

## **Způsoby přípravy vzorků tuků pro stanovení stopových množství kovů**

LUDMILA WINTEROVÁ – ŠTEFAN SCHMIDT

**Súhrn.** V práci sme sa zamerali na problematiku prípravy vzoriek tukov a olejov pre stopovú analýzu vybraných ťažkých kovov (Fe, Ni, Cu, Pb a Cd). Porovnali sme tri metódy, z ktorých sa osvedčila predovšetkým extrakcia kovov z tukovej matrice kyselinou chlórovodíkovou. Dobré výsledky sme získali aj pri mineralizácii suchou cestou pomalým spaľovaním vzorky na variči a v muflovej peci. Obe nami navrhnuté metódy boli prijaté do normy RVHP. Pri analýzach sme nezistili zvýšené obsahy sledovaných kovov v skúšaných tukových výrobkoch.

Zvýšený obsah některých těžkých kovů v životním prostředí se musí zákonitě projevit i ve zvýšení obsahu těchto kovů v potravinách. Hygienická směrnice č. 50 z roku 1978 a její doplněk č. 69 z roku 1986 ukládá výrobcům potravin kontrolovat své výrobky a dodržovat maximální limity obsahu těžkých kovů předepsané touto směrnicí. Před podnikovými laboratořemi tedy stojí úkol zajišťovat důslednou kontrolu potravin, a tím plnit důležitý celospolečenský požadavek – zajistit zdravotně nezávadnou výživu obyvatelstva.

Stanovení koncentrací kovů povolených Hygienickou směrnicí spadá do oblasti stopové analýzy. Tohoto označení se používá pro stanovení obsahu analytu pod  $10^{-4} \% = 1 \text{ mg/kg} = 1 \text{ ppm}$ . Pro stanovení takových koncentrací je nutno používat nejen drahé a většinou dovozové přístroje, ale hlavně pracovat v podmínkách a používat postupy, které stopová analýza vyžaduje. Společnými problémy všech metod pro stopovou analýzu je odběr a homogenizace vzorků, nestálost vzorků, ztráty při mineralizaci, kontaminace z prostředí, čistota chemikálií, dávkování reagentů a v neposlední řadě i správná interpretace výsledků. Obecně platí, že výrazně vzrůstají potíže při snižování stanovených obsahů.

---

Ing. Ludmila Winterová, CSc., Tukový průmysl – Výzkumný ústav, U plynárny 30, 145 10 Praha 4.

Ing. Štefan Schmidt, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Na správnost získaných výsledků stanovení stopových množství kovů má největší vliv příprava vzorků, t. j. převedení organického materiálu do rozpustné homogenní anorganické formy – tzv. mineralizace. K nejobtížněji mineralizovatelným organickým látkám patří tuky a oleje, v nichž je navíc limitovaný obsah kovů velmi nízký (od setin – Cd po jednotky – Fe mg/kg). Pro přípravu vzorků tuků a olejů jsou využívány hlavně metody suché mineralizace [1–4], které, jsou-li prováděny dostatečně pozorně a pečlivě, dávají většínou vyhovující výsledky.

Mokrá mineralizace se pro oleje a tuky využívá velmi zřídka, protože může vycházet pouze z malého množství vzorku 0,2–0,5 g a nelze při ní dosáhnout dokonalého rozložení matrice. Byly používány směsi  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  [5] a mineralizáty byly měřeny bezplamenovou AAS, která je citlivější. Mokrá mineralizace [6] není zatížena ztrátami, ale riziko kontaminace je větší a je-li použita kyselina chloristá [7], hrozí exploze vzorku.

Další používanou metodou přípravy tukových vzorků je extrakce tuků zředěnými kyselinami [8–12], kdy je za zvýšené teploty extrahován vzorek buď rozpuštěný v organickém rozpouštědle, nebo přímo rozehrátý vzorek. Extrakce se provádí buď v temperovaných dělicích nálevkách, nebo varem v baňkách pod zpětným chladičem. Extrakty jsou vhodné pro stanovení AAS s plamenovou a bezplamenovou atomizací, pro stanovení polarografické je nutná jejich dalších úprava.

