

HODNOTENIE METÓDY STANOVENIA SELÉNU V ZELENINE ATOMOVOU ABSORPČNOU SPEKTROFOTOMETRIOU S ELEKTROTERMICKOU ATOMIZÁCIU A S GENEROVANÍM HYDRIDOV

ONDREJ HEGEDÜS^{ab}, ALŽBETA HEGEDÜSOVÁ^{bc}, JURAJ GAŠPARÍK^a a ADRIANA IVIČIČOVÁ^a

^a Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Nových Zámkoch, Slovenská 13, 940 30 Nové Zámky,

^b Výskumný ústav zeleninársky, Andovská 6, 940 01 Nové Zámky, ^c Katedra chémie, Fakulta prírodných vied Univerzity Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra, Slovenská republika
labodbor@zoznam.sk, valsikovam@vuznz.sk, ahegedusova@ukf.sk

Došlo 9.2.04, prepracované 12.1.05, prijaté 27.1.05.

Kľúčové slová: stanovenie selénu, ETA-AAS, HG-AAS, validácia

Úvod

Biologická hodnota vypestovaných poľnohospodárskych produktov závisí od kvality pestovateľských substrátov – pôd. V pôdach prítomné biogénne prvky sa transferujú do rastlín a tým do potravinového reťazca. Z týchto prvkov má veľmi významné postavenie selén, ktorý vplýva na zdravie ľudskej populácie. Hladina selénu v ľudskom organizme je závislá od jeho obsahu v systéme pôda – rastlina^{1,2}.

Rozloženie selénu závisí od rastlinného druhu. Obsah selénu je dvoj- až trojnásobne väčší v zrne a v koreni ako v stonke a v listoch. Selén vo forme seleničitanov sa nachádza hlavne v koreňoch, vo forme selenanov v stonke a v ostatných nadzemných orgánoch rastlín. Príčina je v rozdielnej redukčnej schopnosti rastlín. Seleničitany sú v rastlinách redukované až na elementárny selén, selenany sú málo redukované^{3,4}.

Zelenina svojim priaznivým látkovým zložením má významné postavenie v ľudskej výžive. Hladina selénu dosahuje v zeleninách hodnoty v rozmedzí od 0,001 do 0,034 mg kg⁻¹ čerstvej hmoty. Najbohatšie na Se sú rajčiny (0,034 mg kg⁻¹) a mrkva (0,020 mg kg⁻¹) (cit.⁵).

Svetová zdravotnícka organizácia stanovila doporučený denný príjem selénu v množstve 50–200 µg. Za optimálny sa považuje príjem 1 µg na deň na kg hmotnosti, priemer pre dospelé ženy 55 µg a pre dospelých mužov 70 µg na deň^{6,7}.

Pre stanovenie nízkych koncentrácií selénu v biologických materiáloch sú v literatúre popisované viaceré

metódy^{8,9}.

- spektrometrické (ETA-AAS, HG-AAS, fluorescenčná spektrometria, ICP-MS),
- elektrochemické (pulzná polarografia, katodická rozpúšťacia voltampérometria),
- rádiochemické (neutrónová aktivačná analýza, röntgenofluorescenčná analýza),
- separačné (plynová chromatografia, kvapalinová chromatografia).

Na stanovenie selénu vo vzorkách rastlinného a živočíšneho pôvodu sa v súčasnosti využíva najmä atómová absorpčná spektrofotometria (AAS). Analýza týchto matric si vyžaduje náročný rozklad pomerne veľkého množstva vzorky. Relatívne vyššie hladiny selénu sa často stanovujú metódou AAS po elektrotermickej atomizácii (ETA-AAS) s deutériovou kompenzáciou pozadia, resp. so Zeemanovou korekciou pozadia. Ursínyová a Hladíková⁸, stanovujú Se v krvnom sére priamo bez predošlej mineralizácie metódou ETA-AAS. V rámci špeciálnych analýz je využívaná prevažne technika generovania hydridov (HG-AAS). Podstata metódy spočíva v generácii hydridov analytu po redukcii na hydrid v kvapalnej fáze, jeho prevedení do plynnej fázy a následnej atomizácii v optickej dráhe atómového absorpčného spektrofotometra. Základným rysom tejto techniky je separácia analytu od matrice a jeho vyššia koncentrácia v absorpčnom prostredí v porovnaní s klasickými metódami AAS. V hydridovom atomizátore nie sú spektrálne interferencie závažným problémom. Nespektrálne interferencie sa prejavujú v kvapalnej fáze, pri redukcii analytu na hydrid a pri uvoľnení hydridu z roztoku, a v plynnej fáze prevažne v atomizátore¹⁰. Charakteristickým rysom nespektrálnych interferencií je, že nie sú aditívne, je možné ich korigovať technikou prídavkov.

