

Iniciace rozkladu mikrovlnným polem významně zkracuje nutné doby rozkladu, neboť rychlý ohřev nastává přímo v reakční směsi interakcí mikrovlnného záření o frekvenci 2450 MHz s molekulami vzorku. Dosahuje se zároveň úspory elektrické energie a v důsledku nižší spotřeby kyselin a kratší doby rozkladu také snížení kontaminace vzorků a slepých pokusů. V současné době se používá zařízení buď s rozptýleným mikrovlnným polem, které doplňuje rotor s reakčními nádobami, nebo s fokusovaným polem, u kterého se energie pomocí speciálního vlnovodu připádí přímo do reakční nádobky. Tento systém umožňuje zvýšit teplotu mineralizace při maximální úspoře energie.

Velkou výhodou všech uzavřených systémů je kromě zamezení ztrát těkavých prvků i významné snížení kontaminace a snížení spotřeby reakčních činidel. Zvyšováním teploty během rozkladu dochází k vývinu plynů a tím ke zvýšení tlaku, čímž se zlepšuje účinnost celého procesu.[28] K úplné mineralizaci však dochází až po dosažení tlaku asi 10 MPa, kdy obsah zbytkového uhlíku klesne pod 1%. Takový tlak umožní dosažení teplot více než 300°C, což jsou teploty používané při suchém rozkladech. Rozklad rostlin v uzavřeném systému za vysoké teploty a s použitím vhodné směsi kyselin tak spojuje výhody obou postupů mineralizace, pokud je cílem úplné odstranění organické matrice vzorku.[29]

2. 6 Vhodné metody pro stanovení germania

Pro koncové stanovení germania se používají metody atomové nebo molekulové spektrometrie. Jedná se o atomovou absorpční nebo hmotnostní spektrometrii, optickou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem, případně absorpční spektrometrii v UV – VIS oblasti.[29]

2. 6. 1 ICP-OES

2. 6. 1. 1 Charakteristika ICP-OES

ICP-OES neboli emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je stopová analytická metoda sloužící ke stanovení obsahu stopových i významných koncentrací jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku. Tato technika umožňuje analyzovat téměř všechny prvky periodické tabulky, které je možno převést do roztoku citlivostí od jednotek ppb po stovky ppm. V posledních přibližně 30 letech se stala masově používanou analytickou technikou a ve světě pracují v současné době tisíce těchto spektrometrů.[30]

ICP-OES patří v současné době k nejvšestrannějším analytickým metodám. Je použitelná pro stanovení 80 % prvků periodické soustavy ve vzorcích ze všech oblastí analytické chemie. Vysoká teplota plazmatu (až 10 000K) snižuje mez detekce prvků a selektivitu stanovení ve srovnání s klasickou variantou emisní spektrometrie.[29]

2. 6. 1. 2 Princip ICP-OES

Roztok analytického vzorku je zmlžen a vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě 6 000 – 10 000 K.

Za takových podmínek (viz první odstavec) se rozpouštědlo okamžitě odpaří a zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Energie v plazmatu je dostatečná k tomu, aby došlo k excitaci elektronů přítomných atomů do vyšších energetických hladin. Protože excitovaný stav atomu je nestabilní, vrací se vybuzené elektrony zpět na své původní energetické hladiny a přitom emitují světlo o přesně definované vlnové délce, určené energetickým rozdílem obou hladin.

$$\delta \cdot E = h \cdot v = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

kde ΔE je energetický rozdíl hladin elektronu v atomu, h je Planckova konstanta (6.626×10^{-34} J.s), ν je frekvence světelného vlnění, c je rychlost světla ve vakuu a λ je vlnová délka světla.

Emitované světlo je poté vedeno na velmi výkonný monochromátor, který rozdělí zachycené světelné záření podle jeho vlnových délek a fotony tohoto rozděleného světla dopadají na citlivý detektor, který převede intenzitu dopadajícího záření na elektrický signál. Intenzita signálu, odpovídají charakteristické vlnové délce světla vznikajícího přechodem energetických stavů analyzovaného prvku pak odpovídá množství prvku, přítomného v analyzovaném roztoku.

2. 6. 1. 3 Transport vzorku do plazmatu

Prakticky všechny vzorky měřené technikou ICP-OES je třeba před analýzou převést do roztoku. Jeho transport do plazmatu probíhá obvykle pomocí peristaltické pumpy (někdy se také označuje jako peristaltické čerpadlo). Jeho pomocí se vzorek dostává do zmlžovače, který z původně kapalného vzorku vyrobí jemný aerosol a tato "mlha" kapiček roztoku a je proudem argonu unášena do plazmového hořáku. Přitom se obvykle používá dvou - nebo i třícestné čerpadlo, které v prvním kanále transportuje roztok vzorku, v druhém kanále roztok interního standardu a třetí může být použit například pro in-line ředění příliš koncentrovaných vzorků.
Nejčastěji jsou používány pneumatické kapilární zmlžovače, které jsou konstrukčně nejvíce propracovány. V těchto zmlžovačích se slabý proud roztoku vstřikuje tenkou tryskou do proudu argonu a v systému několika koncentrických trubic vzniká poměrně velmi dobře definovaný a homogenní aerosol vzorku. Jeho hlavní nevýhodou je možnost zanesení trysky malými nerozpuštěnými částečkami ve vzorku nebo vykrystalovanými solemi při analýze příliš koncentrovaných roztoků. Pro takové roztoky je proto lépe využít pneumatického Babbingtonova zmlžovače, který dovoluje pracovat i se silně zasolenými roztoky nebo suspenzemi pevných částic, nevytváří však tak jemný a dobře definovaný aerosol.

Speciálním případem je generování plynných hydridů a jejich dávkování do plazmatu. Tento postup vede k mimořádné citlivosti analýz, má však řadu omezení - je použitelný pouze v omezené skupině prvků jako arsen, selen, antimon, cín nebo bismut a současně nesmí analyzovaný roztok obsahovat významné koncentrace těžkých kovů.

2. 6. 1. 4 Odečtení emisních spekter

Při vstupu analyzovaných prvků do plazmatu dochází k vybuzení jejich emisních čar. Aby bylo možné využít těchto emisních čar pro analytické účely, je třeba odvést vznikající záření do součásti, která je schopna jej rozdělit podle jeho vlnových délek – tzv. monochromátor a dále určit intenzitu vyzařování při určené vlnové délce, což zprostředkovává detektor.