Velká pozornost je v literatuře věnována přímému stanovení bez úpravy vzorku přímým dávkováním oleje do grafitové kyvety při bezplamenovém AAS stanovení kovů. Tento způsob uvádějí materiály IUPAC [13], ISO [14] a další autoři. U nás zatím tento způsob není rozšířen, vzhledem k nedostatku vhodné přístrojové techniky.

V naší práci jsme se zaměřili na porovnání dvou způsobů suché mineralizace a extrakční metody, které považujeme v našich podmínkách pro přípravu vzorků tuků ke stanovení stopových množství kovů za nejvhodnější.

## Metody a materiál

*Extrakce minerální kyselinou* – stanovované těžké kovy se z olejů a tuků extrahují do kyseliny chlorovodíkové koncentrace  $c(\text{HCl}) = 5 \text{ mol.l}^{-1}$  při  $75^\circ\text{C}$ .

Pracovní postup: Diferenčně navážený vzorek (ca 50 g) se převede do plášťované dělicí nálevky vytemperované na  $75^\circ\text{C}$ . Ke vzorku se přidá 10 ml 5M HCl a obsah nálevky se důkladně třepe po dobu 5 minut. Po dokonalém oddělení obou fází se spodní vrstva odpustí přes filtr smočený 5M HCl do 50 ml

odměrné baňky. Ke zbylé tukové vrstvě v dělicí nálevce se znovu přidá 10 ml roztoku HCl a extrakce se opakuje. Potřetí se extrakce provede s 10 ml destilované vody. Spojené extrakty se v 50 ml odměrné baňce doplní redestilovanou vodou.

*Mineralizace tzv. suchou cestou* – vzorek tuku se zpopelní při regulované teplotě nejdříve na elektrickém vařiči a poté v muflové peci a popel se rozpustí v 5 % kyselině dusičné.

Pracovní postup A: Do platinové nebo křemenné misky se naváží přesně 25 g dobře homogenizovaného oleje nebo tuku. Misky se umístí na plotýnku regulovatelného el. vařiče, jehož teplota se za míchání vzorku skleněnou tyčinkou zvedá podle přesného teplotního režimu tak, aby po 3 hodinách dosáhla 300 °C. Postupné zvyšování teploty je důležité jednak proto, aby nedocházelo k prskání vzorku a jednak proto, že při rychlém zvýšení teploty dochází ke ztrátám některých kovů a tvorbě nesnadno rozložitelných látek. Při 300 °C se vzorky ponechají na vařiči nejméně 5 hodiny tak, aby došlo k jejich zuhelnění. Zuhelnatělé vzorky se umístí do muflové pece, která se rychle vyhřeje na 300 °C a po 30 minutách se teplota znovu zvyšuje po 50 °C až na 500 °C. Na této teplotě se vzorek nechá minimálně 6 hodin. Současně se vzorky je nutno zahřívat i prázdnou misku, která slouží jako slepý pokus pro stanovení.

Zpopelněný vzorek se pak rozpustí v 3 × 8 ml 5% kyseliny dusičné za horka na vodní lázni a převede do 25 ml odměrné baňky.

Pracovní postup B: Jiný způsob přípravy vzorků před vložením do muflové pece je jejich spálení pomocí knotu, který se vyrobí z bezpopelného filtračního papíru. Knot se ponoří do rozehrátého vzorku tuku a zapálí se. Vzorek pomalu vyhoří a zbytek v misce se spálí v muflové peci jako v předchozím postupu. Pro slepý pokus je nutno v prázdné misce spálit jeden připravený knot.

*Vlastní stanovení.* Sledované kovy byly v mineralizátech stanoveny metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie na přístroji AAS 3 fy Carl Zeiss, olovo bylo stanoveno metodou diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie na přístroji PA 3 (Laboratorní přístroje, Praha). Podmínky měření pro jednotlivé kovy jsou uvedeny v práci [15] a budou podrobně zveřejněny v připravovaném příspěvku [16].

Materiál – všechna měření byly prováděna na vzorku rafinovaného ztuženého 100 % tuku vyrobeného z bezerukového řepkového oleje. Dále byly analyzovány vzorky surového řepkového oleje a některých finálních výrobků ztužených kovů a rafinovaných olejů.