Cieľom práce bolo porovnať dve techniky stanovenia Se metódou AAS a na základe štatistického hodnotenia výsledkov navrhnúť metódu vhodnú na stanovenie jeho nízkych koncentrácií v zelenine.

Experimentálna časť

Použitý prístroje a zariadenia

- na stanovenie selénu sa použil atómový absorpčný spektrofotometer SpectrAA–200 fy. Varian, Australia,
- merania sa uskutočnili využitím hydridovej techniky s modulom VGA-77 a techniky elektrotermickej atomizácie s deutériovou kompenzáciou pozadia s modulom GTA-100,
- kremíková absorpčná cela pre hydridovú techniku,
- mineralizačný autokláv ZA-1.

Chemikálie a reagenty

Pre techniku HG-AAS:

- základný roztok selénu (Merck) o koncentracii 1000 mg l⁻¹,

- pracovné roztoky selénu sa pripravili riedením základného roztoku zriedeným roztokom HCl o konc. $1,7 \text{ mol l}^{-1}$ v deionizovanej vode,
- deionizovaná voda,
- kyselina chlorovodíková, suprapur, Merck,
- pracovné roztoky HCl o konc. $1,7 \text{ mol l}^{-1}$, 7 mol l^{-1} a 10 mol l^{-1} sa pripravili riedením z koncentrovanej HCl suprapur deionizovanou vodou,
- kyselina dusičná, suprapur, Merck,
- peroxid vodíka p.a. Merck, s certifikátom,
- redukčiant: 0,6% tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4) p.a. Merck s 0,5% NaOH v deionizovanej vode.

Pre techniku ETA-AAS:

- základný roztok selénu (Merck) o koncentrácii 1000 mg l^{-1} ,
- pracovné roztoky sa pripravili riedením základného roztoku v 1% (v/v) roztoku HNO_3 (Merck, Suprapur) v deionizovanej vode,
- deionizovaná voda,
- kyselina dusičná, suprapur, Merck,
- peroxid vodíka p.a. Merck s certifikátom.

P o d m i e n k y m e r a n i a

- a) Pri použití hydridovej techniky sa na meranie použila katódová selénová výbojka – prúd na lampe 10 mA, vlnová dĺžka 196 nm, šírka štrbiny 1,0 nm bez kompenzácie pozadia. Čas nasávania vzorky pred samotným odčítaním 45 s, merací (integračný) čas 5 s, vyhodnotenie výšky signálu, prietok argónu 60 ml min^{-1} . Atomizačným prostredím bola kremenná kyveta vyhrievaná na $900 \text{ }^\circ\text{C}$, nosným roztokom HCl o konc. 10 mol l^{-1} a redukčným činidlom bol 0,6% NaBH_4 s 0,5% NaOH. Pre vyhodnotenie výsledkov sa použila metóda štandardných prídavkov.
- b) Pri použití elektrotermickej atomizácie sa na meranie použila katódová selénová výbojka, prúd na lampe 10 mA, vlnová dĺžka 196 nm, šírka štrbiny 1,0 nm,

s deutériovou kompenzáciou pozadia. Dávkovaný objem vzorky 10 μl . Použité modifikátory: paládiový modifikátor $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ o koncentrácii $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ v roztoku 0,1% HNO_3 v dávkovanom objeme 10 μl a kyselina askorbová o koncentrácii 1 % v dávkovanom objeme 10 μl . Pre vyhodnotenie výsledkov sa použila metóda kalibračnej krivky. Teplotný program uvádza tabuľka I.

V a l i d á c i a m e t ó d

Obidve použité metódy (ETA-AAS a HG-AAS) boli podrobené validácii, pričom sa stanovili nasledovné vybrané validačné charakteristiky metódy:

- zhodnosť – v podmienkach opakovateľnosti,
- kalibračná krivka a linearita,
- medza detekcie a medza stanoviteľnosti,
- štandardná kombinovaná neistota.

Zhodnosť (opakovateľnosť) sa charakterizovala výberovým variačným koeficientom s_R , ktorý sa počítal zo smerodajnej odchýlky s a aritmetického priemeru \bar{x} série meraní v podmienkach opakovateľnosti t.j. podmienkach, pri ktorých sa nezávislé výsledky skúšok získajú tou istou metódou na identických skúšaných jednotkách, v tom istom laboratóriu, tým istým operátorom, pri použití toho istého vybavenia počas krátkeho časového rozpätia¹¹. Vypočítaný s_R sa hodnotil podľa vopred určenej požiadavky.

$$s_R = 100 \cdot s / \bar{x} \quad (1)$$

požiadavka: $s_R < 5 \%$.

