

ACP
Analytická chémia v praxi
stav a perspektívy
2012



XII. konferencia s medzinárodnou účasťou
**SÚČASNÝ STAV A PERSPEKTÍVY ANALYTICKEJ
CHÉMIE V PRAXI**

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

8. – 11. mája 2012
v Bratislave



SLOVENSKÁ
ZDRAVOTNICKÁ
UNIVERZITA



ORGANIZÁTORI

Ústav analytickej chémie FCHPT STU v Bratislave

v spolupráci

s Katedrou analytické chémie, Přírodovědecké fakulty UK v Praze,
Slovenskou zdravotníckou univerzitou v Bratislave,
Odbornou skupinou pre analytickú chémiu Slovenskej chemickej spoločnosti
a České společnosti chemické

ODBORNÝ GARANT

Prof. Ing. Ján Labuda, DrSc., FCHPT STU v Bratislave

PROGRAMOVÝ VÝBOR

Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., PřF UK v Praze
Prof. MVDr. Jozef Bíreš, DrSc., ŠVPS SR
Prof. Mgr. Dana Farkašová, PhD., SZU v Bratislave
Doc. RNDr. Milan Hutta, CSc., PřF UK v Bratislave
Prof. Ing. Ján Labuda, DrSc., FCHPT STU v Bratislave
Doc. Ing. Tibor Liptaj, CSc., FCHPT STU v Bratislave
Prof. Ing. Ján Mocák, DrSc., FPV UCM v Trnave
Ing. Jozef Obernauer, SNAS
MUDr. Gabriel Šimko, MPH, ÚVZ SR
Mgr. Kateřina Věntusová, VÚP, Bratislava

ORGANIZAČNÝ VÝBOR

Ing. Svetlana Hrouzková, PhD.
Doc. Ing. Katarína Hroboňová, PhD.
Ing. Pavel Májek, PhD.
Ing. Ľubomír Švorc, PhD.
Ing. František Čacho, PhD.
RNDr. Vlastimil Vyskočil, PhD.
Ing. Zuzana Hloušková, hospodár

RECENZENT

Prof. Ing. Ján Labuda, DrSc., FCHPT STU v Bratislave

VYDAVATEĽSTVO

Chemické Listy, ISSN 1803-2389

FLEXIBLE SCOPE OF ACCREDITATION IN CLINICAL BIOCHEMISTRY AND IMMUNOCHEMISTRY

JÁN BALLA

*Analytical-Diagnostic Laboratory & Ambulances Ltd, Prešov, Slovakia
jan.balla@mail.t-com.sk*

Quality in medical laboratories

Laboratory testing and services are an integral part of modern medical practice and have an important role in the provision of health care. Laboratory medicine confronts the same challenges of quality, cost, and access as the larger health care system. Although laboratory testing accounts only small part of annual health care costs the influence of laboratory medicine on the quality and cost of health care is much greater because laboratory test results influence the majority of patient care decisions and in utilization and reimbursement.

Medical laboratory accreditation

The concept of laboratory accreditation is defined by ISO/IEC as a formal recognition and authorization that a laboratory is competent to carry out specific tests or specific types of tests. Accreditation usually depends on a successful laboratory assessment and is followed by appropriate surveillance by an independent body. The accreditation of medical laboratories has become a subject of widespread interest in recent years. It was originally done according to ISO 17025 but nowadays is gradually changing to ISO/EN/15189 (ref.^{1,2}). Internationally recognized standard ISO/EN/15189:2007 is acknowledged as a cornerstone of accreditation of medical laboratories and it is accepted by nearly all Accreditation Bodies all over the world. Accreditation awarded is based on the assessments of laboratories conducted by assessors selected and trained by Accreditation Bodies. Assessors selected from medical laboratory professionals and trained by Accreditation Bodies play the key role in assessment process of medical laboratories seeking accreditation. These assessors should be preferably drawn from the field of laboratory medicine ensuring that medical laboratory professionals are significant part of the assessment team.

Accreditation scope development

The scope of accreditation of clinical laboratories is the formal and precise statement of the activities which the laboratories are accredited for³. Historically, clinical biochemistry laboratory accreditation has been based on a fixed scope of accreditation which defines the detailed list of testing methods, describing the measurement principle and procedures used for the tests, range of measure-

ments, tested matrices and/ or materials and the scope parameters. Although the extension to scope can be made at any time throughout the assessment cycle the fixed scope of accreditation in clinical biochemistry and immunochemistry might be considered as rather rigid and restrictive particularly when running “open” analytical systems. Despite the laboratory competence in general has already been demonstrated it does not allow medical laboratories to react quickly to changing requirements in health care sector and to obtain formal acceptance of the necessary modifications from the accreditation body in time. Recommendations resulting from a comprehensive discussion within the EA WG Healthcare – Laboratory Medicine, set out some principles for the definition of fixed or flexible accreditation scopes. Accordingly, for medical laboratories the ‘flexible’ scope of accreditation is preferred. The laboratory shall maintain a list of all individual examinations which form part of its accreditation. This approach is fully in line with overall EA principles on flexible scopes as published in EA-2/15 (ref.⁴⁻⁶).

Premises of flexible accreditation

Laboratories accredited to flexible scope may be allowed to undertake certain tests and to report the results as accredited, even though they may not be explicitly stated on their accreditation schedule. This may involve (a) introduction of the similar or amended tests in accordance with a generic tests that are already covered by accreditation, (b) the modification of existing methods to broaden their applicability (e.g. to deal with new materials or matrices tested and/ or properties measured), (c) the inclusion of newly revised or technically equivalent standard methods, procedures or instrumental applications, and/ or (d) updated versions of test kits or their standard applications without having to report to the Accreditation Body in advance, provided that these tests, their modifications and updated versions of new methods and tests kits do not incorporate new measurement principles that are not covered by the original description of the scope.

The flexible scope of accreditation makes it possible to react faster with specific desires. With flexibility of accreditation scope, more responsibility is transferred to the medical laboratory. Planning, performing, documenting, and evaluating results and procedures include additional requirements, focused particularly on precisely defined systems of validation of the methods. Flexibilization of the scope allows laboratories which have shown appropriate technical competence to introduce new methods or tests, and/ or to modifying existing methods within its scope of accreditation, without having to undergo a new on site assessment. However, the flexibility does not go beyond a given analytical technique. Extension of an ana-

lytical technique or switching to another one requires a formal application for extension by Accreditation Body.

Prerequisites of flexible accreditation

There are some basic prerequisites for the flexible scope of accreditation: (i) first premise is a higher qualification of laboratory staff with an appropriate professional experience; (ii) second premise is a precise description of laboratory processes and procedures; (iii) third premise is a well developed management of quality system; (iv) fourth premise is an extended scope of methods validation process. It is highlighted that flexible accreditation is rather about qualified personnel than about the technical sophistication of the laboratory. For application and management of a flexible scope, the laboratory shall comply with specific requirements on validation. Precisely defined procedures for the validation of methods, together with performance and acceptance criteria, are the key points for flexible scope of accreditation. In contrast to fixed scope accreditation, flexible scope accreditation shows differences between sectors, between accreditation bodies, and between the professional assessors as well. The expression of the scope of accreditation for the fixed and the flexible accreditation vary from country to country and from sector to sector depending on the tradition in the respective sector and country. However, accreditation bodies in Europe adopt concept of flexible scope very warily rather than promote it. In the field of clinical chemistry and immunochemistry the concept of flexible scopes is still used rarely and only few medical laboratories in EU applied for it.

Discussion

The term "standard method" refers to a base measurement technology or analytical method. The term "non-standard method" includes both standard methods that have been modified to meet a particular site's needs and techniques and methods that are truly different from standard methods in their base technology. Field-associated methods such as immunoassay test kits are often considered non-standard by regulators because they are not traditional fixed laboratory methods. Whether a method is "standard" or "non-standard" is irrelevant as long as the data produced contributes in a cost-effective manner to the decisions that need to be made. There is often assumed that the term "standard" implies a level of data quality that is higher than that obtained by "non-standard" methods. Although it may be true that standard techniques have more name recognition, wider acceptance, and well-documented analytical performance, it is not necessarily true that a standard technique will yield higher analytical quality data than a non-standard technique for a specific application.

Introduction of revised standard methods or procedures, e.g. modifications of instrumental applications for open biochemical and immunochemical analyzers open a debate on how much can you tweak or change a method

or procedure and still have it be the same method or procedure. Modification is the act of making something different or the act of revising or altering. What is an 'adjustment' or 'modification' to methods, when revalidation is needed, is not articulated straightaway. When is it an adjustment and when is it a new procedure? If it's a new procedure you have to revalidate. The question arises when is "an adjustment a modification"? Generally, modifications could be allowable to such an extent when system suitability criteria demonstrate in validation study that the final procedure fits to purpose.

Conclusion

One must handle the flexible scope with flexibility. It is not useful to create rigid rules for formal harmonisation of the way the accreditation scope is expressed. However, the objective of this review is to focus attention of medical laboratories seeking accreditation on guiding and regulating requirements that medical laboratories shall meet to justify when fix upon appropriate scope of accreditation. EA and its stakeholders must develop the concept of flexible scope to make it better understood and more harmonised throughout the laboratory and accreditation communities⁷. All parties in concern, medical laboratories, national accreditation bodies and regulators would keep in mind the international context as led by ILAC and IAF to ensure flexible scope implementation with clear interpretation and internationally recognized readability rather than local interpretation of it.

REFERENCES

1. EN ISO/IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd edition, 2005.
2. ISO 15189:2007 Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence.
3. ILAC-G18:04/2010 Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories
4. EA-4/17 EA. Position Paper on the Description of Scopes of Accreditation of Medical Laboratories. EA Laboratory Committee working group on Healthcare – Laboratory Medicine. Date of Approval: 9 November 2008; Date of Implementation: 9 November 2009.
5. EA-2/15 – EA Requirements for the Accreditation of Flexible Scopes. EA Executive Committee. Date of approval: 9th July 2008. Date of implementation: 9th July 2009.
6. IFCC Statement on the use of ISO 15189 in the accreditation of medical laboratories. IFCC/EMD Committee on Clinical Laboratory Medicine, June 2007.
7. Accreditation with Flexible Scope. Needs, Current Situation, Future Developments. Outcomes of the EUROLAB TCQA workshop. European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories. Paris, November 24, 2009.

ELEKTROANALYTICKÉ METODY V KLINICKE ANALÝZE

JIRÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,
Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektro-
chemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2,
Česká republika
barek@natur.cuni.cz

1. Úvod

V souvislosti s fascinujícím rozvojem moderních a separačních a spektrometrických metod a jejich aplikací v klinické analýze došlo k výraznému útlumu používání moderních elektroanalytických metod v této mimořádně významné oblasti. Cílem tohoto příspěvku je zdůraznění současných možností zejména voltametrie a amperometrie v oblasti klinické analýzy a na konkrétních příkladech ukázat, že v řadě případů mohou být užitečnou, ekonomicky výhodnou, uživatelsky přívětivou a z hlediska potřebných analytických parametrů plnohodnotnou alternativou k převládajícím separačním a spektrometrickým metodám.

2. Kontrola obsahu farmaceutických preparátů

Zde lze využít skutečnosti, že většina přídavných látek je elektrochemicky inaktivních, takže lze poměrně selektivně stanovit elektrochemicky aktivní léčiva a to i v roztocích jejichž turbidita komplikuje či zcela znemožňuje spektrofotometrické stanovení. Požadavky na citlivost nejsou zpravidla v těchto případech nijak extrémní a dobu analýzy lze výrazně zkrátit použitím průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí. Pro stanovení elektrochemicky redukovatelných látek jsou nejvhodnější rtuťové¹ či amalgamové² elektrody či borem dopované diamantové filmové elektrody³, které lze použít i ke stanovení elektrochemicky oxidovatelných látek spolu s různými modifikacemi uhlíkových pastových elektrod⁴.

3. Stanovení léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách

Zde je v poslední době pozornost soustředěna na moč, vzhledem k rostoucím obtížím při získávání vzorků krve. Výše uvedené elektrody jsou opět snadno použitelné ke stanovení katodicky redukovatelných či anodicky oxidovatelných látek, avšak zpravidla je nutné předřadit předběžnou separaci a prekoncentraci, dnes nejčastěji pomocí extrakce tuhou fází, k dosažení požadované citlivosti a selektivity. V případě metabolitů se častěji používají metody založené na anodické oxidaci, neboť většina metabolitů aromatických či heterocyklických léčiv obsahuje OH sku-

pinu na aromatickém systému, která je snadno elektrochemicky oxidovatelná.

4. Stanovení biomarkerů expozice, onemocnění či léčby

I zde lze v některých případech použít s úspěchem moderní voltametrické či amperometrické metody, jak bude demonstrováno na případu stanovení hydroxypyrenu v moči pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody⁵. Diskutována bude i možnost voltametrického či amperometrického stanovení markerů nádorových onemocnění či orientační elektrochemické testy na přítomnost léčiv používaných v psychiatrii v moči.

5. Vsádková a průtoková elektroanalytická stanovení

V klinické analýze přistupujeme k měření v průtokových systémech v podstatě ze dvou důvodů. Tím prvním je snaha po zkrácení doby stanovení, která nás vede k používání průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí. Druhým důvodem je snaha po zvýšení selektivity stanovení, která vede k používání vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. V této části budou zejména diskutovány typy elektrochemických detektorů použitelných při průtokových měřeních v klinické analýze.

6. Elektrochemické biosenzory

Modifikace povrchu elektrody vhodnou látkou se schopností selektivně rozpoznat sledovaný analyt vede ke konstrukci „chytrých senzorů“ použitelných k rychlé a levné detekci určitých analytů. Příkladem mohou být DNA biosenzory detekující látky poškozující DNA, senzory modifikované různými „molekulárními kalíšky“, povrchově aktivními látkami, semipermeabilními filmy atp. Diskutovány budou možnosti a omezení v této oblasti, kde hlavním problémem zůstává dostatečná robustnost těchto elektrod a reprodukovatelnost jejich přípravy, která zatím brání jejich širší rutinní aplikaci.

7. Nové elektrodové materiály v klinické analýze

V této části budou diskutovány důvody vedoucí elektroanalytické chemiky k hledání nových elektrodových materiálů (snaha po dosažení co nejnižšího šumu a nabíjecího proudu, co nejširšího potenciálového okna, mechanické a elektrochemické robustnosti a zejména minimalizace

problémů s pasivací pracovní elektrody) a příklady perspektivních netradičních elektrodových materiálů (amalgamové, pastové, filmové a borem dopované diamantové filmové elektrody) u nichž již byla ověřena jejich použitelnost ke stanovení léčiv, jejich metabolitů, biomarkerů expozice a dalších analytů relevantních pro klinickou analýzu. Pozornost bude věnována i sítotiskovým elektrodám na jedno použití.

8. Využití supramolekulárních interakcí v klinické elektroanalýze

Zde bude definován pojem supramolekulární elektrochemie a diskutovány možnosti využití supramolekulárních interakcí v elektroanalytické chemii, ke zvýšení citlivosti či selektivity moderních elektroanalytických metod a k řešení některých problémů v oblasti klinické analýzy. Logickou inspirací v této oblasti je stále častější využívání supramolekulárních interakcí v separačních metodách.

9. Závěr

Závěrem budou stručně shrnuty výhody i nevýhody diskutovaných elektroanalytických metod a přístupů, jejich možnosti a omezení a perspektivy jejich dalšího rozvoje v oblasti klinické analýzy. Zmíněn bude i stále rostoucí význam monitorování léčiv a jejich metabolitů v životním prostředí.

Autor děkuje za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 0021620857), Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151) a Univerzitě Karlově v Praze (projekt UN-CE 2012/44).

LITERATURA

1. Barek J., Fogg A. G., Muck A., Zima J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 31, 291 (2001).
2. Yosypchuk B., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 189 (2009).
3. Peckova K., Musilova J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 148 (2009).
4. Zima J., Svancara I., Barek J., Vytras K.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 204 (2009).
5. Yosypchuk O., Peckova K., Barek J.: Chem. Listy 104, 186 (2010).

NETYPICKÉ ELEKTROANALYTICKÉ APLIKÁCIE

ERNEST BEINROHR a FRANTIŠEK ČACHO

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
ernest.beinrohr@stuba.sk*

Elektroanalytické metódy sa zväčša používajú na charakterizáciu a stanovenie elektrochemicky aktívnych látok ako sú ťažké kovy, niektoré nekovy a početné komplexné a organické zlúčeniny. V práci sú uvedené princípy a postupy chronopotenciometrického stanovenia niektorých elektrochemicky málo aktívnych alebo neaktívnych látok ako sú fosforečnany, hliník a bromičnany.

Fosforečnany sú elektrochemicky neaktívne a preto ich nemožno priamo elektrochemicky stanoviť. Možno však využiť tvorbu heteropolykyselín s molybdénanom, ktoré sú vďaka prítomnosti Mo(VI) už elektrochemicky aktívne a dajú sa redukovať a spätne oxidovať. Stanovenie pozostáva z troch krokov, najprv sa prídavkom roztoku molybdénanu v silne kyslom prostredí vytvorí heteropolykyselina, kyselina molybdátofosforečná, ktorá sa v póroch uhlíkovej elektródy elektrochemicky zredukuje na „molybdénovú modrú“ a potom sa táto zlúčenina konštantným prúdom spätne oxiduje. Z chronopotenciometrickej odozvy posledného kroku možno pomocou kalibračnej závislosti určiť koncentráciu fosforečnanov vo vzorke. Hlavnou výhodou oproti fotometrickej metódy je možnosť analyzovať aj zakalené a farebné roztoky.

Elektrochemické stanovenie hliníka vzhľadom na jeho príliš záporný oxidačno-redukčný potenciál je možné

iba nepriamo, napríklad s využitím adsorpcie komplexov hliníka na ortuťovú, poortuťovanú alebo bizmutovú elektródu s následnou elektrochemickou redukciou alebo oxidáciou adsorbovaného komplexu, presnejšie povedané organického ligandu v komplexe. Ďalšia, nami testovaná možnosť, je využiť tvorbu komplexov hliníka a trojmocného železa s fluoridovými aniónmi, kde hlinité ióny vytvárajú stabilnejšie komplexy ako železité. Potenciál elektrochemickej redukcie Fe(III) na Fe(II) závisí od prítomnosti fluoridových iónov, ich klesajúcou koncentráciou sa posúva k pozitívnejším potenciálom a naopak. Stanovenie hliníka je založené na tom, že po pridaní vzorky do roztoku s fluoridovými iónmi a Fe(III) prípadné hlinité ióny viažu časť fluoridových iónov, čím sa úmerne zvyšuje koncentrácia voľných železitých iónov a tým aj signál redukcie Fe(III) na Fe(II).

Bromičnany možno síce v kyslom prostredí elektrochemicky redukovať, avšak len pri potenciáloch, kde už prebieha aj elektrochemická redukcia vodíkových iónov, čo značne zvyšuje signál pozadia. Je výhodnejšie preto bromičnany v kyslom prostredí pomocou bromidov alebo jodidov najprv chemicky zredukovať na bróm alebo jód, ktoré potom možno elektrochemicky redukovať a stanoviť pri oveľa priaznivejších potenciáloch. Látky so silnými oxidačnými vlastnosťami samozrejme rušia, pretože tiež oxidujú bromidy a jodidy. Keďže sa bromičnany stanovujú najmä v dezinfikovaných vodách, ktoré obsahujú značné množstvá dezinfekčných prostriedkov a ich vedľajších produktov, treba tieto látky pred meraním najprv odstrániť. Najviac sa osvedčila ich selektívna redukcia prídavkom Fe(II).

Práca bola financovaná Vedeckou grantovou agentúrou VEGA (projekt č. 1/0149/12).

VYSOKOCITLIVÉ BIOROZPOZNÁVANIE POMOCOU LEKTÍNŮVÝCH BIOSENZOROV A ICH BIOMEDICÍNSKE APLIKÁCIE

TOMÁŠ BERTÓK*, PETER GEMEINER, a JÁN TKÁČ

*Oddelenie glykobiotechnológie, Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava, Slovenská republika
chemtobe@savba.sk*

Analýza biomolekúl, ako nukleové kyseliny či proteíny, sa ukázala byť veľmi dôležitá najmä pre oblasť medicínskej diagnostiky. V posledných rokoch sa ale kvôli svojmu výrazne vyššiemu kombinatorickému potenciálu ukázali byť zaujímavejšie molekuly sacharidov. Odhaduje sa, že približne 50–90 % ľudských proteínov je glykozylovaných, a zmeny v glykozylácií príslušného proteínu sú často dôsledkom určitého ochorenia, dokonca aj veľmi skorého štádia¹. Skupina látok (proteínov) schopných veľmi špecificky interagovať s určitou sacharidickou štruktúrou (dokonca špecificky s jedným sacharidom, či už viazaným alebo voľným), sa nazýva lektíny (starší názov je aglutiníny pre svoju schopnosť zhlukovať cukry). Práve táto skupina proteínov je čím ďalej tým častejšie využívaná v oblasti glykomiky a glykoproteomiky ako biorozpoznávacie elementy, a to pri konštrukcii biosenzorov a biočipov najmä pre biomedicínske aplikácie^{2–4}. Keďže väzobný pár lektín-glykoproteín nevytvára redoxný pár, na detekciu glykoproteínov sa obyčajne nevyužívajú bežné elektrochemické metódy, ako voltampérometria. Elektrochemická impedančná spektroskopia predstavuje citlivú metódu na detekciu zmien odporu vrstvy na povrchu fyzikálneho prevodníka so zvyšujúcou sa hrúbkou vrstvy⁵. Využíva sa pri konštrukcii nielen lektínových biosenzorov, ale aj imunosenzorov a genosenzorov⁶. Prudký rozvoj nastal v oblasti tzv. „label-free“ metód, ale aj metód so značením (lektínová „microarray“).

Biosenzory poskytujú možnosť jednoduchej, rýchlej a efektívnej prípravy vysokocitlivých zariadení na detekciu veľmi nízkych koncentrácií analytu aj v komplexných (biologických) vzorkách. Medzi najčastejšie využívané patria najmä elektrochemické biosenzory, aj keď existuje prirodzene viac typov využívajúcich lektíny ako biosektory (optické, kalorimetrické, piezoelektrické, magnetické, akustické, mikromechanické). Pre väčšiu citlivosť sa množstvo prác zaoberá v súčasnosti aplikáciou nano(bio) technológií do oblasti bioanalytických senzorov. Rôzne nanomateriály vykazujúce unikátne vlastnosti oproti makroskopickým materiálom z rovnakých prvkov slúžia na modifikáciu povrchov elektrochemických prevodníkov pre zlepšenie vlastností z nich pripravovaných biosenzorov, najmä citlivosti. Okrem aplikácie nanomateriálov, veľmi jednoduchý, lacný a efektívny spôsob modifikácie po-

vrchov v nanoškále je vytvorenie tzv. samo-usporiadaných vrstiev (self-assembled monolayers, SAM) na povrchu najmä zlatých elektród, umožňujúcich kontrolu hustoty a v určitých prípadoch aj orientácie biosektora na povrchu prevodníka. Najcitlivejším krokom pri príprave biosenzorov je blokovanie povrchu voči nešpecifickým interakciám z biologických vzoriek. Za týmto účelom je pre každú metódu a povrch potrebné osobitne preveriť daný blokovací roztok. Pre oblasť glykomiky patria medzi najčastejšie používané rôzne komerčne dostupné blokovacie roztoky (bez obsahu sacharidov), albumín z hovädzieho séra, alebo jednoduché menšie molekuly, ako napr. poly(vinyl alkohol) (PVA). Najčastejšie veličiny slúžiace na vyhodnotenie analytického signálu pri lektínových biosenzoroch sú impedancia, kapacitancia (elektrochemické biosenzory), index lomu (povrchová plazmónová rezonancia), prípadne pri metódach využívajúcich značenie fluorescencie (lektínová microarray), alebo zmeny v absorbancii vzoriek (ELLA, využívajúca chrenovú peroxidázou značené lektíny). Citlivosť, ktorá sa dosahuje pri meraniach využívajúcich elektrochemický detekčný koncept, sa pohybuje na femtomolárnej úrovni, pričom v súčasnosti je možné pomerne presne odlišiť hodnotu nešpecifického signálu od špecifického – úroveň nešpecifického signálu sa bežne pohybuje pod 20–30 % oproti špecifickému^{7,8}.

Príspevok bol vytvorený realizáciou projektu Centrum pre Materiály, vrstvy a systémy pre Aplikácie a Chemické procesy v extrémnych podmienkach – Etapa II, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Drake P. M., Cho W., Li B., Prakobphol A., Johansen E., Anderson N. L., Regnier F. E., Gibson B. W., Fisher S. J.: *Clin. Chem.* 56, 223 (2010).
2. Sánchez-Pomales G., Zangmeister R. A.: *Int. J. Electrochem.* 2011, 1 (2011).
3. Gabius H.-J., André S., Kaltner H., Siebert H.-C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 165 (2002).
4. Kolarich D., Lepenies B., Seeberger P. H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 1 (2011).
5. Rahaie M., Kazemi S. S.: *Biotechnol.* 9, 428 (2010).
6. Cunningham S., Gerlach J. Q., Kane M., Joshi L.: *Analyst* 135, 2471 (2010).
7. La Belle J. T., Gerlach J. Q., Svarovsky S., Joshi L.: *Anal. Chem.* 79, 6959 (2007).
8. Nagaraj V. J., Aithal S., Eaton S., Bothara M., Wiktor P., Prasad S.: *Nanomedicine* 5, 369 (2010).

VYUŽITIE KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZY NA SEPARÁCIU LÁTOK V MNOHOZLOŽKOVÝCH VZORKÁCH

RÓBERT BODOR*, MIROSLAVA HALAŠIOVÁ, ANDREA PASTIEROVÁ, JURAJ ŠEVČÍK a MARIÁN MASÁR

*Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, 985 42 Bratislava, Slovensko
bodor@fns.uniba.sk*

V súčasnosti sa spomedzi techník kapilárnej elektroforézy (CE) najčastejšie používa kapilárna zónová elektroforéza (CZE), najmä v hydrodynamicky otvorených separačných systémoch v kapilárach s vnútorným priemerom 50–75 μm . Hlavné obmedzenia tohto prístupu sa týkajú (a) koncentračných limitov detekcie (cLOD), (b) koncentračných pomerov analytov a matricových zložiek vo vzorke a (c) rozlíšenia látok v mnohozložkových vzorkách. Hydrodynamicky uzatvorený systém s potlačeným elektroosmotickým tokom umožňuje používať kapiláry s väčším vnútorným priemerom (300 μm), čo má priaznivý vplyv napr. na zníženie cLOD. Všeobecne, možnosti jednodolnovej technológie v separácii látok obsiahnutých v mnohozložkových zmesiach z dôvodu zvýšeného rizika prekryvu píkov sú obmedzené a to tak v hydrodynamicky otvorených ako aj zatvorených separačných systémoch. Technika spájania kolón je vhodným nástrojom na zníženie rizika prekryvu píkov tak pri kombinácii chromatografických ako aj rôznych elektroforetických techník. V oblasti kapilárnych elektroforetických techník najefektívnejšie sa dá využiť systém spájaných kolón on-line kombináciou izotachoforézy s kapilárnou zónovou elektroforézou (ITP-CZE) v hydrodynamicky uzatvorených separačných systémoch. Ak ITP krok slúži najmä ako koncentračná a dávkovacia technika pre CZE, tak ITP-CZE pri separácii mnohozložkových zmesí látok má v hľadiska rozlíšenia píkov v CZE stupni prakticky rovnaké obmedzenia ako jednodolnová CZE. Tento režim ITP-CZE je využiteľný na zníženie cLOD pri separácii látok s približne rovnakou koncentraciou. S využitím čistiacieho efektu ITP je ITP-CZE využiteľný aj pre vzorky, v ktorých makrozložky majú výrazne vyššiu koncentráciu (až niekoľko poriadkov) ako analyty. Zníženie saturačného faktora (pomer píkovej kapacity a počtu separovaných látok) v CZE stupni znižuje riziko prekryvu píkov. Obmedzenie počtu látok separovaných v CZE stupni je možné pri dvojkolnovej ITP-CZE dosiahnuť (a) voľbou vodiaceho a zakončujúceho iónu pre elektrolytový systém v ITP stupni, ktoré definujú malý pohyblivostný interval pre izotachoforetickú migráciu látok, (b) vytvorením pohyblivostných subintervalov pomocou ITP zón vhodných látok (diskrétnych spacerov), ktoré rozdelia analyty zo vzorky na skupiny migrujúce priestorovo oddelene v hraniciach týchto ITP zón. Elektro-

foretický prenos len jednej z týchto skupín do CZE stupňa zabezpečí zníženie počtu látok v CZE voči celkovému počtu látok vo vzorke.

Distribúcia analytov do jednotlivých skupín je závislá od efektívnej pohyblivosti tak analytov, ako aj použitých diskretných spacerov v zmysle kritérií pre „spike“ režim. Keďže skupiny analytov sú od seba oddelené, hoci analyty v rámci jednej skupiny nie sú separované, môžeme považovať ITP v takomto režime za prvú dimenziu dvojdimenzionálneho separačného systému. Prenos vybranej hraničnej vrstvy do CZE stupňa s minimálnou dĺžkou zón ohraničujúcich spacerov, ako aj odvedenie zostávajúcej časti ITP migračnej konfigurácie, je riadený a odvodený od signálu detektora ITP kolóny. Pri tomto prístupe analyty z ostatných rozhraní nie sú prítomné v CZE stupni, teda nulifikácia separácie z prvého stupňa je eliminovaná. V následných pokusoch sa do CZE stupňa prenášajú vždy iné hraničné vrstvy (iné skupiny analytov), ktoré sa nachádzajú medzi inou dvojicou spacerov. Takýmto spôsobom sa získa súbor meraní, ktorý charakterizuje analyzovanú vzorku ako celok a môžeme ho označiť ako 2D ITP(DS) CZE.

Väčší počet meraní s jednou vzorkou je z časového hľadiska náročné, preto automatizácia celého procesu je nevyhnutným predpokladom zabezpečenia efektivity pre analýzu väčšieho počtu vzoriek. Automatizovaný elektroforetický analyzátor so separačnou jednotkou usporiadanou pre techniku spájania kolón vyvinutý na Katedre analytickej chémie, Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave spĺňa tieto požiadavky. Ako mnohozložkové vzorky boli použité modelové zmesi organických zlúčenín, absorbujúce UV žiarenie alebo vzorky ľudského moču. Experimenty jednoznačne preukázali, že rôzne režimy ITP-CZE sú vhodné na separáciu multikomponentných vzoriek.

Elektroforetické techniky sú využiteľné aj na úpravu mnohozložkových vzoriek pre ďalšie analytické metódy, napr. na preparatívne účely. Z hľadiska množstva látok, ktoré sa dajú izolovať je spomedzi CE techník najefektívnejšia izotachoforéza. Použitím kapilár s veľkým vnútorným priemerom (1–1,5 mm) v hydrodynamicky uzavretom separačnom systéme a pomocou preparatívneho ventilu sa dá uskutočniť diskontinuálna frakcionácia, ktorá značne zjednoduší maticu, koncentruje analyt a umožňuje získať dostatočné množstvo vzorky pre finálnu metódu alebo pre iné ako analytické účely. Bolo preukázané, že preparatívna ITP je užitočná na úpravu vzoriek bohatých na vysokomolekulové látky, napr. proteíny alebo humínové kyseliny.

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektu VEGA 1/1149/12 a projektu “Dobudovanie centra excelentnosti metód a procesov zelenej chémie” ITMS: 26240120025 na základe podpory OPVaV financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

VYUŽITÍ UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD V ANALÝZE LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ

**HANA DEJMKOVÁ*, JIŘÍ BAREK
a JIŘÍ ZIMA**

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Česká republika
dejmkova@natur.cuni.cz*

Jako mnohé další obory, i farmaceutický průmysl je úzce spojen s analytickou chemií: výroba, biologická účinnost, distribuce v organismu a mnohé další procesy související s léčivými jsou kontrolovány různými analytickými metodami. Pro každou aplikaci je nutné zvolit vhodnou analytickou techniku a její parametry s ohledem na podmínky stanovení, požadované výsledky a náklady. Elektrochemické metody patří mezi techniky citlivé a poměrně selektivní; obě vlastnosti se zvýrazní, použije-li se jich v kombinaci s chromatografickými technikami. Vynikají nízkými náklady, jsou proto vhodné pro velkoplošná sledování, jejich zavedení ovšem vyžaduje dostatečné odborné zkušenosti. Rozhodující pro úspěch elektroanalytické metody je volba vhodné pracovní elektrody, přičemž v poslední době jsou v této oblasti s úspěchem využívány uhlíkové pastové elektrody (CPE). V jednotlivých kapitolách příspěvku budou shrnuty základní informace o těchto elektrodách, nastíněny chemické struktury látek vhodné pro analýzu na těchto elektrodách a na příkladech jednotlivých metod stanovení různých léčiv budou ukázány výhody a vlastnosti CPE.

Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) vznikly jako výsledek snahy o přípravu elektrody s obnovitelným povrchem a současně použitelné pro anodické oxidace. Původně se mělo jednat o suspenzi uhlíkového prášku vykapávající kapilárou, obdobně jako jsou řešeny rtuťové elektrody. Nakonec se nicméně ukázalo, že zajímavější vlastnosti má hustší, pastovitá směs, jejíž povrch se obnovuje mechanickým otřením¹.

CPE je tedy tvořená směsí uhlíku, pastovací kapaliny a případně dalších látek a tato hmota je naplněna do elektrodového těla vhodného tvaru, které umožňuje snadnou obnovu povrchu. Tato struktura zajišťuje elektrodám některé zajímavé elektrochemické vlastnosti, jako je nízký proud pozadí a široké potenciálové okno, a chemické vlastnosti, například příspěvek nepolární pastovací kapaliny k vlastnostem povrchu elektrody. Cenou za tyto výhody jsou i některé nevýhody, zejména nižší stabilita v přítomnosti organických rozpouštědel a omezená použitelnost v katodické oblasti z důvodu obtížné odstranitelnosti kyslíku z pastového materiálu².

Dalším specifickým pozitivem pastových elektrod je možnost modifikace základního složení pasty, buď použitím speciálních druhů pastovací kapaliny či uhlíku, jako jsou uhlíkové nanotrubičky, různé grafenové struktury, nebo přimísením dalších vhodných komponent do materiálu pasty. Úloha těchto změn je v zásadě trojí: modifikace elektrody mohou umožnit akumulaci analytu a tím zvětšit citlivost stanovení, mohou působit jako katalyzátor usnadňující elektrochemickou reakci, nebo konečně zprostředkování elektrochemické reakce vhodnými mediátory³.

CPE jsou obvykle používány v kombinaci se vsádkovými voltametrickými technikami, jako je cyklická voltametrie (CV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV). Při vhodné volbě pasty však lze tuto elektrodu použít jako pracovní elektrodu při amperometrické detekci v kombinaci s HPLC či jinými průtokovými metodami⁴.

Oxidovatelná léčiva

Vzhledem ke zmíněným vlastnostem CPE, respektive jejich obtížné použitelnosti v oblasti katodických potenciálů, je jejich hlavní význam při stanovení anodicky oxidovatelných látek. Těžiště této skupiny tvoří zejména sloučeniny obsahující ve své struktuře amino skupinu nebo hydroxy skupinu na aromatickém systému, kam kromě řady léčiv patří velká skupina jejich metabolitů. Mechanismus elektrochemické reakce těchto látek je značně komplikovaný, výrazně závislý na struktuře a pozici dalších funkčních skupin, nicméně obecně bývá mnohostupňový a jeho výsledným produktem jsou často polymerní struktury. Zde se potom s výhodou uplatní obnovitelný povrch uhlíkových pastových elektrod, protože reakční produkty pasivují povrch elektrod a tím snižují opakovatelnost měření bez čištění elektrody. Zvláštním případem jsou v tomto ohledu catecholy a hydrochinony, ve kterých uspořádání fenolových skupin umožňuje velmi snadnou oxidaci za vzniku benzochinonů a chinonů.

Hůře jsou oxidovatelné sekundární a terciární aminy. I v tomto případě jsou produkty reakcí závislé na celkové struktuře molekuly, nejčastější ale bývá vznik aldehydu a primárního či sekundárního aminu. Dalším oxidovatelným místem molekul léčiv jsou některé heterocyklické struktury, jako je indol či purin. Zvláštní skupinu tvoří thioly, oxidovatelné za vzniku disulfidické vazby mezi dvěma molekulami analytu⁵.

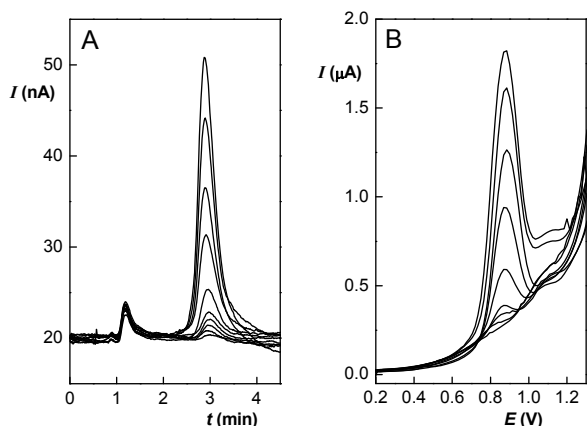
Zmíněné využitelné základní struktury jsou mezi léčivými relativně běžné a vyskytují se ve většině různých kategoriích léčiv. V některých případech jsou součástí charakteristické molekulové kostry, jako je tomu v případě catecholové struktury u catecholaminů a sympatomimetik, aromatické aminy běžné u sulfonamidů či hydrochinonové struktury u mnoha protirakovinných léčiv⁶. Elektrochemicky aktivní skupiny mohou také být do léčiv zavedeny nebo

změněny v průběhu jejich metabolické transformace.

Stanovení sulfamethizolu

Jak již bylo řečeno, je nutné pro různé analytické aplikace zvolit různé instrumentální techniky. Příkladem tohoto rozdílu může být použití techniky DPV pro stanovení analytu ve farmaceutických formulacích a techniky HPLC s elektrochemickou detekcí pro stanovení v biologických vzorcích. Tato volba využívá relativní výhody různých způsobů použití pro získání maximální efektivity měření. DPV je méně citlivá, ale je rychlá, levná a nenáročná. Je méně selektivní, proto se zpravidla nehodí k analýze komplexních směsí, na druhou stranu je však tolerantní k přítomnosti pevných částic a látek nepodléhajících elektrodové reakci. Proto je vhodná pro analýzu jednodušších směsí s vyšším obsahem analytu, jako jsou léčivé přípravky, kde teží ze snadné přípravy vzorku a časové a experimentální nenáročnosti. Stanovení v komplexní matici tělních tekutin či tkání naproti tomu vyžaduje zařazení separačního kroku; elektrochemická detekce v kombinaci s HPLC propůjčuje metodě jak potřebnou selektivitu, tak citlivost, ovšem za cenu větší časové i instrumentální náročnosti metody.

Obě tyto techniky byly využity pro stanovení sulfonamidového antibiotika sulfamethizolu (obr. 1). Pro DPV bylo zvoleno prostředí o pH 7; při analýze vzorku tablet byly tablety rozpuštěny a roztok zředěn pufrům. Mez detekce dosáhla hodnoty $1,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Optimální podmínky pro HPLC-ED byly: kolona LiChroCART 125-4, LiChrospher RP18 5 mm, mobilní fáze desetkrát zředěný

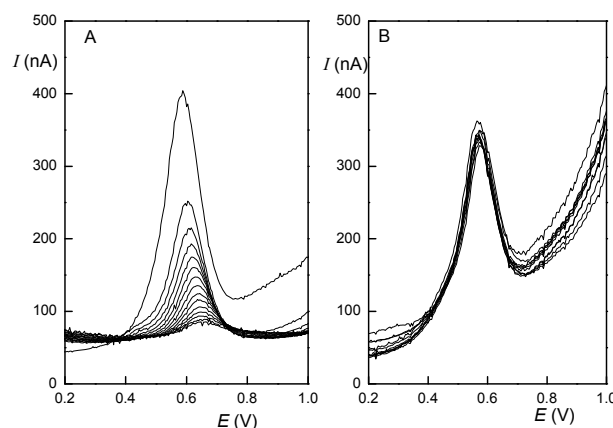


Obr. 1. Koncentrační závislosti sulfamethizolu, získané pomocí HPLC-ED (A) a DPV (B). (A) kolona LiChroCART 125-4, LiChrospher RP18 5 µm, mobilní fáze desetkrát zředěný BR pufr pH 3: methanol (70:30, V/V), detekční potenciál 1,3 V, $c = 4 \cdot 10^{-7}$; $6 \cdot 10^{-7}$; $8 \cdot 10^{-7}$; $1 \cdot 10^{-6}$; $2 \cdot 10^{-6}$; $4 \cdot 10^{-6}$; $6 \cdot 10^{-6}$; $8 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$; (B) základní elektrolyt BR pufr pH 7, $c = 4 \cdot 10^{-6}$; $6 \cdot 10^{-6}$; $8 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-5}$; $2 \cdot 10^{-5}$; $4 \cdot 10^{-5}$; $6 \cdot 10^{-5}$; $8 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$

Brittonův-Robinsonův (BR) pufr pH 3: methanol (70:30, V/V), průtoková rychlost 1 ml min^{-1} , detekční potenciál 1,3 V. V případě této metody mez detekce činila $2,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Modelové vzorky moči byly před analýzou přečištěny a zakonzentrovány extrakcí na tuhé fázi⁷.

Stanovení triclosanu

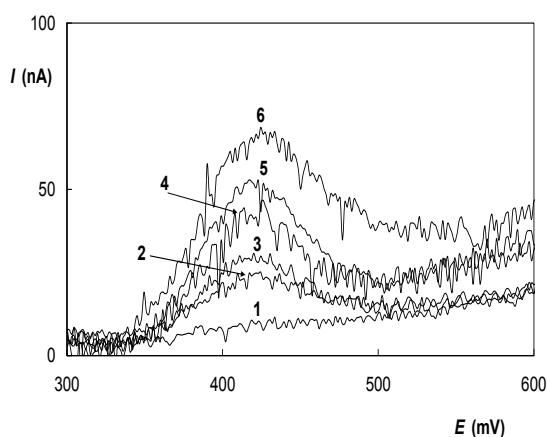
Hlavní myšlenkou při vývoji CPE byla možnost obnovitelnosti povrchu elektrody, odstraňující vliv historie elektrody na výsledky měření. Jeden z příkladů, využívající tuto výhodu, je metoda stanovení antibakteriálního činidla triclosanu pomocí DPV. Stanovení je prováděno v BR pufru pH 11, přičemž bylo ověřeno, že do obsahu 50 % methanolu v roztoku nemá obsah methanolu vliv na výšku ani polohu píku. Při ověření opakovatelnosti měření bylo zjištěno, že se elektroda velmi silně pasivuje; během patnácti následujících měření klesne odezva elektrody prakticky k nule (obr. 2A). Při otírání elektrody je signál stabilní s RSD 2,7 % ($n=10$) (obr. 2B). Autoři, využívající ke stanovení této látky jiné druhy elektrod, museli před každým měřením povrch elektrody obnovovat mnohem pracnějším leštěním⁸. Vyvinutá metoda je použitelná pro stanovení triclosanu⁹ s mezí stanovitelnosti $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.



Obr. 2. Opakované voltamogramy triclosanu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) prováděné bez otírání (A) a s otíráním (B) elektrody mezi měřeními. Měřeno v BR pufru pH 11

Stanovení doxorubicinu

V případě málo polárních analytů může být citlivost stanovení zvýšena akumulací na pracovní elektrodě; vzhledem k přítomnosti nepolární pastovací kapaliny se tu uplatňuje extrakce analytu do materiálu elektrody. V příznivých případech je možné tímto postupem zvýšit odezvu až o jeden řád a dosáhnout velmi nízkých mezí detekce. To byl i případ stanovení protinádorového léčiva doxorubicinu, probíhajícího v prostředí BR pufru pH 7.



Obr. 3. DP voltamogramy doxorubicinu v prostredí BR pufru pH 7 po predchozí akumulaci 120 s, potenciál akumulace 0 mV; $c = 0$ (1); $2 \cdot 10^{-9}$ (2); $4 \cdot 10^{-9}$ (3); $6 \cdot 10^{-9}$ (4); $8 \cdot 10^{-9}$ (5); $10 \cdot 10^{-9}$ (6) mol l^{-1}

Dvouminutovou akumulací, předřazenou před záznamem DP voltamogramu, se podařilo dosáhnout meze detekce $2 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3)¹⁰.

Stanovení epinefrinu

V tomto případě byla zkoumána možnost zvýšit voltametričnou odezvu katecholaminu epinefrinu využitím elektrokatalytických vlastností uhlíkových nanotrubiček. V sérii uhlíkových past se stoupajícím podílem uhlíkových nanotrubiček se několikanásobně zvětšila výška píku epinefrinu ve slabě kyselém prostředí při obsahu jednotlivých uhlíkových nanotrubiček (SWCNT) přesahujícím 50 %. Použití pastové elektrody vytvořené pouze ze SWCNT se ukázalo jako nevhodné vzhledem ke stoupajícímu šumu a driftu základní linie. Jako optimální podmínky pro stanovení bylo zvoleno prostředí BR pufru pH 6 a elektroda složená z grafitového prášku a SWCNT v poměru 1:1. Spolu se stoupající odezvou u modifikovaných elektrod se snižovala dosažitelná mez detekce¹¹; za optimálních podmínek dosáhla hodnoty $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Tato práce byla finančně podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021620857), Karlovou Univerzitou v Praze (projekt SVV 2012-263204) a Grantovou agenturou ČR (projekt P206/12/G151).

LITERATURA

1. Adams R. N.: *Anal. Chem.* 30, 1576 (1958).
2. Zima J., Svancara I., Barek J., Vytras K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 204 (2009).
3. Svancara I., Vytras K., Barek J., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 311 (2001).
4. Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: *Sensors* 4, 47 (2004).
5. Lund H., Hammerich O.: *Organic Electrochemistry*. 4. vyd., Marcel Dekker, New York 2001.
6. Flanagan R. J., Perrett D., Whelpton R.: *Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2005.
7. Mikeš M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2012.
8. Raghupathy P., Mathiyarasu J., Joseph J., Phani K. L. N., Yegnaraman V.: *J. Electroanal. Chem.* 584, 210 (2005).
9. Malá P.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova, Praha 2012.
10. Jemelkova Z., Zima J., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1503 (2009).
11. Jemelkova Z., Barek J., Zima J.: *Anal. Lett.* 43, 1367 (2010).

THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE THERMODYNAMIC DISTRIBUTION OF SOME POTENTIAL LOCAL ANAESTHETICS ON MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER STATIONARY PHASES

NATALIA DENDERZ^a, JOZEF LEHOTAY^{a,*}, and JOZEF ČIŽMÁRIK^b

^a Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

^b Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, Odbojarov 10, 832 32 Bratislava, Slovak Republic
jozef.lehotay@stuba.sk

Abstract

Molecularly imprinted polymer (MIP) and non-imprinted polymer (NIP) on the base of methacrylic acid prepared by a bulk polymerization were used as stationary phases for the HPLC analysis. The thermodynamic processes were carried out to investigate the temperature effects during sorption processes morpholinoethyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acid (MEP), dipiperodon and quercetin in methanol, acetonitrile and toluene (porogen) as mobile phases. The template was chosen from the set of homologous of MEP – 2-(morpholin-4-yl) ethyl (2-methoxyphenyl)carbamate. Thermodynamic parameters were measured over the temperature range of 20–60 °C. There were determined van't Hoff plots – dependences between logarithms of the retention factors ($\ln k$) and the inverse value of the temperature ($1/T$). Contrary to expectations, the driving force for the affinity of the target molecules for both of polymers was enthalpic term (with an average of 54 %, 82 % and 84 % contribution of enthalpic term for MeOH, ACN and toluene, respectively on the MIP and 53 %, 57 % and 65 % for MeOH, ACN and toluene, respectively on the NIP).

Introduction

Presently, the molecularly imprinting technique (MIT) is one of the most developing methods for sample preparation due to its usefulness in a wide range of applications. The large interest of molecularly imprinted polymers (MIPs) has progressed mainly in chemistry and biology. These synthetic materials are extensively applied due to their excellent selectivity, sensitivity, highly mechanical strength, pH stability, durability to heat, pressure and aggressive chemicals (such concentrate bases, acids or organic solvents). Additionally, MIPs synthesis is simple, cheap and brings a wide spectrum of target molecules and monomers which can be used to their preparation^{1–5}.

MIPs are synthetic, highly cross-linked polymers prepared by the polymerization of functional and cross-linking monomers in the presence of a specific analyte,

named template. The most common method to prepare MIPs is the non-covalent protocol^{6,7}. This approach is based on physical interaction of the print molecule and the functional monomer through hydrogen, hydrophobic, electrostatic bonding or dispersion interactions with an excess of a cross-linking monomer^{5,6}. Removal of the template leaves “memory sites”, complementary to the corresponding molecule in size and shape. These binding sites may recognize only one structure or group of structures on which was designed.

MIPs have an application as sorbents, stationary phases, synthetic receptors and enzymes or drug delivery systems in liquid chromatography (LC), solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction (SPME), capillary electrophoresis (CE), capillary electrochromatography (CEC) or in chemical sensors. They are using to the separation, extraction, catalysis or adsorption of drugs, biomolecules and metals from different complex matrices^{8–13}.

To understand the interactions occurring between the target molecule and the MIP, the thermodynamic studies are needed. The measured thermodynamic quantities using structurally related compounds can be useful to gain some insight into the retention and separation mechanisms on the MIPs. The magnitude of retention of a substance on stationary phases is measured under isocratic conditions by the retention factors, k_i and the distribution of the solute between the mobile and stationary phases is determined by the standard free energy change, ΔG_i° . Combination of these two parameters yielded commonly used to investigate retention mechanisms in chromatography – a van't Hoff analysis. If chromatographic retention is modelled as a partitioning process between two phases, the temperature dependence of retention should be modelled by the van't Hoff equation^{14–16}:

$$\ln k = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (1)$$

where k is retention factor for the solute, ΔH° is the standard partial molar enthalpy of transfer, ΔS° is the standard partial molar entropy of transfer, R is the gas constant, T is the absolute temperature and $\ln \phi$ is the phase ratio (the volume of the stationary phase, V_S , divided by the volume of the stationary phase, V_M).

In the present work the retention of potential local anaesthetics – morpholinoethyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acid (MEP), local anaesthetic – dipiperodon, flavonoid – quercetin in methanol, acetonitrile and toluene (porogen) as mobile phases were investigated on MIP- and the NIP-based columns. Calculated values of entropic and enthalpic terms should explain types of binding mechanisms which are taking place du-

ring the sorption processes on the tested polymers. Thanks to HPLC analysis of target molecules the investigation of mentioned interactions was possible.

Experimental

Chemicals and columns

MEP were prepared at Department of Pharmaceutical Chemistry (Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, Slovakia), dipiperodon (analytical standard) and quercetin (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Structures of all analytes used in this study are shown in Fig. 1. Methanol and acetonitrile (gradient grade) were obtained from J.T. Baker (Deventer, Netherlands), toluene (p.a.) was ordered in ANALYTIKA spol. s.r.o. (Prague, Czech Republic), acetic acid (p.a.) (HAc) and acetone (p.a.) were purchased from MIKROCHEM (Pezinok, Slovakia), methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) and azobisisobutyronitrile (AIBN) for synthesis were obtained from MERCK (Darmstadt, Germany), piston columns ECO^{PLUS}, 125 × 5 mm were delivered from KronLab (Dinslaken, Germany), GraceSmart RP18 column, 5 μm, 150 × 4.6 mm (Maryland, USA).

Polymers preparation

The MIP was prepared by a bulk polymerization method according to the Zhang *et al.* method¹⁸. MAA as a functional monomer (1.8 mmol), toluene as a porogen (3.0 ml) in presence of 2-(morpholin-4-yl)ethyl (2-methoxyphenyl)carbamate (M-1) (0.3 mmol) as a template were mixed together in a glass tube. Then EDMA as a cross-linker monomer (9.0 mmol) and AIBN (20 mg) as an initiator were added. The polymerization of the MIP was allowed to proceed in a water bath at 60 °C for 24 h. In the next, the prepared polymer was grounded and passed

through 40 μm sieve, to receive smaller particles than 40 μm. Fine particles were removed by flotation in acetone. The Soxhlet extraction of the dried particles (24 h, 100 ml MeOH/HAc (9:1), v/v) was used in order to purify the MIP from the template. The NIP was prepared in the same manner like the MIP but without presence of the template in the polymerization mixture. Because of keeping the same conditions of the polymerization process, the identical steps in the preparation of the control polymer (NIP) were used.

Columns preparation

Piston columns were filled with definite amount of the MIP or the NIP (200 mg). They were washed with methanol for 24 h to elute all remaining residues. The flow rate of the mobile phase was gradually growing up to precise pack of particles of the polymers. The sorbent in the column was pressed by the pistons as long as the resistance was felt.

Apparatus

An Agilent Technologies 1260 Infinity system (Waldbronn, Germany), consisting of a pump with a degasser, a diode-array detector (DAD), a 20 μL injector and an Agilent Technologies Chemstation were used. In the case of toluene the fractions were collected. Analyses were carried out on piston columns ECO^{PLUS} in temperature range of 20–60 °C. The mobile phases were methanol (for methanolic solutions of compounds under study), acetonitrile (for acetonitrile solutions) and toluene (for toluene solutions) at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. For the determination of the compounds under study in toluene fractions, C18 column at flow rate 0.5 mL min⁻¹ with methanol as a mobile phase was used. Diode array detection was used in the range of 200–400 nm and the chromatograms were acquired at wavelengths of 235, 254 and 360 nm.

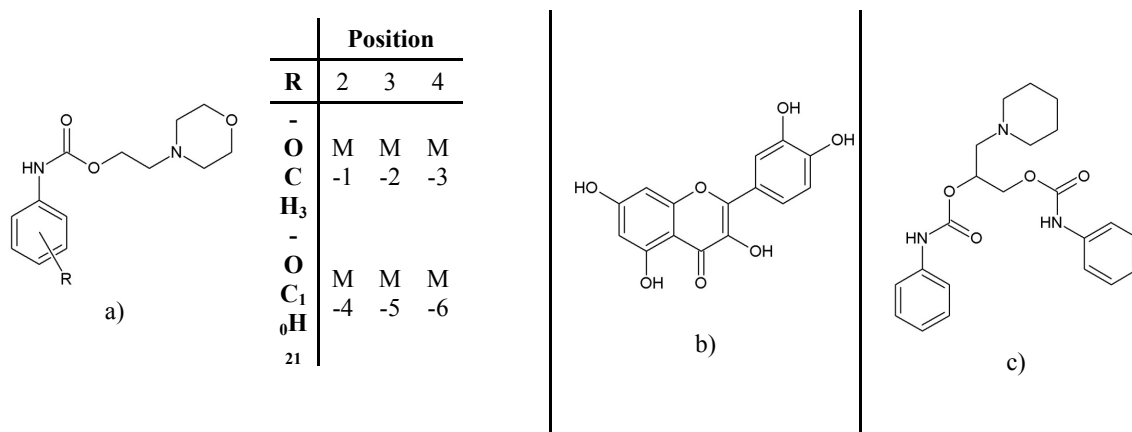


Fig. 1. Structures of analytes used in the study a) morpholinoethyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acid, b) quercetin, c) dipiperodon

Chromatographic experiments

Solutions of MEP, quercetin and dipiperodon in methanol, M-1, M-2, M-3, quercetin and dipiperodon in acetonitrile (M-4, M-5 and M-6 were not soluble in acetonitrile) and MEP in toluene (quercetin and dipiperodon were not soluble) were prepared. Analytes in methanol and acetonitrile were directly detected by DAD. If toluene was used as a mobile phase, the fractions from the piston columns were collected, evaporated to dryness, dissolved in methanol and analyzed using C18 column. The concentration of all solutions was 5 µg/mL. Prior to the each analysis, the piston columns were conditioned with solution of methanol with addition of HAc (9:1) (v/v) (6 mL), methanol (6 mL) and then the mobile phase (6 mL). The same procedure was used for the NIP.

Results and discussion

The thermodynamic study, used in this work, was done in order to explore the retention of analytes tested on the molecularly imprinted polymer. Retention thermodynamics were assessed for eight solutes: M-1 to M-6 analytes, quercetin and dipiperodon, in three mobile phases: toluene (porogen), acetonitrile and methanol and with each of the two stationary phases – MIP and NIP. Since a linear relationship $\ln k_i = f(1/T)$ was observed for all studied compounds (measured at temperatures range 20 to 60 °C), the van't Hoff equation could be used to determine corresponding thermodynamic terms calculated at 293 K, listed in Table I.

In order to calculate thermodynamic quantities and to understand the specific sorption on the MIP, the van't Hoff plots were constructed. Calculated data show that the

Table I

The values of thermodynamic terms of linear regression ($\ln k_i = f(1/T)$), the values of thermodynamic terms in % and correlation coefficients (*r*)

Analyte	MIP					NIP				
	$-\Delta H_i/RT$ *	$-\Delta H_i/RT$ %	$\Delta S_i/R + \ln \phi$	$\Delta S_i/R + \ln \phi$ %	<i>r</i>	$-\Delta H_i/RT$ *	$-\Delta H_i/RT$ %	$\Delta S_i/R + \ln \phi$	$\Delta S_i/R + \ln \phi$ %	<i>r</i>
Solvent	MeOH									
M-1	10.99 ± 0.19	55.68	-8.73 ± 0.14	44.32	0.990	7.45 ± 0.11	52.72	-6.66 ± 0.13	47.28	0.991
M-2	7.66 ± 1.42	54.42	-6.04 ± 1.11	45.58	0.937	6.97 ± 0.87	51.91	-6.26 ± 0.69	48.09	0.996
M-3	12.15 ± 2.34	52.81	-10.06 ± 0.98	47.19	0.989	8.20 ± 0.25	52.56	-7.35 ± 0.24	47.44	0.993
M-4	11.38 ± 1.09	54.92	-9.63 ± 1.46	45.08	0.988	9.49 ± 0.19	52.55	-8.62 ± 0.16	47.45	0.998
M-5	10.36 ± 1.07	54.23	-8.50 ± 0.98	45.77	0.968	8.28 ± 0.17	52.94	-7.39 ± 0.17	47.06	0.998
M-6	13.58 ± 1.63	53.43	-11.46 ± 1.28	46.57	0.981	7.61 ± 0.62	52.78	-6.75 ± 0.58	47.22	0.996
Dipiperodon	13.79 ± 0.17	55.18	-11.22 ± 0.17	44.82	0.993	10.34 ± 0.61	54.90	-8.36 ± 0.65	45.10	0.995
Quercetin	7.86 ± 0.38	51.18	-7.49 ± 0.33	48.82	0.914	8.86 ± 0.39	52.90	-7.96 ± 0.36	47.10	0.995
	ACN									
M-1	3.75 ± 0.05	94.54	-0.22 ± 0.04	5.46	0.998	11.68 ± 0.40	57.70	-8.56 ± 0.38	42.30	0.999
M-2	4.06 ± 0.25	87.96	-0.56 ± 0.23	12.04	0.998	9.40 ± 0.08	59.77	-6.34 ± 0.07	40.23	0.991
M-3	4.01 ± 0.13	88.81	-0.50 ± 0.10	11.19	0.998	10.27 ± 1.00	58.80	-7.25 ± 1.23	41.20	0.990
Dipiperodon	4.36 ± 0.14	83.47	-0.87 ± 0.11	16.53	0.999	9.27 ± 0.65	52.92	-6.16 ± 0.60	40.08	0.992
Quercetin	14.88 ± 0.31	55.86	-11.70 ± 0.30	44.14	0.989	14.16 ± 0.87	55.23	-11.64 ± 0.84	44.77	0.996
	Toluene									
M-1	5.60 ± 0.38	84.85	-0.99 ± 0.18	15.15	0.994	11.37 ± 1.58	63.04	-7.11 ± 0.15	36.96	0.985
M-2	5.85 ± 0.38	82.19	-1.25 ± 0.15	17.81	0.992	11.92 ± 2.08	61.27	-7.66 ± 1.38	38.73	0.988
M-3	5.64 ± 0.79	83.71	-1.05 ± 0.09	16.29	0.990	11.88 ± 2.32	61.41	-7.62 ± 1.53	38.59	0.983
M-4	5.57 ± 0.70	85.84	-0.95 ± 0.12	14.16	0.991	10.47 ± 2.01	64.70	-6.18 ± 1.16	35.30	0.985
M-5	5.85 ± 0.90	85.91	-0.95 ± 0.15	14.09	0.993	11.92 ± 2.46	66.86	-6.01 ± 0.68	33.14	0.991
M-6	5.64 ± 0.89	83.84	-1.04 ± 0.20	16.16	0.991	11.88 ± 2.22	71.78	-4.77 ± 0.98	28.22	0.989

*Calculate at T = 293 K

transfer of the analytes from the mobile phase to the surface of the MIP and the NIP is enthalpically favoured. The predominance of the contribution (in %, Table I) of the energy term was greater in toluene and acetonitrile on the MIP. The smaller contribution of enthalpic term in methanol was compensated by the higher contribution of the entropic term. However, in all cases the entropic term was less favourable. In the case of the NIP, the values of both terms were similar in acetonitrile and methanol mobile phases.

The dominance of enthalpic term implies more significant energetic interactions between the target molecules and the surface of the MIP and the NIP than steric interactions based on the designed cavities (entropic term). Our results on the temperature dependence of the retention of studied compounds and predominance of the energy driven distribution do not support the MIP-theory.

Conclusions

This article presents a work aiming at thermodynamically interpreting the specific sorption and molecular recognition by the MIP and the NIP. Investigated polymers based on methacrylic acid were synthesized by a bulk polymerization. The effect of temperature on the thermodynamic distribution of solute molecules for a series of structurally related and not-related compounds were interpreted using van't Hoff plots generated from the chromatographic data. MEP, quercetin and dipiperodon were used to calculate the enthalpic and the entropic terms. Contrary to expectations, the entropic term was not a driving force for the sorption of the investigated analytes on the MIP. If methanol was used as a mobile phase the entropic term was more important than in toluene and ACN mobile phases, reaching 46 % and 47 % contribution for the MIP and the NIP, respectively.

Our study may provide useful information to the knowledge of the mechanisms of the sorption processes on the MIP and the NIP. Thanks to thermodynamic studies, we were able to specify which term of the van't Hoff equation was responsible for the processes occurring on their surface. The study of the temperature effect helps to estimate the interaction behaviour on the MIP and the NIP, and is the key to understanding the mechanism governing the chromatographic processes.

This work was supported by the VEGA grant No. 1/0164/11.