Protože energetické podmínky v používaném plazmatu se významně liší v různých prostorových částech výboje, je velmi důležité správné umístění pozorovacího místa, z nějž se spektrum zaznamenává. V běžném plazmatickém hořáku se teploty generovaného plazmatu liší až o několik tisíc °C mezi prostorem těsně za hlavicí hořáku (kde plazma vzniká) a jeho ukončení, tedy na vzdálenost přibližně pouhých dvou centimetrů. Díky tomu je pochopitelně výrazně odlišná intenzita vybuzeného záření v různých místech plazmatického kužele, protože ta je dána především energií, předávanou atomům plazmatem, tedy vlastně teplotou plazmatu.

2. 6. 1. 5 Spektrální rozklad emitovaného záření

Vzhledem k tomu, že existuje několik tisíc emisních spektrálních čar různých prvků nebo molekul, je základní podmínkou pro získání kvalitních analytických dat dokonalé odečtení intenzity právě hledané emisní čáry měřeného prvky tak, aby současně nebyla měřena emise i jiného prvku a nedocházelo tak ke vzniku falešných kladných signálů. Proto lze říci, že srdcem

každého emisního spektrometru je monochromátor, tedy optický člen, který je schopen rozdělit dopadající zařízení podle jeho vlnových délek. Na dokonalosti této separace jednotlivých spektrálních oblastí (čar) závisí schopnost přístroje měřit i velmi malá množství určeného prvku ve velkém nadbytku prvků jiných (selektivita měření).

Nejstarším disperzním prvkem pro rozklad světla je disperzní hranol, jehož účinnost je však pro požadavky metody ICP-OES příliš nízká.

Pro účely emisní spektrometrie poměrně dobře vyhovuje rozlišení optických mřížkových disperzních členů. Přitom se obvykle používá rozlišení až ve vyšším spektrálním řádu (20 – 50), kde lze dosáhnout odlišení jednotlivých spektrálních čar o 0,005 nm.

V současné době je pravděpodobně nejvíce používaným disperzním členem ICP spektrometrů tzv. Echelleho uspořádání, které kombinuje optický hranol jako vstupní člen a za něj se umísťuje optická mřížka, která primárně rozložené světlo ještě dále jemně disperguje.

2. 6. 1. 6 Detektory

Konečnou fází celé spektrální analýzy je kvantitativní vyhodnocení naměřených údajů umožňující výpočet obsahu sledovaného prvku v měřeném vzorku. Základním členem pro toto vyhodnocení je detektor, jehož úkolem je změřit intenzitu dopadajícího záření o příslušné vlnové délce – toto záření na něj pošle výše zmíněný disperzní člen, obvykle Eschelle monochromátor.

Detektor je proto na svém povrchu pokryt speciální polovodičovou fotocitlivou vrstvou, která je schopna převést intenzitu dopadajícího světla na velmi slabý elektrický proud. Po jeho zesílení se přesně určí intenzita vzniklého elektrického proudu a ta je pak výchozím údajem pro určení obsahu měřeného prvky v analyzovaném roztoku.

Starší přístroje obvykle pracovaly tak, že se monochromátor postupně natáčel tak, aby na detektor vysílal předem zvolenou vlnovou délku záření, která odpovídala spektrální čáře měřeného prvku. Postupně tak podle předem zvoleného počítačového programu proměřil všechny prvky, které měly být analyzovány. Tento postup byl poměrně pomalý, protože pro získání kvalitního signálu je třeba každou spektrální čáru proměřovat minimálně několik sekund a běžná analýza, zahrnující například 10 prvků tak trvala přibližně 5 - 10 minut.

Podstatné zkrácení doby analýzy, i když za cenu značného zvýšení ceny zařízení, přineslo použití tzv. polychomátorů , které fungovaly na principu klasických kvantometrů, běžně používaných v hutním průmyslu. Disperzní člen zde zůstával v nehybné pozici a na místa, kam bylo vysíláno světlo o požadované vlnové délce byly umístěny detektory. Celá analýzy tak proběhla za podstatně kratší dobu, protože se současně měřily všechny prvky naráz. Problémem byla nutnost instalace poměrně drahých detekčních členů pro každý měřený prvek a dále také fakt, že přístroj byl schopen měřit vždy jen předem vybranou a nainstalovanou sérii prvků. Proto takové přístroje nacházejí uplatnění především v kontrole sériové výroby, kde je nutno kontrolovat stále stejné parametry.

V posledních přibližně 10 letech se objevily přístroje, které namísto jednotlivých nákladných detektorů mají instalováno tzv. diodové pole, tedy soustavu až několika milionů pixelů, z nichž každý je schopen měřit intenzitu emise světla v určitém vlnovém rozsahu. Kvalitní přístroje dnes přitom disponují detektory, které jsou schopny pokrýt škálu vlnových délek od 160 do 900 nm

s rozlišením 0,002 – 0,005 nm. Měření pak probíhá opět současně na všech zvolených vlnových délkách a snímání signálu se omezuje na vybrané pixely spíše z důvodu rychlosti zpracování získaných dat. Detektory tohoto typu je třeba při měření chladit na poměrně nízké teploty, obvykle postačí teploty asi -35 °C, kde se používá Peltierova efektu. Některé citlivější přístroje vyžadují chlazení až pod -100 °C a tam je jako chladicí médium využíván kapalný dusík.[30]

Obrázek číslo 5 – Přístroj ICP-OES firmy Varian

2. 6. 2 ICP-MS

2. 6. 2. 1 Charakteristika ICP-MS

ICP-MS neboli hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je ultrastopová analytická metoda sloužící ke stanovení obsahu stopových množství jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku. Tato technika umožňuje analyzovat téměř všechny prvky od lithia po uran s citlivostí až jednotek ppt po stovky ppm. Její masové nasazení nastalo až v posledních přibližně 20 letech, kdy byly úspěšně vyřešeny technické problémy s vytvářením stabilního vakua o tlaku řádově 10^{-5}Torru a udržením konstantních podmínek v argonovém plazmatu.[31]

2. 6. 2. 2 Princip ICP-MS

Roztok analytického vzorku je zmlžen a vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě 6 000 – 10 000 K.

Za takových podmínek se rozpouštědlo okamžitě odpaří a zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Jednotlivé volné atomy ve většině případů vytvoří jednou kladně nabité ionty Me^+, které jsou dále unášeny do přechodové komory, kde je snížen tlak plynu na přibližně 0,01 Torru.