Kalibračná krivka: Vypočítali sa základné parametre kalibračnej krivky (smernica závislosti m , posun regresnej priamky b a jeho štatistické testovanie, koeficient determinácie R^2 a spoľahlivosť kalibračného vzťahu reprezentovaná reziduálnou smerodajnou odchýlkou s_y , resp. relatívnou reziduálnou smerodajnou odchýlkou $s_{y,rel}$). V prípade, že sa dokáže štatisticky významná odlišnosť posunu regresnej priamky od nuly, s hodnotou b sa počíta, v opačnom prípade sa b zanedbáva, čo program vykoná automaticky.

Tabuľka I
Teplotný program stanovenia selénu technikou ETA-AAS

Stupeň	Teplota [$^\circ\text{C}$]	Doba zotrvania na danej teplote [s]	Prietok inertného plynu [l min^{-1}]	Poznámky
Sušenie	85	5	3,0	
Sušenie	95	40,0	3,0	
Sušenie	120	10,0	3,0	
Rozklad	1000	5,0	3,0	
Rozklad	1000	1,0	3,0	
Rozklad	1000	2,0	0,0	
Atomizácia	2600	0,8	0,0	meranie signálu
Atomizácia	2600	2,0	0,0	meranie signálu
Atomizácia	2600	2,0	3,0	čistenie kyvety

Linearita metódy sa hodnotila ako jej schopnosť poskytnúť v definovanom intervale výsledky úmerné koncentrácii¹². Určila sa maximálna dovolená odchýlka od priemernej relatívnej odozvy, ktorá sa znázornila v programe aj graficky ako dolná a horná hranica prijateľnej hodnoty relatívnej odozvy. Linearita metódy bola zabezpečená po ten bod, po ktorý relatívna priemerná odozva ležala medzi dolnou a hornou hranicou prijateľnej hodnoty relatívnej priemernej odozvy.

Pre vyhodnotenie výsledkov metódou štandardného prídavku sa medza detekcie počítala ako trojnásobok a pri stanovení medze stanoviteľnosti ako desaťnásobok smerodajnej odchýlky slepých vzoriek.

Pre vyhodnotenie výsledkov metódou kalibračnej krivky sa medza detekcie a medza stanoviteľnosti počítali z hornej hranice pásu spoľahlivosti, tzv. „upper limit approach“ (ULA, cit.¹³). Podmienkou bolo ekvidistantné rozdelenie koncentrácií.

Pre výpočet medze detekcie platí:

$$\text{LOD} \equiv c_D = k_D \cdot s_y / m \quad (2)$$

k_D je tabelovaná hodnota pre $(n - 2; 0,01)$ v kalibračnej závislosti tvaru $y = b + mc$, resp. pre $(n - 1; 0,01)$ v kalibračnej závislosti tvaru $y = mc$, s_y je reziduálna smerodajná odchýlka.

Pre výpočet medze stanoviteľnosti platí:

$$\text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOD} \quad (3)$$

Všetky výpočty popísaných validačných charakteristík sa vykonali v programe Excel pomocou výpočtových tabuliek vytvorených na tento účel, ktoré umožnia všestranne využívanie možností programu pri laboratórnych výpočtoch. Zostavené výpočtové tabuľky umožnia požadované výpočty validačných charakteristík z nameraných dát so slovným hodnotením požiadavky tak, aby dali jednoznačnú odpoveď užívateľovi o ďalšej nutnej činnosti.

Všetky vypočítané a jednotlivito hodnotené validačné charakteristiky sa premietli do jednej tabuľky, v ktorej sa na základe výsledkov hodnotenia jednotlivých validačných charakteristík hodnotila validácia ako celok¹⁴.

Štandardná neistota merania sa počítala ako rozšírená kombinovaná neistota podľa dokumentov Eurachem z programu Metro2003, verzia 3.02 (cit.¹⁵).

Analýzovaný materiál

Na analýzy sa použili vzorky čerstvých a sušených rajčín a kapusty. Vzorky zeleniny sa odoberali z výskumných poličok Výskumného ústavu zeleninárskeho v Nových Zámkoch, resp. z obchodnej siete.

Spracovanie vzoriek

Vzorky zeleniny po očistení sa zhomogenizovali a použili na mineralizáciu, resp. na prípravu sušiny. Sušina sa pripravila sušením čerstvých homogenizovaných vzoriek v sušiarňi pri teplote 80 °C.

Mineralizácia vzoriek: Vzorky čerstvej zeleniny sa priamo navažovali do mineralizačných autoklávov typu

ZA-1 a sušina po homogenizácii v trecej porcelánovej miske. Návažok čerstvej zeleniny bol 10 g, sušiny 1 g. K naváženým vzorkám sušiny sa pridal na zvlhčenie 1 ml deionizovanej vody. Ku vzorkám sa pridal 5 ml konc. HNO_3 a 2 ml H_2O_2 . Vzorky sa uzavreli do kovových plášťov mineralizačných autoklávov, a mineralizovali sa v horkovzdušných sterilizátoroch v trvaní 120 min pri teplote 140 °C.

