



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STANOVENÍ MIKROPRVKŮ V MLÉCE POMOCÍ
ICP-OES PO EXTRAKCI TECHNIKOU DGT**

DETERMINATION OF MICROELEMENTS IN MILK BY ICP-OES AFTER EXTRACTION BY DGT
TECHNIQUE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aneta Habartová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1428/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Aneta Habartová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Stanovení mikroprvků v mléce pomocí ICP–OES po extrakci technikou DGT

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování teoretické části práce
2. Testování extrakce mikroprvků z ředěného mléka technikou DGT
3. Validace techniky DGT
4. Zpracování naměřených výsledků, diskuse výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Aneta Habartová
student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením mikroprvků (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn) v mléce pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) po extrakci technikou difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT) za použití sorpčního gelu obsahujícího sorbent Chelex 100 a agarózového difúzního gelu. Optimalizace techniky DGT v modelových roztocích kovů proběhla pomocí doporučovaných základních testů. Poté byla ověřena výkonnost techniky DGT v matici zředěného mléka. Při analýze reálného vzorku mléka byl stanoven pouze Zn o koncentraci $3,74 \pm 0,02$ mg/l. Ostatní mikroprvky v připraveném eluátu byly na hranici nebo pod limitem detekce instrumentální metody. Dosazené výsledky byly porovnány s analýzou mléka po mikrovlnné digesci na ICP-OES, avšak i tyto výsledky se nacházely pod limitem detekce přístroje. Naměřen byl pouze Zn o koncentraci $3,91 \pm 0,16$ mg/l. Pro budoucí analýzu vybraných mikroprvků v mléce technikou DGT je třeba další optimalizace prekoncentrační techniky, příp. použití citlivější instrumentální metody.

ABSTRACT

This thesis is focused on determination of microelements (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn) in milk by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES) after extraction by Diffusion Gradients in Thin films technique (DGT) containing Chelex 100 resin gel and agarose diffusion gel. The optimalization of DGT in model metal solutions was verified by recommended basic tests. The performance of the DGT technique in the diluted milk matrix was verified. By DGT technique was determined only Zn in real milk matrix with concentration $3,74 \pm 0,02$ mg/l. The other microelements in the prepared eluate were at or below the limit of detection of the instrumental method. The obtained results were compared with the analysis of milk after microwave digestion by ICP-OES. However, these results were below the detection limit of the device too, only Zn with concentration $3,91 \pm 0,16$ mg/l was measured. For the future analysis of the selected microelements in milk by DGT technique, further optimization of the preconcentration technique is required, or use of a more sensitive instrumental method.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mléko, mikroprvky, Chelex 100, DGT, ICP-OES

KEYWORDS

Milk, microelemets, Chelex 100, DGT, ICP-OES

HABARTOVÁ, Aneta. *Stanovení mikroprvků v mléce pomocí ICP-OES po extrakci technikou DGT*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124022>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc a čas, který mi věnoval v průběhu tvorby diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Mléko	9
2.1.1	Složení mléka	9
2.1.1.1	Voda	9
2.1.1.2	Sacharidy	9
2.1.1.3	Tuky	9
2.1.1.4	Bílkoviny	10
2.1.1.5	Vitamíny	10
2.1.1.6	Minerální látky	10
2.2	Charakteristika vybraných stopových prvků	11
2.2.1	Esenciální prvky	11
2.2.2	Toxické prvky	13
2.3	Metody stanovení prvků v mléce	14
2.3.1	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).....	16
2.3.1.1	Princip	16
2.3.1.2	Instrumentace	16
2.3.1.3	Interference.....	18
2.3.2	Metody úpravy vzorku mléka	18
2.3.2.1	Analýza zředěného mléka	19
2.3.2.2	Metody rozkladů vzorku mléka.....	19
2.3.2.3	Prekoncentrace prvků ze vzorku mléka.....	20
2.4	Technika DGT	20
2.4.1	Vzorkovací jednotka	21
2.4.2	Princip techniky DGT	22
2.4.3	Výpočty v technice DGT.....	23
2.4.4	Faktory ovlivňující měření techniku DGT	23
2.4.4.1	Teplota.....	24
2.4.4.2	Iontová síla a pH	24
2.4.4.3	Difúzní mezní vrstva (DBL)	25
2.4.5	Difúzní gely v technice DGT	25
2.4.5.1	Agarózový gel	27
2.4.6	Sorpční gely v DGT	28
2.4.6.1	Akumulační a eluční vlastnosti	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Laboratorní vybavení	31
3.1.1	Chemikálie	31
3.1.2	Pomůcky.....	31

3.1.3	Přístroje	31
3.2	Popis analyzovaných vzorků	31
3.3	Aparatura pro DGT	32
3.4	Pracovní postupy	33
3.4.1	Příprava difúzního gelu	33
3.4.2	Příprava sorpčního gelu.....	34
3.4.3	Sestavení jednotek DGT.....	34
3.4.4	Modelový roztok kovů	34
3.4.5	Modelový roztok mléka	35
3.4.6	Eluce sorpčního gelu a ředění eluátu.....	35
3.4.7	Kalibrační roztoky	35
3.4.8	Stabilita roztoku	35
3.4.9	Akumulační faktor.....	35
3.4.10	Eluční faktor	35
3.5	Optimalizace techniky DGT.....	36
3.5.1	Test lineární akumulace v závislosti na čase v plastové nádobce	36
3.5.2	Test lineární akumulace v závislosti na čase ve skleněné kádince	36
3.5.3	Test lineární akumulace v závislosti na reciproké tloušťce difúzního gelu	36
3.5.4	DGT experiment.....	36
3.5.5	Vliv koncentrace konkurenčních prvků Ca a K	36
3.6	Ověření výkonnosti techniky DGT v matrici mléka	37
3.6.1	Test lineární akumulace v závislosti na čase.....	37
3.6.2	DGT experiment.....	37
3.7	Analýza mléka.....	37
3.7.1	Prekoncentrační technikou DGT	37
3.7.2	Mikrovlnnou digescí	37
3.7.2.1	Kalibrační roztoky	38
3.8	Analýza technikou ICP-OES.....	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
4.1	Optimalizace sorpčního gelu	39
4.1.1	Příprava	39
4.1.2	Akumulační faktor.....	40
4.1.3	Eluční faktor	40
4.2	Stabilita modelového roztoku.....	41
4.3	Optimalizace techniky DGT v modelovém roztoku kovů	42
4.3.1	Test lineární akumulace v závislosti na čase.....	42
4.3.2	Test lineární akumulace v závislosti na reciproké difúzní tloušťce	44

4.3.3	Základní DGT experiment	47
4.3.4	Vliv konkurenčních prvků Ca a K.....	48
4.4	Ověření výkonnosti techniky DGT v matrici mléka	49
4.4.1	Test lineární akumulace v závislosti na čase.....	49
4.4.2	Základní DGT experiment	51
4.5	Analýza reálného vzorku mléka	51
5	ZÁVĚR.....	53
6	SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	62
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	63

1 ÚVOD

Mléko je konzumováno po celém světě už po tisíce let. Jeho produkce činí přes 500 milionů tun – mléko se tak stalo jednou z hlavních složek mezinárodního obchodu. Z nutričního hlediska mléko představuje téměř kompletní zdroj živočišných bílkovin, tuků, sacharidů a minerálních látek. Co se týče obsahu minerálních látek je mléko bohaté především na vápník, draslík, chlor a fosfor, ale obsahuje i množství mikroprvků jako je zinek, železo, měď a mangan. Všechny tyto kovy se v určitém množství podílí na vývoji a růstu člověka a na správném fungování metabolismu lidského organismu. Jakýkoliv nedostatek či nadbytek těchto základních prvků může vést k narušení základních funkcí organismu.

Kromě výše zmíněných prvků se do mléka vlivem průmyslových a zemědělských procesů může dostávat stopových prvků, často označovaných za toxické. Nadbytek těchto kovů v mléce pak představuje značné riziko, i proto, že je konzumováno i dětmi. Proto je důležité provádět kontroly potravin za účelem zachování jejich bezpečnosti.

Analýza těchto stopových prvků včetně mléka však vyžaduje použití vysoce citlivých technik – při analýze mléka se nejvíce využívá spektrometrických technik jako je ICP-OES a ICP-MS. Při přímé analýze mléka se jako problematická jeví komplikovaná matrice, která může způsobit spektrální či nespektrální interference. Pro odstranění matrice mléka se proto využívá rozkladů na suché a mokré cestě. Tyto postupy jsou však poměrně časově náročné a použití různých činidel může vést ke kontaminaci vzorku. Další možností separace analytů od komplikované matrice jsou extrakční techniky.

Jednou z extrakčních technik je také technika difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT), která umožňuje separaci a prekoncentraci analytů ze složité matrice na stopové až ultrastopové úrovni. Díky tomu je schopna snížit citlivost běžně používaných technik pro stanovení kovů. První využití technika DGT nalezla v environmentální analýze, ale v posledních letech si našla uplatnění i v analýze potravin např. při stanovení olova v sójových omáčkách nebo rtuti v rybích omáčkách.

Cílem této diplomové práce je aplikovat techniku DGT za použití sorpčního gelu se zakomponovaným sorbentem Chelex 100 pro stanovení vybraných mikroprvků v mléce s následnou detekcí na ICP-OES.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mléko

Mléko je tekutina vylučovaná mléčnými žlázami samic savců, primárně určena pro výživu svých mláďat. Z výživového hlediska mléko dodává energii i všechny potřebné živiny ve snadno stravitelné formě pro rychlý růst a vývoj novorozenců. Z fyzikálně-chemického hlediska je mléko polydisperzní systém, jehož složky se nachází ve třech fázích – emulzní, koloidní a molekulární. Emulzní fáze je tvořena mléčným tukem nacházejícím se ve formě tukových kapének. Hlavní mléčnou bílkovinou je kasein, který představuje koloidní disperzi. V molekulární disperzi jsou přítomny sacharidy, vitamíny, dusíkaté látky, minerální látky a plyny [1, 2, 3].

2.1.1 Složení mléka

Zastoupení jednotlivých složek mléka je proměnlivé a závisí na několika faktorech – na výživě, zdravotním stavu a věku zvířete, ale i např. na změně ročního období nebo stadiu laktace [2, 4]. Průměrné složení mléka je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1 Průměrné základní složení kravského mléka [4]

Hlavní složka	Zastoupení [%]
Voda	87,0
Laktóza	4,0–5,0
Tuky	3,0–4,0
Bílkoviny	3,0
Minerální látky	0,8
Vitamíny	0,1

2.1.1.1 Voda

Nejvíce zastoupenou složkou mléka je voda, která je její nezbytnou součástí. Vyskytuje se ve třech fázích – volná voda, ve které jsou rozpuštěny složky jako soli, glycidy; voda vázaná na koloidy (tvoří pouze asi 3 %) a silně vázaná krystalická voda [5].

2.1.1.2 Sacharidy

Ze sacharidů je v mléce obsažen z 99 % disacharid laktóza (redukující cukr složený z D-glukózy a D-galaktózy), který slouží především jako zdroj energie, podporuje absorpci vápníku a dodává mléku nasládlou chuť. Ve stopových množstvích je zastoupena i glukóza, galaktóza, fruktóza, glukosamin, galaktosamin a kyselé a neutrální oligosacharidy [3].

2.1.1.3 Tuky

Tuk je v mléce dispergován ve formě tukových kapének a vytváří emulzi olej ve vodě. V mléčném tuku se nachází 97–98 % triacylglycerolů, zbylé množství představují diacylglyceroly (0,3 %), monoacylglyceroly (0,03 %), volné mastné kyseliny (0,1 %),

fosfolipidy (0,8 %), steroly (0,3 %), karotenoidy a vitamíny rozpustné v tucích (ve stopovém množství). Mastné kyseliny obsažené v mléčném tuku jsou ze 70 % nasycené (především palmitová, miristová, stearová) a z 30 % nenasycené (nejvíce olejová, méně linolová, linolenová). Mléčný tuk je hlavním energetickým zdrojem pro výživu, a podílí se na senzorických a reologických vlastnostech mléka [1, 3, 4].

2.1.1.4 Bílkoviny

Bílkoviny mléka se dělí na rozpustné a nerozpustné bílkoviny. Nerozpustné bílkoviny – kaseiny zaujímají 80 % frakce mléčných bílkovin. Zbylých 20 % představují rozpustné bílkoviny, označované jako syrovátkové. Obě tyto bílkoviny jsou dobře stravitelné a považované za vysoce kvalitní zdroj aminokyselin [2, 4].

Hlavní funkcí kaseinů je vazba minerálních látek, především vápníku a fosforu. Kaseiny lze rozdělit na α_{s1} - , α_{s2} - , β - a κ -kasein. Navzájem se odlišují obsahem aminokyselin, elementárním složením a hodnotou izoelektrického bodu. Chemicky se řadí mezi fosfoproteiny a jsou schopny se shlukovat do komplexů a micel. Mezi hlavní proteiny syrovátkových bílkovin se řadí α -laktoalbumin (40 %), β -laktoglobulin (20 %), imunoglobuliny a sérový albumin. Mají globulární charakter a řadí se k hydrofilním koloidům. Při zahřevu nad teplotu 80 °C denaturují a získávají tak schopnost vázat těžké kovy pomocí thiolových skupin. V minoritním zastoupení k bílkovinám mléka se dále řadí laktoferin, transferin, kininogen a další [3].

2.1.1.5 Vitamíny

Mléko se vyznačuje bohatým zastoupením vitamínů. Z vitamínů rozpustných v tucích se v mléce nacházejí vitamíny A, D, E a K. Jejich množství závisí především na obsahu mléčného tuku. Mají nezastupitelnou roli v lidském organismu, kde se podílejí na procesech zrakového vjemu nebo krevního srážení, v mléce se vyskytují pouze ve stopových množstvích. V jisté míře se v mléce vyskytují i vitamíny rozpustné ve vodě (B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂ a vitamín C). Hydrofilní vitamíny jsou důležitými kofaktory v několika metabolických procesech. Jejich přibližné množství v mléce zaujímá 0,05–0,14 mg/100 g [3, 4, 6].

2.1.1.6 Minerální látky

Minerální látky v mléce zaujímají 0,8 % z celkového složení mléka a vyskytují se v několika chemických formách – ve formě anorganických iontů a solí, nebo se vážou na organické molekuly (bílkoviny, tuky, sacharidy a nukleové kyseliny). V metabolismu mají řadu důležitých fyziologických funkcí, kde se uplatňují např. jako součásti strukturních složek tkání, enzymů a dalších biologicky důležitých molekul. Obsah minerálních látek v mléce však není konstantní a mění se v závislosti na výživě zvířete, podmínkách životního prostředí nebo genetických faktorech [2, 7].

Mléko je především hlavním zdrojem vápníku, draslíku a sodíku. V mléce se vyskytují ve formě solí kyseliny citronové a fosforečné. Převážná část vápníku se váže na kaseiny, zbylé množství je vázáno na α -laktoalbumin nebo se nachází v rozpustné formě jako citrát vápenatý. Sodík a draslík jsou z velké části přítomny v pravém roztoku ve formě částečně disociovaných solí. K dalším makroprvkům mléka se řadí fosfor, který se vyskytuje především v organické

formě vázaný na kasein, částečně se taky vyskytuje jako anorganický fosfát. V neposlední řadě lze v mléce najít hořčík a chlor. Tabulka 2 uvádí jejich zastoupení v kravském mléce [3].

Ve stopovém množství se v mléce vyskytují další prvky jako železo, zinek, měď, mangan, jód, fluor, selen, kobalt, chrom, molybden, nik, křemík a bór (Tab. 3). Tyto prvky se označují jako mikroprvky a v metabolismu člověka hrají převážně nutriční roli a jsou součástí katalyzátorů pro chemické reakce [2, 3].

Tab. 2 Průměrné množství makroprvků v kravském mléce [2]

Prvek	Koncentrace [mg/l]	Prvek	Koncentrace [mg/l]	Prvek	Koncentrace [mg/l]
K	1 360	Cl	970	Na	530
Ca	1 120	P	890	Mg	100

Tab. 3 Průměrné množství mikroprvků v kravském mléce [2]

Prvek	Koncentrace [mg/l]	Prvek	Koncentrace [µg/l]	Prvek	Koncentrace [µg/l]
Fe	0,50	I	100–770	Cr	2,0
Zn	3,90	F	20	Ni	26,0
Cu	0,09	Se	10,00	Mo	50,0
Mn	0,03	Co	0,50	Si	3 000,0

2.2 Charakteristika vybraných stopových prvků

2.2.1 Esenciální prvky

Některé kovy se v potravinách vyskytují přirozeně, to znamená, že se do potravin dostaly v důsledku koloběhu prvků v přírodě a jejich přirozeným rozšířením v různých částech biosféry. V takovém případě se označují jako esenciální a v charakteristických koncentracích zastupují významné role v metabolických drahách. Při nedostatečném množství mohou vyvolat poruchy v metabolismu lidského těla. V případě, že se v potravinách vyskytují ve vysokých koncentracích, mohou tyto prvky vyvolat toxické účinky. Pak tyto látky označujeme jako kontaminující. K těmto prvkům se řadí hlavně Fe, Zn, Cu, Mn, Co a Ni. Jejich zastoupení v mléce je zobrazeno v tabulce 4 [6, 8, 9, 10].

Tab. 4 Zastoupení stopových prvků v kravském mléce (syrovém a pasterovaném) a jejich doporučená denní dávka (DDD) [2, 6, 15]

Prvek	Koncentrace v syrovém mléce [mg/l]	Koncentrace v ošetřeném mléce [mg/l]	DDD [mg]
Fe	0,72	0,80–11,84	10–15
Zn	0,98	0,48–1,54	10–12
Cu	0,17	0,08–0,16	1,5–3,0
Mn	0,08	0,04–0,09	2–5
Co	neměřeno	0,000 5	neměřeno
Ni	0,04	0,04–0,05	0,1–0,5

Železo

Železo je zásadní stopový prvek pro lidský organismus. Nachází se jako součást proteinů hemoglobinu, myoglobinu a cytochromu, kde se účastní přenosu, využití a ukládání kyslíku. Nedostatečný příjem železa v dietární dávce může způsobovat anémii a snížení imunity, naopak nadměrný příjem železa (>1 000 mg/den) vede až k poškození jater [2, 6].

V mléce se železo váže na tuky, bílkoviny a jiné molekuly. Ze 14 % se železo váže na membránu tukových kuliček, z 53 % na kaseiny a syrovátkové bílkoviny. 32 % železa je spojeno s nízkomolekulárními látkami v mléce [2, 5].

Některé potraviny mohou být obohacovány právě o železo z důvodu dosažení dostatečného příjmu železa potravou, k tomuto procesu se využívá sloučenin železa jako jsou sírany, fosforečnany či uhličitany, ale i například elementární železo. Nejčastěji fortifikovanými potravinami jsou mléčné výrobky, především pak výrobky určené pro náhradní kojeneckou výživu [6].

Zinek

Zinek se vyskytuje v těle dospělého člověka v množství 1,4–3,0 g, nejvíce ve svalové hmotě a kostech. V organismu se nachází jako součást více než 200 různých druhů enzymů, které jsou nezbytné pro katalytické funkce v těle. Nedostatek zinku ve stravě může vést ke ztrátě chuti, vypadávání vlasů a nehtů, u dětí vede dokonce k pomalejšímu růstu. V případě vysokých dávek je zinek toxický a dráždí sliznici trávicího ústrojí [6].

Převážná distribuce zinku v mléce se nachází v bílkovinné frakci, zejména v kaseinech (1/3 volně vázaná v kaseinových fosfoserinových reziduech, 2/3 pevně vázány na koloidní fosforečnan vápenatý). 1–3 % zinku se nachází v lipidové frakci [2].

Měď

Měď je jedním ze stopových prvků, který je esenciální pro všechny organismy. Zastoupení mědi lze nalézt v enzymech jako jsou hydroxylázy, superoxidodismutázy, aminoxidázy a jiné. V potravinách se měď vyskytuje ve vyšší dávce v játrech, sýrech nebo černém čaji (10–33 mg/kg). Naopak nízký obsah mědi obsahuje mléko (0,05–0,20 mg/kg). Deficit mědi může postihnout funkci imunitního systému či centrálního nervového systému, ale nedostatek mědi u lidí je spíše vzácný. Denní dávka mědi je důležitá, protože je nezbytná pro efektivní využití železa [6, 11].