## Výsledky a diskuse

Pro zajištění rozdílů mezi navrženými metodami, případně jejich vhodnosti, byly porovnávány nalezené obsahy Fe, Ni, Cu u vzorku ztuženého 100 % tuku, který byl extrahován 5M HCl a mineralizován podle postupů A a B. Obsah Cd a Pb porovnáván nebyl, protože nalezené hodnoty byly ve všech případech pod mezí stanovitelnosti těchto kovů. V tabulce 1 jsou uvedeny nalezené hodnoty obsahu kovů z 8 paralelních stanovení, vypočtené průměrné hodnoty ( $\bar{x}$ ), směrodatné odchylky ( $s$ ) a variační koeficienty ( $v$ ). Shodnost výsledků získaných jednotlivými postupy přípravy vzorku byla prověřena  $t$ -testem, tabelovaná hodnota  $t_k$  pro  $n = 8$  a  $\alpha = 0,05$  je 2,145. Je-li vypočítaná hodnota  $t$  menší než tato hodnota, není mezi oběma metodami na

Tabuľka 1. Porovnání jednotlivých způsobů přípravy vzorku tuku Iva pro stanovení kovů mg.kg<sup>-1</sup>

Table 1. Comparison of the different procedures of the preparation of Iva fat for metal determination mg kg<sup>-1</sup>

Stanovení <sup>1</sup>	Fe			Ni			Cu		
	E	A	B	E	A	B	E	A	B
1	2,42	2,50	1,70	0,45	0,29	0,24	0,04	0,03	0,05
2	2,40	3,02	2,18	0,44	0,39	0,25	0,04	0,03	0,02
3	2,51	2,69	2,32	0,45	0,29	0,46	0,04	0,04	0,03
4	2,58	2,73	1,77	0,44	0,25	0,46	0,04	0,03	0,05
5	2,45	2,21	2,20	0,48	0,26	0,38	0,05	0,03	0,05
6	2,62	2,53	1,92	0,42	0,31	0,29	0,04	0,08	0,04
7	2,43	2,18	2,15	0,38	0,35	0,31	0,03	0,05	0,02
8	2,49	2,35	1,98	0,41	0,30	0,27	0,03	0,04	0,03
$\bar{x}$	2,49	2,53	2,03	0,43	0,32	0,33	0,039	0,041	0,037
$s$	0,074	0,270	0,206	0,028	0,051	0,084	0,006	0,016	0,013
$v$	3,0	10,7	10,1	6,5	15,9	25,4	15,4	39,0	35,1
$t$	0,377	3,906		5,00	0,27		0,31	0,512	

E – extrakce 5 M HCl, Extraction with 5 M HCl,

A – spalování (pomalé zuhelnění vzorku na vařici + muflová pec),

Incineration (slow carbonification of the sample on a cook-stove + muffle furnace),

B – vyhoření vzorku bezpopelným knotem + muflová pec,

Burning of the sample by an ashless wick + muffle furnace.

$\bar{x}$  – průměr, Average,  $s$  – směrodatná odchylka, Standard deviation,  $v$  – variační koeficient v %, Variation coefficient in %,  $t$  – hodnota vypočtená podle vzorce, Value calculated according to the formula,  $t_k$  – tabelovaná hodnota = 2,145, Table value = 2.145.

<sup>1</sup>Determination.

hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významný rozdíl a výsledky jsou shodné [17].

Vzhledem k tomu, že nebylo v našich možnostech získat ověřené referenční materiály tukového charakteru, na kterých bychom si ověřili správnost postupu při mineralizaci i při vlastním stanovení, pokusili jsme se o to jednak pomocí přídatku anorganických standardů ke vzorkům, a jednak pomocí srovnávacích analýz na jiných pracovištích. Standardní roztoky kovů jsme přidávali přímo k navážkám vzorků tuku Iva. Velikost přídatků byla volena tak, aby se obsah kovu pohyboval kolem hodnoty hygienického limitu pro daný kov.

Získané výsledky potvrdili správnost navrženého postupu mineralizace suchou i extrakční metodou. Hodnoty výtěžnosti (recovery) se pohybovali v uspokojivých relacích [15] a nebylo prokázáno významné snížení obsahu sledovaných kovů v důsledku relativně vyšší teploty [18] při spalování vzorků v muflové peci.