Úprava mineralizátov pre HG-AAS: Po vychladnutí sa mineralizáty kvantitatívne preniesli do 25 ml odmerných baniek, pridal sa 4 ml HCl o koncentrácii 7 mol l^{-1} a zahrievali 30 min pri 80 °C. Po vychladnutí sa doplnili HCl o koncentrácii 1,7 mol l^{-1} po rýsku a hneď zmerali. Pre stanovenie obsahu Se v zelenine sa použila metóda štandardných prídavkov. Ako štandardný prídavok sa k naváženým vzorkám pred mineralizáciou pridal 0,25, resp. 0,5 μg Se.

Úprava mineralizátov pre ETA-AAS: Po vychladnutí sa mineralizáty kvantitatívne preniesli do 25 ml odmerných baniek a doplnili deionizovanou vodou po rýsku.

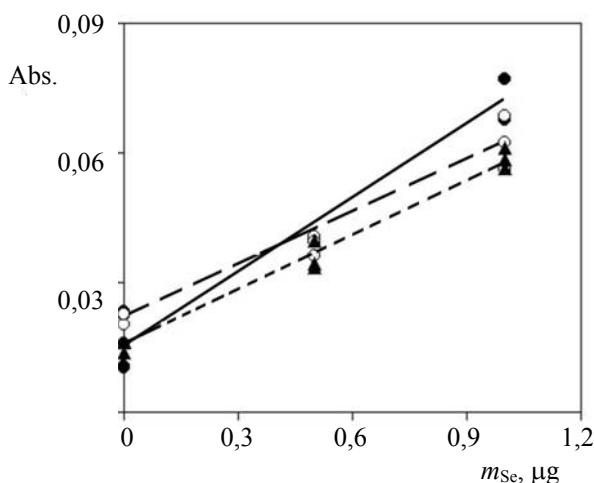
Výsledky a diskusia

Nízke hladiny selénu v zelenine vyžadujú vypracovať takú metódu stanovenia, ktorou je možné reálne sa vyskytujúce koncentrácie bezpečne stanoviť. Dosahovanie vyššej koncentrácie selénu v analyzovanej vzorke zvyšovaním návažky je možné iba do určitej hranice, nad ktorou je mineralizácia vzorky už problematická alebo nemožná. Zakoncentrovanie vzorky môže tiež narážať na technické prekážky, resp. aj na stabilitu analyzovaného materiálu.

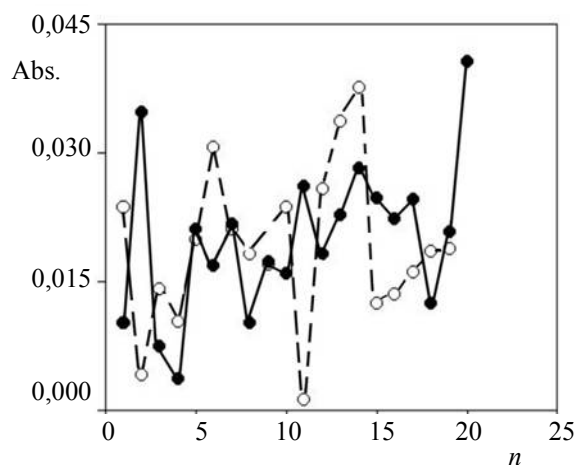
Rôzne zeleninové druhy predstavujú maticu, ktorú nie je možné priamo bez úpravy vzorky analyzovať a ktorá tzv. maticovým efektom môže významne ovplyvniť priebeh analýzy. Nakoľko sa jedná o stanovenie veľmi nízkych koncentrácií, bolo treba použiť metódu s vysokou citlivosťou.

Moderné prístroje AAS sú vybavené technikou lineárnej kalibrácie s počiatkom v bode 0, ako aj s nenulovým úsekom, pričom sa pracuje v „normálnom kalibračnom móde“ s kalibráciou vo vodných roztokoch. Predpokladom použitia tejto techniky je, že metóda musí mať požadovanú výťažnosť a vplyv matrice na výsledok merania musí byť malý¹⁶. Kvôli overovaniu vplyvu matrice sa porovnávali výsledky meraní vzoriek vodných roztokov Se a mineralizátov zelenín so štandardným prídavkom použitím techník ETA-AAS a HG-AAS. Obr. 1 a 2 znázorňujú výsledky meraní, získané dvoma sledovanými technikami.