Téměř většina mědi je vázána na nízkomolekulární látky a kaseiny mléka. Pouze 8 % je vázáno na syrovátkové bílkoviny a 2 % se nachází v tukové frakci [2].

Mangan

Mangan je důležitým kofaktorem řady enzymů jako je např. argináza a pyruvátcarboxyláza, která je jedním z důležitých enzymů při biosyntéze sacharidů. Manganaté ionty jsou součástí hydroláz, kináz nebo glykosyltransferáz. Nejvyšší množství manganu v lidském těle lze nalézt hlavně v kostech, játrech a ledvinách, méně v mozku a slezině. Nedostatek manganu v organismu je důležitý pouze z dlouhodobého hlediska, kdy může způsobit zpomalený růst nebo abnormální vývoj kostí. Vysoké dávky manganu mohou způsobit anémii, ale otrava manganem je velmi málo pravděpodobná [6].

V potravinách se mangan nachází převážně ve formě manganatých iontů nebo labilních komplexů. V mléce je distribuce manganu následující: 67 % je vázáno na kaseiny, 14 % na syrovátkové bílkoviny, 18 % na nízkomolekulární látky a 1 % se nachází v tukové frakci [2, 6].

Kobalt

Nezbytným prvkem je pouze pro přežvýkavce, bakterie a řasy. U lidí je důležitý jako součást vitamínu B₁₂ (kyanokobalaminu). Toxicita kobaltu způsobuje kardiovaskulární a bronchopulmonální účinky. Distribuce kobaltu v mléce a jeho chemická forma nebyla dosud dostatečně popsána [2, 6, 11].

Nikl

V malém množství je nikl důležitým kofaktorem některých enzymů, dále se může účastnit při vstřebávání železa. Sloučeniny niklu způsobují podráždění kůže, tetrakarbonyl niklu je vysoce toxická a karcinogenní látka, která je lehce vstřebávána plicemi. V potravinách se mohou vyskytovat vyšší hladiny niklu v důsledku skladování v kovových nádobách. O vazbě niklu a jeho chemické formě v mléce nejsou vedeny dostačující informace [2, 6].

2.2.2 Toxické prvky

Ostatní stopové prvky vstupují do potravního řetězce v důsledku činností lidí. Zejména z průmyslových a zemědělských procesů. Jsou to látky toxické a mohou vyvolat škodlivé účinky na lidské zdraví v důsledku jejich bioakumulace v lidských tkáních. V kravském mléce bylo detekováno např. olovo, arsen, kadmium a chrom (Tab. 5) [9, 12].

Tab. 5 Množství těžkých kovů v syrovém kravském mléce [12]

Prvek	Koncentrace v mléce [$\mu\text{g/l}$]
Pb	0,030–10,460
Cd	0,010–0,270
Cr	0,020–5,010
As	0,002–1,530

Olovo

Ke znečištění mléka olovem přispívá řada faktorů (znečištěná krmiva, klimatické faktory pesticidy), z nichž nejdůležitějším zdrojem kontaminace je voda. V přírodních vodách bylo detekováno 5 $\mu\text{g/l}$ olova, pro pitnou vodu je maximální hranice koncentrace olova 10 $\mu\text{g/l}$. Pro syrové mléko, tepelně ošetřené a pro mléko na výrobu mléčných produktů je stanovený limit 0,020 mg/kg čerstvé hmotnosti [6, 10, 14].

Olovo způsobuje poškození centrálního nervového systému, anémii a poškození ledvin. Je zvláště nebezpečné pro ženy v prenatálním období, kdy může prostoupit placentou a způsobit potrat. K otravám olova dochází ale velmi málo, vzhledem k jeho nízkým koncentracím v potravinách [10, 13].

Kadmium

V životním prostředí se kadmium vyskytuje převážně v půdách, sedimentech a mořské vodě. Hlavním zdrojem kontaminace potravin kadmiiem pochází z fosforečnanových hnojiv, ve kterých se koncentrace kadmia pohybuje mezi 2 až 100 mg/kg. Obecně 30 % celkové zátěže kadmiiem pochází z živočišných produktů a 70 % z rostlinných [8, 10].

Nadměrný příjem Cd ve stravě způsobuje zhoršenou funkci ledvin, poškozuje játra a pohlavní orgány. Vykazuje taky karcinogenní a teratogenní účinky [13].

2.3 Metody stanovení prvků v mléce

Pro zhodnocení kvality mléka se analyzují mikroprvky jako je Al, Pb, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Mn, Ni, P, Sb, Si, Sn, Zn a Ti. Nejběžněji používanými technikami pro prvkovou analýzu jsou atomová absorpční spektrofotometrie, optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) [15, 16].

Výběr vhodné instrumentální techniky závisí především na typu měřeného vzorku, na předpokládané koncentraci a druhu analytu ve vzorku, ale také na časové náročnosti analýzy, nákladech a dostupnosti instrumentální techniky. Tabulka 6 uvádí souhrn charakteristik nejpoužívanějších technik [2].

Tab. 6 Souhrn analytických výkonnostních charakteristik technik používaných při analýze mléka a mléčných výrobků [2]

Technika	Objem vzorku [ml]	LOD [ng/ml]	Multielementární analýza	Vliv matrice vzorku na analýzu	Spektrální interference	Přesnost měření (% RSD)
F-AAS	5–10	$1-10^3$	Potenciálně	Velký	Malé	0,5–1,0
ET-AAS	0,01–0,10	$10^{-2}-10^{-1}$	Potenciálně	Mírný	Malé	3,0–5,0
ICP-OES	1–10	$20^{-1}-10^1$	Ano	Malý	Velké	0,5–1,0
ICP-MS	1–10	$10^{-3}-10^{-2}$	Ano	Mírný	Významné	1,0–3,0

Atomová absorpční spektrometrie

AAS je nejběžněji používanou metodou pro především jednorvkové stanovení 60 až 70 prvků periodické tabulky v množství od jednotek $\mu\text{g/l}$ až po desetiny g/l . Základním principem je absorpce záření volnými atomy sledovaného analytu v základním energetickém stavu vznikajících v atomizérech. Nevýhodou techniky jsou chemické a fyzikální interference (nespektrální interference). Spektrální interference jsou u dané techniky spíše vzácné [17, 18].

Plamenová atomová absorpční spektrometrie (F-AAS) je relativně jednoduchá metoda, která využívá k atomizaci vzorku plamen nejčastěji tvořený směsí acetylenu a vzuchu a umožňuje přímou analýzu kapalných vzorků. Nevýhodou techniky je nemožnost měření více prvků během jedné analýzy. Je však vhodnou a často využívanou technikou pro stanovení Ca, Cu, Fe, Mg, Mn a Zn v mléce [2].

Naproti tomu atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS) provádí atomizaci vzorku v grafitové trubici, je schopna přímo analyzovat vzorky v pevném skupenství, poskytuje nižší detekční limity a pro analýzu vyžaduje malé množství vzorku (viz tabulka 6). Nevýhodou techniky je časová náročnost analýzy, která se pohybuje v řádu minut, větší vliv spektrálních interferencí než u F-AAS a nižší lineární dynamický rozsah. Z těchto důvodů je více používanou technikou F-AAS [2, 18].

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

ICP-MS je nejrozšířenější analytická technika pro kvantitativní stanovení stopových a ultrastopových koncentrací téměř všech prvků periodické tabulky. Je to rychlá a citlivá technika umožňující multielementární analýzu, díky čemuž poskytuje úplnou informaci o daném vzorku. Problémy u této techniky představují spektrální i nespektrální interference. ICP-MS je schopná také provádět izotopovou analýzu a detekovat nekovové prvky, což se uplatňuje pro stanovení fosforu a jódu v mléce. ICP-MS nachází uplatnění nejen v analýze potravin, ale i životním prostředím [17].

Principem techniky je převedení molekul vzorku na ionty v iontovém zdroji za dodání energie. Následně jsou vzniklé ionizované částice separovány podle poměru m/z (hmotnost/náboj) v separátoru iontů, nejčastěji v kvadrupólu. Vybrané ionty dopadají na

detektor, kde dochází k zesílení signálu v elektronovém násobiči a výsledný signál je zpracován počítačem [18].

2.3.1 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je jedna z nejrozšířenějších technik pro stopové stanovení prvků převážně v životním prostředí a potravinách, ale i v biologických vzorcích a ropných produktech. Výhodou techniky je schopnost multielementární analýzy více než 70 prvků periodické tabulky, rychlé stanovení vzorků (10^1 – 10^2 /hod), široký lineární rozsah (5–6 řádů), přesnost měření (0,5–2,0 % RSD), správnost měření (≈ 1 % RSD), automatizovaný provoz s použitím programovaných dávkovačů. K nevýhodám techniky se řadí vysoké pořizovací a provozní náklady, interference maticí vzorku [18, 19, 20].

2.3.1.1 Princip

Technika optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem využívá jevu emise fotonů při přechodu elektronu ze základního do vyššího energetického stavu v atomu. Energie fotonu je charakteristická pro daný prvek a množství vyzařených fotonů je úměrné koncentraci tohoto prvku [21].

2.3.1.2 Instrumentace

Technika ICP-OES využívá relativně jednoduché instrumentace: zmlžovače a mlžné komory, ve kterých dochází k tvorbě aerosolu. Ten je nasměrován do indukčně vázaného plazmatu (ICP), ve kterém se udržuje teplota až 10 000 K. Plazma umožňuje odpaření matrice aerosolu, atomizaci prvků a excitaci elektronů v atomu, následně jejich deexcitaci do základního stavu při emisi fotonu. Fotony jsou shromažďovány v optickém zařízení, kde dochází k separaci fotonů určité vlnové délky pomocí monochromátoru. Fotony určité vlnové délky jsou poté převedeny na elektrický signál fotodetektozem a ten je zobrazen i uložen do osobního počítače (Obr. 1) [22].

2.3.1.2.1 Zmlžovače

V technice ICP-OES se nejčastěji využívají dva typy zmlžovačů – pneumatické a ultrazvukové. Oba zmlžovače slouží k přeměně kapalného vzorku na aerosol, který je následně transportován do plazmatu. Pneumatické zmlžovače využívají vysokorychlostní proud (1 l/min) argonu k vytvoření aerosolu, avšak do plazmatu se dostává velmi malá část ze vzorku, jen asi 5 %, zbytek z objemu vzorku odtéká do odpadu. Jeho předností je jeho stabilita a jednodušší použití, zatímco ultrazvukové zmlžovače se vyznačují vyšší účinností asi 20 %, čímž zvyšují i citlivost přístroje. Jejich nevýhodou jsou maticové efekty a vyšší pořizovací náklady. Principem ultrazvukových zmlžovačů je tvorba aerosolu ultrazvukovou oscilací pomocí piezoelektrické destičky, jsou tak nezávislé na průtoku plynu [22, 23].

Mezi zmlžovač a hořákem je umístěna ještě mlžná komora, která odstraňuje příliš velké kapičky z aerosolu a umožňuje tak vstup do plazmatu pouze asi 8 μm (v průměru) jemných kapiček. Případně může mlžná komora tlumit vznikající pulzy při rozprašování a poskytovat tak jistou stabilitu [22].

2.3.1.2.2 Indukčně vázané plazma

Hořák, který umožňuje vznik indukčně vázané plazmy (ICP) se skládá ze tří koncentrických skleněných trubic – prostřední, vnější a vnitřní, kterými protéká proud plynu. Okolo vnější trubice je umístěna měděná cívka se třemi závity (skrz kterou cirkuluje voda), která je připojená k vysokofrekvenčnímu generátoru. Přivedená vysokofrekvenční energie způsobí indukci magnetického pole a jiskra z Teslova transformátoru zionizuje plasmový plyn (Ar). Vzniklé elektrony a ionty vzniklé po ionizaci plazmatem jsou následně urychleny magnetickým polem a při srážce s dalším proudem plasmového plynu způsobí další ionizaci řetězovou reakcí – tento proces pokračuje, dokud se nevytvoří plazma. Vnější proud plasmového plynu pak udržuje plazma při vysoké teplotě a koncentruje ho uvnitř vnějších stěn. Vnitřní proud plasmového plynu také označovaný jako nosný plyn prorazí otvor ve středu plazmatu a vnese do něj vytvořený aerosol, zároveň pomáhá udržovat tvar plazmatu. Posledním vstupujícím proudem plynu do plazmatu je pomocný plyn, jehož funkcí je nadsvedávání plazmatu a ředění vnitřního argonu v přítomnosti organických látek [22, 24].

Po vnesení aerosolu do plazmatu dochází k následujícím procesům: desolvataci, odpaření rozpouštědla, atomizaci, ionizaci a excitaci, poté následuje emise záření. K atomizaci dochází v předehřívací zóně (7 000 K), k ionizaci a excitaci dochází v počáteční radiační zóně (6 200 K) a k emisi záření v normální analytické zóně (5 800 K). Plazma dosahuje teploty až 10 000 K. [22].

2.3.1.2.3 Optické zařízení

Záření emitované z plazmatu dopadá na optickou čočku a prochází skrz vstupní štěrbinu do spektrometru. V praxi jsou k dispozici dva typy spektrometrů: sekvenční (monochromátor) a simultánní (polychromátor). V případě sekvenční analýzy je konstrukce zařízení jednodušší, zahrnuje vstupní optiku, difrakční mřížku a výstupní optiku. Volba vlnové délky je zvolena na hlavním počítači a následně je difrakční mřížka rotačním pohybem přesunuta do požadované polohy. Typickým příkladem sekvenčního spektrometru je Czerny-Turner [22, 24].

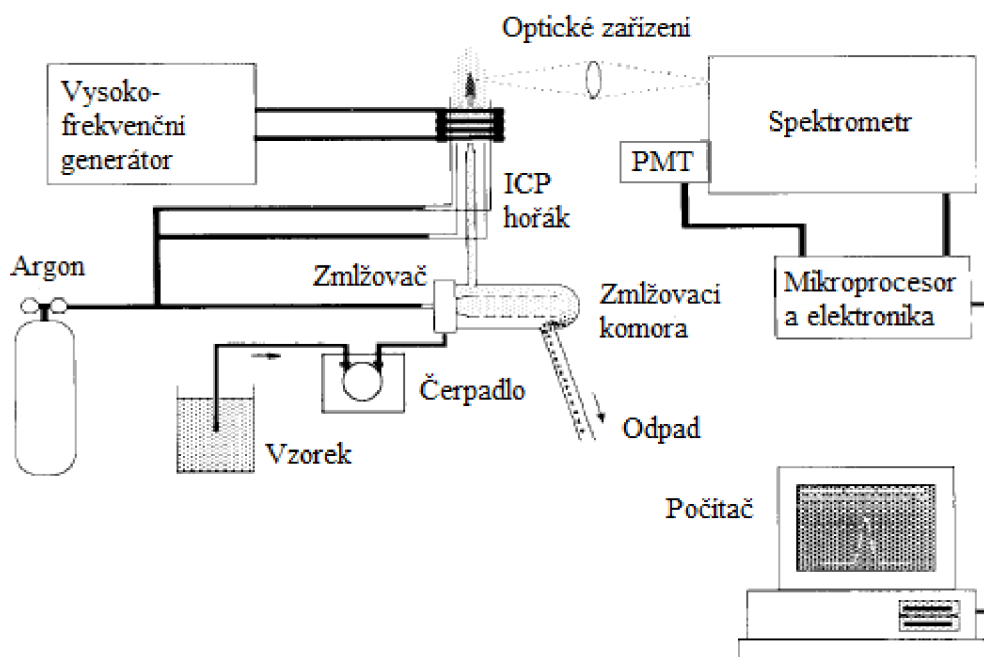
Jiným typem je simultánní spektrometr, který umožňuje v jednom okamžiku snímat celé emisní spektrum. Tento systém je umožněn díky polychromátoru, který obsahuje ve své konstrukci vstupní štěrbinu, mřížku a několik výstupů umístěných podél obvodu kruhu. V tomto případě mřížka neprovádí žádný rotační pohyb a má konkávní vzhled [21, 24].

2.3.1.2.4 Detekce

Po dosažení výběru vlnové délky daným spektrometrem vniká spektrální informace, kterou je potřeba převést na elektrický signál. Tento proces se provádí pomocí fotonásobiče (PMT), vícekanálovým detektorem pro přenos náboje (CTD) nebo s vázaným nábojem (CCD) [24].

Fotonásobič je konstrukčně vakuová trubice složená ze dvou elektrod. Katoda má tvar svislého dutého půlválce s velkou plochou vyrobeného z fotoemisního materiálu a anoda je ve formě drátu, případně mřížky určená pro sběr elektronů. Mezi katodou a anodou jsou ještě uloženy dynody. Princip detektoru spočívá v dopadnutí fotonu emitovaného z ICP na fotokatodu, zde dochází k vyrazení elektronu, který je urychlený a směřuje k první dynodě. Při nárazu dojde k uvolnění dalších dvou nebo více elektronů, ty jsou opět urychleny a směřují

k další dynodě, kde z každého elektronu jsou vyraženy další dva nebo více elektronů atd. Nakonec je signál vyhodnocen řídicím počítačem [22].



Obr. 1 Schematické znázornění přístroje ICP-OES, upraveno [23]

2.3.1.3 Interference

Technika se potýká s řadou problémů v oblasti interferencí, které mohou následně zkreslovat výsledné měřené hodnoty stopových prvků. Jedná se především o spektrální interference, které souvisí s maticí daného vzorku. Způsobují je přídavné látky ve vzorku (prvky a molekuly), které emitují záření ve zvoleném spektrálním intervalu. V případně podobnosti dvou vlnových délek prvků (např. pro Na 285,28 nm a pro Mg 285,21 nm) může dojít ke sběru falešně pozitivního nebo nadhodnoceného signálu. Tyto interference však lze obvykle kontrolovat pomocí korekčních faktorů pro interferující prvky přímo z hlavního počítače [18].

Další interference projevující se v ICP-OES jsou nespektrální interference – způsobeny fyzikálními a chemickými ději. Fyzikální interference přispívají k chybám, které negativně ovlivňují výslednou analýzu při prvotních procesech jako je nasávání nebo zmlžování vzorku, ale i při následném odpařování. Chemické interference souvisí s projevy atomizace v plazmatu [18].

2.3.2 Metody úpravy vzorku mléka

Před samotným stanovením prvků na některé z výše uvedených technik je nejdříve potřeba provést předběžnou úpravu vzorku mléka tak, aby byl překonán potenciální rušivý efekt komplexní (tukové a proteinové) matrice a také, aby se zvýšila citlivost použité metody. Většina úprav slouží k převedení vzorku do kapalné homogenní formy se sníženou viskozitou, pro lepší

zavedení vzorku pomocí autosampleru do některé z analytických technik. A také pro uvolnění sledovaných analytů z různých komplexů a vazeb do roztoku [25, 28].

K takovým úpravám vzorku se nejčastěji využívají metody:

- Analýza zředěného mléka
- Metody rozkladů vzorku mléka
- Prekoncentrace prvků ze vzorku mléka

2.3.2.1 Analýza zředěného mléka

Stanovení prvků v mléce přímou analýzou po zředění je atraktivní metoda úpravy vzorku díky své rychlosti a minimální manipulaci se vzorkem – čímž se předchází kontaminaci vzorku použitím činidel [26].

Přímé stanovení prvků v mléce na přístroji ICP-OES zahrnuje pouze vhodné ředění mléka bez jakékoliv předchozí úpravy. Podle M. Antonia Muricia a kol. bylo provedeno ředění mléka 1:50 pro makroprvky a 1:25 pro mikroprvky (Zn) a následně byly výsledky porovnány se vzorky, které byly upraveny mineralizací (Tab. 7). Výsledné hodnoty prokázaly, že přítomnost tuku v mléce nezpůsobuje větší matriční efekty dané techniky [27].