Po průchodu do vstupu k detektoru klesá tlak na řádově 10^{-5} Torru a ionty se systémem elektromagnetických čoček dostávají do kvadrupólového detektoru. Zde jsou analyzované ionty vedeny takovým způsobem, aby na povrch zesilovače dopadly v daném časovém okamžiku pouze ionty se zvolenou hmotností. Dopadem na povrch zesilovače vzniká velmi slabý elektrický proud, který je následně zesílen a je změřena jeho intenzita. Pomocí výpočetního programu jsou naměřené intenzity signálu převedeny na koncentrační data a výsledkem analýzy jsou údaje o koncentraci měřených prvků v analyzovaném roztoku.[31]

2. 6. 2. 3 Transport vzorku do plazmatu

V maximu běžných aplikací se analýza technikou ICP-MS provádí z roztoku vzorku. Pro jeho převedení do plazmatu je proto nejprve třeba jej dopravit do zmlžovače, což se provádí za použití peristaltické pumpy (někdy se také označuje jako peristaltické čerpadlo). Přitom se obvykle používá dvou - nebo i třícestné čerpadlo, které v prvním kanále transportuje roztok vzorku, v druhém kanále roztok interního standardu a třetí může být použit například pro in-line ředění příliš koncentrovaných vzorků.

Vytváření aerosolu vzorku probíhá ve zmlžovači, z něhož vychází jemně dispergovaná „mlha“ kapiček roztoku a je proudem argonu unášena do plazmového hořáku. Nejčastěji jsou používány pneumatické kapilární zmlžovače, které jsou konstrukčně nejvíce propracovány. V těchto zmlžovačích se slabý proud roztoku vstřikuje tenkou tryskou do proudu argonu a v systému několika koncentrických trubic vzniká poměrně velmi dobře definovaný a homogenní aerosol vzorku. Jeho hlavní nevýhodou je možnost zanesení trysky malými nerozpuštěnými částečkami ve vzorku nebo vykrystalovanými solemi při analýze příliš koncentrovaných roztoků. Pro takové roztoky je proto lépe využít pneumatického Babbingtonova zmlžovače, který dovoluje pracovat i se silně zasolenými roztoky nebo suspenzemi pevných částic, nevytváří však tak jemný a dobře definovaný aerosol.

V některých speciálních aplikacích lze odebírat vzorek pro měření i z pevného materiálu a to ojiskřováním laserem za průtoku konstantního množství argonu, který transportuje odjiskřené mikročástečky vzorku přímo ho hořáku.

Posledním speciálním případem je generování plynných hydridů a jejich dávkování do plazmatu. Tento postup vede k mimořádné citlivosti analýz, má však řadu omezení - je použitelný pouze v omezené skupině prvků jako arsen, selen, antimon, cín, tellur nebo bismut a současně nesmí analyzovaný roztok obsahovat významné koncentrace těžkých kovů.

2. 6. 2. 4 Omezující faktory

Přestože technika ICP-MS poskytuje vynikající detekční limity pro velké množství analyzovaných prvků, existují i zde jistá omezení, která limitují použití této metody. Tato omezení jsou dána jak technickými možnostmi současné instrumentální techniky tak fyzikálními vlivy , vyplývajícími z vlastností měřených iontů.

Jedním ze základních omezujících faktorů pro použití metody ICP-MS je obsah solí v analyzovaných vzorcích. Důvody jsou jednak fyzické nanášení zbytků solí na povrch vstupních kónů a následném zmenšování jejich reálného průměru (*blokování kónu*) a dále změna fyzikálních podmínek v argonovém plazmatu, kdy v přítomnosti velkého množství solí dochází energetickým posunům a následně ke generaci rozdílného množství iontů měřených prvků ve vzorku a kalibračním roztoku.

Prakticky to znamená, že množství solí v analyzovaném vzorku by nemělo překročit hranici 2 - 5 g soli/l a pokud analyzovaný vzorek tyto parametry nesplňuje, je třeba ho zředit. Z běžně analyzovaných vzorků se to nejvíce týká například mořské vody (salinita cca 40 g/l), krevní plasmy nebo krve (salinita přes 25 g/l), moči a řady dalších běžných vzorků.

Polyatomické interference jsou patrně nejproblematičtější stránkou praktické analýzy metodou ICP-MS. Jedná se o jev, při kterém v argonovém plazmatu dochází k tvorbě poměrně stabilních částic, tvořených převážně dvěma atomy s jedním kladným nábojem. Takové částice pak poskytují falešný kladný signál na hmotě, odpovídající součtu hmot svých atomů a v konečném důsledku tak nedefinovaným způsobem zvyšují množství analyzovaných prvků.
Je třeba si uvědomit že k tvorbě těchto částic může docházet pouze tehdy, když jejich atomy jsou v plazmatu zastoupeny ve velkém množství.

Eliminace polyatomických interferencí je i v současné době stále předmětem rozsáhlého výzkumu. Technicky jsou přitom měněny energetické podmínky v plazmatu, experimentuje se se způsobem vnášení vzorku do plazmatu (ochlazování zmlžovače), přidávají se pomocné plyny jako vodík nebo methan a hledají se i další možnosti. Matematicky se provádějí korekce signálu na základě měření množství atomů vytvářejících polyatomické ionty nebo měřením poměrů jiných izotopů s podobným typem interference.

2. 6. 2. 5 Využití ICP-MS

Metoda ICP-MS je založena na analýze iontů měřených prvků a je proto žádoucí, aby atomy analyzovaných prvků byly před vstupem do detektoru převedeny do formy iontů M^+. Dlouhodobým výzkumem bylo proto nalezeno plazma s takovými parametry, které produkci uvedených iontů zabezpečuje v požadované míře.

Základní charakteristikou vstupu vzorku do plazmatu je množství přiváděného plynu. To je v tomto případě na úrovni přibližně 20 l Ar/min a zajišťuje tvorbu aerosolu vzorku potřebných parametrů. Pro takový průtok plynu je pak jako ideální prostředí definováno vysokofrekvenční (obvykle v rozmezí 25 - 50 MHz) plazma s dodávaným výkonem 0,8 - 1,8 kW.