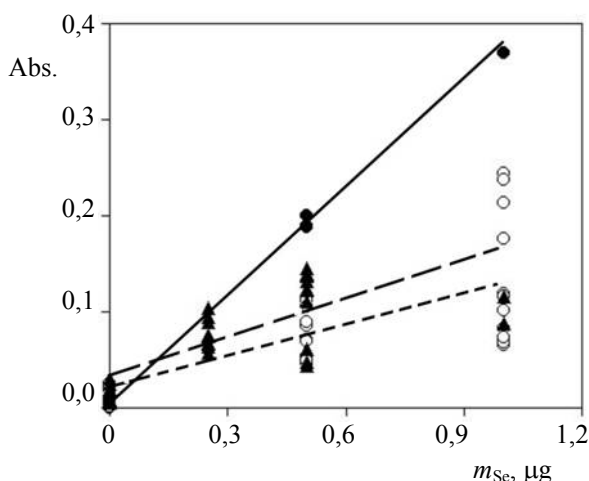
Výsledky analýz zeleninových vzoriek poukazujú na existenciu maticového vplyvu najmä v prípade metódy HG-AAS. Maticový vplyv pri metóde HG-AAS spôsoboval približne polovičnú výťažnosť analýzy. Znamenalo to, že výsledky analýz nebolo možné počítať cez kalibračnú krivku vodného roztoku. K dosahovaniu reálnych výsledkov analýz sa vyhodnotenie vykonávalo metódou štandardného prídavku, a to prídávaním štandardného prídavku do vzorky pred mineralizáciou. Metóda ETA-AAS dávala



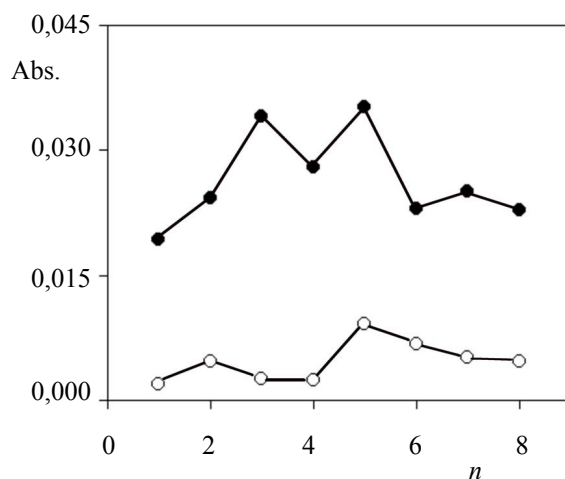
Obr. 1. Vplyv matrice na priebeh kalibračnej závislosti pri meraniach ETA-AAS; ● – vodný roztok, ○ – čerstvé rajčiny, ▲ – sušené rajčiny, m_{Se} štandardný prídavok Se



Obr. 3. Absorbancia slepých vzoriek a vzoriek rajčín pri meraniach ETA-AAS; ● – rajčiny, ○ – slepé vzorky, n počet meraní



Obr. 2. Vplyv matrice na priebeh kalibračnej závislosti pri meraniach HG-AAS; ● – vodný roztok, ○ – čerstvé rajčiny, ▲ – sušené rajčiny, m_{Se} štandardný prídavok Se



Obr. 4. Absorbancia slepých vzoriek a vzoriek rajčín pri meraniach HG-AAS; ● – rajčiny, ○ – slepé vzorky, n počet meraní

len o málo odlišnú smernicu závislosti, čo poukazuje na malý vplyv matrice na výťažnosť stanovenia vzoriek zelenín.

Možnosť stanovenia reálnych koncentrácií Se v analyzovaných vzorkách sa sledovala porovnávaním výsledkov meraní slepých vzoriek s výsledkami meraní reálnych vzoriek. Merania sa vykonali sériami analýz slepých vzoriek a vzoriek rajčín celým analytickým postupom vrátane mineralizácie, tak technikou ETA-AAS, ako aj technikou HG-AAS. Absorbancia merania slepých vzoriek na AAS sa porovnala s hodnotami absorbancie vzoriek rajčín (obr. 3 a 4). Výsledky poukazujú na skutočnosť,

že z dôvodu nízkeho obsahu Se v analyzovanej zelenine, metódou ETA-AAS nie je možné bezpečne rozlíšiť signál slepých vzoriek od signálu analyzovanej zeleniny, čo znamená, že citlivosť metódy za vyššie uvedených podmienok mineralizácie je nedostatočná na stanovovanie Se v zeleninových vzorkách s nízkym obsahom Se.