Tab. 7 Porovnání přímé analýzy mléka s mlékem po úpravě mineralizací [27]

prvek	Přímá analýza	Po mineralizaci
Ca	1 291,0 ± 11,0	1 300,0 ± 12,0
K	1 767,0 ± 61,0	1 780,0 ± 66,0
Zn	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,6

2.3.2.2 Metody rozkladů vzorku mléka

K metodám rozkladu mléka se využívají takové postupy, které vedou k úplnému rozložení tukové a proteinové matrice mléka. Toho lze dosáhnout vystavením mléka silné minerální kyselině (tzv. mokrý způsob), zpopelněním vzorku mléka pomocí vysoké teploty (tzv. suchý způsob) nebo mikrovlnnou digescí (Tab. 8) [16, 28, 29].

Fáze odstranění matrice rozkladem v přítomnosti silné kyseliny bývá často kritickým krokem, protože může vést ke ztrátám analytu a jeho kontaminaci, a tím přispět k chybám systematické analýzy. Proto se dále vyvíjejí nové postupy, které by vedly k minimálnímu ošetření vzorku, aby se zabránilo problémům s kontaminací, a tím i k časově méně náročné úpravě a také ke snížení nákladů na analýzu [30].

Tab. 8 Porovnání limitů detekce (LOD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) daných metod pro stanovení zinku v kojenecké mléčné výživě [29]

Parametry	Mokrý způsob	Suchý způsob	Mikrovlnná digestce
LOD [$\mu\text{g/kg}$]	4,9	5,7	4,9
RSD [%]	5,1	3,6	1,2

2.3.2.3 Prekoncentrace prvků ze vzorku mléka

Prekoncentrační krok může zlepšit citlivost i selektivitu dané techniky. Za prekoncentraci považujeme získávání analytu z velkého objemu vzorku na menší objem rozpouštědla. K prekoncentračním metodám můžeme zařadit extrakci na pevné fázi (SPE) za použití např. kolonové techniky. Zde jsou zadržovány sloučeniny a prvky na pevných fázích (např. silikagel nebo chelatační sorbenty) a následně jsou eluovány pomocí kyselin nebo jiných činidel. Na obdobném principu pracuje i technika difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT), která se inspirovala jinými prekoncentračními technikami a voltametří [31, 32]. Tato technika je podrobně popsána v následující kapitole.

2.4 Technika DGT

Technika difúzního gradientu v tenkém filmu, označovaná jako technika DGT (angl. *Diffusive Gradients in Thin Films Technique*) byla popsána W. Davisonem a H. Zhangem v roce 1994 jako nová *in situ* technika. Prvotním zaměřením této techniky bylo stanovení zinku v mořské vodě [32].

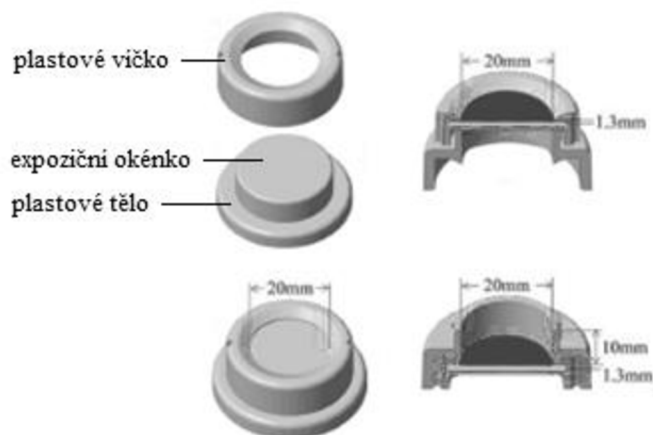
V posledních letech byla technika intenzivně vyvíjena a modifikována a dnes je její aplikace rozšířena pro analyzování významného počtu prvků a sloučenin včetně simultánního stanovení kovů, oxyaniontů, prvků vzácných zemin, radioaktivních prvků, ale i stanovení organických sloučenin jako je methylrtuť nebo rezidua antibiotik ve vodách, půdách a sedimentech [33].

Dále se technika rozšiřuje do oblasti monitorování potravin, za účelem kontroly a udržování kvality potravinářských výrobků. První takovou aplikací techniky DGT v oblasti potravinářského průmyslu je publikace H. Chena a kol. z roku 2014, která se zabývá stanovením koncentrace olova v sójových omáčkách. Ve druhé publikaci se M. Reichstädter a kol. zabývali stanovením rtuti v různých druzích rybích omáček [34, 35].

Díky prekoncentrační schopnosti je technika schopna stanovit stopová i ultrastopová množství labilních kovových specií i ze složitých maticí vzorků (řádově $1,10^{-12}$ g/l). Dalšími výhodami techniky kromě již zmíněné vysoké citlivosti, prekoncentrační schopnosti a aplikace pro mnoho anorganických a organických sloučenin a prvků je také její jednoduchost a finanční nenáročnost [36, 37].

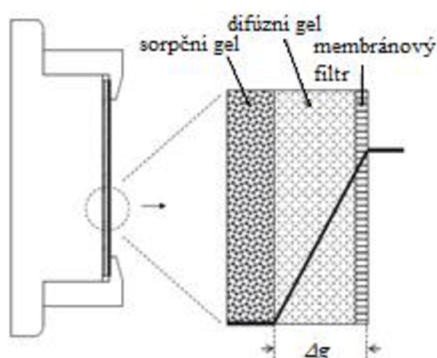
2.4.1 Vzorkovací jednotka

Vzorkovací jednotka využívaná v technice DGT pro měření ve vodném prostředí má tvar pístonu a je vyrobena z plastu. Jedná se o malé zařízení velikostně se pohybující v řádu desítek mm (Obr. 2) [33].



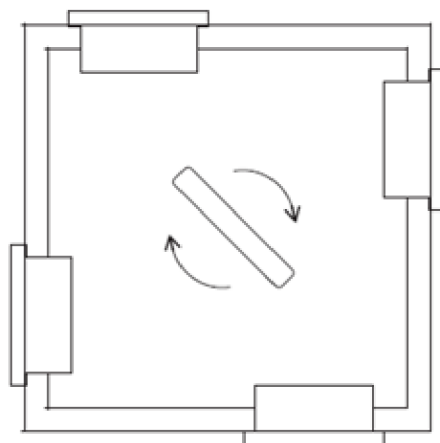
Obr. 2 Schematické znázornění vzorkovací jednotky včetně jejich rozměrů. Převzato a upraveno z [33]

Na plastové tělo jednotky DGT jsou vkládány dva hydrogely: difúzní a sorpční o přesně definované tloušťce (0,05 mm a 0,08 mm). První vrstvu tvoří gel sorpční, který je složen ze základního difúzního gelu a sorbentu obsahujícího specifické funkční skupiny sloužící pro zachycení analytu. Sorpční gel je překryt difúzním gelem umožňujícím difúzi sledovaného analytu a následně filtrační membránou, která slouží jako ochranná vrstva před poškozením a znečištěním gelů většími částicemi (Obr. 3). Běžně používanými materiály pro výrobu membrány jsou polyvinylidenchlorid (PVDF), acetát celulózy (CN) a hydrofilní polyethersulfon (PES) s velikostí pórů 0,45 μm . Vše je utěsněno plastovým víčkem s expozičním okénkem [33, 36].



Obr. 3 Schematické znázornění ukládání jednotlivých vrstev v jednotce DGT. Převzato a upraveno z [38]

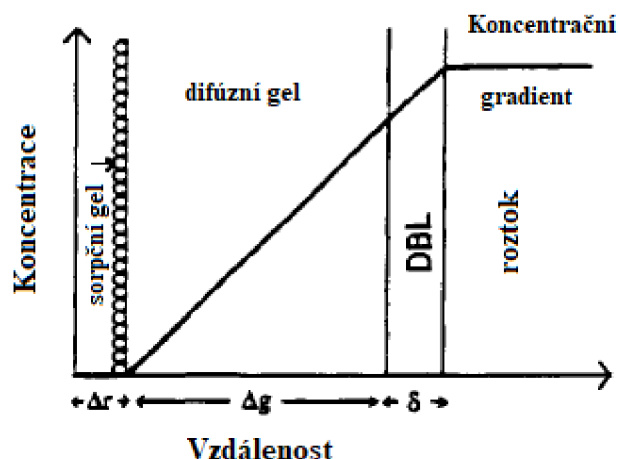
Po sestavení jsou jednotky DGT vloženy do příslušného plastového nosiče (Obr. 4), který je ponořen do měřeného roztoku.



Obr. 4 Schematické znázornění plastového nosiče, který je vystavený měřenému roztoku [38]

2.4.2 Princip techniky DGT

V roztoku dochází k difúzi analytů skrze póry difúzní vrstvy a následně jsou analyty zachyceny na sorpčním médiu. Ve velmi krátké době se tak v difúzním gelu (s přesně definovanou tloušťkou Δg) vytvoří lineární koncentrační gradient (Obr. 5) a pokud během doby měření zůstává neměnný, lze využít pro výpočty koncentrace analytu ve vzorku 1. Fickův zákon difúze. Ihned po ponoření jednotky se mezi gelovou vrstvou a měřeným roztokem vytváří ještě difúzní hraniční vrstva zvaná DBL (z angl. slova *Diffusive Boundary Layer*), ve které dochází k transportu iontů pouze molekulární difúzí a tloušťku této vrstvy je nutno připočíst k tloušťce Δg [36, 39, 40, 41].



Obr. 5 Schematické znázornění koncentračního gradientu v ustáleném stavu v zařízení DGT s vrstvou DBL. Převzato a upraveno z [40]

2.4.3 Výpočty v technice DGT

Pomocí 1. Fickova zákona lze vyjádřit tok analytu přes difúzní vrstvu známé tloušťky Δg podle vztahu (1):

$$F = \frac{M}{A \cdot t} = \frac{D \cdot c}{\Delta g} \quad (1)$$

kde M je množství kovu vázaného na sorpční médium (Chelex-100), A je plocha exponovaného difúzního gelu, t je doba měření, D je difúzní koeficient kovu v příslušném gelu a c je koncentrace analytu v měřeném roztoku [36].

Koncentraci sledovaného analytu c_{DGT} můžeme spočítat z rovnice (2), která je také známa jako DGT rovnice:

$$c_{DGT} = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A} \quad (2)$$

Tento vztah umožňuje vypočítat koncentraci analytu v analyzovaném roztoku pouhým změřením množství rozpuštěné látky (M), která se váže na sorpční gel. Tloušťka gelu Δg a jeho plocha A jsou známými veličinami získanými geometrickým měřením jednotky DGT, čas t lze přesně změřit. Difúzní koeficienty D lze dohledat v různých tabulkách pro široký rozsah teplot, případně lze hodnotu D získat experimentálně [38].

Nahromaděné množství analytu (M) v sorpčním gelu lze měřit přímo pomocí technik, jako je XRF, PIXE nebo jednoúčelový analyzátor AAS – AMA 254. Častěji se však využívá eluce analytů ze sorbentu (Chelex-100) do známého objemu roztoku např. HNO_3 (od 1M po koncentrovanou). Koncentrace analytů c_e pak může být změřena pomocí atomové absorpční spektrometrie, atomové emisní spektrometrie, případně hmotnostní spektrometrie [38, 40, 41]. Množství kovu M nahromaděného v sorpčním gelu po eluci pak lze vypočítat ze vztahu (3):

$$M = \frac{c_e (V^{bl} + V_e)}{f_e} \quad (3)$$

kde V^{bl} je objem sorpčního gelu, V_e je objem použitého elučního činidla a f_e je eluční faktor pro daný analyt [38].

2.4.4 Faktory ovlivňující měření techniku DGT

Aby mohla být použita základní DGT rovnice (rovnice 2) pro výpočet koncentrace je nutné, aby bylo při měření splněno několik předpokladů:

- Množství analytu, které se hromadí před dosažením ustáleného stavu je v porovnání s celkovým nahromaděným množstvím (M) zanedbatelně malé.
- Transport analytu DGT jednotkou může být popsán planární difúzí.
- Příslušné parametry měření jako jsou M , Δg , D , A a t jsou přesně známy.
- Interakce (nábojové účinky, specifické vazby analytu a složek roztoku) s difúzním gelem a membránovým filtrem jsou zanedbatelné.
- Analyt se naváže na sorpční médium sorpčního gelu tak rychle, aby nepronikl za svůj povrch [38].

2.4.4.1 Teplota

Teplota úzce souvisí s difúzním koeficientem analytu v difúzní vrstvě podle Stokes-Einsteinovy rovnice (4), která zahrnuje viskozitu vody η a absolutní teplotu T^K .

$$\frac{D_1 \eta_1}{T_1^K} = \frac{D_2 \eta_2}{T_2^K} \quad (4)$$

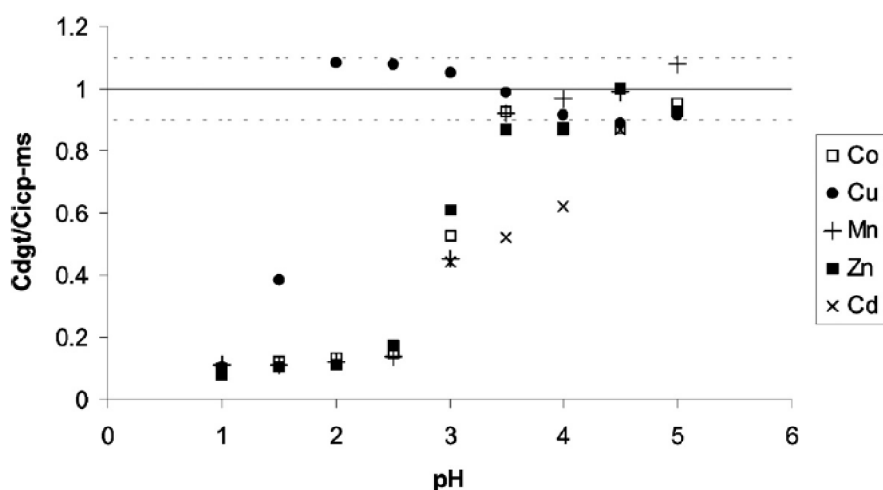
kde T je teplota ve $^{\circ}\text{C}$ a indexy (1 a 2) zobrazují hodnoty parametrů viskozity měřené při dvou různých teplotách [38].

Je tedy důležité znát přesnou teplotu měření, aby mohla být použita odpovídající hodnota difúzního koeficientu. Pokud se teplota během měření změní o 5°C , je možné využít průměrnou teplotu, avšak tato hodnota vnáší do měření chybu s velikostí do 10 %. Každý stupeň lišící se od střední hodnoty teploty pak mění hodnotu difúzního koeficientu cca o 3 %. Stanovení difúzního koeficientu s 10% a vyšší odchylkou vede k podhodnocování naměřených výsledků [38].

2.4.4.2 Iontová síla a pH

Parametry iontová síla (IS) a pH mohou způsobovat rozdílnou sílu interakce mezi sledovaným analytem a sorpčním médiem vazebného gelu. IS s hodnotami od 0,1 mM do 100,0 mM poskytují vhodnou přesnost měření technikou DGT. Dostatečná IS tak např. zabrání nežádoucím interakcím mezi záporně nabitými skupinami kyseliny pyrohroznové v difúzním gelu a kationty z roztoku, čímž by docházelo k nepřesnostem měření – tedy zvýšení poměru koncentrace v gelu ku koncentraci v roztoku nad hodnotu 1 [38].

Přesnost techniky může ovlivnit také rozmezí hodnot pH, při kterých probíhá měření. To souvisí s vlastnostmi použitého sorbentu a difúzního gelu. Optimální pH pro daný sorbent lze nalézt v příbalové informaci při koupi sorbentu, případně lze provést kontrolní experimenty v roztocích s různými hodnotami pH a ověřit si tak správnou funkci DGT (Obr. 6) [38].



Obr. 6 Výkon sorbentu Chelex 100 pro měření Co, Cu, Mn, Zn a Cd v rozmezí pH 1–5 při porovnání koncentrací měřené DGT (c_{dgt}) a technikou ICP-MS (c_{icp-ms}) [38]

2.4.4.3 Difúzní mezní vrstva (DBL)

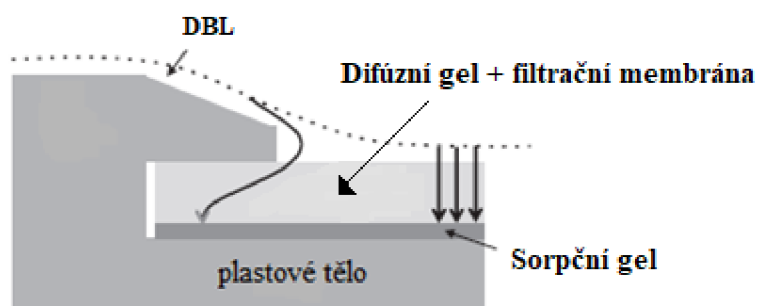
Difúzní gradient tvořící se v difúzní gelové vrstvě a membránovém filtru po ponoření do roztoku není jediným příspěvkem k celkové difúzi analytu zařízením DGT. Bylo zjištěno, že v těsné blízkosti povrchu jednotky neexistuje žádný tok, proto zde dochází ke vzniku vrstvy, skrze kterou dochází k transportu analytu difúzí (Obr. 7). Tato vrstva se označuje jako difúzní mezní vrstva a je označovaná jako DBL [38].

V dobře promíchávaných roztocích byl předpoklad, že DBL je zanedbatelně tenká vzhledem k tloušťce Δg (difúzní gel + membránový filtr) a byla tudíž ignorována při výpočtech. Při hlubším zkoumání bylo zjištěno, že tloušťka této vrstvy závisí na rychlosti toku roztoku a tloušťce difúzní gelové vrstvy. To znamená, že v případě, kdy dochází k nedostatečnému promíchávání roztoku nebo je použita malá tloušťka difúzní gelové vrstvy (např. 0,16 mm), se tvoří tenká vrstva DBL, kterou je nutno započítat do celkové tloušťky Δg . V některých případech vzniká vrstva DBL i v dobře promíchávaných roztocích, proto je potřeba ji při výpočtech zohlednit. Tloušťka DBL se vypočítá ze vztahu (5):

$$DBL = \frac{b}{m} \left(\frac{D_w}{D} \right) \quad (5)$$

kde b je posunutí a m je směrnice regresní přímky ze závislosti reciprokého množství naakumulovaného analytu na tloušťce difúzního gelu, D_w je difúzní koeficient kovu ve vodě získaný z tabulek [42].

Difúze analytu DGT zařízením je kolmá k jejímu povrchu. Difúze by mohla mít i laterální charakter, jak je schematicky znázorněno na Obr. 5. Dochází k tomu na okraji plastového okna jednotky DGT, v důsledku větší plochy vazebného gelu, než je jeho geometrická plocha. Tato nová (prodloužená) plocha se nazývá efektivní plocha A_E a závisí na konstrukci jednotky DGT a prochází vrstvou DBL i difúzní vrstvou s filtrační membránou [38].



Obr. 7 Schematické znázornění možných cest difúze skrz DBL a difúzní vrstvou. Převzato a upraveno z [38]

2.4.5 Difúzní gely v technice DGT

Difúzní gely používané v technice DGT jsou trojrozměrné polymerní sítě, které jsou vysoce hydrofilní. Jsou tvořeny až z 95 % vodou, přesto však nejsou rozpustné ve vodě. Jejich vlastností je bobtnací schopnost při dané iontové síle, pH a teplotě. Hydrogely se dále vyznačují svou pružností a elasticitou, zároveň však bývají obvykle křehké. To závisí především na

složení gelového média a způsobu přípravy. Hlavní funkcí hydrogelů v této technice je schopnost umožnit řízenou difúzi analytů. Difúzní gradient jednotlivých analytů vzniká právě v difúzní hydrogelové vrstvě, mezi vnějším roztokem a vazebným gelem. Analyt by se tak měl akumulovat pouze na povrchu vazebného gelu v sorpčním médiu a koncentrace analytu v difúzním gelu by tak měla být ideálně nulová [43, 44].

Nejvíce používanými difúzními gely v technice DGT jsou polyakrylamidové gely zesítené agarózovým derivátem (APA) nebo bisakrylamidem (BPA) a čistý agarózový gel (AGE). Gely na bázi polyakrylamidu vykazují bobtnací vlastnosti při namáčení ve vodě, stabilitu v tloušťce si udržují při pH 2–9. Velikost pórů APA gelu je >5 nm a umožňuje tak difúzi analytů do molekulové hmotnosti 106. Tento gel však není vhodný pro měření několika analytů (např. antibiotik, rtuti a amoniaku) v technice DGT, proto bývá častěji nahrazován agarózovým gelem (Tab. 9). Je třeba taky poznamenat, že akrylamid, který se používá k přípravě APA a BPA gelu, byl označen za pravděpodobný lidský karcinogen [45, 46]. Proto, pokud využíváme techniku DGT pro potravinářský průmysl, jeví se agarózový gel jako vhodnější difúzní hydrogelová vrstva. Tabulka 9 shrnuje další vlastnosti gelů.