REFERENCES

1. Quaglia M., Lorenzi E. De, Sulitzky C., Caccialanza G., Sellergren B.: *Electrophoresis* 24, 952 (2003).
2. Bui B.T.S., Haupt K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2481 (2010).
3. Djozan D., Ebrahimi B., Mahkam M., Farajzadeh M.A.: *Anal. Chim. Acta* 674, 40 (2010).
4. Izenberg N.R., Murray G M., Pilato R.S., Baird L.M., Levin S.M., Van Houten K.A.: *Planet. Space Sci.* 57, 846 (2009).
5. Pakade V., Lindahl S., Chimuka L., Turner C.: *J. Chromatogr., A*, In Press, 10.1016/j.chroma.2012.01.051 (2012).
6. Hall A., Lanza-Sellergren F., Manesiotis P., Sellergren B.: *Anal. Chim. Acta* 538, 9 (2005).
7. Gholivand M.B., Karimian N., Malekzadeh G.: *Talanta* 89, 513 (2012).
8. Xu Z.X., Gao H.J., Zhang L.M., Chen X.Q., Qiao X.G.: *J. Food Sci.* 76, R69 (2011).
9. Turiel E., Martin-Esteban A.: *Anal. Chim. Acta* 668, 87 (2010).
10. Turiel E., Martin-Esteban A.: *J. Sep. Sci.* 32, 3278 (2009).
11. Sellergren B.: *Nat. Chem.* 2, 7 (2010).
12. Kirsch N., Hedin-Dahlström J., Henschel H., Whitcombe M.J., Wikman S., Nicholls I.A.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58, 110 (2009).
13. Urraca J.L., Aureliano C.S.A., Schillinger E., Esselmann H., Wiltfang J., Sellergren B.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 9220 (2011).
14. Haidacher D., Vailaya A., Horváth C.: *PNAS* 93, 2290 (1996).
15. Coym J.W.: *J. Sep. Sci.* 31, 1712 (2008).
16. Chester T.L., Coym J.W.: *J. Chromatogr., A* 1003, 101 (2003).

JEDNODUCHÁ ŘEŠENÍ PRO OBTÍŽNÉ HPLC SEPARACE

JINDŘIŠKA DOLINOVÁ

LABICOM, s.r.o., Rokycanova 18, 779 00 Olomouc, Česká republika
jindriska.dolinova@labicom.cz

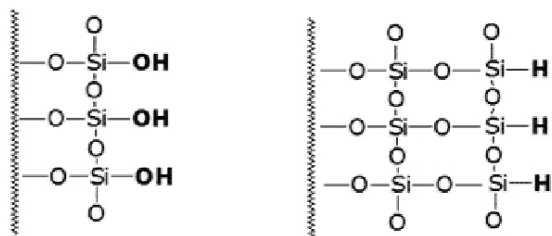
Separace v kapalinové chromatografii je výsledkem mnoha typů interakcí analytů se stacionární fází příp. složkami mobilní fáze. Výběr vhodné stacionární fáze významně ovlivní jak možnosti separace analytů, tak tvar a symetrii získaných chromatografických píků, ale i detekční limity analytů. Výběr vhodné stacionární fáze má přímý dopad na časovou i ekonomickou náročnost analýz.

Cílem příspěvku je seznámení s neobvyklými typy stacionárních fází v kapalinové chromatografii a s praktickými ukázkami aplikační podpory. Bude zaměřen na kolony jejichž stacionární fáze je tvořena:

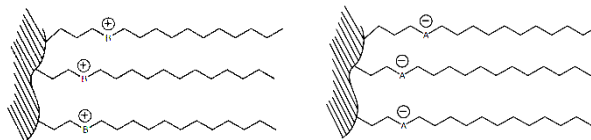
- silikagelem typu C,
- silikagelem typu B s modifikací alkylovým řetězcem s iontovou skupinou,
- neobvyklou modifikací silikagelu typu B odtadecylovými a propylfenylovými řetězci.

Běžně používaný silikagel typu B je zakončený hydroxylovými skupinami. Aktivita těchto skupin je při separacích v reverzním uspořádání cíleně potlačována pomocí tzv. endcappingu, který může být realizován různými způsoby. Přesto na povrchu upraveného silikagelu mohou zůstat zbytkové silanolové skupiny, které na sebe mohou vázat molekuly vody, což pak ovlivňuje separační účinnost stacionární fáze. Naproti tomu, silikagel typu C, jehož struktura je zakončena vodíkovými atomy, zcela eliminuje tyto nedostatky¹.

Silikagel typu C je díky pevné vazbě mezi uhlíkem a vodíkem stabilní i při nízkých hodnotách pH a je teplotně odolný. Na kolonách s tímto typem sorbentu probíhá ustalování rovnováhy velmi rychle. Separace lze provádět ve všech typech módů – v reverzním, normálním i při 100% vodné mobilní fázi, přičemž změna typu módu na koloně nemá vliv na její životnost. Silikagel typu C se



Obr. 1. Struktura silikagelu typu B a silikagelu typu C



Obr. 2. Silikagel typu B s modifikací alkylovým řetězcem a iontovou skupinou (stacionární fáze Primesep)

vyrábí v několika modifikacích (C18, C8, cholesterol, fenyl). Zvláštním případem z této řady sorbentů je patentovaná stacionární fáze Diamond Hydride, určená pro separace velmi polárních látek. Vysoká symetrie chromatografických píků získaných při separacích na této koloně je výstižně demonstrována při analýzách polárních metabolitů, aminokyselin, organických kyselin, nukleotidových bazí nebo polárních léčiv.

Silikagel modifikovaný alkylovým řetězcem, který obsahuje ionizovatelnou funkční skupinu, je dalším typem sorbentu rozšiřujícím možnosti separací směsí nepolárních a polárních analytů – zejména polárních analytů s ionizovatelnou funkční skupinou². Při separaci analytů na těchto typech stacionárních fází lze využít jak hydrofóbních vlastností struktury analytu, tak iontově-výměnných interakcí mezi ionizovatelnou skupinou analytu a stacionární fází. Možnosti separací na těchto kolonách jsou názorně demonstrovány v mnoha aplikacích jako jsou např. separace organických kyselin, aminokyselin, polárních léčiv nebo anorganických iontů atd.

Jedinečnou stacionární fází je silikagel modifikovaný oktadecylovými a propylfenylovými řetězci, kde probíhá separace na základě hydrofóbních a π - π interakcí³. Kombinace uvedených interakcí umožňuje separaci flavonoidů, různě substituovaných aromatických sloučenin, perfluorovaných surfaktantů či různých typů léčiv.

LITERATURA

1. MicroSolv Technology Corporation: Why You Should Learn About Type-C™ Columns (USA).
2. SIELC Technologies: Primesep – Columns, Methods, Applications 2001–2004 (USA).
3. MACHEREY-NAGEL: Chromatography Columns & Supplies Catalogue 2011 (Německo), str. 116–117.

MONITORING REZIDUÍ PESTICÍDOV V POTRAVINÁCH NA SLOVENSKU

JARMILA ĎURČANSKÁ

Štátny veterinárny a potravinový ústav Bratislava, Botanická 15, 842 52 Bratislava, Slovensko
durcanska@svuba.sk

Reziduá prípravkov na ochranu rastlín sú zo strany verejnosti citlivou a podrobne sledovanou témou. Z prieskumu, ktorý vykonával Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) v rámci Európskej únie v roku 2010 vyplynulo, že reziduá pesticídov a iné chemické kontaminanty sú z pohľadu konzumenta „najobávanejšou“ hrozbou poškodenia zdravia, ktoré vyplýva z konzumácie potraviny (EFSA¹). Kontrolu potravín rastlinného aj živočíšneho pôvodu vykonávajú na Slovensku inšpektori Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR (ŠVPS SR) a analýzy sa vykonávajú na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Bratislave (ŠVPÚ).

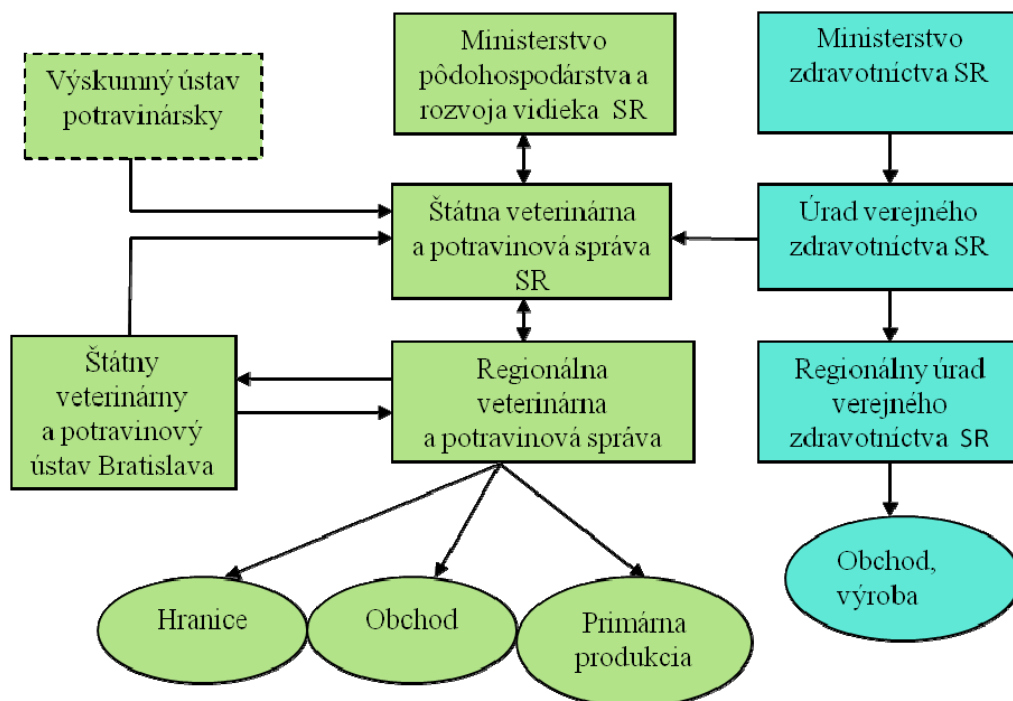
Kontrola, limity a výkon skúšok podliehajú rôznym európskym smerniciam a nariadeniam, z ktorých najdôležitejšie a najrozsiahlšie je Nariadenie EPar č. 396/2005 o maximálnych hladinách reziduí pesticídov v/na potravinách alebo krmivách rastlinného alebo živočíšneho pôvodu a o zmene a doplnení smernice Rady 91/414/EHS².

Toto nariadenie, ktoré definuje predmetné komodity, maximálne reziduálne limity a spôsob posudzovania nálezov, zjednotilo mnoho predchádzajúcich smerníc, ktoré vždy museli byť zapracované do národnej legislatívy a tým sa predlžovalo obdobie, kedy mohli vstúpiť do platnosti. Zjednotilo aj dovtedajšie tzv. „národné“ limity, čím bol postavený jednotný prístup k výsledkom v rámci celej EU.

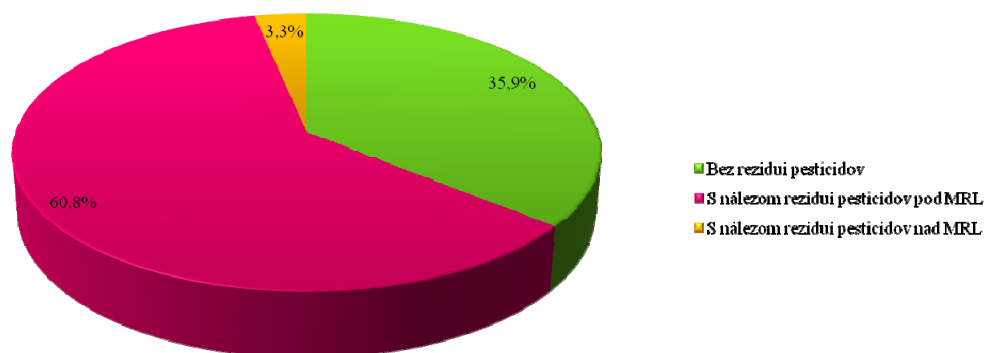
Kontrolu reziduí pesticídov zastrešuje ŠVPS SR, ale podieľa sa na nej viacero inštitúcií, ako vidno na obr. 1.

ŠVPÚ Bratislava je v rámci Slovenska poverené vykonávaním analýz reziduí pesticídov rastlinného a čiastočne živočíšneho pôvodu a na túto činnosť má všetky 4 národné referenčné laboratória, ktoré sa týkajú oblasti reziduí pesticídov. Na vyšetrenia sa používa technika plynovej a kvapalinovej chromatografie v spojení s konvenčnými i hmotnostnými detektormi. V rámci viacerých multireziduálnych aj single reziduálnych metód sa na našom ústave aktuálne sleduje okolo 300 reziduí prípravkov na ochranu rastlín a ich metabolitov.

Vzorky na vyšetrenie sa odoberajú na základe vypracovaného viacročného kontrolného programu Slovenskej republiky, ktorý zahŕňa niekoľko podoblastí – národný program, európsky program, kontrolu importu z tretích krajín a riešenie sťažností spotrebiteľov. Prehľad



Obr. 1. Schéma kontroly reziduí pesticídov v SR



Obr. 2. Percentuálne zastúpenie výsledkov vzoriek, vyšetrených v r. 2011

a percentuálne zastúpenie vzoriek vyšetrených v roku 2011 sú znázornené na obr. 2.

Pokiaľ namerané hodnoty prekročia legislatívny limit, nálezy sa zasielajú na posúdenie rizika na Výskumný ústav potravinársky. Samozrejme, že takéto vzorky sú stiahnuté z trhu.

Výsledky každoročného merania sú zhrnuté v Národnej správe o vyšetrovaní rezíduí pesticídov, ktorá je uverejnená na web stránke ŠVPS SR a súčasne sú zasielané do EFSA, ktorá je poverená vypracovaním celoeurópskej správy. Všetky merania členských štátov súčasne slúžia ako podklady na ďalšie prehodnocovanie rizika a prípadné úpravy maximálnych reziduálnych limitov a umožňujú odhadnúť zaťaženie obyvateľstva Európy rezíduami pesticídov.

LITERATÚRA

1. 2010 Eurobarometer survey report on risk perception in the EU. <http://www.efsa.europa.eu/en/riskcommunication/riskperception.htm>.
2. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 z 23. februára 2005 o maximálnych hladinách rezíduí pesticídov v alebo na potravinách a krmivách rastlinného a živočíšneho pôvodu a o zmene a doplnení smernice Rady 91/414/EHS, Úradný vestník EÚ, L 70 (2005).

PREZENTÁCIA VÝSLEDKOV MONITORINGU REZIDUÍ PESTICÍDOV V DETSKEJ A DOJČENSKEJ VÝŽIVE METÓDOU LC/MS/MS V ROKU 2011

ZUZANA FÁBEROVÁ* a EMÍLIA SEVČÍKOVÁ

Úrad verejného zdravotníctva SR, Trnavská cesta 52,
845 05 Bratislava, Slovensko
zuzana.faberova@uvzs.sr.sk

Národné referenčné centrum (NRC) pre reziduá pesticídov Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky vyvíja a zavádza nové analytické metódy pre stanovenie pesticídov s hlavným zreteľom na dojčenskú výživu. NRC kontroluje pesticídy v detskej a dojčenskej výžive podľa viacročného plánu úradnej kontroly potravín a požiadaviek smerníc 2006/125/EC a 2006/141/EC a monitoruje pesticídy v detskej a dojčenskej výžive podľa nariadenia komisie (ES) č. 1274/2011 týkajúceho sa koordinovaného viacročného kontrolného programu spoločenstva na roky 2011, 2012, 2013.

Analýzy sa vykonávajú vo všetkých druhoch vzoriek dojčenskej výživy na báze mlieka, ovocia, zeleniny a cereálií odoberaných z distribučnej siete alebo lekárni

v rámci SR. Pri stanovení pesticídov v dojčenskej výžive je dôležité poznať ich chemické a fyzikálne vlastnosti, ako je napríklad rozpustnosť, polarita a prchavosť. Veľký vplyv na analýzu pesticídov má aj zloženie matrice, hlavne obsah vody, tuku, farbív a karotenoidov vo vzorke, ktorá môže rušiť stanovenie jednotlivých pesticídov.

Analytické techniky na stanovenie pesticídov závisia od druhu pesticídu. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostno-spektrometrickou detekciou je jednou z často používaných metód, ktorá sa využíva na stanovenie pesticídov. V roku 2011 bolo touto technikou zavedených a zvalidovaných 88 pesticídov vrátane ich degradačných produktov. 81 pesticídov bolo stanovených multi-reziduálnou metódou QUENCHERS. Pesticídy, ktoré sa nedali stanoviť touto metódou, boli stanovené „single“ reziduálnymi metódami (SRM). K takýmto pesticídom patrí fentín, haloxyfop, PTU, mepikvát, chlormekvát a glyfosát. V roku 2011 bolo analyzovaných 40 vzoriek na obsah rôznych druhov pesticídov, z čoho bolo 22 vzoriek sušených, 15 ovocných a 3 mliečne. Ani jedna z nameraných hodnôt neprekročila hodnotu MRL.

DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS BY LC-MS (IT)

MIROSLAV FIŠERA* and PAVEL VALÁŠEK

*Tomas Bata Univerzity in Zlín, Faculty of Technology,
T. G. Maryk sq. 272, 76272 Zlín, Czech Republic
fiseram@ft.utb.cz*

Introduction

In recent years, many papers have paid attention to the bioactive compounds, particularly to the antioxidant activity of polyphenolic compounds in food and beverages, due to their positive effect on human body. As consumers have become more conscious of the health benefits of phenolic compounds and their antioxidant activities via the conventional media, the beverage industries have recognized new marketing opportunities for their products. Therefore, the phenolic compounds and their antioxidant capacity in foods and beverages become an important quality parameter, especially in niche markets concerned with health benefits. Wine is a widely consumed beverage in the world, with thousands of years of tradition. It is an excellent source of various classes of polyphenols. The phenolic compounds are responsible for the sensory characteristics, particularly color, astringency, bitterness and aroma^{1,2}.

Similarly beer is a complex low-alcoholic beverage with refreshing frothy taste. It has been a popular beverage for thousands of years. Brewers often declare brewing as the oldest biotechnological process (from world's first civilization, Sumerians, in Mesopotamia – 4000 BC). Beer was not bitter and was rather flat in ancient times since hop was not used in beer production until around the eighth century³. Phenolic compounds in red wine exhibit a broad spectrum of beneficial pharmacological properties, believed to be related to their antioxidative properties. Anti-atherogenic, anti-tumour, anti-ulcer, and anti-inflammatory activities have all been demonstrated by the consumption of red wine and red wine phenolic compounds⁴⁻⁹. As a material for winemaking, the phenolic compounds of wine grape are one of the most important aspects determining wine quality. A large number of published papers have focused on the essential contributions of phenolic compounds profiles to wine quality and sensory properties^{1,2}.

The phenolic profiles in wine depend on the phenolic compounds present in the grapes, the extraction parameters, winemaking technologies as well as fermentation temperature, yeast strain, processing enzymes, cap management, and alcohol concentration¹⁰⁻¹². On the other hand, phenolic compounds of grapes are affected by many factors such as agrotechnical processes, genetic variation,

and maturity, climatic and geographical conditions¹³⁻¹⁵. Other factors that influence the extent of phenolic extraction are the molecular weight, size and type of phenolic molecules, the surface area, the concentration gradient, other temperature treatments including grape and must freezing and thermo-vinification, and factors that affect cell permeability, such as pectolytic enzyme selection¹⁶. Also, the environmental condition (temperature, annual precipitation levels, altitude and geochemical characteristics) can affect the vine grapes maturation and consequently the concentration of their phenolic compounds.

Nowadays beer is made from barley (malt), hops, water and yeast thus it is rich in nutrients (including carbohydrates, amino acids, minerals, and vitamins), but also provides a variety of non-nutrient components including polyphenols. Hops are added as a flavoring ingredient and stabilizer, and give beer its unique aroma and refreshing bitterness.

Beer has been an important food item in the daily diet, and people attributed therapeutic effects to beer. Recently, a renewal interest has been focused on beer, a common beverage rich in polyphenols with a moderate antioxidant activity. Beer polyphenols have been mostly investigated in the light of their potential antioxidant activity claimed to enhance beer flavor and stability or even human health¹⁷.

Flavor stability, one of the important characteristics in beer, is challenging brewers, and is one of the most important factors in determining the shelf-life of packaged beer. The flavor stability of beer primarily depends on the oxygen content in the packaged beer. However, the individual stages of beer production such as malting, mashing, brewing and packaging can influence the flavor stability. Prolonging shelf-life by delaying flavor staling is one of the greatest challenges facing the brewer today. In recent years, significant efforts have been made to avoid the oxygen pick-up during brewing process, the level of total packaged oxygen might be as low as 0.1 mg L⁻¹, but oxidative staling of beer is still noticeable. Minimizing the formation and activity of reactive oxygen species (O₂, HOO•, H₂O₂ and HO•) in beer and wort, must be the first step for improving beer flavor stability. Antioxidants reduce the rate of oxidation reactions. Therefore, attention is now increasingly shifting towards increasing the antioxidant activity of beer itself¹⁸.

There are many endogenous antioxidants such as polyphenols, Maillard reaction products, and sulphite present in beer. Among these antioxidants, polyphenols are of particular interest to brewers because they play a key role in the brewing process by delaying, retarding, or preventing oxidation processes. The majority of polyphenols of beer are derived from malt (70–80 %), whereas about 20–30 % is derived from hops¹⁹. Further, polymerization

of phenolics and formation of polyphenols, and their chemical changes can occur during wort boiling and possibly during fermentation and storage of beer. Polyphenolic constituents of beer represent a large structural variety and belong to the classes of simple phenols, benzoic and cinnamic acid derivatives, coumarins, catechins, di-, tri- and oligomeric proanthocyanidins, (prenylated) chalcones and flavonoids, all of which have been reported to possess antioxidant and antiradical properties as well as other biological effects. Several studies have demonstrated the high *in vitro* total antioxidant capacity of beers²⁰, and subsequent investigation has shown that these antioxidant components are indeed bioavailable.

Many papers dealing with phenolic compounds of wine and grapes and their total antioxidant capacity have been published. However, little attention has been paid to comparison on phenolic compounds of wine grapes from different origin in Moravian wine, as well as on comparison of phenolic contents and antioxidant activities of phenolic compounds. Flavonoids, phenolic acids, flavonols and resveratrol and other groups of compounds could be key agents of the antioxidant action on the human metabolism pathway, the reason why we wanted to qualify the wines from a nutritional point of view.

There have been several studies on the antioxidant activity and polyphenols content in beer²¹. However, these studies focused on the relationship between antioxidant activity and total polyphenols content, limited data are available on phenolics profiles (total and individual polyphenols contents) and their contribution to antioxidant activity for beers. Moreover, it is difficult to compare data within the literature due to the lack of agreement on the appropriate method for analyzing polyphenols and antioxidant activity evaluation. As a consequence, information in the literature on the levels and species of polyphenols is not enough and also contradictory. Beer is a complex mixture of natural compounds, activities and mechanisms of antioxidants present in beer would largely depend on the composition and conditions of the test system. Different antioxidant activity evaluation methods based on different reaction mechanisms might give various evaluation results²². In addition the inhibitory and/or synergetic effects can influence the total antioxidant activity of such complicated mixtures of polyphenolic compounds.

Aims of this study were to determine the total content of phenolics, to identify and quantify individual phenolic compounds and to determine the total antioxidant activity in wine samples collected from four different geographical regions of Austria and Czech Republic. Next aim of this study was to detect, in a full scale industrial process, the polyphenols in all worts and beers, their fate during the main brewing procedures and to compare the six kinds of “Czech brews” and their corresponding 28 worts and 17 beers from famous brewery of South Moravia in Czech Republic from the point of view determination of total polyphenols content, evaluation and comparison of the different kinds of “Czech brews” and their corresponding intermediates of brewing technology for their DPPH• radi-

cal scavenging activity and FRAP reducing power.

Materials and methods

Instrumentation

For measurement of antioxidant activity was used diode array spectrometer Biochrom Libra S6 (Biochrom Ltd, Cambridge, UK). For HPLC analysis was used UltiMate® 3000 HPLC system consisted of UltiMate 3000 RS pump, UltiMate 3000 RS autosampler, UltiMate 3000 RS column compartment and UltiMate 3000 RS diode array detector (Varian Inc., Santa Clara, CA, USA). Chromatographic separation was carried out on Supelcosil LC-18-DB column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Supelco, USA) at 30 °C by gradient elution with a mobile phase containing solvent A (5% v/v aqueous acetonitrile acidified with 0.35 mL trifluoroacetic acid (TFAA) and solvent B (50% v/v aqueous acetonitrile acidified with 0.25 mL TFAA). Run time was 30 min and the flow rate was 0.5 mL min⁻¹. For HPLC-MS analysis was used combination of HPLC system described above with Bruker Daltonics AmaZon X HCT (High Capacity Trap) MS system with 3D ion trap technology.

Chemicals

Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, 2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). A standard solution of DPPH $c = 0.20 \text{ mol L}^{-1}$ was prepared in methanol. Working DPPH solution was prepared at $c = 100 \text{ μmol L}^{-1}$ containing acetate buffer of pH 4.3 in the ratio 1:2 (DPPH:buffer). Tannin was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Phenolic reference standards including gallic acid, catechin, vanillic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, rutin, cinnamic acid, quercetin and resveratrol were purchased from Aldrich (Zwijndrecht, Belgium). Lab-Scan acetonitrile (ACN) was obtained from POCH A.S. (Gliwice, Poland). Other chemicals and reagents were purchased from Penta, Chrudim and/or Lachema, Brno, (both Czech Republic). All solutions were prepared with deionised (DI) water (Aquaosmotic, Tišnov, Czech Republic).

Methods

Folin-Ciocalteu method

The TPC was determined according to the Folin-Ciocalteu method²³. Briefly, 0.025 mL of sample was mixed with 1 mL of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu reagent and allowed to stand for 3 min. Then 5 mL of 200 g L⁻¹ sodium carbonate (Na₂CO₃) was added and final volume was made up to 50 mL with DI water. Each sample was measured spectrophotometrically at 765 nm after 30 min of standing against blank. Five-point calibration was strict-

ly linear ($R_2 > 0.9999$) in the concentration range 0–250 mg L^{-1} tannin as the standard. The determined values were expressed as tannin equivalents (TE, mg L^{-1}). All samples were analyzed as triplicates. Highly repeatable results for standards and samples were obtained.

DPPH radical scavenging activity^{24, 25}

A mixture of undiluted sample (0.1 mL) with 10 mL working DPPH solution was measured immediately at 515 nm against a methanol blank (AC(0)). The mixture was then incubated at room temperature and dark for 30 minutes and it has been again measured spectrophotometrically at 515 nm (AA(t)). The gallic acid (GA) calibration curve was plotted as a function of the percentage of DPPH radical scavenging activity. The measurement was compared to the standard calibration curve, and the free radical scavenging activities were expressed as millimoles of gallic acid equivalents (GAE) per millilitre of sample ($\mu\text{mol/ml}$). The calibration curve was strictly linear ($A = 855.59 c - 16.015$, $R_2 = 0.9980$, where A is absorbance value, c is concentration of gallic acid in standard solutions) in the concentration interval 0.02–0.08 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ gallic acid. The $\mu\text{mol mL}^{-1}$ inhibition of DPPH radical caused by a wine samples were determined according to the following formula: $(AC(0) - AA(t))/AC(0) \times 100$, where AC(0) is the absorbance of the sample at $t = 0$ min and AA(t) is the absorbance of sample at $t = 30$ min). All samples were analyzed as triplicates.

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

The reducing activity of the samples was determined by FRAP method²⁶. A 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ standard solution of gallic acid (GA) was prepared in H_2O . The oxidant in the FRAP assay was prepared by mixing 5 mL of 10 mmol L^{-1} 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) in water, 50 mL of acetate buffer pH 3.6, and 5 mL of $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mmol L^{-1}). Sample (0.025 mL) was added to 4 mL reagent and absorbance was measured spectrophotometrically at 593 nm (A 0min). Then sample solution has been allowed to stand at room temperature and in dark for 10 min and measured again at 593 nm (A10 min). The difference of absorbances ($\Delta A = A 10 \text{ min} - A 0 \text{ min}$) of the reaction mixture was calculated and related to ΔA of a Fe(II) standard solution. The difference in absorbance ΔA was linearly proportional to the concentration of antioxidant and indicated increased reducing power. The measurement was compared to a calibration curve of prepared gallic acid solution, and then final results expressed as micromoles of gallic acid equivalents (GAE) per millilitre of the sample ($\mu\text{mol mL}^{-1}$). The calibration curve was strictly linear ($A = 1.0800 c + 0.0072$, $R_2 = 0.9999$, where A is absorbance value, c is concentration of gallic acid in standard solutions) in the concentration interval 0.02–0.1 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ gallic acid. All samples were analyzed as triplicates.

HPLC/MS analysis of phenolic composition

The individual phenolic compounds were quantified using a HPLC method using gradient elution with the mo-

bile phase containing solvent A (5% v/v aqueous ACN acidified with 0.35 mL trifluoroacetic acid (TFAA) and solvent B (50% v/v aqueous ACN acidified with 0.25 mL TFAA). The UV detector was set at 205, 210, 275 and 375 nm. Wine sample was filtered using 0.45 μm pore size Nylon membrane filter 13 mm (FFNN1345-100, Gronus, UK) using filter devices (Millipore, Bedford, MA, USA) before injecting. Injection volume was 20 μL . Individual phenolic compounds were identified by comparing retention times and UV-VIS spectra of the corresponding standard compounds and data were quantified using the corresponding calibration curves of the individual standard compound.

For identification and final confirmation of some compounds was used MS system amazon X, which representing one from the latest developments in ion trap technology. With greatly enhanced sensitivity, MS/MS speed and „Zero-Delay Alternating“ polarity switching, the amazon X is very suitable for the analysis of complex samples when more in depth and detailed analysis of molecular structure is needed. This instrument supported by spectral MSⁿ libraries is very effective mass spectrometer for MS/MS based multi-compound screening.

Discussion

In this study, total 32 wine samples including 16 white and 16 red wines, which were made from grapes of Grüner Veltliner and Zweigelt varieties, were selected for determination of total phenolics contents (TPC) and total antioxidant activity (TAA). Grüner Veltliner is a variety of white wine grape grown primarily in Austria and in Czech Republic. Zweigelt is a red wine grape variety that is the most widely-grown in Austria nowadays.

Polyphenols play critical roles both in flavor stability and colloidal stability of beer too. They are also generally considered as one of very important sources of antioxidants in beer, brewing materials and brewing intermediates, such as malts, sweet wort, hop and hop products, hopped wort and young beer^{3,22,27}. “Czech brews” processed by different technology and their all worts and beers were studied by the Folin-Ciocalteu assay in order to evaluate the influence of different wort separation and brewing technology on the phenolics contents.

The total antioxidant activities were measured and compared with their reducing power (by FRAP method) and free radical scavenging activities (DPPH• method). The results indicate that differences in the total sum of FRAP between worts and beers are higher than in the total sum of DPPH• values. The results obtained by FRAP method had some discrepancies compared with those of the DPPH• method. In the present study, the different observations from two methods for evaluating antioxidant activity of beer might be due to different mechanisms of reaction. Moreover, antioxidant properties of single compounds within a group could vary remarkably, so that the same levels of antioxidants were not necessarily corresponding to the same antioxidant responses.

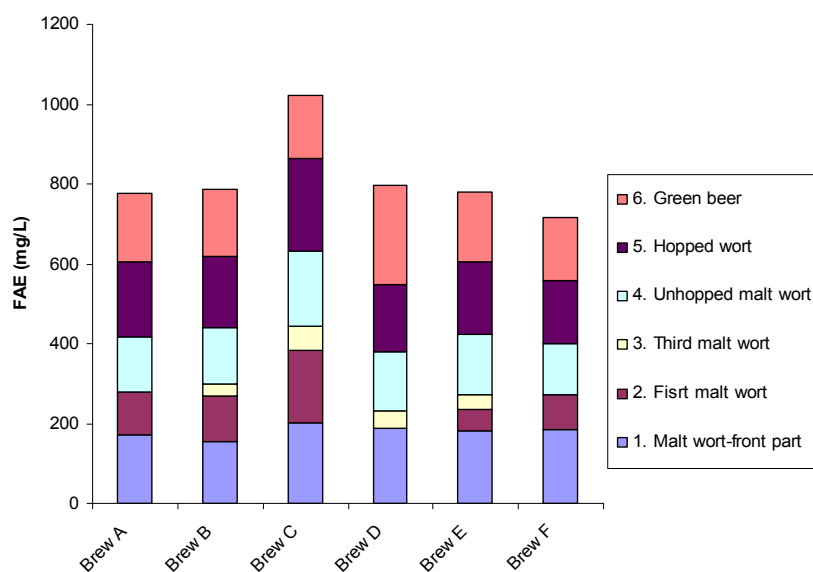


Fig. 1. Total phenolic content in all samples A-F from various stages during the brewing process (give the method used, experimental conditions etc.)

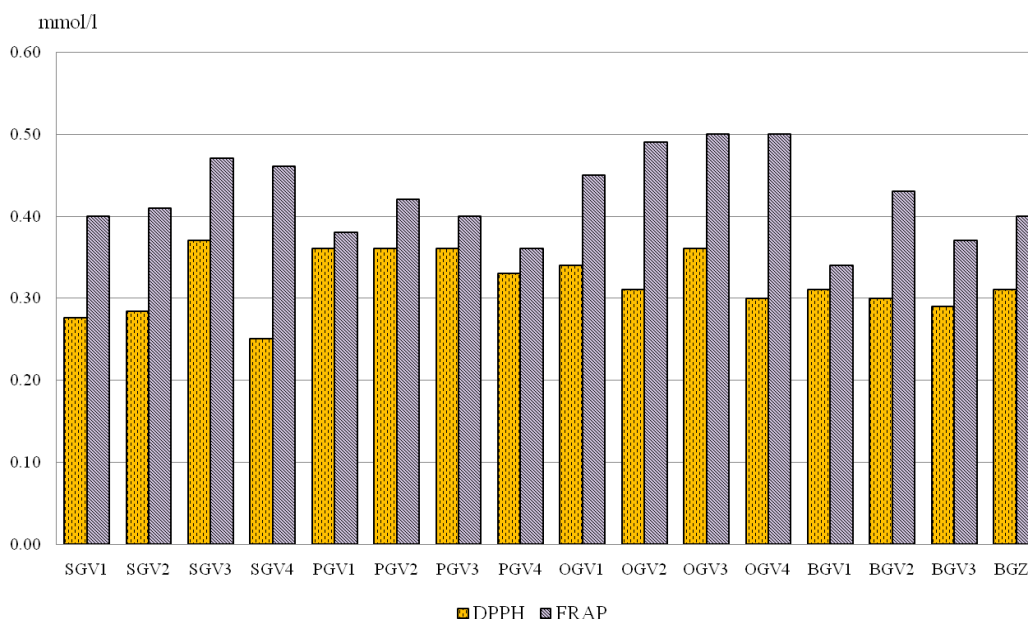


Fig. 2. Total antioxidant activities in white wine samples determined by the DPPH and FRAP methods (GAE mmol L⁻¹)

Total contents of phenolics

The different variations of red and white wine samples were tested for total content of phenolic compounds in four sets of analyses. The total phenolics contents varied from 218 to 328 mg L⁻¹, averaging 263 mg L⁻¹ for the four

white wine samples SGV and from 1182 to 1232 mg L⁻¹, averaging 1216 mg L⁻¹, for the four red wine samples SZW. The total phenolics contents ranged from 268 to 283 mg L⁻¹, averaging 274 mg L⁻¹ for PGV samples and from 564 to 729 mg L⁻¹, averaging 651 mg L⁻¹ for red wine samples PZW. Samples PGV-3 and PZW-3 have high content

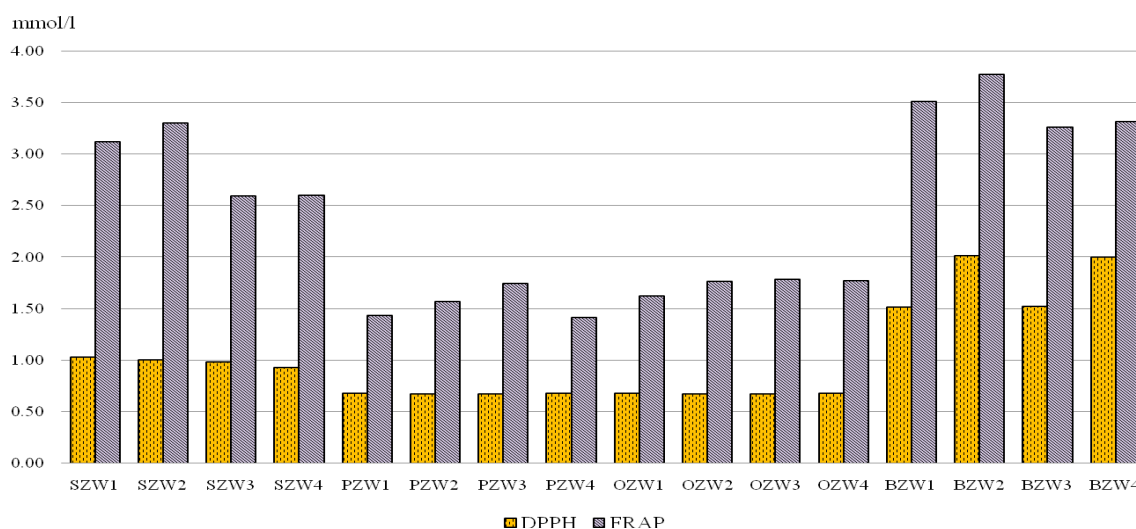


Fig. 3. Total antioxidant activities in red wine samples determined by the DPPH and FRAP methods (GAE mmol L⁻¹)

of total phenolics; the same as SGV-3 and SZW-3. Probably, the high content of phenolics content of grape samples depends on growing part of vineyard, shelter place from wind, intensity of sunlight radiation as well as shaded or non shaded clusters and other factors.

The summary of the total polyphenols content of worts and beers is presented in Fig. 1. Six kinds of “Czech brews” (labelled as A – F) and their corresponding 28 worts and 17 beers exhibited considerable differences in their total polyphenols content values, varying from 33 to 233 mg FAE/l for all worts and from 147 to 246 mg FAE/l for all beers studied. The highest TPC (246 mg L⁻¹) was determined in Comenius14° (Brew C), and the lowest TPC (147) was evaluated in Patriot 11° (Brew A), which are in agreement with regional mark “Czech beer” studied by other authors²⁸ (165–201 mg L⁻¹).

Conclusions

According to the results, following main practical significant summaries can be postulated i.) the geographical origin, average annual temperature, annual levels of precipitation and pedology influenced to total content of phenolics and total antioxidant activity/total antioxidant capacity and the concentration of phenolic compounds could be a marker for possible identification of wines geographical origin. In addition the total contents of phenolic compounds significantly correlated with antioxidant activity and contents of individual phenolic compounds and gallic acid was the most abundant compound; tannic acid, caffeic acid, quercetin and rutin activities were intermediate and ferulic acid and resveratrol showed the lowest influence to the free radical-scavenging activity.

This work provides also new knowledge on beer polyphenols which have both important technological and physiological properties. In conclusion, the present study determined phenolics profiles (both total and individual polyphenols contents) and antioxidant activities of six kinds of “Czech brews” and their corresponding 28 worts and 17 beers at various stages during the brewing process.

Further research could select critical points in a technological process in which the losses of polyphenolics are most critical and to explain influence of polyphenolics on the several stages of the brewing process and the overall beer stability e.g. formation of haze, colour, taste, filtration, foam maintenance, physico-chemical stability and shelf-life of beer. Further, this study will enhance the theoretical and practical knowledge in the field of beer producers and food chemistry.

On the results obtained from current study, further work on optimizing brewing processes will be the improvement of beer’s flavor stability through raising selectively certain polyphenols.

REFERENCES

1. Spranger M. I., Clímaco M. C., Sun B., Eiriz N., Fortunato C., Nunes A., Leandro M.C., Avelar M.L., Belchior A.P.: *Anal. Chim. Acta* 51, 151 (2004).
2. Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheyner, V., Waters, E.: *Anal. Chim. Acta* 51, 57 (2004).
3. Bamforth C.W.: in: *Beer. Tap into the Art and Science of Brewing*. 2nd Ed., Oxford University Press, New York 2003.
4. Kinsella J. E., Frankel E., German B., Kanner J.: *Food Technol.* 47, 85 (1993).

5. Stocker R., O'halloran R. A.: *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 123 (2004).
6. Clifford A. J., Ebeler S. E., Ebeler J. D., Bills N. D., Hinrichs S. H., Teissedre P. L., Waterhouse A. L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 748 (1996).
7. Saito M., Hosoyoma H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 1460 (1998).
8. Estruch R., Sacanella E., Badia E., Antúnez E., Nicolás J. M., Fernández-Solá J., Rotilio D., De Gaetano G., Rubin E., Urbano-Márquez A.: *Atherosclerosis* 175, 117 (2004).
9. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Tesler J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44 (2007).
10. Fang F., Li J.M., Zhan P., Tang K., Wang W., Pan Q.H., Huang W. D.: *Food Res. Int.* 41, 53 (2008).
11. Fang F., Li J.M., Pan, Q.H., Huang, W.D.: *Food Chem.* 101, 428 (2007).
12. García-Falcón M.S., Pérez-Lamela C., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J.: *Food Chem.* 105, 248 (2007).
13. Dopico-García, M.S., Figue, A., Guerra, L., Afonso, J.M., Pereira, O., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R.M.: *Talanta* 75, 1190 (2008).
14. Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L.: *Am. J. Enol. Viticult.* 53, 268 (2002).
15. Dokoozlian N.K., Kliewer W.M.: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121, 869 (1996).
16. Romero-Cascales I., Fernandez-Fernandez J. I., Lopez-Roca J. M., Gomez-Plaza E.: *Eur. Food Res. Technol.* 221, 163 (2005).
17. Kondo K.: *BioFactors* 22, 303 (2004).
18. Lu J., Zhao H., Chen J.: *J. Agricult. Food Chem.* 55, 1094 (2007).
19. Gerhauser C., Becker H., *Phenolic Compounds in Beer*. in: *Victor R. Preedy, Beer in Health and Disease Prevention*. p. 124, Elsevier, New York 2009.
20. Montanari L., Perretti G., Natella F.: *Lebensm.-Technol.* 32, 535 (1999).
21. Lugasi A., Hovari J.: *Nahrung.* 47, 79 (2003).
22. Zhao H., Chen W., Lu J., Zhao M.: *Food Chem.* 119, 1150 (2010).
23. Rastija V., Srečnik G., Šarić M. M.: *Food Chem.* 115, 54 (2009).
24. Rodríguez-Delgado M. A., Malovaná S., Pérez J. P., García Montelongo F. J.: *J. Chromatogr., A* 912, 249 (2001).
25. Price S. F., Breen P. J., Vallado M., Watson B. T.: *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 187 (1995).
26. Peng Z., Iland P. G., Oberholster A., Sefton M. A., Waters E. J.: *Aust. J. Grape Wine Res.* 8, 70 (2002).
27. Briggs D.E., Stevens R.: *Brewing: Science and Practice*. Wood Head, Cambridge 2004.
28. Obruča S., Márová I., Pařilová K.: *Czech J. Food Sci.* 27, 323 (2009).

VYUŽITÍ AMALGAMOVÝCH A OD NICH ODVOZENÝCH ELEKTROD V ANALÝZE LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ

JAN FISCHER* a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
jan.fischer@natur.cuni.cz

Úvod

Ve vyspělých zemích roste pozornost věnovaná kontrole léčiv či jejich metabolitů v přípravcích či v tělních tekutinách. Mezi metody použitelné k těmto účelům bezsporu patří i moderní voltametrické metody¹. Vývoj těchto metod pro stanovení submikromolárních a nanomolárních koncentrací různých typů biologicky aktivních organických sloučenin je realizován zejména prostřednictvím nových typů pracovních elektrod, které rozhodující měrou ovlivňují celkové parametry voltametrické metody.

V této souvislosti je věnována značná pozornost hledání nových typů elektrodových materiálů, které se vyznačují širším rozsahem dostupných potenciálů, nižším zbytkovým proudem a šumem, použitelností v širším spektru rozpouštědel a základních elektrolytů, větší odolností vůči pasivaci, vyšší rychlosti elektrodových reakcí a tudíž i vyšší reverzibilitou elektrodových dějů, větší mechanickou robustností, umožňující jejich kompatibilitu s průtokovými měřeními a případně i nižší toxicitou. Poslední požadavek do jisté míry souvisí s rostoucí merkurofobií v některých zemích, která komplikuje používání klasických rtuťových elektrod, a které i 85 let po jejich zavedení do analytické chemie patří stále k nejspolehlivějším a nejcitlivějším sensorům.

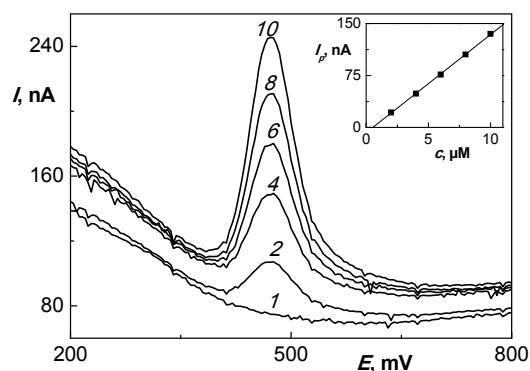
Aplikace amalgamových elektrod

Při stanovení elektrochemicky redukovatelných látek představují možnou alternativu ke rtuťovým elektrodám netoxické rtuťové amalgamové elektrody, jejichž hlavní výhodou je kromě snadné obnovitelnosti povrchu i široký potenciálový rozsah v katodické oblasti². Snadná příprava těchto elektrod spolu s jejich příznivými analytickými charakteristikami vytváří předpoklad pro jejich široké využití pro voltametrické stanovení různých typů polutantů. Tuhé stříbrné amalgamové elektrody lze připravovat ve třech variantách, buď jako leštěné, modifikované rtuťovým meniskem a nebo jako modifikované rtuťovým filmem. Pro rutinní analýzy se jeví jako nejvhodnější modifikace rtuťovým meniskem. Vedle tuhých amalgamových elektrod se jsou pro některé aplikace výhodné elektrody z pastových amalgámů³, které se svými vlastnostmi vyrovnají pevným amalgámům, ale umožňují snazší mechanickou obnovitelnost povrchu či přípravu jednorázových senzorů.

Jednou z elektrochemicky aktivních skupin léčiv jsou látky odvozené od *N*-nitrosomočoviny, které se využívají při léčbě mozkových a jiných nádorů. Elektroanalýza těchto látek je založena na elektrochemické redukci *N*-nitroso skupiny, jak bylo v minulosti prokázáno pro rtuťové elektrody⁴. V modelové studii byla ukázána možnost stanovení carmustinu (BCNU) a lomustinu (CCNU), které patří v klinické praxi mezi stále používané *N*-nitrosomočoviny. K voltametrickému stanovení látek byla použita metoda DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné amalgamové elektrode⁵. Jednostupňová redukce obou látek umožňuje stanovit oba analyty s mezi stanovitelnosti na úrovni v rozmezí 2–6 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Dále byla pro stanovení modelových analytů ověřena možnost použít indikační stříbrnou tuhovou amalgamovou elektrodu v ampérometrické detekční cele ve wall-jet uspořádání pro průtokovou injekční analýzu.

Modifikace uhlíkovým inkoustem

Tuhé amalgamové elektrody mohou být také snadno modifikovány uhlíkovými inkousty připravenými z uhlíkových prášků smíchaných s polystyrenem rozpustitelným v 1,2-dichlorethanu⁶. Takto připravená uhlíková filmová elektroda umožňuje měření až do anodické části potenciálového okna, kde je signál nemodifikované stříbrné amalgamové elektrody překryt rozpouštěním rtuti. Snadná odstranitelnost těchto filmů je výhodná pro jejich výměnu při pasivaci povrchu elektrody a umožňuje také snadný přechod zpět na nemodifikovanou tuhovou amalga-



Obr. 1. Stanovení paracetamolu (2–10 $\mu\text{mol l}^{-1}$) v modelovém vzorku moči pomocí uhlíkovým filmem modifikované tuhé stříbrné amalgamové elektrody v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru pH 4

movou elektrodou.

Typickým príkladom elektrochemicky aktívneho analgetika je paracetamol (*N*-acetyl-*p*-aminofenol alebo Acetaminophen), ktorý patrí k najbežnejším voľne prodejným liečivám (Paralen atd.). Díky modifikaci tuhé amalgamové elektrody uhlíkovým filmem lze sledovat elektrochemickou oxidaci hydroxyskupiny na aromatické jádro⁷. Tato reakce byla využita pro voltametrické stanovení paracetamolu jak v léčích tak v moči pacientů. Výše uvedená metoda je dostatečně selektivní k tomu, aby dokázala odlišit také paracetamol od 4-aminofenolu, který je primárním degradačním produktem Paracetamolu. Díky tomu lze sledovat kvalitu a stálost přípravků obsahující paracetamol.

Závěr

Stříbrná amalgamová elektroda je senzorem, který je vhodný pro stanovení elektrochemicky aktivních léčiv, může být v řadě případů použit jako plnohodnotná náhrada klasických rtuťových elektrod a jejich modifikace zejména uhlíkovými filmy umožňuje rozšířit jejich použití i nad rámec pracovního potenciálového okna rtuťových elektrod. Proto se jeví amalgamové elektrody jako vhodné pro použití v klinické analýze, kde mohou v mnoha případech úspěšně nahradit elektrody rtuťové.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 0021620857), Grantové agentury České republiky (projekty P206/12/G151 a P206/10/P087) a Univerzity Karlovy v Praze (projekt UNCE 2012/44).

LITERATURA

1. Wang J.: *Electroanalytical Chemistry*, 2. vyd. Wiley, New York 2000.
2. Novotný L., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* 94, 1118 (2000).
3. Yosypchuk B., Šestáková I.: *Electroanalysis* 20, 426 (2008).
4. Snyckerski A., Fijalek Z.: *Chem. Anal.* 41, 1025 (1996).
5. Pecková K., Vrzalová L., Bencko V., Berek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1697 (2009).
6. Yosypchuk B., Berek J., Fojta M.: *Electroanalysis* 18, 1126 (2006).
7. Khaskheli A. R., Fischer J., Berek J., Sirajuddin, Bhanger M. I.: 63. Zjazd chemikov, Tatranské Matliare, Slovensko, 5.–9. 9. 2011, Slovenská chemická spoločnosť, *ChemZi* 7/13, str. 147.

ANALÝZA A CHARAKTERIZÁCIA HUMÍNOVÝCH KYSELÍN KOMBINÁCIOU METÓD KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

**ROBERT GÓRA, MILAN HUTTA,
NATÁLIA MASARYKOVÁ, PAVOL
ROHÁRIK a LUKÁŠ IMRIŠČÁK**

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovensko
gora@fns.uniba.sk*

Úvod

Humínové látky (HL) sú prírodné látky makromolekulového charakteru s komplexnou 3-dimenzionálnou štruktúrou. Patria medzi najvýznamnejšie zložky pôdnej organickej hmoty, ktorá z hľadiska globálneho životného prostredia predstavuje dôležitú zásobáreň uhlíka pre uhlíkový cyklus. Vo všeobecnosti sú HL amorfné, polydisperzné makromolekuly kyslého charakteru so žltým až čiernym sfarbením, ich relatívna mólová hmotnosť pohybuje v rozsahu od niekoľkých stoviek až po niekoľko stotisíc¹. Napriek tomu, že humínové látky sú dlhodobo predmetom štúdií a našli rôznorodé, široké využitie, ešte stále nie sú komplexne vo všetkých detailoch spoznané. Táto skutočnosť je dôsledkom ich chemickej, štruktúrnej a fyzikálnej polydisperzity, ktorá sa prejavuje vo veľkej neurčitosti analytického signálu takmer vo všetkých analytických metódach, ktoré sa zaoberajú výskumom a charakterizáciou HL z makromolekulového pohľadu. Výrazný analytický signál je získavaný o HL iba pri zjednodušujúcom pohľade zameranom napr. na ich elementárne chemické zloženie. Štruktúrna nejednoznačnosť a vlastnosti HL majú za následok veľmi rôznorodé prejavy v správaní sa za rôznych podmienok (napr. silná schopnosť tvorby molekulových agregátov a ich náhly rozpad, tvorba supramolekulových štruktúr a podobne)².

Významné uplatnenie v charakterizácii a analýze humínových látok našli separačné metódy. Medzi hlavné oblasti ich využitia patria izolácia a frakcionácia HL pred ďalšími experimentami (napr. charakterizácia získaných frakcií spektrálnymi metódami) alebo získanie informácií o ich štruktúre a vlastnostiach^{2,3}. Spomedzi chromatografických metód najširšie uplatnenie našla rozmerovo vylučovacia chromatografia (SEC), používaná predovšetkým na stanovenie relatívnej molovej hmotnosti HL, alebo na frakcionáciu vzoriek na základe rozmerov molekúl. Metóda SEC umožňuje dosiahnuť relatívne správne a presné stanovenie distribúcie molovej hmotnosti aj vzhľadom skutočnosť, že rozmer molekúl je úmerná ich relatívnej molovej hmotnosti, avšak závisí aj od ďalších iných faktorov, ktoré môžu výrazne ovplyvniť elučné správanie sa HL v chromatografickom systéme, ako napr. koncentrácia HL

vo vzorke, pH a tiež iónová sila prítomných solí v roztoku mobilnej fázy⁴⁻⁷.

Reveržno-fázová vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (RP-HPLC) sa často používa na stanovenie celkového obsahu HL v rôznych environmentálnych vzorkách, najmä v prírodných vodách. Cieľom týchto prác sú obvykle stanovenie dôležitých parametrov z hľadiska životného prostredia, ako množstvo celkového alebo rozpusteného organického uhlíka (TOC, DOC)³. Pri použití RP-HPLC na analýzu HL vo všeobecnosti platí, že klasické RP – systémy s použitím lineárnej gradientovej elúcie neumožňujú účinnú frakcionáciu HL a získané chromatografické záznamy poskytujú iba obmedzené množstvo použiteľných informácií o povahe a štruktúre analyzovaných látok. Naopak, použitie skokovej gradientovej elúcie umožní HL separovať do niekoľkých dobre definovaných frakcií v závislosti od počtu nastavených krokov⁸.

Kombináciu dvoch alebo viac chromatografických metód (on-line alebo off-line) založených na rozličných separačných princípoch využívali autori doposiaľ iba v zriedkavých prípadoch na analýzu HL. Shalliker a kol. vo svojej práci⁹ opisali využitie spojenia SEC a RP-HPLC metódy na analýzu a charakterizáciu humínových látok izolovaných z tzv. Bayerových roztokov (vznikajú pri procese výroby hliníka, kde vysoký obsah humínových látok je nežiaduci). HL separovali pomocou SEC metódy do niekoľkých frakcií a vybrané frakcie ďalej analyzovali RP-HPLC metódou v spojení s hmotnosťnou spektrometriou (MS), ktorá umožnila aj identifikovať niektoré komponenty nachádzajúce sa v SEC frakciách HL. Opačnú kombináciu¹⁰, spojenie RP-HPLC s využitím skokovej gradientovej elúcie a SEC zvolili autori na charakterizáciu humínových kyselín (HK) izolovaných z pôdnych zdrojov a na porovnanie ich chromatografického správania sa s komerčne dostupnými HK v prostredí *N,N*-dimetylformamidu (DMF) ako organického modifikátora mobilnej fázy.

Z uvedeného vyplýva, že je stále potrebné vyvíjať nové separačné metódy a techniky na analýzu a charakterizáciu tzv. enviromakromolekul aj vzhľadom na stúpajúcu tendenciu ich využitia v rôznych odvetviach hospodárstva. K riešeniu podobných, zložitých problémov môže napomôcť aplikácia nových postupov, ktoré poukazujú najmä na možnosti využitia kombinácie spájania dvoch alebo viacerých chromatografických alebo iných separačných metód pracujúcich na odlišných princípoch (napr. spojenie SEC – HPLC, RP-HPLC – SEC, ITP – CZE – HPLC a pod.)^{9,11} a taktiež využitie neobvyklých, doteraz menej často používaných postupov v chromatografických metódach (skoková gradientová elúcia, voľba netradičného organického modifikátora mobilnej fázy – DMF a pod.) (cit.^{8,12,13}). Práca sa zaoberá možnosťami analýzy a charakterizácie vzoriek humínových kyselín rôzneho pôvodu off-

line kombináciou dvoch chromatografických metód, RP-HPLC a SEC.

Experimentálna časť

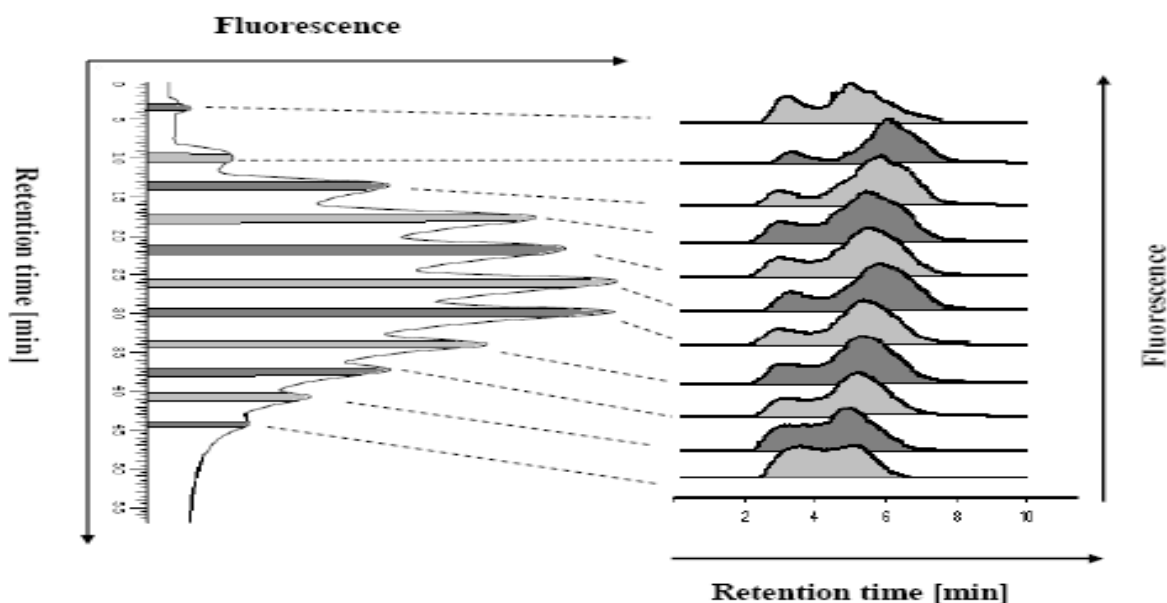
Všetky chromatografické experimenty sme uskutočnili použitím chromatografického systému LaChrom Merck – Hitachi (Merck, Darmstadt, Nemecko), ktorý sa skladal z nasledujúcich modulov: zo štvorkanálovej pumpy L-7100 on-line spojeným s vákuovým odplyňovačom L-7612, z automatického dávkovača L-7200, z kolónového termostatu L-7300, v ktorom bola umiestnená chromatografická kolóna, zo spektrofotometrického detektora s radom diód (DAD) L-7450A, z flourimetrického detektora (FLD) L-7480. Komunikáciu medzi zariadením a riadiacim softvérom HSM verzia 4.1 bola zabezpečená fázovým rozhraním D-7000.

V prvom separačnom stupni sme rozdelili skúmané vzorky HL do niekoľkých dobre definovaných frakcií metódou RP – HPLC. Na separáciu vzoriek sme použili analytickú kolónu LiChrospher ODS WP 300 RP-18 (250 × 4 mm) s priemernými rozmermi pórov 30 nm (Merck, Darmstadt, Nemecko), ktorá bola spojená s predkolónou LiChrospher ODS WP 300 RP-18 (4 × 4 mm) (Merck, Darmstadt, Nemecko). Na samotnú frakcionáciu sme využívali techniku skokovej gradientovej elúcie, kde hlavnou organickou zložkou mobilnej fázy (MF) bol *N,N*-dimetylformamid (DMF), ktorý už v minulosti bol často používaný pri izolácii HL z pôdnych vzoriek, vzhľadom na jeho výborné solvatačné vlastnosti, silnú schopnosť tvorby

vodíkových mostíkov a nízku prchavosť¹⁴. Požadované zloženie MF sme dosiahli miešaním dvoch základných roztokov, DMF a tlmivého roztoku o pH 3,00 (pripravený rozpustením $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ koncentračnú úroveň 5 mmol dm^{-3} , pH sme si upravili na hodnotu 3,00 postupným pridávaním roztoku H_3PO_4 o koncentrácii 5 mmol dm^{-3}) v závislosti od času⁸. Jednotlivé frakcie sme zbierali v časových intervaloch odvodených z odozvy FLD detektora ($\lambda_{\text{ex.}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 530 \text{ nm}$), čo predstavovalo približne 500 μl eluátu z oblasti maxima píkov. Frakcie získané týmto spôsobom sme použili na ďalšie analýzy v druhom separačnom stupni. Termostat bol vyhriaty na teplotu $35,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, prietok MF bol nastavený na 1 ml min^{-1} a pre účely získania RP-HPLC frakcií HL sme dávkovali do chromatografického systému 100 μl vzorky.

Druhý separačný stupeň pozostával zo SEC analýzy RP-HPLC frakcií HL. Použili sme kovovú kolónu s rozmermi (250 × 2,2 mm), plnenú gélom Spheron HEMA 100 (Tessek Praha, ČR) s priemernými rozmermi častíc gélu < 25 μm . Pri tejto metóde sme ako mobilnú fázu použili zmes DMF a tlmivého roztoku ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 mmol dm^{-3} , pH 3,00) v pomere 99/1 (v/v). Používali sme rovnaký spôsob detekcie a nastavenie teploty termostatu ako v prípade RP-HPLC experimentov. Dávkovaný objem frakcií bol v rozmedzí 20–100 μl pri prietoku MF $0,2 \text{ ml min}^{-1}$.

V práci sme použili 3 typy vzoriek humínových látok, komerčne dostupný štandard humínových kyselín od firmy Sigma – Aldrich (HK Aldrich) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MI, USA) a pracovné štandardy humínových kyselín



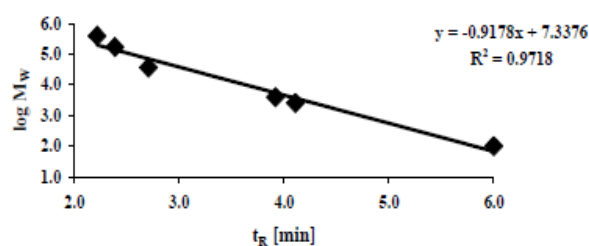
Obr. 1. Multichromatogram vzorky HK DS I, získaný aplikáciou metód RP-HPLC (vertikálne umiestnený záznam) a SEC (horizontálne umiestnený záznam). Obidva chromatografické záznamy vzorky HA DS I ($3,02 \text{ mg ml}^{-1}$) sme získali použitím FLD detekcie ($\lambda_{\text{ex.}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 530 \text{ nm}$) pri dávkovaní 100 μl vzorky v prípade RP-HPLC a 20 μl zo zachytených frakcií (SEC)

izolované z pôdy (okolie Dunajskej Stredy, Calcaric Fluvio-soil, 1. horizont (HK DS I a HK DS J)), podľa frakcionačnej schémy, ktorý bol vyvinutý modifikáciou schémy doporučenej spoločnosťou IHSS^{15,16}. Všetky tri vzorky boli pripravené na koncentračnej úrovni asi 3 mg ml⁻¹ denne rozpustením naváženého množstva HK v tlmovom roztoku mobilnej fázy a pridaním malého množstva roztoku NaOH (5 mmol dm⁻³).