Iné výsledky dáva metóda HG-AAS. Z obr. 4 vyplýva jednoznačná a po analýze série vzoriek bezpečná rozlíšiteľnosť absorbancie slepých vzoriek od absorbancie vzoriek zelenín. Znamená to, že metóda môže byť úspešne použitá aj na stanovovanie nízkych koncentrácií Se v zelenine.

Tabuľka II
Hodnotenie opakovateľnosti metód stanovenia Se v modelových vodných roztokoch

Počítaný parameter		ETA-AAS	HG-AAS
Aritmetický priemer, mg l ⁻¹	\bar{x}	0,0148	0,0095
Smerodajná odchýlka, mg l ⁻¹	s	0,0011	0,0010
Výberový variačný koeficient, %	$s_R = 100 \cdot s / \bar{x}$	7,49	10,96
Požiadavka	$s_R < 12 \%$	splnená	splnená

Pre účely štatistického porovnania dvoch techník merania (ETA-AAS a HG-AAS) sa pristúpilo k stanoveniu vybraných validačných charakteristík metód v modelových vodných roztokoch. Výsledky validácie metódy ETA-AAS a metódy HG-AAS počítané vo výpočtových tabuľkách v programe Excel sú uvedené v tabuľkách II až IV. Z výsledkov vyplýva, že metóda ETA-AAS sa vyznačuje nižšou hodnotou opakovateľnosti ako metóda HG-AAS, linearita merania bola zabezpečená a potvrdená pri oboch meracích technikách. Zo stanovenia detekčných limitov metód (sú počítané na meraný roztok) vyplýva nižšia hod-

Tabuľka III
Hodnotenie kalibračnej krivky a linearity metód stanovenia Se v modelových vodných roztokoch

Parametr	Hodnota	
	ETA-AAS	HG-AAS
<i>Hodnotenie posunu kalibračného vzťahu v kalibračnej závislosti^a</i>		
t_{vyp}	2,901	2,645
t_{krit}	2,160	2,160
m , l mg ⁻¹	9,367	13,082
b	0,009	-0,004
<i>Hodnotenie spoľahlivosti regresie^b</i>		
s_y	0,0053	0,0024
$s_{y \text{ rel}}$	3,35	2,14
	kalibrácia je spoľahlivá	kalibrácia je spoľahlivá
<i>Hodnotenie linearit^c</i>		
	požiadavka na linearitu splnená	požiadavka na linearitu splnená

^a Absorbancia = $f(c)$, pričom c je koncentrácia [mg l⁻¹], Podľa hodnotenia kalibračného vzťahu platí kalibračný model: $y = m \cdot x + b$, ^b požiadavka: $s_{y \text{ rel}} < 5,0$, ^c požiadavka: všetky body relatívnej odozvy

Tabuľka IV
Detekčné limity stanovenia Se v modelových vodných roztokoch

Parametr	Hodnota	
	ETA-AAS	HG-AAS
<i>Hodnotenie posunu kalibračného vzťahu v kalibračnej závislosti^a</i>		
t_{vyp}	2,914	2,645
t_{krit}	2,160	2,160
m , l mg ⁻¹	9,319	13,082
b	0,0093	-0,0039
<i>Hodnotenie spoľahlivosti regresie^b</i>		
s_y	0,0053	0,0024
$k_{D(n-2)}$	2,953	2,953
$k_{D(n-1)}$	2,624	2,624
LOD, mg l ⁻¹	0,0017	0,00049
LOQ, mg l ⁻¹	0,0050	0,00165
	požiadavka je splnená	požiadavka je splnená

^a Absorbancia = $f(c)$, pričom c je koncentrácia [mg l⁻¹], podľa hodnotenia kalibračného vzťahu platí kalibračný model: $y = m \cdot x + b$, ^b požiadavka na dolnú hranicu rozsahu merania (LOQ) $\leq 0,005$

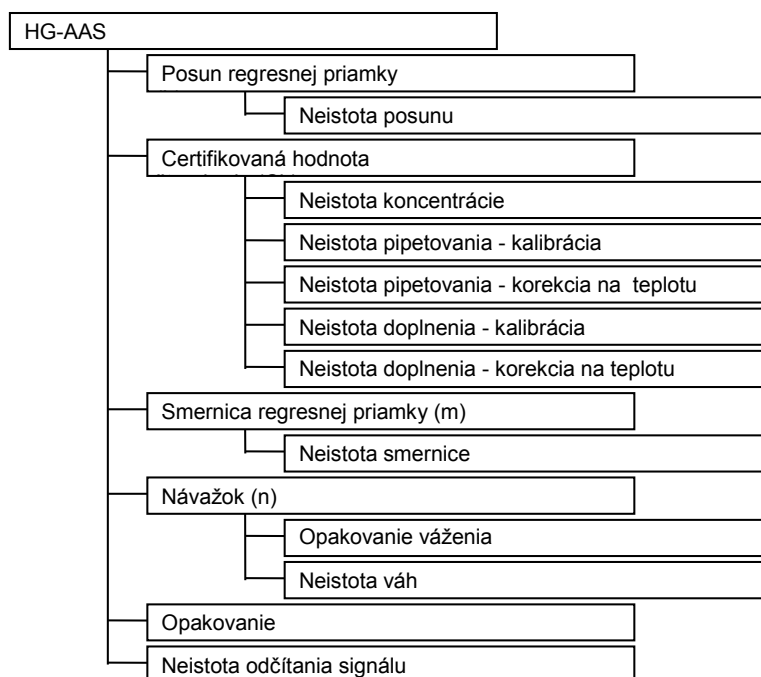
nota medze stanoviteľnosti metódy HG-AAS, čo z pohľadu nízkej koncentrácie Se v zelenine je rozhodujúce. Z uvedeného dôvodu pre analýzu zeleninových vzoriek môže byť úspešne použitá.