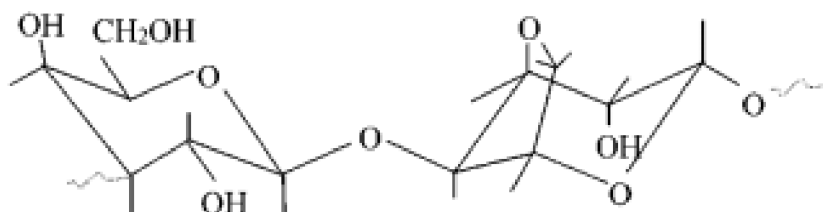
Tab. 9 Porovnání vlastností APA a AGE gelů [46]

Vlastnosti	APA gel	AGE gel
Velikost pórů	>5 nm	>20 nm
Hydratace gelu	3,2násobek tloušťky v rozmezí pH 2–9	Bez bobtnání
Stabilita tloušťky gelu	pH 2–9	Stabilní při pH 2–11, iontové síle 0–1 M, teplotě 4–40 °C, doba skladování až 300 dní
Reaktivita	Specificky váže stopové kovy a jejich komplex kyseliny fulvové. Má kladný náboj a elektrostatickou interakci s kovy při iontové síle <1 nM.	Vyznačuje se záporným nábojem s elektrostatickou interakcí s anionty a kationty při iontové síle < nM a <2–3 mM.
Difúzní koeficient	0,82 ± 0,05; respektive 0,70 ± 0,06 krát větší než difúzní koeficient kationtů a aniontů ve vodě (kromě Al)	1,10 ± 0,04 krát větší než APA gel
Cílové analyty schopné změřit technikou DGT	Hlavně anorganický NO ₃ ⁻ , oxyanionty (včetně PO ₄ ³⁻), majoritní prvky (Fe, Mn) a stopové kovy. Nelze jej využít pro měření Hg ⁺ , NH ₄ ⁺ a organických polutantů.	Schopný měřit analyty jako v APA gelu a spoustu dalších majoritních, minoritních, stopových kovů, včetně organických sloučenin.

Vlastnosti	APA gel	AGE gel
Vhodné podmínky pro nasazení DGT	Obecně pH 5–9 pro kationty i anionty (současně závisí na použitém vazebném gelu), iontová síla 1–750 nM.	Obecně pH 5–9 pro kationty a pH 4–10 pro anionty (současně závisí na použitém vazebném gelu); iontová síla 1–750 nM pro anionty a 2/3–750 mM pro kationty.

2.4.5.1 Agarózový gel

Agaróza je lineární polysacharid, který se získává z agaru nebo červených mořských řas agarového typu, po vyčištění od agaropektinu. Strukturně se jedná o β -1,3 vázanou D-galaktózu a α -1,4 vázané podjednotky 3,6-anhydro- α ,L-galaktózy s molekulovou hmotností 306 g/mol (Obr. 8). Agaróza však může být znečištěna stopovým množstvím sulfátových skupin, které mohou ovlivňovat vlastnosti gelu. Jednotlivé složení agarózy se pak liší od výrobce v závislosti na použitých surovinách a technologii výroby [44, 47, 48].



Obr. 8 Základní struktura agarózy [48]

Agarózový gel vzniká zahřátím a následným chlazením vodného roztoku agarózy. Mechanismus je řízen vodíkovou vazbou vznikající mezi molekulami agarózy. Po ochlazení se volná vlákna stávají uspořádanými a vytváří se nekonečná trojrozměrná síť, tvořená helixy agarózy (Obr. 9). Gelová síť je stabilizována vodou, ve které byla agaróza rozpuštěna. Gel může být tvořen s koncentrací agarózy již od 0,1% w/v. Pro účely techniky DGT se využívá v koncentraci 1,5%. Při této koncentraci má velikost pórů >20 nm, je poměrně křehký, a proto práce s ním musí být velmi opatrná [46, 48, 49].



Obr. 9 Mechanismus tvorby gelu [50]

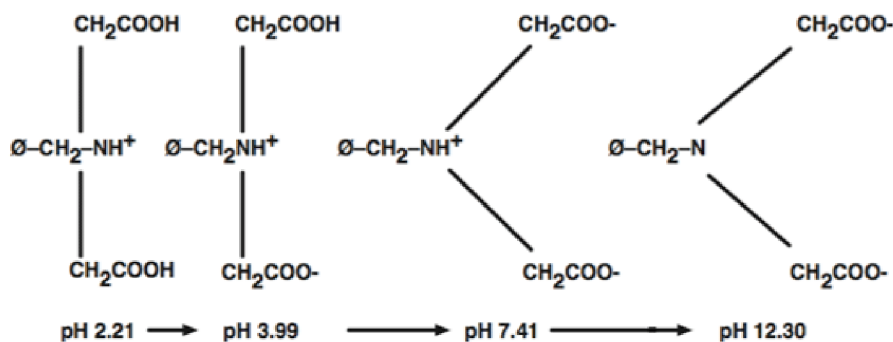
Kromě techniky DGT se agarózový gel nejčastěji využívá pro separaci DNA při elektroforéze [51], v kosmetických a farmaceutických přípravcích [52] i v potravinářském průmyslu (např. cukrářské želé, aspiky) [53].

2.4.6 Sorpční gely v DGT

Sorpční nebo-li vazebná vrstva používaná v technice DGT slouží k akumulaci analytů po průchodu difúzním gelem. Jedná se o sorpční médium imobilizované v tenké vrstvě hydrogelu, na který se specificky váže daný kov. Podle požadovaného kovu je nutno vybrat vhodný sorbent a také matici, ve které bude ukotven. Hlavním cílem vazebné vrstvy je prekoncentrace anorganických iontů stopových prvků z velkých objemů [54, 55].

Sorbenty zabudované v gelové matici bývají ve formě pevné nebo práškové. Musí mít dostatečně malou velikost částic (<100 μm), aby je bylo možné snadno a rovnoměrně zakomponovat do vhodného hydrogelu. Maticí pro vazebné gely jsou pak vhodné polyakrylamidové nebo agarózové gely, které byly popsány výše [38].

Mezi nejrozšířenější sorbenty patří Chelex 100, který se řadí mezi chelatační iontoměniče. Obsahuje funkční skupiny iminodiacetové kyseliny vázané na styren divinylbenzenovou kostru, které fungují jako chelatační činidla pro polyvalentní kovové ionty. Řadí se mezi slabě kyselé katexová činidla s vysokou selektivitou pro kovové ionty (Al, Cd, Co, Mn, Zn, Ni, Pb a další). Určitou nevýhodou sorbentu Chelex 100 je závislost na pH. Funkční skupiny kyseliny iminodiacetové se tak vyskytují ve čtyřech chemických formách (Obr. 10). Při pH menší než 4 je vazba na Chelex 100 snížena, z důvodu protonace karboxylových funkčních skupin [54, 55, 56, 57].



Obr. 10 Různé formy Chelex 100 v závislosti na pH [57]

Alternativou sorbentu Chelex 100 pro stanovení některého z prvků Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Ni, Pb a Cd je například vazebné činidlo SPR-IDA (suspendovaná částicová činidla iminodiacetátu), která je tvořena menšími velikostmi kuliček (0,2 μm) oproti Chelex 100, čímž usnadňuje homogenní distribuci v hydrogelu. Dalším používaným činidlem může být membrána Whatman P81, která se řadí mezi iontoměničové membrány. Jedná se o membránu na bázi fosfátu celulózy a je silně katexová. Také byly vyvinuty smíšené vazebné vrstvy pro zvýšení rozsahu analyzovaných kovů měřených technikou DGT. Mezi tyto činidla patří např. Chelex 100/ferrihydrid, Chelex 100/Metsorb, AgI/SPR-IDA a ZrO₂/SPR-IDA (Tab. 10) [38, 40, 58].

Tab. 10 Přehled činidel používaných ve vazebných vrstvách a jejich cílové analyty (s ohledem na analyzované prvky této diplomové práce) [38]

Kategorie	Vazebné činidlo	Cílové analyty
Katexová vazba	Chelex 100	Al, Ca, Cd, Ce, Co, Cr(III), Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Ho, La, Lu, Mg, Mn, Nd, Ni, Pb, Pu, Pr, Sm, Tb, Tm, U, Y, Yb, Zn
	SPR-IDA	Cd, Co, Cu, Ni, Pb
Membránová vazba	Whatman P81	Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn
Smíšená vazebná činidla	Chelex 100/ferrihydride	As, Cd, Cu, Mn, Mo, P, Pb, Zn
	Chelex 100/Metsorb	As, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Sb, V, W
	AgI/SPR-IDA	Cd, Co, Cu, Ni, Pb, S ²⁻
	ZrO ₂ /SPR-IDA	As, Cd, Co, Cu, Mo, Ni, P, Pb, Sb, Se, V

2.4.6.1 Akumulační a eluční vlastnosti

Po vhodném výběru sorpčního média schopného akumulovat cílový analyt, je zapotřebí kvantitativně vyhodnotit toto naabsorbované množství. Nejčastěji se k tomu využívá elučních činidel o malém objemu (typicky 1 ml). Eluent se vybírá na základě vazebné vrstvy a mechanismu, jímž je analyt vázán. Při použití vazebné vrstvy Chelex 100 se používá jako eluční činidlo nejčastěji 1M roztok kyseliny dusičné, pro Metsorb je to např. 1M roztok hydroxidu sodného nebo pro ferrihydrid kyselina dusičná či jiná kyselina. Tyto experimenty se obvykle provádějí po dobu 24 hodin, ředí se na vhodný objem a poté je možné množství analytu změřit pomocí některých analytických metod (ICP-MS, ICP-OES) [38].

Pro výpočet absorbovaného množství analytu na vazebné vrstvě se využívá akumulární faktor f_u a lze jej spočítat pomocí rovnice (6):

$$f_u = \frac{M_i - M_f}{M_i} \quad (6)$$

kde M_i je počáteční množství analytu v roztoku a M_f je množství analytu zbývajících v roztoku po ukončení experimentu. Hodnota akumulárního faktoru je obvykle >85 . Tato hodnota vypovídá o tom, jak je schopen se cílový analyt akumulovat na daném sorpčním médiu [38].

Pro správné vyhodnocení absorbovaného množství analytu je potřeba dále zavést eluční faktor f_e , který by mohl přispět k nejistotě měření DGT. Lze ho vypočítat ze vztahu (7):

$$f_e = \frac{M_e}{M_i - M_f} \quad (7)$$

M_e je naměřené množství analytu v elučním roztoku. Eluční faktor se obvykle pohybuje v rozpětí 75–100 %. Běžná hodnota elučního faktoru pro Chelex 100 se uvádí 80 % pro 1M HNO_3 po dobu 24 hodin. Je však možné tyto eluční podmínky modifikovat tak, aby bylo možné dosáhnout vyšších hodnot elucí, ale nedocházelo zároveň k vyšší chybovosti měření. Podle D. Devillers a kol. lze měnit následující podmínky eluce za účelem zlepšení elučních vlastností: koncentrace HNO_3 1–15M, objem 1–2 ml, doba eluce 8–48 hodin [38, 59].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- Ultračistá deionizovaná voda vyrobená pomocí jednotky ELGA Purelab
- Kyselina dusičná 67 % p.a. (Analytika Praha spol. s.r.o., ČR)
- Kyselina dusičná 65 % (Lachema s.p. Brno, ČR)
- Zásobní roztok směsi kovů (Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn v konc. 1 000 mg/l) v 10% HNO₃ (Analytika, spol. s r.o.)
- Zásobní roztok K a Ca (v konc. 10 000 mg/l) ve 2% HNO₃ (Analytika, spol. s r.o.)
- Agarosa, Type I (Sigma-Aldrich, USA)
- Dusičnan sodný (Lachema a.s., Brno, ČR)
- Chelex 100, Biorad Laboratories (Hercules, USA)
- Hydroxid sodný (Analytika Praha spol. s.r.o., ČR)

V následujících kapitolách se vodou bude vždy rozumět voda, která byla upravená pomocí přístroje Purelab na ultračistou deionizovanou vodu.

3.1.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Jednotky DGT, DGT Research Ltd, Lancaster, UK
- Mikropipety, Thermo Scientific, finnpipette F1
- Třepačka, yellow line, Labicom s.r.o.
- Vařič (topná deska), ETA 2107
- Chladnička, Gorenje
- Analytické váhy, Sartorius
- Membránový filtr, Pall Cororation, USA (Supor, velikost pórů 0,45 μm, průměr 2,50 cm, tloušťka 0,14 mm)
- DGT jednotka holder
- Míchačka, Biotech, Color squid
- pH metr
- Teploměr
- Stříkačky, Omnifix, Braun
- Filtry na stříkačky nylonové 0,45 μm; Labicom s.r.o.

3.1.3 Přístroje

- Mikrovlnná digesční jednotka mls 1 200 mega
- Přístroj ICP-OES Ultima 2, HORIBA Scientific

3.2 Popis analyzovaných vzorků

Vzorky pro analýzu byly zakoupeny z komerčního prodeje – kravské mléko odstředěné s obsahem tuku 0,5 % a kravské mléko polotučné s obsahem 1,5 % tuku značky TATRA. A jeden vzorek kravského mléka byl zakoupen ze soukromého chovu v Třebeticích u Holešova.

3.3 Aparatura pro DGT

Technika DGT může být provedena ve dvou různých uspořádáních – ve skleněné kádince (Obr. 11) nebo v plastové nádobce s držákem (Obr. 12). V této práci byly testovány obě provedení pro optimalizaci měření ve vodných roztocích kovů, pro ostatní experimenty byla používána pouze plastová nádoba s plastovým držákem.

Aparatura ve skleněné kádince

Celé uspořádání aparatury zahrnuje laboratorní stojan, míchačku, skleněnou kádinku o objemu 1-4 l, magnetické míchadlo, silonové vlákno, jednotky DGT a těžítka (Obr. 11).

Jednotky DGT jsou nejprve sestaveny podle kapitoly 3.4.3, poté jsou pomocí silonového vlákna přivázány jedna k druhé a následně k laboratornímu stojanu. Při tomto uspořádání dochází jak k míchání roztoku pomocí magnetické míchačky, tak k pohybu DGT jednotek na vlasci.

Tento způsob uspořádání experimentu byl původní a stále se využívá. Nevýhodnou však je precizní práce s vlascem, kdy je potřeba, aby jednotlivé jednotky DGT byly k sobě přivázány tak, aby byly jednoduše a co nejrychleji od sebe oddělitelné (pouze např. 2 jednotky při časovém experimentu), aby nedocházelo k větší prodlevě, kdy jsou jednotky vytazeny z roztoku. Zároveň, aby mezi 2 jednotkami nedocházelo ke vzduchové bublině, která dané jednotky místo ponoření nadnáší nad roztokem. Dalším rizikem může být kontaminace roztoku kovovým těžítkem, které se používá pro zatížení jednotek v roztoku. Značnou nevýhodou je také omezený počet možných jednotek DGT na jeden experiment.



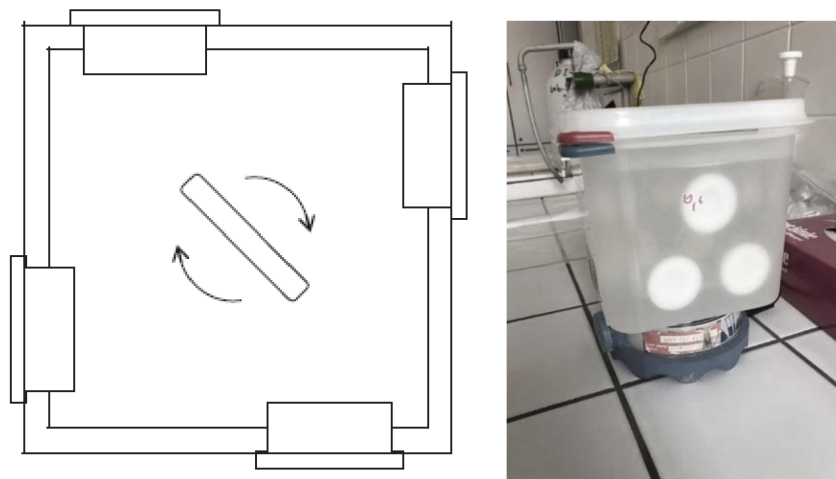
Obr. 11 Aparatura pro techniku DGT – skleněná kádinka

Aparatura v plastové nádobě

Aparatura v plastové nádobce s držákem se vyznačuje především jednodušším uspořádáním a snadnější manipulací. Základem je plastová nádoba o objemu 2,5 l, plastový držák, jednotky DGT a magnetická míchačka s míchadlem (Obr. 12).

Jednotky DGT jsou opět sestaveny podle kapitoly 3.4.3 a následně jsou vsunuty do jednotlivých otvorů v plastovém držáku. Poté je plastový držák vložen do plastové nádoby s připraveným roztokem.

Výhodou tohoto uspořádání je snadná manipulace při vytahování jednotlivých jednotek DGT a zároveň použití většího počtu jednotek na jeden experiment, konkrétně 10. V této aparatuře také odpadá nutnost využití těžítka nebo silinového vlasce. Nevýhodou může být stacionární poloha jednotek DGT po celou dobu experimentu, která může přispívat k zvětšování vrstvy DBL, viz dále.



Obr. 12 Aparatura pro techniku DGT – plastová nádoba

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Příprava difúzního gelu

Difúzní agarózový gel používaný v technice DGT je 1,5%, tzn. že velikost pórů je >20 nm. Postup přípravy je následující: odměrným válcem bylo odměřeno 100 ml vody a na analytických vahách bylo odváženo 1,5 g agarózy. Množství navážené agarózy bylo kvantitativně převedeno do Erlenmeyerovy baňky spolu s vodou. Ta byla vložena do předehřáté vodní lázně na teplotu 80 °C a roztok byl průběžně promícháván, dokud nebyla agaróza ve vodě úplně rozpuštěna.

Po rozpuštění agarózy bylo pipetou odebráno potřebné množství roztoku agarózy a ihned opatrně pipetováno mezi dvě předem předehřátá skla. Skla byla oddělena distanční folií o tloušťce 0,8 mm a utěsněna svorkami (Obr. 13).

Skla naplněná agarózovým roztokem byla vložena do chladničky, kde byla chlazena ve vertikální poloze až do ztuhnutí. Poté byla skla řádně promyta vodou a gel byl opatrně oddělen od vrchního skla. Z hotového gelu byly pomocí vykrajovátko s kulatým obvodem vyraženy disky o průměru 2,5 cm. Takto připravené gely byly uloženy do nádoby s roztokem 0,01 M NaNO_3 .

3.4.2 Příprava sorpčního gelu

Sorpční gel používaný v této práci obsahuje sorbent Chelex 100 zakomponovaný v agarózové matrici. Postup přípravy je následující: nejprve byl připraven difúzní gel stejně jako v kapitole 3.4.1. Poté bylo na analytických vahách odváženo 0,7 g sorbentu Chelex 100 s přesností na 4 desetinná místa. Do takto připravené zkumavky bylo odpipetováno potřebné množství zahřátého agarózového gelu a pomocí třepačky důkladně promícháno.

Takto vzniklá směs sorbentu a agarózového gelu byla co nejrychleji pipetována mezi dvě předem přehřátá skla s distanční folií o tloušťce 0,5 mm a utěsněna pomocí svorek (Obr. 13).

Skla s naplněným sorpčním gelem byla umístěna do chladničky v horizontální poloze a byla chlazená do ztuhnutí gelu. Poté byla skla řádně promyta vodou a gel byl opatrně oddělen od vrchního skla. Z hotového gelu byly pomocí vykrajovátko s kulatým obvodem vyraženy disky o průměru 2,5 cm. Takto připravené gely byly uchovávány ve vodě.