Výsledky a diskusia

V prvom separačnom stupni sme aplikovali RP-HPLC metódu, ktorá nám umožnila charakterizáciu vzoriek HL porovnaním ich chromatografických profilov získaných dvomi typmi detektorov (DAD, FLD) v tandemovom zapojení a separáciu vzoriek do frakcií, ktoré boli zbierané v oblasti maxim pík na základe odozvy FLD detektora. Zo získaných chromatografických záznamov vyplýva, že dôsledkom prinútených náhlych zmien koncentrácie mobilnej fázy podľa priebehu aplikovanej gradientovej elúcie sa nám jednotlivé vzorky podarilo rozdeliť do 11-tich pomerne dobre definovaných frakcií (obr. 1, vertikálne umiestnený záznam). Porovnaním RP-HPLC profilov skúmaných vzoriek HL môžeme konštatovať, že jednotlivé vzorky poskytujú chromatogramy s rozdielnymi charakteristickými črtami^{2,10}, čo svedčí o rozdielnom zložení jednotlivých vzoriek. Podobné rozdiely v chromatografických profiloch dokumentujú aj chromatogramy získané spektrofotometrickou detekciou, či už porovnaním kontúrových máp sledovaných v rozmedzí vlnových dĺžok 270 až 800 nm alebo jednotlivých chromatogramov pri konkrétnej vybranej vlnovej dĺžke (280 nm, 420 nm). Získané frakcie sme v ďalšom separačnom stupni, v off-line režime analyzovali metódou SEC.

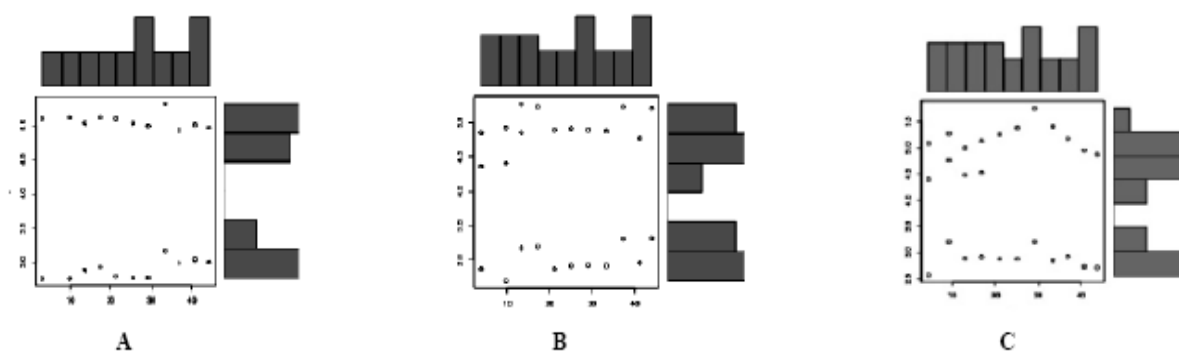
Pre druhý separačný stupeň sme si zvolili chromatografickú metódu, ktorá pracuje na základe rozdielných separačných princípov ako v prvom stupni používaná RP-HPLC. Vybrali sme rozmerovo vylučovaciu chromatogra-



Obr. 2. Kalibrácia použitej stacionárnej fázy Spheron HEMA 100 použitím polystyrénových štandardov s nominálnymi hodnotami relatívnych molových hmotností 900, 2600, 4000, 10000, 37000, 97000, 120000

fiu (SEC), ktorá umožňuje pomerne presne a správne určiť distribúciu relatívnej molovej hmotnosti jednotlivých vzoriek HL^{10,11,17} a tiež ich frakcií získaných metódou RP-HPLC. Ako stacionárnu fázu sme použili gél Spheron HEMA 100 s veľkosťou častíc < 25 μm, ktorým sme naplnili kolónu s rozmermi 250 × 2,2 mm. Gély Spheron HEMA sa vyznačujú mimoriadnou mechanickou odolnosťou, ktorá umožňuje ich použitie pri kvapalinovej chromatografii pri pomerne vysokých tlakoch, bez rizika deformácie či rozpadnutia častíc, upchania kolóny a roztrhnutia stĺpca gélu.

Na kalibráciu stacionárnej fázy sme použili rad dostupných štandardov makromolekulových látok a polymérov (globulárne proteíny, polystyrénove štandardy, dextrány a pod.) o známej relatívnej molovej hmotnosti. Spomedzi skúmaných kalibračných štandardov pre naše potreby najlepšie vyhoveli polystyrénové štandardy (PS) najmä preto, lebo svoje absorpčné maximum majú pri 270 nm a svojimi vlastnosťami najviac spĺňajú požiadavky vyplývajúce zo zloženia nami navrhnutého separačného systému. Zo získaných retenčných údajov sme zostrojili kalibračnú závislosť (obr. 2), ktorá znázorňuje závislosť logarit-



Obr. 3. Grafické znázornenie 2D záznamov Pearsonovho korelačného koeficientu, ktorý vyjadruje stupeň porovnateľnosti po aplikácii kombinácie metód SEC a RP-HPLC pre vzorky HK Aldrich (A), HK DS I (B) a HK DS J (C)

Tabuľka I

Vypočítané štatistické parametre charakterizujúce stupeň porovnateľnosti po aplikácii kombinácie metód SEC a RP-HPLC pre vzorky HK Aldrich (A), HK DS I (B) a HK DS J (C)

Pearson Product Moment Correlation – Ungrouped Data						
Statistics	(A) HK Aldrich		(B) HK DS I		(C) HK DS J	
	Variable X	Variable Y	Variable X	Variable Y	Variable X	Variable Y
Mean	24.9564	3.9786	23.0528	4.0732	22.7423	4.1212
Biased Variance	160.6704	1.1830	169.5655	0.9355	160.6985	1.2126
Biased Standard Deviation	12.6756	1.0877	13.0217	0.9672	12.6767	1.1012
Covariance		0.3867		-0.2683		-1.1062
Correlation		0.0268		-0.0204		-0.0762
Determination		0.0007		0.0004		0.0058
T-Test		0.1198		-0.0981		-0.3744
p-value (2 sided)		0.9058		0.9223		0.7114
p-value (1 sided)		0.4529		0.4613		0.3557
Degrees of Freedom		20		23		24
Number of Observations		22		25		26
Level of Significance (p) for a Two-Tailed Test						
df (n-2):		0.1	0.05	0.02		0.01
Critical values		0.582	0.666	0.750		0.798

mu molovej hmotnosti (log MW) jednotlivých PS štandardov od ich retenčného času (t_R), ktorú sme potom použili na stanovenie distribúcie relatívnych molových hmotností pre jednotlivé vzorky humínových látok a ich RP-HPLC frakcií^{10,11}.

RP-HPLC frakcie vzoriek sme pomocou SEC rozseparovali spravidla na dve väčšie subfrakcie, z ktorých prvá eluovala v oblasti vylučovacej medze použitej stacionárnej fázy a „de facto“ bola vylúčená zo separácie, teda ich relatívna molová hmotnosť bola väčšia ako 100 000. Druhá subfrakcia pokryla prakticky celý pracovný rozsah kolóny, čo znamená, že v jej zóne eluovali látky so širokou distribúciou relatívnej molovej hmotnosti, pričom maximum zóny padalo do oblasti, kde eluovali štandardy s relatívnou molovou hmotnosťou okolo 10 000. V niektorých prípadoch sa na chromatografických záznamoch objavil aj tretí pík, ktorý sa nachádzal v oblasti zodpovedajúcej elučného času štandardu s relatívnou molovou hmotnosťou približne 30 000.

Použitú kombináciu dvoch chromatografických metód RP-HPLC a SEC sme hodnotili aj z hľadiska dosiahnutia miery ortogonalít separácie. Na tento účel sme použili matematickú metódu, ktorá porovnáva úroveň korelácie dát získaných obidvomi chromatografickými metódami zostrojením grafickej závislosti. Na os „x“ sme vynesli hodnoty retenčných časov získané z prvej chromatografickej dimenzie (RP-HPLC) na os „y“ retenčné časy v hodnotách maxim pík z druhej chromatografickej dimenzie (SEC) pre všetky tri skúmané vzorky HL (obr. 3). Pomo-

cou dostupného štatistického programu¹⁶ sme vypočítali Pearsonove korelačné koeficienty („Pearson Product Moment Correlation“) a ďalšie štatistické parametre, ktoré charakterizujú stupeň porovnateľnosti nameraných dát, ktoré pre skúmané vzorky dosiahli nasledovné hodnoty: HK Aldrich 0,0268, HK DS I -0,0201 a HK DS J -0,0762.

Záver

Práca sa zoberá možnosťami analýzy a charakterizácie vzoriek humínových látok off-line kombináciou dvoch chromatografických metód, RP-HPLC a SEC. V prvom separačnom stupni použitá RP-HPLC metóda s technikou skokovej gradientovej elúcie umožnila separáciu jednotlivých vzoriek HL do 11 dobre definovaných frakcií, ktoré boli v druhom separačnom stupni charakterizované metódou SEC, ktorá pracuje na základe odlišných separačných princípov ako RP-HPLC.

Po porovnaní vypočítaných hodnôt Pearsonových korelačných koeficientov pre všetky tri skúmané vzorky humínových kyselín a ich frakcií získané kombináciou metód RP-HPLC a SEC môžeme konštatovať, že hodnoty poukazujú na veľmi nízku úroveň korelácie a použitý separačný systém sa správa ako ortogonálny

Práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/1349/12.

LITERATÚRA

1. Choudhry G.G.: Humic Substances. Structural aspects, and photophysical, photochemical and free radical characteristics, in Hutzinger O. Ed., *The Handbook of Environmental Chemistry* Vol. 1., Part C, str. 1–24. The Natural environment and the biogeochemical cycles, Springer Verlag, Heidelberg 1989.
2. Hutta M., Góra R., Halko R., Chalányová M.: *J. Chromatogr., A* 1218, 8946 (2011).
3. Jánoš P.: *J. Chromatogr., A* 983, 1 (2003).
4. Town R.M., Powell H.K.J.: *Anal. Chim. Acta* 256, 81 (1992).
5. Powell H.K.J., Town R.M.: *Anal. Chim. Acta* 267, 47 (1992).
6. Town R.M., Powell H.K.J.: *Anal. Chim. Acta* 279, 211 (1993).
7. Mori S., Hiraide M., Mizuike A.: *Anal. Chim. Acta* 193, 231 (1987).
8. Hutta M., Góra R.: *J. Chromatogr., A* 1012, 67 (2003).
9. Whelan T.J., Shalliker R.A., McIntyre C., Wilson M.A.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 3229 (2005).
10. Góra R., Hutta M., Rohárik P.: *J. Chromatogr., A* 1220, 44 (2012).
11. Góra R., Hutta M., Havlíková D., Rohárik P.: Orthogonal off-line combination of RP-HPLC and SEC for analysis and characterization of soil humic acids, Proceedings of International Conference Humic Substances in Ecosystems 8, Šoporňa, 13–16 September 2009, Zaujec A., Bielek P., Gonet S.S., Debska B., Heczko J. (ed.), str. 167–174. VUPOP, Bratislava 2009.
12. Góra R., Hutta M., *J. Chromatogr., A* 1084, 39 (2005).
13. Góra R., Hutta M., Vrška M., Katuščák S., Jablonský M.: *J. Sep. Sci.* 29, 2179 (2006).
14. Ziechmann W.: *Huminstoffe*, str. 191. Verlag Chemie, Weinheim 1980.
15. Kandráč J., Hutta M., Foltin M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem. Articles* 208, 577 (1996).
16. Prochácková T., Góra R., Kandráč J., Hutta M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 229, 61 (1998).
17. Jánoš P., Zatléřpáková I.: *J. Chromatogr., A* 1160, 160 (2007).
18. Wessa P.: Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r4, 2009. <http://www.wessa.net/> (15.6.2011).

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE S COULOMETRICKOU ÚČINNOSTÍ V HPLC – VČERA, DNES A ZÍTRA

ALEŠ HORNA

*RADANAL, Okružní 613, 53003 Pardubice
horna@radanal.cz*

Elektrochemická detekce s coulometrickou účinností je příkladem vysoce citlivé a selektivní detekce v HPLC. Na rozdíl od spektrálních detektorů, elektrochemický detektor k detekci látky využívá elektrochemickou reakci, tedy přenos elektronů (oxidace a redukce). Elektrochemická reakce představuje přeměnu chemické a elektrické energie. Podle definice je elektrický proud pohybem elektronů a tudíž v elektrochemii můžeme rozeznávat dva rozdílné typy procesů. Vznik elektrického proudu v důsledku přenosu elektronu chemickou reakcí a využití elektrického proudu pro chemické změny.

V HPLC můžeme také na tento elektrochemický detektor pohlížet jako postkolonový chemický reaktor, který mění chemické vlastnosti analytu. Prakticky to znamená, že na chromatografické koloně separují jiné chemické individuum než jaké detekují. Postkolonovou derivatizaci provádíme pro zlepšení detekčních vlastností látky. V každém případě pro úspěšnou práci s elektrochemickým detektorem je nutná určitá znalost chemie či ještě lépe chápání chemie.

Na citlivost odezvy elektrochemického detektoru mají vliv parametry mobilní fáze jako je její chemické složení, pH, rychlost průtoku tak na druhé straně i kvalita povrchu elektrody a velikost vloženého potenciálu. Když používáme elektrochemický detektor ve spojení s chromatografickou kolonou, musíme současně respektovat podmínky, které vyžaduje vedle detekce i separace na koloně. Elektrochemická reakce na povrchu elektrody, nad kterým se pohybuje kapalná fáze, je řízena třemi kroky, z nichž každý může být rychlost určujícím. Prvním krokem je to difuze analytu k povrchu elektrody. Pak následuje přenos elektronu mezi analytem a povrchem elektrody. Třetím krokem je opět transport reakčních produktů od povrchu elektrody.

V průběhu oxidační reakce uvolněné elektrony vytvářejí proud, který je zesílen a sledován jako signál detektoru. Elektrochemické detektory v HPLC se dělí na amperometrické a coulochemické. Účinnost využití analytu pro detekci u amperometrických detektorů, kde je rychlost určujícím krokem difuze, se pohybuje mezi 5–10 %. V případě coulochemické detekce, kde je konverze redox reakce stoprocentní, máme co činit s „absolutní“ metodou, kde z přeneseného náboje na elektrodu můžeme spočítat pomocí Faradayova zákona množství analytu v odpovídajícím chromatografickém píku. Zvýšení rychlosti průtoku mobilní fáze (analytu) se v chromatografickém záznamu projeví nárůstem výšky píku, přičemž plocha píku zůstává konstantní pro široký rozsah průtoků.

Coulochemické detektory byly původně vyvinuty pro sledování neurotransmiterů v lidském mozku. Díky vynikající citlivosti a robustnosti se tyto detektory používají prakticky výhradně na klinických pracovištích jako speciální analyzátoři pro stanovení katecholaminů a metanefrinů v plazmě. Pole sériově řazených pracovních elektrod s coulometrickou účinností detekce lze využít pro identifikaci elektroaktivních látek na základě jejich elektrochemické charakteristiky. Toho se využívá ve farmaceutických, potravinářských a mnoha výzkumných pracovištích, kde se tento typ CoulArray detekce uplatňuje s využitím HPLC gradientové eluce pro analýzu složitých směsí elektroaktivních látek v přírodních extraktech, kontrole léčiv a životního prostředí.

Dnes je velkou aplikační oblastí pro HPLC s elektrochemickou detekcí analýza potravin. Antioxidanty v potravinách jsou obecně přijímány odbornou veřejností jako zdravé prospěšné látky. V souvislosti s nabídkou zdravých potravin a doplňků stravy se velká pozornost věnuje pojmům souvisejícím s antioxidační aktivitou a antioxidační kapacitou. Naopak velmi malá pozornost se věnuje studiu produktů, které vznikají oxidací antioxidantů. Pro studium redukčních reakcí antioxidantů lze s výhodou použít elektrochemický detektor s pracovní elektrodou tvořenou nanoporézním grafitem. V tomto uspořádání reakce probíhají na styku pevné a kapalné fáze. Zdrojem elektronů je povrch pevné fáze. Elektrochemický detektor ve spojení s hmotnostním detektorem umožňuje sledovat oxidačně redukční produkty antioxidantů ve fázi jejich vzniku bez rušivého příspěvku oxidačního činidla a dalších reagujících látek v matrici.

Z pohledu do budoucnosti se jeví perspektivní oblastí elektrochemické detekce zejména aplikace ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Využití elektrochemie a hmotnostní spektrometrie ve spojení LC/EC/MS byl již věnován první mezinárodní workshop na Univerzitě v Münsteru v září roku 2011. Predikce metabolismu potenciálních léčiv v lidském těle je jednou z hlavních výzev farmaceutického výzkumu. Hlavní cestou, jak jsou chemické látky z těla eliminovány, je enzymatická biotransformace. Ta je velmi často iniciována oxidačními reakcemi s využitím skupiny enzymů cytochromu P450. S rostoucím počtem nových potenciálních léčiv v posledních letech roste i význam rychlých testovacích metod jako zdroje spolehlivých informací o biotransformaci látek o různé chemické struktuře. To má obrovský význam při posuzování možné hepatotoxicity nově navrhovaných chemických struktur vyvíjených léčiv. Elektrochemické cely lze využít pro syntézu reakčních intermediátů v prostředí mobilní fáze a jejich záchyt v následné reakci s glutationem nebo jinými vhodnými biomakromolekulami. Opačně toho lze využít i pro sledování modifikace proteinů. Pomocí elektrochemické detekce lze podobně

studovat biotransformace probíhající v životním prostředí a spektrum takto sledovaných látek rozšířit vedle léčiv i o pesticidy a další do životního prostředí unikající chemikálie. Využití LC/EC/MS pro charakterizaci oxidačních produktů Roscovitinu je vůbec první prací tohoto druhu u nás¹.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu Nové konstrukce a využití nanobiosenzorů a nanosenzorů v medicíně (NANOSEMED), KAN208130801.

LITERATURA

1. Karady M., Novák O., Horna A., Strnad M, Doležal K.: *Electroanalysis* 203, 2898 (2011).

USE OF DERIVATIZED CYCLOFRUCTANS AS CHIRAL SELECTORS IN HPLC

KATARÍNA HROBOŇOVÁ^{a*}, MATRIN TIBENSKÝ^a, JOZEF LEHOTAY^a, JOZEF ČIŽMÁRIK^b, and DANIEL W. ARMSTRONG^c

^a Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

^b Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárrov 10, 832 32 Bratislava, Slovakia, ^c Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Arlington, Texas 76019, USA

katarina.hrobonova@stuba.sk

Continued discoveries of significant differences in effectiveness and toxicity of individual enantiomers in biological systems has maintained the importance of chiral separations. Cyclofructans are a small group of macrocyclic oligosaccharides, which consist of six or more β -linked D-fructofuranose units and represent a new class of chiral selectors for HPLC enantioseparations. Their names are usually abbreviated as CF6, CF7, CF8, etc. CF6 consists of an 18-crown-6 ether core and six fructofuranose units are arranged in spiral fashion, either inward or outward around the crown ether skeleton. CF6 shows a clear “front/back” regionalization of hydrophilic and hydrophobic groups. Derivatization of a native chiral selector with aliphatic or aromatic functional groups can improve its chiral recognition capabilities. Derivatized – cyclofructan bonded chiral stationary phases produced effective enantiomeric separations for a variety of compounds¹⁻³.

Chiral potential local anaesthetic drug – derivatives of phenylcarbamic acid and potential β -blockers of aryl-oxyaminopropanol type were used for HPLC study of retention and enantioseparation on the RN-CF6 (*R*-naphthylethyl-carbamate CF6 chiral selector bonded on silica gel) and DMP-CF7 (dimethylphenyl-carbamate CF7 chiral selector bonded on silica gel) chiral stationary phas-

es in polar organic separation mode. The results were compared with macrocyclic antibiotic and β -cyclodextrin chiral stationary phases. The mobile phase composed of methanol/ acetonitrile/ acetic acid/ triethylamine (20/80/0.3/0.2 v/v/v/v) was utilized as the starting conditions for all tested chiral stationary phases.

The study was oriented on the testing of influence of mobile phase composition, influence of analyte solvent nature, and influence of column temperature on retention and enantioseparation of target analytes. Based on the results obtained the correlation between the structures of the analytes and their retention and resolution values was studied to understanding the interaction types participating in the separation mechanism. The nature of analyte solvent significantly influenced the retention and shape of elution peaks. The most considerable effect was observed in the case of alcohols (methanol, ethanol, propanol) as analyte solvent. Also the separation of different forms of studied racemic compounds on chiral stationary phases was achieved. The effect was observed mainly on cyclofructan chiral stationary phases. This probably indicated the formation of solvation complexes between the solvent molecule and analyte which follows to change of retention properties of formatted complexes. The thermodynamic study for derivatives of aryloxyaminopropanol indicated that the resolution values of complexes not significantly decreased in the temperature interval from 0 °C to 50 °C. The ratio of peak shapes of associates of studied derivatives depended on the temperature.

This study was financially supported by the Grant Agency VEGA of Slovak Republic (grant no. 1/0164/11).

REFERENCES

1. Sun M. P., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr., A* 1217, 4904 (2010).
2. Sun P., Wang C., Breitbach Z. S., Zhang Y., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 81, 10215 (2009).
3. Kawamura M., Uchiyama T., Kuramoto T., Tamura Y., Mizutani K.: *Carbohydr. Res.* 192, 83 (1989).

SYSTEMS BIOLOGY FROM THE POINT OF VIEW OF ANALYTICAL CHEMISTRY**JÁN HROUZEK^{a*}, and SVETLANA HROUZKOVÁ^b**

^a *Hermes LabSystems, Púchovská 4, Bratislava,* ^b *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic*
jan.hrouzek@hermeslab.sk

Systems biology is an emergent field that aims at system-level understanding of biological systems. Understanding of structure of the system, such as gene regulatory and biochemical networks, as well as physical structures (*i*), understanding of dynamics of the system, both quantitative and qualitative analysis as well as construction of theory/model with powerful prediction capability (*ii*), understanding of control methods of the system (*iii*), and understanding of design methods of the system (*iv*), are key milestones to judge how much we understand the system¹. Functional genomics such as transcriptomics and proteomics can simultaneously determine massive gene or protein expression changes following drug treatment or other intervention. However, these changes can't be coupled directly to changes in biological function. As a result, metabolomics and its many pseudonyms (metabonomics, metabolic profiling, etc.) have exploded onto the scientific scene in the past several years². Metabolomics is a key technology for systems biology. Metabolomics (or metabonomics) has been labeled one of the new "omics", joining genomics, transcriptomics, and proteomics as

a science employed toward the understanding of global systems biology². Metabolomics has its roots in early metabolite profiling studies but is now a rapidly expanding area of scientific research in its own right. The analysis of the metabolome is particularly challenging due to the diverse chemical nature of metabolites. Metabolites are the result of the interaction of the system's genome with its environment and are not merely the end product of gene expression but also form part of the regulatory system in an integrated manner³.

For metabolomics, gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry are well suited for coping with high sample numbers in reliable measurement times with respect to both technical accuracy and the identification and quantitation of small-molecular-weight metabolites. This potential is a prerequisite for the analysis of dynamic systems⁴.

In this paper, recent developments of analytical techniques used in metabolomics will be discussed and selection of the major applications of metabolomics relevant to pharmaceutical, clinical and environmental area utilizing advanced chromatographic equipment will be shown.

REFERENCES

1. Kitano H.: *Science* 295, 1662 (2002).
2. Li H., Jiang Y., He F. C.: *Yi Chuan* 30, 389 (2008).
3. Rochfort S.: *J. Nat. Prod.* 68, 1813 (2005).
4. Weckwerth W.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 669 (2003).

CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS: STATE-OF-THE-ART AND FUTURE TRENDS

SVETLANA HROUZKOVÁ*,
EVA MATISOVÁ, and **MÁRIA**
ANDRAŠČÍKOVÁ

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
svetlana.hrouzkova@stuba.sk*

In the last decade, endocrine disrupting chemicals (EDCs) attracted increasing attention in the scientific community, regulation and public interests groups. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are of global concern due to their widespread occurrence, persistence, bioaccumulation and potential adverse effects on human health and ecosystem functioning. By definition, an endocrine disrupter is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and, consequently, causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations¹. It is important to distinguish this from a potential endocrine disrupter, which is an exogenous substance or mixture that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations¹. EDCs can modulate both the endocrine and immune systems resulting in alteration of homeostasis, reproduction, development and behaviour². These compounds may be man-made, e.g. industrial chemicals, crop protection chemicals, or they may be natural like the phytoestrogens³. The ubiquitous presence with trace level concentrations and wide diversity are the most important reported characteristics of EDCs⁴. As EDCs may cause detrimental effect at very low concentrations and in addition, they are usually present as mixtures in the environment, they may pose potential risk to ecosystem and human health⁴.

Analysing the EDCs at low concentration levels requires multistep sample preparation including cleaning and preconcentration of the resulting extract. As EDCs represent structurally diverse classes of substances, plentiful analytical methods could be applied for the identification and quantification of these compounds^{5,6}. Recently, methods based on biosensors have also been used⁷. The most efficient approach to EDCs residues analysis involves the use of chromatographic methods⁸. Analytical techniques as gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) combined with mass spectrometry (MS) or tandem MS are the techniques most frequently used and can reach satisfactory selectivity and sensitivity analyzing EDCs in complex food matrices and matrices of environmental origin. Capillary GC coupled to MS detection has developed into a primary technique for identification and quan-

tification of many EDCs using small bench-top instruments with sophisticated data systems⁹. Electron ionization is the ionization technique of the first choice. In cases requiring enhanced sensitivity and selectivity the negative/positive chemical ionization is employed^{10–12}.

As a special approach to gas chromatographic separations, fast GC technique meets the present day demands on faster and cost-effective analysis. Nowadays, fast GC can be performed on commercial gas chromatographs, which are equipped with high-speed injection systems, electronic gas pressure control, rapid oven heating/cooling and fast detection^{13–15}.

Advances in LC-MS interfacing, namely introduction of electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) have enabled sensitivity and reliability that are suitable for routine determinations of EDCs, particularly for more polar compounds that would require derivatization for GC-MS. LC-MS can reduce clean-up requirements over HPLC-UV (high performance liquid chromatography with ultraviolet detection), although care must be taken with matrix effects on ESI responses that may affect quantitation⁹.

The detection, identification and determination of substances in food and environmental samples that are able to disrupt the endocrine system of living organisms will be a relevant research direction also in the next years. Despite the tremendous developments and improvements in the analytical instrumentation, for most of substances there is continuous need to employ the extraction and preconcentration steps. For EDCs residues analysis ultrasensitive analytical methods are required and there is still the need to improve the performance and ruggedness of analyses and there is continuous attempt to develop the method for determination of multiresidues covering wider range of physical-chemical properties of compounds.

This work was supported by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic (VEGA project No. 1/0647/11).

REFERENCES

1. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.html
2. Amaral Mendes J.J.: Food Chem. Toxicol. 40, 781 (2002).
3. Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A.: Pure Appl. Chem. 75, 631 (2003).
4. Chang H.S., Choo K.H., Lee B., Choi S.J.: J. Hazard. Mater. 172, 1 (2009).
5. Petrovič M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D.: J. Chromatogr., A 974, 23 (2002).
6. Laguna A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago

- G., Marino A.: *Anal. Chim. Acta* 501, 79 (2004).
7. Bezbaruah A.N., Kalita H., in: *Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater*, p. 93, IWA Publishing, London 2010.
 8. Comerton A.M., Andrews R.C., Bagley D.M.: *Philos. Trans. R. Soc., A* 367, 3923 (2009).
 9. Holland P.T.: *Pure Appl. Chem.* 75, 1843 (2003).
 10. Húšková R., Matisová E., Hrouzková S., Švorc I.: *J. Chromatogr., A* 1216, 6326 (2009).
 11. Húšková R., Matisová E., Hrouzková S.: *Chem. Listy* 104, 913 (2010).
 12. Hrouzková S., Matisová E., Andraščíková M., Horváth M., Húšková R., Ďurčanská J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem. iFirst*
DOI:10.1080/03067319.2011.592944 (2011).
 13. Matisová E., Dömötörövá M.: *J. Chromatogr., A* 1000, 199 (2003).
 14. Dömötörövá M., Matisová E.: *J. Chromatogr., A* 1207, 1 (2008).
 15. Hrouzková S., Matisová E., in: *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*, Chap. 6, p. 131, InTech, Zagreb 2011.

HUMÍNOVÉ LÁTKY – ANALYTY A INTERFERENTY CHEMICKEJ ANALÝZY VÝZNAMNÝCH SKUPÍN LÁTOK

M. HUTTA*, **R. GÓRA**,
M. CHALÁNYOVÁ, **R. HALKO**,
R. BODOR a **M. MASÁR**

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
hutta@fns.uniba.sk*

Úvod

Humínové látky (HL) – prírodné makromolekulové alebo supramolekulové látky zaujímavým objektom výskumu mnohých vedných odborov, medzi nimi aj analytickej chémie. Predmetom záujmu sú nielen ako analyty, ale aj ako interferenty značného počtu rôznych typov chemických analýz. Ich prítomnosť vo vzorkách môže zapríčiniť problémy nielen v klasických oblastiach stopovej analýzy pesticídov v pôde, v sedimentoch a vo vode, ale problémovo sa prejavujú aj v niektorých nových oblastiach – stopovej analýzy antibiotík vo vodách, v sedimentoch a v hlavne v pôdach, ktoré sú zúrodňované kalmi z čistiarní splaškových a odpadových vôd, v kriminalistickej analýze, v archeometrii a v mnohých ďalších oblastiach.

Teoretická časť

HL ako makromolekulové alebo supramolekulové polyelektrolyty s aniónovým charakterom dlhodobo spôsobujú veľké problémy pri analýze DNA^{1–5} a jej fragmentov metódami využívajúcimi na zmnoženie DNA fragmentov polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) a koncové metódy denaturačnej kvapalinovej chromatografie alebo elektroforézy. Problémy spôsobujú humínové látky aj v spojitosti s genetickým mikrobiologickým výskumom pôdných mikroorganizmov vzorkovaných z úložísk alebo čiernych skládok toxických odpadov (anilín⁶). Takýto výskum je zameraný na vytipovanie a následné získanie nových mikroorganizmov na remediáciu zložiek životného prostredia biologickými a biotechnologickými prostriedkami. V súvislosti s genetickým výskumom ľudskej DNA predstavujú humínové látky stále úplne nevyriešený problém⁷ aj v oblastiach forenznej analýzy, paleobiológie a archeológie. HL vadia pri izolácii nedenaturovanej DNA a jej fragmentov z kostí nájdených v pôde alebo v sedimentoch^{8,9}. Problém vplyvu HL na PCR je neustále aktuálny pre nové návrhy a riešenia^{10,11}. Je tomu tak aj napriek tomu, že riešenie tohto problému už niektoré firmy ponúkajú v podobe chromatografických kolóniek na extrakciu tuhou fázou alebo iných formátov plnených bližšie nešpecifikovanými chromatografickými sorbentami¹². Viaceré z produktov podľa výrobcov poskytujú možnosti odstráne-

nia takých inhibítorov PCR, ako sú okrem HL aj taníny a melanín, avšak zloženie chromatografických materiálov nie je z komerčných zdrojov dostupné. Zložitosť problémov chemickej analýzy stopových koncentrácií iónogénnych látok (napríklad pesticídov, antibiotík, nukleových kyselín) v reálnych vzorkách (pôdy, sedimenty, povrchové vody)¹³ si vyžaduje dosahovať zložitosti problému adekvátnu selektivitu úpravy vzorky, separácie a detekcie, a zároveň vysoké obohacovacie a koncentračné koeficienty. To je prakticky nemožné bez zložitých analytických postupov, nákladnej modernej inštrumentácie a dôslednej kontroly kvality analýz. Zároveň sa predpokladá a je legislatívne určené vypracovávanie analytických metód a postupov, ktoré sú robustné, validované a univerzálne aplikovateľné. Systém kontroly kvality však všeobecne trpí nedostatkom vhodných štandardných referenčných materiálov (napr. HL) potrebných na validáciu existujúcich i nových analytických metód a ich kombinácií¹⁴. To sa týka hlavne systematického vyhodnocovania vplyvu potenciálnych interferentov v environmentálnych matriciach a hodnotenia selektivity metódy pomocou frakcií HL – humínových kyselín (HK) a fulvokyselín (FK)¹⁵.

Diskusia

Diskusia problematiky kombinovania separačných techník využívajúcich kvapalnú prostredie

Problém mnohozložkovej analýzy látok v zložitých matriciach, medzi ktoré nesporne patria environmentálne a biologické matrice značne ovplyvnil vytvorenie teórie separácie^{14,16} a tiež vývoj inštrumentácie a nových separačných techník do takej miery, že sa hovorí o separačnej vede. Zo štádia výskumu sa do rutínnej praxe dostali elektro-separačné (ES) metódy – kapilárna izotachoforéza¹⁷ (cITP), kapilárna zónová elektroforéza¹⁸ (CZE), izoelektrická fokusácia (IEF) a micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC)¹⁹. V oblasti čipových aplikácií sa výskum zameriava na zvýšenie spoľahlivosti inštrumentácie a zabezpečenie výrobnéj reprodukovateľnosti jednorazových alebo jednúčelových čipov. Extrémna zložitosť problémov analýzy stopových koncentrácií iónogénnych látok v prirodzených matriciach (vode, pôde, sedimentoch, lignite, rašelíne, humifikovaných odpadoch) za výrazného interferenčného účinku HL spôsobuje, že pre ich úspešné riešenie je potrebné spájať spolu dokonca aj techniky s prívlastkom vysokoúčinné. Popri on-line spojeniach separačných, detekčných a identifikačných metód, napríklad LC-DAD^{20,21}, HPLC-MS²² a ďalších, sa stále intenzívne skúmajú možnosti vzájomného prepojenia separačných metód navzájom do podoby takzvanej komprehenzívnej techniky² (<http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/veda-a-vyzkum/albertov-comprehensive-days-2011>).

Vznikajú tak 2D separačné techniky, napríklad HPLC-HPLC²³ alebo 2D elektromigračné techniky napr. ITP-CZE²⁴ a iné. Pri systematickej zmene selektivity počas separačného procesu môžeme dosiahnuť prakticky neohraničené separačné možnosti, ktoré sa vyžadujú hlavne z pohľadu komplexnosti štruktúr a prejavov HL, pokiaľ však nie sme obmedzení nárokmi na krátke trvanie analýzy^{26–28}. Z pohľadu separačnej selektivity systému je zaujímavá Freemanova koncepcia separačného módu²⁹. Výhody postupného použitia rôznych módov (mode sequencing) je možné vyjadriť i matematicky. Podľa Giddingsa³⁰ môže postupnosť nezávislých (nekorelujúcich) módov, z ktorých každý má definovanú píkovoú kapacitu, vykazovať v prípade nekorelujúcich separačných mechanizmov znásobený efekt. Mieru nekorelovanosti retenčných údajov, alebo iných kvalitatívnych parametrov kombinovaných metód možno vyjadriť napríklad pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu alebo pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu^{31,32}. Svoju koncepciu neskôr Giddings ešte ďalej rozšíril a zovšeobecnil. Na túto tému publikoval veľmi podnetný a aj v súčasnosti aktuálny článok³², v ktorom diskutuje rozsah, premenlivosť, účinnosť a obmedzenia tzv. 2D (dvojdimenziálnych) separácií, pričom poukazuje na vzťahy a možnosti dvojrozmerných metód a im zodpovedajúcich jednorozmerných metód. Podľa neho diskretná 2D separácia využíva väčší separačný priestor ako 1D separácia, v ktorom každá zložka vzorky má presne dané svoje koordináty. Kontinuálna 2D separácia si naproti tomu vyžaduje súčasnú prítomnosť oboch separačných mechanizmov, pričom pohyb separovaných zložiek si môžeme predstaviť ako trajektórie bodov v 2D priestore. Z uvedeného je zrejme, že trajektórie namiesto diskretných bodov z predchádzajúceho prípadu zaberajú viac z potenciálne využiteľnej separačnej plochy a tak obmedzujú využiteľný separačný 2D priestor.

Najväčšiu separačnú účinnosť je možné teda dosiahnuť diskretnou kombináciou selektívnych metód, čo je v súlade so závermi práce³². Pre výber efektívnych kombinácií separačných metód Giddings navrhuje uprednostňovať voľbu vysokoúčinných, selektívnych a kompatibilných separačných procesov.

Je zrejme, že najprospernejšie pri analýze súboru iónových a iónogénnych látok v environmentálnych vzorkách a ich potenciálnych interferentov – humínových kyselín a fulvokyselín^{33,34}, bude také spojenie väčšieho počtu nezávislých meraní, ktoré sú realizované pomocou rôznych analytických techník a metód, ktoré sú vzájomne prepojené pomocou vhodného rozhrania (interface). Čím početnejší je súbor látok prítomných vo vzorke, tým účinnejšiu techniku alebo kombináciu techník potrebujeme. Táto požiadavka je výraznejšia v prípade HL, ktoré neposkytujú analytické signály s výraznými a diskretnými črtami, ale skôr ich je potrebné charakterizovať distribučnými funkciami. Z toho istého dôvodu, teda výskytu HL v zložitých zmesiach veľmi podobných molekúl a ich asociátov, obyčajne HL pokrývajú veľký separačný priestor a zvyšujú pravdepodobnosť interakcie analytu s HL koextrahovanými z tuhej alebo kvapalnej vzorky.

Definovanie kritérií pre voľbu metód vhodných na kombinovanie v analytických schémach na analýzu iónogénnych analytov popri humínových látkach

Pri uplatňovaní kritérií vo výbere vhodných kombinovateľných metód je potrebné riešiť hlavne problémy účinnosti, selektivity a vzájomnej kompatibility týchto metód, ako aj ich kompatibility s charakterom analytickej vzorky. Kompatibilitu ako vzájomnú zlučiteľnosť a tolerovanie sa kombinovaných metód z pohľadu vhodnosti separačných prostredí a operačných podmienok posudzujeme podľa toho, či sú tieto dve metódy kombinované sekvenčne, alebo simultánne. Pri sekvenčnom usporiadaní kompatibility ďalej závisí na tom, či používame spojenie on-line, alebo off-line. Najväčšie požiadavky na kompatibilitu sú pri simultánnom spojení, pretože tu prebiehajú oba procesy naraz v rovnakých podmienkach. Off-line spojenie umožňuje jednoducho včleniť prispôsobovací krok a preto je veľmi rozšírené v ľubovoľných analytických schémach a je tiež ľahko reprodukovateľné mnohými pracoviskami. Svojimi princípmi a separačnými mechanizmami sú kvapalinová chromatografia a elektroseparačné metódy (CZE, CTP, MEKC) odlišné, čo nás oprávňuje predpokladať, že efektívne spojenie HPLC a CTP umožní relatívne jednoduchými prostriedkami a časovo nenáročne riešiť mnohé problémy analýzy látok v takých prirodzených maticiach ako sú pôda, sedimenty a ich rôznorodé extrakty obsahujúce v rôznej miere popri analytoch aj humínové látky.

Svojimi princípmi a separačnými mechanizmami sú kvapalinová chromatografia a elektroseparačné metódy (ZE, ITP, MEKC) odlišné, takže že efektívne spojenie kvapalinovej chromatografie a elektroseparačii umožní riešiť mnohé problémy analýzy iónogénnych látok aj v pôdnych maticiach, kde je predpoklad interferencií nielen anorganických konštituentov pôdy, ale hlavne iónogénnych polyelektrolytov – humínových látok.

Z hľadiska kompatibility separačných prostredí HPLC aj ES využívajú vodné a zmesové rozpúšťadlá v kombinácii s vhodnými tlmivými elektrolytmí. Pre spojenie s ES je, podľa našej mienky, najvhodnejšie poradie LC metód:

- kvapalinová chromatografia na reverzných fázach (hydrofóbny efekt), relatívne nízka koncentrácia operačných elektrolytov (pH tlmiacich roztokov, iónovo-párovacích aditív a podobne),
- gélová permeačná chromatografia (delenie podľa veľkostí molekúl), relatívne nízka koncentrácia operačných elektrolytov (pH tlmiacich roztokov, indiferentných solí pre definovanie iónovej sily),
- afinitná chromatografia (stérické efekty a chemisorpcia), v niektorých prípadoch je pre desorpciu potrebná relatívne vyššia koncentrácia špecifických iónových látok a solí,
- ionomeničová chromatografia (chemisorpcia), klasická IEC pracuje s vysokými koncentraciami solí a extrémnymi hodnotami pH, iónová chromatografia IC je kompatibilnejšia, separačný mechanizmus je však založený na nábojových interakciách,
- rozdeľovacia chromatografia, práca v s vodou nemie-

šateľných rozpúšťadlových zmesiach alebo v nevodných prostrediach predstavuje obmedzenie pri on-line technikách,

- adsorpčná chromatografia, práca v nevodných prostrediach predstavuje obmedzenie pri on-line technikách.

Pri off-line spojení je možné využiť aj adsorpčnú chromatografiu (normálne fázy) a všetky predchádzajúce módy s nepolárnymi rozpúšťadlami. Obmedzenia z hľadiska niektorých ES metód (CZE, ITP) sú v podstate určované³² nutnosťou použiť prostredie ionizujúce vzorku, ale popri tom obsahujúce len takú koncentráciu balastných iónov, ktorá neznižuje (neruší) separačnú kapacitu v použitom systéme, zároveň však umožňuje delenie a neznamená detekciu použitými detektormi. Z tohto pohľadu je účelné zamerať sa aj na vývoj chromatografických metód na odsolovanie vzoriek pôdných extraktov pred ich analýzou ITP, CZE alebo ITP-CZE.

Pri kvapalinovej chromatografii je druhou zložkou separačného systému stacionárna fáza, ktorá nesmie ovplyvňovať ES systém. To znamená, že musíme používať stacionárne fázy, ktoré:

- sa nerozkladajú za produkcie iónových, alebo inak rušiacich látok (hydrolyza, bakteriálny rozklad, termický rozklad a pod.),
- zabezpečujú spolu s mobilnou fázou kvantitatívny výťažok delených látok (nesmú nevratne zadržiavať analyt, meniť jeho zloženie katalýzou, rozkladom a pod.).

V HPLC už z podstaty jej princípu pracujeme so sorbentami majúcimi veľký povrch (stovky $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), ktorý je navyše nehomogénny. V kapilárnej ITP alebo CZE sú z tohto hľadiska podmienky definované oveľa lepšie. Pracujeme vo voľnom roztoku a pritom je pomer plochy separačného priestoru ku jeho objemu malý. Znamená to, že potenciálne sorbované stopové zložky vzorky môžeme vytlačiť z povrchu separačného priestoru už malými koncentraciami vhodnej látky bez toho, aby sme výrazne ovplyvnili (na rozdiel od HPLC) selektivitu delenia. Rôzny stupeň kompatibility vykazujú aj iné časti chromatografického systému, (dávkovacie zariadenie, spojovacie elementy, detektory, prenosové zariadenie, interface pri on-line spojení). Z tohto pohľadu je najkritickejší výber detektorov, ktoré musia byť nedeštruktívne, resp. nereakčné, ak chceme detegovať a identifikovať pôvodnú látku a nie jej derivát alebo degradačný produkt. Táto požiadavka sa stáva tým naliehavejšou, čím menšie látkové množstvo, resp. koncentráciu vzorky pri spojení metód musíme analyzovať. Otázky možnosti vzájomného prepojenia kvapalinovej chromatografie a cITP už boli diskutované aj v prácach^{32,35,36}. Z predchádzajúcej časti vyplýva, že vzhľadom na odlišné fyzikálno-chemické princípy je komprehenzívne spojenie HPLC-HPLC³⁷ a HPLC s ES metódami pri analýze iónogénnych látok prítomných na stopových koncentračných úrovniach v zložitých prirodzených matriciach obsahujúcich HL celkom perspektívne^{38–42}. Navrhnutým spojením bude možné, okrem už uvedeného, zlepšiť medze dôkazu a medze stanovenia mnohých analytov pri podstatnom zrýchlení analýz⁴³. Tieto predpoklady

sa nám, vzhľadom na pokroky vo veľmi rýchlej HPLC využívajúcej monolitové⁴⁰ a nepolárne mikro-časticové krátke kolóny zdajú reálne. V oboch skupinách metód však môžu, na základe našich poznatkov^{32,38,39,43–60} a poznatkov iných autorov^{33,34,37,40–42}, významne a rôznorodo vplyvať na analýzu širokej skupiny xenobiótik vo vode, pôde a sedimentoch práve HL. Tento problém si vyžaduje na riešenie využívať veľmi rôznorodé prístupy a nástroje, napríklad systematické štúdium zmien asociačných až agregáčnych stavov molekúl (makromolekúl) HL do supramolekulových štruktúr a ich asociáciu s analytmi práve v počas vytvárania a optimalizovania metód extrakcie HL z pôdy, vody a sedimentov; metód úpravy vzorky pred jej analýzou komprehenzívnymi kombinovanými metódami analýzy v kvapalnom prostredí pomocou nových metód napríklad dynamického rozptylu laserového žiarenia kombinovaného s DAD a 3D-FLD, s kvapalinovou chromatografiou a elektroforézou v kapilárach a na čípe.

Záver

Výskum HL a ich interferenčného pôsobenia je veľmi náročný, ale aj sľubný. Vytvára popudy na iný spôsob uvažovania o súčasných problémoch chemickej analýzy a podnety na výskum separačnej a detekčnej selektivity aj za podmienok jeho aplikovania na nie presne a niekedy aj nie správne charakterizované HL. Je zrejme, že pokrok v diskutovanej oblasti je úzko spojený s našou schopnosťou kombinovať existujúce poznatky a analytické metódy do nových kombinácií, často pracujúcich za extrémnych operačných podmienok, ako je to naznačené napríklad v posledných prácach autorského kolektívu^{58–60} venovaných niektorým teoretickým a praktickým aspektom separácie HL kombinovanými metódami HPLC. Niektoré ďalšie práce sú uvedené aj v tomto zborníku

Táto práca bola finančne podporená projektami VEGA 1/1349/12 a APVV-0597-07 v rámci činnosti Centra excelentnosti VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

1. Tsai Y.-L., Olson B. H.: Appl. Environ. Microbiol. 58, 2292 (1993).
2. Young Ch. C., Burghoff R. L., Keim L. G., Minak-Bernero V., Lute J. R., Hinton S. M.: Appl. Environ. Microbiol. 59, 1972 (1993).
3. Tebbe Ch. C., Vahjen W.: Appl. Environ. Microbiol. 59, 2657 (1993).
4. Kuske Ch. R., Banton K. L., Adorada D. L., Stark P. C., Hill K. K., Jackson P. J.: Appl. Environ. Microbiol. 64, 2463 (1998).
5. Frostegard A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P.: Appl. Environ. Microbiol. 65, 5409 (1999).
6. Urata M., Uchida E., Nojiri H., Omori T., Obo R., Miyaura N., Ouchiyama N.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 2457 (2004).

7. Sutlovic D., Definis Gojanovic M., Andelinovic S.: *Croatica Chemica Acta* 80, 117 (2007).
8. Rojas-Herrera R., Narváez-Zapata J., Zamudio-Maya M., Mena-Martínez M. E.: *Mol. Biotechnol.* 40, 13 (2008).
9. Matheson C. D., Gurney C., Esau N., Lehto R.: *The Open Enzyme Inhibition Journal* 3, 38 (2010).
10. Sutlovic D., Gamulin S., Definis-Gojanovic M., Gagic D., Andjelinovic S.: *Electrophoresis* 29, 1467 (2008).
11. Baar C., d'Abbadie M., Vaisman A., Arana M. E., Hofreiter M., Woodgate R., Kunkel T. A., Holliger P.: *Nucleic Acids Res.* 2, 1 (2011).
12. Anonym: brožúra OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit, www.zymoresearch.com (stav k 20.4.2011).
13. Manahan S. E.: *Environmental Chemistry*, (6. vyd.), Lewis Publ., Boca Raton 1994.
14. Giddings J.C.: *J. Chromatogr.* 395, 19 (1987).
15. <http://www.ihss.gatech.edu> (stav ku 25. 4. 2011).
16. Jonsson J.A.: *Chromatographic Theory and Basic Principles*, Marcel Dekker, New York 1987.
17. Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen Th. P. E. M.: *Isotachopheresis*, Amsterdam 1976.
18. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis*, J. Chromatogr. Library, Vol. 52, Elsevier, Amsterdam 1992.
19. Terabe S., Otsuka K., Ando T.: *Anal.Chem.* 57, 834 (1985).
20. Novotny M., Springston S. R., Peaden P. A., Fjeldsted J.C., Lee M.L.: *Anal. Chem.* 53, 407A (1981).
21. Alfredson T., Sheehan T.: *J. Chromatogr. Sci.* 24, 473 (1986).
22. Maris F. A., Geerding R. B., Frei R.W., Brinkman U. A. Th.: *J. Chromatogr.* 323, 113 (1985).
23. Guiochon G., Gonnord M.-F., Zakaria M.: *Chromatographia* 17, 121 (1983).
24. Kaniansky D., Marák J.: *J. Chromatogr.* 498, 191 (1990).
25. Jandera P., Hájek T., Česla P.: *J. Sep. Sci. Special Issue 2D LC* 33, 1382 (2010).
26. Snyder L. R.: *J. Chromatogr. Sci.* 8, 692 (1970).
27. Snyder L. R., Kirkland J. J.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 1. vyd., str. 135. Wiley Intersci., New York 1974.
28. Jandera P., Churáček J.: *Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze*, str. 65. Academia, Praha 1984.
29. Freeman D. H.: *Anal. Chem.* 53, 2 (1981).
30. Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 39, 1027 (1967).
31. Doerffel K., Eckschlagner K.: *Optimální postup chemické analýzy*, SNTL, Praha 1985.
32. Hutta M.: *CSc. Dissertation Thesis*, PriF UK, Bratislava 1990.
33. Peña-Mendéz E.M., Havel J., Patočka J.: *J. Appl. Biomed.* 3, 13 (2005).
34. Skybová M.: *Acta Montanistica Slovaca* 11, 362 (2006).
35. Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 56, 1258A (1984).
36. Giddings J. C.: Use of Multiple Dimensions in Analytical Separations, in Cortes H. J. (ed.): *Multidimensional Chromatography*, Marcel Dekker, Chrom. Sci. Series Vol 50, New York 1990.
37. Whelan T.-J., Shalliker R. A., C. McIntyre, Wilson M. A.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 3229 (2005).
38. Kopáček P., Kaniansky D., Hejzlar J.: *J. Chromatogr.* 545, 461 (1991).
39. Nagyová I., Kaniansky D.: *J. Chromatogr. A* 916, 191 (2001).
40. Fetsch D., Fetsch M., Peña-Mendéz E. M., Havel J.: *Electrophoresis* 19, 2465 (1998).
41. Pokorná L., Pacheco M. L., Havel J.: *J. Chromatogr. A* 895, 345 (2000).
42. Peña-Mendéz E. M., Novotná K., Gajdošová D., González V., Havel J.: *Chemosphere* 68, 2047 (2007).
43. Božek P., Hutta M., Hrivnáková B.: *J. Chromatogr. A* 1084, 24 (2005).
44. Kandráč J., Hutta M., Foltin M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles*, 208, 577 (1996).
45. Halko R., Hutta M.: *Fresenius Environ. Bull.* 11, 22 (2002).
46. Hutta M., Rybár I., Chalányová M.: *J. Chromatogr. A* 959, 143 (2002).
47. Halko R., Hutta M.: *Anal. Chim. Acta* 466, 325 (2002).
48. Chalányová M., Paulechová M., Hutta M.: *J. Sep. Sci.* 29, 2149 (2006).
49. Hutta M., Chalányová M., Halko R., Góra R., Rybár I., Pajchl M., Dokupilová S.: *J. Sep. Sci.* 29, 1977 (2006).
50. Hutta M.: *Assoc. Prof. Report*, PriF UK, Bratislava 1997.
51. Halko R.: *PhD Dissertation Report*, PriF UK, Bratislava 2002.
52. Góra R.: *PhD Dissertation Report*, PriF UK, Bratislava 2005.
53. Rybár I., Góra R., Hutta M.: *J. Sep. Sci.* 18, 3164 (2007).
54. Masár M., Sydes D., Luc M., Kaniansky D., Kuss H.M.: *J. Chromatogr. A* 1216, 6252 (2009).
55. Halašiová M., Bodor R., Kaniansky D.: *Chem. Listy* 104, 464 (2010).
56. Halko R., Neuročný T., Hutta M.: *Polish J. Soil. Sci.* 12, 149 (2009).
57. Chalányová M., Hutta M., Pagáč M.: *J. Sep. Sci.* 33, 134 (2010).
58. Hutta M., Góra R., Halko R., Chalányová M.: *Analytické separačné metódy na analýzu a charakterizovanie huminových a im podobných látok*, Kartprint, Bratislava 2010.
59. Hutta M., Góra R., Halko R., Chalányová M.: *J. Chromatogr. A* 1218, 8946 (2011).
60. Góra R., Hutta M., Rohárik P.: *J. Chromatogr. A* 1220, 44 (2012).

PCDD/PCDF AND PCB CONCENTRATIONS IN RAW MILK IN THE VICINITY OF VARIOUS INCINERATORS AND METALLURGICAL PLANTS IN SLOVAKIA

JANA CHOVANCOVÁ*, KAMIL ČONKA, ANNA FABIŠIKOVÁ, MILENA DÖMÖTÖROVÁ, ZUZANA STACHOVÁ SEJÁKOVÁ, BEÁTA DROBNÁ, and ANTON KOČAN

*Department of Toxic Organic Pollutants, Slovak Medical University, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovakia
jana.chovancova@szu.sk*

Introduction

Persistent organic compounds (POPs) such as polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) which form during heat and metallurgical processes may be a significant source of increased exposure of people residing in the vicinity of polluting plants due to long-term consumption of the contaminated animal food^{1,2}.

The main PCDD/F and PCB exposure route for lactating cattle grazing is ingestion of the vegetation or soil on the pastures which are contaminated directly by deposition of airborne PCDD/Fs and PCBs from polluting plants^{1,3,4}. PCDDs/Fs/PCBs transfer and accumulate from cattle in the milk and together with dairy products is considered as one of the main contributors to POP human uptake⁴. Increased concentrations in raw milk produced in the vicinity of the potential POP emission sources were observed by many authors^{1,2,5–7}. Also in the Slovak Republic the waste and municipal incinerators as well as the metallurgical industry seem to be important emission sources with high influence on the soil, feed and food chain PCDD/F and PCB contamination. Congener-specific analyses of seventeen PCDD/F and twelve PCB congeners in cow, sheep, and goat milk gathered near polluting plants and from background area were performed in this study. The obtained data about PCDD/F and PCB levels in raw milk collected from cattle that are contaminated only via eating vegetation and soil during grazing are good indicators of environmental quality of rural areas in Slovakia.

Material and methods

Sample collection

The milk survey included samples collected in the vicinity of four areas with potential PCDD/F emission sources and one background (control) area without known atmospheric pollution source (Fig. 1).

Cow, goat and sheep raw milk samples were gathered during 2006–2007. 29 cow and goat milk samples originat-

ed directly from small family farms (SFF), 16 cow and 14 sheep milk samples were acquired from animals raised at bigger farms (BF). The cows and goats from small farms were usually kept in fenced backyards, grazed and fed with local feed. The animals from bigger farms were usually grazed on pastures and received also the supplementary fodder. The milk samples were kept frozen (–20 °C) until they were processed.

HRGC/HRMS analysis

An HP 6890 Plus GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) coupled to a MAT 95XP (ThermoFinnigan, Bremen, Germany) and a Trace GC Ultra coupled to a DFS (Thermo, Bremen, Germany) operating at a 10–% valley resolution of 10000 in the selected ion monitoring mode was used for analysis of seventeen 2,3,7,8-substituted PCDDs/PCDFs, four non-ortho and eight mono-ortho PCBs. PCDDs/Fs and non-ortho PCBs were separated on an Rtx®-Dioxin2 column (60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and a DB-5 MS column (60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) was used for mono-ortho PCBs separation. Qualitative and quantitative analyses were carried out by the USEPA 1613 and 1668 isotope dilution methods. Each analytical batch a method blank and in-house reference material (sunflower oil spiked with native PCDD/Fs and dl-PCBs) included.

All measurements were carried out in accredited laboratory (ISO/IEC 17 025) which successfully participated in interlaboratory studies (Interlaboratory Comparison on Dioxins in Food in human milk, 2006; Proficiency test on determination of PCDD/Fs and PCBs in milk fat, 2010)^{8,9}.



Fig. 1. **Samplig sites:** Krompachy (metallurgical plant recycling of copper scrap); Košice (municipal waste incinerator and iron-ore sintering in a metallurgical plant); Nemecká (hazardous waste incinerators); Šaľa (chemical factory, hazardous waste incinerator); Starina (control area)

Results and discussion

The summarized results of PCDDs, PCDFs, non-ortho and mono-ortho PCBs by type of analyzed raw milk samples are given in Table I. Because milk samples were collected during years 2006–2007, the toxic equivalent factors (TEFs) valid till the end of December 2011 (ref.¹⁰) were used for the calculation of toxic equivalents (TEQs). For comparison, also TEQ values calculated using TEFs valid from January 2012 (ref.¹¹) are quoted in the Table 1. The TEF value for 1,2,3,4,8-PeCDF decreased from 0.05 to 0.03 and for 2,3,4,7,8-PeCDF from 0.5 to 0.3. For each octachlorinated congener the new TEF value was set to 0.0003. With regard to dl-PCBs, from January 2012 the TEF values were decreased for PCB-81 as well as for each mono-ortho PCB congener to 0.00003, and for PCB-169 to 0.03 (ref.¹²). From the Table 1 it is evident that using the new TEFs, the PCDD-TEQ values are not changed for all

type of milk, TEQ values for non-ortho PCBs are slightly higher, and TEQ values for PCDFs and mono-ortho-PCBs are significantly lower in comparison with TEQs calculated using TEFs valid till December 2011.

When some congener was present in the analyzed sample at a concentration lower than its limit of detection (LOD), the LOD was used for TEQ calculation. As can be seen from the Table I, considerably higher median total WHO₁₉₉₈TEQ PCDD/PCDF/dl-PCB values were found for two types of milk samples acquired from small family breeders in comparison with milk samples collected from bigger farms. The difference in median TEQ value between milk from small family farms and bigger farm was more than four times higher. The measurements also showed only minimal differences in total WHO₁₉₉₈TEQ medians for cow and sheep milk from bigger farms. Our results also revealed that the mean and median WHO₁₉₉₈TEQ PCDF values were moderately higher than

Table I

Summary of concentrations of PCDDs, PCDFs, non-ortho PCBs, mono-ortho PCBs and sum of PCDD/Fs+dl-PCBs in all collected raw milk samples from small family farms (SFF) and bigger farms (BF)

Milk	N	Compound	pg WHO ₁₉₉₈ TEQ g ⁻¹ fat ^a			pg WHO ₂₀₀₅ TEQ g ⁻¹ fat ^b		
			Mean	Median	Min-Max	Mean	Median	Min-Max
Cow (SFF)	15	PCDDs	0.64	0.38	0.03–2.74	0.64	0.58	0.03–2.74
		PCDFs	1.53	1.28	0.26–4.06	1.05	0.85	0.17–2.85
		non-ortho PCBs	4.34	4.41	0.47–8.73	4.46	4.41	0.48–9.39
		mono-ortho PCBs	0.59	0.51	0.10–1.20	0.15	0.08	0.02–0.67
		PCDD/Fs/dl-PCBs	7.11	6.42	0.85–16.0	6.30	6.11	0.71–15.0
Cow (BF)	16	PCDDs	0.44	0.17	0.03–3.03	0.44	0.17	0.03–3.03
		PCDFs	0.90	0.40	0.21–5.37	0.63	0.27	0.14–3.89
		non-ortho PCBs	1.43	0.67	0.26–6.84	1.5	0.70	0.27–7.13
		mono-ortho PCBs	0.19	0.13	0.05–0.48	0.04	0.03	0.01–0.11
		PCDD/Fs/dl-PCBs	2.96	1.42	0.59–14.3	2.61	1.20	0.48–13.0
Sheep (BF)	14	PCDDs	0.84	0.15	0.25–4.95	0.84	0.15	0.02–4.95
		PCDFs	1.11	0.31	0.15–5.71	0.77	0.23	0.11–3.99
		non-ortho PCBs	1.90	1.05	0.29–8.63	2.06	1.12	0.31–9.26
		mono-ortho PCBs	0.16	0.15	0.04–0.31	0.02	0.02	0.01–0.04
		PCDD/Fs/dl-PCBs	4.01	1.63	0.61–19.6	3.70	1.50	0.54–18.2
Goat (SFF)	14	PCDDs	1.21	0.42	0.06–9.20	1.23	0.42	0.06–9.20
		PCDFs	2.12	0.91	0.16–10.6	1.50	0.63	0.13–7.74
		non-ortho PCBs	5.66	3.32	0.45–19.7	5.93	3.48	0.47–20.5
		mono-ortho PCBs	0.58	0.27	0.08–2.30	0.11	0.05	0.02–0.44
		PCDD/Fs/dl-PCBs	9.57	5.42	0.77–32.6	8.65	4.81	0.78–30.1

^a TEFs valid till December 31, 2011, ^b TEFs valid from January 1, 2012

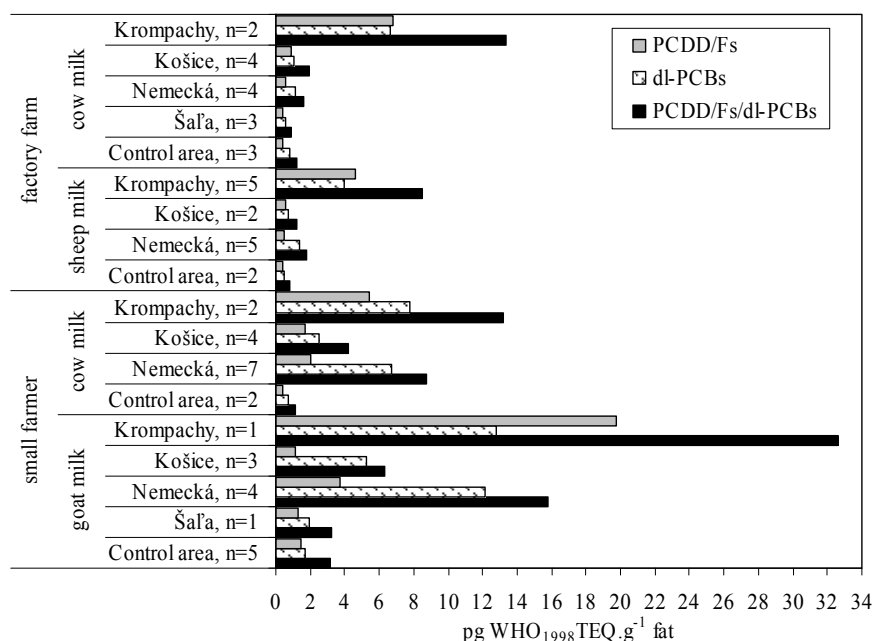


Fig. 2. PCDD/Fs, dl-PCBs and PCDD/Fs/dl-PCBs in milk samples by studied areas

WHO₁₉₉₈TEQ PCDD values in all type of milk samples. With respect to PCBs, significantly higher WHO₁₉₉₈TEQ values were observed for non-ortho PCBs in comparison with mono-ortho PCBs.

The most toxic congener 2,3,7,8-TCDD was detected in thirty from fifty nine raw milk samples. 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF and 2,3,4,6,7,8-HxCDF congeners were positively detected in more than 90% of all the samples and 1,2,3,7,8,9-HxCDF congener was present above the LOD only in two goat milk samples. Other PCDD/F congeners were detected in 10 to 65% of the samples. Regarding the congener profile the highest concentration and also the contribution to the WHO₁₉₉₈TEQ PCDD/Fs showed 2,3,4,7,8-PeCDF congener (35–84%). Dioxin-like PCB congeners except PCB-81 and PCB-123 were detected in all the samples. Congener PCB-81 was not detected in four samples and PCB-123 was not quantified due to coeluting impurities in one of them. The mono-ortho substituted congeners, PCB-118 and PCB-156 were determined at the highest concentrations, followed by PCB-105 and PCB-167. The major contributors to the total WHO₁₉₉₈TEQ dl-PCBs in our study were PCB-126 and PCB-156.