Výpočet kombinovanej štandardnej neistoty metódy vyžaduje odhaliť všetky zdroje neistoty počas celého analytického procesu. Program Metro vyžaduje zostrojiť Ishikawov diagram, pomocou ktorého sú jednotlivé neistoty priradené k výsledku stanovenia. Modelový diagram je uvedený na obr. 5. Výsledkom výpočtu je kombinovaná štandardná neistota, ktorú uvádza tabuľka V.

Ako potvrdzujú vyššie uvedené výsledky, na stanovenie Se v zeleninových vzorkách sa osvedčila metóda HG-AAS, preto ďalšie stanovenia sa robili touto metódou.

Tabuľka V
Výsledok stanovenia neistôt v programe Metro2003

Veličina	Se
Hodnota, mg kg ⁻¹	0,0203
Kombinovaná štandardná neistota, mg kg ⁻¹	± 0,0058
Expanzný koeficient	1,96
Pravdepodobnosť, %	95
Počet stupňov voľnosti	1101



Obr. 5. Ishikawov diagram pridelovania neistôt

Tabuľka VI
Overenie správnosti vypracovanej metódy

Použitý referenčný materiál	Certifikovaná hodnota Se [mg kg ⁻¹]	Stanovená hodnota Se [mg kg ⁻¹]	Výťažnosť [%]
SRM 1515 – sušené jablkové listy	0,050	0,045	91,0
CRM (NRC for CRM China) – kapusta	0,083	0,098	118,3
BCR 384 – lyofilizované bravčové mäso	0,183	0,195	106,6

Validita metódy sa overila reálnymi vzorkami cez nasledovné validačné charakteristiky:

- správnosť,
- medza detekcie a medza stanoviteľnosti,
- štandardná kombinovaná neistota.

Nakoľko sa rozhodlo pre metódu vyhodnotenia pomocou štandardných prídavkov (silný vplyv matrice), so stanovením linearitu sa nepočítalo.

Správnosť metódy sa overila analýzou matricových referenčných materiálov (RM). Ako RM sa použili: sušené jablkové listy, kapusta a lyofilizované bravčové mäso (lyofilizované bravčové mäso bolo analyzované ako vzorka s vyššou sušinou a s vyšším obsahom bielkovín, ktorej úspešná analýza dáva predpoklady aj pre stanovenie organicky viazaného Se v rastlinných bielkovinách, pre ktorú úlohu sa popísaná metóda hodlá využívať).

Výsledky analýz uvádza tabuľka VI.

Pre vyhodnotenie výsledkov metódou štandardného

prídavku sa medza detekcie počítala ako trojnásobok a medza stanoviteľnosti ako desať násobok smerodajnej odchýlky slepých vzoriek. Pre výpočet limitných hodnôt metódy zo slepých vzoriek platí: LOD = 0,01044 a LOQ = 0,03480 v signálovej doméne, v prepočte na koncentračnú doménu a na návažok vzorky 10,0 g LOD = 0,00264 mg Se kg⁻¹, resp. LOQ = 0,00904 mg Se kg⁻¹.

Pre stanovenie neistoty metódy platia vyššie uvedené podmienky.

Záver

Porovnaním sledovaných metód stanovenia selénu (ETA-AAS a HG-AAS) sa zistilo, že vo vzorkách zeleniny s nízkym obsahom Se metódou ETA-AAS nie je možné bezpečne rozlíšiť signál slepých vzoriek od signálu analyzovanej zeleniny. Znamená to, že citlivosť tejto metódy je

nedostatočná na stanovovanie Se v zeleninových vzorkách s jeho nízkym obsahom. Metódou HG-AAS sa signál slepých vzoriek bezpečne rozlíši od signálu analyzovanej zeleniny.