Technicky je tento výkon předáván protékajícímu proudu argonu pomocí cívky o 3 - 4 závitech, která je umístěna na vyústění zmlžovače. Protože předávání tak vysokého výkonu

z vysokofrekvenčního generátoru do plazmatu by za normálních podmínek způsobilo přehřívání cívky s možností jejího poškození natavením, jsou cívky zhotoveny z dutých kapilár o vnitřním průměru 1 - 2 mm. Cívka je pak kontinuálně chlazena proudem chladicího média (obvykle deionizované vody) o teplotě 15 - 20 °C.

Biologie a medicína

Vzorky různých organických tkání nebo tělních tekutin jsou prakticky ideální pro analýzu technikou ICP-MS.

Zároveň se v současné době stále prohlubují naše znalosti o mechanizmu působení stopových prvků v metabolizmu živočichů a sledování těchto elementů v jednotlivých tělních tkáních nebo dokonce buňkách pomáhá tyto znalosti rozšiřovat a v řadě případů může napomoci k odhalení příčin nemocí nebo různých alergických stavů u pacientů. Přitom lze často jako vzorek použít například lidské vlasy nebo srst zvířat a je tak možno analyzovat i vzorky staré stovky nebo tisíce let.

Životní prostředí

Obsah toxických kovů jako olovo, kadmium, arzen nebo rtuť v okolním prostředí je velmi důležitým parametrem pro posouzení jeho kvality popřípadě vlivu lidské činnosti na tento stav.

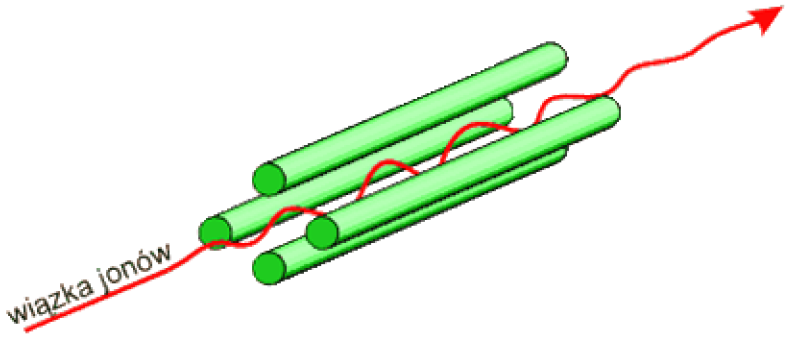
Analyzovaným materiálem jsou zde obvykle rostliny jako houby, mechy nebo lišejníky, o jejichž schopnosti absorbovat těžké kovy z okolního prostředí je známo velmi mnoho. V prostředí moří jsou to obvykle ulity nebo lastury mořských měkkýšů, významným materiálem jsou tkáně mořských korálů. Díky vysoké citlivosti techniky ICP-MS lze analyzovat i velmi malé vzorky a je proto možno sledovat postupné změny obsahu prvků v tkáni jednoho jedince v různých obdobích života. Například sledováni obsahu arzenu nebo rtuti v jednotlivých vrstvách korálového útesu nebo dokonce i jednotlivé skořápky mořského tvora nám může poskytnou představu u postupných změnách obsahu sledovaných prvků v období řádu desítek až tisíců let nazpět.

Kontrola kvality potravin, pitné vody, léčiv

V současné době se metodou ICP-MS každodenně provádí desetitisíce analýz nejrůznějších druhů potravin a přípravků sloužících jako složky potravy s cílem kontrolovat obsah vybraných toxických prvků jako olovo, kadmium, arzen, nikl, berylium nebo rtuť. Povolené obsahy těchto prvků jsou legislativně určeny v jednotlivých státech celého světa a výrobce potravin má za povinnost deklarovat, že jeho výrobek byl zkontrolován a bylo zjištěno, že obsahy kontrolovaných složek leží pod zákonnými limity. Stejně se kontrolují i zemědělské produkty, které slouží k přímé konzumaci jako ovoce, zelenina nebo např. brambory či rýže.

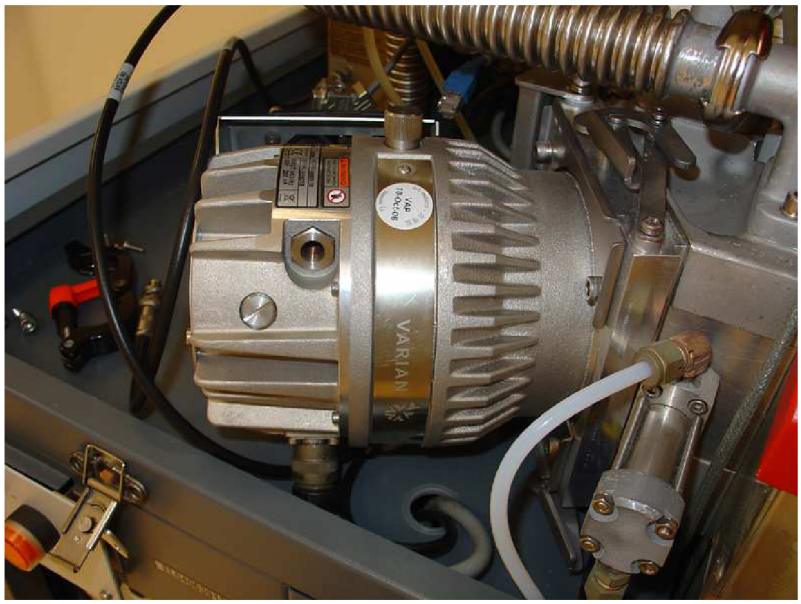
Stejně jako pro potraviny, platí zákonné limity i pro pitné vody a metoda ICP-MS je využívána především ke kontrolám těch nejsledovanějších toxických prvků.

Velmi přísné předpisy jsou dále stanoveny pro výrobky farmaceutického průmyslu a je zákonnou povinností každého výrobce provádět průběžně kontroly každé vyrobené šarže libovolného léčiva nebo léčivého přípravku i na obsahy těžkých toxických kovů.[31,47,48]



Obrázek číslo 6 – Schematický nákres kvadrupólu

Obrázek číslo 7 – Peristaltické čerpadlo pro dávkování vzorku do zmlžovače



Obrázek číslo 8 – Turbomolekulární pumpa, zamontovaná v přístroji ICP-MS

Obrázek číslo 9 – Celkové schéma ICP-MS

2. 6. 3 AAS

2. 6. 3. 1 Charakteristika AAS

AAS neboli atomová absorpční spektrometrie je spektrometrická analytická metoda sloužící ke stanovení obsahu stopových i významných koncentrací jednotlivých prvků v analyzovaném roztoku. Metodou lze analyzovat přes 60 prvků periodické tabulky s citlivostí od setin do stovek ppm. Největší rozmach zaznamenala technika v 60. – 80. letech 20. století, kdy patřila k nejcitlivějším a nejvíce užívaným instrumentálním analytickým technikám.