In Fig. 1 the graphical comparison of PCDD/F, dl-PCB and total PCDD/F/dl-PCB concentrations expressed as WHO₁₉₉₈TEQ by areas and by type of milk are presented. The total TEQ values in milk samples from small farms in areas with expected increased environmental con-

tamination (Krompachy, Košice, Nemecká) were significantly higher than in the control area. No difference in TEQ value was observed for goat milk from area Šaľa and control area.

With regard to cow and sheep milk from bigger farms several times higher total TEQ values showed the samples from Krompachy and Košice, moderately higher from Nemecká and slightly lower for cow milk from area Šaľa in comparison with control area without known local POP source (long-range transport only).

The maximal limit for PCDD/Fs/dl-PCBs in milk valid till December 2011 in EU countries was 6 pg g⁻¹ fat¹². The high proportion of samples above the maximal limit of PCDD/Fs/dl-PCBs showed raw cow (8 from 15) and goat milks (7 from 14) collected from small family farmers.

Milk from animals originated from these small breeders was not placed on the market and was ordinarily consumed by the farmer's family only, without official control. Regular milk consumption which exceeds the maximal limit of PCDD/Fs/dl-PCBs may cause intake considerably exceeding the tolerable intake (14 pg TEQ/week/kg body weight or 70 pg TEQ/month/kg body weight).

We found surprising levels above maximal limits (2–4 times higher) also in cow and sheep milk from bigger farm situated in Krompachy area where metallurgical plant recycling copper scrap is located. It is needed to emphasise that all of the analysed milk samples were gathered in the

areas with supposed PCDD/F source. For consumer's health protection, milk must not exceed the value of 3 pg TEQ.g⁻¹ fat till December 2011 for PCDD/Fs (ref.¹²). The action limit (AL) for raw milk is 2 pg TEQ.g⁻¹ fat for PCDD/Fs and the same AL is also for dl-PCBs (ref.¹³). The results in this study showed that the PCDD/F action threshold was exceeded in fourteen milk samples and in twenty three milk samples for dl-PCBs.

Our measurements revealed that dl-PCBs contributed to the total TEQ with higher proportion than PCDD/Fs. It is caused by increased environmental contamination of Slovakia by PCBs due to their past production and intensive usage in our country. Also for this reason, the TEQ dl-PCB levels in milk samples of Slovakia are in general higher in comparison with other European countries.

The PCDD/F levels in united group of cow milk from Slovakia are higher than in milk from Spain¹⁴, Turkey¹⁵ and France¹⁶, and moderately lower than those published by Abad et al.¹⁷ for milk from Italy. Ingelido et al.¹⁸ detected in cow milk samples in farms under impact from incinerators lower levels than in our study for milk from factory farms in areas with assumed environmental pollution. Regarding TEQ levels in ship milk, our results are higher than those published for milk from Italy¹⁸.

This study was aimed on the impact of selected PCDD/F and PCB sources on environmental contamination and the transfer of these pollutants into cow, sheep and goat milk. The main exposure route of cows, sheep and goats to PCDD/Fs and PCBs is generally through grass. Our results unambiguously point out that many of analyzed raw milk samples from chiefly small breeders exceeded ML EU legislation for PCDD/Fs/dl-PCBs. The highest levels were observed in milk samples from area Krompachy. This contributes to the presumption that metallurgical industry (production of secondary copper) situated close this area could be one of the most important sources of PCDD/F contamination of feed and food chain and also is the significant source of exposure of general population residing in this area. In addition, the local domestic combustion of fossil fuels used to heat family houses may also substantially contribute to the total PCDD/Fs/PCBs emissions in villages of this area mainly in winter months.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-21-004205. The authors would like to thank Mrs. Jarmila Pauliková and Mrs. Jarmila Salajová for their skilled technical assistance.

REFERENCES

- Liem A. K. D., Hoogerbrugge R., Kootstra P. R., van der Velde E. G., de Jong A. P. J. M.: *Chemosphere* 23, 1675 (1991).
- Ramos L., Eljarrat E., Hernandez L. M., Alonso L., Rivera J., Gonzalez M. J.: *Chemosphere* 35, 2167 (1997).
- Fürst P., Krause G. H. M., Hein D., Delschen T., Wilmers K.: *Chemosphere* 27, 1349 (1993).
- Fries G. F.: *Sci. Total Environ.* 185, 93 (1996).
- Hippelein M., Kaupp H., Dorr G., Hutzinger O.: *Chemosphere* 32, 1617 (1996).
- Alcock R. E., Sweetman A. J., Anderson D. R., Fisher R., Jennings R. A., Jones K. C.: *Chemosphere* 46, 383 (2002).
- Esposito M., Cavallo S., D'Ambrosio R., Gallo P., Colarusso G., Pellicano R., Baldi L., Guarino A., Serpe L.: *Chemosphere* 77, 1212 (2009).
- Interlaboratory Comparison on Dioxins in Food 2006. Seventh Round and International Study. Rapport 2006:7. ISSN 1503-1403.
- Proficiency Test on Determination of PCDD/Fs and PCBs in Animal Fat, July-October 2010. Report PCDD/Fs and PCBs, 15 March 2011. European reference Laboratory Dioxins and PCBs. 8 p.
- van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A. T. C., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S. W., Kubiak T., Larsen J. C., van Leeuwen F. X. R., Liem A. K. D., Nolt C., Peterson R. E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T.: *Environ. Health Perspect.* 106, 775 (1998).
- COMMISSION REGULATION (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Recommendation of 6 February 2006 on the reduction of the presence of dioxins, furans and PCBs in feedingstuffs and foodstuffs (2006/88/EC).
- Abad E., Llerena J. J., Saul J., Caixach J., Rivera J.: *Chemosphere* 46, 1435 (2002).
- Aslan S., Korucu M. K., Karademir A., Durmusoglu E.: *Chemosphere* 80, 1213 (2010).
- Diletti G., Torreti L., De Massis M. R., Migliorati G., Scortichini G.: *Organohalogen Compounds* 64, 1 (2003).
- Durand B., Dufour B., Fraisse D., Defour S., Duhem K., Le-Barillec K.: *Chemosphere* 70, 689 (2008).
- Ingelido A. M., Abballe A., di Domenico A., Fochi I., Iacovella N., Saragosa A., Spagnesi M., Valentini S., De Felip E.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 397 (2009).

MEDICÍNSKE LABORATÓRIÁ A SYSTÉMY MANAŽERSTVA KVALITY

KATARÍNA JURÍKOVÁ

*Slovenská národná akreditačná služba, Karloveská 63,
840 00 Bratislava 4, Slovensko
katarina.jurikova@sneas.gov.sk*

V súčasnosti je na Slovensku akreditovaných 26 medicínskych laboratórií (ML), ktoré si zaviedli systém manažerstva voliteľne podľa dvoch medzinárodných noriem: ISO/IEC 17025: 2005 a ISO 15189: 2007. Aj keď pre medicínske laboratóriá je špecifickejšia ISO 15189: 2007, obidve normy majú v zmysle medzinárodných dohôd rovnocenné postavenie a sú rovnako uznávané multilaterálnymi dohodami.

Zavedenie systému manažerstva kladie požiadavky na manažment aj na odbornú činnosť pracoviska. V prípade, ak laboratórium nie je samostatný právny subjekt, iniciatíva a činnosť manažmentu laboratória musí mať oporu a podporu manažmentu organizácie, ktorej je súčasťou. Ak tomu tak nie je, plnenie viacerých požiadaviek na manažment sa stáva formálnou záležitosťou, v niektorých prípadoch vedie k pasivite manažmentu laboratória a zostáva viac-menej otázkou šťastia, ak manažment organizácie pri riadení činnosti medicínskeho laboratória berie do úvahy ekonomické aj kvalitatívne kritériá vyvážené. Napriek tomu, že zavedenie a udržiavanie systému manažerstva kvality (SMK) znamená dosť veľkú časovú záťaž, manažment ML musí informovať a zapojiť všetkých relevantných pracovníkov, informovať ich o svojich cieľoch, politike a stratégii a konkretizovať zodpovednosti a právomoci jednotlivých funkcií. Ide o dôležitú požiadavku a predpoklad na to, aby celý systém bol funkčný a efektívny.

Všetka dokumentácia používaná v laboratóriu z externých zdrojov aj interne vytvorená sa stáva riadenou a musí mať náležitosti, ktoré sú v akreditačných normách jednoznačne uvedené. Okrem originálnych návodov a manuálov sa môžu v laboratóriu používať aj skrátené postupy a /alebo návody, ktoré však musia byť preskúmané a schválené. Táto požiadavka sa týka aj rôznych návodov a postupov, ktoré niekedy bývajú umiestnené v laboratóriách na stenách napr. pri zariadeniach. Ak ML uzatvára zmluvy, tieto musia byť pred ich podpísaním preskúmané a ML o ich preskúmaní musí mať záznam. Laboratórium musí mať vypracovanú politiku a postupy na preskúmanie, musia sa viesť záznamy o prípadných zmenách dohodnutých podmienok a ich opätovnom preskúmaní, musí sa preskúmať aj práca zadávaná subdodávateľsky alebo spolupracujúcemu laboratóriu.

Patologické, histopatologické a príbuzné laboratóriá majú mať rutinne zavedenú prax pre získavanie druhého názoru. V tejto súvislosti majú mať spracovaný postup na hodnotenie a výber spolupracujúcich laboratórií

a konzultantov, majú mať dohodnuté podmienky spolupráce a viesť záznamy o preskúmaníach dohodnutých podmienok spolupráce.

K nástrojom na zlepšovanie kvality ML patrí aj preventívna činnosť, ktorá má byť nielen plánovaná a zdokumentovaná, ale aj monitorovaná a kontrolovaná spôsobom, ktorý preukazuje účinnosť vykonaných preventívnych činností. Laboratóriá vykonávajú internú kontrolu kvality a zúčastňujú sa aj externého hodnotenia kvality, ale stáva sa, že na základe zaznamenaných údajov neanalyzujú trendy a riziká a nevykonávajú nápravné opatrenia.

ML má mať vypracovaný plán činností, ktorý obsahuje všetky postupy a nástroje aplikované v laboratóriu na zlepšenie, medzi ktoré patria napr. aj indikátory kvality. Relatívne dlhé obdobie sa očakávalo, že ich pre ML určí regulátor. Ich definovanie však zostalo na rozhodnutí manažmentu ML, ktorý ich musí pravidelne hodnotiť a flexibilne prispôbovať tak, aby bolo možné konštatovať trvalé zlepšovanie činnosti ML.

Pokiaľ ide o pracovníkov, ISO 15189 požaduje, aby riaditeľ alebo jeho zástupca definoval štandardy výkonov a zabezpečil ich následné monitorovanie; aby laboratórium malo dostatok kvalifikovaných pracovníkov s vhodným a dokumentovaným vzdelaním, praxou a skúsenosťami. Laboratórium musí mať vypracovaný priebežný vzdelávací program s konkrétnymi údajmi o plánovaných vzdelávacích činnostiach, ktorý je dostupný pre pracovníkov na všetkých úrovniach.

Medicínske laboratórium aj v prípade, že nevykonáva odbery vzoriek, je zodpovedné za sledovanie času a podmienok transportu vzoriek. V záujme vlastnej ochrany ML musí mať záznamy preukazujúce, kedy bola vzorka odobraná – dátum a čas odberu, aj záznamy dokazujúce, kedy (dátum a čas) bola vzorka prijatá do laboratória. Ak má laboratórium viaceré zberné miesta, a vyšetrenia sa vykonávajú v centrálnom laboratóriu, zo záznamov sa musí dať jednoznačne zistiť, kedy boli vzorky na zberných miestach prijaté a prípadne spracované a kedy boli v laboratóriu vyšetrené. Ak ide o vzorky citlivé na teplotu, laboratórium musí pri prijímaní sledovať a zaznamenávať teplotu transportu. Na túto činnosť je postačujúce, ak sa používajú pracovné meradlá. Usporiadanie priestorov a podmienky prostredia laboratória musia byť vhodné pre vykonávanú činnosť, ale musí sa pamätať aj na to, že má byť pohodlné a bezpečné aj pre pracovníkov.

Požiadavku, aby laboratórium malo spracovaný zoznam svojich vyšetrovacích postupov obsahujúci aj požiadavky na primárne vzorky, laboratóriá plnia publikovaním v laboratórnej príručke a/alebo na svojej webovej stránke. Všetky používané vyšetrovacie postupy musia byť validované. Laboratórium musí mať k dispozícii validačné charakteristiky zvolené podľa účelu použitia vyšetrenia a musí vedieť preukázať, že pred tým, ako sa začal postup

rutinne používať, bol preskúmaný a potvrdilo sa, že dosahuje deklarované validačné parametre a postup používa správne. Všetky postupy sa pravidelne, najmenej raz ročne majú preskúmať s vyhotovením záznamu o preskúmaní a závere. Pravidelne sa musí kontrolovať aj vhodnosť biologických referenčných intervalov. Podnetom má byť napr. zmena vyšetrovacieho postupu, zmena zariadenia, zmena postupu pred vyšetrením.

Oznamovanie výsledkov na Výsledkových listoch má spĺňať požiadavky uvedené v normách: okrem výsledkov, v SI jednotkách alebo v nadväzných jednotkách – ak je relevantné, laboratóriá môžu uvádzať aj poznámky a komentáre, ako aj interpretáciu výsledkov, pričom má byť jasne uvedené, že ide o interpretáciu a ak má laboratórium zavedný systém manažérstva kvality podľa ISO/IEC 17025, interpretácie musia byť zreteľne označené. Na výsledkovom liste musí byť uvedené aj meno, funkcia a podpis schvaľujúcej osoby alebo aj identifikácia osoby, ktorá schvaľuje uvoľnenie Správy (ISO 15189).

Okrem všetkých normami požadovaných informácií v prípade akreditovaného pracoviska Výsledkový list musí obsahovať informáciu o tomto statuse: akreditačnú značku, ktorá má predpísané náležitosti a podmienky používania publikované v MSA 02. Výsledkový list môže obsahovať iba slovný odkaz na akreditáciu.

Aj keď kapitola Etika v laboratórnej medicíne je označená ako informatívna príloha normy ISO 15189 a to z dôvodu, že nejde o plnenie akreditačných požiadaviek, všetci pracovníci medicínskeho laboratória sú viazaní etickým kódexom svojej profesie. Základným princípom zdravotníckej etiky má byť dobrá a nediskriminatívna starostlivosť o pacienta. Podobne vzhľadom na skutočnosť, že laboratórny informačný systém (LIS) je používaný ako veľmi dôležitý pracovný nástroj, norma ISO 15189 obsahuje aj Odporúčania na ochranu LIS ako informatívnu prílohu.

Na záver je vhodné uviesť, že posudzovanie zhody treťou nezávislou stranou, ktorou je národný akreditačný orgán, na Slovensku SNAS, je v súčasnosti podporené platnou legislatívou. Ide o Nariadenie EP a Rady 765/2008 ako aj o zákon 505/2010 Z.z. O akreditácii. V nedávnej súčasnosti bol publikovaný dokument EA 2/13, na základe ktorého začala EÚ používať kooperáciu s európskou akreditáciou v regulovanej oblasti. Takto nasmerovanému trendu hodnotenia a posudzovania kvality sa nevyhnú ani medicínske laboratóriá na Slovensku.

ODHAD NEISTOTY VÝSLEDKOV MERANIA VYPLÝVAJÚCI Z ODBERU VZORKY

JOSEF KALAŠ

josef.kalas.post@gmail.com

O skutočnosti, že odber vzoriek má na výsledky meraní značný vplyv, často o veľa významnejší ako použitá analytická metóda, nikto asi nepochybuje. Trochu zložitejším problémom však zrejme bolo a je kvantitatívne vyjadrenie odhadu neistoty vyplývajúcej z odberu vzorky. Na odber vzoriek rôznych komodít existuje značné množstvo štandardizovaných alebo legislatívne predpísaných postupov a vzorkovacích plánov. Žiaľ, tieto postupy sa nezaoberajú neistotami. O tie sa zaujímajú a s nimi pracujú iní ľudia, väčšinou zameraní na laboratórnu činnosť. Ďalším problémom bolo, že až do roku 2007 nebol k dispozícii žiaden návod alebo pokyn, ako tieto neistoty reálne stanoviť. Až v tomto roku vydal EURACHEM v spolupráci s EUROLAB, CITAC, Nordtest a UK RSC Analytical Methods Committee dokument „Neistota merania vyplývajúca z odberu vzoriek. Pokyny na metódy a prístupy“¹. Tento pomerne rozsiahly dokument je určený špecialistom, ktorí sa zaoberajú problematikou vzorkovania alebo odhadmi neistôt merania vo vzťahu k vzorkovanému objektu („sampling target“). Je zameraný na stanovenie neistoty týkajúcej sa zmesnej vzorky („composite sample“) ovplyvnenej všetkými krokmi odberu, úpravy a prípravy vzorky. Uvádza dva hlavné prístupy:

- empirický – na základe opakovaného odberu vzoriek,
- modelový – na základe identifikácie a sumácie každého kroku od vlastného odberu cez úpravu vzorky až po prípravu nej vzorky a analýzu.

Oba prístupy sa považujú za rovnocenné a môžu sa vzájomne dopĺňať. Okrem výkladu ako stanoviť neistoty, sa tento document zaoberá relatívne dôkladne aj terminológiou, validáciou vzorkovania, zabezpečením kontroly kvality vzorkovania, porovnaním odberu vzoriek a ich analýz z hľadiska finančných nákladov, voľbou najúčelnejšieho prístupu ku vzorkovaniu a analýze (fitness for purpose) a v prílohách uvádza aj názorné riešenia stanovenej neistoty v šiestich príkladoch z praxe.

Následne bolo vydaných niekoľko ďalších dokumentov zameraných na túto problematiku, z ktorých

k najzaujímavejším patria technické správy EUROLAB², NORDEN³, AMC⁴, ako aj EURACHEM^{5,6}.

Zavedenie odhadov neistôt výsledkov merania vyplývajúcich z odberu vzoriek do reálnej praxe však zrejme prinesie aj niektoré otázky a možno aj problémové situácie. Napríklad, v akom vzťahu bude preberanie dávky alebo dodávky štatistickou prebierkou tovaru meraním podľa ISO 3951, kde sa s neistotami merania neuvažuje, k prípadne stanovenej neistote výsledku merania spôsobenej odberom? Pri zavedení rozšírenia neistôt výsledkov merania o vplyv odberu vzoriek bude zrejme potrebné zamyslieť sa aj nad jednotným a jednoznačným vyhodnocovaním prekročenia limitov a príslušne poučiť zainteresované strany. Bude zrejme potrebné doriešiť aj niektoré ďalšie problémy súvisiace napríklad s akreditáciou:

- ak bude akreditované skúšobné laboratórium preberať vzorky od akreditovaného inšpekčného orgánu (akreditácia vzorkovania) alebo neakreditovaného orgánu – akým spôsobom bude možné preberať stanovené neistoty vzorkovania?
- ako uvádzať celkovú neistotu merania (vyplývajúcu z odberu ako aj z úpravy vzorky a analýzy), ak je skúšobné laboratórium akreditované iba na skúšanie?
- kto zabezpečí školenia na jednotnú aplikáciu pokynov EURACHEM?

Ďalšou komplikáciou je skutočnosť, že v ostatnom čase došlo vo svete k určitému posunu v definíciách metrologických termínov v oblasti merania, čo sa prejavilo napríklad v 3. vydaní Medzinárodného metrologického slovníka – Základné a všeobecné koncepcie a súvisiace pojmy (VIM 3)⁷. Reakcie na túto skutočnosť je možné nájsť v odborných terminologických materiáloch napr. AMC⁸, EURACHEM⁹, v metrologickej terminológii vydanej SEKK, spol. s r.o., a EURACHEM ČR¹⁰ a v STN 01 0115:2011. Tabuľka I dokumentuje, že tento posun sa nie je vždy rovnako prekladá do národných jazykov, čo vedie k rozdielnej českej a slovenskej terminológii v tejto oblasti.

Na základe uvedeného bude pravdepodobne potrebné vážne sa zamyslieť nad:

- užitočnosťou jednoznačných a jednotných prekladov metrologickej terminológie v češtine a slovenčine,
- vhodným usmernením akreditovaných subjektov pri

Tabuľka I

Vybrané „citlivé“ termíny, ktorými sa líšia česká a slovenská terminológia

VIM 3	EURACHEM ČR	STN 01 0115:2011
Measurement trueness	Pravdivost měření	Pravdivosť merania
Measurement accuracy	Přesnost měření	Správnosť merania
Measurement precision	Preciznost měření	Presnosť merania
Measurement bias	Vychýlení měření	chyba termín

- využívání a oznamování neistôt výsledkov merania vyplývajúcich z odberu vzoriek,
- zväžením jednotného postupu pri používaní neistôt výsledkov meraní rozšírených o vplyv odberu vzoriek pri posudzovaní reálnych vzorkovaných objektov.

LITERATÚRA

1. EURACHEM/CITAC: *Measurement uncertainty arising from sampling. A guide to methods and approaches*, EURACHEM/CITAC, 2007. www.eurachem.org.
2. EUROLAB Technical Report No. 1: *Measurement uncertainty revisited. Alternative approaches to uncertainty evaluation*, EUROLAB, 2007.
3. NORDEN – Nordic Innovation Centre – NT Technical report TR604: *Uncertainty from sampling – a nordtest handbook for sampling planners on sampling quality assurance and uncertainty estimation based upon the Eurachem international guide „Estimation of measurement uncertainty arising from sampling”, approved 2007 – 06.*
4. AMC Technical briefs: *Measurement uncertainty arising from sampling: the new EURACHEM guide*, AMCTB No. 31, 31 July 2008.
5. Vilímeč J.: *Nejistota vzorkování jako součást nejistoty měření*, Zpravodaj EURACHEM ČR, číslo 43, únor 2009.
6. Kořínek P.: *Odhad nejistoty měření vyplývající z odběru vzorku*, Zpravodaj EURACHEM ČR, číslo 38, červen 2007.
7. *International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM)*, 3rd ed., Bureau International des Poids et Mesures, Geneva, 2008. www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html.
8. AMC Technical briefs: *Terminology – the key to understanding analytical science, Part 2: Sampling and sample preparation*. AMCTB No. 19, 19 March 2005.
9. Bernát P., Kohout P., Plzák Z., Vencelides Z., Vilímeč J.: *Terminologie vzorkování*, Metodický list 4, EURACHEM ČR, 2010.
10. *Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři*, SEKK, spol. s r.o., a EURACHEM ČR, 2009.

VODA OVPLYVNILA MOJE CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENIE?!

PETRA KOTIANOVÁ* a ZUZANA CEJPKOVÁ

Merck, spol. s r.o., Na Hřebenech II, 1718/10, 140 00 Praha 4, Česká republika
petra.kotianova@merckgroup.com

Úvod

HPLC je jednou z najbežnejšie používaných analytických metód súčasnosti. Uplatnenie tejto metódy je veľmi rozsiahle. Stretáme sa s ňou vo farmácii, potravinárstve, environmentálnej, forenznnej, klinickej analýze, vo výskume na akademických pracoviskách atď. Pre plné využitie výhod HPLC a od nej odvodených techník ako LC-MS a UHPLC je nevyhnutné mať k dispozícii rozpúšťadlá a činidlá, ktoré spĺňajú najvyššie štandardy kvality.

Mobilnou fázou pri HPLC na reverzných fázach je zmes vody (100% voda, voda s prídavkom modifikátora, alebo pufor) a organické rozpúšťadlo. K dispozícii sú viaceré typy alebo stupne čistoty rozpúšťadiel balených vo fľašiach pre HPLC, LC-MS, UHPLC-MS. Kvalita jednotlivých výrobkov sa ťažko porovnáva na základe certifikátov o analýze, pretože každý výrobca sleduje iba vybrané parametre. Metodika a inštrumentácia na stanovenie toho ktorého parametra môže byť rôzna. Navyše niektoré parametre dôležité pre daný typ analýzy nemusia byť vôbec sledované. V prípade vody pre chromatografické účely to býva napr. obsah TOC.

Spôľahlivým zdrojom vody je ultračistá voda z účinného purifikačného systému. Moderné laboratórne zariadenia majú v podstate modulárny charakter, a tak si možno zvoliť kombináciu purifikačných krokov pre získanie vody s vyhovujúcou kvalitou pre daný analytický účel. Okrem množstva možností purifikačných krokov od predčistenia, cez purifikáciu, po konečné dočistenie na filtroch si je možné pri zariadeniach Merck Millipore zvoliť také usporiadanie, ktoré nebude zaberat' inak využiteľný priestor na laboratórnom stole. Výhodou prípravy vody priamo v laboratóriu je jej čerstvosť a on-line kontrola dôležitých parametrov ultračistej vody opúšťajúcej purifikačné zariadenie.

Kontaminanty vody a spôsoby ich odstránenia

Voda môže byť kontaminovaná:

- iónmi,
- organickými látkami,
- tuhými časticami,
- koloidmi,
- baktériami,
- rozpustenými plynmi.

Prítomnosť kontaminantov môže spôsobovať upchatie fritiek, zanášanie pórov kolóny, akumuláciu organických látok na kolóne, a tým dochádza k zníženiu separačnej účinnosti kolóny, zvýšeniu základnej línie, prítomnosti neočakávaných pík. Môže prísť k ovplyvneniu LOD, LOQ, ovplyvneniu signálu detektora a v dôsledku toho aj k nesprávnemu vyhodnoteniu chromatografického záznamu.

Metódy na odstránenie kontaminantov zahŕňajú: jednoduchú a viacnásobnú destiláciu, deionizáciu na iónomerničoch, elektrodeionizáciu, reverznú osmózu, fotooxidáciu, zachytávanie nečistôt na aktívnom uhlí, či ďalších špeciálnych filtroch. Každá z týchto technológií úpravy vody je inak účinná pre odstránenie vymenovaných druhov kontaminantov, a preto purifikačné systémy Merck Millipore využívajú kombináciu viacerých princípov pre získanie ultračistej vody (voda typu 1) z pitnej vodovodnej vody.

Parametre vody pre chromatografiu

O kvalite vody pre analytické účely pojednáva norma STN EN ISO 3696¹: Kvalita vody na analytické účely. Špecifikácia a skúšobné metódy (ISO 3696:1987), podľa

Tabuľka I

Parametre kvality vody – 1. stupeň kvality podľa STN EN ISO 3696 (cit.¹) a Merck Millipore

STN EN ISO 3696	
Parameter	1. stupeň kvality
hodnota pH (25 °C)	nemeria sa
konduktivita, mS/m (25 °C), max.	0,01
oxidovateľné látky, kyslík (O) mg/L, max.	nemeria sa
absorbancia pri 254 nm v kvete s optickou dĺžkou 1 cm, absorbancia, max.	0,001
odparok pri 110 °C, mg/kg, max.	nemeria sa
oxid kremičitý, mg/L, max.	0,01
Merck Millipore	
Kontaminant	typ 1
rezistivita, MΩ.cm *	> 18
TOC, ppb	< 10
pyrogény, Eu/mL	< 0,003
častice > 0,2 μm	< 1
kremík, ppb	< 10
baktérie, cfu/mL	< 1

* rezistivita 18 MΩ.cm odpovedá konduktivitě 0,055 μS/cm, t.j. 0,0055 mS/m

ktorej rozoznávame tri stupne kvality vody. Pre chromatografické účely je vhodná voda 1. stupňa kvality (najvyšší stupeň čistoty), ktorá má byť bez rozpustených alebo koloidných anorganických a organických nečistôt a vyhovuje prísny analytickým požiadavkám. Získava sa ďalšou úpravou vody 2. stupňa kvality.

Stupne kvality laboratórnej vody sú definované príslušnými legislatívnymi a profesnými autoritami, a teda celosvetovo sa môžeme stretnúť s rôznymi definíciami čistoty vody, kritériami a metódami na jej posudzovanie. Merck Millipore posudzuje kvalitu vody na základe prítomnosti sledovaných kontaminantov. Rozdeľuje kvalitu vody do troch skupín s tým, že najvyšší stupeň čistoty označuje ako typ 1. Porovnanie požadovaných parametrov podľa STN EN ISO 3696 a Merck Millipore pre najvyšší stupeň kvality/čistoty vody sú uvedené v tab. I.

Zariadenie vhodné na prípravu ultračistej vody pre HPLC

Z vyššie uvedeného je zrejmé, že iba použitím viacerých krokov purifikácie a kombináciou viacerých technológií je možné získať z pitnej vody ako vstupnej suroviny ultračistú vodu, vodu typu 1, vhodnú pre chromatografické účely. V prvom kroku, predúprave, dochádza k odstráneniu 95–99 % kontaminantov pôvodne prítomných vo vode. V následnom čistiacom kroku sú odstránené zvyšky kontaminantov. Jednotlivé techniky úpravy vody musia byť v týchto krokoch zoradené v optimálnom poradí, aby bola zabezpečená výroba vody najvyššej čistoty.

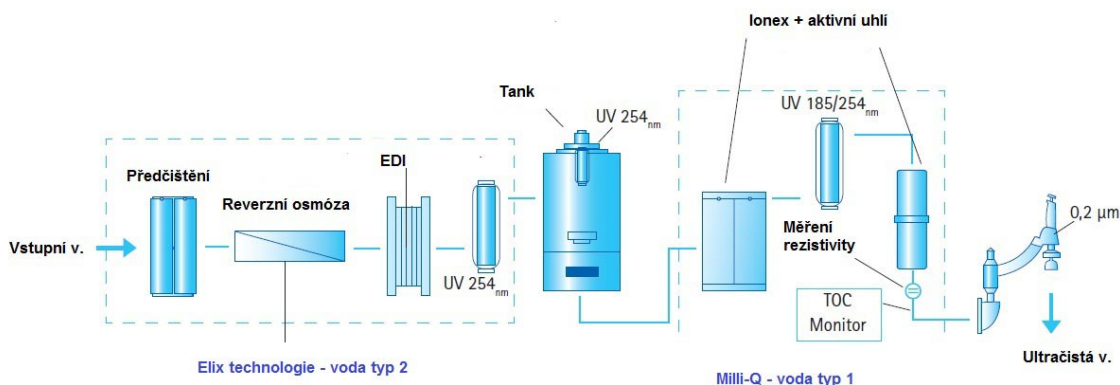
Voda typu 1 by sa mala používať vždy čerstvá, aby bolo zaručené, že parametre sa od odberu ultračistej vody z purifikačného zariadenia po jej použitie nezmenia. Príklad usporiadania systému Merck Millipore určeného na výrobu ultračistej vody pre chromatografické účely², ktoré rešpektuje túto zásadu je na obr. 1. K predúprave dochádza

v zariadení Elix[®], ktoré využíva filtráciu, reverznú osmózu, elektrodeionizáciu a foto-oxidáciu na prípravu vody typu 2 z pitnej vodovodnej vody. Voda je zbieraná v zásobníku, odkiaľ v momente potreby vody odchádza na čistiaci krok. Voda skladovaná v zásobníku v určitých intervaloch medzi odbermi recirkuluje, aby sa obmedzili možné nepriaznivé vplyvy pri jej dlhodobjšom skladovaní v zásobníku. Čistiaci krok v zariadení Milli-Q[®] pozostáva z deionizácie, foto-oxidácie, prečistení na aktívnom uhlí a záverečnej filtrácie.

Možností usporiadania systému je niekoľko. Spomínané usporiadanie dvoch zariadení za sebou má pre užívateľa výhodu aj v tom, že spája zariadenie na výrobu vody nižšej kvality, používanú napr. na umývanie skla, alebo



Obr. 2. Jedna z možností priestorového usporiadania purifikačného systému Milli-Q[®] Integral



Obr. 1. Schéma zariadenia na prípravu ultračistej vody vhodnej pre HPLC

prípravu pufrů (vyžaduje sa typ 2) so zariadením na výrobu ultračistej vody pre chromatografické účely. Pri dostatočnom objeme zásobníka a kapacite zariadení je teda možné pokryť potrebu na vodu pre všetky účely laboratória. V prípade, že má užívateľ k dispozícii zariadenie na výrobu vody typu 3 alebo 2, umožňuje jeho rozšírenie na výrobu vody pre chromatografické účely. V súčasnosti sú dostupné aj zariadenia, ktoré spájajú tieto dve do jedného. V roku 2008 bol uvedený na trh systém Milli-Q® Integral³. Kapacita výroby vody typu 1, resp. 2 (podľa miesta odberu) je u jednotlivých modelov 70, 120, 240, alebo až 320 L, pri produkcii ultračistej vody prietokom od 0,05 do 2 L/min. Samotné zariadenie a aj zásobník môžu byť pod laboratórnym stolom, či uchytené na stene. Takto môže byť tento moderný purifikačný systém umiestnený aj v menších laboratóriách, kde nezaberá priestor na pracovnom stole (obr. 2).

Záver

Kvalita rozpúšťadiel je jedným z kritických parametrov pri HPLC, nakoľko ovplyvňuje analytické stanovenie. Jednou zo zložiek mobilnej fázy pri RP-HPLC je voda, ktorú je potrebné používať rovnako ako ktorékoľvek iné rozpúšťadlo v príslušnej kvalite, zbavenú kontaminantov.

Pri UHPLC a LC-MS sa otázka kvality vody ako rozpúšťadla stáva ešte významnejšou. Vodu vyhovujúcej kvality pre chromatografické účely možno pripraviť účinným purifikačným zariadením priamo v laboratóriu. Výhodou je možnosť vybrať si systém, ktorý produkuje vodu najlepšie vyhovujúcu konkrétnym požiadavkám, možnosť kontroly dôležitých parametrov, čerstvosť pripraveného rozpúšťadla. Na jednej strane existujú systémy, ktoré z predupravenej vody (typ 2, 3) vyrábajú ultračistú vodu (typ 1). Na druhej strane zariadenia ako Milli-Q® Integral, ktoré dokážu z pitnej vodovodnej vody vyrobiť ultračistú vodu a zároveň variabilitou usporiadania rešpektovať náročné požiadavky užívateľa na priestorové usporiadanie laboratória.

LITERATÚRA

1. STN EN ISO 3696: Kvalita vody na analytické účely. Špecifikácia a skúšobné metódy (ISO 3696:1987).
2. Tarun M., Mabic S.: A practical guide to the effects of water purity on HPLC, LC-MS and related techniques, Millipore Corporation, Lit. No. PB1042EN00 (2011).
3. Milli-Q® Integral system. Integrated pure and ultrapure water. Lit. No. PB10008EN00, EMD Millipore (2012).

VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

TOMÁŠ KRÍŽEK^{a,*}, VERONIKA DOUBNEROVÁ^b, HELENA RYŠLAVÁ^b a PAVEL COUFAL^a

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2,

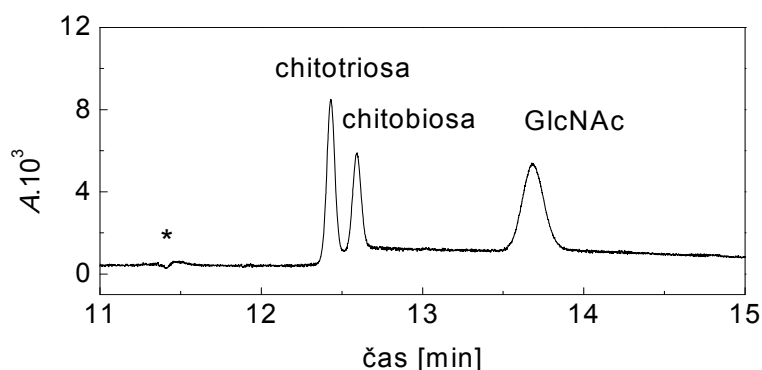
^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Česká republika
krizek@natur.cuni.cz

Stanovení aktivity enzymů je významným zdrojem informací pro základní i aplikovaný výzkum v oboru biochemie a molekulární biologie. Díky tomu, že i malé změny v aktivitě enzymů mohou vést k vážným poruchám metabolismu, růstu nebo reprodukce, má stanovení aktivity enzymů velký význam také v medicíně. Spolehlivé metody stanovení enzymové aktivity mohou být následně využity ke včasné diagnóze řady závažných onemocnění, jako jsou rakovina močového měchýře¹ a slinivky břišní², nebo Gaucherova choroba³.

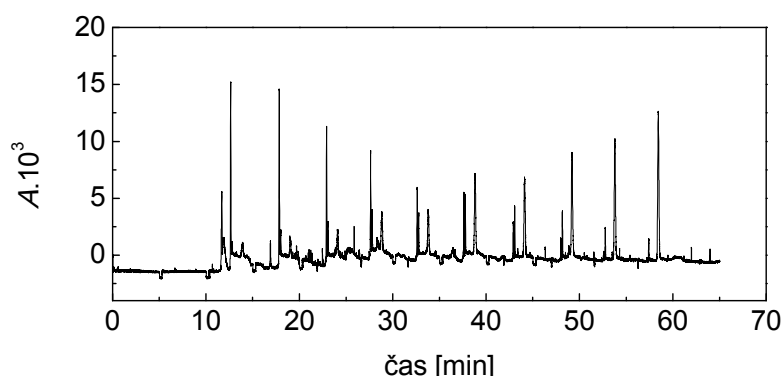
Pro stanovení enzymové aktivity se v praxi nejčastěji používá absorpční nebo fluorescenční spektrometrie ve viditelné a UV oblasti spektra. Pro tyto metody existují komerční čtečky schopné zpracovat až 1536 vzorků v jednom běhu. Spektrometrický přístup je výhodný hlavně díky své jednoduchosti a rychlosti. Na druhé straně je takto možné stanovit pouze aktivitu enzymů, jejichž substráty a produkty se výrazně liší svými spektrometrickými vlastnostmi, tak aby bylo možné obě látky v reakční směsi od sebe odlišit. Pokud je však, jako je tomu v této práci, substrátem oligomer a enzym jej štěpí na monomery, jsou rozdíly v absorpci i fluorescenci mezi oběma látkami minimální. V takovém případě existují dvě možná

řešení. Jedním z nich je využití, takzvaného chromo- nebo fluorogenního substrátu, tedy látky, která je podobná substrátu, jeden z produktů jejího štěpení však absorbuje záření nebo fluoreskuje. Nevýhodou tohoto postupu je fakt, že pracuje s nepřírodným substrátem a aktivita enzymu vůči němu se může lišit od aktivity vůči substrátu přirozenému. Pokud chceme mít jistotu, kterou poskytuje práce se skutečným přírodním substrátem, musíme sáhnout po jiné analytické metodě. V takovém případě se jako výhodné jeví separační metody, které jsou schopny rozlišit látky i na základě jemných rozdílů v jejich struktuře, polaritě, velikosti apod. Ze separačních metod se pro stanovení enzymové aktivity nejvíce osvědčila kapilární elektroforéza, především díky její rychlosti, ale také díky velké flexibilitě. Existují dvě základní provedení – „online“ a „offline“^{4,5}. Při práci v režimu offline probíhá enzymová reakce v mikrozkušavce nebo vialce v objemu několika desítek mikrolitrů. Dávkování a mísení enzymu a substrátu, stejně tak jako časování reakce, přitom provádí operátor. Práce v elektroforetické kapiláře, která na rozdíl od chromatografické kolony není naplněna stacionární fází, umožňuje zavedení oddělených zón substrátu a enzymu, jejich promísení, provedení enzymové reakce a separaci produktů přímo uvnitř kapiláry a to zcela automaticky. To je principem online módu. Takováto automatizace celého procesu přináší kromě zvýšení výkonu také výhody omezení rizika ztráty nebo znečištění vzorku a zvýšení reprodukovatelnosti.

Tato práce představuje aplikaci kapilární elektroforézy pro stanovení enzymové aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy vůči *N,N',N''*-triacetylchitotriose a *N,N'*-diacetylchitobiose jako substrátu. Trimerní chitotriosa je enzymem štěpena na dimerní chitobiosu, která je dále štěpena na konečný produkt, monomer *N*-acetylglukosaminu.



Obr. 1. Separace *N,N',N''*-triacetylchitotriose, *N,N'*-diacetylchitobiose a *N*-acetylglukosaminu (GlcNAc). 25 mM tetraboritan sodný, pH 10,0; 12 kV; 25 °C; křemenná kapilára 75 μ m ID, 65,0/56,5 cm



Obr. 2. Sledování průběhu štěpení N,N',N'' -triacetylchitotriosu β - N -acetylhexosaminidasou prostřednictvím opakovaných nástříků reakční směsi v pětiminutových intervalech

V této práci je prezentován vývoj a optimalizace metody pro současné elektroforetické stanovení všech tří látek. Samotná separace pracuje se základním elektrolytem obsahujícím boritanový anion. Ten vytváří záporně nabitě estery se sacharidovými analyty a umožňuje tak jejich separaci, která je ukázána na obr. 1.

Při práci v offline uspořádání byla enzymová reakce prováděna ve vialce v objemu 40 μ l. Následná separace trvala 15 minut. Tato poměrně dlouhá doba trvání analýzy byla zkrácena opakovanými nástříky vzorku do běžící analýzy, což umožnilo provést 10 analýz během jedné hodiny a zcela automaticky sledovat průběh reakce analýzou vzorků reakční směsi odebíraných v pětiminutových intervalech. Takové sledování reakce je ukázáno na obr. 2.

Stanovení enzymové aktivity v online uspořádání lze provádět několika způsoby. Jsou-li známy elektroforetické pohyblivosti enzymu i substrátu, je možné vypočítat napětí a dobu, po kterou musí být vloženo, aby došlo k překrytí odděleně nadávkovaných zón substrátu a enzymu. Nechá se proběhnout reakce a opětovným vložení napětí se od sebe odseparují vzniklý produkt, zbylý substrát a enzym. Ve většině případů však elektroforetické pohyblivosti zkoumaných látek neznáme. Proto se využívají tzv. „at-inlet“ metody⁶, při nichž se zóny substrátu a enzymu nadávkují bezprostředně za sebou a reakce probíhá pouze v prostoru, kde se zóny překryjí difúzí. Novinkou v této oblasti je přístup nazvaný „Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles“, zkráceně TDLFP⁷. Tato technika je založena na předpokladu, že zóny nadávkované dostatečně velkým tlakem mají parabolický profil a jejich promísení prostřednictvím difúze napříč kapilárou je mnohem rychlejší, než difúze podélná. Na základě těchto předpokladů je možné nalézt pořadí a délku dávkovaných zón, které umožní získat dobře promíchanou reakční směs se známými koncentracemi reaktantů. S využitím tohoto modelu byla vyvinuta

online metoda stanovení aktivity β - N -acetylhexosaminidasy. Výhodou TDLFP přístupu je, že reakce může probíhat v zóně obsahující citrátový pufr o pH 4,5, zatímco následná separace probíhá, stejně jako v případě offline metody, v borátovém pufru o pH 10,0. Další výhodou je minimální spotřeba enzymu i substrátu díky tomu, že pro jedno měření se použije pouze několik desítek nanolitřů roztoků obou látek.

Práce vznikla za finanční podpory Univerzity Karlovy v Praze (projekt č. SVV 2012-265201), GAUK (projekt 710) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM0021620857).

LITERATURA

1. Yoshida K., Sugino T., Tahara H., Woodman A., Bolodeoku J., Nargund V., Fellows G., Goodison S., Tahara E., Tarin D.: *Cancer* 79, 362 (1997).
2. Uehara H., Nakaizumi A., Tatsuta M., Baba M., Takenaka A., Uedo N., Sakai N., Yano H., Iishi H., Ohigashi H., Ishikawa O., Okada S., Kakizoe T.: *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2513 (1999).
3. Charrow J., Esplin J. A., Grippie T. J., Kaplan P., Kolodny E. H., Pastores G. M., Scot C. R., Wappner R. S., Weinreb N. J., Wisch J. S.: *Arch. Intern. Med.* 158, 1754 (1998).
4. Glatz Z.: *J. Chromatogr., B* 841, 23 (2006).
5. Bao J. J., Fujima J. M., Danielson N. D.: *J. Chromatogr., B* 699, 481 (1997).
6. Van Dyck S., Vissers S., Van Schepdael A., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr., A* 986, 303 (2003).
7. Okhonin V., Liu X., Krylov S. N.: *Anal. Chem.* 77, 5925 (2005).

KONTROLA ČISTOTY KONTRASTNÍCH LÁTEK PRO ZOBRAZOVÁNÍ MAGNETICKOU REZONANCÍ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

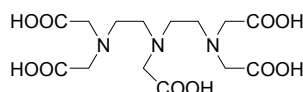
**ANNA KUBÍČKOVÁ* a PAVEL
COUFAL**

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Česká republika

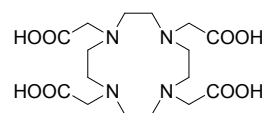
anna.kubickova@natur.cuni.cz

Kapilární zónová elektroforéza je široce využívanou elektromigrační metodou vhodnou k analýze látek nesoucích náboj¹. Mezi nejčastěji studované analyty patří anorganické kationty a anionty, dále např. aminokyseliny, proteiny či enzymy. Hlavní výhodou kapilární zónové elektroforézy je vysoká účinnost separace látek i v poměrně složitých maticích, malá spotřeba jak analyzovaného vzorku, tak separačního pufru a v neposlední řadě možnost spojení s hmotnostním spektrometrem. Ačkoli mezi vhodné analyty patří i řada léčiv a účinných látek, ve farmaceutickém průmyslu je stále dominantní separační metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Magnetická rezonance se v posledních letech stala absolutně běžnou diagnostickou metodou používanou ke zobrazování měkkých tkání². K dosažení lepšího zobrazení je pacientovi před vlastním vyšetřením podána kontrastní látka založená většinou na sloučenině gadolinia. Pro použití v klinické praxi musí být tento pro člověka značně toxický kov aplikován ve formě vysoce stabilního komplexu. Nejčastěji používanými ligandy pro přípravu kontrastních látek jsou polyamino polykarboxyláty, které díky svému polydentátnímu charakteru tvoří extrémně stabilní komplexy s nízkým rizikem uvolnění toxického kovu. Tyto ligandy lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupinou jsou sloučeniny s otevřeným řetězcem odvozeným od struktury DTPA (kyselina diethylenetriaminpentaocetová, obr. 1), jejichž použití je však v současné době na ústupu. Důležitější skupinu představují makrocyclické ligandy na bázi DOTA (kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraocetová, obr. 2). Posledním trendem ve vývoji kontrastních látek je příprava tzv. cílených kontrastních látek³. Takové kontrastní látky mají na komplexující ligand navázanu ještě skupinu, která se selektivně váže na určitý typ tkáně (např. nádor, kosti atd.). Tím je ovlivněna biodistribuce kontrastní látky v těle a je možné použít výrazně menší množství kontrastní látky pro dosažení stejného kontrastu.



Obr. 1. Struktura DTPA



Obr. 2. Struktura DOTA

Obecným problémem přípravy makrocyclických kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí je jejich poměrně složitá, často několikastupňová syntéza s poměrně nízkými výtěžky. To je mimo jiné způsobeno i obtížným čištěním jednotlivých reakčních meziproductů. Vedle žádané látky totiž nelze zabránit vzniku vedlejších produktů s velmi podobnými vlastnostmi. Běžně používané metody organické analýzy (tenkovrstvá chromatografie, nukleární magnetická rezonance atd.) často nejsou schopny poskytnout jasnou odpověď na otázku kolik a jakých produktů je v danou chvíli přítomno v reakční směsi. V minulosti sice byla publikována metoda využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii k separaci ligandů vhodných pro přípravu kontrastních látek, kvůli iontovému charakteru studovaných látek však bylo třeba použít málo běžnou stacionární fázi a pro rutinní analýzy není příliš vhodná⁴.

V rámci této práce byla vyvinuta a zoptimalizována metoda využívající kapilární zónovou elektroforézu pro sledování průběhu klíčových kroků syntézy nových cílených kontrastních látek pro magnetickou rezonanci. Námi vyvinutou metodou je možné nejen identifikovat, ale také kvantifikovat jednotlivé reakční meziproducty a produkty během méně než 15 minut. Metoda byla otestována na reálných reakčních směsích a upravena tak, aby nevyžadovala žádnou předúpravu vzorku. Získaná data je možné použít k další optimalizaci přípravy kontrastních látek a především ke zvýšení výtěžků jednotlivých reakčních kroků.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt SVV 2012-265201 a UNCE 2012/44) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekty MSM 0021620857).

LITERATURA

1. Foret F., Křivánková L., Boček P., v knize: *Capillary Zone Electrophoresis*. VCH, Weinheim 1993.
2. Merbach A. E., Tóth E., v knize: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, J. Wiley, New York 2001.
3. Caravan P.: *Accounts Chem. Res.* 42, 851 (2009).
4. Hamplová A., Coufal P., Bosáková Z., Opekar F., Kubíček V.: *Chem. Listy* 102, 194 (2008).

CHEMICKÁ ANALÝZA CYANOTOXÍNOV VO VODÁRENSKÝCH NÁDRŽIACH A V PRÍRODNÝCH KÚPALISKÁCH

ELENA KUREJOVÁ*, **ZUZANA FÁBEROVÁ**, **EMÍLIA ŠEVČÍKOVÁ**
a **EVA PERCZELOVÁ**

Úrad verejného zdravotníctva SR, Trnavská 52, 826 45
Bratislava, Slovensko
elena.kurejova@uvzsr.sk

Abstrakt

Cyanotoxíny predstavujú zdravotné riziko pre kúpajúcich sa rekreantov a konzumentov pitnej vody produkovanej z povrchových zdrojov. Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky v rámci projektu Cyanobaktérie sleduje obsah cyanotoxínov v prírodných kúpaliskách a vo vodárenských nádržiach so zvýšeným výskytom cyanobaktérií metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie a metódou ELISA testov. Obsah toxínov bol meraný v troch vodárenských nádržiach a v desiatich prírodných kúpaliskách.

Úvod

Všeobecne známym prejavom eutrofizácie je pravidelný masový rozvoj vodného kvetu siníc¹. Niektoré druhy siníc (cyanobaktérii) sú schopné produkovať toxické látky cyanotoxíny, ktoré môžu byť nebezpečné pre ľudské zdravie (hepatotoxíny, neurotoxíny, dermatotoxíny)². Dokázal sa vplyv cyanotoxínov na vznik rakoviny kože, pečene, na oslabenie imunitného systému. Tieto účinky hrozia najmä pri pití vody s obsahom cyanotoxínov³. Medzi najviac sledované cyanotoxíny patria mikrocystíny, patriace do skupiny cyklických peptidov. Doteraz bolo určených viac ako 80 mikrocystínov z environmentálnych vzoriek a laboratórných kultúr siníc⁴. *Cylindrospermopsin* (CYN) je alkaloidný toxín, pôvodne identifikovaný v tropickej cyanobaktérii *Cylindrospermopsis raciborskii*. Produkovaný je i druhmi siníc bežnými v našich podmienkach. Vyznačuje sa cytotoxickými účinkami prevažne na bunky pečene a ľadvín².

Mikrocystín LR patrí medzi najčastejšie a najviac toxické mikrocystíny. WHO odporúča limit 1,0 µg l⁻¹ pre mikrocystín LR v pitnej vode⁵. Tento ukazovateľ bol zaradený do rozšíreného rozboru pitnej vody produkovanej z povrchových zdrojov podľa novelizovaného nariadenia vlády SR č. 496/2010 Z.z., ktorým sa mení a dopĺňa nariadenia vlády SR č. 354/2006 Z.z.⁶. Kontrolu vykonáva výrobca pitnej vody v pitných vodách upravovaných z povrchových zdrojov v období výskytu cyanobaktérií v počtoch > 20 000 buniek/ml v mieste najväčšieho výskytu na povrchovom zdroji⁶.

V rámci projektu Úradu verejného zdravotníctva Cyanobaktérie bol v rokoch 2008 až 2011 sledovaný obsah cyanotoxínov v lokalitách so zvýšeným výskytom cyanobaktérií. Jednalo sa o vodárenské nádrže – Hriňová, Klenovec, Málinec, a prírodné kúpaliská – Ružiná, Teplý vrch – ORMET, Šaštín – Stráže, Malé Leváre, banské jazero Počúvadlo, Ružiná, Jazero v Košiciach, Liptovská Mara, Senec – Slnčné jazerá, Zlaté piesky a Nitrianske Rudno.

Metódy stanovenia

Smernica WHO⁷ popisuje postup extrakcie mikrocystínov zo vzoriek vôd na pevnej fáze, postupy stanovenia cyanotoxínov metódami HPLC, LC/MS/MS, CG/MS a Elisa testami. Aplikačný list firmy Dionex⁸ popisuje postup analýzy mikrocystínov metódou HPLC na chromatografickej kolóne Acclaim. V špecializovanom laboratóriu kvapalinovej chromatografie Úradu verejného zdravotníctva SR sa stanovuje obsah mikrocystínov LR, RR, LA, YR, LW a LF a cylindrospermopsínu metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie a metódou ELISA testov. V prípade cylindrospermopsínu bola na potvrdenie prítomnosti analytu v reálnej vzorke použitá metóda LC/MS/MS.

Príprava vzoriek

Vzorky vôd boli umiestnené do ultrazvukového vodného kúpeľa z dôvodu rozbitia buniek siníc a uvoľnenia toxínov z popraskaných buniek do vody. Následne boli vzorky spracované zakoncentrovaním analytov z jedného litra vody s použitím SPE kolóniek. Nasorbované analyty boli vymyté z kolóniek rozpúšťadlom a zahustené na rotačnej vákuovej odparke do poslednej kvapky. Odparok bol rozpustený v presnom objeme (1,0 ml) rozpúšťadla a takto pripravený roztok bol použitý pre HPLC analýzu. Biomasa sinicového kvetu bola spracovaná lyofilizáciou, čo predstavuje vymrazenie a následné vysušenie vzorky. Sušina – lyofilizát bol po rozpustení trikrát homogenizovaný najprv na laboratórnom, potom na ultrazvukovom homogenizátore. Po homogenizácii bola skúmavka s roztokom centrifugovaná, supernatant prefiltrovaný na nápiach do kvapalinového chromatografu.

Chromatografická analýza

Toxíny boli stanovované metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) na reverznej fáze C₁₈. Na delenie sa použila gradientová elúcia. Detekcia sa uskutočnila v UV oblasti pri vlnovej dĺžke 239 nm pre mikrocystíny a 262 nm pre cylindrospermopsín. Na analýzu sa použil kvapalinový chromatograf fy DIONEX s diodearray detektorom s meniteľnou vlnovou dĺžkou v rozmedzí

190–600 nm.

Podmienky chromatografickej analýzy

kolóna: reverzná fáza C₁₈ firmy VARIAN, 250 × 4,60 mm, 5 μm

mobilná fáza: A – acetonitril s 0,05 % obsahom TFA (kyselina trifluóroctová) (v : v)

B – redestilovaná voda s 0,05 % obsahom

TFA (v : v)

prietok: 1,0 ml min⁻¹

teplota kolóny: 20 °C

objem nástreku: 100 ml

trvanie analýzy: 40 min

Ako kalibračná metóda bola použitá metóda externého štandardu v kalibračnom rozsahu pre mikrocytíny od 0,10 do 2,0 mg l⁻¹ a pre cylindrospermopsín od 0,50 do 10 mg l⁻¹. Identifikácia bola vykonaná na základe retenčného času štandardov a porovnaním charakteristického spektra štandardu v UV oblasti so spektrom analyzovanej látky vo vzorke.

Analýza cylindrospermopsínu metódou LC/MS/MS

Obsah CYN bol overený metódou kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou detekciou. Na analýzu sa použil Triple-Quad LC/MS/MS VARIAN. Materský ión CYN o molekulovej hmotnosti 416,4(M+H⁺) bol rozštiepený na dcérske ióny 176,3 a 194,1.

Podmienky chromatografickej analýzy:

kolóna: reverzná fáza C₁₈ firmy SUPELCO, 100 × 2,1 mm, 3 μm

mobilná fáza: A – acetonitril s 0,05 % obsahom TFA (kyselina trifluóroctová) (v : v)

B – redestilovaná voda s 0,05 % obsahom

TFA (v : v)

prietok: 0,2 ml min⁻¹

teplota nástreku vzorky: 300 °C

teplota kolóny: 20 °C

objem nástreku: 10 μl

trvanie analýzy: 30 min

ELISA test

Pri ELISA testoch sú využívané špecifické protilátky proti cyanotoxínom a následná fotometrická detekcia farebných produktov enzymatickej reakcie. Na priamu analýzu vzoriek vôd boli použité ELISA testy firmy Abraxis, USA s rozsahom merania pre mikrocytíny 0,16–2,5 μg l⁻¹ a pre CYN 0,05–2,0 μg l⁻¹.

Výsledky

V rámci úlohy sa validovala metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s diode-array detektorom na stanovenie cyanotoxínov vo vode a v biomase siníc s nasledovnými validačnými parametrami:

Limit kvantifikácie (LOQ) pre vody – pre zakoncentrovanie vzorky z 1000 ml na konečný objem 1,0 ml je hodnota LOQ pre mikrocytíny 0,10 μg l⁻¹, pre cylindrospermopsín 0,50 μg l⁻¹.

Limit kvantifikácie (LOQ) pre biomasu siníc – pre navážku vzorky 100 mg a konečného objemu po zakoncentrovaní 2,0 ml je hodnota LOQ pre mikrocytíny 2,0 μg g⁻¹, cylindrospermopsín 10 μg g⁻¹.

Linearita – korelačný koeficient R > 0,995.

Opakovateľnosť – smerodajná odchýlka < 5 %.

Reprodukovateľnosť – smerodajná odchýlka < 10 %.

Správnosť – výťažnosť procesu úpravy vzorky ± 20 %.

Úspešnosť pri účasti na medzilaboratórnych porovnávacích testoch organizovaných SZÚ Praha.

V reálnych vzorkách sa výsledky pohybovali od nedeťogovaného obsahu po maximálne namerané hodnoty uvedené v tabulke I a II.

Cylindrospermopsín (CYN) bol potvrdený len v jednej vzorke z biomasy siníc z rekreačnej vodnej nádrže

Tabuľka I

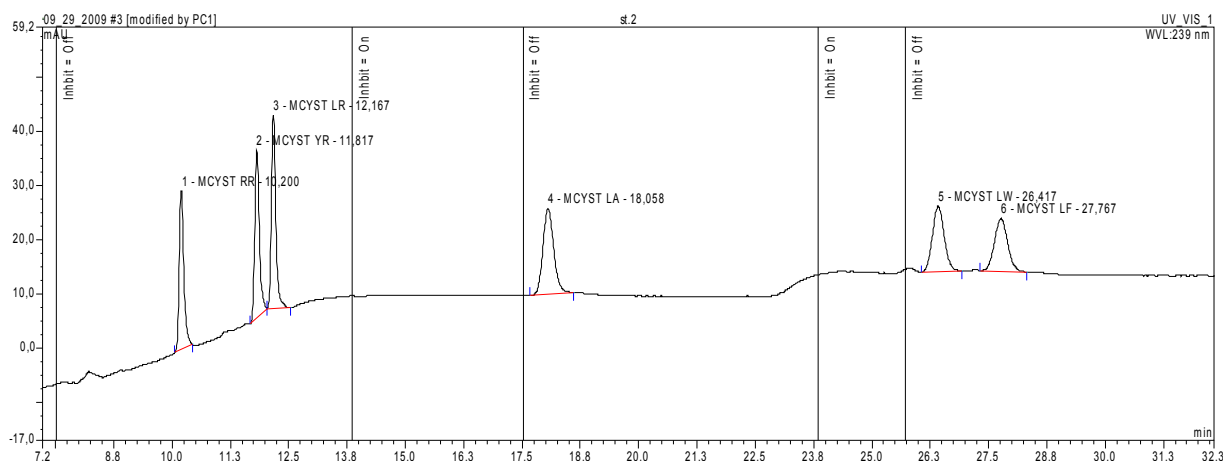
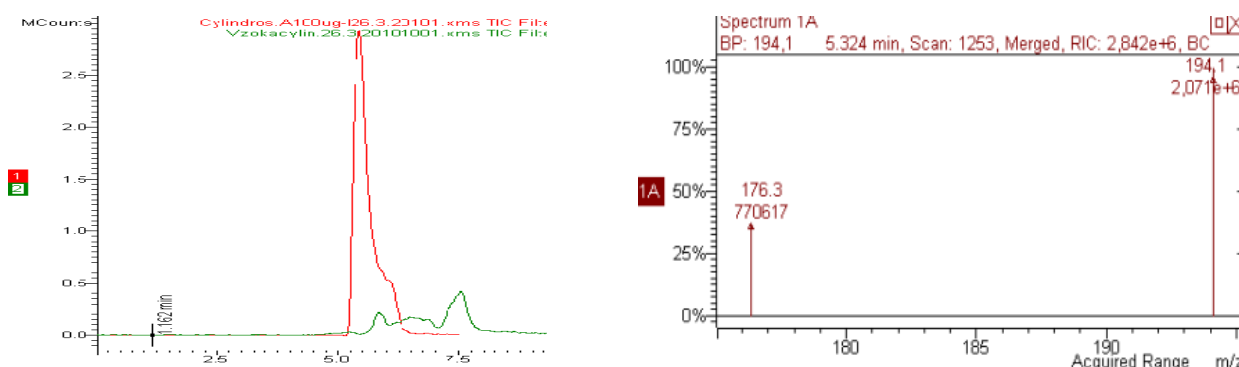
Maximálne hodnoty obsahu mikrocytínov (MCST) v lyofilizáte sinicových vodných kvetov a vo vodách v sledovaných lokalitách. Výsledky boli namerané v časovom intervale rokov 2008–2011

Lokalita	Hriňová	Klenovec	Málinec	Ružiná	Teplý vrch	Šaštín-Stráže	Lipt. Mara
Obsah MCST v lyofilizáte, μg g ⁻¹	12,8	–	74	506	41	1626	927
Obsah MCST vo vode, μg l ⁻¹	ND	ND	ND	4,9	0,63	0,15	7,3

Tabuľka II

Maximálne hodnoty obsahu mikrocytínov (MCST) v lyofilizáte sinicových vodných kvetov a vo vodách v sledovaných lokalitách. Výsledky boli namerané v časovom intervale rokov 2008–2011

Lokalita	Počúvadlo	Ružiná	Jazero v Košiciach	Zlaté piesky	Senec-Snečné jazerá	Nitrianske Rudno
Obsah MCST v lyofilizáte, μg g ⁻¹	3222	415	132	33	–	38
Obsah MCST vo vode, μg l ⁻¹	39	ND	5,0	ND	ND	0,58

Obr. 1. Chromatogram štandardu mikrocystínov 1,0 mg l⁻¹Obr. 2. LC/MS/MS analýza štandardu cylindrospermopsínu 100 µg l⁻¹ a vzorky z rekreačnej vodnej nádrže

Nitrianske Rudno. Analýza tohto ukazovateľa v reálnych vzorkách je zložitejšia z dôvodu veľkého množstva interferujúcich látok prítomných vo vzorkách, výsledok bol overený metódou LC/MS/MS.

Záver

Validáciu bola overená vhodnosť vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na stanovenie mikrocystínov v biomase sinicového vodného kvetu a vo vodách. Stanovenie obsahu mikrocystínov ELISA testami poskytuje informáciu o sumárnom obsahu, nie je možná identifikácia jednotlivých mikrocystínov. Výhodou ELISA testov je stanovenie toxínov vo vzorkách vôd bez nutnosti zakoncentrovania.