Obr. 13 Příprava sorpčního gelu

3.4.3 Sestavení jednotek DGT

Plastové vzorkovací jednotky používané v technice DGT jsou před použitím skladovány v 1M HNO₃. Po vyjmutí jsou důkladně očištěny vodou. Na plastové tělo expozičního okénka jsou gely vkládány v pořadí (viz Obr. 3): sorpční gel (0,5 mm), difúzní gel (0,8 mm) a membránový PES filtr (0,14 mm). Vše je utěsněno pomocí plastového víčka.

3.4.4 Modelový roztok kovů

Modelové roztoky kovů byly připraveny v 1 l nebo 2 l odměrné baňce, do které bylo nejprve přidáno potřebné množství vody a následně bylo pipetováno takové množství ze standardu kovů, aby výsledná koncentrace činila 100-500 µg/l v závislosti na prováděném experimentu. Bylo odváženo potřebné množství NaNO₃, aby výsledná koncentrace činila 1M. Následně byla odměrná baňka doplněna vodou po rysku a uzavřena skleněnou zátkou. Hotový roztok byl vždy důkladně promíchán.

Takto připravený roztok byl přelit do plastové nebo skleněné nádoby dle experimentu a pomocí 1M HNO₃ nebo 1M NaOH bylo upraveno pH na hodnotu v rozmezí 6–7. V nádobě byl roztok vždy ponechán po dobu 24 hodin na stabilizaci při rychlosti míchání cca 400 rpm.

3.4.5 Modelový roztok mléka

Pro optimalizaci techniky DGT na matrici mléka bylo použito 10krát ředěné mléko. Do 2 l odměrné baňky bylo odměřeno 200 ml mléka a doplněno 1 800 ml vody až po rysku. K tomuto množství bylo pipetováno ze standardu kovů 100–400 µl v závislosti na experimentu.

3.4.6 Eluce sorpčního gelu a ředění eluátu

Po ukončení experimentů byly jednotky DGT z roztoku vytaženy, očištěny vodou, rozebrány a byl opatrně vytažen sorpční gel, očištěn vodou a eluován v 1,5 ml 1M HNO₃. Eluce sorpčních gelů probíhala ve zkumavkách po dobu 24 hodin. Poté byl odebrán 1 ml vzorku a vhodně naředěn vodou pro analýzu na přístroji ICP-OES.

3.4.7 Kalibrační roztoky

Do čtyř 25 ml odměrných baněk byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0; 0,10; 0,25; 0,50 mg/l. Jednotlivé koncentrace byly připravovány pipetováním potřebného objemu ze standardního roztoku kovů a odměrné baňky byly vždy doplněny po rysku příslušným *blankem*, aby byla simulována matrice eluátu pro omezení spektrálních interferencí.

3.4.8 Stabilita roztoku

Stabilita připraveného modelového roztoku byla zkoumána v nádobce s plastovým držákem po dobu 0 až 24 hodin. Do držáku byly uchyceny jednotky DGT pouze s difúzním gelem a membránovým filtrem. Jednotlivé odběry vzorků roztoku byly prováděny v časech 0, 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 480 a 1440 minut. Pro analýzu koncentrace bylo odebráno vždy 10 ml roztoku a následně proměřeno na ICP-OES.

3.4.9 Akumulační faktor

Do 7 zkumavek bylo odměřeno vždy 45 ml připraveného roztoku podle kapitoly 3.4.4. Do každé zkumavky byl vložen sorpční gel a zkumavky byly umístěny na třepačku s horizontálním pohybem. V časových intervalech 0–36 hodin byly odebírány různé objemy vzorku, které byly následně vhodně naředěny na analýzu pomocí ICP-OES. Sorpční gel byl na konci experimentu vytažen, promyt vodou a eluován v 1,5 ml 1M HNO₃ po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin byl z roztoku odebrán 1 ml vzorku a naředěn 10x vodou pro analýzu na ICP-OES.

3.4.10 Eluční faktor

Do 6 zkumavek bylo odměřeno vždy 30 ml připraveného roztoku podle kapitoly 3.4.4. Do každé zkumavky byl vložen sorpční gel a zkumavky byly umístěny na třepačku s horizontálním pohybem. Nejdříve bylo odebráno z každé zkumavky 10 ml roztoku pro analýzu koncentrace prvků na ICP-OES. Poté byla spuštěna analýza vložím sorpčního gelu, ten byl po 24 hodinách vytažen, opláchnut vodou a ponechán na eluci v 1,5 ml 1M HNO₃. Eluce gelů probíhala v časech 1–24 hodin. Poté byl odebrán 1 ml vzorku a naředěn 10krát pro analýzu na ICP-OES.

3.5 Optimalizace techniky DGT

3.5.1 Test lineární akumulace v závislosti na čase v plastové nádobce

Difúzní koeficient byl měřen v modelovém roztoku kovů připraveném podle kapitoly 3.4.4. Do plastového držáku bylo vloženo 10 jednotek DGT (připravených podle 3.4.3), a držák byl vložen do plastové nádoby s míchaným roztokem. Jednotky byly postupně vytahovány v časech 4, 12 a 24 hodin. Po ukončení experimentu následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu podle 3.4.6.

V průběhu experimentu byla vždy při odběru jednotek měřena současně i teplota a bylo odebráno 10 ml z roztoku pro určení přesné koncentrace roztoku na přístroji ICP-OES.

3.5.2 Test lineární akumulace v závislosti na čase ve skleněné kádince

Difúzní koeficient byl měřen v modelovém roztoku kovů připraveném podle 3.4.4. Jednotky DGT sestavené dle 3.4.3 byly přivázány jedna k druhé pomocí silonového vlákna a otvorů na jednotkách a následně k laboratornímu stojanu. Ty byly postupně vytahovány v časech 4, 8 a 24 hodin. Po ukončení experimentu následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu podle 3.4.6.

V průběhu experimentu byla vždy při odběru jednotek měřena současně i teplota a bylo odebráno 10 ml z roztoku pro určení přesné koncentrace roztoku na přístroji ICP-OES.

3.5.3 Test lineární akumulace v závislosti na reciproké tloušťce difúzního gelu

Pro tento experiment byly použity difúzní gely o třech různých tloušťkách 0,25 mm; 0,50 mm a 0,80 mm. Z těchto gelů bylo sestaveno 10 jednotek DGT a vloženo do plastového držáku, který byl vložen do modelového roztoku kovů připraveného podle 3.4.4. Experiment probíhal po dobu 24 hodin a poté následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu, jak bylo popsáno výše v kapitole 3.4.6.

V průběhu experimentu byla vždy proměřena i teplota a bylo odebráno 10 ml z roztoku pro určení koncentrace roztoku na přístroji ICP-OES.

3.5.4 DGT experiment

Byl připraven modelový roztok podle 3.4.4 a do takto připraveného roztoku byly vloženy jednotky DGT (podle 3.4.3) do otvorů plastového držáku. Experiment probíhal 24 hodin, následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu podle 3.4.6.

3.5.5 Vliv koncentrace konkurenčních prvků Ca a K

Při tomto experimentu bylo k základnímu modelovému roztoku připraveného podle 3.4.4 přidáno ještě 1,5 ml objemu ze standardního roztoku vápníku a draslíku. Dále probíhal experiment klasickým postupem po dobu 24 hodin a následovala eluce sorpčního gelu a ředění eluátu podle 3.4.6.

3.6 Ověření výkonnosti techniky DGT v matrici mléka

3.6.1 Test lineární akumulace v závislosti na čase

Difúzní koeficient byl měřen v modelovém roztoku mléka připraveném podle 3.4.5. Do plastového držáku bylo vloženo 10 jednotek DGT (připravených podle 3.4.3), a držák byl vložen do plastové nádoby s roztokem. Jednotky byly postupně vytahovány v časech 4, 8 a 24 hodin. Po ukončení experimentu následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu podle kapitoly 3.4.6.

V průběhu experimentu byla vždy při odběru jednotek měřena současně i teplota a bylo odebráno 10 ml z roztoku pro určení přesné koncentrace roztoku na přístroji ICP-OES.

3.6.2 DGT experiment

Byl připraven modelový roztok mléka podle 3.4.5 a do takto připraveného roztoku byly vloženy jednotky DGT (podle 3.4.3) do plastového držáku, který byl následně vložen do roztoku. Experiment probíhal 24 hodin, následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu podle kapitoly 3.4.6.

3.7 Analýza mléka

3.7.1 Prekoncentrační technikou DGT

Pro testování reálného vzorku byl připraven roztok naředěním mléka 10krát vodou. Do roztoku byl vložen plastový držák s 6 jednotkami DGT. Experiment probíhal po dobu 24 hodin, poté následoval postup eluce sorpčního gelu a ředění eluátu dle 3.4.6.

V průběhu experimentu bylo odebíráno 10 ml roztoku, následně naředěno 2krát vodou a filtrováno na filtru s velikostí pórů 0,45 μm .

3.7.2 Mikrovlnnou digesí

Pro porovnání naměřeného množství sledovaných analytů technikou DGT byla provedena mikrovlnná digesce mléka ve vysoce účinné mikrovlnné digesční jednotce. Do příslušných nádobek byly odměřeny 4 ml vzorku mléka, 4 ml kyseliny dusičné (a. p. 67%) a 2 ml peroxidu vodíku. Takto připravené nádobky byly vloženy do mikrovlnné pece na program 5 (Tab. 11), po digesci byly nádobky vytaženy z pece, ponechány volně na laboratorním stole na zchlazení a poté otevřeny a jejich obsah byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Simultánně se vzorkem mléka byl připraven blank, který obsahoval pouze 4 ml kyseliny dusičné a 2 ml peroxidu vodíku. Stejně jako u vzorku byl po digesci obsah kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn po rysku vodou. Tento blank sloužil jako podkladová matrice pro přípravu kalibračních roztoků pro analýzu na ICP-OES.

Tab. 11 Jednotlivé kroky digesce mléka

krok	1	2	3	4	5
Příkon [W]	250	0	250	500	0
Čas [min]	2	2	2	5	5

3.7.2.1 Kalibrační roztoky

Do tří 25 ml odměrných baněk bylo odměřeno takové množství ze standardů kovů, aby výsledná koncentrace byla 0,1; 0,25 a 0,5 mg/l. Odměrné baňky byly doplněny po rysku připravenou směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku po digesci, jak bylo popsáno v 3.8. Posledním kalibračním bodem byla koncentrace 0 mg/l, která obsahovala pouze směs kyseliny dusičné a peroxidu vodíku po digesci.

3.8 Analýza technikou ICP-OES

Před spuštěním analýzy na přístroji ICP-OES je potřeba nejdříve nastavit základní parametry pro měření (Tab. 12, Tab. 13) a poté probíhá postup měření podle dodaného návodu k přístroji.

Tab. 12 Specifikace a možnosti nastavení pro analýzu na ICP-OES

Komponenta	Vlastnost, nastavení
Generátor	40,68 MHz
Výkon generátoru	1300 W
Čerpadlo	Peristaltické, 16 ot/min
Zmlžovač	0,81 ml/min
Tlak na zmlžovači	2,78 bar
Mlžná komora	Cyklonová
	Plazmový 13,57 l/min
Průtok argonu	Nosný 0,205 l/min Pomocný 0,195 l/min
Detekce	Duální detekce PMT s vysoce dynamickým detekčním systémem
Analytický režim	Gaussovský
Integrační čas	0,5 s

Tab. 13 Seznam použitých vlnových délek používaných při analýze

Prvek	Vlnová délka [nm]	Prvek	Vlnová délka [nm]
Cd	214,438	Mn	257,610
Co	228,616	Ni	221,647
Cu	327,396	Pb	220,350
Fe	259,940	Zn	206,191

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace sorpčního gelu

4.1.1 Příprava gelu

Základem správného použití techniky DGT je správná příprava sorpčního gelu, který selektivně zachytává sledované analyty pomocí funkčních skupin v něm obsažených. Je proto potřeba zajistit správnou distribuci sorbentu Chelex 100 v agarózovém difúzním gelu tak, aby nedocházelo k nerovnoměrné sorpci analytů na jednotlivé gelové disky a tím nedocházelo k nepřesným výsledkům měření. Distribuce částic byla hodnocena nejprve vizuálně, a poté byla ověřena experimentálně pomocí základních experimentů (viz dále). Optimalizace přípravy sorpčního gelu probíhala s různými navážkami sorbentu Chelex 100 (0,4 g až 1,0 g) a zároveň byla testována příprava sorpčního gelu o tloušťce 0,25 a 0,50 mm.

Nejprve byla provedena příprava sorpčních gelů s vysokými navážkami sorbentu Chelex 100 (0,5 g až 1,0 g) v 1,5% agarózovém difúzním gelu. Příprava jednotlivých gelů probíhala standardním postupem, kdy byl nejdříve připraven difúzní gel, který byl ještě za tepla smíchán s navážkou sorbentu ve zkumavce pomocí třepačky a následně pipetován mezi nahřátá skla s distanční folií o tloušťce 0,5 mm. Po ztuhnutí připraveného gelu byl vizuálně zkoumán jeho vzhled – distribuce částic v nosném gelu, shluky, mezery apod. V případě navážky 1 g se sorbent v některých částech gelu shlukoval a v některých částech byl připravený gel úplně bez sorbentu. Při navážce 0,8 g Chelexu 100 nebyl sorbent opět dostatečně distribuovaný a v některých místech vytvářel jemné shluky Chelex 100. Až navážka 0,5 g se jevila jako optimální. Při této navážce byl sorbent plně distribuovaný po celé ploše agarózového gelu.

Pro ověření vhodně zvolené navážky byly ještě připravovány gely s navážkou sorbentu 0,4 a 0,6 g. Obě navážky byly vyhodnoceny jako nevyhovující. V případě nižší navážky se tvořila volná místa bez sorbentu, a naopak při vyšší navážce se začínaly opět tvořit jemné shluky sorbentu v gelu. Za optimální navážku bylo tedy zvoleno 0,5 g sorbentu na 5 ml difúzního gelu.

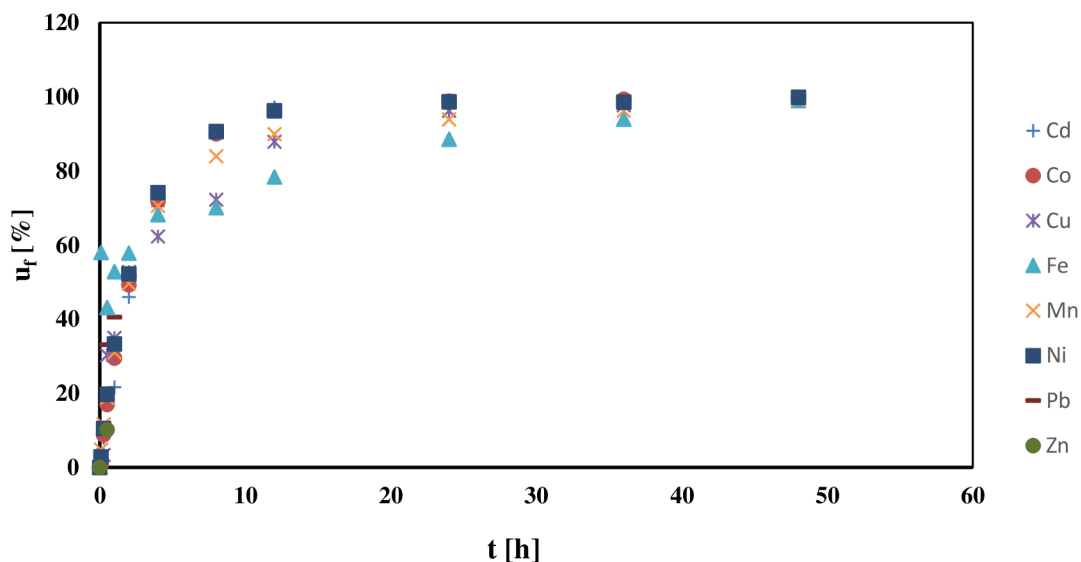
Gely s různými navážkami byly také připravovány o různých tloušťkách (0,25 mm a 0,50 mm). Tloušťka vložky 0,25 mm byla však příliš malá a převážná část roztoku se zachytávala na povrchu skel, nebylo tak možné dosáhnout homogenní distribuce sorbentu v gelu. Navíc práce s tak tenkým gelem nebyla jednoduchá a gel se neustále smotával okolo pinzety.

Jako optimální byly proto pro přípravu sorpčního gelu zvoleny následující parametry: navážka 0,1 g sorbentu Chelex 100 na 1 ml agarózového difúzního gelu a tloušťka 0,5 mm. Je však nutno poznamenat, že Chelex 100 má vyšší hustotu, a proto se usazuje na spodní straně skel v průběhu polymerizace gelu. Je tedy důležité, aby při pokládání sorpčního gelu na plastové tělo jednotky DGT, byl gel ve správné poloze – tzn., aby byl otočen funkčními skupinami („drsnou stranou“) směrem vzhůru, aby pak nedocházelo k prodlužování difúzní dráhy.

4.1.2 Akumulační faktor

V rámci optimalizace chelexového sorpčního gelu byl prováděn akumulční test sledovaných analytů na připravený sorpční gel. V testu bylo sledováno, s jakou hodnotou f_u a jak rychle jsou schopny se cílové analyty akumulovat na sorbent Chelex 100 v čase.

Po provedení postupu podle kapitoly 3.4.9 byly hodnoty f_u vypočteny pomocí rovnice (6) a následně byly převedeny do grafické podoby (Obr. 14).



Obr. 14 Akumulační faktor kovů v závislosti na čase

Z grafu na obrázku 15 lze vyčíst, že akumulace všech kovů v sorpčním gelu probíhala rychle a v čase 12 hodin bylo z roztoku nasorbováno více než 80 % celkového množství kovů v roztoku. Po 24 hodinách byla hodnota f_u pro všechny prvky >90 %. William Davison ve své knize uvádí, že hodnota f_u by měla dosahovat hodnoty minimálně 85 % pro správné použití techniky DGT [38], proto bylo dále využíváno času 24 hodin.

4.1.3 Eluční faktor

Dalším optimalizačním testem pro chelexový sorpční gel bylo testování elučního faktoru pro sledované analyty v 1M HNO₃. Faktor f_e je kritickou hodnotou z důvodu přesnosti techniky DGT, protože kompenzuje skutečnost, že se při eluci analytů v elučním činidle uvolňuje pouze část sledovaných kovů. Nejčastěji využívaným činidlem pro eluci kovů ve spojitosti se sorbentem Chelex 100 je kyselina dusičná, která může být použita v různých koncentracích od 1M po koncentrovanou [38]. Nejběžněji se však využívá 1M HNO₃, proto byla testována i v této diplomové práci.

Postup testování elučního faktoru 1M HNO₃ je uveden v kapitole 3.4.10 a následně byl faktor eluce f_e spočítán podle rovnice (7) v časech 1, 4, 8, 12 a 24 hodin (Tab. 14).

Tab. 14 Výsledné hodnoty elučního faktoru f_e [%] pro sledované analyty

čas [h]	Cd	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
1	76,8 ± 4,2	73,3 ± 0,6	62,0 ± 4,4	75,7 ± 1,4	78,0 ± 2,6	70,1 ± 4,4	73,9 ± 1,6
4	76,2 ± 4,2	73,2 ± 1,7	67,7 ± 2,9	70,3 ± 3,2	71,6 ± 1,8	73,6 ± 3,3	73,6 ± 5,2
8	79,5 ± 4,7	75,3 ± 3,4	66,2 ± 1,7	74,6 ± 4,1	73,8 ± 4,1	75,0 ± 1,2	79,2 ± 3,6
12	82,0 ± 3,6	77,1 ± 4,1	65,2 ± 4,0	75,2 ± 2,2	73,7 ± 3,6	76,3 ± 3,4	80,4 ± 4,4
24	83,4 ± 0,5	78,0 ± 0,7	67,6 ± 1,3	78,3 ± 2,0	73,8 ± 1,6	76,7 ± 0,4	81,5 ± 1,2

Tabulka 14 uvádí eluční faktory pro jednotlivé kovy v časech 1–24 hodin, při kterých se hodnoty faktoru f_e s časem převážně zvyšovaly. V časech 1–12 hodin byly hodnoty f_e pro všechny sledované prvky >65 %. V čase 24 hodin byl eluční faktor všech kovů nejvyšší >75 %, kromě Cu, která měla hodnotu f_u pouze 67,6 %. Železo bohužel nebylo možné naměřit.