2. 6. 3. 2 Princip AAS

Roztok analytického vzorku je zmlžen a vzniklý aerosol je zaveden do plamene, kde se roztok okamžitě odpaří a rozruší se chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Podmínky v plameni jsou přitom voleny tak aby co největší populace měřených atomů zůstala v neutrálním stavu a nedocházelo k ionizaci za vzniku nabitých částic typu Me^+.

Plamenem prochází paprsek světla ze speciální výbojky, jehož fotony jsou při setkání s atomy analyzovaného prvku absorbovány a atom prvku přechází do příslušného vzbuzeného stavu. Dochází tak k úbytku intenzity procházejícího světla a tento úbytek je dán Lambert-Beerovým zákonem ve tvaru:

$$I = I_0 \cdot e^{-(k \cdot n \cdot l)}$$

kde I_0 je intenzita budícího záření, I je intenzita záření po průchodu absorbujícím prostředím (plamenem), k je atomový absorpční koeficient pro danou absorpční čáru, n je počet atomů analyzovaného prvku v jednotce objemu a l je délka absorpční vrstvy (délka hořáku, vytvářejícího plamen).

V praxi se pak jako měřená veličina používá logaritmus úbytku světelné energie nazvaný absorbance A, pro niž platí vztah:

$$A = \log (I_0/I) = 2{,}303 \cdot k \cdot n \cdot l$$

Pro absorbanci pak platí velmi jednoduchá lineární závislost na koncentraci atomů měřeného prvku. Všechny AAS spektrometry proto udávají měřený signál v jednotkách absorbance po matematickém zpracování skutečně měřených intenzit procházejícího světla.

2. 6. 3. 3 Technický popis zařízení

Měřicí systém metody AAS se skládá ze 3 základních součástí:

1. Zdroje elektromagnetického záření
2. Měrné cely, v níž dochází k atomizaci (plamen, grafitová kyveta)
3. Optického detekčního systému, který měří intenzitu prošlého záření o specifické vlnové délce

Kromě toho je každý přístroj vybaven zařízením, které provádí transport kapalného vzorku do měrné cely a výpočetním systémem, který řídí běh celé analýzy a vyhodnocuje naměřené signály, které převádí přímo do požadovaných jednotek (např. koncentrace měřeného prvku ve vzorku).

2. 6. 3. 4 Transport vzorku do měrné cely

Plamen

Transport do plamene probíhá obvykle pomocí pneumatického kapilárního zmlžovače, který pomocí průtoku spalovacího plynu a oxidačního činidla způsobí nasávání roztoku měřeného vzorku nebo pomocí ultrazvukového rozprašování roztoku vzorku.

Často je takto vzniklý aerosol dále upravován tak, aby vstupující částice (kapičky) měly pokud možno jednotnou velikost. Proud nasávaného vzorku je proto naváděn proti pevné překážce (skleněná kulička) o kterou se dále rozbíjí na jemnější částice nebo je homogenizován průchodem přes jiný homogenizátor (například rychle rotující plastovou vrtulku). Podle druhu a poměru paliva a oxidovadla lze dosáhnout různých teplot.

Elektrotermický atomizátor

Tento atomizátor je tvořen grafitovou trubicí (kyvetou), která je vyhřívána elektrickým proudem. Měřené záření prochází rovnoběžně s osou této trubice.

Vzorek se vnáší pomocí mikropipety automatického dávkovače přímo na vnitřní stěnu trubice nebo na speciální grafitovou destičku - platformu. Dávkované množství vzorku se obvykle pohybuje v rozsahu objemů 5 - 50 μl, pro dosažení extrémních citlivostí lze pak provést opakované dávkování vzorku tak, že se nadávkovaný vzorek opatrně odpaří při teplotách kolem 100 °C a po ochlazení kyvety se dávkování opakuje, možno i několikanásobně.

Moderní dávkovače jsou konstruovány tak, aby celý proces dávkování byl plně řízen počítačem a umožňují analýzu několika desítek vzorků bez zásahu obsluhy, včetně nakalibrování příslušné metody a případného opakování analýzy s nižším dávkovaným objemem vzorku v případě neočekávané vysokého signálu.

Generace plynných hydridů

Speciálním případem je generování plynných hydridů a jejich dávkování do plamene. Tento postup vede ke zvýšení citlivosti analýzy, má však řadu omezení - je použitelný pouze v omezené skupině prvků jako arsen, selen, antimon, cín nebo bismut a současně nesmí analyzovaný roztok obsahovat významné koncentrace těžkých kovů. Jako redukční činidlo se zde používá roztok borohydridu sodného ($NaBH_4$), který po okyselení uvolňuje nascentní vodík s mimořádně silnými redukčními účinky.

Speciálním případem je zde generace studených par rtuti, kterou lze poměrně snadno vyredukovat z analyzovaného roztoku již uvedeným borohydridem nebo levnějším chloridem cínatým ($SnCl_2$). Ze zkušenosti však vyplývá, že v případě použití chloridu cínatého se redukční aparatura již nemůže použít pro analýzu cínu, protože je prakticky nemožné ji vyčistit tak, aby nevykazovala vysoký signál pro cín i v případě analýzy ultračisté deionizované vody.

2. 6. 3. 5 Zdroje záření

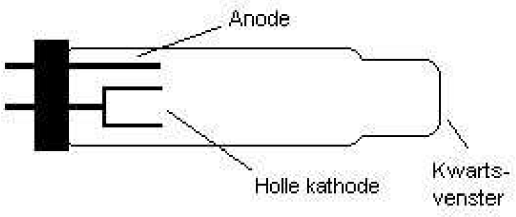
Základním požadavkem na zdroj měřeného záření je jeho relativně vysoká intenzita v oblasti měřených vlnových délek a především pak časová stabilita zdroje. Intenzita vyzařovaného záření by se pro praktické účely neměla měnit o více než 1 % v časovém intervalu řádově desítek sekund. Proto se v praxi používají převážně jednoúčelové výbojky, které nevyzařují kontinuální spektrum, ale září především v oblastech vlnových délek měřených spektrálních čar.