Najvyšší obsah mikrocystínov bol zaznamenaný v banskom jazere Počúvadlo (tab. I). Takýto vysoký obsah bol stanovený v jazere v roku 2008, v ďalších rokoch sa

nenamerali také vysoké koncentrácie. Cylindrospermopsín (CYN) sa vyskytol v roku 2009 v lokalite Nitrianske Rudno. HPLC analýza bola potvrdená metódou LC/MS/MS (obr. 2) a stanovený bol obsah 157 µg g⁻¹ CYN. Výhodou LC/MS/MS metódy je jej vysoká citlivosť, vzorky vôd je možné merať priamo bez zakoncentrovania. Vo vzorkách vôd z vodárenských nádrží po úprave nebol nameraný obsah mikrocystínov ani cylindrospermopsínu.

LITERATÚRA

1. Kočí V., Burkhard J., Maršálek B.: *Eutrofizace na prelomu tisíciletí*, seminár Eutrofizace, Brno 2000.
2. Bláhová L., Oravec M., Šimek Z., Maršálek B., Bláha L.: *Analytické možnosti stanovení významných „tradičních“ i „nových“ cyanotoxínů*, In: Zborník z konferencie Cyanobaktérie 48–50 (2008).
3. Horecká M.: *Úlohy a požiadavky verejného zdravot-*

- níctva pri ochrane zdravia pred cyanobaktériami*, In: Zborník z konferencie Sinice 2011 Bratislava, 1–3 (2011).
4. Spoo L., Neffling M., Meriluoto J.: *Toxicon* 55, 954 (2010).
 5. WHO (1998): *Guidelines for Drinking-water Quality*. Second edition, Volume 1 – Recommendations – Addendum: Organic Constituents: Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR, World Health Organization, Ženeva 1998.
 6. *Nariadenie vlády č. 496/2010 Z.z. z 8.12.2010, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 354/2006 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu.*
 7. Ken-ichi Harada, Fumio Kondo and Linda Lawton: *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Chapter 13. LABORATORY ANALYSIS OF CYANOTOXINS, WHO 1999.
 8. Application Note 261: *Sensitive Determination of Microcystins in Drinking and Environmental Waters*, Dionex.

CONCEPTS OF CONSTRUCTION AND DETECTION WITH DNA-BASED BIOSENSORS

JÁN LABUDA^{a*}, KATARÍNA BENÍKOVÁ^a, LENKA HLA VATÁ^a, ANTON AMBRÓZY^a, GUZEL ZIYATDINOVA^b, VLASTIMIL VYSKOČIL^c, and ANTON CIUCU^d

^a *Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia,*

^b *Analytical Chemistry Department, A. M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan (Volga Region) Federal University, Kremlyevskaya 18, 420008 Kazan, Russia,* ^c *Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague 2, Czech Republic,* ^d *Faculty of Chemistry, University of Bucharest, Panduri Av. 90-92, 050671 Bucharest, Romania*
jan.labuda@stuba.sk

Deoxyribonucleic acid as well as other nucleic acids and aptamers are utilized for about two decades as biorecognition elements at so called nucleic acids biosensors. These biosensors represent analytical devices that integrate nucleic acid as the biological recognition element and a physicochemical transducer, for instance an electrode. The typical bioanalytical selectivity is not referred to analyte(s), but to interactions of the surface attached nucleic acids in general. In this relation, these biosensors could characterize reactivity of nucleic acids in cells. Investigation of chemical interactions of nucleic acids is based on their bioaffinity¹. Electrochemical nucleic acid based biosensors are rather popular and represent electrodes chemically modified by a nucleic acid film/layer. Optical, piezoelectric, and impedimetric nucleic acid biosensors are also widely developed and used. Thus, the DNA-based biosensors represent today irreplaceable testing and warning (bio)analytical devices applied to the detection of nucleic acid sequences with so-called genosensors, detection of effects of risk chemicals and drugs, evaluation of DNA damage by physical and chemical agents including the detection of pro- and antioxidants²⁻⁴.

Detection modes used at electrochemical DNA-based biosensors have been recently classified in an IUPAC technical report⁵. They include intrinsic DNA redox and tensametric responses, signals of redox indicators, labels and others. Material of the electrode plays also an important role at the selection of detection mode. Estimation of nature of DNA damage belongs to problems using the biosensor based on a carbon electrode. For this purpose,

we have suggested application of several voltammetric and impedimetric modes^{6,7}. To ensure detection windows with necessary sensitivity of the carbon paste-based screen-printed electrode, an interface formed by carbon nanotubes with large surface area and good electric conductivity can be used. The sensors have been exploited both in batch and flow-through cells. Damage to DNA by various chemical and physical agents has been investigated and opening of the helix structure, strand-breaks and total destruction of the DNA layer have been detected using voltammetric signals of guanine moiety, redox active DNA intercalators and redox indicators present in solution. Biosensors with Nafion, chitosan and other membranes against surface active compounds have been prepared and applied to investigation of some food samples.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency (Project SK-RO-0028-10), the National Scholarship Programme of the Slovak Republic (GZ) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project MSM 0021620857), the Charles University in Prague (Project UNCE 2012/44) and the Grant Agency of the Czech Republic (Project P206/12/G151) (VV).

REFERENCES

1. Labuda J., Fojta M., Jelen F., Paleček E.: v in: *Encyclopedia of Sensors*, (Grimes C. A., Dickey E. C., Pishko M. N., ed.) Vol. 3, pp. 201–228. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch 2006.
2. Labuda J., Vyskocil V.: in: *Encyclopedia of Applied Electrochemistry, DNA/Electrode Interface*, (Savinell R. F., Ota K., Kreysa G., ed.). Springer, Berlin 2011. URL: <http://www.springerreference.com/index/chapterdoi/10.1007/303710> (accessed 2 December, 2011).
3. Labuda J.: in: *Nucleic Acid Biosensors for Environmental Pollution Monitoring*, (Mascini M., Palchetti I., ed.), pp. 121–140. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2011.
4. Vyskocil V., Labuda J., Barek J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 233 (2010).
5. Labuda J., Brett A. M. O., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: *Pure Appl. Chem.* 82, 1161 (2010).
6. Ziyatdinova G., Labuda J.: *Anal. Methods* 3, 2777 (2011).
7. Hlavata L., Benikova K., Vyskocil V., Labuda J.: *Electrochim. Acta*, in press.

ŠTÚDIUM ROZKLADU NIEKTORÝCH LOKÁLNYCH ANESTETÍK V BIOLOGICKÝCH VZORKÁCH METÓDOU HPLC

**JOZEF LEHOTAY^{a*}, JOZEF ČIŽMÁRIK^b
a KATARÍNA HROBOŇOVÁ^a**

^a Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Katedra farmaceutickej chémie, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovensko
jozef.lehotay@stuba.sk

Deriváty substituovaných esterov fenylnkarbámovej kyseliny sú potenciálne liečiva s lokálno-anestetickým, antiarytmickým, antiinfektívnym, respektíve algicídny účinkom, ktoré sú v súčasnosti v rozličných štádiách ich vývoja a výskumu. Na našich pracoviskách sa študujú hlavne aspekty ich projekcie syntézy, izolácie, identifikácie, molekulové deskriptory, so zameraním na definovanie najmä vzťahu medzi ich chemickou štruktúrou, fyzikálno-chemickými vlastnosťami a ich biologickými a farmakologickými účinkami.

V ostatnom čase sa venuje hlavná pozornosť najmä štúdiu ich stereochemických aspektov, mechanizmu ich separácie, výberu stacionárnych fáz v HPLC a kinetike rozkladu v biologickom materiáli. Chirálna separácia v súčasnosti predstavujú jednu z najdôležitejších analytických trendov. Veľmi dôležité uplatnenie našli tieto separácie predovšetkým vo farmaceutickej chémii, kde je veľmi dôležité poznať „enantioméru čistotu“ pripravovaných liečiv, nakoľko vo väčšine prípadov je biologická aktivita jednotlivých enantiomérov podstatne rozdielna. Interakcia medzi biologicky aktívnymi látkami a proteínovými receptormi je veľmi často stereoselektívna. Pri štúdiu interakčného mechanizmu, ktorý je dôležitý pri separácii enantiomérov sa použili homologické rady derivátov piperidíno esterov alkoxyfenylkarbámovej kyselín a stacionárna fáza makrocyclické antibiotikum teikoplanín. Zmenou hodnoty pH mobilnej fázy prídavkom dietylaminu sa mohli sledovať nábojové interakcie medzi stacionárnou fázou a separovanými enantiómami, nakoľko sa menila disociačná rovnováha. Vplyv tvorby vodíkových väzieb sa skúmal na základe zmeny zloženia mobilnej fázy. Sterické efekty sa zisťovali zmenou dĺžky a polohy alkoxylového reťazca na benzénovom jadre v molekulách piperidíno esterov alkoxyfenylkarbámovej kyseliny. Vplyv molekúl cukrov v štruktúre teikoplanínu sa sledoval tým, že sa použila stacionárna fáza teikoplanínu, ktorá neobsahovala tieto molekuly. Z výsledkov separácií enantiomérov možno urobiť nasledujúce závery:

- Hodnota pH mobilnej fázy má podstatný vplyv na hodnotu $R_{i,j}$ enantiomérov.
- Zloženie mobilnej fázy značne ovplyvňovalo výsledky separácie, najvyššie hodnoty $R_{i,j}$ sa dosiahli pri použití metanolu.

- Vplyv dĺžky alkoxylového reťazca sa sledoval len vtedy, ak sa nachádzal v polohe 2 na aromatickom jadre, možno predpokladať tienie stereogénneho centra, čo zhoršovalo separáciu.
- Vplyv polohy alkoxylového reťazca nebol rozhodujúci pri polohách alkoxylového reťazca v polohe 3 a 4 na benzénovom jadre.
- Molekuly cukru v štruktúre teikoplanínu mali negatívny vplyv na separáciu enantiomérov.

Po zistení najvhodnejších podmienok separácie enantiomérov uvedených látok sa sledovala kinetika rozkladu jednotlivých enantiomérov v biologickom materiáli. V prípade rozdielnej kinetiky rozkladu jednotlivých enantiomérov možno predpokladať ich rozdielnu biologickú aktivitu. Na štúdium kinetiky rozkladu niektorých enantiomérov derivátov kyseliny alkoxyfenylkarbámovej v králičom krvnom sére sa použila kombinácia troch metód: predkoncentrácia enantiomérov pomocou malej kolóny, analytická separácia racemátu v RP systéme a separácia enantiomérov v chirálnej kolóne (Chirobiotic TAG). Referenčný roztok racemátu sa pridol do králičieho krvného séra, vzorka sa udržiavala pri teplote 37 °C a v určitých časových intervaloch sa časť vzorky analyzovala. Z výsledkov analýz vyplýva:

- Pri použití králičieho krvného séra skladovaného 1 rok v chladničke sa enantioméry sledovaných látok nerozkladali v priebehu 24 hodín.
- Pri použití králičieho krvného séra, ktoré sa odobralo králikom po nadávkovaní atropínu sa zistil pomalý rozklad sledovaných enantiomérov, čo dokumentuje iný mechanizmus rozkladu.
- Pri použití čerstvého králičieho krvného séra v prvých dvoch hodinách bol rozklad rýchlejší, potom rýchlosť rozkladu enantiomérov klesala. Na základe časového priebehu rozkladu a korelačného koeficienta sa zistilo, že enzymatická degradácia sa uskutočňuje podľa reakcie 2. poriadku.

Na kinetiku rozkladu má vplyv poloha alkoxy substituenta v molekule derivátov kyseliny alkoxyfenylkarbámovej. Zo štatistického vyhodnotenia (F test, $\alpha = 0,05$) vyplýva, že hodnoty rýchlostných konštánt rozkladu jednotlivých enantiomérov nie sú štatisticky významne rozdielne. Počet atómov uhlíka v alkoxy substituentu má vplyv na hodnoty rýchlostných konštánt, najnižšia rýchlosť rozkladu sa zistila pri 2-hexyloxy substituentu. Medza stanovenia derivátov kyseliny alkoxyfenylkarbámovej v králičom krvnom sére bola 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Táto práca bola podporovaná VEGA grantom č.1/0164/11.

IN VIVO KVANTITATÍVNA ANALÝZA METABOLITOV V MOZGU

LADISLAV BAČIAK, SVATAVA KAŠPAROVÁ A TIBOR LIPTAJ*

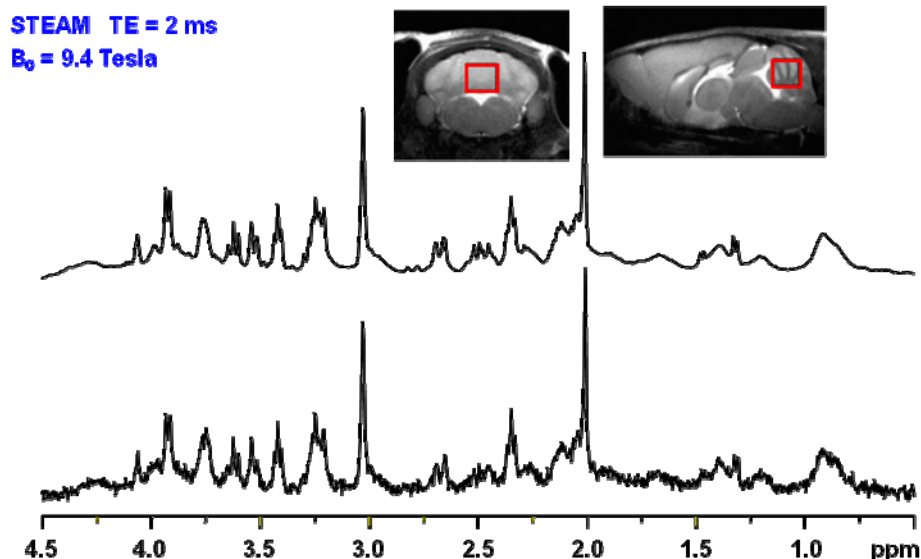
Chemickotechnologická fakulta STU, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
tiber.liptaj@stuba.sk

Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) sa oproti iným metódam molekulej spektroskopie vyznačuje radom špecifických vlastností. Z hľadiska jej *in-vivo* aplikácií sú dôležité najmä jej neinvazívnosť a schopnosť elektromagnetického žiarenia využívaného v NMR prenikat' cez tkanivá (rádiofrekvenčné žiarenie). Primárne využitie NMR v chémii je zamerané na identifikáciu a určovanie štruktúry látok a je založené na bohatosti štruktúrnych informácií obsiahnutých v NMR spektrách. Bohatosť informácií vo všeobecnosti však implikuje zložitosť spektier jednoduchých látok, čo sa ešte znásobuje v prípade vzoriek zmesí. Napriek tomu sa NMR čoraz častejšie využíva i ako metóda kvantitatívnej analýzy zmesí. Významnou prednosťou NMR rovnaká citlivosť stanovenia pre všetky zložky zmesí, z čoho vyplýva jednoduché stanovenie relatívneho obsahu komponent zmesí na základe porovnania relatívnej intenzity čiar v NMR spektrách. Ďalšou výhodou NMR je nenáročnosť prípravy vzoriek pre NMR analýzu. Z toho vyplýva jej veľká univerzálnosť s možnosťou kvantitatívnej analýzy rôznych typov vzoriek, o.i. aj

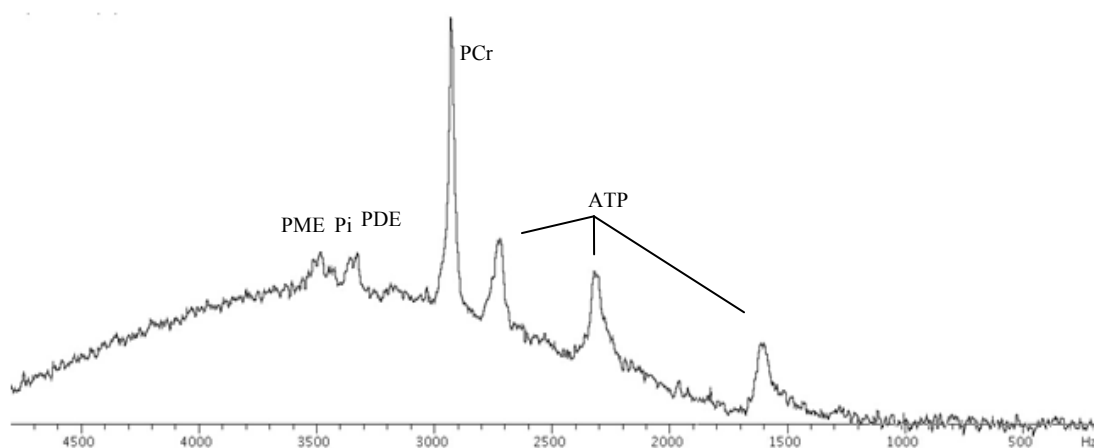
vzoriek žijúcich objektov a to od úrovni mikroorganizmov, cez tkanivá, orgány až po experimentálne zvieratá a ľudí. Z hľadiska technického usporiadania, možno *in-vivo* NMR experimenty rozdeliť na:

- experimenty v NMR kvete (experimenty na malých objektoch – mikroorganizmoch, bunkových kultúrach, tkanivách, ..), kde NMR kveta je pripravená ako bioreaktor, ktorý umožňuje kontinuálnu výživu vzorky. Experimenty sa obvykle uskutočňujú na „klasických“ NMR spektrometroch s vertikálnym magnetom, a
- experimenty na veľkých objektoch (experimentálne zvieratá, ľudia) kedy celý objekt (alebo jeho relevantná časť) je umiestnená v magnetickom poli NMR spektrometra. Experimenty sa uskutočňujú obvykle na spektrometri s horizontálnym magnetom a spektrometer je vybavený na NMR zobrazovanie (Magnetic Resonance Imaging, MRI).

V tomto príspevku sa zameriavame na *in-vivo* NMR experimenty na experimentálnych zvieratách. Špecifickou črtou týchto experimentov je, že vyžadujú špecifickú (lokalizáciu) miesta, z ktorého sa NMR spektrá merajú. Táto lokalizácia sa vykonáva dvomi spôsobmi, a to vhodným umiestnením špeciálnej meracej cievky (často tzv. povrchová cievka, ktorá má citlivosť obmedzenú na priestor, v blízkosti ktorého sa nachádza) alebo pomocou kombinácie gradientov magnetického poľa a rádiofrekvenč-



Obr. 1. a) MRI obraz mozgu potkana; obdĺžniky označujú vybranú časť tkaniva, určenú na meranie NMR spektier. b) Simulované NMR spektrum získané dekonvolúciou experimentálneho spektra. c) Experimentálne *in-vivo* ^1H NMR spektrum z vybranej časti mozgu potkana¹



Obr. 2. *In-vivo* ^{31}P NMR mozgu potkana namerané povrchovou cievkou, PCr – fosfokreatín, ATP – adenzíntrifosfát, PME – fosfo-monoestéry, PDE – fosfodiestéry, Pi – anorganický fosfát

ných impulzov s vhodnou frekvenčnou charakteristikou. V druhom prípade sa lokalizácia vykoná za pomoci zobrazovacích metód NMR.

V *in-vivo* sa využívajú sa viaceré metódy NMR. Najčastejšie je to ^1H NMR metóda, ktorá umožňuje získať informáciu o koncentrácii cca 20 nízkomolekulových, dobre pohyblivých metabolitov s koncentráciou $\sim 1 \text{ mmol l}^{-1}$ a vyššie, ktoré sa nachádzajú v cytosóle buniek, resp. medzibunkových tekutinách. Veľkým technickým problémom pri *in-vivo* ^1H NMR spektroskopii je potlačenie intenzívneho signálu vody, ktorého koncentrácia niekoľko tisíckrát prevyšuje koncentráciu meraných metabolitov. Kvantifikácia obsahu pozorovateľných metabolitov sa vykonáva dekonvolúciou experimentálneho spektra na subspektra jednotlivých metabolitov tak, aby ich súčet (simulované spektrum) sa čo najviac zhodoval s experimentálnym spektrom.

Druhou najčastejšie využívanou metódou v *in-vivo* NMR spektroskopie je ^{31}P NMR, pomocou ktorej je možno sledovať koncentrácie metabolitov, ktoré hrajú kľúčovú

úlohu v energetickom metabolizme buniek². Technicky sú *in-vivo* ^{31}P NMR experimenty ľahšie prevediteľne ako ^1H NMR experimenty, citlivosť metódy je však menšia, a preto obvykle je priestorové rozlíšenie menšie ako v prípade ^1H NMR spektroskopie.

Prednáška je venovaná popisu základných čít vyššie uvedených metód a ich aplikácií na štúdium metabolizmu mozgu potkana.

Autori d'akuju za podporu grantom VEGA 1/0272/10 a VEGA 1/0972/12.

LITERATÚRA

1. Tkáč I., Andersen P., Adriany G., Merkle H., Ugurbil K., Gruetter R.: *Magn. Reson. Med.* 46, 451 (2001).
2. Kašparová S., Brezová V., Valko M., Horecký J., Mlynárik V., Liptaj T., Vančová O., Uličná O., Dobrota D.: *Neurochem. Int.* 46, 601 (2005).

ANALÝZA VYBRANÝCH PRVKOV V POLYMETALICKÝCH KONKRÉCIÁCH METÓDOU AES-ICP A RFS

DANIELA MACKOVÝCH, AUGUSTÍN MAJCHRÁK, JARMILA NOVÁKOVÁ a KATARÍNA UHRINOVÁ

Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Geoanalytické laboratóriá, Markušovská cesta 1, 052 01 Spišská Nová Ves, Slovensko
daniela.mackovych@geology.sk

Úvod

Polymetalické konkrécie sú prírodné útvary, ktoré vznikali v oceáne dva až tri milióny rokov. Nachádzajú sa na dne oceánu v hĺbke od štyroch do šiestich kilometrov. Konkrécie obsahujú približne 30 % mangánu, 1,2 % medi, 1,2 % niklu a 0,2 % kobaltu, 5,0 % železa a iné pre priemysel zaujímavé prvky. Majú rôzny tvar a hmotnosť. Vyskytujú sa vo forme guľičiek, hrudiek, alebo tenkých lavíc. Podľa výsledkov prieskumu, na jednom štvorcovom metri morského dna je 10 až 40 kilogramov konkrécie. Veľké zásoby železo-mangánových konkrécií existujú aj v Indickom oceáne a v severnej časti Atlantického oceánu.

Konkrécie objavila v menších hĺbkach britská expedícia plaviaca sa okolo sveta na lodi Challenger v rokoch 1872 až 1876. Vtedy ešte nikto netušil, že raz budú významným potenciálnym zdrojom surovín. Prvýkrát sa ťažba realizovala v Mexickom zálive v roku 1970, aj to len z hĺbky 1000 m nasávaním. Najbohatšie pásmo je v priestore medzi Mexikom a Havajskými ostrovmi¹.

Experimentálna časť

To, čo je na polymetalických konkréciách zaujímavé, je ich zloženie. Vzorky boli odobrané z oblasti medzi Me-

xikom a Havajskými ostrovmi (obr. 1) a dodala ich organizácia Interoceanmetal (Poľsko). Veľkosť jednotlivých vzoriek bola od 5 do 15 cm (obr. 2).

Úprava vzoriek

Vzorky pre stanovenie prvkov boli sušené pri teplote do 40 °C, zдробňované drvením vo valcovom mlyne na zrnitosť 1 až 2 mm a následne upravované na analytickú zrnitosť pod 0,06 mm bezotterovou homogenizáciou v achátovom zariadení.

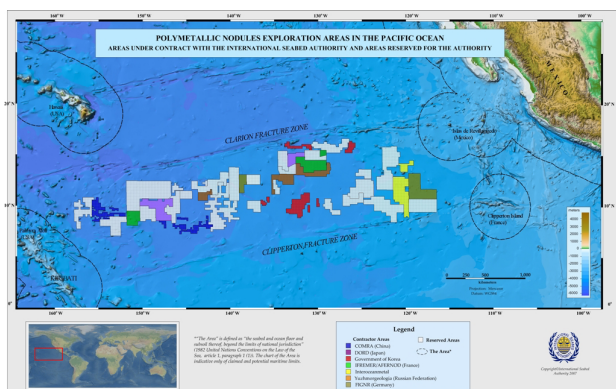
Chemikálie

Zásobné štandardy a chemikálie boli zakúpené od firmy Merck, Ultra Scientific USA, Analytika ČR. Voda používaná na analýzu bola upravovaná na ionomeniči (zariadenia RODEM 6 a Milipore).

Analytické metódy a prístroje

Na stanovenie sledovaných prvkov boli aplikované analytické metódy: atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (AES-ICP) – stanovenie B, Ce, La, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, Yb a enegriovo disperzná röntgenfluorescenčná spektrometria (RFS) – SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂, CaO, MgO, MnO, P₂O₅, Na₂O, K₂O z tavených perál a As, Ba, Cd, Cr, Cs, Cu, Ga, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Th, U, V, Y, Zn a Zr z lisovanej tablety. Strata žíhaním (LOI) bola stanovená gravimetricky pri teplote 1050 °C.

Pre stanovenie prvkov metódou AES-ICP bol použitý rozklad vzoriek sintráciou s Na₂O₂. 1g vzorky sa sintroval s 5 g Na₂O₂ v niklovom tégliku pri teplote 490 °C ± 5 °C cca 20 min. Slinok sa rozpustil v destilovanej vode



Obr. 1. Oblasť výskytu polymetalických konkrécií v Tichom oceáne



Obr. 2. Vzorky polymetalických konkrécií

Tabuľka I

Vlnové dĺžky prvkov meraných na AES-ICP

Prvok	Vlnová dĺžka [nm]	Prvok	Vlnová dĺžka [nm]	Prvok	Vlnová dĺžka [nm]
B	249,772	Eu	420,504	Pr	410,072
Ce	418,659	Gd	342,246	Sm	359,259
La	408,671	Ho	345,600	Tb	350,914
Dy	353,171	Lu	261,541	Tm	313,125
Er	369,265	Nd	406,108	Yb	328,937

Tabuľka II

Pracovné podmienky merania na RFS

Prvok	Čiara	Napätie/Prúd [kV/mA]	Terčik	Prvok	Čiara	Napätie/Prúd [kV/mA]	Terčik
Al	K _α	14,5/12	HOPG	Ni	K _α	40,5/7	B ₄ C
As	K _α	40,5/7	B ₄ C	P	K _α	14,5/12	HOPG
Ba	K _α	53,5/5,6	Al ₂ O ₃	Pb	L _β	40,5/7	B ₄ C
Ca	K _α	14,5/12	HOPG	Rb	K _α	40,5/7	B ₄ C
Cd	K _α	53,5/5,6	Al ₂ O ₃	Sb	K _α	53,5/5,6	Al ₂ O ₃
Cr	K _α	30/10	Co	Si	K _α	14,5/12	HOPG
Cs	K _α	53,5/5,6	Al ₂ O ₃	Sn	K _α	53,5/5,6	Al ₂ O ₃
Cu	K _α	40,5/7	B ₄ C	Sr	K _α	40,5/7	B ₄ C
Fe	K _α	14,5/12	HOPG	Th	L _α	40,5/7	B ₄ C
Ga	K _α	40,5/7	B ₄ C	Ti	K _α	14,5/12	HOPG
K	K _α	14,5/12	HOPG	U	L _B	53,5/5,6	Al ₂ O ₃
Mg	K _α	14,5/12	Al	V	K _α	30/10	Co
Mn	K _α	14,5/12	HOPG	Y	K _α	40,5/7	B ₄ C
Mo	K _α	53,5/5,6	Al ₂ O ₃	Zn	K _α	40,5/7	B ₄ C
Na	K _α	14,5/12	Al	Zr	K _α	40,5/7	B ₄ C

Rozsah prvkov

Na (11) – U (92)

Rtg lampa

Pd s Be okienkom P_{max}=300 W

Rtg generátor

U=1–60 kV, I= 1–80 mA, P= do 3,5 kW

Detektor

polovodičový Si(Li) chladený N₂(l),

Rozlíšenie

150 keV na čiara K_α Mn

Rozptylové terčiky

Mo, Co, Al₂O₃, B₄C, Al, HOPG-kryštál

Výveva

kapacita 5 m³ h⁻¹

Lis

hydraulický HERZOG HTP 40

Indukčné taviace zariadenie

ITZ-1

a roztok sa prefiltraval. Vo filtráte sa stanovil bór. Zrazenina sa rozpustila v HCl (1+1) a vo filtráte sa stanovili prvky La a Ce. Prvky vzácnych zemín sa rozkladali rovnakým spôsobom s Na₂O₂, po rozpustení v HCl sa k filtrátu pridal NH₄OH a Ca²⁺ a kyselina oxálovou. Zrazenina sa vyžihani pri teplote 950 °C sa následne rozpustila s HCl (1+1). Z roztoku sa stanovili prvky vzácnych zemín². Na stanovenie koncentrácií prvkov metódou AES-ICP bol použitý prístroj Varian model VISTA MPX. Rušivé vplyvy pri stanovení sledovaných prvkov boli minimalizované opti-

malizáciou podmienok merania a voľbou analytickej čiary bez spektrálnych rušivých vplyvov. Fyzikálne rušivé vplyvy spojené najmä s rozprašovaním vzorky s vysokým obsahom rozpustených zložiek a procesom transportu vzorky, boli eliminované dodržaním identického prostredia v kalibračných roztokoch a vzorkách. V tab. I sú uvedené spektrálne čiary pre jednotlivé prvky.

Stanovenie prvkov metódou enegriovo disperznej röntgenfluorescenčnej spektrometrie (RFS) bol vykonaný dvomi spôsobmi: z tavenej perly a z lisovanej tablety. Me-

Tabuľka III

Výsledky analýzy vzoriek polymetalických konkrécií – PMK 1, PMK 2 a referenčného materiálu NOD-P-1 metódou RFS

Prvok	Jednotka	PMK 1	±	PMK 2	±	NOD-P-1 Nameraná hodnota	±	NOD-P-1 Certifiková- vaná hodnota	±
SiO ₂	%	12,37	0,15	36,76	0,46	13,9	0,17	13,93	0,034
Al ₂ O ₃	%	4,46	0,11	11,77	0,17	4,85	0,12	4,8	0,092
Fe ₂ O ₃	%	8,58	0,21	5,90	0,15	8,33	0,20	8,3	0,044
CaO	%	2,43	0,06	1,37	0,07	3,10	0,07	3,1	0,016
MgO	%	3,33	0,09	3,14	0,08	3,31	0,09	3,3	0,014
TiO ₂	%	0,37	0,02	0,24	0,02	0,50	0,03	0,5	0,003
MnO	%	42,85	0,42	17,94	0,22	37,56	0,36	37,6	0,10
K ₂ O	%	1,16	0,03	3,17	0,08	1,19	0,03	1,2	0,014
Na ₂ O	%	3,1	0,11	4,3	0,16	2,20	0,08	2,2	0,006
P ₂ O ₅	%	0,30	0,02	0,33	0,02	0,46	0,02	0,46	0,005
LOI	%	15,88	0,40	11,73	0,29	19,8	0,05		
V	µg/g	518	26	417	21	564	28	570	10
Cr	µg/g	<300		<300					
Ni	µg/g	13080	196	2874	72	13350	200	13400	64
Cu	µg/g	13204	330	4304	108	11540	288	11500	49
Zn	µg/g	1541	77	407	20	1595	80	1600	6
Ga	µg/g	<50		<50					
As	µg/g	70	3,5	22	2,2				
Rb	µg/g	20	2	55	5,5				
Sr	µg/g	702	21	585	29	670	18	680	3
Y	µg/g	80	4	60	3	95	5		
Zr	µg/g	317	16	188	9				
Nb	µg/g	<20		<20					
Mo	µg/g	715	18	301	8	758		760	4
Cd	µg/g	30	3	8	1,6				
Sn	µg/g	<20		<20					
Sb	µg/g	59	4	29	2				
Cs	µg/g	<20		<20					
Ba	µg/g	5903	177	18673	280	3337	100	3350	28
Pb	µg/g	310	23	104	8	555	42	560	6
Th	µg/g	<20		<20					
U	µg/g	<20		<20					

ranie bolo vykonané na prístroji firmy Spectro model SPECTRO X-LAB 2000. Pracovné podmienky sú uvedené v tabuľke II. Pre kvantitatívne stanovenie prvkov bola použitá metóda, v ktorej je na zostrojenie kalibračných kriviek použitých viac ako 50 rôznych medzinárodných certifikovaných referenčných materiálov v širokom koncentračnom rozsahu pozostávajúcich z granitov, dioritov, bazaltov, oxidov prvkov, popolčiekov, vápencov, sedimentov, odpa-

dov a kalov, rôznych rúd a iných geologických materiálov. Rušivé vplyvy boli eliminované vhodným výberom analytickej čiary, rozptylového terčika a korekčnými faktormi.

Postup prípravy lisovanej tablety: 5 g vysušenej a zhomogenizovanej vzorky o zrnitosti < 0,06 mm sa zmiešalo s 1 g vosku vo vibračnom miešači a v hydraulickom lise sa vylisovala tableta o priemere 40 mm silou 150 kN po dobu 10 sekúnd. Z takto pripravenej tablety sa

Tabuľka IV

Výsledky analýzy vzoriek polymetalických konkrécií – PMK 1, PMK 2 a referenčného materiálu NOD-P-1 metódou AES-ICP

Prvok	Jednotka	PMK 1	±	PMK 2	±	NOD-P-1 Nameraná hodnota	±	NOD-P-1 Informačná hodnota	±
B	µg/g	90	5	67	4				
Ce	µg/g	332	15	156	8	280	13	290	
La	µg/g	89	4	50	2	106	5	104	
Dy	µg/g	22,1	1,1	13,4	0,6	27,6	1,3	27	
Er	µg/g	9,57	0,4	6,30	0,3	12,2	0,5	12	
Eu	µg/g	6,38	0,3	3,58	0,2	7,2	0,3	7,5	
Gd	µg/g	24,2	1,2	14,9	0,7	28,0	1,2	28	
Ho	µg/g	3,78	0,2	2,34	0,2	5,01	0,3		
Lu	µg/g	1,35	0,06	0,95	0,05	1,7	0,08	1,8	
Nd	µg/g	104	5	62,8	3	120	6	120	
Pr	µg/g	25,10	1,2	14,70	0,7	28,8	1,4		
Sm	µg/g	23,90	1,4	14,00	0,7	29,9	1,5	30	
Tb	µg/g	4,42	0,2	2,33	0,1	5,4	0,3		
Tm	µg/g	1,80	0,09	1,21	0,06	2,59	0,12		
Yb	µg/g	9,61	0,4	6,15	0,3	12,6	0,6	13	

stanovili koncentrácie prvkov As, Ba, Cd, Cr, Cs, Cu, Ga, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Th, U, V, Y, Zn a Zr. Doba merania bola 500 s.

Postup prípravy tavenej perly: pre analýzu sa použili vzorky o zrnitosti <0,06 mm, vyžíhané pri 1000 °C. Vzorky pre stanovenie obsahov hlavných prvkov sa pripravili tavením s tetraboritanom lítym. Do PtAu téglíka sa navážilo 0,5 g vzorky a 7,0 g taviacej zmesi. Po premiešaní sa téglík so vzorkou vložil do indukčnej pece s teplotou 1100 °C po dobu 2,5–3 min. Do roztavenej vzorky sa pridalo 10 mg jódu a kelímok sa zakryl Pt viečkom. Po 30 sekundách sa opäť spustilo tavenie po dobu 1 min. Po vychladnutí sa z kelímka vyklopila perla. Z takto pripravenej perly boli stanovené oxidy prvkov SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂, CaO, MgO, MnO, P₂O₅, Na₂O, K₂O. Doba merania bola 300 s.

Výsledky a diskusia

Analyzovali sa dve vzorky polymetalických konkrécií z expedície z roku 2009. Miesto odberu: PMK 1 – hĺbka 4,4 km, lokalita – 120 °W, 10 °30'N, PMK 2 – lokalita 119 °33'W, 11 °N.

Na kontrolu analytických výsledkov sa súčasne so vzorkami analyzoval referenčný materiál US Geological Survey – Manganese Nodule, NOD-P-1. Materiál bol pripravený zo vzoriek polymetalických konkrécií odobraných z Tichého oceána z lokality 124 °28'W, 14 °50'N, hĺbka 4,3 km, ktorý sa matricou podobal dodaným vzorkám.

Výsledky analýz sú uvedené v tab. III.

U analyzovanej vzorky PMK 1 namerané obsahy prvkov MnO = 42,85 % / Mn = 32,96 %, Cu = 1,32 %, Ni = 1,31%, Fe₂O₃ = 8,58 % / Fe = 6,12 % sú v zhode s priemernými publikovanými obsahmi (30 % Mn, 1,2 % Cu, 1,2 % Ni, 5,0 % Fe). Vzorka PMK 2 je chudobnejšia na polymetalické prvky, obsahuje vyšší obsah kremičitanov a uhličitanov. Obsah vzácnych prvkov (REE) v oboch vzorkách koreluje s obsahom Mn, Cu, Ni, Fe, čo nasvedčuje tomu, že REE sa spoluzrážajú z vodného prostredia spolu s polymetalickými prvkami.

Záver

Polymetalické konkrécie patria k významným a perspektívnym surovinám vo svete. Pretože ide o prírodné bohatstvo celého ľudstva, aj Slovensko má nárok na primeraný podiel z týchto zdrojov, ak sa začnú ťažiť. Medzinárodná organizácia preorské dno rozdelila tamojšiu časť Tichého oceána medzi štáty a priemyselné konzorciá a každému z nich pridelila 150 000 km². Jedným z potenciálnych investorov sa stala spoločná organizácia Interoceanmetal, ktorá vznikla v roku 1987 v Poľsku. Dnes má táto organizácia šesť členov: Poľsko, Rusko, Slovensko, Česká republika, Bulharsko a Kubu. Zaujímavé sú údaje o prognózových zdrojoch týchto polymetalických konkrécií. Zásoby sa odhadujú na 20 miliárd ton. Ťažba týchto surovín je zatiaľ veľmi náročná a nákladná¹.

LITERATÚRA

1. Franzen J.: “Activities of the Interoceanmetal Joint Organization, Problems of the Application of the United Nations International Framework Classification for Reserves/Resources,” In: Proc. Ninth ISOPE Ocean Mining Symp, Maui, pp. 165–167, 2011.
2. Das D. K., Roychowdhury P.: *At. Spectrosc.* 18, 80 (1997).

ELECTROCHEMICAL HYDRIDE GENERATION ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC SELENIUM

ALENA MANOVÁ*, ERNEST
BEINROHR, FRANTIŠEK ČACHO,
and LUKÁŠ LAUKO

*Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
alena.mnova@stuba.sk*

Abstract

A flow-injection system with electrochemical hydride generation and atomic absorption detection for the determination of inorganic selenium is described. This technique has been developed in order to avoid the use sodium tetrahydroborate, which is capable of introducing contamination. A simple electrochemical flow-through cell with powder carbon as cathodic material was used and optimized. The influence of the generation current, concentration of the catholyte, carrier stream, flow rate of the sample and interferences by other metals on the generation of hydrogen selenide were studied.

Introduction

The sodium tetrahydroborate (NaBH_4) – acid reduction technique has been widely used for hydride generation (HG) in atomic spectrometric analyses. However, this technique has certain disadvantages. The NaBH_4 is capable of introducing contamination, is expensive and the

aqueous solution is unstable and has to be prepared freshly each working day. In addition, the process is sensitive to interferences from coexisting ions^{1–4}, and excessive hydrogen gas can be evolved. Although, it is not a problem in atomic absorption spectrometry (AAS), it would change the impedance of the inductively coupled plasma (ICP) and increase the reflected power; hence extra power would be required to keep the plasma stable⁵, and in extreme cases the plasma would be extinguished. Various proposals have been made to overcome the interferences: time-consuming matrix separation⁶, increasing the acidity of the reaction medium⁷ and the addition of chemical modifiers such as KI, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or other chelating agents have been described in the literature. All methods include the risk of contamination due to the high concentrations of the agents used. Though the mechanism is not entirely understood, it is assumed that the interaction between the interfering ions and the reducing agent NaBH_4 plays an important role in the mechanism of interference. Thus far, only a few attempts have been made to solve this problem employing alternative reducing agents.

In the present work, a flow injection system with an electrochemical flow-through cell has been developed for electrochemical hydride generation of hydrogen selenide. This system requires only a small sample volume and is very easily automated. The electrochemical HG technique combined with AAS is a well established method for achieving the required high sensitivity and low detection limits.

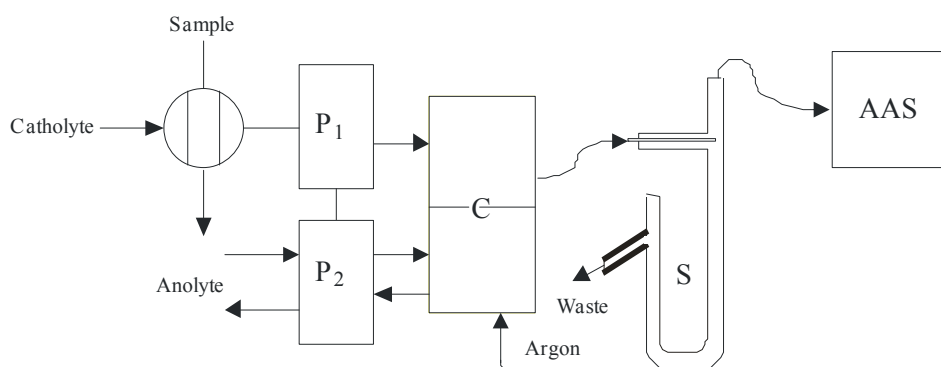


Fig. 1. Schematic diagram of the electrochemical HG system; P1, P2 – peristaltic pumps, C – electrochemical flow-through cell, S – gas-liquid separator, AAS – atomic absorption spectrometry

Experimental

Instrumentation

A Perkin-Elmer 5000 AAS was used, with an electrically heated quartz tube atomizer. The experimental set-up of the new electrochemical HG system is shown in Fig. 1.

The electrolyte is continuously conveyed by peristaltic pump. The sample solution is introduced into the loop and transported to the electrochemical cell. A constant current is applied to the electrolytic cell. The gaseous reaction products; hydrides and hydrogen, formed at the cathode, are flowed out of the cell with the carrier stream of an argon and separated from the solution in a gas-liquid separator. The hydrides are transported to an electrically heated quartz tube with an argon and determined under operating conditions for hydride forming elements by AAS.

The operating conditions of the system are shown in Table I.

Reagents and standard solutions

All reagents used were of analytical-reagent grade or higher. Stock solution of Se(IV) 1.0 g dm^{-3} and other elements were obtained from Slovak Institute of Metrology (SMU) Bratislava. Standard solutions have been prepared daily by dilution of the stock solutions. Deionized distilled water was obtained from a Barnstead NANOpure system. High-purity HCl, H_2SO_4 and sub-boiling distilled HNO_3 (prepared in-house) were used for all analyses. Electrolytic solutions of HCl, HNO_3 and H_2SO_4 were used to test the efficiency of Ec HG system.

Sample preparation

Add 2 ml of concentrated HNO_3 to 0.2 g of sample and digest at a power of 8 for 10 min in the PMD microwave-assisted digester. Evaporate the solution to dryness

Table I
Operating conditions for the FI-Ec-HG AAS system

Parameter	Se
Wavelength	196.0 nm
Slit-width	2.0 nm
Lamp power	6 mA
Atomizer temperature	900 °C
Sample matrix H_2SO_4	1.0 mol dm^{-3}
Anolyte H_2SO_4	1.0 mol dm^{-3}
Sample volume	1.0 ml
Sample flow rate	2.5 ml min^{-1}
Electrolysis current	120 mA
Carrier gas flow rate	300 ml min^{-1}

and dissolve the residue with the electrolyte solution. Measurement: analyse 1 ml of the sample solution at the optimum parameter set.

Procedure

The anolyte solution ($1 \text{ mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$) was pumped and continuously recirculated at a flow rate of 5.2 ml min^{-1} through the anode of the electrolytic flow cell. A small volume, according to loop 1 ml, of the standard or sample solution was filled into the loop and then injected with the stream of the electrolyte to the cathode of the flow cell. Hydrogen selenide was produced at the cathode by electrolysis and HG took place. The reaction products were passed to a gas-liquid separator; the hydride and other gases then were transported by a stream of Ar into the T-tube atomizer for AAS measurements. The operating conditions of the system are shown in Table I, except where indicated otherwise. Five parallel analyses were performed and the average result for each of samples was taken.

Results and discussion

Composition of the carrier-electrolytic solution

Acids (H_2SO_4 , HCl, and HNO_3) were tested as electrolytes. It was found that $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$ gave highest absorbance for Se while nitric acid suppressed the Se signal almost completely probably because of the oxidizing properties. With HCl, the Cl_2 evolved would be a pollutant. Hence H_2SO_4 was chosen as the electrolyte. With this acid smaller interferences from transition metals were found. Higher acidity would also help to clean the electrodes; $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$ was finally used as a compromise concentration.

Electrolytic current

The absorbance signals increased in proportion to the electrolytic current for Se up to -150 mA . In the present work -120 mA was used for all the analyses. Greater current than -150 mA could be used for higher sensitivity but this might affect the lifetime of the cell.

Carrier stream flow rate

The absorbance signal increased slightly with the carrier stream flow rate of argon and 300 ml min^{-1} was chosen.

Interferences in the determination of Se

Interferences from coexisting elements Li, Na, K, Mg, Ca, Ba, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Sn, Pb, Sb, Bi and As for Se have been studied in the present FI - Ec - HG technique. Some results are shown in Fig.3. It can be seen that the interferences are negligible for many ele-

ments whereas the Cu, Sb, Bi interferences are severe. However, interferences from some elements can be masked by chelating agents. It was found that the interference effects of some elements varied with the used cathode material. Hence it is possible to use an appropriate cathode to minimize interferences from certain elements.

Detection limits, characteristic concentrations and precisions

All the values for aqueous solutions are shown in Table II. The precision is expressed as relative standard deviation (RSD). It should be pointed out that the detection limit and characteristic concentration could be much improved by changing the experimental set-up and optimizing the operating conditions.

Analysis of real samples

Five samples of different waters, eucalyptus leaves, vitamin E with Se were analysed by the proposed technique. Each result in Table III is the average value of five parallel complete analyses of the sample. It can be seen that the results obtained by the proposed method are satisfactory.

Conclusion

This work shows that the Ec HG technique is an interesting alternative to chemical hydride generation with NaBH₄ in determination of inorganic Se. With power carbon as cathode material the determination is selective to Se (IV). This method has several advantages in comparison to the common hydride generation by sodium tetrahydroborate: the determination of Se (IV) and total inorganic selenium can take place in one reaction medium, it shows a higher sensitivity and lower detection limits and in addition the unstable NaBH₄ solution can be avoided. The detection limit based on the 3 σ criteria is 1,4 $\mu\text{g dm}^{-3}$ for Se (IV). Linear working range for EcHG-AAS is 3–300 $\mu\text{g dm}^{-3}$. The optimised device parameters for electrochemical generation SeH₂ are: generation current –120 mA, flow rate of Ar 300 cm^3 , catholyte 1,0 mol dm^{-3} H₂SO₄, anolyte 1,0 mol dm^{-3} H₂SO₄, atomic temperature 900 °C. The results of interferences Li, Na, K, Mg, Ca, Ba, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Sn, Pb, Sb, Bi and As have shown a decrease of signal for Se in every case except for Sn. EcHG-AAS has been applied for analysis of the real samples.

The authors appreciate the financial support of the Slovak Grant Agency VEGA (project No 1/0419/12).

Table II
Detection limit, characteristic concentration and relative standard deviation

Element	Detection limit (3 σ) [$\mu\text{g dm}^{-3}$]	Linear working range [$\mu\text{g dm}^{-3}$]	RSD* [%]
Se	1.4	3–300	1.5

* $n = 11$; analyte concentration 50 $\mu\text{g dm}^{-3}$

Table III
Analyses of real samples (Se)

Sample	Found [$\mu\text{g dm}^{-3}$]	Standard addition [$\mu\text{g dm}^{-3}$]	Standard addition found [$\mu\text{g dm}^{-3}$]	Difference [%]
Tap water	< 5.0	25.0	24.96 \pm 0.03	+ 0.16
Mineral water (Salvator)	< 5.0	25.0	25.10 \pm 0.12	- 0.40
Surface water (Kuchajda see)	< 5.0	50.0	50.47 \pm 0.72	- 0.94
Sea water (Adriatic sea)	< 5.0	50.0	48.72 \pm 0.22	+ 2.56
Waste water (Chlor alkali plant)	< 5.0	100.0	97.50 \pm 0.22	+ 2.50
Eucalyptus leaves	226 ^a \pm 1.81	100.0	91.25 \pm 0.44	+ 8.75
Vitamin E	125 \pm 1.02	50.0	47.20 \pm 0.32	+ 5.60

^a value in ng g^{-1}

REFERENCES

1. Smith A. E.: *Analyst* 100, 300 (1975).
2. Thompson M., Pahlavanpour S. J., Walton S. J., Kirkbright G. F.: *Analyst* 103, 705 (1978).
3. Pierce F. D., Brown H. R.: *Anal. Chem.* 48, 693 (1976).
4. Welz B., Melcher M.: *Spectrochim. Acta, Part B* 36, 439 (1981).
5. Huang B., Zhang Z., Zeng X.: *Spectrochim. Acta, Part B* 42, 129 (1987).
6. Nakahara T., Kikui N.: *Spectrochim. Acta, Part B* 40, 21 (1985).
7. Melcher M., Welz B., in: *Atomspektrom. Spurenanal.*, (B.Welz, ed.), p. 419. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1981.

VYHODNOCOVÁNÍ NEJISTOTY MĚŘENÍ – OD VYDÁNÍ POKYNU PRO VYJADŘOVÁNÍ NEJISTOTY MĚŘENÍ (GUM:1995) PO SOUČASNOST

DAVID MILDE

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

V první polovině 90. let minulého století vstoupil pojem nejistota měření do chemických laboratoří. Převážná většina analytických chemiků do té doby posuzovala spolehlivost či nespolehlivost svých výsledků různými způsoby, často podle zvyku dané instrumentální metody či dle porozumění statistice. Snad jen na okraj je třeba upozornit, že analytičtí chemici neobjevili v nejistotě nic nového, ale začali aplikovat to, co bylo v některých odvětvích průmyslu již používáno. Tento příspěvek si klade za cíl stručně představit vývoj konceptu nejistoty a jejího vyhodnocení z pohledu analytické laboratoře a čtenáře odkázat na patřičnou literaturu, kde je možné získat podrobné informace.

Do širšího podvědomí analytické veřejnosti nejistota vstoupila díky nové technické normě používané pro akreditaci zkušebních a kalibračních laboratoří ČSN EN ISO/IEC 17025 (cit.¹). V kapitole věnující se technickým požadavkům (5.4.6.2) je uvedeno, že laboratoře musí mít a používat postupy pro odhad nejistoty měření. Odborná veřejnost tedy začala hledat způsoby odhadu nejistoty měření. Základním a několik let jediným dostupným dokumentem byl ISO Guide 98-3, takzvaný GUM (Guide to the expression of uncertainty in measurement)². Jeho český překlad byl vydán až v roce 2011 jako technická normalizační informace (TNI 014109-3) (cit.³). Mimo jiné tyto dokumenty přináší pro chemika uchopitelnou definici nejistoty a poukazují na rozdíl v pojmu chyba (pojmu používaného ve statistice) a nejistota. Tyto dokumenty také uvádějí přístup k vyhodnocení nejistoty měření, který dne nazýváme jako „složka po složce“ či „zdola nahoru“. K vyhodnocení nejistoty se využívá model měření a jsou uvedeny dva základní způsoby: vyhodnocení standardní nejistoty způsobem A a vyhodnocení standardní nejistoty způsobem B. Vyhodnocení způsobem A vychází z dostupnosti experimentálních dat (opakovaných měření), předpokládá u nich normální rozdělení a výběrový odhad směrodatné odchylky ztotožňuje se standardní nejistotou u . Vyhodnocení způsobem B lze použít, nejsou-li přímo dostupná experimentální data, ale naopak jiné relevantní údaje (např. specifikace výrobce, údaje z certifikátů, nejistoty připisované referenčním datům či dříve naměřená data nebo zkušenosti). Zde se zvolí očekávaný typ rozdělení pravděpodobnosti a snadným výpočtem získáme standardní nejistotu. Dále jsou popsány způsoby určení kombinované standardní nejistoty u_c pro nekorelovaná i korelovaná data. Tento krok je v GUM popsán poněkud komplikovaně

s využitím parciálních derivací a korelačních koeficientů jednotlivých vstupních veličin. Některé odborné společnosti připravily dokumenty vysvětlující použití těchto postupů a doplnily je o celou řadu praktických příkladů. Z celé řady odborných společností se dále budeme podrobněji věnovat pouze společnostem Eurachem a Eurolab. Závěrečným krokem vyhodnocení nejistoty je výpočet rozšířené nejistoty U , která se pak obvykle uvádí spolu s výsledkem. Obecně pro veličinu Y se výsledek uvádí $Y = y \pm U$. Například látkovou koncentrací kyseliny chlorovodíkové můžeme udat $0,102 \pm 0,0016 \text{ mol dm}^{-3}$, přičemž údaj za \pm je právě rozšířená nejistota. Některé laboratoře zavedly udávání nejistoty relativně v procentech.

Jednu z prvních pro chemické laboratoře praktických příruček na vyhodnocování nejistot vydala v roce 1995 organizace Eurachem pod názvem Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Tato příručka je stále dostupná na webových stránkách eurachem.org, ale v roce 2000 vyšlo její revidované vydání a pro rok 2012 je připravováno již 3. rozšířené vydání. Český překlad byl publikován v roce 1996 organizací Eurachem-ČR v řadě příruček pro laboratoře jako Kvalimetrie 6 (cit.⁴). Tato příručka uvádí praktické přístupy pro odhad nejistoty, její uvádění a její velmi ceněnou částí byly praktické příklady vyhodnocení nejistoty z běžné analytické praxe (acidobazická titrace, stanovení Cd pomocí AAS, stanovení organofosforových pesticidů pomocí GC a stanovení obsahu masa). Pro výpočet kombinované nejistoty složitých modelů měření prezentuje způsob výpočtu popsáný Kragtenem⁵ s využitím běžně dostupného software Microsoft Excel. Postupem času se začala objevovat celá řada různých kvalitních dokumentů a pokynů odborných organizací pro vyhodnocování nejistoty. Organizace Eurolab v roce 2002 publikovala jako technickou zprávu 1/2002 dokument věnovaný vyhodnocování nejistot způsobem „složka po složce“ s praktickými příklady pro chemické a fyzikální laboratoře doplněnou o téměř 90 doporučených citací⁶.

Používání a zejména časově náročného vyhodnocování nejistoty měření způsobem „složka po složce“ přivedlo odborné společnosti poměrně rychle k hledání jiných přístupů k vyhodnocování nejistoty. Všeobecně přijímaným dokumentem popisujícím praktické vyhodnocení nejistoty přístupem, který je označován „shora dolů“ je pokyn Eurachem/CITAC Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement⁷ z roku 2000 (v době vzniku tohoto příspěvku platné vydání, v roce 2012 vstoupí v platnost vydání nové). Český překlad je dostupný jako 11. díl řady příruček pro laboratoře Kvalimetrie⁸. Tento dokument představuje odhad nejistoty s využitím údajů z vnitrolaboratorní validační studie a provedení odhadu nejistoty na základě předchozích údajů z mezilaboratorního vyvíjení metody. Dále uvádí přístupy k vyhodnocování nejistot empirických a ad hoc metod. Pozitivně přijímanou částí příručky se opět

staly praktické príklady. Využití přístupu „shora dolů“ laboratorím značně usnadňuje práci. Není zapotřebí provádět časově náročnou sérii dalších experimentů, ale lze využít již jednou v laboratoři naměřená data. Alternativní přístupy k vyhodnocování nejistot jsou pro chemiky přijatelným způsobem zpracovány ve dvou technických zprávách Eurolabu 1/2006 a 1/2007. Oba dokumenty jsou přístupné i v českém překladu^{9,10}. Dalšími cennými zdroji v oblasti nejistot jsou materiály přístupné na webových stránkách organizace Nordtest^{11,12} a Analytical Methods Committee Royal Society of Chemistry¹³.

Další směr, kterým se ubíralo vyhodnocování nejistoty, spočíval v pohledu na získání výsledku jako celku samotné analýzy a vzorkování. Tedy samostatnou a doposud ještě v legislativě nezavedenou oblastí je nejistota odběru vzorků. Otázka odběru vzorků je snad i komplikovanější než otázka samotné chemické analýzy, protože existuje celá řada odběrových technik, strategií na nepřeborné množství vzorků. Přesto se v roce 2007 podařilo publikovat první podrobnější příručku¹⁴, na které se podíleli Eurachem, CITAC a také EUROLAB, Nordtest a UK RSC Analytical Methods Committee. Český překlad publikoval Eurachem-ČR jako součást své řady příruček Kvalimetrie 15 (cit.¹⁵). Dokument zevrubně popisuje empirický a modelový přístup odběru vzorků a odhadu nejistoty v těchto případech. A stejně jako další dokumenty Eurachem uvádí několik praktických příkladů (dusičnany v salátu pěstovaném ve skleníku, olovo v kontaminované ornici, rozpuštěné železo v podzemní vodě, vitamín A v dětské ovesné kaši, enzym v krmivu pro drůbež a kadmium a fosfor v zemědělské ornici). Součástí příručky jsou i detailní statistické postupy pro zpracování jako jsou parametrická a neparametrická analýza rozptylu.

Naopak oblast legislativy zejména z Evropské unie vedla k detailnímu zpracování použití nejistoty k posuzování shody s limitními hodnotami. Jak postupovat v případě, že povolenou limitní hodnotu nepřekročil výsledek, ale jeho nejistota ano či naopak výsledek překročil limitní mez, ale jeho nejistota ještě spadá pod tuto mez? Způsoby vyhodnocení uvádí jak dokument Eurachem/CITAC¹⁶ dostupný i v českém překladu¹⁵ tak i normativní dokument ISO/IEC Guide 98-4 (cit.¹⁷), který je však pouze v pracovní verzi. Uvedené dokumenty představují relativně jednoduché statistické postupy využívající hodnotu standardní nejistoty v blízkosti limitní hodnoty a umožňují vypočítat oblasti přijetí a zamítnutí – tedy zda výsledek překročil či nepřekročil limitní hodnotu. Využití nejistoty měření při posuzování s limitní hodnotou se postupně rozšiřuje do řady oblastí počínaje analýzou potravin.

V posledních letech se způsoby vyhodnocování nejistoty měření dostávají i do oblastí, které pro analytické laboratoře nejsou až tak klíčové. Pracovní skupiny v rámci organizací Eurachem a CITAC dokončují na dokumentu, který by popisoval i vyhodnocení nejistoty v blízkosti meze detekce či statisticky sofistikované postupy pro vyhodnocení nejistoty u velkých souborů dat. Ke druhé oblasti přispělo vydání doplňku k Pokynům ISO/IEC 98-3, kde je uvedeno použití simulační metody Monte Carlo

k propagaci nejistoty. Uvedený Pokyn byl v českém překladu v loňském roce vydán jako Technická normalizační informace¹⁸.

Významnou podporou konceptu vyhodnocování nejistoty měření oproti klasickému chybovému modelu přineslo 3. vydání Mezinárodního metrologického slovníku v roce 2007 jako ISO Guidu 99 (cit.¹⁹). Tento dokument zavádí novou definici nejistoty, ta však není v rozporu s definicí z dokumentu GUM a popisuje implementaci nejistoty měření do nových oblastí a nových definicí základních metrologických pojmů.

Nejistota měření a její vyhodnocení má za sebou dětská léta i období dospívání a analytickou veřejností je zavedena do praxe a používána. Vstup tohoto pojmu do odborné veřejnosti v České republice byl spojen s nepochopením a častokrát neopodstatněnou kritikou. Z rigorózního statistického přístupu má vyhodnocování jak „zdola nahoru“ tak i „shora dolů“ některé slabiny (např. používání pouze aditivního modelu měření), ty však ve většině případů významně neovlivní vyhodnocení velikosti nejistoty. Mnoho počátečních nedostatků se za více než 15 let používání nejistot v laboratořích podařilo překonat a v posledních letech čelí nejistota dalším výzvám. Jednou z nich je její používání v klinických laboratořích. Dalším momentálně aktuálním tématem je vyhodnocování nejistoty u kvalitativních analýz.

Autor děkuje za finanční podporu MŠMT ČR v rámci projektu LG 11010.

LITERATURA

1. ČSN EN ISO/IEC 17025: *Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří*. ČNI Praha 2005.
2. ISO/IEC Guide 98-3: *Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)*. ISO, Ženeva 2008.
3. TNI 014109-3: *Nejistoty měření – část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995)(Pokyn ISO/IEC 98-3)*. UNMZ, Praha 2011.
4. Suchánek M. (ed.): *Kvalimetrie 6. Stanovení nejistoty analytického měření*. Eurachem-ČR, Praha 2006.
5. Kragten J.: *Analyst 119*, 2161 (1994).
6. EUROLAB Technical Report No. 1/2002: *Measurement Uncertainty in Testing – A short introduction on how to characterise accuracy and reliability of results including a list of useful references*. Eurolab, Berlín 2002.
7. Ellison S.L.R., Rösslein M., Williams A. (ed.): *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide 4*. Eurachem, 2000.
8. Suchánek M. (ed.): *Kvalimetrie 11: Stanovení nejistoty analytického měření*. Eurachem-ČR, třetí vydání, Praha 2001.
9. EUROLAB Technická zpráva 1/2006: *Pokyn pro vyhodnocování nejistoty měření výsledků kvantitativních zkoušek*. EUROLAB-CZ, Praha 2008.

10. EUROLAB Technická zpráva 1/2007: Revize nejistot měření: alternativní přístupy k vyhodnocení nejistot. EUROLAB-CZ, Praha 2008.
11. Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M.: *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*. Nordtest Report TR 537, Espo 2004.
12. Gron Ch., Hansen J.B., Magnusson B., Nordbotten A., Krysell M., Andersen K.J., Lund U.: *Uncertainty from sampling – a nordtest handbook for sampling planners on sampling quality assurance and uncertainty arising from sampling*. Nordtest Report TR 604, Oslo 2007.
13. <http://www.rsc.org/Membership/Networking/InterestGroups/Analytical/AMC/TechnicalBriefs.asp> (staženo 15.3.2012).
14. Ramsey M.H., Ellison S.L.R. (ed.): *Measurement Uncertainty Resulting From Sampling. A guide to methods and approaches*. Eurachem/CITAC Guide. Eurachem, 2007.
15. Suchánek M. (ed.): *Kvalimetrie 15: Použití informací o nejistotě k posuzování shody. Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků*. Eurachem-ČR, Praha 2008.
16. Ellison S.L.R., Williams A. (ed.): *Use of Uncertainty Information in Compliance Assessment*. Eurachem/CITAC Guide. Eurachem, 2007. ČNI, Praha 2011.
17. TNI 014109-4: Nejistota měření – část 4: úloha nejistoty měření při posuzování shody. ČNI, Praha 2011.
18. TNI 014109-3.1: Nejistota měření – část 3: Pokyn k vyjádření nejistoty měření (GUM:1995), doplněk 1: šíření rozdělení užitím metod Monte Carlo (Pokyn ISO/IEC 98-3/Doplněk 1). ČNI, Praha 2011.
19. ISO/IEC Guide 99: *International Vocabulary of Metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. ISO, Ženeva 2007.