Výsledky meraní metódou HG-AAS poukázali na existenciu silného matricového vplyvu, preto výsledky analýz sa neurčovali z kalibračnej krivky vodného roztoku, ale metódou štandardného prídavku.

Výsledky validácie metódy ETA-AAS a metódy HG-AAS počítané vo výpočtových tabuľkách v programe Excel dokazujú, že metóda ETA-AAS sa vyznačuje nižšou hodnotou opakovateľnosti ako metóda HG-AAS, linearita merania bola zabezpečená a potvrdená pri oboch meracích metódach. Zo stanovenia detekčných limitov metód vyplýva nižšia hodnota medze stanoviteľnosti metódy HG-AAS, čo z pohľadu nízkej koncentrácie Se v zelenine je rozhodujúce.

Na stanovenie Se v zeleninových vzorkách sa osvedčila metóda HG-AAS. Analýzou referenčných materiálov (sušené jablkové listy, kapusta a hovädzie obličky) sa zistila 105% priemerná výtlačnosť analýzy, štandardná neistota 28,7 %, LOD = 0,01044 a LOQ = 0,03480 v signálovej doméne. V prepočte na koncentračnú doménu v podmienkach mineralizácie LOD = 0,00264 mg Se kg⁻¹, resp. LOQ = 0,00904 mg Se kg⁻¹.

Táto práca bola podporovaná štátnym podprogramom výskumu a vývoja SR „Potraviny – kvalita a bezpečnosť“ číslo 2003SP270280E010280E01.

LITERATÚRA

- Bajčan D., Žemberyová M., Limek J., Ruriková D.: Chem. Listy 95, 638 (2001).
- Vollmannová A., Tóth T., Tomáš J., Jomová K.: Chem. Listy 97, 801 (2003).
- Baghour M., Moreno D.A., Hernandez J., Castilla N., Romero L.: J. Environ. Sci. Health A 6, 1075 (2002).
- Farkašová I., Žemberyová M.: Chem. Listy 93, 633 (1999).
- Arteel G. E., Sies H.: Environ. Toxicol. Pharm. 4, 153 (2001).
- Maďarič A., Kadřabová J.: Bull. Potravn. Výsk. 1, 11 (1998).
- Velišek J. (ed): *Chemie potravin 2*, str. 97. Osis, Tábor 1999.
- Ursínyová M., Hladíková V.: Chem. Listy 92, 495 (1998).
- Zhenga J., Ohata M., Furuta N., Kosmus W.: J. Chromatogr. 1, 55 (2000).
- Dědina J., Fara M., Kolihová D., Korečková J., Musil J., Plško E., Sychra V.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Československá spektroskopická společnost – Sekce optické atomové spektroskopie, Praha 1987.
- STN ISO 3534-1: *Štatistika. Slovník a značky – Část 1: Pravdepodobnosť a všeobecné štatistické termíny* (júl 1999).
- Holík M.: *Validace analytických metod (Postup při práci a příprava protokolu se zaměřením na HPLC a TLC)*. Lachema, Brno 1990.
- Mocák J., Bond A. M., Mitchell S., Scollary G.: Pure Appl. Chem. 2, 297 (1997).
- Hegedüs O.: *Konferencia Chemické analýzy pri zabezpečovaní ochrany zdravia obyvateľstva. Donovaly, 2. – 3. októbra 2002*, Zborník, str. 42. Štátny zdravotný ústav v Banskej Bystrici, Banská Bystrica 2002.
- Baričič P., Mackov M.: *Metro2003 (Verzia: 2.30). Laboratorný softvér pre Windows*. Chemmea s.r.o., Bratislava 2003.
- Borošová D.: *Konferencia Chemické analýzy pri zabezpečovaní ochrany zdravia obyvateľstva. Donovaly, 2. – 3. októbra 2002*, Zborník, str. 37. Štátny zdravotný ústav v Banskej Bystrici, Banská Bystrica 2002.

O. Hegedüs^{a,b}, A. Hegedüsová^{b,c}, J. Gašparík^a, and A. Ivičičová^a (^a Regional Authority of Public Health, Nové Zámky, ^b Research Institute of Vegetables, Nové Zámky, ^c Department of Chemistry, Constantine the Philosopher University in Nitra, Slovak Republic): **Evaluation of the ETA-AAS and HG-AAS Methods of Selenium Determination in Vegetables**

Two methods of selenium determination, ETA-AAS and HG-AAS, were compared and evaluated. The following validation parameters were determined: accuracy (under repeatability conditions), trueness, calibration curve and linearity, limit of detection, limit of determination and combined standard uncertainty of the method. The HG-AAS method was more suitable for the determination of low selenium concentrations in vegetables. The results were calculated by the standard addition method because of the strong matrix effect.