Výbojka s dutou katodou - HCL

Nejstarším a současně nejčastěji používaným zdrojem elektromagnetického záření v AAS je výbojka s dutou katodou (anglicky *Hollow cathode lamp*), zkratka HCL.

Je tvořena skleněným pláštěm o průměru 30 - 50 mm a délce okolo 12 cm, ve kterém je umístěna dutá katoda z analyzovaného prvku, představující dutý váleček o průměru několika milimetrů a anoda z běžného kovu. Skleněná nádoba je dobře vakuově zatěsněna a je naplněna inertním plynem (neon, argon) pod tlakem 100 - 200 Pa. V případě, že na obě elektrody vložíme napětí v řádu několika tisíc voltů, dojde ke vzniku doutnavého výboje a kladně nabité ionty vzácného plynu jsou přitahovány ke katodě, na kterou narážejí vysokou rychlostí. Srážkami se z povrchu anody uvolňují atomy analyzovaného prvku, které se srážejí s dalšími letícími ionty a excitují se do vyššího energetického stavu. Při návratu do stabilního stavu pak vyzařují elektromagnetické záření, jehož vlnová délka odpovídá energetickému rozdílu mezi excitovaným a normálním stavem daného atomu. Prakticky tak získáme čárové spektrum o několika desítkách spektrálních linií, které jsou pro každý prvek charakteristické a jejich vlnová délka je určována stavbou elektronového obalu analyzovaného prvku.

Jistou nevýhodou praktického používání HCL je nutnost výměny lampy při přechodu na analýzu jiného prvku a také fakt, že potřeba nákupu více výbojek zvyšuje náklady na analýzy. Tento nedostatek se výrobci snaží eliminovat výrobou tzv. multielementálních lamp, jejichž anoda je tvořena slitinou několika definovaných kovů. Na trhu jsou dnes i výbojky s možností analyzovat 8 prvků bez výměny HCL. Nevýhodou těchto lamp je však výrazné snížení citlivosti, protože jejich emisi na měřené vlnové délce snižuje současná excitace všech atomů kovů v anodě a tím faktickým snížením emitovaného výkonu na požadované analytické linii.



Obrázek číslo 10 – Schematický průřez HCL

Bezelektrodová výbojka - EDL

Dalším typem zdroje záření pro AAS je bezelektrodová výbojka (anglicky *Electrodeless Discharge Lamp*), zkratka EDL.

Uvedené zařízení funguje na principu výboje ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli. Zdrojem záření je křemenná baňka naplněná vzácným plynem obsahující několik miligramů těkavé sloučeniny (obvykle halogenidů) analyzovaného prvku. Baňka je umístěna v cívce vysokofrekvenčního zdroje, které po přívodu energie vytvoří stabilní prstencový výboj a dojde k vyzáření spektrálních čar stejně jako u lamp typu HCL. Obvyklá frekvence zdrojů vysokofrekvenčních zdrojů činí 27 MHz.

Tyto výbojky mají vyšší životnost a poskytují vyšší intenzitu záření než odpovídající klasické HCL. Lze je však vyrobit jen pro omezené množství prvků, protože musí být k dispozici snadno těkavá sloučenina analyzovaného prvku a tuto podmínku splňují především hydridotvorné prvky jako As Se, Sn, Sb, Bi, dále pak například fosfor, olovo, zinek a alkalické kovy. Z ekonomického hlediska je důležitá nezbytnost nákupu speciálního zdroje vysokofrekvenčního elektromagnetického pole, protože v klasických přístrojích AAS tento zdroj není automaticky zabudován.

Kontinuální zdroje

V současné doby se do praktického využití začínají dostávat kontinuální zdroje záření, které vyzařují vysokou energii v celém rozsahu měřeného spektra a dokonalejším optickým detektorem, který je srovnatelný s mřížkovými detektory používanými v metodě ICP-OES.

Zdrojem záření jsou v tomto případě vysokotlaké xenonové nebo deuteriové výbojky, uvažuje se i možnosti využít jako zdroj záření laserové diody. Optický systém je tvořen Echelle monochromátorem jako disperzním členem a detektorem může být například detektor využívající diodové pole - CCD detektor.

2. 6. 3. 6 Atomizace vzorku

Zásadní podmínkou pro měření koncentrace prvku metodou AAS je převedení atomů analyzovaného prvku do stavu Me^0, tedy do stavu, kdy se v měřeném médiu (plamen, plyn) vyskytují převážně nenabité volné atomy analytu. Pro každý z již zmíněných způsobů měření je tak nutné nalézt takové fyzikální podmínky, v nichž populace částic Me^0 vykazuje maximum.

Plamen

V průběhu vývoje metody AAS se objevila řada kombinací spalovaného a oxidačního plynu, ale postupně se pro praktické využití omezilo pouze na 2 kombinace: 1. acetylen – vzduch a 2. acetylen – oxid dusný. Zároveň hořáky pro spalování uvedených plynů mají v současné době standardní délku 100 a 50 mm, jsou však vždy nastavitelné z hlediska pozice průchodu měřeného světla různou oblastí plamene. Je to proto, že plamen ve svém těle vykazuje značně rozdílné fyzikální vlastnosti především z hlediska lokální teploty, ale i oxidačních schopností – můžeme zde nalézt zóny s výrazně redukčními nebo naopak oxidačními schopnostmi. Analytik pak musí pro konkrétní případ zvolit vždy tu oblast plamene, v níž převládá populace analyzovaných

atomů Me^0, kdy je dosaženo maximální citlivosti stanovení. Další možností, jak ovlivnit citlivost stanovení je otočení hořáku kolem osy, čímž se sníží délka analyzované zóny. Tento postup se prakticky používá v případech, kdy je třeba analyzovat relativně koncentrované roztoky a je třeba se vyhnout jejich ředění.

Plamen acetylen – vzduch je využíván pro analýzu velké většiny prvků a prakticky standardně je dodáván v délce 100 mm. Pro analýzu alkalických kovů se přitom volí ještě specifická varianta tzv. chudého plamene, kdy je množství acetylenu sníženo na minimum a teplota uvnitř plamene tak klesá pod 1000 °C. Je to proto, že alkalické kovy velmi snadno ionizují a vytvářejí ionty Me^+ které snižují citlivost stanovení. Snížením teploty plamene lze dosáhnout výrazného snížení populace nabitých iontů v plameni. Podobně působí i přídavek tzv. iontových pufrů, tj. atomů, které jsou úmyslně přidány ve vysokém nadbytku vůči analyzovanému prvku a vytvářejí prostředí, které je z hlediska ionizace uniformní pro všechny přítomné prvky. Typickými iontovými pufry jsou sloučeniny cesia nebo lanthanu.