UTILIZING MOLECULAR EVOLUTIONARY PATTERNS FOR MASS SPECTRA INTERPRETATION

ROBERT MISTRÍK

*HighChem, s.r.o., Čajakova 18, 81105 Bratislava, Slovakia
robert@mistrík.com*

The challenge set by metabolomic research is the analysis of numerous small molecules and ends with structural assignments of individual metabolic components. Due to the immense structural diversity of small molecules and the inability to decipher spectral information effectively, the structural work remains a huge bottleneck in chemical and biological sciences.

Widely used library search systems are designed to identify compounds represented in the reference library. If the unknown compound is not represented in the library, the compound cannot be identified by this method. To overcome this shortcoming, various accurate molecular mass search techniques into structural databases are often applied to derive at least a structural proposal of unknown compound.

A novel integrated mass spectrometric approach which takes advantage of the structural continuum and conservation of eukaryotic metabolism will be presented. Comprehensive empirical data collections in addition to a fragment search technique and precursor-ion fingerprinting method (PIF) are integrated into this approach.

In biological compartments, endogenous metabolites resulting from sequential transformation reactions represent a chemical continuum of predetermined structural space, ideally fitting the PIF concept where the success rate of ion identification depends on previously elucidated substructural moieties. Furthermore, metabolic constituents are generally conserved across species and thus share similar structural scaffolds, allowing the sampling of a variety of known and commercially accessible eukaryotic metabolites and establishment of an initial library of ion fingerprints (substructures) which are organism independent, but highly specific to molecular space emerged through natural evolutionary processes. Synergic effects regarding structural continuum and conservation of eukaryotic metabolism and the presented integrated approach will be demonstrated on dopamine and *N*-acetyldopamine biotransformation as part of the tyrosine metabolism pathway (human) and puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. The relationship between biochemical pathways and mass spectrometric fragmentation pathways will be shown for phenylalanine biotransformation. An example of complete structure assembly from determined substructures will be given.

PREHLAD APLIKÁCIÍ CHEMOMETRIE V MEDICÍNE

JÁN MOCÁK a VIERA MRÁZOVÁ*

*Katedra chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Nám. J. Herdu, 917 01 Trnava, Slovensko
viera.mrazova@ucm.sk*

Chemometrické skúmanie dát, najmä mnohorozmerná analýza dát a umelé neurónové siete, sa v súčasnosti používa na vyšetrenie vzájomných vzťahov v rozsiahlej sérii dát, ktoré sú výsledkom experimentálnych meraní a pozorovaní rozličného druhu. Dôležitou úlohou chemometrických techník je zhodnotenie vzťahov medzi zvolenou cieľovou premennou a experimentálne zmeranými deskriptormi skúmaných objektov. Cieľom tejto práce je ukázať aplikácie viacerých zobrazovacích a klasifikačných chemometrických techník v medicíne.

Nádorové markery sú produkty patologicky zmenených tkanív, najmä nádorového pôvodu. Pomáhajú spresniť klinické štádium, biologický charakter malignity a majú význam pri monitorovaní účinnosti chemoterapie. Dosiaľ nebol charakterizovaný marker, ktorý by bol špecifickým pre daný typ nádoru, ani pre rakovinu všeobecne. Najúčinnější a všeobecne uznávaný pozitívny test na rakovinu pľúc je založený na histologickom vyšetrení príslušnej vzorky tkaniva. Tento spôsob je však pomerne invazívny a predovšetkým zaberá dlhý čas. Naopak, používanie nádorových markerov je menej invazívne a trvá oveľa kratšiu dobu. V naliehavých prípadoch môže teda zabrániť strate času potrebného na lekárske ošetrovanie.

Dá sa očakávať, že vhodnou kombináciou viacerých markerov možno predikčnú silu nádorových markerov značne zvýšiť, a to použitím metód mnohorozmernej analýzy dát. Kombináciou viacerých nádorových markerov, ako aj iných dôležitých údajov možno zvýšiť mieru špecifickosti, resp. mieru citlivosti. V tejto práci sme demonštrovali využitie metód mnohorozmernej analýzy dát na analýzu tumorových markerov významných v diagnostike a pri sledovaní priebehu nádorového ochorenia pľúc^{1,2}.

Glykovaný hemoglobín (HbA_{1c}) je frekvencovane využívaným dlhodobým ukazovateľom koncentrácie glukózy v organizme, keďže jeho hodnoty vyjadrujú stav za obdobie 6–8 týždňov. Jeho stanovenie je dôležité pri diagnostike trvalej hyperglykémie, pri priebežnej kontrole liečby *diabetes mellitus* (cukrovky) a porovnávaní rôznych liečebných postupov^{3,4}. HbA_{1c} vzniká neenzymatickou adíciou glukózy na voľné aminoskupiny bielkovinových reťazcov hemoglobínu. V súčasnosti existuje viac ako 30 spôsobov stanovenia glykovaného hemoglobínu, ktoré poskytujú odlišné výsledky⁵⁻⁷.

Na porovnanie dvoch metód stanovenia HbA_{1c} využívajúcich rozdielne referenčné systémy boli použité regresné metódy, ktoré na rozdiel od bežnej metódy najmenších štvorcov (OLS) uvažujú náhodnú chybu v oboch porovnávaných metódach, a to Demingovu regresiu, Passingovu-Bablokovu regresiu a ortogonálnu regresiu⁸.

Hypertenzia je nielen ochorením dospelých, ale ako sa ukázalo v posledných rokoch, čoraz častejšie sa s ňou stretávame u detí. Ochorenie prebieha latentne a vyúsťuje do poškodenia a následne zlyhania dôležitých orgánov. Je známym veľa rizikových faktorov, ktoré prispievajú k vzniku hypertenzie. Však pravým rizikom pre jej vznik je ich koincidencia.

Diagnostikovanie hypertenzie u detí je veľmi zložitá. Vyžaduje si to dlhodobéjšie monitorovanie krvného tlaku a biochemických parametrov, ktoré by lekára nasmerovali k určeniu diagnózy. S diagnostikou sa začína okolo troch rokov. Čím je dieťa mladšie tým je viac pravdepodobnejšie, že hypertenzia vzniká na podklade iného ochorenia. Na hodnotenie hypertenzie u detí sme využili metódy mnohorozmernej analýzy dát. Výstupom je komplexná informácia, ktorá dokáže poskytnúť ucelenejší výsledok ako hodnotenie jedného parametra.

Autori ďakujú za podporu grantu VEGA 1/0233/12.

LITERATÚRA

- Mrázová V., Mocák J., Varmusová E., Kavková D., Bednárová A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 210 (2009).
- Mrázová V., Mocák J., Varmusová E., Kavková D.: *Nova Biotechnol.* 8, 65 (2008).
- Roszyk L., Faye B., Sapin V., Somda F., Tauveron I.: *Ann. Endocrinol.* 68, 357 (2007).
- Veazie P. J., Johnson P. E., O'Connor P. J., Rush W. A., Sperl-Hillen J. M., Anderson L. H.: *Med. Hypotheses* 64, 792 (2005).
- Fleming J. K.: *Clin. Biochem.* 40, 822 (2007).
- Příbyl J., Skládal P.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 1952 (2006).
- Schnedl W. J., Lahousen T., Wallner S. J., Krause R., Lipp R. W.: *Clin. Biochem.* 38, 88 (2005).
- Mrázová V., Mocák J., Bednárová A., Balla J.: *Centr. Eur. J. Chem.* 8, 1216 (2010).

CHARAKTERIZACE MIKRO A NANO OBJEKTŮ PRO MEDICÍNU POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

**JAN PETR^{a*}, PAVLÍNA GINTEROVÁ^a,
KATEŘINA POLÁKOVÁ^b, JOANNA
ZNALEZIONA^a, ZDENKA MARKOVÁ^b,
KATEŘINA VÍTKOVÁ^c, VÁCLAV
PROCHÁZKA^c, VÍTĚZSLAV MAIER^a,
RADEK ZBOŘIL^b a JURAJ ŠEVČÍK^a**

^a Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů – Katedra analytické chemie a Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^b Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů – Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^c Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Česká republika
secjpetr@gmail.com

Současný vývoj diagnostických a léčebných metod v medicíně zahrnuje čím dál více použití objektů v rozměrech mikrometrů nebo nanometrů. Příkladem může být využití mikročásticové a nanočásticové imunodiagnostiky umožňující téměř homogenní imunoanalýzu (např. ve srovnání s klasickou ELISA technikou)¹, využití nanočástic jako kontrastní látky pro MRI diagnostiku² nebo využití mikro- a nanoagregátů pro cílené doručení léčiv v organismu³. Ve všech těchto případech je velice důležité důkladně charakterizovat mikro- a nanoobjekty jak z pohledu jejich chemického složení a struktury, tak z hlediska jejich koloidního chování a toxicity. Mezi jeden z velice obtížných úkolů se řadí právě studium koloidního chování, protože v tomto případě je nutné analyzovat mikro- a nanoobjekty v prostředí s vysokou iontovou silou a obsahujícím celou řadu dalších látek (v prostředí organismu). Pro tento úkol se jeví jako velice výhodné použít kapilární elektroforézu, která umožňuje nejen práci v takovém prostředí, ale navíc velice dobře reflektuje koloidní chování těchto větších objektů⁴.

V rámci tohoto příspěvku budou diskutovány možnosti použití kapilární elektroforézy pro charakterizaci čtyř typů mikro- a nanoobjektů: (i) mikroorganismů a buněk⁵, (ii) fluorescenčních nanočástic (kvantových teček)⁶, (iii) magnetických nanočástic⁷, a (iv) syntetických liposomů⁸. Všechny tyto objekty se v kapilární elektroforéze chovají

podobným způsobem a je možno je charakterizovat různými metodami (kapilární zónovou elektroforézou, izoelektrickou fokusací apod.) především podle účelu této charakterizace. Příkladem může být charakterizace uhlíkových kvantových teček pro aplikaci fluorescenčního značení buněk pomocí techniky micelární elektrokinetické chromatografie, kdy bylo cílem především popsat uniformitu disperze syntetizovaných částic jak co do náboje, tak co do hydrofobicity⁶. Naopak v případě buněk může být zase cílem analýza agregátů a jejich izoelektrického bodu pro charakterizaci jejich interakce například s léčivými⁵.

Obecně lze tvrdit, že kapilární elektroforéza je účinným nástrojem pro charakterizaci mikroobjektů a nanoobjektů a v této oblasti výzkumu se ukazuje jako neocenitelný nástroj pro další obory od materiálové chemie po medicínu.

Práce byla podpořena projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace CZ.1.05/2.1.00/03.0058 a projekt Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost CZ.1.07/2.3.00/20.0018).

LITERATURA

1. Teste B., Kanoufi F., Descroix S., Poncet P., Geogelin T., Siaugue J.M., Petr J., Varenne A., Hennion M.C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 3395 (2011).
2. Kluchová K., Zbořil R., Tuček J., Pečová M., Zajoncová L., Šafařík I., Mašláň M., Marková I., Jančík D., Šebela M., Bartoňková H., Belles V., Novák P., Petridis D.: *Biomaterials* 30, 2855 (2009).
3. Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R.: *Nature Nanotechn.* 2, 751 (2007).
4. Radko S.P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 23, 1957 (2002).
5. Petr J., Maier V.: *Trends Anal. Chem.* 31, 9 (2012).
6. Bourlinos A.B., Zbořil R., Petr J., Bakandritsos A., Krysmann M., Giannelis E.P.: *Chem. Mater.* 24, 6 (2012).
7. Petr J., Teste B., Descroix S., Siaugue J.M., Gareil P., Varenne A.: *Electrophoresis* 31, 2761 (2010).
8. Rucins M., Ginterová P., Znaležiona J., Maier V., Pajuste K., Ševčík J., Plotniece A., Petr J.: v přípravě.

INFLUENCE OF GROWING CONDITIONS AND TECHNOLOGICAL PROCESSING ON PROPERTIES OF FLOURS ASSESSED BY SPECTROSCOPIC METHODS

MARTIN POLOVKA^a, FERENC KAJDÍ^b, BLANKA TOBOLKOVÁ^{a,c}, MILAN SUHAJ^a, and ALENA BEDNÁRIKOVÁ^a

^a VUP Food Research Institute, Department of Chemistry and Food Analysis, Priemyselná 4, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic, ^b University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Science, Vár 2, Vár 2, HU-9 200 Mosonmagyaróvár, Hungary, ^c Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic
polovka@vup.sk

Summary

Complex analysis of the influence of growing and technological processing conditions on selected properties of group of commercial samples of Slovak and Hungarian wheat, spelt and rye flours prepared following organically and conventional production practices was performed. Solid flour samples were analyzed to ash and dry matter content as well as to minerals and trace elements content. Extracts of flours in 50% ethanol were treated by EPR and UV-VIS spectroscopy to determine the total polyphenols and flavonoids content as well as some other characteristics of antioxidant properties, including ABTS^{•+} and DPPH tests. Multivariate statistical analysis was subsequently applied on the whole dataset of experimental characteristics in order to assess the influence of way of production (organic vs. conventional) and technological processing (grinding) on sample properties. Besides that, the possibility of flours differentiation according to the previously mentioned characteristics as well as their origin was tested. By means of canonical discrimination analysis, flour samples were with > 95% correctness discriminated according to their country of origin. Taking into account the way of production, organically grown samples were with ~ 92% discrimination score differentiated from that produced by conventional production practices. Classification of samples according to the way of technological processing (grinding) reached ~ 96% and according to varietal composition, 100% correct classification. As the most significant experimental characteristics for the purposes of flour samples differentiation, minerals and trace elements content, as well as flavonoids content and radical-scavenging activity of extracts were recognized. The prediction ability of the statistical models was in all cases > 92%, in case of varietal composition, even 100%.

Introduction

Besides the traditional role of cereals as a source of nutrients, in the recent years, their growing utilization in so called “functional foods” has been noticed, utilizing either whole cereals or some their components. The conventional definition of functional foods is that it is a food where a new ingredient (or more of an existing ingredient) has been added and the new so-prepared product has a new function, frequently related e.g., to health-promotion or disease prevention. Functional foods must have the character of foods and their positive impact will be reflected already in the consumption quantity corresponding to normal food. They are not pills or other form of medication or supplements¹. One type of cereals with high potential in functional foods preparation represents spelt (*Triticum spelta*, L.) – a hexaploid species of wheat, being in the past an important staple in parts of Europe. Nowadays, it has again found a growing importance in market as a health food or a component of health beneficial foods, due to its agronomic, compositional and medical characteristics. This cereal has similar chemical composition as common wheat but its content of nutritionally important compounds is higher. According to some previously published analytical data, it contains about 57.9 % carbohydrates (excluding 9.2 % fibre), 17.0 % protein and 3.0 % fat, as well as dietary minerals and vitamins². Due to its moderate amount of gluten, it is suitable for baking purposes. Spelt is most frequently available in several forms (products) e.g., as coarse pale bread, biscuits, crackers or as spelt pasta. Besides that, grain of spelt is used in brewing industry and/or as feeding^{3–5}. Comparison of some characteristics of wheat, spelt and rye whole meal flours is presented in Table I (ref.^{6,7}).

For the preparation of functional foods containing cereals or its components, it is necessary to consider several factors. Although the content of the main components in the grain changes within the respective variety only statistically, significant effect on the chemical composition of grain could have soil composition, climatic and agro-technical conditions, and last but not least, the technologi-

Table I
Comparison of selected averaged characteristics of wheat, spelt and rye whole meal flours

Parameter	Wheat ⁶	Spelt ⁷	Rye ⁶
Proteins (g/100g)	11.55	12.8	11.27
Saccharides (g/100g)	71.03	62	71.76
Dietary fiber (g/100g)	9.1	11.4	13.3
Minerals (as ash, g/100g)	1.62	1.8	1.72
Riboflavin (mg/100g)	0.11	0.15	0.14

cal procedures/processes used in subsequent post-harvesting treatment⁸. All these factors can significantly affect the properties of grains/flours and the content of potentially interesting constituents, predetermining thus their use in functional foods production. In this context, procedures for the isolation of individual components of interest from cereal are of great importance, as well. Therefore, it is necessary to deal in details with the problems of the isolation of functional components from flour and aspects of their stability. Besides that, it is also important to deal with the effects of isolation/extraction conditions on the content of functional components (e.g., polyphenols, flavonoids, organic acids).

This contribution, as a part of a complex study, focused on potential of some cereals to serve as functional foods components themselves, or after their additivation / doping by mixing with some other components of natural origin with known antioxidant potential and health beneficial effects (e.g., anthocyanins, flour or medical herbs extracts). As an input information for further processing, the influence of the origin & growing condition (organic vs. conventional farming practices), technological processing (degree of grinding) as well as varietal composition on selected properties of group of 24 commercial wheat, spelt

and rye commercial flour samples of Slovak and Hungarian origin was performed. The basic characteristics of solid samples, i.e., dry matter and ash content, but also minerals and trace elements content was evaluated. Besides that, antioxidant properties of flours extracts were assessed by means of UV-VIS and EPR spectroscopy, involving several assays. Amino acids profile was determined by HPLC-MS system. Results obtained were correlated via simple correlations with total polyphenols and flavonoids content. Besides that, the multivariate statistical analysis was used to evaluate the influence of origin, varietal composition, way of production and technological processing on sample properties. In addition, the possibilities of some flour properties (ash, dry matter content) prediction from spectral characteristics, was tested.

Experimental

Samples

For the purposes of this study, 24 commercial samples of Slovak and Hungarian organic and conventional smooth, semi-smooth, rough and whole meal wheat, spelt and rye flours were selected. Detailed description of samples is given in Table II.

Table II
Basic characteristics of the samples of Slovak and Hungarian organic (O) and conventional (C) flours under study

ID	Sample characterisation	Country of origin*	Way of production**	ID	Sample characterisation	Country of origin*	Way of production**
F1	Wheat, whole meal, smooth	SK	O	F13	Rye, whole meal, smooth	SK	C
F2	Wheat, whole meal	HU	O	F14	Spelt, whole meal, smooth	SK	O
F3	Wheat, whole meal, stone mill	HU	O	F15	Spelt, whole meal	HU	O
F4	Wheat, smooth	HU	O	F16	Spelt, whole meal, stone mill	HU	O
F5	Wheat, whole meal, smooth	SK	C	F17	Spelt, smooth	HU	O
F6	Wheat, semi-smooth	SK	C	F18	Spelt, whole meal, smooth	SK	C
F7	Wheat, rough	SK	C	F19	Spelt, smooth	SK	O
F8	Wheat, smooth	SK	C	F20	Spelt, whole meal, rough	SK	O
F9	Rye, whole meal, smooth	SK	O	F21	Spelt, smooth	HU	O
F10	Rye, whole meal	HU	O	F22	Spelt, whole meal	HU	O
F11	Rye, whole meal, stone mill	HU	O	F23	Spelt, whole meal	HU	O
F12	Rye, smooth	HU	O	F24	Spelt, semi-smooth	HU	O

* HU – Hungary, SK- Slovak Republic;** O – organic, C – conventional

Basic characteristics of solid flours

Solid flour samples were evaluated to dry matter and ash content using the standard AOAC methods^{9,10}. Minerals and trace elements content (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na and Zn) was determined using the atomic absorption spectrometry – AAS. For these purposes, Perkin Elmer 4100 (Perkin Elmer, USA) spectrometer, equipped with a deuterium lamp background-correction system was employed, using an air/acetylene flame and the flame-ionization detector¹¹. Besides that, total nitrogen content was determined using the routine Kjeldahl method¹².

Extracts preparation

For EPR and UV-VIS experiments, exactly 50 ml of 50% ethanol/water solution (v/v) was poured over 2.5 g of respective flour sample and the extraction was performed at ambient temperature. The mixture was shaken on laboratory shaker (Innova 2000, USA) for 1h at 150 rpm. Subsequently, the supernatant was separated from the solid matter using the laboratory ultracentrifuge (SciQuip, UK) at 9200 rpm at ambient temperature during 10 min. The so prepared extracts were stored at ambient temperature in darkness between the experiments. For HPLC analysis, 1 g of flour sample was mixed with 20 ml of acetic acid solution in water (0.1 M) and the aliquot of internal standard d3-Glu (50 µl) was added. The mixture was shaken at 150 rpm for 30 min in laboratory shaker at ambient temperature and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at the temperature of 0 °C. After the filtration, the supernatant (200 µl) was mixed with 100 µl of isotopically labelled internal standard and 800 µl 0.1% solution of acetic acid (in water, v/v) and used in analysis.

HPLC-MS, UV-VIS and EPR spectral characteristics

Amino acids (AA) profile and their quantification was performed by HPLC-MS-MS with positive electrospray ionization using an Agilent 6410 Triple Quad detector (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to a HPLC system Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) consisting of a binary pump, a vacuum degasser, a autosampler, and a thermostated column compartment. The analytical separation was performed on an a Purospher® STAR RP-8ec (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) using an isocratic mixture of 100 ml acetonitrile and 500 ml of water solution of perfluorooctanoic acid (PFOA) (0.05 mM) at the flow-rate of 0.5 ml min⁻¹ at temperature of 25 °C. Free individual amino acids was quantified using linear calibration curve established with standard solution using the L-amino acids kit containing the 98% purity standards of 20 amino acids (Sigma – Aldrich). As an internal standards, a lyophilised mixture of isotopically labelled L-amino acids (ChromSystems, München, Germany) and standard of d3-glutamic acid (d3-Glu, 97%, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) were used. Quantification was per-

formed by comparison of the peak area ratio of selected amino acids with relevant internal standard monitored using the MRM transitions. The following instrumental (ion source) parameters were used for amino acids analysis: drying gas (N₂) flow, 8 L min⁻¹; gas temperature, 320 °C; nebulizer pressure 50 psi; capillary voltage, 3.0 kV; fragmentor voltage, 50–100 V (depending on analyte); collision energy, 2–30 eV (depending on analyte); dwell time, 50 ms. All the samples were analysed in two parallel repetitions. The determined concentrations of 21 free amino acids were counted together and the result was presented as total amino acids content.

UV-VIS experiments were carried out with both, extracts and solid samples, using a UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 with accessory. The experiments with solid samples were performed in attenuated reflectance mode using the Large Integrating Sphere Assembly LISR 3100 (Shimadzu, Kyoto, Japan) employing quartz cell enabling reflection measurements from the surface of defined upper layer of flours samples. The reflectance spectrum of the respective flour sample was recorded in triplicates in the spectral range from 200 to 2500 nm and averaged for use in the data analysis. Flours reflectance spectra visualisation and comparison was performed using the spectroscopic data evaluation environment of Panorama 3.1 (Labcognition GmbH & Co. KG) enabling the multivariate transformation of spectra by the method of principal component factoring (PCF). Before the PCF all the spectra were smoothed by the Savitzky-Golay method to remove baseline shifts and superimposed peaks and normalised by data scaling and centering techniques. Radical-scavenging activity of solid samples was characterized by UV-VIS, employing the modified Quencher method¹³. The content of total polyphenols (TPC) expressed as Gallic acid equivalents¹⁴ and of flavonoids (TFC) expressed as Rutine equivalents was determined in the extracts. Besides that, radical-scavenging activities of extracts were evaluated using the solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation-radical (ABTS⁺), respectively¹⁵. All the experiments were performed in duplicates.

The entire EPR experiments were performed in duplicates, using a portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker Biospin, GmbH, Karlsruhe, Germany) with accessory. The ability of flour extracts to terminate DPPH and ABTS⁺ radicals was evaluated. The ABTS⁺/DPPH radical-scavenging activities were expressed as Trolox equivalents (TEAC_{ABTS⁺/DPPH})¹⁴.

Multivariate statistical methods were used to distinguish the samples according to selected characteristic, i.e., origin, way of production, varietal composition, way of technological processing, employing methods of principal component analysis, principal component factoring, canonical, and kth neighbour discriminant analysis and classification. These calculation were performed by means of Unistat®6.1 (Unistat, London, United Kingdom) statistical software, taking into consideration all the experimental

data obtained from HPLC-MS, AAS, UV–VIS and EPR experiments. The recognizability of discriminant model was determined as the percentage of the correctly classified samples in the training data set. The prediction ability was tested, as the percentage of the samples correctly classified in the leave-multiple-out cross-validation approach¹⁶.

Results and discussion

As the basic parameters of the studied flour samples, ash and dry matter content were determined. Results obtained indicated, that there is not a clear difference between the samples following neither from their origin, way of production, nor varietal composition, as the results within the common groups are statistically distributed.

Regarding the total nitrogen content, it is obvious that samples from Hungary reveal in average its slightly higher contents than the Slovak ones, exception for some case,

where practically either none or only statistically negligible differences were found. There is also not clear relationship between the nitrogen content and the varietal composition of flours, the same for the way of production. For the later mentioned, with respect to presupposed much more intensive fertilization in conventional farming, one could expect at least slightly higher content of nitrogen, but this expectation was not supported by the results. Results presented in Table III also indicate that there exist some relationship between the amino acids content and the way of sample processing (grinding), which is most probably the result of modified extraction ability of amino acids from respective flours in dependence on the degree of grain micronization. Practically the same, unambiguous trends and relationships were obtained also for other evaluated parameters of flours and their extracts, as was also observed for the results of Quencher assay, content of polyphenols or flavonoids.

Table III

Averaged results (mean± SD, $n=2$) of some characteristics of solid flour samples and their extracts in 50% EtOH (v/v)

ID	Ash [%]	Dry matter [%]	Total nitrogen content [%]	Total AA content [mg kg ⁻¹]	Quencher [mg kg ⁻¹]	TPC [mg kg ⁻¹]	TFC [mg kg ⁻¹]
F1	1.9±0.0	89.2±0.0	1.8±0.1	919.3±0.9	11.3±1.0	1433.2±16.6	310.3±43.2
F2	1.6±0.0	89.2±0.0	2.3±0.1	1473.6±5.3	12.7±2.3	1734.7±70.4	163.8±2.5
F3	1.9±0.4	89.4±0.1	2.3±0.1	1448.1±3.5	11.8±1.4	1719.2±55.6	185.8±3.8
F4	0.8±0.0	89.0±0.0	2.3±0.1	989.0±6.5	10.8±2.0	1548.2±51.2	560.9±19.3
F5	1.9±0.0	88.7±0.1	1.9±0.1	1273.1±8.5	14.2±1.7	1580.6±29.5	127.5±1.8
F6	0.6±0.4	88.5±0.1	1.6±0.1	503.0±6.7	8.3±3.1	1492.7±3.7	441.5±9.6
F7	0.4±0.0	89.4±0.0	1.7±0.1	482.4±8.0	8.6±1.7	1273.5±55.2	294.7±15.7
F8	0.5±0.0	88.5±0.0	1.7±0.1	526.9±2.9	10.9±2.4	1330.0±39.4	182.5±6.1
F9	1.6±0.0	89.4±0.1	1.3±0.1	2173.9±1.3	11.0±1.3	1376.3±3.4	432.9±6.6
F10	1.7±0.0	89.5±0.3	1.6±0.1	2488.8±12.8	14.6±0.2	1395.6±15.6	558.5±4.4
F11	1.9±0.0	89.0±0.1	1.2±0.1	1736.2±28.5	12.9±0.9	1677.5±71.2	480.9±15.9
F12	0.7±0.0	88.2±0.8	0.8±0.0	1168.9±7.5	10.2±1.2	833.1±12.9	417.0±4.3
F13	1.6±0.0	89.2±0.0	1.3±0.1	1733.9±3.2	13.2±1.6	1328.3±81.3	770.5±12.1
F14	2.1±0.0	89.7±0.1	2.3±0.1	1495.8±30.7	12.4±2.0	1825.8±221.4	271.8±37.8
F15	2.2±0.0	89.8±0.0	2.6±0.1	1488.1±5.9	13.9±3.1	1964.9±427.5	214.8±25.7
F16	2.1±0.0	89.8±0.0	2.6±0.1	1428.9±18.2	12.0±3.2	1569.8±3.5	182.7±0.6
F17	1.0±0.0	89.3±0.0	2.4±0.1	818.6±2.1	9.5±3.4	1392.3±0.8	114.9±13.4
F18	2.5±0.0	90.3±0.0	2.2±0.1	1521.9±19.4	12.1±3.3	1411.5±74.6	274.9±6.9
F19	1.1±0.0	89.4±0.0	2.3±0.1	1002.2±6.6	13.0±3.2	1390.9±44.4	143.5±14.8
F20	1.4±0.0	89.8±0.0	2.1±0.1	1263.5±38.9	9.6±2.0	1433.0±54.6	129.8±4.5
F21	0.8±0.0	89.7±0.0	2.1±0.1	771.0±6.6	10.8±0.1	1339.3±64.5	187.8±6.7
F22	2.1±0.0	90.1±0.1	2.2±0.1	1379.1±17.3	12.8±1.2	1728.2±28.6	181.2±13.1
F23	1.1±0.0	88.4±0.1	1.5±0.1	810.1±7.9	10.2±1.1	1276.8±26.5	143.5±3.4
F24	1.1±0.0	89.0±0.3	1.3±0.1	722.0±0.2	9.8±0.6	1110.1±57.8	95.0±6.1

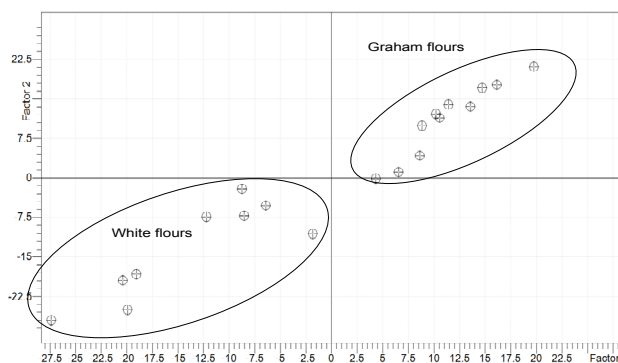


Fig. 1. Wheat, rye and spelt flours spectral reflection data projection by principal component factoring (each point represents a reflection spectrum of sample in VIS spectral region). For the differentiation purposes, flour samples were classified into two sub-groups as graham (whole meal) and white (the rest)

Correlation matrix of all determined characteristics (data not presented) indicates moderate correlations of majority of determined characteristics, revealing R^2 values within the range of $<0.4\text{--}0.6>$; however, in some cases, strong correlations were confirmed e.g. between the total amino acids content and TEAC values evaluated both from UV-VIS and EPR measurements with ABTS^{++} and DPPH radicals.

However, considering the results of all methods and assays used, it can be concluded, that any single analytical method or their combination and/or simple mutual correlation do not offer an unambiguous answer on the topics of the similarities/differences between the samples from their origin, way of production, processing or varietal composition points of view. Thus, multivariate statistical analysis was employed to find the similarities and differences within the group of samples of common characteristics and between the individual groups and to perform the differentiation and classification of individual flour samples.

By the method of principal component factoring (PCF), the whole UV-VIS-NIR reflection spectra were

processed, separately for respective spectral regions (UV, Visible and NIR). While the spectra from UV and NIR regions do not offer clear differentiation of samples into subgroups by any of chosen criteria (origin, way of production, varietal composition, way of grinding & processing), this is not the case of VIS-spectra (part of complex reflection spectra recorded in the spectral range 330–780 nm). As is clearly indicated on Fig. 1, from the UV-VIS-NIR reflection measurements of flours the data obtained in the visible spectral range, it is possible to differentiate the wheat flours according to way of grinding. From practical reasons, samples were classified only into two sub-groups – one for whole meal flours (labelled as graham) and the 2nd for the remaining samples (refer to Table II for further details).

Very promising results offered the processing of the entire group of experimental characteristics by the methods of principal component analysis, canonical discrimination analysis and k^{th} nearest neighbour classification. Principle component analysis was able to explain in all studied cases the variability of the dataset by 78 % and 83 % of the variability of the dataset (taking into consideration the cumulative % of variance of first 3 and 4 principal components, respectively). Eigenvalues indicates that in the differentiation by PCA, very important role have the total nitrogen content, content of amino acids and total polyphenols. The other characteristics contributed to principal components construction by various, but usually lower significance.

CDA, in dependence on the selected discrimination criterion, possessed very high recognition scores, reflecting the successfulness of the discrimination of the samples into respective groups on the basis of their experimental characteristics, as clearly indicated in Table IV. The lowest recognition was obtained in classification of samples according the way of production (farming), in which 3 organically and 1 conventionally produced sample were misclassified. As regards the importance of individual characteristics for the discrimination, it should be noted here that it vary with the selected criterion, however, important role of individual minerals and trace elements, followed by TPC/TFC and last but not least, individual

Table IV

Results of canonical discrimination analysis, k^{th} nearest neighbour classification and prediction tests by means of CDA, of flour samples under study and their extracts according to various discrimination parameters. The whole dataset of experimental characteristics was taken for the discrimination and classification. Results are expressed as % of correctly classified samples

Method	Origin [%]	Way of farming [%]	Varietal composition [%]	Technological processing (grinding) [%]
Canonical discrimination	95.8	91.7	100	95.8
K^{th} nearest neighbour	k=1	100	100	100
	k=2	95.8	100	95.8
Prediction ability by CDA	92.9	97.7	100	97.7

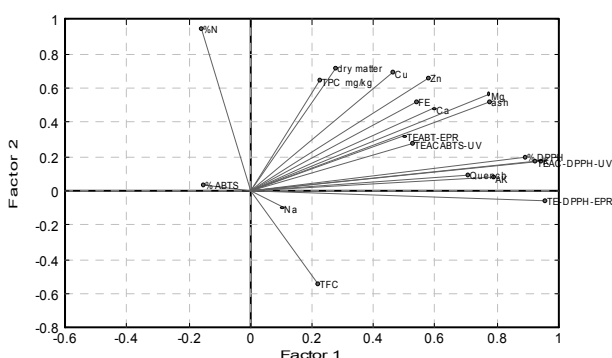


Fig. 2. Plot of factors (Varimax rotation) indicating the importance of individual experimental characteristics of flour samples and their extracts for the purposes of samples differentiation according to chosen criteria

characteristics of antioxidant properties. Similar results give also processing of the data by the principal component factoring in varimax rotation. As follows from the plot of factors depicted on Fig. 2, 4 vectors are lying in different sectors of the plot than those of rest of the group, corresponding to the content of nitrogen, total flavonoid content, as well as sodium content and ABTS⁺ radical-scavenging ability assessed by UV-VIS.

Prediction ability is one of the most important characteristics of the classification model/procedure, reflecting the ability of the statistical model to correctly classify the unknown samples (samples of unknown affiliation), just on the basis of comparison of its characteristics with those of already classified samples. For the purposes of this study, the prediction ability was tested by CDA in leave-multiple-out approach, assigning in turn up to 20 % of the samples as unknown. Percentage of correctly predicted samples reached in each cases high value, as indicated in Table II, the lowest in prediction of sample origin and the highest in the prediction of sample varietal composition.

Conclusion

The spectral characteristics of 24 commercial flour samples and their extracts in 50% EtOH were studied by UV-VIS-NIR, EPR, AAS and HPLC-MS methods, in order to assess the influence of several factors, i.e., origin of sample, growing conditions, varietal composition and technological processing on their properties. As follows from the results, besides the antioxidant properties, the content of minerals and trace elements, but also the total nitrogen and amino acids content is significantly influenced by the above-mentioned conditions. Additional experiments with samples of identical origin but various growing conditions are in progress, in order to specify the most proper conditions for grain production and processing, from functional components content and health-beneficial properties maintenance points of view.

This publication is the result of Project HUSK – 0901/1.2.1/0010 „Utilization of regional sources for functional food production“ implementation, supported by the European Regional Development Fund within the Hungary – Slovakia Cross-border Cooperation 2007-2013 Programme. This contribution is also the result of the project implementation „Centre of Excellence for Contaminants and Microorganisms in Food“ supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.



Building partnership



<http://www.husk-cbc.eu>

REFERENCES

1. Roberfroid M.: in: *Functional Food: Concept to Product (2nd edition)*, Chap. 1, p. 3. Woodhead Publishing, Cambridge 2011.
2. Gabrovská D., Fiedlerová V., Holasová M., Mašková E., Smrčinov H., Rysová J., Winterová R., Michalová A., Hutař M. *Food Nutr. Bull.* 23, 3 (2002).
3. Bonafaccia G., Galli V., Francisci R., Mair V., Skrabanja V., Kreft I.: *Food Chem.* 68, 4 (2000).
4. Kohajdová Z., Karovičová J.: *Potravinárstvo* 1, 2 (2008).
5. Abdel-Aal E.-SM., Rabalski I.: *Food Chem.* 111, 1 (2008).
6. Vojtaššáková A., Kováčiková E., Simonová E., Holčíková K., in: *Obiloviny a strukoviny: potravinové tabuľky*. Výskumný ústav potravinársky, Bratislava 1999.
7. Ranhotra G.S., Gelroth J.A., Glaser B.K., Lorenz K. J.: *Food Compos. Anal.* 9, 1 (1996).
8. Příhoda J., Skřivan P., Hrušková M.: in: *Cereální chemie a technologie I.: Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
9. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). Official Method 923.03: *Determination of Ash in Wheat Flour* (1990).
10. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). Official Method 925.10: *Determination of Dry matter and Moisture in Cereal Products* (1990).
11. Suhaj M., Koreňovská M.: *Food Chem.* 107, 1 (2008).
12. EN ISO 20483: *Cereals and pulses – Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content – Kjeldahl method* (2006).
13. Serpen A., Gökmen V., Pellegrini N., Fogliano V.: *J. Cereal Sci.* 48, 3 (2008).
14. Polovka M., Šťavíková L., Hohnová B., Karásek P., Roth M.: *J. Chromatogr., A* 1217, 51 (2010).
15. Suhaj M., Ráková J., Polovka M., Brezová V.: *Food Chem.* 97, 4 (2006).
16. Berrueta L.A., Alonso-Salces R.M., Héberger K.: *Chromatogr., A* 1158, 1 (2007).

MOŽNOSTI VYUŽITIA HPLC-NMR PRI STANOVENÍ ANTIOXIDANTOV, KOMPLEXOV A ĎALŠÍCH LÁTOK

JAROSLAV ŠKUBÁK*, SZABOLCS
**NAGY, TIBOR LIPTAJ a JOZEF
LEHOTAY**

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 34 Bratislava, Slovensko
jaroslav.skubak@stuba.sk*

Kombinácia HPLC s NMR poskytuje možnosť látky nielen stanoviť, ale ich aj identifikovať. Budú prezentované výsledky experimentálnej práce a ukázané možnosti odstránenia problémov a namerania spektier potrebných na identifikáciu stanovovaných látok. Vo všeobecnosti prevláda názor, že kombinácia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s nukleárnou magnetickou rezonanciou je ekonomicky vysoko náročná, ale poskytuje unikátne výsledky o štruktúre analytu.

Spojenie HPLC s NMR kladie neštandardné nároky na podmienky separácie v HPLC a identifikáciu v NMR. HPLC podmienky je nutné prispôsobiť extrémne vysokým hmotnostným koncentráciám /v rozsahu 5 až 10 mg ml⁻¹ analytu /a samotná separácia sa uskutočňuje skôr v preparatívnych podmienkach a často ani takto získaná koncentrácia nie je dostatočná na identifikáciu látky a vyžadujú sa rôzne postupy zakonzentrovania analytu na výstupe s chromatografickej kolóny. Pre NMR sú koncentrácie po HPLC separácii spravidla pod mezou detekcie a preto sú nutné postupy odstraňovania vplyvov použitých rozpúšťadiel, nakoľko môže prichádzať k interferencii (prekrytie časti NMR spektra) je nutná fokusácia na hľadané funkčne skupiny, získanie plnohodnotného NMR spektra je takmer nemožné. NMR stanovenie vyžaduje prácu v deuterovaných, izotopicky stabilných rozpúšťadlách, ich cena je väčšinou príliš vysoká a preto je nutné ich nahrádzať lacnejšími, stanovenie komplikujúcimi rozpúšťadlami. Veľmi dôležitým aspektom je aj čas analýzy, s klesajúcou koncentráciou exponenciálne rastie dĺžka analýzy a tým aj nároky na strojový čas, čo pri zariadeniach cenovej kategórie NMR predražuje ceny analýz. Niekedy HPLC-NMR meranie trvá niekoľko hodín až týždňov, čím sa nielen komplikuje využitie NMR na iné účely, ale aj hrozí rozklad alebo premena skúmaného analytu.

Pri extrémnom prekročení kapacity chromatografickej kolóny, prichádza k zhoršeniu separácie, prípadne dokonca k skráteniu životnosti kolóny alebo jej zničeniu. Za účelom dosiahnutia identifikácie zložky systému sa využívajú metódy umožňujúce zvýšenie koncentrácie zakonzentrovaním, predĺžením zdržného času v NMR kyvete a výmeny nevhodných nedeuterovaných rozpúšťadiel za deuterované.

Jedným z príkladov praktického využitia HPLC-NMR v praxi je identifikácia a stanovenie niektorých flavonoidov v pive. Flavonoidy sú významnou skupinou antioxidantov, uvoľňujú sa napríklad tepelným spracovaním rastlinných materiálov. Pri príprave piva sú jedným z ich hlavných zdrojov chmeľ¹ a jačmeň². Pivo je veľmi obľúbený produkt a jedným z parametrov jeho kvality by mohol byť obsah antioxidantov. Veľmi často opomínanou skupinou látok sú produkty degradácie antioxidantov, ktoré majú často mutagénne a karcinogénne účinky a práve preto je podstatné ich sledovanie a identifikácia. NMR je jedným z unikátnych možností ich identifikácie. Pivo predstavuje veľmi komplikovanú maticu obsahujúcu alkohol, cukry, bielkoviny a ďalšie lipofilné zlúčeniny, ktoré výrazne komplikujú stanovenie fenolických antioxidantov. Preto prvým krokom musí byť odstránenie väčšiny týchto interferujúcich látok a to sa uskutočňuje pomocou modifikovaných metód SPE (solid phase extraction).

Ďalším krokom je zakonzentrovanie požadovaných látok do najvyšších možných koncentrácií, pri ktorých ešte neprichádza k poškodeniu HPLC kolón a súčasne sú látky rozpustné v mobilnej fáze. Ďalšou možnosťou je skonzentrovanie vzorky v predkolóne alebo na hlave kolóny. Podmienkou úspešnej separácie je nájdenie chromatografických podmienok, ktoré sú kompatibilné s NMR detekciou napr. limitácia v použití tlmivých roztokov v mobilnej fáze alebo rozpúšťadiel s väčším počtom neekvivalentných protónov. Počas separácie zmesi s komplikovanou maticou a veľmi koncentrovaných roztokov môže prísť k zhoršeniu separácie stanovovanej látky od prípadných interferujúcich látok a preto sa pred vstupom do NMR detektora sa umiestňuje nedeštruktívny detektor. Pre antioxidanty je jedným z ideálnych detektorov elektrochemický detektor³, ktorý je deštruktívny a tak vzniká nutnosť použiť UV-VIS detekciu. Pri HPLC separácii často prichádza k zriedeniu hľadaných analytov a súčasne pri preparatívnej chromatografii prichádza k súbežnej elúcii viacerých látok, preto je často potrebné využiť viacdimenzionálnu chromatografiu a viacnásobné opakovanie separácii, čo často vedie k veľkým nárokom na prístrojové vybavenie, ktoré nie vždy spĺňajú až príliš automatizované robotické systémy. V našich podmienkach vznikla nutnosť hardwarovo aj softwarovo upraviť a prispôsobiť staršie zariadenia na požiadavky jednotlivých aplikácií. Za účelom dosiahnutia potrebnej koncentrácie pre NMR na výstupe z HPLC kolóny je potrebné použiť rôzne techniky zakonzentrovania analytov. Najjednoduchší je opakovaný zber frakcií, následné odparenie časti organických rozpúšťadiel a klasická extrakcia alebo SPE. Väčšinou je nutné ďalšie zakonzentrovanie, napríklad odparením a rozpustením vzorky v minimálnom objeme deuterovaného rozpúšťadla. Problémom antioxidantov je tepelná nestálosť a ľahká možnosť oxidácie kyslíkom alebo ďalšími zložkami systému. Výho-

dou SPE je možnosť odstránenia mnohých týchto negatívnych vplyvov v *on-line* SPE móde, nevýhodou je ale cena a nutnosť premývania veľkými nadbytkami deuterovaných rozpúšťadiel najmä D₂O. Nevyhnutným predpokladom úspešného využitia SPE je znalosť kapacity danej kolónky pre danú látku v danej matici a rovnako aj výťažnosť.

Za účelom identifikácie neznámych flavonoidov boli prvé testy robené so štandardmi látok, ktoré sa nachádzajú v zmesi a patria do tej istej skupiny látok. Boli pripravené referenčné roztoky so známymi koncentraciami a tzv. „umelé pivo“. „Umelé pivo“ je roztok obsahujúci hľadané látky, kde matrica vzorky je simulovaná prídavkom alkoholu, cukrov alebo ďalších látok za účelom zistenia vplyvu interferentov na analýzu. Po odmeraní referenčných roztokov a „umelého piva“, je možné jednoznačne identifikovať píky v oblasti aromatickej časti NMR patriace k jednotlivým (fenolickým) antioxidantom. Následne je možné zmerať R spektrum piva. Na potvrdenie identity a kvantity jednotlivých píkov je možné požitie vnútorného štandardu (nitro-fenoly) alebo prídavok známeho množstva referenčných látok do piva.

Teoreticky najvýhodnejším spojením, ktoré nám poskytuje najviac informácií o skúmanom systéme je priame *on-line on-flow*, keď sú použité deuterované rozpúšťadlá a výstup z HPLC kolóny je priamo spojený s celou v NMR magnet, príkladom je sledovanie asociačných komplexov. Pri tomto spojení sa používa deuterovaná voda, nakoľko voda obsahuje veľmi veľa ¹H (110 mol l⁻¹) a jeho signál je veľmi široký, látky s koncentraciami mmol l⁻¹ nie sme principiálne schopní detegovať. Pri acetonitrile dokážeme pracovať aj s nedeuterovaným rozpúšťadlom stratíme však časť NMR spektra, v ktorej sa nachádzajú chemické posuny daného rozpúšťadla, ani to nie je možné robiť priamo, nakoľko aj tento signál by prekročil dynamický rozsah detektora, ale je tu možnosť potlačiť tento signál vhodne zvolenou pulznou frekvenciou danej oblasti pomocou SCAUT SCANu (identifikácia majoritných signálov rozpúšťadla) a pomocou WET frekvencie (dekupling) tieto oblasti odfiltrujeme. Samozrejme tým strácame informácie z daných oblastí NMR spektra a ich okolia.

Nezanedbateľným problémom je tvorba ¹³C satelitov, ktoré sú v klasických ¹H spektrách zanedbateľné. Pri kombinácii HPLC-NMR sú jednoznačne najdominantnejšími signálmi v spektre. Sledovanie asociačných komplexov je veľmi významné najmä u rôznych farmaceutík nakoľko ich vytváraním napr. s alkoholom prichádza k zmene účinku daného liečiva príkladom môžu byť niektoré deriváty diazepámu, keď prichádza k zmene sedatívneho účinku na narkotický a priame spojenie HPLC s NMR nám v tomto prípade dokáže dať niektoré odpovede týkajúce sa prítomnosti a aj štruktúry daných systémov. Ďalším dôležitým aspektom je časovo náročnosť merania. Používa sa prerušenie prietoku mobilnej fázy s následným zadržaním analytu v NMR magnet. Takto napríklad možno sledovať rozpadové charakteristiky vznikajúcich komplexov, prípadne zistiť viac informácií o daných látkach v tomto móde možno získať klasické protónové spektrum. Chromato-

grafické podmienky sú ale často za hranicou stability kolóny, čo vedie k rýchlej degradácii HPLC kolóny. Rovnako tieto metódy vyžadujú aspoň približnú optimalizáciu separácie, nakoľko často prichádza k „prerazeniu“ kolóny a vďaka tomu strate separačných vlastností. Bežne používaný parameter v kvapalinovej chromatografii je iónová sila a zmena pH. Tieto majú veľký vplyv na zmenu podmienok v magnetickom poli. V našom prípade práve pri sledovaní tvorby komplexov zvyšovaním iónovej sily viedlo k zúženiu píkov a tým aj efektívnej koncentrácii analytu v NMR cele, súčasne ale prítomnosť iónov viedla k destabilizácii magnetického poľa a bolo nutné pracovať s roztokom s čo najnižšou iónovou silou. Veľmi podstatným parametrom pri *on-line* meraní je aj stabilita prietoku a tlaku v NMR cele a tým spojená stabilita zloženia jej obsahu aj najmenšie výchylky sa výrazne prejavujú na kvalite zameraného spektra. Samotné NMR meranie je založené na priamom sčítaní jednotlivých scanov (šum sa spriemeruje a signál sa zvýrazní), ak sú však polohy píkov nedostatočne stabilné vedie to k rozšíreniu píkov a tým aj poklesu pomeru signál/šum.

Veľmi vďačným príkladom využitia HPLC-NMR sú analýzy neznámych látok v odpadových vodách. Ako príklad uvedieme jeden neštandardný model keď bola snaha zistenia pôvodcu znečistenia odpadovej vody celkovým organickým a anorganickým dusíkom. Odpadová voda na vstupe z viacerých zdrojov obsahovala minimum celkového dusíka, na výstupe z viacstupňovej čistiarne však obsahovala nadlimitnú hodnotu. Mnohé organické látky obsahujúce N sú stabilné voči oxidácii pri stanovovaní celkového dusíka, preto bola skúmaná ich prítomnosť. Odpadová voda je veľmi vhodná vzorka pre identifikáciu majoritných zložiek, nakoľko väčšinou je možné použiť SPE predkoncentráciu bez nutnosti ďalšej úpravy. V stabilnej / chemicky upravenej a odstátej / odpadovej vode sú už väčšinou dominantné látky v stabilnom stave a preto nie je nutné venovať toľko pozornosti ich stabilite a oxidácii. Veľmi výhodnou metódou je použitie *off-line* spojenia HPLC s NMR, keď sa v klasických HPLC podmienkach uskutoční separácia pridaním vody sa zníži elučná sila a použitie ďalšej SPE vedie k výmene nedeuterovaného rozpúšťadla za deuterované. Pokusy získať ¹⁵N NMR neboli úspešné, ¹H spektrá poukázali na cukor pripomínajúcu veľkú molekulu, pochádzajúcu z priemyselného detergentu. Týmto spôsobom sa podarilo identifikovať hlavnú zložku znečistenia a následne sa zistilo, že niektoré mikroorganizmy sa prispôbili, začali tento produkt degradovať, zo vzduchu prijímali dusík vo forme N₂ potrebný k existencii, vytvorili si vlastné /toxické/ prostredie a tým spôsobom zvyšovali celkový dusík v odpadovej vode. Problém bol odstránený práve prídavaním biologického substrátu bohatého na dusík v procese čistenia odpadovej vody.

Praktické skúsenosti s NMR poukazujú na experimentálnu náročnosť spojenia HPLC-NMR. Úspešne boli namerané *on-line on-flow* NMR spektrá komplexov, *on-line stop-flow* NMR spektrá vysokokonzentrovaných látok, *off-line* NMR spektra piva, *off-line* s využitím SPE NMR spektra odpadových vôd. Experimenty ďalej pokračujú

najmä v *off-line* móde s využitím SPE techník.

Chceli by sme sa poďakovať prof. J. Čižmárikovi, Ing. N. Pronayovej, Ing. M. Kaliňakovi, Bc. M. Karabínovi, a Ing. J. Kováčovej za pomoc a podporu. Grantovej agentúre Slovenskej republiky (VEGA 1/0164/11) a Národnému programu na podporu NMR infraštruktúry na Slovensku ďakujeme za finančnú podporu, bez ktorej by nebolo možné uskutočňovať výskum v tejto oblasti.

LITERATÚRA

1. Kováčová J., Lehotay J., Ťurčová E., Mocák J., Čižmárik J.: *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 34, 329 (2011).
2. Cacciola F., Jandera P., Hajdú Z., Česla P., Mondello L.: *J. Chromatogr., A* 1149, 73 (2007).
3. Jandera P.: In: *Beer in Health and Disease Prevention*, (Preedy V. R., Ed.), Chap. 98, pp. 1003–1014, Academic Press, Elsevier 2009.

SKÚŠKY SPÔSOBILOSTI AKO ÚČINNÝ NÁSTROJ ZABEZPEČENIA KVALITY VÝSLEDKOV SKÚŠOK V SKÚŠOBNOM LABORATÓRIU ŠTÁTNEHO VETERINÁRNEHO A POTRAVINOVÉHO ÚSTAVU BRATISLAVA

LUBICA ŠTULLEROVÁ
a **OLGA KOVÁROVÁ**

Štátny veterinárny a potravinový ústav Bratislava, Botanická 15, 842 52 Bratislava, Slovensko
stullerova@svuba.sk, kovarova@svuba.sk

Stručná charakteristika organizácie

Štátny veterinárny a potravinový ústav Bratislava (ďalej len ŠVPÚ Bratislava) je organizácia s bohatou históriou (bol založený v roku 1941), počas ktorej prechádzala rôznymi organizačnými zmenami. V posledných rokoch to bolo hlavne začlenenie laboratórií zrušenej Slovenskej poľnohospodárskej a potravinovej inšpekcie (ďalej len

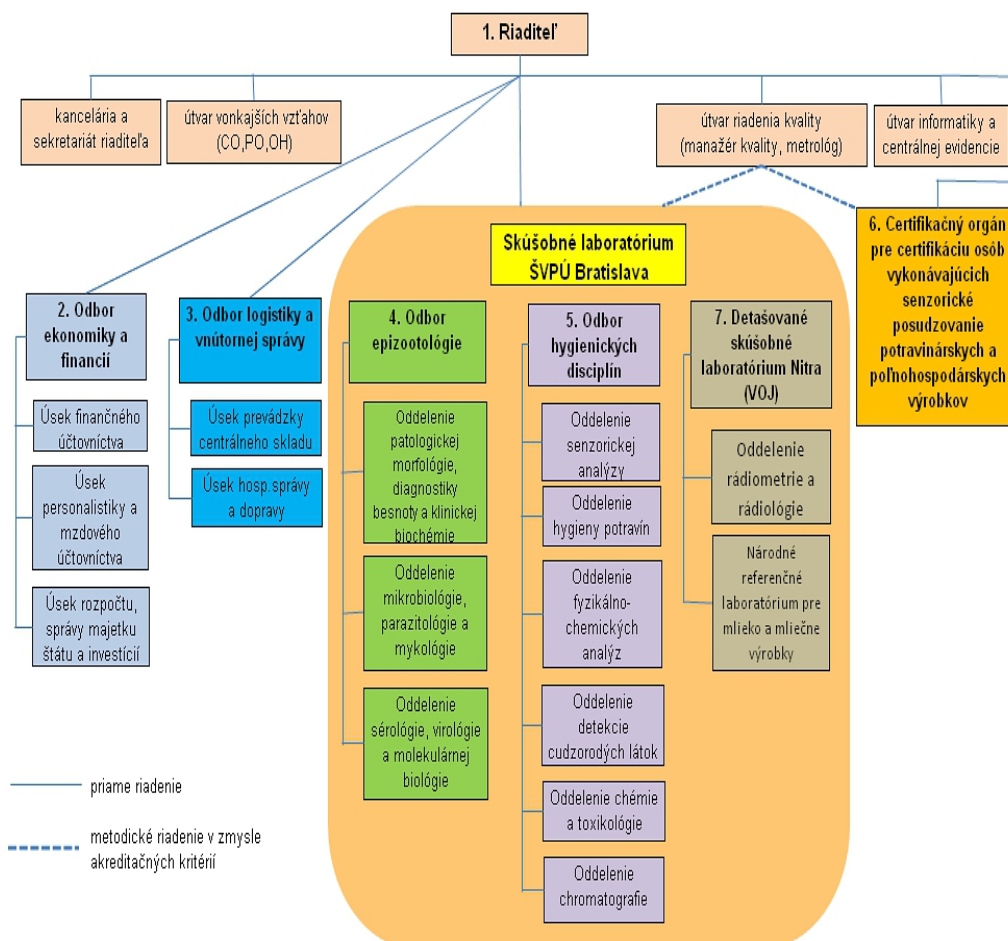
SPPI) v roku 2002 a v roku 2007 zlúčenie so Štátnym veterinárnym a potravinovým ústavom Nitra.

ŠVPÚ sa bytostne dotýkajú dva zákony: Zákon č. 39/2007 Z. z. o veterinárnej starostlivosti v znení neskorších predpisov a Zákon č. 152/1995 Z. z. o potravinách v znení neskorších predpisov.

Hlavným predmetom činnosti ŠVPÚ je skúšanie úradných vzoriek potravín živočíšneho a rastlinného pôvodu, úradných vzoriek krmív, vôd, tabaku a tabakových výrobkov a zabezpečenie veterinárnej ochrany územia SR, na úseku veterinárnej starostlivosti.

Naše skúšobné laboratóriá sú akreditované podľa požiadaviek ISO/IEC 17025:2005, pre nasledovnú oblasť akreditácie:

- Senzorické, mikrobiologické, chemické, molekulárno-biologické skúšanie a stanovenie rádioaktivity v potra-



Obr. 1. Organizačná štruktúra ŠVPÚ Bratislava

vinách, krmivách a kŕmnych komponentoch živočíšneho a rastlinného pôvodu, tabaku, tabakových výrobkov, vo vode a v zložkách životného prostredia.

- Sérologické, virologické, parazitologické, mykologické, bakteriologické, patologicko-anatomické, molekulárno-biologické a toxikologické skúšanie biologických materiálov a diagnostikovanie príčin ochorení a hynutí zvierat.
- Vyjadrovanie názorov a interpretácií.

Sme laboratóriá s fixným aj flexibilným rozsahom akreditácie. V rámci flexibilného rozsahu máme akreditovaných 659 parametrov/analytov a 8 princípov metód. Vo fixnom rozsahu je 46 princípov s 388 analytmi.

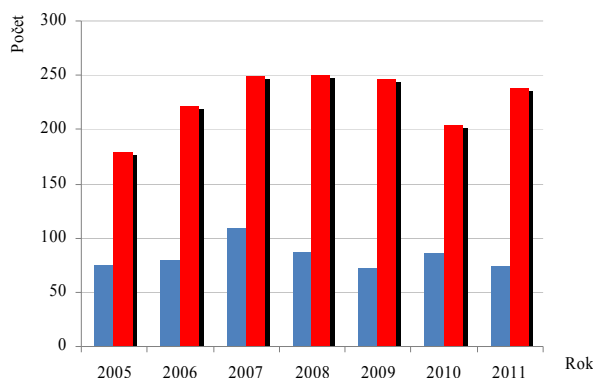
Ako vidieť z organizačnej štruktúry nášho ústavu, okrem laboratórnej diagnostiky (skúšobných laboratórií), ktorá tvorí prevažnú väčšinu činnosti ústavu, ŠVPÚ Bratislava má aj akreditovaný Certifikačný orgán pre certifikáciu pracovníkov vykonávajúcich senzorické posudzovanie potravinárskych a poľnohospodárskych výrobkov, ktorý vykonáva certifikáciu osôb v oblasti senzorického posudzovania potravinárskych a poľnohospodárskych výrobkov, v oblastiach akreditácie:

- Potravinárske a poľnohospodárske výrobky,
- vína.

podľa požiadaviek ISO/IEC 17024:2003.

História akreditácie našich laboratórií je úzko spätá s históriou SNAS a siaha do deväťdesiatych rokov minulého storočia, kedy v roku 1993 z Rozhodnutia predsedu ÚNMS SR bol vytvorený Slovenský národný akreditačný systém. Následne v roku 1994 začala cesta akreditácie našich laboratórií (vtedy to boli laboratóriá SPPI) spolupracou s Ing. Obernauerom, ktorý vtedy riadil technický výbor SNAS na akreditáciu laboratórií. A tak sme sa zaradili medzi prvé akreditované subjekty na Slovensku.

V rámci systematickej kontroly kvality práce sa Skúšobné laboratóriá ŠVPÚ Bratislava dlhé roky zúčastňujú



Obr. 2. Počet testov a počet analytov (parametrov) vykonaných v rokoch 2005 až 2011 v ŠVPÚ BA; ■ počet testov, ■ počet analytov (parametrov)

medzilaboratórnych testov (MT), jednak medzinárodných ako aj tuzemských organizovaných FAPAS, FEPAS, GeMMA, VÚVH, ÚKZÚZ Brno a inými organizáciami, s výbornými výsledkami. Prehľad počtu medzilaboratórnych testov a analytov, resp. parametrov, ktorých sa naše laboratóriá zúčastnili v posledných rokoch je uvedený na obr. 2.

Z uvedeného vyplýva, že naše laboratóriá aj v minulosti, prikladali veľkú vážnosť účasti na skúškach spôsobilosti, medzilaboratórnych porovnaní (ďalej len PT/MP). Z ponuky organizovaných PT/MP (hlavne z ponuky FAPAS, FEPAS) sme si vybrali takmer všetky PT/MP, ktoré súviseli s našimi akreditovanými skúškami. Hospodárska kríza zasiahla samozrejme aj našu organizáciu a primäla nás stanoviť si pravidlá na prihlasovanie sa do PT/MP. Už sme sa neprihlasovali, tak ako to bolo zvykom v minulosti, na všetky ponúkané analyty, vo všetkých matriciach, každý rok. Kým v minulosti ročné finančné náklady na MP sa pohybovali okolo 1 milióna Sk, v roku 2011 dosiahli hodnotu „len“ 25 000 €, čo predstavuje cca 750 000 Sk.

Pravidlá účasti SL ŠVPÚ v medzilaboratórnych porovnávaníach v súčasnosti

V súlade s Politikou SNAS na účasť v skúškach spôsobilosti a v súlade s MSA-1L/14 sme spracovali stratégiu účasti ŠVPÚ BA na vhodných PT/MP, na jeden akreditačný cyklus, čo je v našom prípade do roku 2015.

Postup bol nasledovný:

- identifikovali sme podoblasti, ktoré sú pokryté rozsahom akreditácie a v ktorých prostredníctvom účasti v jednom porovnávacom teste možno vziať kvalitu získaných výsledkov na ostatné techniky, vlastnosti a predmety v rámci jednej podoblasti. Pri definovaní podoblastí sme postupovali od techniky merania/princípu metódy, cez vlastnosť/parameter po predmet/matricu. Definovaním podoblastí sme si určili „rozsah účasti“.
- určili sme si frekvenciu účasti pre každú podoblasť (pre každú podoblasť rôzne, ale minimálne jedenkrát počas akreditačného cyklu),
- definovali sme si, že Stratégiu účasti na PT budeme preverovať a prehodnocovať jedenkrát ročne počas preskúmania manažmentom tak, aby bola splnená požiadavka SNAS: „Laboratóriá sa počas jedného akreditačného cyklu musia zúčastniť skúšok spôsobilosti alebo iných vhodných medzilaboratórnych porovnaní a dosiahnuť v nich uspokojivé výsledky v každej podoblasti činnosti, ktorá je definovaná v ich „Rozsahu akreditácie“, ak sa takéto porovnanie organizujú, sú dostupné a vhodné.“ V prípade neuspokojivých výsledkov v MP je nutná opätovná účasť.
- ak pre niektorú podoblasť nie sú dostupné vhodné medzilaboratórne porovnanie, je možné použiť napríklad:
 - porovnanie zamerané na hodnotenie výkonnosti

- ných charakteristík metód
- zaslanie internej vzorky alebo predmetu do iného alebo viacerých externých laboratórií za účelom porovnania dát
 - stanovenie charakteristík referenčných materiálov (čo využívame aj ako jeden z prvkov zabezpečovanie kvality výsledkov skúšok. Správnosť a presnosť výsledkov kontrolujeme pravidelným zaraďovaním CRM alebo RM medzi bežne analyzované vzorky. Výsledky analýz CRM a RM v priebehu určitého časového rozpätia priebežne zaznamenávame vo forme regulačných diagramov, v ktorých sledujeme a vyhodnocujeme trendy.)
 - porovnanie výsledkov dvoch alebo viacerých laboratórií na základe ich vlastnej iniciatívy, (V takýchto prípadoch je však potrebné, aby boli jasne dopredu definované kritériá a postupy, na základe ktorých budú výsledky MP vyhodnotené tak, aby boli akceptovateľné pre účely PT. Všetky takto organizované MP, ktoré budú využívané aj pre účely PT, musia spĺňať relevantné požiadavky normy ISO/IEC 17043: 2010.)
 - ak nič vhodné nenájdeme, je nutné problém prekonzultovať so SNAS (Pitevné metódy: Príčiny úhynu vtákov, plazov a rýb, Príčiny úhynu cicavcov).