Hodnota elučního faktoru se pokládá za správnou, pokud se nachází v rozmezí 75–100 %, přesto je jeho reprodukovatelnost kritická pro přesnost techniky DGT a vždy jsou upřednostňovány vyšší hodnoty f_e [38]. Proto byl pro následující experimenty vybrán čas eluce 24 hodin.

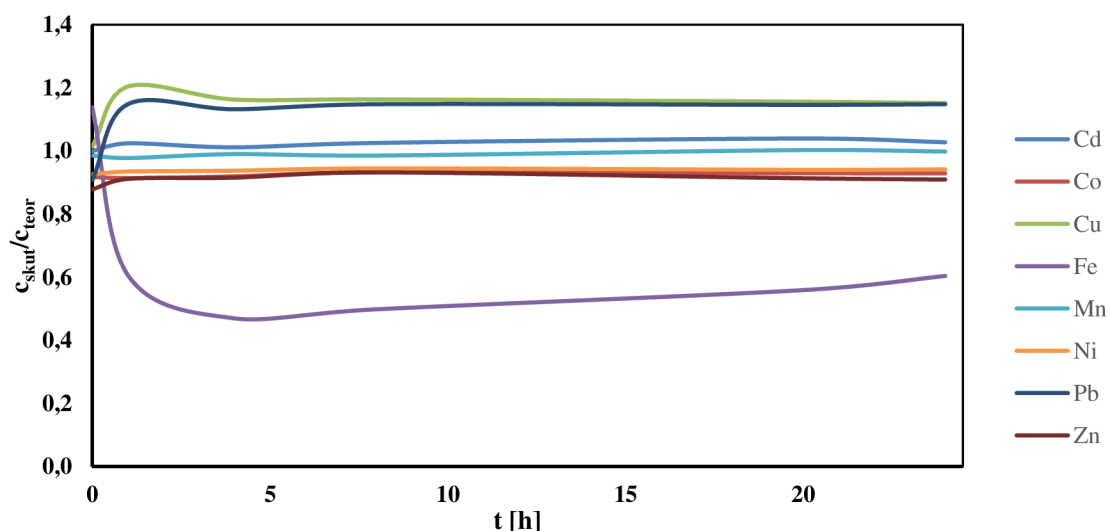
H. Zhang a W. Davison použili na eluci kovů z chelexového sorpčního gelu (s maticí polyakrylamidového gelu) 1 ml 2M HNO₃ a jejich výsledky elučních faktorů byly následující: 83,9 ± 2,7 % pro Cd; 79,3 ± 6,4 % pro Cu; 69,7 ± 5 % pro Fe; 81,4 ± 2,2 % pro Mn a 80,3 ± 5,5 % pro Zn. Nízkou hodnotu pro železo okomentovali jako důsledek částečné oxidace Fe²⁺ na Fe³⁺ při procesu iontové výměny [40].

Y. Wang a kol. využili pro eluci kovů jako eluční činidlo 1M HNO₃ v objemu 1,8 ml po dobu 24 hodin a stanovili eluční faktor 93,8 % pro Cd; 97,5 % pro Co; 103,0 % pro Cu; 96,7 % pro Mn; 105,0 % pro Ni; 95,5 % pro Pb a 88,0 % pro Zn [46].

4.2 Stabilita modelového roztoku

Tento experiment byl proveden za účelem ověření stability roztoku v aparatuře plastové nádoby s jednotkami DGT (pouze s difúzním gelem a filtrační membránou) po dobu 24 hodin. Při testování stability je zapotřebí vytvoření vhodných podmínek měření tak, aby se co nejvíce zabránilo poklesu koncentrace sledovaných analytů po dobu jejich expozice v roztoku. Ke snížení koncentrace analytů v roztoku může přispívat sorpce iontů kovů na stěny použité plastové nádoby nebo částečná interakce iontů kovů s filtrační (PES) membránou nebo difúzním agarózovým gelem, které nesou mírný záporný náboj. K potlačení těchto účinků se využívá přídavek 0,1 mM až 100 mM NaNO₃, která tyto elektrostatické interakce mezi ionty kovů a filtrační membránou nebo agarózovým gelem minimalizuje [38]. V této diplomové práci byla využita 10 nM NaNO₃.

Výsledky tohoto experimentu byly vyhodnoceny porovnáním koncentrace c_{skut} naměřené v roztoku v časových intervalech pomocí ICP-OES ku koncentraci fixní c_{teor} určené při přípravě, následně byly výsledky vyneseny do grafické podoby (Obr. 15).



Obr. 15 Závislost koncentrace kovů na čase

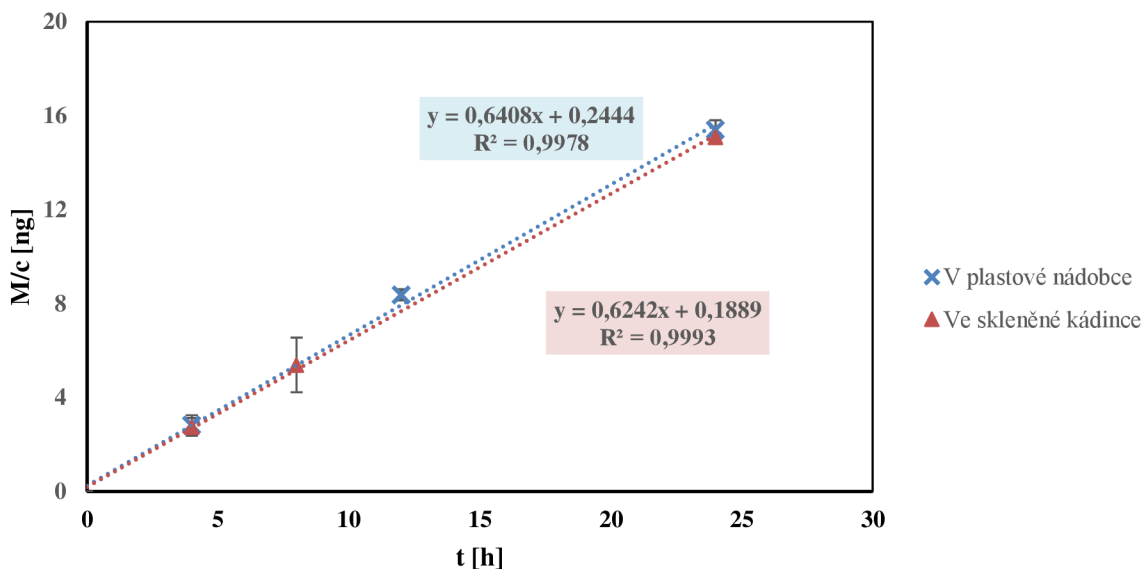
Z grafu na obrázku 14 lze vidět, že všechny měřené koncentrace kovů byly kromě železa v čase stabilní, a nedocházelo tak k větším ztrátám. Koncentrace železa částečně klesala, což lze vysvětlit interakcí s použitou PES filtrační membránou nebo sorpcí na stěny použité nádoby, což bylo taky ověřeno experimentálně. Z výsledků lze vyhodnotit, že použitá koncentrace 10 nM NaNO_3 byla pro experiment dostatečná a může být využívána i v dalších testech.

4.3 Optimalizace techniky DGT v modelovém roztoku kovů

Pro ověření správné výkonnosti techniky DGT slouží tři základní testy: test lineární akumulace sledovaných analytů v čase a test lineární akumulace analytů na reciproké tloušťce difúzní vrstvy. Oba tyto testy jsou následně ověřeny na základním DGT experimentu. V následujících kapitolách jsou všechny tyto testy podrobně popsány.

4.3.1 Test lineární akumulace v závislosti na čase

Protože je základním předpokladem rovnice DGT lineární akumulace sledovaných analytů na čase, byl proveden tento test, při kterém byly sestavené DGT jednotky vystaveny míchanému roztoku o přesné koncentraci sledovaných kovů a vytahovány v různých časových intervalech. Po eluci sorpčního gelu a ředění eluátu byla měřena naakumulovaná koncentrace kovů na přístroji ICP-OES a následně přepočtena podle vztahu (3) na množství (M) a vynesena do grafu v závislosti na době expozice (t). Pro lepší přehlednost výsledků byl použit reprezentativní graf pouze pro Mn (Obr. 16). Z důvodu použití nového uspořádání pro testování techniky DGT v plastové nádobce, byl ještě pro kontrolu proveden test ve skleněné kádince, který byl ověřen již dříve [63].



Obr. 16 Množství manganu naakumulovaného v sorpčním gelu v závislosti na čase v modelovém roztoku

Z grafu na obrázku 16 lze vyčíst, že akumulované množství manganu rostlo lineárně s rostoucím časem jak v uspořádání v plastové nádobce, tak ve skleněné kádince ($R^2 = 0,9978$; $R^2 = 0,9993$). Závislosti pro ostatní měřené mikroprvky byly obdobné, kdy se opět ověřila lineární akumulace v čase s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9976$ pro Cd; $0,9939$ pro Co; $0,9942$ pro Cu; $0,9973$ pro Mn; $0,9966$ pro Ni a $0,9977$ pro Zn. Tím se ověřil základní předpoklad lineární akumulace v čase a zároveň správnost použití techniky DGT v tomto novém uspořádání.

Získané závislosti M/c na čase byly použity k výpočtu difúzního koeficientu D pomocí vztahu (8) [60]:

$$D = \frac{k \cdot \Delta g}{A \cdot t_s} \quad (8)$$

kde k je směrnice ze závislosti $M/c = f(t)$; A je plocha exponovaného difúzního gelu s hodnotou $3,14 \text{ cm}^2$; Δg je tloušťka difúzní vrstvy s velikostí $0,096 \text{ cm}$ (tloušťka difúzního gelu + membránového filtru + DBL). Veličina t_s slouží pouze pro přepočítání hodin na sekundy (3600 s). Po dosazení všech hodnot do rovnice (8) byl spočítán difúzní koeficient pro mangan a následně pro všechny ostatní prvky s příslušnými směrnicemi pro jednotlivé kovy. Difúzní koeficienty vypočtené pro obě uspořádání jsou uvedeny v tabulce 15, vztažené na jednotnou teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro tento teplotní přepočítání se využívá Stoke-Einsteinovy rovnice (9):

$$\log D_T = \frac{1,37023(T-25) + 8,36 \cdot 10^{-4}(T-25)^2}{109+t} + \log \frac{D_{25}(273+T)}{298} \quad (9)$$

kde za D_T je dosazen difúzní koeficient při jakékoliv teplotě a T je teplota ve $^\circ\text{C}$ [46].

Tab. 15 Difúzní koeficienty ($D \cdot 10^6$) vypočítané pro sledované mikroprvky naměřené v plastové nádobce a skleněné kádince při 25 °C

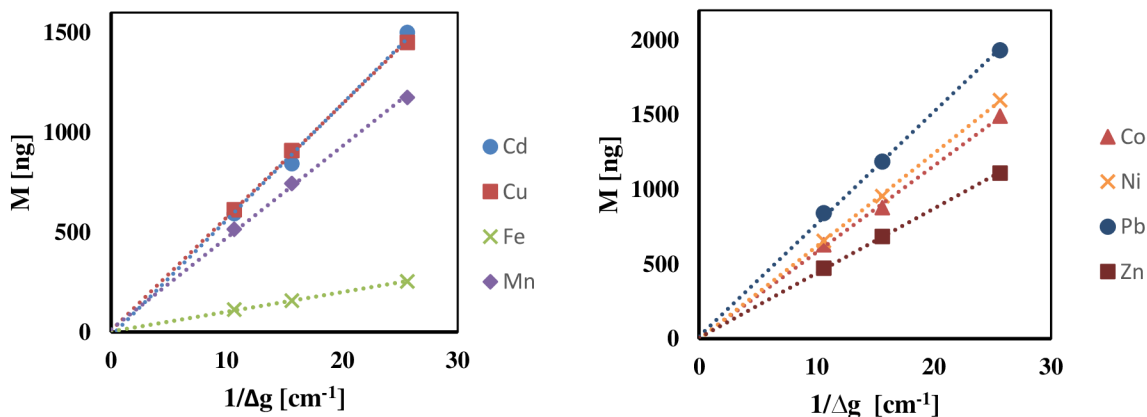
Analyt	D (v plastové nádobě) [cm^2/s]	D (ve skleněné kádince) [cm^2/s]
Cd	6,18 ± 0,12	6,11 ± 0,07
Co	5,96 ± 0,17	5,96 ± 0,10
Cu	6,43 ± 0,08	5,44 ± 0,27
Mn	6,66 ± 0,12	6,05 ± 0,14
Ni	7,64 ± 0,03	7,15 ± 0,13
Zn	8,75 ± 0,39	8,37 ± 0,24

Z tabulky 15 vyplývá, že difúzní koeficienty naměřené v difúzní agarózové vrstvě v plastové nádobce se lišili minimálně od hodnot difúzního koeficientu naměřeného ve skleněné kádince.

Ve studii Y. Wang a kol. určili difúzní koeficienty ($D \pm$ standardní odchylka $\cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) v agarózovém difúzním gelu při 25 °C s následujícími hodnotami: 6,38 ± 0,09 pro Cd; 6,53 ± 0,08 pro Co; 6,59 ± 0,12 pro Cu; 6,40 ± 0,50 pro Fe; 5,91 ± 0,11 pro Mn; 6,54 ± 0,18 pro Ni; 8,41 ± 0,15 pro Pb a 6,89 ± 0,43 pro Zn [46]. Hodnoty difúzních koeficientů naměřených v této diplomové práci jsou téměř shodné s hodnotami naměřených v této studii, případné odchylky (např. u Zn) lze připsat tomu, že Y. Wang a spol. využili k měření jinou filtrační membránu, konkrétně PVDF membránu (velikost pórů 0,45 μm ; tloušťka 100 μm), která mohla ovlivňovat výsledné hodnoty oproti PES filtrační membráně využitě v této diplomové práci. Různé účinky filtračních membrán (CN, PES, PDVF) na rychlost difúze cílových analytů byly prokázány i v této studii Y. Wang a kol. [46].

4.3.2 Test lineární akumulace v závislosti na reciproké difúzní tloušťce

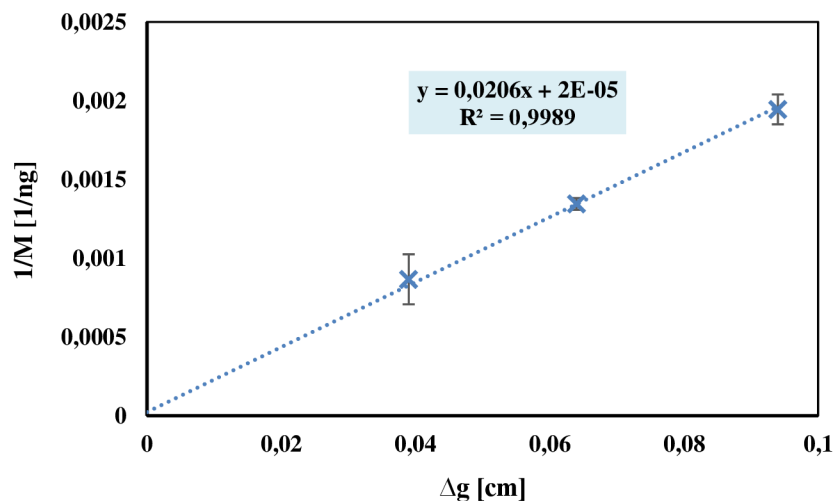
Test lineární akumulace kovů v závislosti na reciproké difúzní tloušťce je dalším ze základních testů pro validaci techniky DGT. Při tomto experimentu byly DGT jednotky vystaveny míchanému roztoku kovů s různými tloušťkami difúzních gelů podle postupu v kapitole 3.5.1. Poté byly koncentrace jednotlivých mikroprvků c_e proměřeny na přístroji ICP-OES, přepočteny pomocí rovnice (3) na množství M pro každý prvek. Z tohoto množství M byl vytvořen graf závislosti $M = f(1/\Delta g)$ (Obr. 17). Směrodatné odchylky pro všechna měření byla menší než 10 %.



Obr. 17 Závislost akumulovaného množství kovových prvků v sorpčním gelu na reciproké tloušťce difúzního gelu (vlevo pro Cd, Cu, Fe a Mn; pravo pro Co, Ni, Pb a Zn)

Z grafů na obrázku 17 vyplývá, že při měření docházelo k lineární akumulaci všech prvků v závislosti na reciproké tloušťce difúzního gelu, a tím byla ověřena funkčnost techniky DGT ($R^2 > 0,997$ pro všechny prvky).

Pro výpočet tloušťky DBL byla sestavena závislost opačná $1/M = f(\Delta g)$. Jako ukázková závislost je uveden graf pouze pro mangan (Obr. 18), podobné závislosti však byly naměřeny i pro ostatní kovové prvky.



Obr. 18 Závislost reciprokého množství manganu na tloušťce difúzní vrstvy

K výpočtu vrstvy DBL byla využita rovnice (5), do které byly dosazeny za b a m hodnoty směrnice a posunutí z regresní přímky grafů $1/M = f(\Delta g)$. Za D byl dosazen difúzní koeficient příslušných kovů v agarózovém gelu; pro mangan $5,77 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ a D_w je difúzní koeficient kovů ve vodě; pro mangan $6,28 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ při 20°C ($6,28 \cdot 10^{-6}$ pro Cd; $6,37 \cdot 10^{-6}$ pro Co; $6,24 \cdot 10^{-6}$ pro Cu; $6,28 \cdot 10^{-6}$ pro Ni; $8,22 \cdot 10^{-6}$ pro Pb a $6,14 \cdot 10^{-6}$ pro Zn) [61]. Výsledné hodnoty DBL jsou shrnuty v tabulce 16.

Tab. 16 *Vypočítané hodnoty DBL pro jednotlivé mikroprvky*

Analyt	DBL [μm]
Cd	20,25 \pm 1,12
Co	11,23 \pm 2,03
Cu	31,26 \pm 1,08
Mn	19,22 \pm 1,98
Ni	34,86 \pm 4,21
Pb	28,64 \pm 2,21
Zn	10,48 \pm 1,54

Z grafu $I/M = f(\Delta g)$ byla ověřena lineární akumulace mikroprvků v závislosti na rozdílné tloušťce difúzní vrstvy ($R^2 = 0,9989$), zároveň byla spočítána DBL pro jednotlivé analyty (Tab. 16). Tloušťka DBL byla zprůměrována a následně byla připočítána k tloušťce Δg a zahrnuta do všech ostatních výpočtů DGT.

Při rychlosti proudění 1 000 rpm se velikost DBL odhaduje na $<3 \mu\text{m}$, kdežto při 100 rpm může být DBL $>170 \mu\text{m}$ [40]. Nižší rychlost proudění (400 rpm) v této práci byla zvolena z důvodu simulování měření pro matici reálného vzorku mléka, která se při vyšších otáčkách srážela.

Vrstvu DBL je potřeba zahrnout do výpočtů, protože přispívá k delší difúzní dráze a tím ke ovlivnění výsledků. Obecně se předpokládalo, že v dobře promíchávaných roztocích je tloušťka vrstvy DBL zanedbatelně malá ve srovnání s tloušťkou Δg (tloušťka difúzní vrstvy + tloušťka filtrační membrány). Praxe však ukázala, že tloušťka DBL se může pohybovat až okolo $230 \mu\text{m}$. Vrstva DBL tak nezávisí jen na rychlosti míchání, ale i na aparatuře měření – tzn., že v případě využití aparatury s plastovým držákem jsou jednotky během měření ve stacionární poloze, což může přispívat k větší tloušťce DBL, kdežto v případě kádinkového experimentu kromě míchání roztoku jsou i samotné jednotky v určitém pohybu. Pokud porovnáme vrstvy DBL pro jednotlivá uspořádání, je vrstva DBL pro první možnost v rozmezí $11\text{--}35 \mu\text{m}$. V kádinkovém experimentu velikost DBL činila $30 \mu\text{m}$, měřená pro rtuť [62]. Z těchto výsledků vyplývá, že stacionární poloha jednotek DGT neměla na tloušťku DBL větší vliv, což může být vysvětleno menším objemem používaného roztoku ($1,5 \text{ l}$), který zajišťuje lepší proudění roztoku mezi jednotlivými jednotkami, oproti 4 l v kádinkovém experimentu.