Z výsledků v tabulce 1 pro stanovení Fe vyplynulo následovné:

1. Rozdíl mezi extrakčním způsobem a spalováním na elektrické plotýnce nebyl statisticky významný, byly nalezeny shodné hodnoty, i když u většiny dalších vzorků byly nacházeny hodnoty extrakční metodou o něco nižší (viz i tab. 2). To je celkem snadno vysvětlitelné tím, že je extrahováno pouze Fe v iontové formě. Extrakční metoda má ale velkou přednost v rychlosti (ca 1 hodina proti minimálně 16 hodinám suché mineralizace) a je tedy vhodná hlavně pro rychlé orientační stanovení.
2. Extrakční způsob má lepší opakovatelnost stanovení (nižší variační koeficient).
3. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl pro spalování pomocí knotu nebo elektrické plotýnky. Při metodě s bezpopelným knotem dochází ke ztrátám Fe, a to až o ca 20 %, způsobeným zřejmě strháváním částic železa spolu se sazemí, které při tomto způsobu vznikají ve značné míře. Proto jsme v další práci tento způsob nepoužívali, i když je ryhlejší a méně nepříjemný než pomalé zuhelnňování na elektrické plotýnce.

Pro stanovení Ni lze vyvodit následující závěry:

1. Byla zjištěna shoda výsledků oběma způsoby spalování, které mají větší rozptyl výsledků než metoda extrakční.
2. Mezi extrakční metodou a metodou spalování na elektrické plotýnce byl zjištěn statisticky významný rozdíl, extrakcí byly nalezeny vyšší hodnoty. Při spalování dochází zřejmě k určitým ztrátám Ni, což potvrzují i některé naše další výsledky.

Obsah Cu ve vzorku se pohyboval na hranici meze stanovitelnosti  $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ale přesto se průměrné hodnoty u všech tří metod shodovaly a byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl mezi nimi. Pro takto nízké koncen-

trance je pochopitelný velký rozptyl výsedků, i když i zde dávala extrakční metoda mnohem lepší opakovatelnost.

V tabulce 2 uvádíme pro ilustraci ještě další hodnoty získané při porovnávání už jenom vybraných postupů – extrakce a zuhelnňování na elektrické pločince u různých typů výrobků Tukového průmyslu.

Tabulka 2. Porovnání jednotlivých způsobů přípravy vzorků různých tuků pro stanovení těžkých kovů [mg.kg<sup>-1</sup>]

Table 2. Comparison of the different procedures of the preparation of different fat samples for heavy metal determination [mg kg<sup>-1</sup>]

Vzorek <sup>1</sup>	Fe		Ni		Cu	
	E	A	E	A	E	A
surový řepkový olej <sup>2</sup>	3,15	3,27	0,06	0,05	<0,05	<0,05
Iva č. 1 <sup>3</sup>	1,80	1,87	0,05	0,09	0,09	0,12
Iva č. 2 <sup>4</sup>	0,90	1,12	0,37	0,35	0,08	0,08
Iva č. 3 <sup>5</sup>	1,33	1,62	0,30	0,30	0,07	0,08
Ceres soft	1,41	1,87	0,06	0,12	0,09	0,06
S-tuk <sup>6</sup>	0,86	1,03	<0,05	<0,05	0,08	0,09
rafinovaný slunečnicový olej <sup>7</sup>	0,28	0,37	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
rafinovaný řepkový olej <sup>8</sup>	0,15	0,25	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Vysvětlivky E a A vid' v tab. 1.

For explanations E and A see Table 1.

<sup>1</sup>Sample; <sup>2</sup>Raw rape-seed oil; <sup>3</sup>Iva No. 1; <sup>4</sup>Iva No. 2; <sup>5</sup>Iva No. 3; <sup>6</sup>S-fat; <sup>7</sup>Refined sunflower oil;

<sup>8</sup>Refined rape-seed oil.