Čo v prípade neúspešnej účasti v medzilaboratórnych porovnávaníach

Vyhodnotenie úspešnosti v PT/MP vykonávame priebežne a navyše celkové vyhodnotenie výsledkov účasti laboratórií na skúškach spôsobilosti alebo iných medzilaboratórnych porovnávaníach za celú organizáciu, robíme raz ročne, pri preskúmaní manažmentom. Priebežné sledovanie úspešnosti vykonávajú vedúci oddelení – vyplnením interného formuláru – „Záznam o medzilaboratórnom teste“ a prípadným prijatím nápravných opatrení vyplývajúcim z neúspešnej účasti na medzilaboratórnom teste, ktorému samozrejme vždy predchádza dôsledná analýza príčin. V prípade neúspešnej účasti v PT/MP vždy analyzujeme príčiny takejto situácie a prijímame také nápravné opatrenia a vykonáme také činnosti, ktoré zabezpečia, aby sa problém trvalo odstránil a v budúcnosti sa neopakoval.

Vhodnosť a účinnosť prijatých nápravných opatrení preskúma manažér kvality. Záznamy o overení účinnosti prijatých NO urobí manažér kvality priamo do formulára NO, v časti „Overenie účinnosti NO“.

Záver

ŠVPÚ Bratislava tak ako v minulosti, tak aj dnes prikladá veľkú vážnosť skúškam spôsobilosti a považuje ich za účinný nástroj zabezpečenia kvality výsledkov skúšok. Účasť v PT vnímame ako jedno z dôležitých „koliesok“ pomyselných hodín neformálneho fungovania systému kvality na našom ústave. Snahou je nerobiť „strašiaka“ z neúspešnej účasti v PT/MP, ako aj z iných nezhôd zistených, napríklad z interných auditov. Naším cieľom je chápať situáciu ako proces neustáleho zlepšovania. V priateľskej atmosfére všetkých zainteresovaných pracovníkov, v zmysle ľudového porekadla „Viac hláv, viac rozumu“, dôsledne zanalyzovať príčiny nezhody a najsť spôsob riešenia, vykonať také činnosti, opatrenia, ktoré zabezpečia, že sa problém trvalo vyrieši a v budúcnosti sa daná nezhoda už nebude opakovať. Popritom by sme nikdy nemali zabúdať na človeka ako ľudskú bytosť. Naším cieľom nie je ľudí trestať za zistené nedostatky. Trety vyvolávajú strach a nedôveru a vedú ku klamstvu a utajovaniu závažných skutočností. Pozitívna motivácia je omnoho účinnejšia ako sankcie.

Použitie skratky

CRM	Certifikovaný referenčný materiál
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FEPAS	Food Examination Performance Assessment Scheme
GeMMA	Genetically Modified Material Analysis
MSA	Metodická smernica na akreditáciu
NO	Nápravné opatrenie
PT/MP	Skúška spôsobilosti/medzilaboratórne porovnanie
RM	Referenčný materiál
SNAS	Slovenská národná akreditačná služba
SPPI	Slovenská poľnohospodárska a potravinová inšpekcia
ŠVPÚ BA	Štátny veterinárny a potravinový ústav Bratislava
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ÚNMS SR	Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky
VÚVH	Výskumný ústav vodného hospodárstva

LITERATÚRA

1. *Politika SNAS na účasť v skúškach spôsobilosti RR-P23*, vydanie 1, SNAS, Bratislava 2011.
2. *MSA-L/14: Stanovenie rozsahu a frekvencie účasti v skúškach spôsobilosti*, vydanie 1, SNAS, Bratislava 2011.

SIMULTÁNNE STANOVENIE VYBRANÝCH LIEČIV VYUŽITÍM BÓROM DOPOVANEJ DIAMANTOVEJ ELEKTRÓDY

**LUBOMÍR ŠVORC^{a*}, JOZEF SOCHR^a,
PETER TOMČÍK^b, MIROSLAV RIEVAJ^a
a DUŠAN BUSTIN^a**

^a Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

^b Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Katolícka univerzita v Ružomberku, Hrabovská cesta 1, 034 01 Ružomberok, Slovenská republika
lubomir.svorc@stuba.sk

Analýza liečiv je nevyhnutnou súčasťou analytickej chémie zohrávajúca významnú úlohu v klinickej chémii najmä pri intoxikácii prípadne podozreniach na predávkovanie liečivami. Študované látky – paracetamol a penicilín V – sa používajú pri ochoreniach infekčného charakteru, ktoré sú zvyčajne spojené s bolesťami hlavy a vysokými teplotami. V biologických vzorkách sa najčastejšie stanovujú vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou. Práca sa zaoberá vývojom novej elektrochemickej metódy na stanovenie stopových množstiev paracetamolu a penicilínu v ľudskom moči využitím bórom dopovanej diamantovej elektródy ako citlivého a selektívneho elektrochemického senzora bez nutnosti modifikácie a elektrochemickej predúpravy jeho povrchu. Elektrochemicky možno študované liečivá stanoviť ich oxidáciou pri vyšších kladných potenciáloch (+0.9 V vs. Ag/AgCl u paracetamolu resp. +1.25 V vs. Ag/AgCl u penicilínu V). Dostatočné rozlíšenie potenciálových maxím a symetrický tvar oxidačných píkov umožňujú ich simultánne stanovenie. Cieľom práce

bol výber vhodného elektrolytu, štúdiom elektródových dejov a optimalizácia experimentálnych a inštrumentálnych podmienok pre simultánne stanovenie študovaných liečiv (vplyv pH a polarizačnej rýchlosti) v acetátovom pufrí s pH 5.0 pomocou cyklickej a „square-wave“ voltamperometrie.

Dosiahnuté analytické parametre charakterizujúce výkonnosť metódy pre paracetamol resp. penicilín V boli: medza detekcie LOD = 0.21 a 0.32 $\mu\text{mol L}^{-1}$, lineárny koncentračný rozsah 0.4–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a opakovateľnosť RSD = 1.5 a 2.1 %. Metóda je vysoko selektívna, interferenty bežne prítomné v moči (cukry, kyselina askorbová a kyselina močová) ani vo vysokom nadbytku neovplyvňujú oxidačné signály paracetamolu a penicilínu V. Vysoké výťažnosti v prípade modelových vzoriek ľudského moču (od 98 do 105 % pre paracetamol a 95 do 102 % pre penicilín V) poukazujú na správnosť navrhovanej metódy. Praktická aplikovateľnosť metódy bola overená na reálnych vzorkách ľudského moču u chorých pacientov užívajúcich komerčné tablety PARALEN a PENICILIN V. Navrhovaná analytická metóda je v porovnaní s chromatografickými a optickými metódami rýchla, lacná a jednoduchá, bez potreby predkoncentračného kroku. Práca nadväzuje aj na aktuálny trend v oblasti vývoja nových elektrochemických metód stopovej analýzy a využitia nových elektródových materiálov na riešenie klinických, potravinárskych a environmentálnych problémov.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (projekty č. 1/0182/11 a 1/0008/12) a Programom na podporu mladých výskumníkov (č. 6406).

VERIFICATION OF WINES ORIGIN BY MEANS OF SPECTROSCOPIC TECHNIQUES

BLANKA TOBOLKOVÁ*^{a,b}, MARTIN POLOVKA^a a MILAN SUHAJ^a

^a VUP Food Research Institute, Department of Chemistry and Food Analysis, Priemysel'ná 4, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic, ^b Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic
tobolkova@vup.sk

Summary

In connection with still developing sector of organic farming including viticulture, and the growing production of organic food products, there is a legitimate demand of both, food control authorities and consumers towards objective methods applicable on unambiguous proving of wine origin from agricultural and production practices points of view. Objective qualitative markers/methods enabling the reliable differentiation of organic and conventional wines are the subject of intensive research.

In this contribution, the utilization of multivariate statistical methods (principal component analysis (PCA), principal component factoring (PCF) as well as methods of discrimination analysis – canonical discrimination (CDA) and k^{th} neighbour discrimination) on experimental UV-VIS and EPR characteristics of group of Slovak organic and conventional white and red wines were applied, in order to test the possibilities of their utilization for the discrimination of wines according to the way of production as well as to test the prediction and recognition ability of the statistical models used. Results obtained clearly indicated that the statistical evaluation of objective spectral characteristics enable with high correctness differentiate and classify the wine samples. Without respect on wine variety or type (red vs. white), CDA possessed 95.8 % correct classification, in case of k^{th} neighbour discrimination, 100 % ($k=1$) and (75 %) correct classification according to the way of production was obtained, respectively. The prediction ability tests possessed also very promising results, as the classification score reached 95 %. All the previously mentioned statistical data were obtained without respect on type of wine. In case wine samples of the same type are subjected to discrimination, and classification, the results of statistical analysis are very similar or even better.

Based on these findings, spectroscopic characteristics are suitable for the purposes of verification of origin – affiliation – of wine sample/s to the individual wine production system, involving selected methods of multivariate statistics. Further spreading of the sample set is desirable to improve the robustness of the differentiation procedure.

Introduction

In recent years, the growing consumer's demand for products that meet health and food safety requirements has led to increased development of organic agriculture. Although there exist fundamental differences in organic and conventional production practices, only limited information is available on their impact on the nutritional quality, especially in terms of health-related antioxidants of food crops. Organic systems emphasise the accumulation of soil organic matter and fertility over time through the use of cover crops, manures, and composts. Conventional practices utilise fertilizers containing soluble inorganic nitrogen and other nutrients, which are more directly available to plants. The availability of inorganic nitrogen influences the synthesis of secondary plant metabolites, proteins, and soluble solids¹.

Crucial part of still developing sector of organic agriculture represents organic viticulture. Based on the available statistical data from 2011, at the end of 2009 in Europe more than 167'000 hectares of vineyards were managed organically, corresponding to around 3.8 % of all vineyards. The biggest producers were Spain, Italy and France².

In the European Union, the practices of organic wine production are based on the Council Regulation (EC) 834/2007, that laid down in the objectives and principles for organic wines production and the general production rules, starting with soil & vineyard management, wine-making practices, as well as some technical information regarding hygiene standards, handling conditions, etc³. The primary aim of organic viticulture is to improve the wine quality as well as reduce the impact on the environment, compared to conventional methods which include use of potentially harmful chemical pesticides, or herbicides, in addition to other additives and preservative.

Wines represent rich source of biological active substances, especially phenolic compounds with multiple biological effects, including antioxidant activity. The quantities and composition of these compounds vary depending on many factors, such as grape variety, grape maturity, environmental and grown conditions or geographical location. Besides, different vinification techniques may also affect changes in bioactive compounds composition. Up to the present, there are only few studies focused on the impact assessment of production systems and wine-making practices on organic and conventional grapes and wines quality. Main differences between them have been found right in the content of phenolic compounds, organic acids or anthocyanins. Organic wines were also characterized by the higher concentration of minerals and essential elements, especially Ca, K, Mg or Cu^{1,4-6}. But these differences are still ambiguous.

Another problem is that continuous development of organic viticulture leads to legitimate demands on quality control and authenticity of organic products, including wines. However, although up to date, there are various methods used for organic and conventional wines differentiation, there are no validated methods suitable for their unambiguous differentiation and verification of their origin. The correctness of the individual differentiation methods is still non-satisfactory^{1,4-6}. Therefore, it is necessary to find characteristics – markers indicating pertinence of wines to these viticulture production systems and to develop the reliable methods/practices enabling unambiguous provement of the affiliation of individual wine to the respective production system.

In this contribution, the utilization of multivariate statistical methods (principal component analysis (PCA), principal component factoring (PCF) as well as some methods of discrimination analysis, i.e., canonical discrimination (CDA) and k^{th} neighbour discrimination) for the purposes of wine origin authentication is tested. For these purposes, objective spectral characteristics obtained on group of 12 organic red and white wines and their corresponding conventional counterparts by EPR and UV-VIS methods were obtained. Wine sample of the same vintage were tested to their ability to scavenge $^{\bullet}\text{DPPH}$, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ and TEMPOL radicals, their antioxidant activity towards $^{\bullet}\text{OH}$ radicals directly generated in samples via chemical reaction was evaluated as well. Besides that, the content of polyphenolic compounds (TPC) as well as the formation of oxidative products (TBARS) and their ferric ions reducing ability was assessed.

Experimental

Samples

Table I summarizes representative wine samples originating from Slovak wine-making region Modrý Kameň. For each variety, samples from organically (O) and conventionally (C) cultivated vineyards were selected

UV-VIS experiments

The UV-VIS experiments were carried out using UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 with accessory. The experiments were performed in duplicates. Radical-scavenging activities (RSA) of wine samples were evaluated using the solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($^{\bullet}\text{DPPH}$) free radical and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) cation radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), respectively. For both radicals, radical-scavenging ability was determined as previously described by Polovka et. al.⁷. In addition, total phenolic compounds content was estimated by Folin-Ciocalteu modified method, using standard solution of Gallic acid for calibration curve construction. Result were expressed as Gallic acid equivalent (GAE, mg l^{-1}). In addition, the capability of wine samples to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , as well as the formation of oxidation products (expressed as tiobarbituric acid reactive substances (TBARS) number), was tested as described by Suhaj et. al.⁸.

EPR experiments

The entire EPR experiments were performed in duplicates, using a portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker Biospin, GmbH, Karlsruhe, Germany) with accessory. The ability of wine samples to terminate $^{\bullet}\text{DPPH}$,

Table I
List of representative wine samples and their characteristics

Organic viticulture				Conventional viticulture			
ID	Sample	Category	Type	ID	Sample	Category	Type
O1	Chardonnay 2008	Dry	White	C1	Chardonnay 2008	Dry	White
O2	Chardonnay 2009	Dry	White	C2	Chardonnay 2009	Semidry	White
O3	Pinot blanc 2008	Dry	White	C3	Pinot blanc 2008	Dry	White
O4	Pinot blanc 2008	Dry	White	C4	Pinot blanc 2008	Dry	White
O5	Pinot blanc 2009	Dry	White	C5	Pinot blanc 2009	Dry	White
O6	Roter traminer 2003	Dry	White	C6	Roter traminer 2003	Dry	White
O7	Roter traminer 2008	Dry	White	C7	Roter traminer 2008	Semisweet	White
O8	Blafränkisch 2008	Dry	Red	C8	Blafränkisch 2008	Dry	Red
O9	Pinor noir 2009	Dry	Red	C9	Pinor noir 2009	Semisweet	Red
O10	Cabernet Sauvignon 2008	Dry	Red	C10	Cabernet Sauvignon 2008	Dry	Red
O11	Cabernet Sauvignon 2008	Dry	Red	C11	Cabernet Sauvignon 2008	Dry	Red
O12	Cabernet Sauvignon 2009	Dry	Red	C12	Cabernet Sauvignon 2009	Dry	Red

ABTS^{•+} and TEMPOL free radicals was examined as previously described by Polovka et. al⁷. The ABTS^{•+}/DPPH radical-scavenging activities were expressed as Trolox equivalents (TEAC_{ABTS^{•+}/DPPH}), in case of TEMPOL as Ascorbic acid equivalent (AAE). Kinetic aspects of individual radicals decay resulting from their reaction with antioxidant (radical scavengers) present in respective wine samples were evaluated by fitting the observed time-dependent decrease of corresponding EPR signal to the model of proper kinetic equation. The *k* parameter was evaluated with the meaning of formal rate constant of ABTS^{•+}, DPPH and TEMPOL radicals decay, respectively⁷. To monitor the antioxidant activity of wine samples, hydroxyl radicals were generated via thermal decomposition of radical initiator (K₂S₂O₈) and trapped by 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO). Results of antioxidant activity test were expressed as % of radicals scavenged (% RS)⁷.

Statistical analysis

To distinguish the organically produced wines from those of conventional production, multivariate statistical calculations employing methods of principal component analysis, principal component factoring, canonical, and *k*th neighbour discriminant analysis and classification were performed by means of Unistat[®] 6.1 (Unistat, London, United Kingdom) statistical software, taking into consideration all the experimental data obtained both from UV-VIS and EPR experiments. The recognizability of discriminant model was determined as the percentage of the correctly

classified samples in the training data set. In addition, the prediction ability was tested, as the percentage of the samples correctly classified in the leave-multiple-out cross-validation approach⁹.

Results and discussion

Characterisation of antioxidant and radical-scavenging properties by UV-VIS and EPR

In accord with our expectations, results of EPR and UV-VIS experiments proved generally the higher values of all evaluated characteristics for samples of red wines, without respect on whether organic or conventional. This is especially the case of total polyphenolic compounds content (Fig. 1a), but the same trend is visible in the formation of oxidative products, herein expressed as TBARS, the ability of wines to reduce ferric ions (FRP) and all the antioxidant properties characteristics evaluated.

As regards the radical-scavenging and antioxidant properties of wines assessed either by UV-VIS or EPR spectroscopy, all wine samples exhibited significant radical-scavenging and antioxidant properties in all the assays used. Again, generally higher radical-scavenging and antioxidant properties of red wines in comparison to white ones were proved, however, great variability of results even within respective group with common general properties (red vs. white wines, organic vs. conventional) do not allow to distinguish the organic and conventional wines on the basis of differences in these properties. This variability is well documented on Figure 1b, depicting the

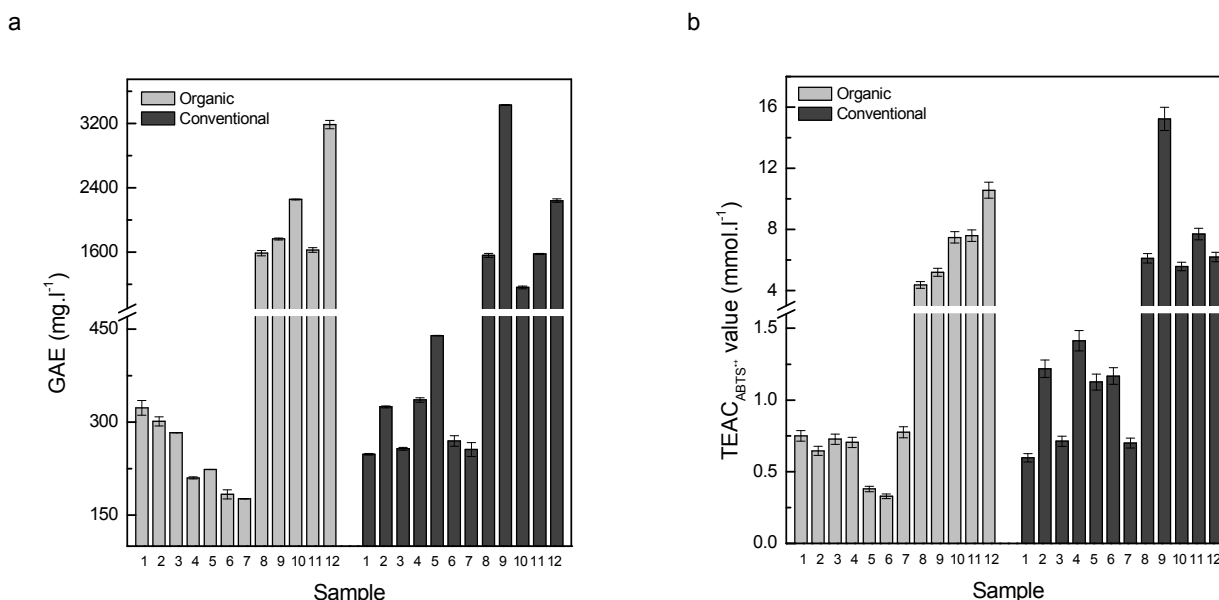


Fig. 1. a: Averaged content of total polyphenolic compounds determined in organic and conventional wine samples, expressed as Gallic acid equivalents (GAE, mg l⁻¹). b: ABTS^{•+} radical-scavenging ability of organic and conventional wine samples characterised by UV-VIS spectroscopy expressed as Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC, mmol l⁻¹)

results of ABTS^{++} radical-scavenging ability of organic and conventional wine samples characterised by UV-VIS spectroscopy. For the purposes of direct comparison, all the experimental results were re-calculated and expressed as Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC). It is obvious, that in some cases, the better RSA exhibited organic wines (e.g., *O1* vs. *C1*, or *O12* vs. *C12*), in the others the results are comparable or within the measurement uncertainty (e.g., *O10* vs. *C10*), and logically, in some cases the better radical scavengers are the conventional samples. Practically identical observations were obtained in DPPH assays. It is also obvious very good correlation between the TEAC values evaluated from EPR and UV-VIS assays.

Antioxidant activity of wine samples evaluated as their ability to terminate the $\cdot\text{OH}$ radicals and expressed as % of radicals scavenged (%RS). Again, in accord with expectations, white wines revealed the lower %RS values than the red ones, however, it is obvious from the results obtained, that in average higher %RS values were obtained for white organic wines in comparison to their conventional counterparts.

Single-correlation matrices of all determined characteristics calculated separately for organic and conventional wines indicated high positive correlations of most of characteristics determined by UV-VIS and EPR with the content of polyphenols, exception for ascorbic acid equivalents and the values of k_{TEMPOL} , both evaluated from TEMPOL assay, for which very weak or even negative correlations with all other characteristics were determined for both, organic and conventional wines. However, comparison of correlation coefficients does not lead to clear differentiation of organic and conventional wines, although their values are in case of conventional wines somewhat lower.

Processing of experimental data set by the methods of multivariate statistics

In view of high variability of results, the ambiguous trends even within individual groups, it can be concluded that single correlation or processing of information from any single assay used for samples characterisation separately, do not allow to perform unambiguous differentiation of wine samples according to the way of production. Thus, methods of multivariate statistical analysis were applied on the whole dataset of experimental characteristics for the purposes of their discrimination. Two general approaches were used, first, wines were differentiated according to their affiliation to either organic or conventional production system without respect on their type (red/white), and then, the discrimination was performed separately for the red and white wines. For these purposes, principal component analysis – PCA, principal component factoring – PCF, as well as discriminant analysis – both canonical – CDA and k^{th} neighbour discrimination and classification were utilized. The recognition and prediction ability of the methods used for discrimination were tested, as well.

Plot of principal components depicted on Fig. 2a clearly indicates that the successful differentiation of wines was obtained by the PCA, utilizing the entire group (12) of experimental characteristics for the principal components construction. As is obvious from the data depicted, there exist two main discrete groups of eigenvectors, corresponding to organic and conventional wine samples, without respect on whether red or white. As also follows from the results of PCA, first three principal components cumulatively explain more than 85 % of the whole variability of dataset of experimental characteristics. At the

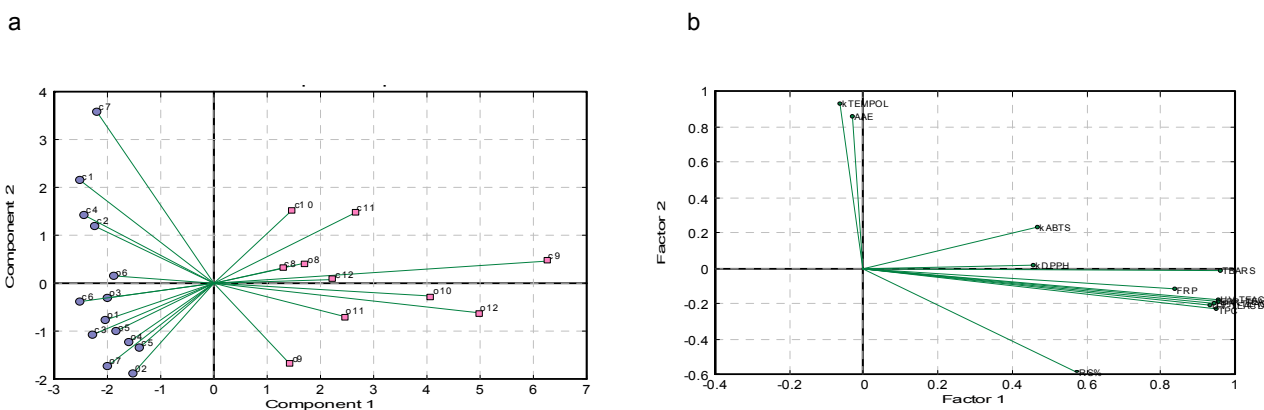


Fig. 2: **a: Differentiation of Slovak organic and conventional red & white wines on the basis principal component analysis of 12 descriptors of antioxidant and radical-scavenging activity** (O – organic wines, C – conventional wines). Both, red and white wines were subjected to differentiation altogether. **b: Plot of factors (varimax rotation) indicating the importance of individual descriptors for the purposes of organic and conventional wines differentiation on the basis of correlations of descriptor vectors with individual samples vectors**

same time, as follows from table of eigenvectors (data not presented), the values of TPC and TEACs play the dominant role in the construction of the 1st principal component, while in the 2nd, values of AAE and in the 3rd, kinetic parameters k_{DPPH} and k_{TEMPOL} are of high significance.

As it is necessary to differentiate and discriminate two types of objects (organic vs. conventional samples), one discriminant function was constructed by CDA. For its construction, AAE values, as well as %RS and k_{TEMPOL} values were utilized as the most powerful discriminators. By means of CDA, 95.8 % correct classification of wines was obtained according to their affiliation to respective production system. In fact, from totally 24 classified samples, only one sample – C5 – was misclassified as to be the organic wine.

Regarding the significance of individual experimental characteristics on the discrimination process, high importance of AAE and k_{TEMPOL} , as well as of %RS, was confirmed also by the principal component factoring in varimax rotation, and is obvious from the plot of vector scores (Fig. 2b). Vectors corresponding to the previously mentioned characteristics lay in different sectors or far apart from the rest.

Kth nearest neighbour classification procedure was performed in two approaches – for $k=1$ and $k=2$, classifying the selected object into groups by comparison its properties to 1 and 2 nearest objects in its neighbourhood, respectively. The former approach possessed 100 %, while the later, only 75 % correct classification, considering 6 samples of conventional wines as the organic. This classification procedure was also used to test the prediction ability of the model in cross-validation test. Results obtained indicated, that the prediction ability is very high, as the classification score reached 95 %.

When all the statistical methods are applied separately on the group of red and white wines, they give somewhat different results in some aspects. PCA in case of white wine samples was able to differentiate the organic and conventional samples, while in case of red wines, the vectors corresponding to organics and conventional wines are not so clearly separated. This is probably caused by the changed variability of the system – reduced numbers of samples and thus, the increased role of individual sample characteristics (and their variability) for the differentiation and classification of the whole group. This assumption also supported the eigenvectors tables, from which the increased role of e.g., TPC, FRP and TBARS, but decreased role of AAE and %RS is obvious, both, for red and white wines. While in case of white wines 100% correct discrimination of organic and conventional samples was obtained by CDA, this procedure could not be applied on red wine samples as due to the reduced number of samples the singular matrix was obtained. Using the kth nearest neighbour classification, in case of white wine samples, 100 % and 85 % correct classification was reached for $k=1$ and $k=2$, respectively. In case of red wine samples, practically identical results were obtained.

Conclusion

Characteristics of radical-scavenging properties of Slovak conventional and organic wines can be effectively used for the purposes of their differentiation from the way of production points of view, involving methods of multivariate statistics. To increase the reliability and robustness of the discrimination models, further experiments are necessary to spread out the dataset of experimental characteristic, increasing thus the variability of the data set. In this context, the analysis of additional wine samples of corresponding counterparts is desirable. Another possibility of widening of number of samples is the consideration of regional effects, i.e., to compare the characteristics of organic and conventional wines from different regions/countries.

This contribution is the result of the project implementation „Centre of Excellence for Contaminants and Microorganisms in Food“ supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF. Wine producers VINO NATURAL DOMIN&KUŠICKÝ and AGRO MOVINO VEĽKÝ KRTIŠ are gratefully acknowledged for their kind cooperation and free samples provision.

REFERENCES

1. Vrček I., Bojić M., Mendaš G., Medić-Šarić M.: *Food Chem.* 124, 1 (2011).
2. Research Institute of Organic Agriculture FIBL. Organic Grape Area: Development by Region 2005-2009. (2011) <<http://www.organic-world.net/statistics-data-sources.html>>.
3. Trioli G., Hofmann U. *ORWINE: Code of Good Organic Viticulture and Wine-making*. (2009). <http://www.orwine.org/intranett/libretti/orw%20gb%20bassa_264_01_0_.pdf>.
4. Mulero J., Pardo F., Zafrilla P.: *J. Food Compos Anal.* 23, 6 (2010).
5. Cozzolino D., Holdstock M., Damberds R.G., Cynkar W.U., Smith P.A.: *Food Chem.* 116, 3 (2009).
6. Provenzano M.R., El Bilali H., Simeone V., Baser N., Mondelli D., Cesari G.: *Food Chem.* 122, 4 (2010).
7. Polovka M., Šťavíková L., Hohnová B., Karásek P., Roth M. J.: *Chromatogr., A* 1217, 51 (2010).
8. Suhaj M., Ráková J., Polovka M., Brezová V.: *Food Chem.* 97, 4 (2006).
9. Berrueta L.A., Alonso-Salces R.M., Héberger K.: *Chromatogr., A* 1158, 1–2 (2007).

METÓDY SKÚMANIA KRIMINALISTICKEJ CHÉMIE

PAVOL ULBRICH

*Kriminalistický a expertízny ústav PZ MV SR, Sklabinská 1,
812 72 Bratislava, Slovensko
pavol.ulbrich@minv.sk*

Kriminalistický a expertízny ústav Policajného zboru Slovenskej republiky je znalecký ústav, ktorého účelom je zabezpečenie kriminalisticko-technickej a expertíznej činnosti pre potreby Policajného zboru Slovenskej republiky, orgánov činných v trestnom konaní a súdov, ako aj na zabezpečenie vedecko-technického rozvoja v tejto oblasti. V prednáške sa budem zaoberať bližšie činnosťou oddelenia chémie a toxikológie, ktorého ťažiskovou náplňou je využívanie metód kriminalistickej chémie.

Kriminalistická chémia skúma chemické a fyzikálno-chemické vlastnosti prostredia, materiálov a dejov dôležitých pre dokazovanie v trestnom konaní. K tomu využíva metódy všeobecnej, analytickej a fyzikálnej chémie a fyziky, ktoré aplikuje a rozvíja v smeroch dôležitých pre objasňovanie kriminálne relevantných udalostí. Tak ako sa vyvíja trestná činnosť a jej „rafinovanosť“, tak sa musí vyvíjať aj spôsob jej odhaľovania, pričom sa využívajú najnovšie poznatky a špičkové techniky a postupy. Už v začiatkoch kriminalistiky sa využívali chemické dôkazové reakcie na rôzne dôkazy slúžiace pri odhaľovaní páchatelov trestných činov. Aj v súčasnosti sa niektoré ešte stále využívajú, ale najčastejšie ako skriningové metódy. Potom nasleduje dokazovanie za použitia prístrojovej techniky, ktorá spĺňa kritéria objektívnej overiteľnosti a vedeckej odôvodniteľnosti.

Použitie chemických analytických metód a postupov v kriminalistickej chémii má niektoré špecifiká, ktoré sú

dané tým, pri vyšetrovaní akého trestného činu sa použijú. V niektorých prípadoch je potrebná identifikácia neznámej chemickej látky, ktorej je dostatok (niekedy aj stovky kilogramov), ale niekedy je vzorky oveľa menej. V prípade zneužívaných omamných a psychotropných látok (tzv. drogy) je potrebné túto látku identifikovať a určiť jej koncentráciu, teda množstvo účinnej látky. Často postačuje iba materiálové porovnanie – potvrdenie zhodnosti dvoch resp. viacerých stôp bez hlbokého poznania konkrétneho zloženia vzorky ako napr. v prípadoch úlomkov autolakov v prípade dopravných nehôd. To ale neznamená, že na toto porovnanie sa nepoužíva špičková technika. Kriminalistická chémia používa aj techniky stopových analýz a mikroskopických analýz hlavne v prípadoch stôp výbušnín na povýbuchových zvyškoch, stôp akceleratorov požiarov alebo pri skúmaní povýstrelových splodín. Pri týchto skúmaniach na našom pracovisku používame metódy:

- plynová chromatografia s hmotnostne spektrometrickým detektorom,
- plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom,
- plynová chromatografia s detektorom elektrónového záchytu,
- iónová chromatografia,
- kvapalinová chromatografia s hmotnostne spektrometrickým detektorom
- infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou,
- mikroinfračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou,
- energiovo disperzná RTG spektrometria,
- rastrovací elektrónový mikroskop s mikrosondou.

THE MONITORING OF EMERGING SUBSTANCES OF MUNICIPAL AND INDUSTRIAL WASTE WATER FROM NOVI SAD AREA DISCHARGED IN TO THE DANUBE RIVER

**MIRJANA VOJINOVIĆ MILORADOV^{*a},
IVAN ŠPÁNIK^b, JELENA RADONIĆ^a,
MAJA TURK SEKULIĆ^a, DUŠAN
MILOVANOVIĆ^a, MAJA ĐOGO^a,
and OLGA VYVIURSKA^b**

^a Faculty of Technical Sciences, Department for Environmental engineering and occupational health, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 6, 21000 Novi Sad, Serbia, ^b Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
miloradov@uns.ac.rs

The water supply system in Novi Sad municipality is based exclusively on using the groundwater from alluvial aquifers (Qtot,av=47 Mio. m³/yr), tapped by more than 20 horizontal wells situated at three locations along the Danube River. These aquifers belong to the so-called “rapidly rechargeable aquifer” category, since they depend on the hydrological regime of river. The abstraction of water is achieved using bank filtration, meaning that approximately 80–90 % of water in these layers originates from the Danube River and 10–20 % from the backland. Deriving drinking water either from the Danube River or from several groundwater reservoirs, the city of Novi Sad faces a specific problem. Two of three sources of drinking water in Novi Sad are located only a few hundred meters downstream of discharges of the Novi Sad two main sewers, GC1 and GC2. Additionally, all of groundwater abstraction points are located under densely populated urban areas, and one of them is located in the proximity of the oil refinery and heating&power plant. The oil refinery in Novi Sad could emit mineral oils and derivatives of mineral oils into the soil and water. Moreover, the quality of drinking water is influenced by different forms of land-use in the backland, such as agricultural lands and drainage canal systems. Mix of communal and industrial waste water is discharged directly into the Danube River in Novi Sad area.

At present, the available information about pollution of water used for abstraction of drinking water in Novi Sad municipality are insufficient for monitoring and risk management for the protection of inhabitants. Screening approaches are either not used at all or very scarcely and most of monitoring is limited just to the selected physical chemical parameters and target compounds. Within the last 5 years, no detailed and systematic monitoring programme for the screening of river pollutants and emerging substances in Novi Sad municipality was performed. However, environmental monitoring of selected target substances was a subject of several domestic research pro-

jects. As the most common pollutants in the drinking water in Novi Sad, high residue values of chlorine, chloroform, ratio of dichlorobromomethane/chloroform and cations of manganese and iron has been reported.

The Danube River is the most important drinking water source in entire Europe. The International Commission for the Protection of the Danube River (ICPDR) monitors physical, chemical and biological parameters in the Danube and its major tributaries since 1996. In 2001, the first Joint Danube Survey (JDS1) was carried out by the ICPDR, as the most homogenous analysis of the water quality and the ecological status of the Danube River. The second Joint Danube Survey (JDS2) was organised during the August and September 2007. The most relevant polar compounds identified in the Danube River basin in terms of frequency of detection, persistency, and concentration levels were 1H-benzotriazole (median concentration 185 ng/L), caffeine (87 ng/L), tolyltriazole (73 ng/L), nonylphenoxy acetic acid (49 ng/L), carbamazepine (33 ng/L), 4-nitrophenol (29 ng/L), 2,4-dinitrophenol (19 ng/L), PFOA (17 ng/L), sulfamethoxazole (16 ng/L), desethylatrazine (11 ng/L), and 2,4-D (10 ng/L), which belong to the open list of 700 emerging substances defined by NORMAN (Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants).

The main objective of the study presented in the paper was to gain more insight into organic and inorganic contaminants present in the raw water used for drinking water production at Novi Sad and to evaluate the risks for human health and the environment, in order to reduce and prevent risks related to environmental quality of surface water and related aquifers used for abstraction of drinking water.

Within the first survey of the research, 10 individual 1 L water samples were taken on 12th December 2011. Two of them were chlorinated and raw drinking water obtained from Public Utility Company Novi Sad. Sampling of waste water was conducted at discharges GC1, GC2, Sever IV and Rokov potok, while samples of surface water from Danube River were taken 100 meters downstream of the respective discharges: 45°15'5,42"N, 19°51'22,95"E; 45°15'44,4"N, 19°51'28,46"E; 45°15'11,84"N, 19°54'40,18"E; 45°15'2,2"N, 19°54'9,92"E (Figure 1). Screening analyses for possible contaminants were performed at the Institute of Analytical Chemistry STU in Slovakia, using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Organic compounds were extracted by liquid-liquid extraction. Water samples (1000 ml) were placed in a 1000 ml glass separatory funnel and extracted with two 50 ml portions of dichloromethane for 20 minutes using automatic shaker device. After extraction, both extracts were combined, dried and placed into heart-shape flask for evaporation to final volume 1 ml. Large volume injection was used for introduction of 30 µl extract to GC system. The GC analysis

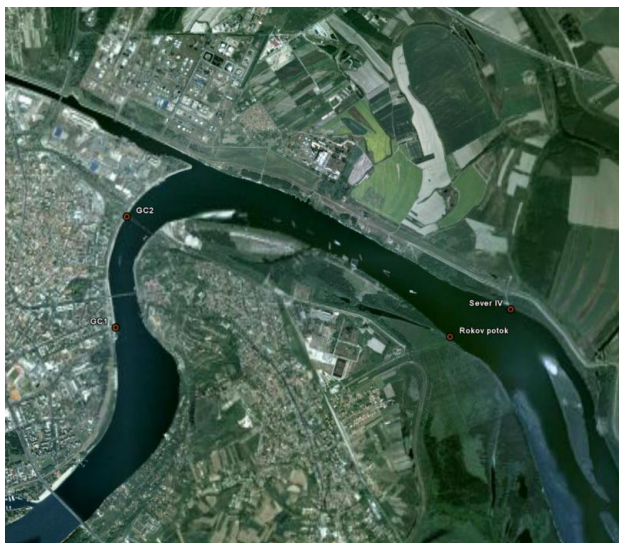


Fig. 1. **Surface water sampling locations** (100m downstream of the discharges)

was performed using Agilent 6890 gas chromatograph coupled to Agilent 5973 mass spectrometric detector (MSD; Agilent Technologies, Little Falls, DE, USA). The system was equipped with PTV injector system. The PTV was ramped from 70 °C to 250 °C (5 minutes) at a rate of 720 °C/s. Capillary GC analysis was performed on a 30 m × 250 mm I.D., 0.25 mm df HP-5MS column (Agilent Technologies). The oven was programmed from 70 °C (2 minutes) at 10 °C/min to 150 °C, at 8 °C/min to 200 °C and finally at 10 °C/min to 280 °C (10 minutes). Helium was used as carrier gas. The MSD was used in the SCAN mode for all samples.

The obtained results will undergo further evaluation using risk prioritization strategies in order to select toxic contaminants found at high enough concentration levels to present a significant hazard for the population of Novi Sad. The monitoring of the quality of waste water and discussing the results of analytical analysis are in progress.

This research was supported by NATO Science for Peace Program (ESP.EAP.SFP 984087), Ministry of Education and Science, Republic of Serbia (III46009) and SRDA project No. SK-SRB-0022-11.

REFERENCES

1. Loos R., Locoro G., Contini S.: *Water Res.* 44, 2325 (2010).
2. Vojinović Miloradov M., Spanik I., Milovanovic D., Miloradov M., Djogo M., Dimkic M.: In: *Proceedings, International Conference on Innovative Technologies - IN-TECH 2011: Good quality of groundwater sources as the challenge for innovative technology*, 01 – 03 September 2011, Bratislava, Slovak Republic, (Kudláček J., Car Z., Pepelnjak T., Pakosta M., ed.), p. 384.
3. Vojinović-Miloradov M., Turk Sekulić M., Radonić J., Mihajlović I., Stošić M.: In: *Proceedings, XV International Eco-Conference on environmental protection of urban and suburban settlements: Emerging substances of concern – a shift in traditional thinking*, 21 – 24 September 2011, Novi Sad, Serbia, (Kastoriomčić D., Kićović D., Golja A., eds.), p. 265.

VÝSKYT MYKOTOXÍNOV V POTRAVINÁCH RASTLINNÉHO A ŽIVOČÍŠNEHO PÔVODU A V KRMIVÁCH

IVETA VOJSOVÁ a ALEXANDRA SLEZÁROVÁ

Štátny veterinárny a potravinový ústav Bratislava, Botanická 15, 842 52 Bratislava, Slovensko
ivojsova@svuba.sk

Mykotoxíny sú vo všeobecnosti považované za neodvrátiteľné kontaminanty potravín a krmív a sú vážnym ekonomickým a zároveň aj filozofickým problémom v celom svete. Záujem o tieto prírodné sa vyskytujúce chemické látky je veľký kvôli ich poškodzujúcim a karcinogénnym účinkom nielen na ľudské zdravie, ale aj na zdravie zvierat. Analýzy mykotoxínov v potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu a v krmivách sa v rámci úradnej kontroly vykonávajú aj na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Bratislave (ŠVPÚ).

Odber vzoriek, kritéria prípravy vzorky a analytických metód používaných na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách a v krmivách, maximálne hodnoty obsahu jednotlivých mykotoxínov sú definované platnými Nariadeniami Komisie (ES). K najdôležitejším patrí Nariadenie Komisie (ES) č.401/2006 v znení neskorších predpisov, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách a Nariadenie Komisie (ES) č.1881/2006 v znení neskorších predpisov, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách.

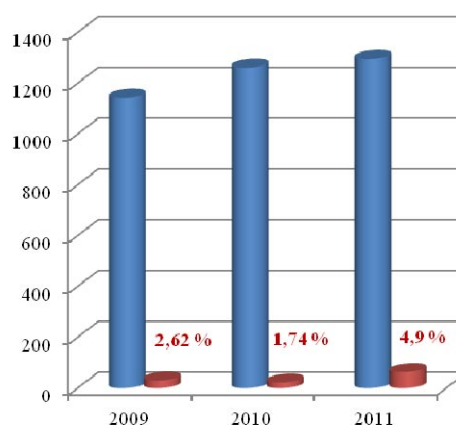
Princípy stanovenia jednotlivých mykotoxínov vychádzajú z aktuálne dostupných STN EN ISO noriem platných pre úradnú kontrolu potravín a krmív a spočívajú v precistení vzorky na imunoafinitnej kolóne a následnom stanovení kvapalinovou chromatografiou s využitím fluorescenčného detektora, príp. UV detektora. Analytické metódy na stanovenie mykotoxínov v potravinách a v krmivách používané na ŠVPÚ Bratislava sú akredito-

vané a validované v zmysle platnej európskej legislatívy.

Laboratórium ŠVPÚ Bratislava stanovuje nasledovné mykotoxíny v rôznych komoditách (obr. 1).

Maximálne exponované substráty z hľadiska výskytu mykotoxínov sú predovšetkým orechoviny, podzemnica olejná, sušené ovocie, káva, koreniny, obilniny, víno, cestoviny, chlieb, pekárenské výrobky, cereálne výrobky, ovocie a výrobky z neho, mlieko, krmivá.

Odber vzoriek je koordinovaný v zmysle Potravinového dozoru SR, kontroly importu aj vrátane importu z tretích krajín, cielených monitoringov a Monitoringu spotrebného koša. Prehľad percentuálneho zastúpenia nadlimitných vzoriek z celkového počtu vyšetrených vzoriek v rokoch 2009–2011 je vyjadrený na obr. 2.



Obr. 2. Percentuálne zastúpenie nadlimitných vzoriek z celkového počtu vyšetrených vzoriek v r. 2009–2011; ■ celkový počet vyšetrených vzoriek, ■ počet nadlimitných vzoriek

Mykotoxín	Komodita
<i>Aflatoxín B1-G2</i>	pistácie, arašidy, lieskovec, iné orechy a olejnaté semená, koreniny, paprika, ryža, obilie, sušené ovocie, múka a výrobky z nej, pečeň, krmivá
<i>Aflatoxín M1</i>	mlieko, mliečne výrobky
<i>Ochratoxín A</i>	káva, múka a výrobky z nej, potravinárske obilie, hrozienka, koreniny, pečeň, krmivá
<i>Zearalenon</i>	obilie, múka, kukurica a výrobky z nich, chlieb, krmivá
<i>Deoxynivalenol</i>	obilie, múka, kukurica a výrobky z nich, cestoviny, chlieb, krmivá
<i>Fumonizín B1, B2</i>	nespracovaná kukurica, potraviny na báze kukurice, krmivá
<i>T-2, HT-2</i>	nespracované obilie a výrobky z obilia, krmivá
<i>Nivalenol</i>	potravinárska pšenica, jačmeň, raž, slad, múka, krmivá
<i>Patulín</i>	jablkové výrobky

Obr. 1. Sledované mykotoxíny v potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu a v krmivách na ŠVPÚ Bratislava

VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH BIOSENZORŮ V KLINICKÉ ANALÝZE

VLASTIMIL VYSKOČIL* a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Česká republika

vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

Jelikož klinické analýzy ve specializovaných laboratořích představují drahé a časově náročné procesy, je stále více analýz prováděno mimo tyto laboratoře (např. na nemocničních ošetřovnách či přímo u pacienta doma). Jednu z největších výzev současné analytické chemie představuje vývoj metod umožňujících takovéto rychlé *in situ* analýzy. Tyto metody musí být citlivé, přesné a schopné stanovit široké spektrum látek nacházejících se v různorodých reálných vzorcích. Elektrochemické biosenzory jsou pro tyto nové aplikace v klinické analýze velmi vhodné, především díky své vysoké citlivosti a selektivitě, rychlé odezvě, snadné přenosnosti a nízké pořizovací i provozní ceně¹.

Elektrochemické biosenzory se staly předmětem základního i aplikovaného výzkumu před padesáti lety. Leland C. Clark představil v roce 1962 na sympóziu Newyorské akademie věd princip první enzymové elektrody s imobilizovanou glukosa oxidázou². První komerčně vyráběný biosenzor firmy Yellow Springs Instruments (Yellow Springs, OH, USA) byl uveden na trh v roce 1975. Toto zařízení bylo využíváno pro rychlé zjištění hladiny cukru v krevních vzorcích diabetiků³.

V současnosti existuje mnoho navržených a rovněž i komerčně dostupných zařízení založených na principu biosenzoru (např. pro detekci patogenů a toxinů), některé z nich pracují i ve vícekanálovém uspořádání^{4,5}. Nejběžnější součástí elektrochemických biosenzorů je vhodný enzym přítomný v biorozpoznávací vrstvě vytvářející elektroaktivní systém pro detekci prostřednictvím fyzikálně-chemického převodníku poskytujícího měřitelný signál. Nativní enzym může být použit jako biorozpoznávací komponenta; v tomto případě je analyt zároveň substrát enzymu, popř. může sloužit jako jeho inhibitor. Kromě toho mohou být enzymy použity jako značky navázané na protilátky, antigeny či oligonukleotidy se specifickými sekvencemi (tzv. afinitní biosenzory)⁶. I když moderní biotechnologie nabízí poměrně širokou škálu dostupných enzymatických systémů, pouze poměrně omezený počet enzymů byl zatím využit pro monitorování klinických metabolitů. Jednalo se především o enzymy ze skupiny oxidoreduktáz: glukosa oxidasa⁷ a glukosa dehydrogenasa⁸ při detekci glukosy, alkohol oxidasa při detekci ethanolu⁹, NADH dependentní laktátdehydrogenasa¹⁰ a laktátcytochrom c oxidoreduktasa při detekci laktátu¹¹⁻¹³, ureasa při detekci močoviny¹⁴ a cholesterol oxidasa imobilizova-

ná spolu s cholesterol esterázou při detekci cholesterolu¹⁵. Peroxidasa a alkalická fosfatasa jsou nejběžnější enzymové značky pro elektrochemické afinitní biosenzory¹⁶.

V tomto příspěvku budou představeny elektrochemické biosenzory, které se v současné době nejvíce uplatňují v praktické klinické analýze. Pozornost bude věnována především enzymatickým a afinitním biosenzorům (imunobiosenzorům a DNA biosenzorům)^{17,18}.

Na tomto místě bychom rádi poděkovali za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 0021620857) a dále Univerzitě Karlově v Praze (projekt UNCE 2012/44) a Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151).

LITERATURA

1. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 121 (2001).
2. Clark L. C., Lyons C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 133 (1962).
3. Wang J.: *Electroanalysis* 13, 983 (2001).
4. Pohanka M., Jun D., Kuča K.: *Drug Chem. Toxicol.* 30, 253 (2007).
5. Pohanka M., Skládal P., Kroča M.: *Def. Sci. J.* 57, 185 (2007).
6. Bakker E.: *Anal. Chem.* 76, 3285 (2004).
7. Kafi A. K., Lee D. Y., Park S. H., Kwon Y. S.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 3539 (2006).
8. Antiochia R., Gorton L.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 2611 (2007).
9. Yildiz H. B., Toppare L.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2306 (2006).
10. D'Auria S., Gryczynski Z., Gryczynski I., Rossi M., Lakowicz J. R.: *Anal. Biochem.* 283, 83 (2000).
11. Stein E. W., McShane M. J.: *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2, 133 (2003).
12. Garjonyte R., Melvydas V., Malinauskas A.: *Bioelectrochemistry* 68, 191 (2006).
13. Pohanka M., Zbořil P.: *Food Technol. Biotechnol.* 46, 107 (2008).
14. Barhoumi H., Maaref A., Rammah M., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Mousty C., Cosnier S., Perez E., Rico-Lattes E.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 2318 (2005).
15. Singh S., Singhal R., Malhotra B. D.: *Anal. Chim. Acta* 582, 335 (2007).
16. Skládal P.: *Electroanalysis* 9, 737 (1997).
17. Pohanka M., Skládal P.: *J. Appl. Biomed.* 6, 57 (2008).
18. Monošík R., Středanský M., Šturdík E.: *J. Clin. Lab. Anal.* 26, 22 (2012).

MULTI-LAYER SYSTEMS FOR FUNCTIONAL AND DETECTION DESIGN OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

ANTON AMBRÓZY* and JÁN LABUDA

*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
anton.ambrozy@stuba.sk*

The current task of chemical analysis is small quantities detection of new substances, often in increasingly complex matrix of the sample. Meeting this objective requires constantly demanding experimental technique enabling highly efficient separation and sensitive, eventually selective detection of individual components of the mixture. Using of sensitive and selective chemical biosensors in combination with simple measuring equipments represents an alternative procedure for solving specific tasks, especially in small testing laboratories.

Biosensors based on surface-modified electrodes successfully extend possibilities of electroanalytical instruments. The biosensor represents an important element of the measurement system that includes a biological component and an electrode as the physico-chemical transducer and ensures certain degree of selectivity in analysis of samples with complex matrices. Currently there are many instrumental methods for the determination of trace concentrations of elements, species and compounds in complex mixtures. Their disadvantages are time demand, high price and inability to be applied to large number of samples in short time. The use of specifically designed biosensors appears to be a suitable alternative.

In practice, amperometric biosensors are the most commonly used type of devices. Chemically modified electrode as a functional part of the biosensor represents from constructive views conventional electrode made from carbon, carbon paste or inert metal and appropriately modified by system of thin layer(s) that is (are) enabled for selective determination of an analyte. This rational chemical modification markedly ensures chemical, electrochemical, transport and other properties of the electrode. One of the serious problems associated with using of amperometric biosensors in complex matrices are interferences caused by electroactive as well as surface active species. Multilayer systems used at the construction of biosensors are trying to achieve high selectivity and eliminate interferences. We focus on the use of polymeric films applied to the biosensor surface in terms of selectivity enhancement, interference elimination and biocompatibility improvement, particularly at enzyme and DNA biosensors.

DNA biosensors represent rather new and specific group of chemical sensors directed to the investigation of reactivity of surface attached DNA. Till now, they have been used for investigation of DNA association interac-

tions and damage to DNA in media with simple matrices like buffer solution or simple, mostly aqueous extracts^{1–5}. Among examples of the multilayer applications, amperometric DNA biosensors designed as DNA films on a cellulose nitrate layer and chitosan layer for the determination of auto-antibodies⁶ and detection of damage to DNA⁷, respectively, can be mentioned. Layered films of enzyme and DNA were shown to be able of *in vitro* biochemical transformation of chemicals and of testing of potential toxic chemicals like styrene⁸. Other layered films of poly(styrene-sulfonate), poly(diallyldimethylammonium) and dsDNA on the pyrolytic graphite electrode were used at the biosensor for the detection of damage to natural DNA⁹. Layer-by-layer films of DNA and glucose oxidase were used for specific formation of DNA cleavage agents like hydrogen peroxide and hydroxyl radicals within the DNA layer¹⁰. Very thin (10–100 nm) films of polymers (based on phenol, phenol derivatives, phenylenediamines, overoxidized or electroinactive polypyrrole) were used to design amperometric enzyme biosensors. The film thickness was controlled by self-limited growth. The permselective properties of the films can be utilized for the elimination of electrochemical interference^{11–13}. Other examples of a control of the detection capability, selectivity, biocompatibility and other properties of enzyme and DNA amperometric biosensors will be presented in this contribution.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA of the Slovak Republic (Project No. 1/0182/11) and the European Fund for Regional Development (ITMS project code 26240220072).

REFERENCES

1. Labuda J., Brett A. M. O., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: *Pure Appl. Chem.* 82, 1161 (2010).
2. Labuda J., Vyskocil V.: in: *Encyclopedia of Applied Electrochemistry, DNA/Electrode Interface*, (Savinell R. F., Ota K., Kreysa G., ed.). Springer, 2011. URL: <http://www.springerreference.com/index/chapterdoi/10.1007/303710> (accessed 2 December, 2011).
3. Labuda J.: in: *Nucleic Acid Biosensors for Environmental Pollution Monitoring*, (Mascini M., Palchetti I., ed.) pp. 121–140. Royal Society of Chemistry, London 2011.
4. Vyskocil V., Labuda J., Berek J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 233 (2010).
5. Ziyatdinova G., Labuda J.: *Anal. Methods* 3, 2777 (2011).
6. Babkina S. S., Ulakhovich N. A., Zyavkina Yu. I.:

- Anal. Chim. Acta 502, 23 (2004).
7. Galandová J., Ziyatdinova G., Labuda J.: Anal. Sci. 24, 711 (2008).
 8. Magweru A., Wang B., Rusling J. F.: Anal. Chem. 76, 5557 (2004).
 9. Zhang Y., Zhang H., Hu N.: Biosensors Bioelectronics 23, 1077 (2008).
 10. Zu Y., Liu H., Zhang Y., Hu N.: Electrochim. Acta 54, 2706 (2009).
 11. Galandová J., Labuda J.: Chem. Pap. 63, 1 (2009).
 12. Zajoncová L., Pospíšková K.: Chem. Listy 103, 291 (2009).
 13. Dongyue L., Jianbo J., Jianguo W.: Talanta 83, 332 (2010).

DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION OF METHOD BASED ON QUECHERS-DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION AND GC-MS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN ACID FRUIT SAMPLES

MÁRIA ANDRAŠČÍKOVÁ^a, SVETLANA HROUZKOVÁ^{a*}, and SARA C. CUNHA^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovak Republic, ^b REQUIMTE, Department Chemical Sciences, Laboratory of Bromatology and Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal
svetlana.hrouzkova@stuba.sk

A pesticide is defined as any substance or mixture of substances intended for preventing, destroying, or controlling any pest, including vectors of human or animal disease, unwanted species of plants or animals that cause harm during the production, processing, storage, transport, or marketing of food and wood as well as wood products, or animal feedstuff, or which may be administered to animals for the control of insects, arachnids, or other pest in or on their bodies¹. The use of pesticides in food production has provided numerous benefits in terms of increasing production and quality but on the other hand pesticide residues are of concern in food safety because they are potential health hazards and ubiquitous contaminants in the environment. Therefore, the analytical determination of these compounds is absolutely necessary and for diverse reasons, such as the large number of substances applied for this purpose (over 800) and their widespread use in a variety of crops, cumbersome².

The key step of analytical procedure for determination of pesticide residues is the pretreatment of the sample to isolate interesting compounds from the matrix using appropriate and efficient methods³. Recently, a new microextraction method, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), has been developed by Assai and co-workers⁴ as an efficient sample preparation and preconcentration method. Essentially, DLLME consists in the rapid addition to an aqueous sample contained in a conical test tube of a mixture of two selected solvents, few microliters of a water-immiscible extraction solvent with high density

than water jointly with a dispersive solvent with high miscibility in both extractant and water phases, in order to form a cloudy solution consisting of small droplets of extraction solvent which are dispersed throughout the aqueous phase. In consequence of the very large surface area formed between the two phases, hydrophobic solutes are rapidly and efficiently enriched in the extraction solvent and, after centrifugation, they can be determined in the phase settled at the bottom of the tube⁵.

The aim of this study was to develop a sample preparation method that combines QuEChERS and dispersive liquid-liquid mikroextraction. The effect of several extraction parameters, such as selection of extractive solvent and its volume and volume of dispersive solvent has been tested. Extract acquired after liquid-liquid extraction by QuEChERS method was used as dispersive solvent. Analyses were performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry using selective ion monitoring mode. Good results of linearity, limits of detection and limits of quantification were acquired by proposed sample preparation method. Satisfactory recoveries at three studied concentration levels were obtained. Developed method was applied to the analysis of real orange samples. Only one out of eleven samples was without positive findings of pesticide residues above limit of detection.

This research was supported by the Scientific Grant Agency (VEGA, project No. 1/0647/11).

REFERENCES

1. FAO. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, p. 28. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome: 1986.
2. Soler C., James K. J., Picó Y.: *J. Chromatogr., A* 1157, 73 (2007).
3. Blasco C., Font G., Picó Y.: *J. Chromatogr., A* 970, 201 (2002).
4. Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M.-R. M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S.: *J. Chromatogr., A* 1116, 1 (2006).
5. Cunha S. C., Fernandes J. O.: *Talanta* 83, 117 (2010).

APPLICATION OF SOME CHEMICAL METHODS TO THE INVESTIGATION OF METAL COMPLEX-DNA INTERACTIONS

**LUCIA ANDREZÁLOVÁ* and ZDEŇKA
ĎURAČKOVÁ**

*Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovakia
lucia.andrezalova@fmed.uniba.sk*

Many small molecules which are bound to DNA and cleave DNA duplex are effective pharmaceutical agents, especially in cancer therapy. DNA has a number of sites in which molecule can be bound: between two base pairs (intercalation), in the minor or major grooves and on the outside of the helix. Upon binding to DNA, small molecules are stabilized through a series of weak interactions such as π -stacking interactions of aromatic heterocyclic groups between the base pairs, hydrogen bonds and van der Waals interactions in the case of binding to the DNA helix groove.

Circular dichroism, fluorescence emission spectroscopy and electronic absorption spectroscopy are widely applied to determine the binding characteristics of metal complexes with DNA. The metal complex – DNA interaction can be detected by UV-Vis absorption spectroscopy by measuring changes in the absorption properties of the metal complex (a drug) or the DNA molecules. The absorption spectrum of DNA exhibits a broad band in the UV region with a maximum at 260 nm. Both, hyperchromic and hypochromic effects are the spectral features of DNA concerning to its double helical structure. Hypochromism indicates that the DNA – metal complex binding mode is electrostatic interaction or intercalation which can stabilize the DNA duplex and hyperchromism means a breakage of the secondary structure of DNA. After interaction with the base pairs of DNA, the π^* orbital of the

bound ligand can couple with the π orbital of the base pairs due to the decrease of the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition energy, which results in bathochromic shift in DNA spectrum^{1,2}.

After binding to DNA, the transition metal complexes can oxidatively modify DNA bases and/or the sugar moiety and thus induce DNA strand breaks. Very sensitive and reliable method for detecting DNA damage at the cellular level is single-cell gel electrophoresis (SCGE, or the comet assay)³. The cells, such as isolated peripheral human lymphocytes or cultured cells, are embedded in agarose on a microscope slide, lysed with detergent and treated with high salt concentration. DNA strand breaks allow DNA to extend from lysed and salt-extracted nuclei, or nucleoids, to form a comet-like tail on alkaline electrophoresis. The amount of DNA in the tail reflects the number of relaxed loops and, therefore, the number of breaks in DNA. Comets from undamaged cells have tightly packed supercoiled DNA and no tail. The comet assay is not the only way to measure oxidative DNA damage, but it is also one of the most sensitive and accurate way, being relatively free of artefacts⁴.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA of the Slovak Republic, the project No. 1/1133/11.

REFERENCES

1. Firdaus F., Fatma K., Azam M., Khan S. N., Khan A. U., Shakir M.: *Spectrochim. Acta, A* 72, 591 (2009).
2. Khan T. A., Naseem S., Khan S. N., Khan A. U., Shakir M.: *Spectrochim. Acta, A* 73, 622 (2009).
3. Collins A. R., Dušinská M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Rašlová K., Vaughan N.: *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 139 (1997).
4. Collins A. R.: *Mutat. Res.* 681, 24 (2009).

VALIDATION OF HPLC-ESI-MS-MS METHOD FOR ACRYLAMIDE DETERMINATION IN BAKERY PRODUCTS (COMPARISON OF SIMPLE AND IMPROVED ELECTROSPRAY IONIZATION)

ALENA BEDNÁRIKOVÁ* and ZUZANA CIESAROVÁ

*VUP Food Research Institute, Department of Chemistry and Food Analysis, Priemysel'ná 4, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic
bednarikova@vup.sk*

Summary

An effective sample preparation procedure was established for the determination of acrylamide in bakery products by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The method entails extraction of acrylamide with acidified water followed by cleanup with ethyl acetate. The chromatographic separations were performed on a octadecyl silica column with 1% methanol in water as the mobile phase. The present study is focused on the comparison of two LC-MS-MS systems using simple or improved electrospray ionization. The limit of quantification (LOQ) was 2 ng mL^{-1} for simple ESI and 0.4 ng mL^{-1} for improved ESI which represent 25 ng g^{-1} and 5 ng g^{-1} , respectively, in real bakery products.

Introduction

Since the first mentioning of acrylamide, a toxic and potentially carcinogenic chemical, in heat-treated food¹, several research groups have been participated in the development of rapid and reliable analytical methods for its quantification in a large variety of foodstuffs and were reviewed by several authors²⁻⁶. Most of the published methods are based on either gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) or high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Current applied methods of acrylamide determination in foods typically include several sample preparation steps (impurity removal, analyte extraction, centrifugation, clean-up, pre-concentration) due to the complexity of food samples and low levels of acrylamide. On the other hand new challenges can emerge (e.g. extraction solvents, time and temperature, de-fatting, sample particle size etc.). Some of them have been studied in detail by Petersson et al.⁷ and Goldmann et al.⁸.