Ve studii M. Reichstädtera a kol. byla vypočtena DBL o velikosti $30 \mu\text{m}$ při rychlosti míchání $1\,200 \text{ rpm}$ [35].

4.3.3 Základní DGT experiment

Dalším doporučovaným testem pro ověření výkonnosti DGT je test na opakovatelnost a výtěžnost měření. Tyto testy zároveň slouží pro ověření předchozích experimentů, do kterého jsou hodnoty D a DBL zahrnuty a porovnáním koncentrace naměřené technikou DGT a technikou ICP-OES se ověří jejich správnost, respektive správnost techniky DGT. Podle firmy DGT Research, která komerčně vyrábí sorpční gely obsahující Chelex 100 také doporučuje provést tento test za účelem ověření správné přípravy vlastnoručně připravených sorpčních gelů v podmínkách laboratoře. Tato odchylka by neměla být větší než 10 % [63].

Pro výpočet koncentrace c_{DGT} technikou DGT byla využita rovnice (2). Množství (M) kovu na sorpčním gelu bylo po eluci vypočteno z rovnice (3). Pro přehlednost je uveden výpočet pouze pro mangan, všechny parametry potřebné pro výpočet jsou uvedeny v tabulce 17.

Tab. 17 Příklad výpočtu M a c_{DGT} pro Mn, měření probíhalo při 20 °C a pH 6,5

Rovnice (3)		Rovnice (2)	
c_e [mg/l]	0,682	Δg [cm]	0,096
V^{bl} [l]	0,000 157	D [cm ² /s]	$5,76 \cdot 10^{-6}$
V_e [l]	0,015	t [s]	86 400
f_e [-]	0,783	A [cm ²]	3,14
M [ng]	1 443,26	c_{DGT} [µg/l]	88,69

Tímto způsobem byly provedeny výpočty i pro všechny ostatní mikroprvky a výsledné hodnoty c_{DGT} byly zprůměrovány a shrnuty v tabulce 18. Koncentrace $c_{ICP-OES}$ naměřené přímo pomocí ICP-OES byly pouze převedeny na příslušné jednotky.

Tab. 18 Výsledky základního testu DGT pro všechny měřené mikroprvky

Analyt	$c_{ICP-OES}$ [µg/l]	c_{DGT} [µg/l]	Rozdíl [%]
Cd	88,1 ± 4,2	87,5 ± 9,9	0,57
Co	87,1 ± 3,2	89,8 ± 6,5	3,22
Cu	71,6 ± 6,4	76,3 ± 5,0	6,71
Mn	89,8 ± 3,5	88,7 ± 2,3	1,11
Ni	90,1 ± 4,4	95,0 ± 5,1	5,55
Pb	68,6 ± 0,7	66,9 ± 9,9	2,34
Zn	72,6 ± 5,0	73,9 ± 2,4	1,93

Z tabulky 18 lze vyčíst, že koncentrace měřené technikou DGT a koncentrace naměřené ICP-OES se lišily o méně než 7 %. Obecně je technika DGT považována za správnou a přesnou, je-li rozdíl mezi skutečnou koncentrací a koncentrací stanovenou technikou DGT menší než 10 % [38]. Nejvyšší spočítaný rozdíl koncentrací v této práci byl 6,71 % pro měď. Z výsledků

této diplomové práce vyplývá, že technika DGT fungovala správně a mohla být tudíž využita k následujícím postupům.

4.3.4 Vliv konkurenčních prvků Ca a K

V tomto experimentu byl sledován vliv konkurenčních kovů na sorpci sledovaných analytů v sorpčních gelech. Chelexový sorpční gel má vysokou afinitu ke sledovaným analytům, pokud se však všechna možná vazebná místa Chelexu přiblíží jeho nasycení, mohou být analyty s nižší afinitou vytěsněny a být nahrazeny analyty s vyšší afinitou nebo analyty s podobnými afinitami ve vysokých koncentracích [38]. Selektivita sorbentu Chelex 100 odpovídá selektivitě kyseliny iminodiocetové a pro dvojmocné ionty v dusičnanových roztocích je následující: $\text{Cu}^{2+} \gg \text{Pb}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \gg \text{Na}^+$ Nejméně můžou ovlivnit sorpci sledovaných analytů jednomocné ionty (Na^+ , K^+), jejichž selektivita je výrazně menší oproti dvojmocným iontům [57]. V mléce se nachází vysoké množství Ca a K, které by potenciálně pomohly ovlivnit sorpci ostatních sledovaných kovů, proto byl proveden ještě jeden experiment v modelovém roztoku sledovaných kovů s přidávkou 100násobné koncentrace Ca a K. Výsledky byly vyhodnoceny porovnáním koncentrace naměřené technikou DGT ku koncentraci naměřené přímo v roztoku pomocí ICP-OES (Tab. 19).

Tab. 19 Výsledky vlivu konkurenčních prvků na měření technikou DGT

Analyt	$c_{\text{ICP-OES}}$ [$\mu\text{g/l}$]	c_{DGT} [$\mu\text{g/l}$]	Rozdíl [%]
Cd	$77,67 \pm 1,53$	$77,40 \pm 6,81$	0,35
Co	$82,33 \pm 3,79$	$85,38 \pm 5,33$	3,70
Cu	$42,00 \pm 9,31$	$40,56 \pm 7,76$	3,43
Mn	$73,00 \pm 2,65$	$64,41 \pm 6,00$	11,77
Ni	$79,00 \pm 5,29$	$77,23 \pm 5,25$	2,24
Pb	$68,50 \pm 6,21$	$61,75 \pm 9,12$	9,85
Zn	$73,00 \pm 1,87$	$74,39 \pm 4,22$	1,90

Rozdíl koncentrací naměřených technikou DGT pro Cd, Co, Cu, Ni, Pb a Zn a koncentrací těchto analytů naměřených přímo ICP-OES se nacházel v doporučeném limitu 10 %. Mangan vykazoval mírné odchylení od tohoto limitu (11,77 %). Důvod tohoto těsného rozdílu může být objasněn tím, že mangan se blíží svou hodnotou selektivity k selektivitě vápníku, a v případě 100krát vyšší koncentrace vápníku mohl vápník začít konkurovat právě manganu a tím snížit jeho vaznost v roztoku.

Po ověření výkonnosti techniky DGT v modelovém roztoku kovů lze konstatovat, že tato technika splňuje všechny potřebné požadavky a je vhodná pro stanovení koncentrací mikroprvků Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb a Zn. Může být tedy dále testována pro analýzu reálného vzorku.

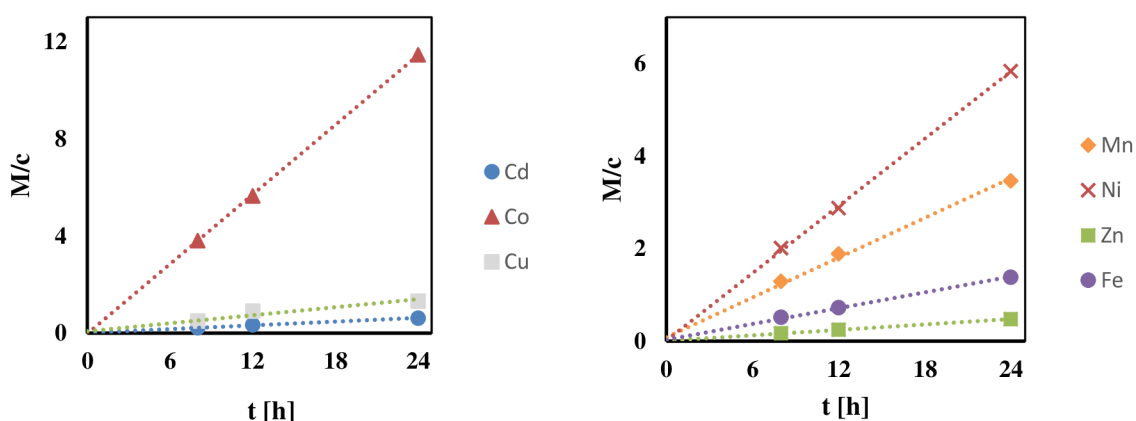
4.4 Ověření výkonnosti techniky DGT v matrici mléka

Po validaci techniky DGT v modelovém roztoku kovů za podmínek laboratoře je potřeba provést ještě ověření výkonnosti techniky DGT v reprezentativní matrici, což v této diplomové práci byl reálný vzorek mléka.

4.4.1 Test lineární akumulace v závislosti na čase

Jak bylo popsáno výše, jeden ze základních výkonnostních testů techniky DGT je test lineární akumulace sledovaných analytů v jednotkách DGT s obsaženým sorpčním chelexovým gelem v závislosti na čase. Tento experiment byl proveden v matrici tvořené 10krát ředěným polotučným mlékem (s obsahem 1,5 % tuku). Mléko je zdrojem především bílkovin, tuků a sacharidů a jednotlivé komponenty by mohly měnit podmínky, při kterých probíhalo předchozí ověření výkonnosti DGT a ovlivňovat samotnou výkonnost DGT.

Jednotky DGT byly ponořeny do roztoku 10krát ředěného mléka, následně byly vytahovány v různých časových intervalech až do času 24 hodin. Celý postup probíhal tak, jak je popsáno v kapitole 3.6.1. Poté byly výsledky vyhodnoceny pomocí rovnic (2) a (3) stejně jako v případě testu v modelovém roztoku kovů a z výsledků byla vynesena závislost (Obr. 19).



Obr. 19 Závislost lineární akumulace stopových prvků na čase; vlevo pro Cd, Co, Cu; vpravo pro Mn, Ni, Zn a Fe

Z grafů vyplývá, že se stopové prvky lineárně sorbovaly na sorpční gel v matrici 10krát ředěného mléka během času 24 hodin ($R^2 = 0,995$ pro Cd; $R^2 = 0,999$ pro Co; $R^2 = 0,995$ pro Cu; $R^2 = 0,997$ pro Mn; $R^2 = 0,999$ pro Ni; $R^2 = 0,998$ pro Pb a $R^2 = 0,999$ pro Zn), čímž byl splněn předpoklad fungování DGT, a aplikovatelnosti rovnice DGT pro další výpočty. Z naměřených závislostí byl vypočítán efektivní difúzní koeficient D_e pro všechny prvky podle rovnice (8) stejně jako v kapitole 3.5.1. Všechny potřebné parametry k výpočtu jsou uvedeny tabulce 20.

Tab. 20 Parametry pro výpočet D_e pro všechny sledované mikroprvky

Analyt	k	Pro všechny analyty	
Cd	0,024 30	Δg [cm]	0,096
Co	0,424 94	A [cm ²]	3,140
Cu	0,056 08	t_s [s]	3 600
Fe	0,047 18		
Mn	0,129 32		
Ni	0,195 36		
Zn	0,020 81		

kde k je směrnice ze závislosti $M/c = f(t)$; A je plocha exponovaného difúzního gelu; Δg je tloušťka difúzní vrstvy (tloušťka difúzního gelu + membránového filtru + DBL). Veličina t_s slouží pouze pro přepočet hodin na sekundy. Po dosazení všech parametrů do rovnice (6) byl spočítán efektivní difúzní koeficient pro všechny sledované kovy (Tab. 21).

Tab. 21 Efektivní difúzní koeficienty D_e vypočítané pro všechny sledované stopové prvky, přepočtené pomocí rovnice (7) na teplotu 25 °C

Analyt	D_e [cm ² /s]
Cd	$(2,31 \pm 0,18) \cdot 10^{-7}$
Co	$(4,03 \pm 0,25) \cdot 10^{-6}$
Cu	$(5,32 \pm 0,07) \cdot 10^{-7}$
Fe	$(4,48 \pm 0,05) \cdot 10^{-7}$
Mn	$(1,23 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$
Ni	$(1,85 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$
Zn	$(1,96 \pm 0,04) \cdot 10^{-7}$

Efektivní difúzní koeficienty měřené v 10krát ředěném mléce byly nižší oproti difúzním koeficientům měřených ve vodném roztoku kovů. Důvodem takto nízkého D_e může být komplexní matrice mléka (přítomnost bílkovin a tuků, laktózy), která může ovlivnit difúzi jednotlivých mikroprvků. Nejnižší hodnoty D_e byly naměřeny pro Zn a Cd; naopak nejvyšší D_e byl naměřen pro Co. Efektivní difúzní koeficient se nepodařilo naměřit pro Pb, protože koncentrace měřené pomocí ICP-OES byly na úrovni šumu. Příčina vzniklého problému nebyla v experimentální části této práce bohužel objasněna. Na druhou stranu se podařilo naměřit železo, které se v roztoku zředěného mléka chovalo při DGT experimentech odlišně v porovnání s experimenty prováděnými v roztocích kovů.

4.4.2 Základní DGT experiment

V další části práce byl proveden test popsáný v kapitole 3.6.2 v matrici 10x zředěného mléka. DGT jednotky byly vystaveny po dobu 24 hodin 10krát zředěnému roztoku mléka s přidavkem 100 μl ze standardu kovů. Koncentrace kovů v eluátu naměřená po eluci sorpčních gelů byla přepočtena na koncentraci c_{DGT} pomocí rovnice (2) a (3) stejně jako v předchozích výpočtech a porovnána s koncentrací $c_{ICP-OES}$ naměřenou po ředění a filtraci zkoumaného roztoku zředěného mléka na přístroji ICP-OES (Tab. 22).

Tab. 22 Výsledky základního testu DGT ve zředěném mléce

Analyt	$c_{ICP-OES}$ [$\mu\text{g/l}$]	c_{DGT} [$\mu\text{g/l}$]	Rozdíl [%]
Cd	68,0 \pm 6,0	62,9 \pm 7,3	7,46
Co	90,5 \pm 2,1	87,3 \pm 3,4	3,59
Cu	46,0 \pm 5,1	40,2 \pm 7,2	12,63
Fe	93,0 \pm 7,1	112,3 \pm 9,0	20,77
Mn	87,0 \pm 5,7	95,5 \pm 5,2	9,78
Ni	83,0 \pm 1,4	83,6 \pm 1,1	0,73
Zn	435,0 \pm 12,2	426,5 \pm 12,6	1,95

Z tabulky 22 vyplývá, že rozdíl koncentrace Cd, Co, Mn, Ni a Zn stanovené v ředěném mléce a koncentrace stanovené technikou DGT byl nižší než doporučených maximálních 10 %. Rozdíl v koncentraci Cu byl těsně mimo doporučený limit (12,63 %). Velkých rozdílů bylo dosaženo v případě Fe, kdy se rozdíl v koncentracích pohyboval kolem 20 %. Příčina takto vysokého rozdílu nebyla objasněna, nicméně Fe vykazovalo rozdílné chování při všech prováděných testech v rámci této diplomové práce.

Po ověření výkonnosti techniky DGT v matrici zředěného mléka lze konstatovat, že tato technika je ve spojení s ICP-OES vhodná pro stanovení koncentrací Cd, Co, Cu, Mn, Ni a Zn v mléce (po naředění vodou).

4.5 Analýza reálného vzorku mléka

Pro analýzu vzorku mléka bylo zvoleno polotučné mléko značky TATRA s obsahem tuku 1,5 %. Pro analýzu bylo mléko naředěno v poměru 1:9 vodou a do zředěného vzorku mléka byly ponořeny jednotky DGT po dobu 24 hodin. Celý postup měření je popsán v kapitole 3.7.1.

Koncentrace naměřená v eluátu po eluci sorpčního gelu byla přepočtena na c_{DGT} pomocí rovnic (2) a (3) a následně byla tato koncentrace porovnána s koncentrací c_{MW} naměřenou po mikrovlnné digesti vzorku testovaného mléka (Tab. 23).

Tab. 23 Porovnání naměřených koncentrací mikroprvků ve zředěném mléce pomocí dvou různých postupů měření

Analyt	c_{DGT} [mg/l]	c_{MW} [mg/l]
Cd	<LOD	nestanoveno
Co	<LOD	nestanoveno
Cu	<LOQ	nestanoveno
Fe	<LOQ	nestanoveno
Mn	<LOD	nestanoveno
Ni	<LOD	nestanoveno
Pb	<LOD	nestanoveno
Zn	3,74 ± 0,02	3,91 ± 0,16

Z výsledků vyplývá, že ačkoliv byla technika DGT v testovaných podmínkách schopna měřit koncentrace vybraných prvků ve zředěném mléce, v reálném roztoku mléka nebylo možné naměřit sledované stopové prvky kromě Zn, jehož koncentrace korespondovala s koncentracemi uváděnými v literatuře [2, 6]. Během testování měření probíhalo v roztocích o koncentracích kovů ± 100 µg/l, zatímco koncentrace prvků v reálném vzorku byla na úrovni jednotek µg/l. Při experimentu existoval předpoklad, že kovy budou prekoncentrovány v sorpčním gelu a pomocí techniky DGT se tak podaří koncentraci kovů v mléce stanovit. K prekoncentraci sledovaných kovů v sorpčním gelu pravděpodobně došlo, nicméně je potřeba si uvědomit, že při dalším postupu analýzy je koncentrace kovů v roztoku pro měření na ICP-OES opět snížena díky eluci a potřebnému minimálnímu objemu k analýze cca 5 ml. Výsledné koncentrace ve zředěném eluátu pak byly pod hranicemi LOD či LOQ ICP-OES. Fakt, že koncentrace sledovaných prvků se nepodařilo naměřit ve vzorku mléka přímo po mikrovlnné digesci byl očekávaný, a proto se tato práce zabývala aplikací techniky DGT pro analýzu vybraných prvků v mléce ve spojení s ICP-OES. Pro obejití limitace ve formě velmi nízké koncentrace sledovaných prvků v mléce byla zkoumána i možnost aplikace techniky DGT ve 2x zředěném mléce, bez předchozího ověření výkonnosti techniky DGT. Zde se však již jevily problémy s komplikovanou maticí mléka, podobně jako při analýzách mléka s vyšším obsahem tuku (tučné, farmářské mléko). Z těchto roztoků se po určité době míchání začaly srážet bílkoviny a roztok nebylo možné analyzovat, popř. interpretovat v rozumné míře dosažené výsledky. Určitým řešením by mohlo být při dobré stabilitě roztoku zředěného mléka zvýšení expoziční doby, např. na 48 nebo více hodin. Zvýšením doby potřebné pro analýzu by se však potlačily výhody aplikace techniky DGT pro stanovení koncentrace vybraných prvků v mléce.

I přesto se nepodařilo dosáhnout uspokojivých výsledků v kombinaci DGT s ICP-OES pro stanovení vybraných mikroprvků v mléce, lze předpokládat, že technika DGT by byla použitelná např. ve spojení s technikou ICP-MS, kde rovněž není možné analyzovat mléko bez předchozí úpravy vzorku.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla testována technika DGT za použití agarózového difúzního gelu a sorpčního gelu obsahujícího sorbent Chelex 100 pro použití této techniky v analýze stopových kovů Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn v mléce.

Prvním cílem práce bylo vyzkoušet funkci nové aparatury v plastové nádobce s držákem pro techniku DGT od běžně využívaného kádinkového experimentu. S tím souvisela stabilita připraveného modelového roztoku kovů po dobu 24 hodin, při které se ověřila stabilita všech kovových prvků kromě železa. Železo se částečně sorbovalo na stěny nádoby a částečně na použitý PES filtr. Poté byla optimalizace zaměřena na sorpční chelexový gel, kde byla potřeba vyřešit přípravu gelu, zoptimalizovat akumulční a eluční faktor. Pro přípravu sorpčního gelu byla využita navážka 0,1 g na 1,0 ml agarózového roztoku s 0,5 mm tloušťkou. Akumulční faktor f_u byl určen pro všechny kovy >90 % při 24hodinové expozici; eluční faktor f_e byl stanoven pro všechny kovy >75 %, kromě Cu, která měla f_e 67,60 %.