Plamen oxid dusný – acetylen má výrazně vyšší teplotu – až 3 000 °C a užívá se především pro analýzu prvků, které vykazují tendenci k tvorbě stabilních oxidů jako hliník, zirkonium nebo kovy vzácných zemin. V určitých případech je vhodnější i potlačení vlivu prostředí - například pro analýzu vápníku vytváří značně stabilní signál nezávislý na složení matrice, která v plameni acetylen – vzduch výrazně mění parametry analýzy. Hořáky pro tento systém mají obvykle délku 50 mm. Zároveň je z hlediska bezpečnosti provozu nezbytné zajistit spolehlivé zažehnutí a především zhasnutí plamene, kdy hrozí při nesprávném načasování jednotlivých kroků exploze uvnitř hořáku.

Elektrotermický atomizátor

Využiti techniky bezplamenné atomizace přináší zvýšení citlivosti stanovení až o několik řádů oproti plameni, je však nutno vyřešit řadu problémů spojených nespecifickou absorpcí světla způsobenou nerozloženými zbytky matrice vzorku a dalšími fyzikálními jevy.

Vlastní atomizátor je tvořen dutým válečkem o délce 30 – 50 mm a vnitřním průměru kolem 5 mm. V polovině délky válečku je malý otvor, který slouží pro dávkování vzorku do kyvety a odvod promývacího inertního plynu. Během vývoje metody byly prováděny experimenty s různými materiály pro výrobu atomizátorů (např. kovový wolfram), ale v současné se době se používá prakticky výlučně grafit, který má na povrchu vrstvu pyrolytického grafitu s vysokou mechanickou a termickou stabilitou. Materiál kyvety je chráněn před shořením v atmosférickém kyslíku proudem argonu, který ji obtéká zvenčí i uvnitř a odstraňuje tak současně z vnitřního prostoru zbytky po pyrolýze matrice. Změny teploty atomizátoru, nutné pro odpaření a atomizaci vzorku jsou docilovány průchodem elektrického proudu materiálem kyvety nebo jejím mikrovlnným ohřevem. Analytický signál je získáván průchodem světla vnitřním prostorem kyvety ve směru její podélné osy a měřením rozdílu absorpce světla zvolené vlnové délky před atomizací vzorku a v intervalu, kdy jsou atomy analyzovaného prvku odpařeny vysoko teplotou do vnitřního prostoru kyvety.

Teplota kyvety v průběhu analýzy je řízena počítačem a skládá se z několika kroků.

1. V prvním je odpařeno rozpouštědlo (obvykle voda a anorganické kyseliny) a teplota je zde volena tak, aby nedošlo k varu a analyzovaný materiál nebyl rozptýlen po stěnách kyvety.

2. V druhém kroku je odstraňována matrice vzorku, především jsou pyrolyzovány přítomné organické sloučeniny nebo lze odpařit snadno těkavé anorganické soli. Pro lepší průběh pyrolýzy se obvykle ke vzorku přidává tzv. modifikátor matrice, tedy sloučenina, která napomáhá oxidaci organických sloučenin, převádí přítomné anorganické soli na těkavější sloučeniny nebo převádí analyzovaný prvek do vhodné formy. Nejobvyklejšími modifikátory matrice jsou chlorid palladnatý, dusičnan hořečnatý nebo fosforečnan amonný, ale ve specializovaných případech se setkáváme s mnoha dalšími sloučeninami.
3. Ve třetím kroku dochází k atomizaci analyzované látky a měření absorpce světla jejími atomy. Proto se v tomto kroku zastavuje proud argonu, procházející vnitřkem kyveta, aby uvolněné atomy nebyly vyplachovány z měřeného prostoru. Výsledný signál má potom tvar píku a pro vyhodnocení obsahu prvku ve vzorku se měří buď jeho výška nebo plocha.
4. Poslední krok slouží k vyčištění kyvety před dalším měřením a kyveta se při něm na několik sekund zahřívá až na teplotu 3 000 oC při maximálním průtoku argonu kyvetou.[47,48]

Obrázek číslo 11 – Atomová absorpční spektometrie

3. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše o výskytu germania v potravinách a o možnosti stanovení tohoto prvku různými analytickými metodami.

Bylo zjištěno, že pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), atomové absorpční spektrometrie (ASS), lze stanovit germanium v potravinách.

Dále bylo zjištěno, že lze používat pro léčbu, příp. preventivní účely, nutriční doplňky organicky vázaného germania. Jedná se především o Ge-132, Spirogermanium a Sanumgerman, ale taky o různé krémy, roztoky.

4. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. *Chemický vzdělávací portál*: [online]. 2006, [cit. 2006-09-20]. Dostupné z: <http://chemie.gfxs.cz/index.php?pg=prvek&prvek_id=32>

2. *Wikipedia, otevřená encyklopedie*: [online]. 2007, [cit. 2007-05-28]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Germanium>

3. *Canov* [online]. 2005, [cit. 2005-07-11]. Dostupné z: <http://www.jergym.hiedu.cz/%7Ecanovm/>

4. *WeBa* [online]. 2007, [cit. 2007-06-10]. Dostupné z: http://webaschoolpage.kvalitne.cz/referaty/periodicka-soustava-prvku.php

5. KOTLÍK, B., RŮŽIČKOVÁ, K. *Chemie I. v kostce pro střední školy*. 4.vyd. Havlíčkův Brod: Frangment, 1999. 119 s. ISBN 80-253-0031-5.