## Závěr

Metody přípravy vzorku ve stopové analýze mohou ovlivnit správnost získaného výsledku podle údaje z literatury až osmdesáti procenty. Je proto velmi důležité věnovat pozornost standardizaci těchto metod, protože různé typy rostlinných i živočišných materiálů vyžadují i různé postupy. Obě uvedené a námi vypracované metody byly na návrh čs. strany přijaty do normy RVHP – Metody mineralizace tuků a olejů, jejíž konečný návrh byl schválen zasedáním specialistů RVHP pro normalizaci a všemi čs. partnery v létě roku 1989. Norma RVHP bude zpracována do soustavy čs. norem jakok ČSN, čímž bude dán předpoklad pro zajištění správnosti a reprodukovatelnosti výsedků analýz zainteresovaných pracovišť.

## Literatura

1. LIST, G. R. – HOFFMAN, R. L. – KWOLEK, W. F., J. Amer. Oil Chem. Soc., 45, 1968, s. 872.
2. SALEK, M. I. – MURRAY, R. S. – CHIN, G. N., J. Amer. Oil Chem. Soc., 65, 1988, s. 1767.
3. SAGREDOS, A. N., Fette Seifen Anstrichm., 79, 1977, s. 331.
4. PIHLAJA, H., Fette Seifen Anstrichm., 83, 1981, s. 294.
5. ELSON, C. M. – BEM, E. M. – ACKMANN, R. G., J. Amer. Oil Chem. Soc., 58, 1981, s. 1024.
6. ELSON, C. M. – ACKMANN, R. G., J. Amer. Oil Chem. Soc., 55, 1978, s. 616.
7. FEDELMANN, C., Anal. Chem., 46, 1974, s. 1606.
8. ČOUPKOVÁ, M. – WINTEROVÁ, L. – MACH, I., UVITZ – Potrav. Vědy, 29, 1988, s. 29.
9. PERSMARK, V. – TOREGARD, B., J. Amer. Oil Chem. Soc., 48, 1971, s. 650.
10. JACOB, R. A. – KLEVAY, L. M., Anal. Chem., 47, 1975, s. 741.
11. KOHIYAMA, M. – MARUYAMA, T. – NIIYA, I. – MATSUMOTO, T., Analyst, 105, 1980, s. 105.
12. BLACK, L. T., J. Amer. Oil Chem. Soc., 52, 1975, s. 88.
13. HENDRIKSE, P. W. – SLIKERVEER, F. J. – ZAALBERG, J. – HAUTFENNE, A., Pure Appl. Chem., 60, 1988, s. 893.
14. ISO/TC 34/SC 11 N 350.
15. WINTEROVÁ, L. a kol.: Minimalizace obsahu těžkých kovů v surovinách a výrobcích tukového průmyslu. [Výzkumná správa.] Praha, Tukový průmysl, 1989. 123 s.
16. WINTEROVÁ, L. – SCHMIDT, Š.: v přípravě.
17. ECKSCHLAGER, K. – HORSÁK, I. – KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL – Bratislava, Alfa 1980. 224 s.
18. HOENIG, M. – DE BORGER, R., Spectrochem. Acta, 38B, 1983, s. 873.

Do redakcie došlo 17. 11. 1989

### Методы подготовки проб жиров для определения ничтожно малых количеств металлов

#### Резюме

В работе мы намерились на проблематику подготовки проб жиров и масел для анализа ничтожно малых количеств избранных тяжелых металлов (Fe, Ni, Cu, Pb и Cd). Сравнивались три метода, из которых оправдался прежде всего метод экстрагирования металлов из жировой матрицы хлористоводородной кислотой. Хорошие результаты мы получили также при минерализации сухим путем медленным сжиганием пробы на плите или в муфельной печи. Оба нами предлагаемые метода были приняты в стандарт СЭВа. При анализах мы неопределили повышенную долю исследованных металлов в испытываемых жировых изделиях.

## **Preparation of fat samples for the determination of trace amounts of metals**

### **Summary**

The work was aimed at the preparation of fat and oil samples for the trace analysis of some heavy metals (Fe, Ni, Cu, Pb and Cd). Three methods have been compared out of which especially the extraction of the metals from fat matrix with hydrochloric acid proved effective. Good results were also obtained with dry mineralization at slow burning of the sample on a cook-stove and in a muffle furnace. Both methods were suggested to be included into the COMECON standard. The analyses revealed no increased contents of the metals studied in the investigated fat products.