Následně byla provedena optimalizace techniky DGT na modelovém roztoku kovů, kterému byly vystaveny plastové vzorkovací jednotky DGT. Provedením základních testů doporučených DGT Research Ltd bylo zjištěno, že množství všech sledovaných kovů v chelexových sorpčních gelech lineárně rostlo se vzrůstajícím časem expozice v roztoku po dobu 24 hodin, zároveň se lineárně akumulovaly všechny kovy na sorpční gel v závislosti na reciproce tloušťce difúzního gelu. Z těchto experimentů byl vypočítán efektivní difúzní koeficient D pro všechny kovy v rozmezí hodnot $5,96\text{--}8,75 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ při 25 °C. Ze závislosti $I/M=f(\Delta g)$ byla vypočítána mezní difúzní vrstva DBL, která byla měřena pro každý analyt a následně zprůměrována do výsledné hodnoty 20 μm . Stanovený difúzní koeficient D všech kovů i tloušťka DBL odpovídá hodnotám publikovaných v literatuře a dosazením do dalšího základního testu DGT byla ověřena jejich velikost, a tím správná funkce techniky DGT. Vzhledem k tomu, že mléko obsahuje vysoké množství makroprvků, byl testován vliv vysokých koncentrací Ca a K na sorpci ostatních kovů. Z výsledků bylo zjištěno, že vysoké koncentrace těchto makroprvků nijak neovlivňovaly měření technikou DGT. Techniku však nebylo možné optimalizovat v modelovém roztoku pro železo, které vykazovalo odlišné chování oproti ostatním stanovovaným mikroprvkům.

Po optimalizaci techniky DGT v modelovém roztoku kovů byla ověřena výkonnost techniky DGT v matici mléka (ředěného v poměru 1:9 vodou). Opět byly provedeny základní testy typické pro techniku DGT a tím byla ověřena správná funkce techniky DGT. Efektivní difúzní koeficient D_e v této matici byl však pro všechny mikroprvky stanoven nižší v rozmezí hodnot $1,96 \cdot 10^{-7}\text{--}4,03 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Takto nízký D_e lze přičíst komplexní matici mléka (3 % bílkovin, 4–5 % laktózy a 3–4 % tuků), která mohla bránit volné difúzi iontů kovů roztokem zředěného mléka. Matrice mléka měla však pozitivní efekt pro stanovení železa, kdy nejspíše vytvářela vhodné podmínky pro jeho sorpci, naopak nevhodné podmínky tvořila při stanovení olova.

Po zhodnocení výsledků byla technika DGT správně validována na zředěnou matici mléka pro modelové roztoky, avšak následná analýza reálného vzorku zředěného mléka na ICP-OES neměla dostatečnou citlivost pro tyto nízké koncentrace. Měřitelný byl pouze Zn s koncentrací $3,74 \pm 0,02 \text{ mg/l}$, která byla porovnatelná s koncentrací měřenou po úpravě mléka mikrovláknou

digescí ($3,91 \pm 0,16$ mg/l). Pro budoucí vývoj techniky DGT pro stanovení stopových kovů v mléce by bylo možné podrobit prekoncentrační techniku dalším optimalizacím, případně vyzkoušet techniku DGT v kombinaci s citlivější instrumentální metodou jako je např. ICP-MS.

6 SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0510-2.
- [2] FUQUAY, John a Patrick FOX. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Oklahoma: Academic Press, 2002 [cit. 2020-04-09]. ISBN 9780080917931
- [3] *Hygiena produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-625-4.
- [4] PEREIRA, Paula C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* [online]. 2014, 30(6), 619-627 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.nut.2013.10.011. ISSN 08999007. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900713004607>
- [5] ČERNÁ, Marie. *Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků*. Praha: Středisko technických informací potravinářského průmyslu Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu, 1979
- [6] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [7] ZAMBERLIN, Šimun, Neven ANTUNAC, Jasmina HAVRANEK a Dubravka SAMARŽIJA. *Mineral elements in milk and dairy products*. *Mljekarstvo / Dairy* [online]. 2012, 62(2), 111-125 [cit. 2020-02-12]. ISSN 0026704X.
- [8] DUDKA, S. a W. P. MILLER. Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to human food chain. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* [online]. 1999, 34(4), 681-708 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1080/03601239909373221. ISSN 0360-1234. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601239909373221>
- [9] Food Safety Authority of Ireland. Mercury, lead, cadmium, tin and arsenic in food. Toxicology Factsheet Series Issue No. 1, May 2009. Available at www.fsai.ie/workarea/downloadasset.aspx?id=8412
- [10] BABIČKA, Luboš. *Toxicky významné látky v potravinách*. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2017. Publikace České technologické platformy pro potraviny. ISBN 978-80-88019-28-2
- [11] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *Minerální látky a stopové prvky: Essenciální minerální prvky ve výživě*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-851-2094-1.
- [12] ZHOU, Xuwei, Nan ZHENG, Chuanyou SU, Jiaqi WANG a Hélène SOYEURT. Relationships between Pb, As, Cr, and Cd in individual cows' milk and milk composition and heavy metal contents in water, silage, and soil. *Environmental Pollution* [online]. 2019, 255 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113322. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119333391>
- [13] KUBAČKOVÁ, Jana. *Chemie a toxikologie potravin*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. ISBN 978-80-7464-598-3.
- [14] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách

- [15] BIRGHILA, Semaghiul, Simona DOBRINAS, Gabriela STANCIU a Alina SOCEANU. DETERMINATION OF MAJOR AND MINOR ELEMENTS IN MILK THROUGH ICP-AES. *Environmental Engineering and Management Journal* [online]. 2008, 7(6), 805-808 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.30638/eemj.2008.107. ISSN 1582-9596. Dostupné z: http://www.eemj.icpm.tuiasi.ro/pdfs/vol7/no6/33_SemaghiulBirghila.pdf
- [16] LONNERDAL, B, C L KEEN a L S HURLEY. Iron, Copper, Zinc, and Manganese in Milk. *Annual Review of Nutrition* [online]. 1981, 1(1), 149-174 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1146/annurev.nu.01.070181.001053. ISSN 0199-9885. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nu.01.070181.001053>
- [17] ČERNOHORSKÝ, Tomáš a Pavel JANDERA. *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-719-4114-X.
- [18] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0
- [19] Kurz ICP *spektrometrie*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, [200-]-. ISBN 978-80-903732-8-0
- [20] NOMNGONGO, Philiswa N., J. CATHERINE NGILA, Titus A.M. MSAGATI a Brenda MOODLEY. Preconcentration of trace multi-elements in water samples using Dowex 50W-x8 and Chelex-100 resins prior to their determination using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* [online]. 2013, 66, 83-88 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/j.pce.2013.08.007. ISSN 14747065. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474706513001071>
- [21] Murray, R.W., Miller, D.J., Kryc, K.A., 2000. Analysis of major and trace elements in rocks, sediments, and interstitial waters by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry (ICP-AES). ODP Tech. Note, 29 [Online]. Available from World Wide Web: <<http://www-odp.tamu.edu/publications/tnotes/tn29/INDEX.HTM>>. [Cit. 2020-04-12]
- [22] HouX.JonesB.T.2000Inductively coupled plasma/optical emission spectrometry p. 9468–9485. In: R.A. Meyers (ed.). *Encyclopedia of analytical chemistry*. Wiley Chichester KoerselmanW.MeulemanA.F.M.1996The vegetation N:P ratio: A new tool to detect the nature of nutrient limitationJ. Appl. Ecol.3314411450
- [23] CHARLES, B.; FREDEEN, Kenneth J. Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Perkin Elmer Corp*, 2004.
- [24] *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy* [online]. UK: John Wiley, 2005 [cit. 2020-07-06]. ISBN 0-470-09349-8. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/047009351X>
- [25] HU, Bin, Man HE, Beibei CHEN a Linbo XIA. Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2013, 86, 14-30 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1016/j.sab.2013.05.025. ISSN 05848547. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854713001286>

- [26] NÓBREGA, Joaquim, Yves GÉLINAS, Antoaneta KRUSHEVSKA a Ramon M. BARNES. Direct Determination of Major and Trace Elements in Milk by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission and Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom* [online]. 1997, 12(10), 1243-1246 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1039/A607492H. ISSN 0267-9477. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=A607492H>
- [27] MURCIA, M.Antonia, Ana VERA, Magdalena MARTINEZ-TOME;, Antonio MUNOZ, Manuel HERNANDEZ-CORDOBA a Roque ORTIZ-GONZALEZ. Fast Determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn Contents in Milk and Nondairy Imitation Milk Using ICP-AES without Mineralization Stage. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 1999, 32(3), 175-179 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1006/fstl.1998.0524. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643898905242>
- [28] BULDINI, Pier Luigi, Silvano CAVALLI a Jawahar Lal SHARMA. Matrix removal for the ion chromatographic determination of some trace elements in milk. *Microchemical Journal* [online]. 2002, 72(3), 277-284 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/S0026-265X(02)00039-5. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X02000395>
- [29] TANG, Jun, Ying YING, Xiao-Dong PAN, Wei JIANG a Ping-Gu WU. Elements analysis of infant milk formula by ICP-OES: a comparison of pretreatment methods. *Accreditation and Quality Assurance* [online]. 2014, 19(2), 99-103 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1007/s00769-014-1039-6. ISSN 0949-1775. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00769-014-1039-6>
- [30] KIRA, Carmen Silvia a Vera Akiko MAIHARA. Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial digestion and neutron activation analysis. *Food Chemistry* [online]. 2007, 100(1), 390-395 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.014. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605007879>
- [31] TÜRKER, Ali Rehber. Separation, Preconcentration and Speciation of Metal Ions by Solid Phase Extraction. *SEPARATION AND PURIFICATION REVIEWS* [online]. 2012, 41(3), 169-206 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1080/15422119.2011.585682. ISSN 1542-2119. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15422119.2011.585682>
- [32] In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin films gels. *Nature* [online]. 1994, 367(6463), 546-548 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/367546a0>
- [33] LI, Cai, Shiming DING, Liyuan YANG, Yan WANG, Mingyi REN, Musong CHEN, Xianfang FAN a Eric LICHTFOUSE. Diffusive gradients in thin films: devices, materials and applications. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2019, 17(2), 801-831 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1007/s10311-018-00839-9. ISSN 1610-3653. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-018-00839-9>

- [34] CHEN, Hong, Lianwen GUO, Menghan ZHANG, Jiali GU, Keli ZHONG, Le BO a Jianrong LI. Determination of lead in soybean sauces by the diffusive gradients in thin films technique. *Food Chemistry* [online]. 2014, 165, 9-13 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.105. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614008218>
- [35] REICHSTÄDTER, Marek, Pavel DIVIS, Ehab ABDULBUR-ALFAKHOURY a Yue GAO. Simultaneous determination of mercury, cadmium and lead in fish sauce using Diffusive Gradients in Thin-films technique. *Talanta* [online]. 2020, 217 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121059. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914020303507>
- [36] DIVIŠ, P., H. DOČEKALOVÁ a V. ŘEZÁČOVÁ. Gel techniques for in situ measurement in natural waters, soils and sediments. *Chemické listy* [online]. 2005, 99(9), 640-646 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2017/2017>
- [37] A Sorption Gel with Titanium Dioxide for Mercury Determination by the Technique of Diffusion Gradient in Thin Film. *Chemické listy* [online]. 2013, vol 107(2), 160-164 [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_160-164.pdf
- [38] *Diffusive Gradients in Thin-Films for Environmental Measurements*. United Kingdom: Cambridge University Press, 2016. ISBN 978-1-107-13076-0
- [39] DAVISON, William a Hao ZHANG. Progress in understanding the use of diffusive gradients in thin films (DGT) – back to basics. *Environmental Chemistry* [online]. 2012, 9(1), 1-13 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1071/EN11084. ISSN 1448-2517. Dostupné z: <http://www.publish.csiro.au/?paper=EN11084>
- [40] ZHANG, Hao. a William. DAVISON. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, 67(19), 3391-3400 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1021/ac00115a005. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00115a005>
- [41] DIVIŠ, Pavel. *Vývoj a aplikace techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro stanovení rtuti v přírodních vodách: Development and application of diffusive gradients in thin films technique for determination of mercury in natural waters : teze habilitační přednášky v oboru chemie a technologie ochrany životního prostředí*. Brno: VUTIUM, 2013. ISBN 978-80-214-4781-3.
- [42] WARNKEN, Kent W., Hao ZHANG a William DAVISON. Accuracy of the Diffusive Gradients in Thin-Films Technique: Diffusive Boundary Layer and Effective Sampling Area Considerations. *Analytical Chemistry* [online]. 2006, 78(11), 3780-3787 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1021/ac060139d. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac060139d>
- [43] LI, W., H. ZHAO, P.R. TEASDALE a R. JOHN. Preparation and characterisation of a poly(acrylamidoglycolic acid-co-acrylamide) hydrogel for selective binding of Cu²⁺ and application to diffusive gradients in thin films measurements. *Polymer* [online]. 2002, 43(17), 4803-4809 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/S0032-3861(02)00309-9.

- ISSN 00323861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386102003099>
- [44] POKUSAEV, B. G., S. P. KARLOV, A. V. VYAZ' MIN a D. A. NEKRASOV. Laws of the Formation and Diffusion Properties of Silica and Agarose Gels. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering* [online]. 2018, 52(2), 222-233 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1134/S0040579518020136. ISSN 0040-5795. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0040579518020136>
- [45] ZHANG, Hao a William DAVISON. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1999, 398(2-3), 329-340 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00458-4. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267099004584>
- [46] WANG, Yan, Shiming DING, Mengdan GONG, Shiwei XU, Weimin XU a Chaosheng ZHANG. Diffusion characteristics of agarose hydrogel used in diffusive gradients in thin films for measurements of cations and anions. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, 945, 47-56 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/j.aca.2016.10.003. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267016311679>
- [47] JEON, You-Jin, Yasantha ATHUKORALA a Je-Hee LEE. Characterization of Agarose Product from Agar Using DMSO. *ALGAE* [online]. 2005, 20(1), 61-67 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.4490/ALGAE.2005.20.1.061. ISSN 1226-2617. Dostupné z: <http://e-algae.org/journal/view.php?doi=10.4490/algae.2005.20.1.061>
- [48] NORMAND, Valéry, Didier L. LOOTENS, Eleonora AMICI, Kevin P. PLUCKNETT a Pierre AYMARD. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* [online]. 2000, 1(4), 730-738 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1021/bm005583j. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm005583j>
- [49] BARRANGOU, Lisa M., Christopher R. DAUBERT a E. ALLEN FOEGEDING. Textural properties of agarose gels. I. Rheological and fracture properties. *Food Hydrocolloids* [online]. 2006, 20(2-3), 184-195 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2005.02.019. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X05001116>
- [50] MILLÁN, Arnaldo J, Rodrigo MORENO a María Isabel NIETO. Thermogelling polysaccharides for aqueous gelcasting—part I: a comparative study of gelling additives. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 2002, 22(13), 2209-2215 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1016/S0955-2219(01)00532-5. ISSN 09552219. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095522190100532>
- [51] SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1975, 98(3), 503-517 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1016/S0022-2836(75)80083-0. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283675800830>
- [52] RIVEST, Christopher, David MORRISON, Bin NI, Jamie RUBIN, Vikramaditya YADAV, Alborz MAHDAVI, Jeffrey KARP a Ali KHADEMHOSEINI. Microscale hydrogels for medicine and biology: synthesis, characteristics and applications. *Journal of Mechanics of Materials and Structures* [online]. 2007, 2(6), 1103-1119 [cit. 2020-

- 03-22]. DOI: 10.2140/jomms.2007.2.1103. ISSN 1559-3959. Dostupné z: <http://msp.org/jomms/2007/2-6/p07.xhtml>
- [53] ARMISÉN, R. Agar, In A. Imeson: Thickening and Gelling Agents for Foods, 2nd ed, London, Blackie Academic and Professional, 1997, 1 – 21 p.
- [54] DROZDZAK, Jagoda, Martine LEERMAKERS, Yue GAO, Vannapha PHROMMAVANH a Michael DESCOSTES. Evaluation and application of Diffusive Gradients in Thin Films (DGT) technique using Chelex®-100, Metsorb™ and Diphonix® binding phases in uranium mining environments. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, 889, 71-81 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.aca.2015.07.057. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015009186>
- [55] SAMCZYŃSKI, Zbigniew. Ion Exchange Behavior of Selected Elements on Chelex 100 Resin. *Solvent Extraction and Ion Exchange* [online]. 2006, 24(5), 781-794 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1080/07366290600846174. ISSN 0736-6299. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07366290600846174>
- [56] AMARA-REKKAB, Afaf a Mohamed DIDI. Removal of Cd (II) and Hg(II) by chelating resin Chelex-100. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2015, 31(1), 205-214 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.13005/ojc/310122. ISSN 0970020X. Dostupné z: <http://www.orientchem.org/vol31no1/removal-of-cd-ii-and-hgii-by-chelating-resin-chelex-100/>
- [57] BIO-RAD LABORATORIES. Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual [online] [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT200.pdf>
- [58] LI, W., H. ZHAO, P.R. TEASDALE, R. JOHN a S. ZHANG. Application of a cellulose phosphate ion exchange membrane as a binding phase in the diffusive gradients in thin films technique for measurement of trace metals. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2002, 464(2), 331-339 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00492-0. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267002004920>
- [59] DEVILLERS, Delphine, Rémy BUZIER, Adeline CHARRIAU a Gilles GUIBAUD. Improving elution strategies for Chelex®-DGT passive samplers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, 409(30), 7183-7189 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1007/s00216-017-0680-4. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0680-4>
- [60] DOCEKALOVA, H a P DIVIS. Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. *Talanta* [online]. 2005, 65(5), 1174-1178 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.08.054. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914004005387>
- [61] *CRC Handbook of chemistry and physics* [online]. 84th ed. USA: CRC Press Inc. Boca Raton, 2003 [cit. 2020-07-22]. ISBN 0849304849. Dostupné z: <http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/isolda/libros/handbook.pdf>
- [62] HABARTOVÁ, Aneta. *Využití techniky DGT pro stanovení rtuti v tekutých ochucovacích potravin* [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-07-11]. Dostupné

z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/108020>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

- [63] DGT Research Ltd., Lancaster, UK: *DGT for measurement in waters, soils and sediments*. [online]. Poslední změna [cit. 2020-7-13]. Dostupné z WWW: [Download Technical pdf document]

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AGE	Agarózový gel
AMA 254	Jednouúčelový atomový absorpční spektrometr s generováním studených par (<i>Advance Mercury Analyser 254</i>)
APA	Polyakrylamidový gel zesítený agarózovým derivátem
BPA	Polyakrylamidový gel zesítený bisakrylamidem
CCD	Detektor s vázaným nábojem (z angl. <i>Charge-Coupled device</i>)
CN	Acetát celulózy
CTD	Detektor pro přenos náboje (z angl. <i>Charge-Transfer device</i>)
DBL	Difúzní mezní vrstva (z angl. <i>Diffusive Boundary Layer</i>)
DDD	Doporučená denní dávka
DGT	Technika Difúzního gradientu v tenkém filmu (<i>Diffusive Gradient in Thin films Technique</i>)
ET-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektronovou atomizací
F-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
HNO ₃	Kyselina dusičná
ICP	Indukčně vázané plazma (z angl. <i>Inductively Coupled Plasma</i>)
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IS	Iontová síla
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
NaNO ₃	Dusičnan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
PES	Polyethersulfon
PIXE	Prvková analýza pomocí protonového svazku
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Počet otáček za minutu
RSD	Přesnost měření
SPE	Extrakce na pevné fázi
XRF	Rengenofluorescenční spektrometrie

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

A	Expoziční plocha (cm^2)
c_{DGT}	Koncentrace naměřená technikou DGT ($\mu\text{g/l}$)
c_e	Koncentrace analytu (mg/l)
$c_{ICP-OES}$	Koncentrace naměřená technikou ICP-OES ($\mu\text{g/l}$)
D	Difúzní koeficient (cm^2/s)
D_e	Efektivní difúzní koeficient měřený v 10krát ředěném mléce (cm^2/s)
D_T	Difúzní koeficient při určité teplotě (cm^2/s)
F	Tok analytu ($\text{mol}/\text{cm}^2\text{s}$)
f_e	Eluční faktor
f_u	Akumulační faktor
Δg	Tloušťka difúzní vrstvy (cm)
M	Množství naakumulované v sorpčním gelu (ng)
t	doba expozice jednotek DGT v roztoku (s, příp. h)
T	Teplota ($^\circ\text{C}$)
V^{bl}	Objem sorpčního gelu (l)
V_e	Objem elučního činidla (l)
η	Viskozita (Pa.s)