6. *Chemie* [online]. 2006, [cit. 2006-08-24]. Dostupné z: <http://yoohoo.euweb.cz/chemano/pg017.html>

7. *Metarulgie kovů* [online]. 2005, [cit. 2005-11]. Dostupné z: <www.nom.wz.cz/KOVY/Ge_Si_Se_Te.htm>

8. TOUŽÍN, J. *Stručný přehled chemie prvků*. 1.vyd. Brno: Masarykova Univerzita, 1995. 225 s. ISBN 80-210-2635-9.

9. GOODMAN, S. *The health and life enhancer* [online]. 2004, [cit. 2005-01-15]. Dostupné z: http://www.positivehealth.com

10. *Periodická tabulka prvků*: [online]. 2007, [cit. 2007-06-25]. Dostupné z: <http://www.tabulka.cz/prvky/ukaz.asp?id=32>

11. *Biotox* [online]. 2006, [cit. 2006-08-11]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon>

12. LOREN, K. *The report on germanium* [online]. 2006, [cit. 2006-12-22]. Dostupné z: http://www.organicgermanium.net

13. RICE, L., WHEELER, J. W., GESCHICKTER, C. F. Synthesis of 4, 4-diakyl-4-4 germacyclo hexanone and 8,8-diakyl-8-germanspiro 8(4.5)decanes. Heterocyc

14. *iReferáty* [online]. 2006, [cit. 2006-02-19]. Dostupné z: <http://referaty.ireferaty.cz/315/1581/Polovodice>

15. *Jak a proč* [online]. 2005, [cit. 2005-09-29].
Dostupné z: <http://www.jakaproc.cz/Stranky/samostud.html>

16. KAMEN, B. *Germanium a new approach to imunity* [online]. 2005, [cit. 2005-03-17]. Dostupné z: <http://organicgermanium.net>

17. VETEJŠKA, K., ZAHRADNÍK, L., MAZÁČEK, J. *Vzácné a stopové prvky*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1967. 149 s.

18. *Ottova encyklopedie* [online]. 2007, [cit. 2007-03-30].
Dostupné z: <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/360207-argyrodit>

19. *Ottova encyklopedie* [online]. 2007, [cit. 2007-03-12].
Dostupné z: <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/404324-Germanit>

20. *SuperSmart* [online]. 2007, [cit. 2007-06-25].
Dostupné z: <http://www.supersmart.com/article.pl?id=0175&lang=en&fromid=GG132>

21. *Mineralienatlas* [online]. 2006, [cit. 2006-03-05].
Dostupné z: <http://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/>

22. ASAI, R. Miracle Cure Organic Germanium. New York Japan. *Publications Kodansha International via Harper and Row*, 1980.

23. *Ginseng UP* [online]. 2005 [cit. 2005-12-27] Dostupné z: <www.ginsengup.com>

24. *Encyklopedie* [online]. 2007, [cit. 2007-06-19].
Dostupné z: <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/125840-chemicky-prvek>

25. FIŠERA, M. *Využití metod atomové spektrometrie v elementární stopové analýze*. Habilitační práce. Brno: VUT, FCH, 1997.

26. ČERNOHORSKÝ, T. *Atomová absorpční spektrometrie II, Kurz pro pokročilé*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2006. 145 s.

27. MADER, P., HABER, V., ZELENKA, J. *Analysis*, Praha. 1997.

28. KNAPP, G. Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology, Berlin: *Walter de Gruyter*, 1988.

29. SOMMER, L., KANICKÝ, V., OTRUDA, V., TOMAN, J. *Optická emisní spektrometrie v indukčně vázaném plazmatu a vysokoteplotních plamenech.* 1.vyd. Praha: Academia, 1992.

30. *Eurochem* [online]. 2006, [cit. 2006-08-18].
Dostupné z: <http://www.eurochem.cz/polavolt/anorg/priprava_vzorku/mader_curdova.htm#>

31. *Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online]. 2007, [cit.2007-06-13].
Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/ICP-MS#searchInput>

32. SANAI, T. Germanium Dioxide-Induced Nephropathy: *A New Type of Renal Diestase Neohrom*, 1990.

33. SCHAUSS, A. G. Nephrotoxicity in Humans by the Ultratrace Element Germanium. *Renal Failure*, 1991.

34. HIGUCHI, I. Germanium Myopathy: Clinical and Experimental Pathological Studies. *Acta Neuropathologica*, 1989.

35. MATSUSAKA, T. Germanium-induced Nephropathy: Report of Two CASE and Review of the Literature. *Clinical Nephrology*, 1988.

36. VAN DER SPOEL, J. Dangers of Dietary Germanium Supplements. *The Lancet*, 1990.

37. KRAPF, R. Abuse of Germanium Associated with Fatal Lactic Acidosis, 1992.

38. TAKUCHI, A. Nephrotoxicity of Germanium Compounds: *Report of a Case and Review of the Literature*, 1992.

39. ASAKA, T. Germanium Intoxication with Sensory Ataxia. *Journal of the Neurological Science*, 1995.

40. LI, J. F. Growth Promoting effect and Toxicity of Germanium in Chickens. *Archiv für geflügelkunde*, 1993.

41. FURST, A. Biological testing of Germanium. *Toxicology and Industrial Health*, 1987.

42. ANGER, F. Subchronic Oral Toxicity (Six Months) of Carboxyethylgermanium sesquoxide $[(HOOCCH_2CH_2Ge)_2O_3]n$ in rats. *Applied Organometallic Chemistry*, 1992.

43. SANAI, T. Chronic Tubulointerstitial Changes Induced by Germanium Dioxide in Comparison with Carboxyethylgermanium sesquoxide. *Kidnex International*, 1991.

44. SANAI, T. Subacute Nephrotoxicity of Germanium Dioxide in the Experimental Animal. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1990.

45. *Healt supplement, Inc*. [online]. 2005 [cit. 2006-10-14]. Dostupná z:www.topsilver.com

46. *Nové Universum*, Encyklopedie: Stuttgart: Verlagshaus, GmbH, 2003. ISBN 80-242-1069-X

47. KOLEKTIV AUTORŮ *Instrumentální analýza*. Praha: SNTL, 1986.

48. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody: Učebnice základů instrumentálních analytických metod.* 2. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-902155-0-5.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ppm	- parts per milion ($mg.l^{-1}$)
ppb	- pars per billion ($\mu g.l^{-1}$)
ppt	- pars per triion ($ng.l^{-1}$)
LD_{50}	**-** dávka, při které uhyne 50% pokusných zvířat
LOAEL	**-** nejnižší dávka, při které byl sledován škodlivý účinek (lowest observable adverse effect level)
NOAEL	**-** dávka, při které nebyl sledován škodlivý účinek (no observable adverse effect level)
Ge – 132	**-** organicky vázané germanium
ICP-OES	- emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ETA-ASS	**-** atomová absorpční spektrometrie elektrotermická
UV – VIS	- ultrafialová a viditelná oblast
ICP – MS	**-** hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ASS	- atomová absorpční spektrometrie