Acrylamide does not show any specific wavelength absorption maxima and this fact complicates its detection. For detection of acrylamide after LC separation, tandem mass spectrometry using electrospray in positive mode is the most frequent method of choice²⁻⁸. LC-MS/MS, working in multiple reaction monitoring (MRM) mode, in which the transition from a precursor ion to a product ion is monitored, has some advantages: a) high selectivity; b)

sensitivity; c) a powerful technique for the quantitative analysis. Improvement of the ion source assembly declared by manufactures to produce dramatic gains in sensitivity is patent-protected⁹.

Quantification is performed by adding different kinds of internal standards²⁻⁸. An isotope-labelled acrylamide (e.g. $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide or d_3 -acrylamide) is usually recommended to be used for improving the repeatability of the whole procedure which is important for the complex matrix of the sample where extraction yields could be varied strongly.

This paper presents validation of simple LC-ESI-MS-MS method for acrylamide determination in bakery products and selected validation parameters were used to compare two types of ESI.

Experimental

Chemicals and reagents

Acrylamide (purity 99 %), ethyl acetate (HPLC-grade) and methanol (HPLC-grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). 2,2,3- d_3 -acrylamide (purity 98 %) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Maryland, USA). Glacial acetic acid, potassium hexacyanoferrate trihydrate and zinc sulphate heptahydrate were analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Deionised water was purified with a purification system PURITY Select (HP, Oxon, UK). Nylon syringe filters $0.45 \mu\text{m}$ were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA).

Stock solution of acrylamide (0.5 mg mL^{-1}) and d_3 -acrylamide (0.2 mg mL^{-1}) were each prepared by dissolving the compounds in deionised water and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Working solution was prepared daily by appropriate dilution of the stock solution.

Carrez I solution was prepared by dissolving 15 g of potassium hexacyanoferrate trihydrate in 100 mL of water, and Carrez II solution was prepared by dissolving 30 g of zinc sulphate heptahydrate in 100 mL of water.

Sample preparation

A finely ground or homogenized dry sample (1.000 g) was weighed into a 10 mL centrifuge tube with a cap, and $50 \mu\text{L}$ of the internal standard d_3 -acrylamide (500 ng) and 9 mL of diluted acetic acid (0.1 %, v/v) were added. After shaking by a vortex mixer for 30 s, the mixture was sonicated for 5 min. Then, $500 \mu\text{L}$ of Carrez I solution and $500 \mu\text{L}$ of Carrez II solution were added and shaken for 1 min. After that, the mixture was centrifuged at 8720 g for 10 min and a clear supernatant was obtained.

A volume of 5 mL of the clear supernatant was trans-

ferred to a separatory funnel and extracted with ethyl acetate (3 x 5 mL). The combined organic layers were evaporated at 35 °C to dryness. The residue was dissolved in 1 mL of diluted acetic acid and filtered through a 0.45 µm pore size nylon syringe filter prior LC analysis.

HPLC-MS-MS analysis

The quantification of acrylamide was performed by HPLC-MS-MS with positive electrospray ionization (ESI+) using two different devices of triple quadrupole mass spectrometers (Agilent 6410 and 6460 Triple Quad detector, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to two HPLC systems Agilent 1200 and 1260 series consisting of a binary pump, a vacuum degasser, an autosampler, and a thermostated column compartment. The analytical separation was performed on Atlantis dC18 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm particle size; Waters, Milford, MA, USA) using isocratic mixture of 1 % of methanol and 0.2 % of glacial acetic acid in water at flow rate 0.4 mL min⁻¹ at ambient temperature. The sample volume injected in both systems (LC-QQQ6410 and LC-QQQ6460) was 20 µL and 10 µL, respectively.

Acrylamide was identified using multiple reaction monitoring (MRM) experiments which are based on in-source generation of the protonated molecular ions of acrylamide and the internal standard (*d*₃-acrylamide), as well as a collision-induced production of specific fragment ions. Instrumental parameters used for the acrylamide analysis in the ESI+ mode are summarized in Table I.

Acrylamide was quantified using a linear calibration curve established with a standard solution of acrylamide

dissolved in water. Concentrations were between limit of quantification (LOQ) to 200 ng mL⁻¹. Quantification was performed by comparison of the peak area ratio of acrylamide with internal standard, *d*₃-acrylamide (50 ng mL⁻¹), monitored using the MRM transitions at *m/z* 72 → 55 (acrylamide) and 75 → 58 (*d*₃-acrylamide).

HPLC system, the ionization interface and the mass spectrometric detector were controlled and data were analysed by MassHunter software (Rev.B.01.03, Agilent, Palo Alto, USA).

Results and discussion

Setting of MS-MS conditions

Electrospray ionization is a sensitive technique that is used for the analysis and identification of small molecules. Manufacturers try to achieve/enhance sensitivity in ESI-MS by improving the desolvation and spatial focusing of ions⁹. Thus, we can compare results obtained by two types of constructed ion sources with optimized setting parameters which are shown in Table I. LC-MS/MS working in MRM has a high selectivity, therefore the relevant MRM transitions for acrylamide and internal standard were selected and optimized. Acrylamide gives the precursor ion with *m/z* ~ 72 assigned to its pseudo-molecular ion [M+H]⁺ and fragment ions with *m/z* 55 (probably formed by ammonia elimination of precursor ion [M+H-NH₃]⁺) and two complementary fragment ions with *m/z* 44 and 27. The first transition at *m/z* 72 → 55 has been selected for quantifying because it shows a relatively high intensity. The second transition at *m/z* 72 → 27 has been used for verifica-

Table I

Instrumental parameters used for acrylamide analysis using electrospray ionization in positive mode by two types of ion sources (where AA = acrylamide)

Source parameter	QQQ 6410				QQQ 6460			
Specification	ESI				JetStream			
Gas temperature [°C]	350				300			
Drying gas (N ₂) flow [L min ⁻¹]	10				10			
Nebulizer pressure [psi]	50				60			
Capillary voltage [kV]	2.5				3.5			
Sheath gas heater	–				250			
Sheath gas flow	–				11			
Fragmentor [V]	45				50			
Dwell [ms]	50				50			
Cell accelerator [V]	–				4			
Acquisition parameters	AA		<i>d</i> ₃ -AA		AA		<i>d</i> ₃ -AA	
Precursor ion <i>m/z</i>	72		75		72		75	
Product ion <i>m/z</i>	55	27	58	30	55	27	58	30
Collision energy [V]	6	14	6	14	10	18	10	18

tion of acrylamide presence by calculating ratio of qualifier response to quantifier response. In any given MS/MS conditions, the relative ratio of acrylamide qualifier to quantifier is 12 % calculated for the standard solution and ± 20 % of uncertainty of presented value is a satisfactory range in real matrices.

Internal standard (d_3 -acrylamide) gives the precursor ion with $m/z \sim 75$ and fragment ions with m/z 58, 44 and 30, respectively. The relative ratio of d_3 -acrylamide qualifier to quantifier is 16 % calculated for standard solution.

Sample treatment

Numerous methods have been developed to determine acrylamide in different heat-treated food samples. Most researchers use reverse-phase chromatography^{2–8} with mobile phase containing predominantly aqueous 0.1% acetic acid or 0.05% formic acid for the chromatographic separa-

tion of acrylamide. Whereas, our choice was Atlantis dC18 column and aqueous 0.2% acetic acid containing 1% methanol as the mobile phase, as well.

Hoenicke et al.¹⁰ published a method for reliable quantification of acrylamide in complex matrices as well as in lower concentrations (up to 5 ng g⁻¹) based only on liquid-liquid extraction with ethyl acetate. They used water extraction at 60 °C followed by removing the fat layer with iso-hexane. Clear aqueous phase obtained after centrifugation was extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phases were reduced to 1 % of original volume and analyzed directly by GC-MS/MS. According to other published results^{7,8} we slightly change the above mentioned procedure as follows: a) extraction with acidified water at ambient temperature; b) skip removing the fat layer; c) centrifugation of the sample at higher rpm; d) reducing the extraction amount of ethyl acetate while extracting 3-times; e) evaporation of ethyl acetate to dryness

Table II

Comparison of single and multi-stage aqueous extractions of acrylamide (SD = standard deviation, $n = 6$)

Aqueous extraction (stage)	Area AA \pm SD	Area d_3 -AA \pm SD	Ratio (AA/ d_3 -AA) \pm SD	Lord's test ($u_{krit} = 0.250$)
1 st	4327 \pm 492	7318 \pm 728	0.591 \pm 0.028	–
2 nd	1126 \pm 119	1906 \pm 207	0.591 \pm 0.018	$u_{12}=0.003$
3 rd	385 \pm 41	653 \pm 70	0.590 \pm 0.020	$u_{13}=0.010$
merged (1 st + 2 nd)	2914 \pm 58	4955 \pm 140	0.588 \pm 0.026	$u_{1M}=0.039$

Table III

Comparison of analytical characteristics of the proposed methodology for the determination of acrylamide (linear calibration equation ($y = a \cdot x + b$) was calculated; where x represents relative concentration of acrylamide vs. internal standard; y represents relative peak area of acrylamide vs. d_3 -acrylamide; s_a , s_b represent standard deviations of calculated parameters of linear regression)

	LC-QQQ 6410	LC-QQQ 6460
Retention time, min	2.2	2.2
<i>Aqueous calibration</i>		
b -intercept of regression equation, $\pm s_b$	-0.0005 ± 0.0021	0.00102 ± 0.00066
a -slope of regression equation, $\pm s_a$	0.893 ± 0.011	0.9812 ± 0.0012
Correlation coefficient, R^2	0.9994	0.9998
Limit of detection (LOD), ng mL ⁻¹	0.5	0.1
Limit of quantification (LOQ), ng mL ⁻¹	2.0	0.4
<i>Matrix calibration</i>		
Spiked levels, ng g ⁻¹	25, 50, 100, 250 and 500	12.5, 25, 50, 100 and 250
b -intercept of regression equation, $\pm s_b$	0.148 ± 0.005	0.0552 ± 0.0011
a -slope of regression equation, $\pm s_a$	0.885 ± 0.011	0.9841 ± 0.0012
Correlation coefficient, R^2	0.998	0.9994
Limit of quantification (LOQ), ng g ⁻¹	25.0	5.0

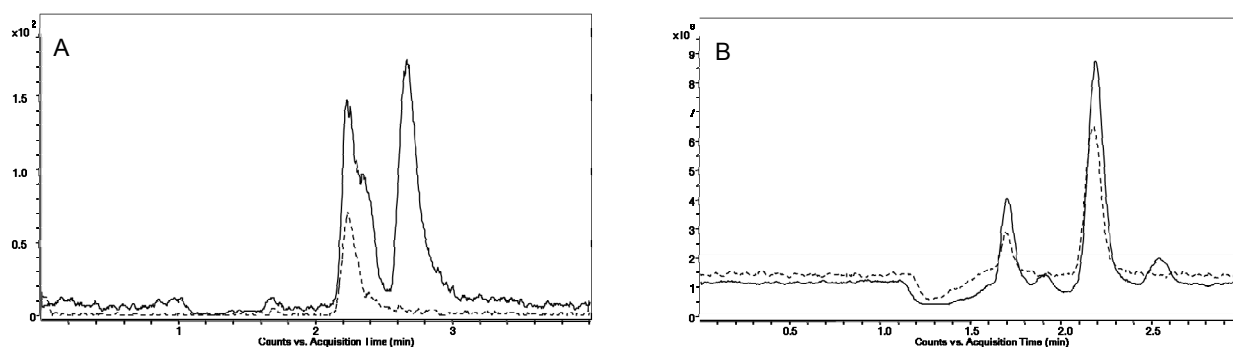


Fig. 1. Overlaid extracted MRM chromatograms of acrylamide (transition at m/z 72 \rightarrow 55) in standard aqueous solution (concentration level 1 ng mL⁻¹; dotted line) and in crisp bread (in case A – determined below LOQ, in case B – determined 28 ng g⁻¹; solid line) in two LC-MS-MS systems (A/ HPLC- ESI-QQQ6410 – simple ESI+; B/HPLC-ESI- QQQ 6460 – improved ESI+)

and dissolution in 1 mL of acidified water.

In this study, cereal based matrices were used as the test material for resolving a problem how many extraction stages are required for acrylamide determination. The internal standard *d*₃-acrylamide (500 ng) was added to one gram of ground sample and extracted three times with acidified water. There were six replicates in each stage in order to calculate the relative responses of acrylamide area and internal standard (Table II). Although the ratios of areas in particular stages were similar, a considerable decrease of areas was observed, which is in good agreement with Gökmen *et al.*¹¹, who claimed that at least two extraction steps were required for complete extraction of acrylamide from cereal and potato based food products. The dilution caused by triple extraction was not advantageous for our purposes. What is more, due to the use of internal standard, a single extraction proved sufficient. According to the presented results, our sample preparation procedure consists of one step aqueous extraction with protein precipitation followed by simple ethyl acetate extraction and then again dissolving in water.

Method performance comparison on two LC-MS systems

To check performance of the developed analysis method of acrylamide, parameters such as limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and linearity were calculated (see Table III). Quantification was performed on the basis of calibration line of the peak area ratio against the concentration ratio of acrylamide with internal standard, *d*₃-acrylamide. The calibration curves for the determination of acrylamide in water were linear over the range of relevant LOQ to 200 ng mL⁻¹ with 50 ng mL⁻¹ of *d*₃-acrylamide and correlation coefficients (r^2) obtained were ≥ 0.995 . Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated from linear regression by following equations: $LOD = 3 * (s_b/a)$ and $LOQ = 10 * (s_b/a)$, respectively.

Two real samples of crisp bread (marked as A, B)

were spiked at five different levels of acrylamide standard and matrix calibration curves were estimated. Similar approach for the estimation of LOQ was applied in real matrices. The obtained results are shown in Table III.

The concentration of acrylamide in crisp bread A and B calculated from aqueous calibration were 175 ± 10 ng g⁻¹ and 27.6 ± 0.9 ng g⁻¹, respectively, and estimated from matrix calibration were 167 ± 14 ng g⁻¹ and 28.1 ± 1.0 ng g⁻¹, respectively. Comparing results obtained from aqueous and matrix calibration curves it was concluded that the preparation of aqueous calibration of acrylamide with internal standard is usable for its quantification in real matrices.

However, the changed volume of the sample injection (from 20 μ L to 10 μ L) was not taken into account, it is clear that LOD and LOQ of the method were reduced 5-times only by using the improved technology of ionization. Fig.1 shows overlaid MRM chromatograms of the acrylamide standard solution (at concentration level 1 ng mL⁻¹) and acrylamide determined in crisp bread (approximately 25 ng g⁻¹) measured by the two HPLC-MS-MS systems.

Analysis of test food materials

Moreover, the accuracy of the method was observed in analyses of different test materials in three consecutive days. Six independent measurements of the test materials supplied from the Food and Environment Research Agency (Fera, York, UK) were carried out each day which resulted in average acrylamide concentration of 79 ± 15 μ g kg⁻¹ in crisp bread (FAPAS test material T3018, satisfactory range of 57–145 μ g kg⁻¹); 288 ± 20 μ g kg⁻¹ and 315 ± 20 μ g kg⁻¹ in crisp bread (FAPAS test material T3025, satisfactory range of 200–444 μ g kg⁻¹) and 1180 ± 180 μ g kg⁻¹ in biscuit (FAPAS test material T3019, satisfactory range of 867–1644 μ g kg⁻¹) (Table IV). Our method is sufficiently robust and has been successfully used for acrylamide determination in materials such as cereal based fried or baked products^{12,13}.

Table IV
Accuracy and repeatability of acrylamide determination

		AA (ng/g) determined	
		by LC –QQQ 6410	by LC – QQQ 6460
FAPAS test materials			
T3018 (crisp bread)	1 st day	83 ± 5	–
Mean value 101 ng g ⁻¹	2 nd day	91 ± 5	–
Satisfactory range:	3 rd day	72 ± 5	–
(57–145) ng g ⁻¹	average	79 ± 15	–
T3019 (biscuit)	1 st day	1288 ± 60	–
Mean value 1256 ng g ⁻¹	2 nd day	1264 ± 60	–
Satisfactory range:	3 rd day	1058 ± 60	–
(867–1644) ng g ⁻¹	average	1180 ± 180	–
T3025 (crisp bread)	1 st day	289 ± 5	309 ± 6
Mean value 322 ng g ⁻¹	2 nd day	298 ± 10	330 ± 9
Satisfactory range:	3 rd day	278 ± 7	305 ± 6
(200–444) ng g ⁻¹	average	288 ± 20	315 ± 20

Note: Test materials T3018 and T3019 are analyzed in years 2008 and 2009

Conclusion

The results presented in this study demonstrate that LC-ESI-MS/MS performed in both of two devices is a suitable technique for the quantitative analysis of acrylamide in such complex matrices as cereals products. The obtained data demonstrate that LOD and LOQ by improved electrospray ionization technology were reduced 5-times.

This work was supported by the Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic for the Structural Funds of the EU under the contract No. 26240120024 and 2624020050.

REFERENCES

1. Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnquist M.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998 (2002).
2. Wenzl T., de la Calle B., Anklam E.: *Food Addit. Contam.* 20, 885 (2003).
3. Castle L., Eriksson S.: *J. AOAC Int.* 88, 274 (2005).
4. Zhang Y., Zhang G., Zhang Y.: *J. Chromatogr.* 1075, 1 (2005).
5. Keramat J., LeBail A., Prost C., Soltanizadeh N.: *Food Bioprocess Technol.* 4, 340 (2011).
6. Tekkeli S.E.K., Önal C., Önal A.: *Food Anal. Method* 5, 29 (2012).
7. Petersson E., Rosen J., Turner Ch., Danielsson R., Hellenäs K.E.: *Anal. Chim. Acta* 557, 287 (2006).
8. Goldmann T., Perisset A., Bertholet M. C., Stadler R. H., Petersson E. V., Hellenäs K. E.: *Food Addit. Contam.* 23, 437 (2006).
9. Hoenicke K., Gatermann R., Harder W., Hartig L.: *Anal. Chim. Acta* 520, 207 (2004).
10. Agilent – Technical Note 5990-3494 en-10 CMS.pdf; <http://www.agilent.com/chem/>
11. Gökmen V., Morales F. J., Ataç B., Serpen A., Arribas-Lorenzo G.: *J. Food Compos. Anal.* 22, 142 (2009).
12. Ciesarova Z., Kukurova K., Bednarikova A., Morales F. J.: *J. Food Nutr. Res.* 48, 20 (2009).
13. Kukurova K., Morales F.J., Bednarikova A., Ciesarova Z.: *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1532 (2009).

METODIKA SPME-GC-MS ANALÝZY PRCHAVEJ FRAKcie OVOCNÝCH DŽÚSOV

VERONIKA GRIGEROVÁ a EVA BENICKÁ*

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
eva.benicka@stuba.sk*

Práca je zameraná na analýzu prchavých zlúčenín v ovocných džúsoch, ktoré vo veľkej miere ovplyvňujú ich senzorické vlastnosti. Prchavé látky podieľajúce sa na tvorbe aromatického profilu môžeme zaradiť medzi chemické zlúčeniny, ako sú aldehydy, ketóny, alkoholy, estery, laktóny, terpény. Podľa literatúry boli použité rôzne izolačné a separačné metódy, ako SPE, SPME, SBSE a priama extrakcia kvapalina-kvapalina. K následnej separácii sa využívalo spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektroskopiou, výsledky analýzy však výrazne ovplyvňuje výber vhodnej izolačnej metódy. Aromatický profil jednotlivých džúsov sa líši v závislosti od druhu ovocia, použitých metód izolácie a separácie, ako aj spôsobu spracovania, uskladnenia. Informácie o profilovom zložení džúsov umožňujú rozlíšenie medzi pravými organickými džúsmi a džúsmi s prídavkom umelých sladidiel.

Ovocné džúsy sú produktmi spracovaného ovocia. Analýza umožňuje identifikáciu a stanovenie zastúpených vonných a nevonných prchavých zlúčenín, ktoré vplývajú priamo na senzorické vlastnosti produktov. Senzorické vlastnosti vonných zlúčenín, obzvlášť ich hraničné vnímanie, sa môže meniť v závislosti od kombinácie prchavých zlúčenín^{1,2}. Potrebné je poznať profil prchavých zlúčenín. Vonné vlastnosti štiav sú ovplyvnené fyzikálnym stavom, chemickými vlastnosťami prchavých zlúčenín, interakciami medzi nimi počas spracovania a skladovania.

Tieto potravinové komodity obsahujú vysoké množstvo zlúčenín, avšak len niekoľko z nich môžeme zaradiť medzi látky zodpovedné za ich charakteristický vonný a chuťový profil produktov. Každý druh ovocia môžeme charakterizovať viac ako 100 prchavými zlúčeninami, v závislosti od ich stupňa zrelosti. Vonné zlúčeniny charakteristické pre citrusové plody ako sú pomaranče a citróny sú monoterpény, seskviterpény a ich deriváty. Pre ostatné necitrusové druhy ovocia sú charakteristické estery, aldehydy, napr. pre banány, jahody, jablká³. Podľa literatúry bolo HRGC-MS metódou v džúsoch identifikovaných 80 zlúčenín. V pôvodnom džúse prevládali 1-hexanol, 1-butanol, E-2-hexenal, E-2-hexenol a butylester kyseliny octovej. V koncentrovaných jablkových džúsoch sa nachádzala väčšina prchavých zlúčenín typických pre jablká iba v stopových koncentráciách. Prítomnosť malého množstva alkoholov

ako je 1-hexanol a 1-butanol je možné vysvetliť výskytom v glykozidických väzbách, z ktorých sú uvoľňované pri tepelnom spracovaní v kyslom prostredí. Hlavnou zložkou v koncentrovaných džúsoch je furfural.

U rôznych džúsov je rozdiel v množstve vonných zlúčenín. Môže to byť spôsobené druhom ovocia, pasterizáciou, umiestňovaním do fliaš, balením a skladovaním⁴. Prchavé zlúčeniny ovplyvňujú senzorické vlastnosti čerstvého ovocia a pripravených ovocných produktov. Chuť a vôňa ovocia sú tvorené komplexom skupín chemických zlúčenín ako sú aldehydy, alkoholy, ketóny, estery, laktóny, terpény a iné. Informácia o aromatickom profile prchavých látok nám umožňuje rozlíšiť prírodné džúsy od nápojov s umelými sladidlami. Koncentrácia týchto prchavých zlúčenín je veľmi nízka ($\mu\text{g l}^{-1}$). Ovpľvňujú ju dva faktory: poľnohospodársky (druh, klimatologické podmienky, stupeň zrelosti) a technologický (podmienky pri zbere úrody, skladovanie a podmienky spracovania).

Z porovnania získaných informácií je zrejmé, že zloženie džúsov jednotlivých druhov ovocia je vo veľkej miere ovplyvnené druhom, podmienkami skladovania a spôsobom spracovania ovocia a šťavy. Veľký vplyv na stanovené množstvo prchavých zlúčenín mal aj spôsob izolácie a samotná separácia látok.

Enzymatické hnednutie je nežiadúcim procesom spôsobujúcim znižovanie kvality, kde kľúčovými enzýmami sú polyfenolové oxidázy. Tieto enzýmy sú prítomné vo všetkých rastlinách, vo väčšom množstve sa vyskytujú v jablkách, hruškách, mangu a i. Prebieha oxidácia fenolového substrátu polyfenolovou oxidázou na reaktívny *o*-chinón a následne dochádza k polymerizáciu *o*-chinónu na pigment hnedého sfarbenia. Enzymatické hnednutie nemá vplyv iba na sfarbenie, ale aj na výživné a iné senzorické vlastnosti, vrátane vône, chuti. V potravinárskom priemysle sa používa 5 metód na kontrolovanie týchto enzymatických procesov. Tepelné spracovanie, kontrola pH, vylučovanie kyslíka (spôsobuje zníženie produkcie prchavých látok), používanie prírodných aditív, používanie činidiel s protihnednutím účinkom. Najpoužívanejším činidlom je kyselina askorbová, ktorá redukuje *o*-chinón na pôvodnú fenolovú zlúčeninu skôr než nastane vytvorenie pigmentu. Nevýhodou je, že kyselina askorbová má negatívny vplyv na zloženie vonných zlúčenín v jablkových džúsoch, dochádza k zmene koncentrácií niektorých prchavých zlúčenín zodpovedných za aromatický profil⁵.

Proces pasterizácie je založený najmä na tepelnej energii, na redukcii mikroorganizmov sa používajú aj metódy ako je použitie vysokého tlaku a pulzné elektrické pole, vďaka ktorým nedochádza k zhoršeniu kvality spôsobenej teplom. Spracovanie oxidom uhličítým prebieha pri nižšej teplote, a tým dochádza k menšiemu

pôsobeníu na nutričné a fyzikálnochemické vlastnosti. Pri tomto spracovaní pomarančových, mrkvových, mandarínkových a iných džúsov nedošlo k zmene fyzikálnych ani chemických vlastností. Došlo k zmene sfarbenia: žlté a svetlé sfarbenie vzrástlo a červené pokleslo⁶.

V praktickej práci sa použila technika SPME so skoncentrovaním zložiek z parnej fázy nad vzorkou vo vzorkovnici. Sledoval sa vplyv parametrov ako typ vlákna, úprava pH, prídavok solí, čas a teplota expozície vlákna, parametre dávkovacej techniky pre GC-MS. Vo vzorkách džúsov sa identifikovali zložky so zastúpením viac ako 1 % v izolovanej zmesi látok parnej fázy. Podľa izolovaného množstva vybraných zlúčenín sa optimalizovala metodika spracovania džúsov.

Autori vyjadrujú poďakovanie Vedeckej grantovej agentúre VEGA MŠ SR a SAV za podporu (grant č. 1/0483/11).

LITERATÚRA

1. Barboni T., Luro F., Chiaramonti N., Desjobert J.-M., Muselli A., Costa J.: *Food Chem.* 116, 382 (2009).
2. Mirhosseini H., Salmah Y., Nazimah S.A.H., Tan C.P.: *Food Chem.* 105, 1659 (2007).
3. D'Acampora Zellner, B., Dugo P., Dugo G, Mondello L.: *J. Chromatogr., A* 1186, 123 (2008).
4. Elss S., Preston C., Appel M., Heckel F., Schreier P.: *Food Chem.* 98, 269 (2006).
5. Komthong P., Igura N., Shimoda M.: *Food Chem.* 100, 1342 (2007)
6. Gasperi F., Aprea E., Biasioli F., Carlin S., Endrizzi I., Pirretti G., Spilimbergo S.: *Food Chem.* 115, 129 (2009).

GC ANALYSIS OF THE EFFECT OF EWE INDIVIDUALS ON MILK FATTY ACID COMPOSITION

LADISLAV SOJÁK^a, RÓBERT KUBINEC^a, JAROSLAV BLAŠKO^{a*}, ALEXANDRA SZABÓOVÁ^a, PETER PODOLEC^a, and MILAN MARGETÍN^b

^a *Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava,* ^b *Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, SK-949 92 Lužianky, Slovakia*
blasko@fns.uniba.sk

The experimental flock of 328 ewes belonging to three breeds (148 Tsigai, 124 Improved Valachian, and 56 Lacaune) with ewes' parity 1 till 8 was grazed on pasture and milk was sampled on the same day in the morning. Fatty acid (FA) milk fat content in particular the content of conjugated linoleic acid (CLA), oleic acid (OA) and 12:0 – 16:0 saturated FA (SFA) was examined with regard to variation among individual ewes, breed, parity and relationship to milk yield. Individual ewes showed the most significant effect on the FA milk fat profile. The CLA milk fat content varied in the wide range of 5–26 mg g⁻¹ FA, thus fivefold among individual ewes. Similarly, the values of Δ -9 desaturase indexes varied within a triple range. The ewes' breed and parity had significant effect on some milk FA and atherogenicity index, and systematic trends were found. The ewes' milk yield varied within a 12-fold range, and that of Lacaune

ewes was significantly higher ($P < 0.05$) compared with other two breeds. An inverse not quite significant relations ($P \approx 0.05$) between the milk yield and the CLA milk fat content were found in Tsigai and Lacaune breeds, and significant for Improved Valachian ($P < 0.001$). With increasing milk yield we observed a decrease also in the content of α -linolenic acid and 18:0 SFA and an increase in 4:0 – 16:0 SFA content in particular that of 14:0 and 10:0 SFA. Variations in the content of OA and linoleic acid were insignificant. The average milk yield of ewes' flock was similar with 1–3 parities, and it decreased approximately by 60% with increasing parities up to 7. The milk fat content of 6:0 – 16:0 SFA ($P \approx 0.05$ – 0.001 for the individual acids), slightly CLA ($P \approx 0.05$), and α -linolenic acid ($P < 0.05$) increased while that of OA ($P < 0.001$), *cis*-9 16:1 ($P \approx 0.05$), and linoleic acid ($P < 0.001$) decreased with rising parity up to tri-pentaparus ewes from the flock. A higher OA content and a lower myristic acid ($P < 0.001$) content for primiparus ewes for flock as well as for all the three breeds was the most striking difference between primiparus and multiparus ewes. Genetic selection of experimental flock ewes based on the content of nutritional beneficial milk FA can be initiated by selecting ewes with a higher CLA milk fat content and higher milk yield.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract Nos. APVV-0416-10, APVV-0458-10, APVV-0163-06, LPP-0198-06 and LPP-0098-06.

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENIE KOFEÍNU V NÁPOJOCH S VYUŽITÍM PRIETOKOVEJ INJEKČNEJ ANALÝZY

FRANTIŠEK ČACHO*, LUKÁŠ
JANKUV, LUKÁŠ LAUKO, ALENA
MANOVÁ a ERNEST BEINROHR

*Ústav analytickej chémie FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
frantisek.cacho@stuba.sk*

Kofeín je alkaloid zo semien kávovníka (*Coffea*) – najčastejšie *Coffea arabica* a *Coffea canephora*. Nachádza sa však aj v iných rastlinách. Má povzbudzujúce účinky na centrálnu nervovú sústavu a používa sa ako súčasť mnohých povzbudzujúcich nápojov. Na stanovenie kofeínu v rôznych matriciach sa používa najmä metóda HPLC¹, avšak v mnohých prípadoch sa uplatňujú aj ďalšie analytické metodiky (UV/VIS/IČ spektrometria, elektrochemická analýza a podobne)^{2,3}.

Jedným z možných postupov je elektrochemická oxidácia kofeínu na elektróde z bórom dopovaného diamantu³. V našej práci sme sa rozhodli použiť pracovnú elektródu z porézneho sklovitého uhlíka. Túto sme pre zvýšenie účinnosti upravili nanosením vrstvy nafionu. Na samotné merania sme použili elektrochemický prietokový

injekčný analyzátor, ktorý umožnil automatické miešanie vzorky s elektrolytom a aj čiastočné riedenie vzorky. Obsah kofeínu sme stanovili v niekoľkých druhoch energetických a kolových nápojov ako aj vo výživových doplnkoch. Z jednotlivých nápojov sme pred analýzou odstránili CO₂ pomocou ultrazvuku, následne sme tieto zriedili demineralizovanou vodou a analyzovali. Výživové doplnky vo forme tabliet sme rozpustili za varu v kyseline sírovej s koncentráciou 0,1 mol dm⁻³, zriedili vodou a analyzovali.

Práca vznikla vďaka podpore projektu Drinking Water Quality Risk Assessment and Prevention in Novi Sad municipality Serbia NATO Science for Peace project SfP 984087 a projektu APVV SK-SRB-0022-11.

LITERATÚRA

1. Casal S., Oliveira M. B., Ferreira M. A.: *Food Chem.* 68, 481 (2000).
2. Najafi N. M., Hamid A. S., Afshin R. K.: *Microchem. J.* 75, 151 (2003).
3. Lourenção B. C., Medeiros R. B., Rocha-Filho R. C., Mazon L. H., Fatibello-Filho O.: *Talanta* 78, 748 (2009).

DEVELOPMENT OF NOVEL CHEMICALLY MODIFIED ELECTRODES FOR ASSESSMENT OF NEUROTRANSMITTERS INVOLVED IN NEURO-DEGENERATIVE DISEASES

**ANTON CIUCU, OVIDIU COVACI,
IULIA-GABRIELA DAVID, and VASILE
DAVID**

*Faculty of Chemistry, University of Bucharest, Panduri
Av. 90-92, 050671 Bucharest, Romania
anton_ciucu@yahoo.com*

Chemically modified electrodes (CMEs) have attracted great interest over the past four decades as researchers attempted to exert more direct control over the chemical nature of an electrode surface. One of the most important properties of CMEs is their ability to catalyze the oxidation or reduction of solute species which exhibit high overvoltages at unmodified surfaces. As a major electrocatalysis effect, CMEs lower the potential required for the electrolysis of the redox system and, therefore, these electrodes possess direct application in a variety of analytical situations, enhancing the sensitivity and selectivity of the detection method. In this respect, carbonaceous electrodes materials have been used in our laboratory for several purposes: a) In biocomposites materials for immobilization of biological molecules; b) Signal transducing platforms for designing a variety of biosensors; c) Electrocatalysis of different analytes.

Dopamine (DA) and serotonin (5-HT) belong to the family of chemical neurotransmitters and there is considerable interest in their electrochemical determination with the challenge of removal the ascorbic acid (AA) interference. In our recent work¹, an electrocatalytic action of iron phthalocyanine (FeIIPc) at the voltammetric oxidation of DA and 5-HT has been investigated. In these studies carbon nanotube paste electrodes modified with FeIIPc have been employed. Due to very poor solubility of phthalocyanines in most solvent systems, these compounds have been employed in CMEs prepared by direct deposition onto a variety of electrode substrates, or included in the electrode materials. The interferences of other electroactive species like AA, uric acid (UA), paracetamol etc. appearing in biologic samples have been also investigated.

A new carbon paste electrode incorporating the anionic surfactant SDS in the paste was tested by cyclic voltammetry toward DA. The modified electrode discriminates effectively between the cationic form of DA and the anionic electroactive species existing normally in biological fluids at the physiological pH. On this principle, a DPV method for DA determination has been developed. It has the detection limit comprised in the submicromolar range and the capability to remove completely the interference of AA and to diminish significantly the interference of UA. The method has been tested with good results on real samples of deproteinized serum².

Recently, films of electrochemically formed polyethacridine imprinted with dopamine template have been applied on the measuring surface of glassy carbon electrodes². The performance of those modified electrodes for the voltammetric determination of DA in various media has been investigated. Owing to the property of the molecular imprinted layer, the DA determinations in micromolar range could be performed in the presence of high, physiological concentrations of electroactive species like AA, UA, etc. The electropolymerization was carried out in aqueous buffered solutions at pH 5.0. By using the differential pulse voltammetric (DPV) technique a limit of DA detection as low as 4.4 nmol/L could be achieved. Satisfactory recoveries were obtained in artificial cerebrospinal fluid containing an excess of AA relative to DA of 2000:1.

This work was supported by the UEFISCDI Romanian Agency (Project no. 251/2011 and the Project RO-FR-497-2011).

REFERENCES

1. Patrascu D., David I., David V., Mihailciuc C., Stamatina I., Ciurea J., Nagy L., Nagy G., Ciucu A. A.: *Sens. Actuators, B* 156, 731 (2011).
2. Patrascu D. G., David V., Balan I., Ciobanu A., David I. G., Lazar P., Ciurea I., Stamatina I., Ciucu A. A.: *Anal. Lett.* 43, 1100 (2010).

IMPROVED ELECTROCATALYTIC VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF GUANINE AT A COBALT PHTHALOCYANINE MODIFIED CARBON NANOTUBES PASTE ELECTRODE

**ANTON CIUCU^{a*}, OVIDIU COVACI^a,
IULIA-GABRIELA DAVID^a, KATARÍNA
BENÍKOVÁ^b, and JÁN LABUDA^b**

^a Faculty of Chemistry, University of Bucharest, Panduri Av. 90-92, 050671 Bucharest, Romania, ^b Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
anton_ciucu@yahoo.com

The development of sensors and biosensors for assessment and monitorization of risk chemicals of environmental origin and selected drugs upon DNA damage is an obvious necessity of the society, with economical implications. This is the reason why the field specialists continue to search the realization of new analytical nanotechnologies based on new bioanalytical instruments (like micro-biosensors) for the detection and assessment of the mentioned compounds in complex matrices.

In the last years, a relative impressive number of inventive designs sensors and biosensors for risk chemicals of environmental origin detection have appeared. Novel materials with unique physical and chemical properties and their introducing into the construction of biosensors with a high performance are the subject of great research interest. Electrodes based on nanostructured materials (mostly carbon based), benefit of their reduced size which make them very attractive in development of miniaturized biosensors. The compatibility with micro-fabrication technology and the low cost of these devices make them promising tool for the rapid and inexpensive detection of many important chemical compounds in different matrices.

The incorporation of electroactive materials into a carbon nanotubes paste electrode is advantageous and has been widely applied in the electroanalytical community¹. Metallophthalocyanines are a possible choice for preparing voltammetric modified sensors due to their catalytic activity for a wide range of redox processes^{2,3}. The sensitivity and the selectivity of the (bio)sensors can be greatly improved as a result of the electrocatalysis by metallophthalocyanines^{4,5}. Recently, immobilization of phthalocyanines and metallophthalocyanines at the surface of carbon nanotubes has been achieved^{6,7}. The resulting phthalocyanine-nanotube complexes (nanocomposites) possess the catalytic properties of phthalocyanine without any destruction of the electrical properties and structures of the

nanotubes and thus noncovalent functionalization of carbon nanotubes is important for developing new nanomaterials.

A sensitive and reliable electrochemical method is proposed for the determination of guanine utilizing the excellent properties of CoPc and CNT as electrode material. The results indicated that the modification of a CNTPE with this compound results in amplification of the guanine oxidation response in contrast to that on the unmodified CNTPE. The electrochemical behavior of the modified electrode and the mechanism of the oxidation of guanine were investigated using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The methods parameters were optimized. A detection limit of $1.3 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ was obtained for guanine using the electrocatalytic oxidation signal corresponding to the Co(II)/Co(III) redox process.

Analytical methods, like the one proposed here making use of nanostructured carbonaceous materials (CNTs) and electrocatalyst (CoPc) offers new solutions for efficient, rapid, and selective detection of risk chemicals of environmental origin and of evaluation of their action and of selected drugs upon DNA damage in complex matrices and thus can be used for the purpose of improving the ways of control of human health and of environmental pollution.

This work was supported by the UEFISCDI Romanian Agency (Project RO-SK-477-2011).

REFERENCES

1. Ricci F., Amine A., Moscone D., Palleschi G.: *Anal. Lett.* 36, 1921 (2003).
2. Mafatle T., Nyokong T.: *Anal. Chim. Acta* 354, 307 (1997).
3. Ciucu A. A., Baldwin R. P.: *Electroanalysis* 4, 515 (1992).
4. Ciucu A. A., Negulescu C., Baldwin R. P.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 293 (2003).
5. Oni J., Westbroek P., Nyokong T.: *Electroanalysis* 14, 1165 (2002).
6. Cao L., Chen H. Z., Zhou H. B., Zhu L., Sun J. Z., Zhang X. B., Xu J. M., Wang M.: *Adv. Mater.* 15, 909 (2003).
7. Balan I., David I. G., David V., Stoica A. I., Mihailciuc C., Stamatina I., Ciucu A. A.: *J. Electroanal. Chem.* 654, 8 (2011).

DETAILED ANALYSIS OF C6-C12 AROMATIC HYDROCARBONS IN LOW BOILED PETROCHEMICAL PRODUCTS BY FLOW MODULATED COMPREHENSIVE TWO DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY

ROMAN GOROVENKO, JÁN KRUPČÍK*, PAVEL MÁJEK, and IVAN ŠPÁNIK

*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
jan.krupcik@stuba.sk*

Comprehensive two-dimensional gas chromatography analysis of C6-C12 aromatic compounds in low boiled petrochemical products shall be presented in this paper. Experiments were performed using an Agilent 7890A GC quipped with flow modulator, flame ionization and quadrupole mass spectrometric detector (Agilent Technologies). Both, normal phase column setup (DB-5ms (30 m × 250 μm × 0.25 μm of poly(5%-phenyl-95%-methyl) siloxane, Agilent Technologies) connected to HP-INNOWax (5 m × 250 μm × 0.15 μm of polyethylene glycol)), as well as reversed phase column setup (ionic liquid

SLB-IL 100 (30 m × 250 μm × 0.20 μm film thickness, Sigma-Aldrich) connected to HP-5ms (5 m × 250 μm coated with 0.25 μm of poly(5%-phenyl-95%-methyl) siloxane, Agilent Technologies)) were used in this study. GC×GC-FID as well as GC×GC-qMSD measurements were registered simultaneously.

Mass spectra obtained by GC×GC-qMSD measurements together with compound boiling points were used for identification purposes. Quantitative measurements were performed both by modulated GC×GC-FID as well as non modulated GC-FID. Practically equal quantitative results were obtained by one dimensional and comprehensive (two dimensional) techniques. The identity of C6-C12 aromatic hydrocarbons present in studied samples based on the mass spectra and boiling points as well as GC-FID and GC×GC-FID quantitative data will be depicted.

Authors are thoroughly grateful to Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU (ITMS 26240120001 and 26240120025) for financial support.

QUANTIFICATION OF EMERGING ORGANIC CONTAMINANTS IN THE DANUBE RIVER SAMPLES BY HPLC

**NEVENA GRUJIĆ^{*a}, NATAŠA MILIĆ^a,
MAJA TURK SEKULIĆ^b, JELENA
RADONIĆ^b, MAJA MILANOVIĆ^a,
IVANA MIHAJLOVIĆ^b, and MIRJANA
VOJINOVIĆ MILORADOV^b**

^a Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, ^b Department for Environmental engineering and occupational health, Faculty of Technical Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 6, Novi Sad, Serbia
nevenagrujic@hotmail.com

Introduction

Surface water is often used as a source for a drinking water production or for leisure and recreational activities. Surface waters are contaminated with thousands of chemical compounds originating from industry, agriculture, household use which number is still increasing. The safety of surface water systems should be an imperative for each society since contaminations of these systems can cause serious effects on human health. New group of environmental pollutants are often identified as „emerging substances” and are widely perceived as unregulated substances. Emerging substances include global organic and some inorganic contaminants, such as pharmaceuticals, personal care products, flame retardants, endocrine-modulating compounds, industrial chemicals (new and recently recognized), nanoparticles, biological metabolites, toxins and many other chemicals from the NORMAN open list of the currently most frequently discussed emerging substances and emerging pollutants (latest update approved March 2011). It is almost inevitable that small amounts of these compounds, which are manufactured to protect human health, improve consumer goods or optimize agricultural production, are unintentionally released into the environment. Pharmaceuticals and other polar emerging contaminants are present up to the $\mu\text{g L}^{-1}$ range in surface water, rivers, lakes and groundwater as a consequence of the systematic input of wastewater. Relatively recent improvements in sophisticated laboratory analytical methods have enabled the identification and quantification of these substances, in very low concentrations (ppb, ppt and lower), which likely have been present in waters for decades. By contrast with regular persistent organic pollutants, which often have longer environmental half-lifetimes, the continuous discharge in the environmental mediums may make emerging substances “pseudo-persistent” contaminants.

In the past decade the presence of pharmaceutical residues in the environment has, become a subject of growing concern. Due to the continuous input that leads to the long-term adverse effects on the aquatic and terrestrial organisms, the special attention is being paid to their concentration levels in the aquatic environment. Up to 95% of the administered dose of human or veterinary drugs can be excreted unmetabolized and discharged into wastewater. Most of the pharmaceuticals could not be completely removed using wastewater treatment plants (WWTPs) and, accordingly, they are released into natural waters. Pharmaceuticals are usually highly water soluble and poorly degradable. Therefore, they can pass through all natural filtrations and reach ground water and ultimately drinking water.

Caffeine, an emerging organic substance, is found to be a good indicator for human sewage because of its relatively high concentrations in surface water and its unambiguous anthropogenic origin. It is present in food, beverages and drugs and main paths to enter wastewater stream are either in urine or when caffeine-containing products are discharged through household pipelines or sewers.

Objective

There is a general lack of information on the levels of emerging environmental pollutants in the countries of West Balkan region. No data on most pharmaceutical levels in water samples is available from any monitoring or research activities in Serbia. The main goal of the investigation was to gain more insight into new organic contaminants present in the water used for drinking water production at the city of Novi Sad, Serbia, to fill data gaps and evaluate their risks for human health and the environment. The objective of the study was identification and quantitation of caffeine, as an indicator of human waste, in the Danube river samples by reversed phase High-performance liquid chromatography (RP HPLC).

Materials and methods

The standard of caffeine (99% purity), acetonitrile and methanol were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany). Chloroform was purchased from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Ultra pure water was used for the preparation of all solutions (Milli-Q-quality).

Samples were collected in amber bottles from seven representative locations of the Danube River (Table I, Fig. 1) on the territory of Novi Sad, Serbia, and stored at 4 °C until analysis. All samples were taken in the middle summer (July) of 2011 under comparable meteorological conditions at all sites (median atmospheric temperature

Table I
List of the spot sampling sites in the Danube River

No.	Location	Code	Norten latitude	Eastern longitude
1	Cepelin	GC1	45°15'5,42"N	19°51'22,95"E
2	Beogradski kej	GC2	45°15'44,4"N	19°51'28,46"E
3	Ratno ostrvo	RO	45°15'11,84"N	19°54'40,18"E
4	Danube middle	RP	45°14'34,91"N	19°54'55,53"E
5	Danube left	DL	45°14'33,24"N	19°55'5,08"E
6	Danube right	DR	45°14'30,61"N	19°54'48,52"E
7	Rokov potok	DM	45°15'2,2"N	19°54'9,92"E

21 °C, atmospheric pressure 995.4 hPa, wind direction N, wind speed 3 m s⁻¹, humidity 60 %). Average Danube water temperature during the spot sampling period was 22.4 °C.

Determination of caffeine in the Danube River samples was performed by solid-phase extraction (SPE) followed by HPLC⁷. The chromatography was using two-solvent isocratic elution. The HPLC-diode array detection (DAD) model Agilent HP 1100 system equipped with an autosampler (Waldbronn, Germany) was used. The analytical column was the Zorbax Eclipse XDB-C8 column (4.6 mm × 150 mm, i.d., 5 µm particle size). Mobile phase was water (pH 8) – acetonitrile (90:10) with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹.

Results and discussion

HPLC analysis of the collected Danube River samples showed the presence of caffeine in 4 samples. Caffeine amount ranged 0–84 ng L⁻¹. Representative HPLC chromatogram of the sample No. 3, collected near the location of the water supply source „Ratno ostrvo“ in Novi Sad, Serbia, is presented on Fig. 2.

The presence of caffeine confirmed the existence of human waste in the Danube River. Median value of detected caffeine concentration in the Danube River samples of our study was 12.067 ng L⁻¹. Loos et al. (2010) in recent study found median caffeine concentration in the Danube River to be 87 ng L⁻¹ which is significantly higher value than one obtained in our study. Comparing obtained results of caffeine in the Danube River with other rivers in Switzerland (6–250 ng L⁻¹) or in the Mississippi River, USA (10–100 ng L⁻¹) it appears that similar level of human contamination as in our study is found.

Conclusions

Median value of detected caffeine concentration in the Danube River samples in our study was 12.067 ng L⁻¹. The presence of caffeine confirmed the existence of human waste in the Danube River on the territory of Novi Sad, Serbia. The data suggested that the proposed HPLC method could be used for caffeine detection in a surface water samples. These determinations in Serbia are very scarce and performed for the first time in the vicinity of Novi Sad city.

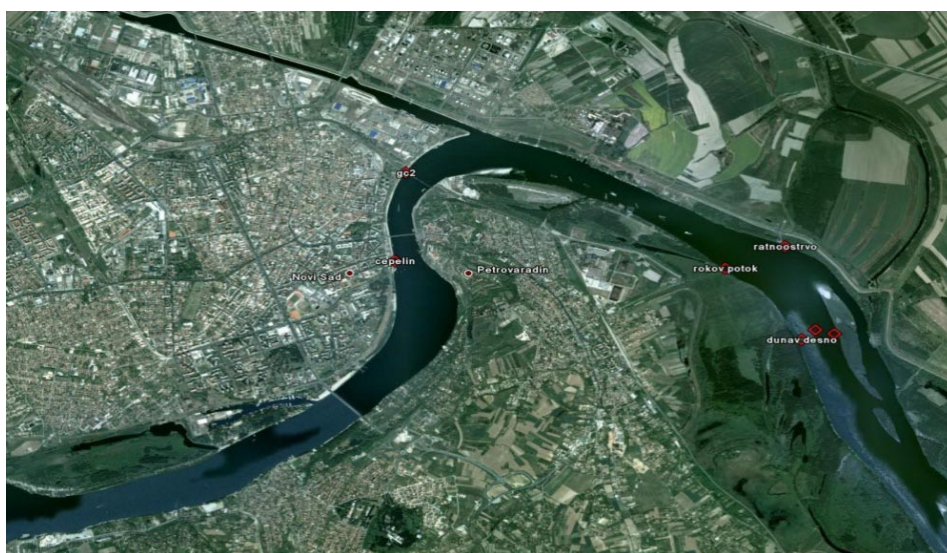


Fig. 1. Map of the sampling areas showing sampling sites

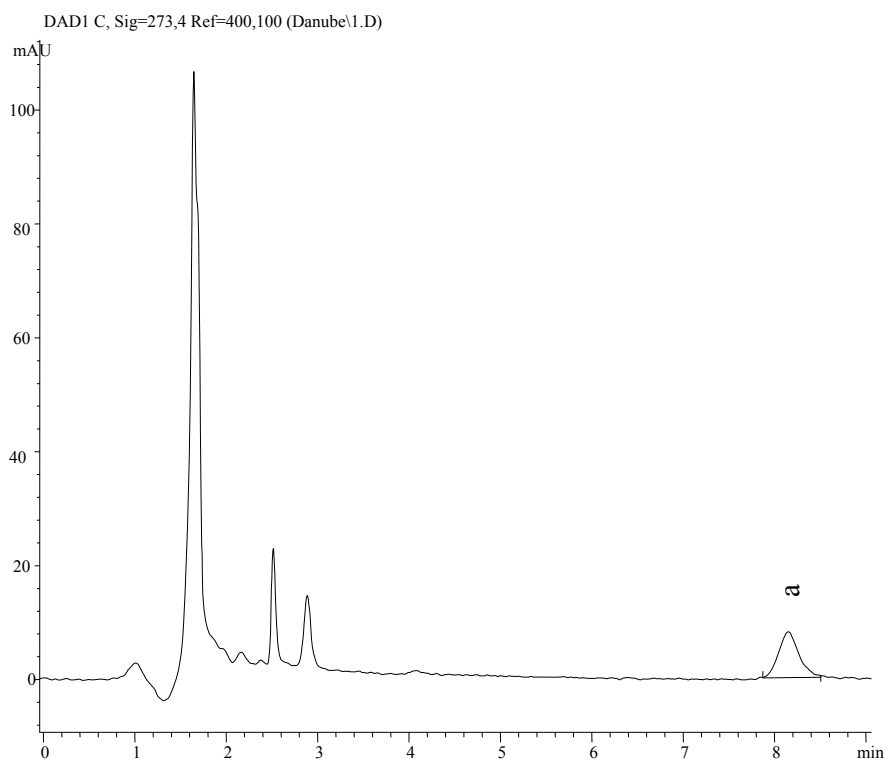


Fig. 2. HPLC chromatogram of the Danube River sample No.3 („Ratno ostrvo“): a) Caffeine

The work was financially supported by Ministry of Education and Science, Republic of Serbia (III46009) and NATO Science for Peace Project „Drinking Water Quality Risk Assessment and Prevention in Novi Sad municipality, Serbia“ (ESP.EAP.SFP 984087).

REFERENCES

- Buerge I. J., Poiger T., Müller M. D., Buser H.-R.: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 691 (2003).
- Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R.: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 1241 (2003).
- Ferreira A. P.: *Cad. Saúde Pública* **21**, 1884 (2005).
- Grujić S., Vasiljević T., Laušević M.: *J. Chromatogr., A* **1216**, 4989 (2009).
- Halling-Sørensen B., Nielsen S. N., Lanzky P. F., Ingerslev F., Holten-Lutzhoft H. C., Jørgensen S. E.: *Chemosphere* **36**, 357 (1998).
- Heberer T.: *Toxicol. Lett.* **131**, 5 (2002).
- Hernando M. D., Mezcuca M., Fernandez-Alba A. R., Barcelo D.: *Talanta* **69**, 334 (2006).
- Hörman A, Rimhanen-Finne R., Maunula L., von Bonsdorff C.-H., Torvela N., Heikinheimo A., Hänninen M.-L.: *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 87 (2004).
- Loos R., Locoro G., Contini S.: *Water Res.* **44**, 2325 (2010).
- NORMAN FP6 network laboratories monitoring emerging pollutants <http://www.norman-network.net>
- Rodrigues S. M., Glegg G. A., Pereira M. E., Duarte A. C.: *Ambio* **38**, 17 (2009).
- Seiler R. L., Zaugg S. D., Thomas J. M., Howcroft D. L.: *Ground Water* **37**, 405 (1999).
- Srdjenovic B., Djordjevic-Milic V., Grujic N., Injac R., Lepojevic Z.: *J. Chromatogr. Sci.* **46**, 144 (2008).
- Stuart J. M., Orr H. J., Warburton F. G., Jeyakanth S., Pugh C., Morris I., Sarangi J., Nichols G.: *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 229 (2003).
- Vojinović Miloradov M., Spanik I., Milovanovic D., Miloradov M., Djogo M., Dimkic M.: In: *Proceedings, International Conference on Innovative Technologies - IN-TECH 2011: Good quality of groundwater sources as the challenge for innovative technology*, 01 – 03 September 2011, Bratislava, Slovak Republic (Kudláček J., Car Z., Pepelnjak T., Pakosta M., eds.), p. 384.
- Vojinović-Miloradov M., Turk Sekulić M., Radonić J., Mihajlović I., Stošić M.: In: *Proceedings, XV International Eco-Conference on environmental protection of urban and suburban settlements: Emerging substances of concern – a shift in traditional thinking*, 21 – 24 September 2011, Novi Sad, Serbia, (Kastoriomčić D., Kićović D., Golja A., eds.), p. 265.

VLIV PŘÍDAVKU MĚDI DO KRMNÉ DÁVKY NA OBSAH RETINOLU A TOKOFEROLU V KOZÍM MLÉČE

LUCIA HODULOVÁ^{*a}, ROMANA KOSTRHOUNOVÁ^a, IVANA BORKOVCOVÁ^a, LENKA VORLOVÁ^a a ALENA PECHOVÁ^b

^a Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta hygieny a technologie mléka, VFU Brno, ^b Klinika chorob přežvýkavců, Fakulta veterinárního lékařství VFU Brno, Česká republika
H11012@vfu.cz

Úvod

Studie byla zaměřena na stanovení obsahu vybraných liposolubilních vitaminů – retinolu a tokoferolu v kozím mléce. Krmná dávka koz se suplementovala měďnatými přípravky. Na suplementaci byla použita organická a anorganická forma mědi. Na analýzu jednotlivých kozích mlék byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí, při vlnových délkách 205 a 325 nm. Průměrný obsah retinolu se pohyboval ve zralém mléce v rozmezí 1,8–4,8 mg kg⁻¹ mléka a obsah tokoferolu mezi 1,8–3,0 mg kg⁻¹.

Kozí mléko se v dnešní době dostává do popředí zájmu spotřebitelů, jsou vyžadovány bližší údaje o obsahu nutričně významných a bioaktivních složek v něm a kladeny požadavky na metody jejich stanovení. Chovatelé přidávají do krmných dávek přežvýkavců různé mikro- a makroelementy, aby zvýšili koncentraci těchto prvků a tím i látek, jejichž obsah ve tkáních tyto prvky ovlivňují. Nutriční důležitost lipofilních vitaminů je zařadila do složek, které třeba analyzovat a vyvíjet metody pro jejich stanovení.

Liposolubilní vitamíny jsou dodávány do organismu po většině různými druhy potravin. Jejich obsah závisí na druhu potravin a technologickém zpracování. Doporučená denní dávka vitaminů se udává pro vitamin A 800 µg a vitamin E 10 µg.

Vitamin A je důležitý pro zrak a společně s vitaminem E jsou potřebné pro fyziologickou funkci reprodukčního systému a správnou funkci imunitního systému. Organismus novorozence vyžaduje vitamin E na ochranu proti oxidativnímu stresu, chrání polynenasycené mastné kyseliny buněčné membrány a lipoproteiny proti oxidaci. Vitamin E zahrnuje 2 skupiny: tokoferoly a tokotrienoly, ale jen tokoferoly plní většinu fyziologických funkcí.

Vitamin A je skupinou různých forem tohoto vitamínu, zahrnuje retinol, retinal, kyselinu retinovou, retinyl estery a provitamin A, karotenoidy a B-karoten. V naší práci jsme stanovovali celkový obsah obou vitaminů v kozím mléce.

Materiál a metoda

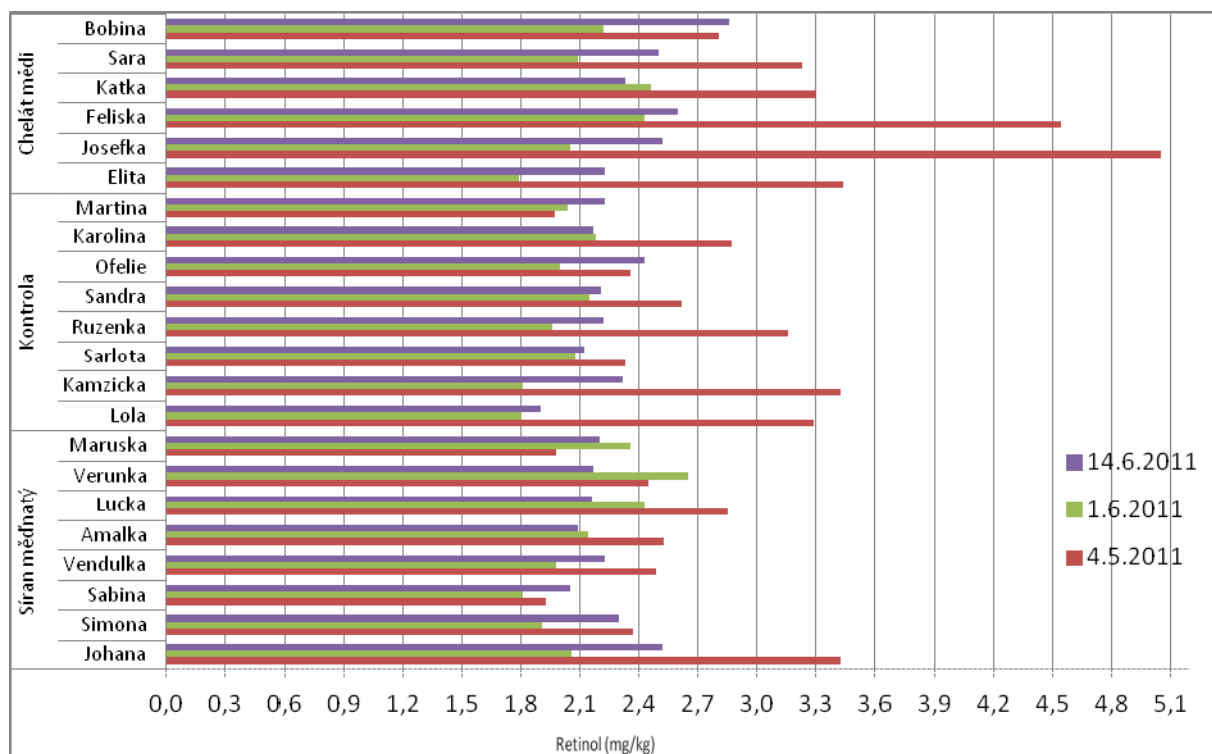
Odběr vzorků mléka: Vzorky kozího mléka pocházely z chovu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, kde jsou chovány kozy bílé krátkosrsté. Celkový počet vzorků v jednom odběru byl 22. Vzorky mléka byly rozděleny do 3 skupin. První skupinu tvořily kontrolní vzorky ($n=8$), druhou skupinu vzorky ($n=8$) od koz, do jejichž krmné směsi byla přidávána anorganická měď ve formě $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. U třetí skupiny byla krmná směs suplementována organickou mědí – chelátem mědi ($n=6$). Přídatky mědi byly podávány perorálně od doby porodu až do odstavení mláďat v dávce 15 mg/den a po odstavení po dobu 8 týdnů v dávce 30 mg/den. Vzorky byly odebírány 2., 6. a 8. týden po odstavení.

Pracovní postup: Byl navážen 1g vzorku do varné baňky, přidáno malé množství antioxidantů (hydrochinon a kyselina askorbová). Vzorek byl saponifikován methanolickým roztokem KOH (1 v/v KOH, 9 v/v metOH) po dobu 30 min. Následně byly analyty extrahovány do hexanu po dobu 10 min třepáním. Hexanová vrstva byla oddělena pomocí separačního nástavce, promyta destilovanou vodou do neutrální reakce a vysušena síranem sodným. Pak byl odebrán alikvotní podíl a odpařen na rotační vakuové odparce právě dosucha. Odparek byl rozpuštěn v methanolu, zfiltrován přes 0,45 µm nylonový filtr a převeden do HPLC vialky.

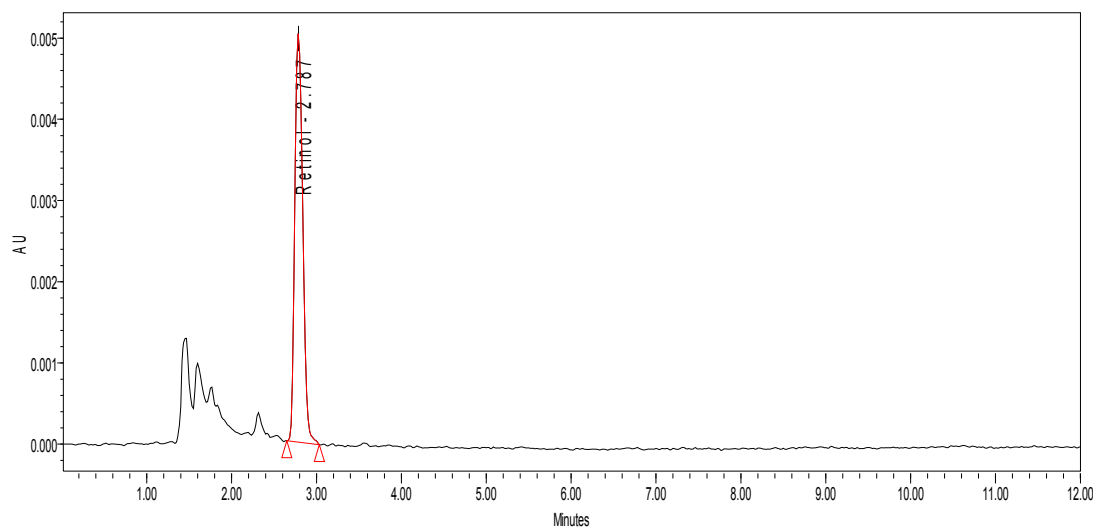
Podmínky HPLC stanovení: mobilní fáze použitá pro separaci vitaminů byla: methanol/voda (95:5), izokratická eluce, průtok 1,0 ml min⁻¹, nástrík 20 µl, teplota kolony 30 °C, detekce při $\lambda = 205 \text{ nm}$ (tokoferol) $\lambda = 325 \text{ nm}$ (retinol). Doba analýzy 12 min a kvantifikace byla prováděna metodou vnější kalibrace.

Každý vzorek byl analyzován minimálně ve dvou paralelních stanoveních, s každou sérií byl měřen slepý vzorek. Celkem bylo analyzováno 66 vzorků.

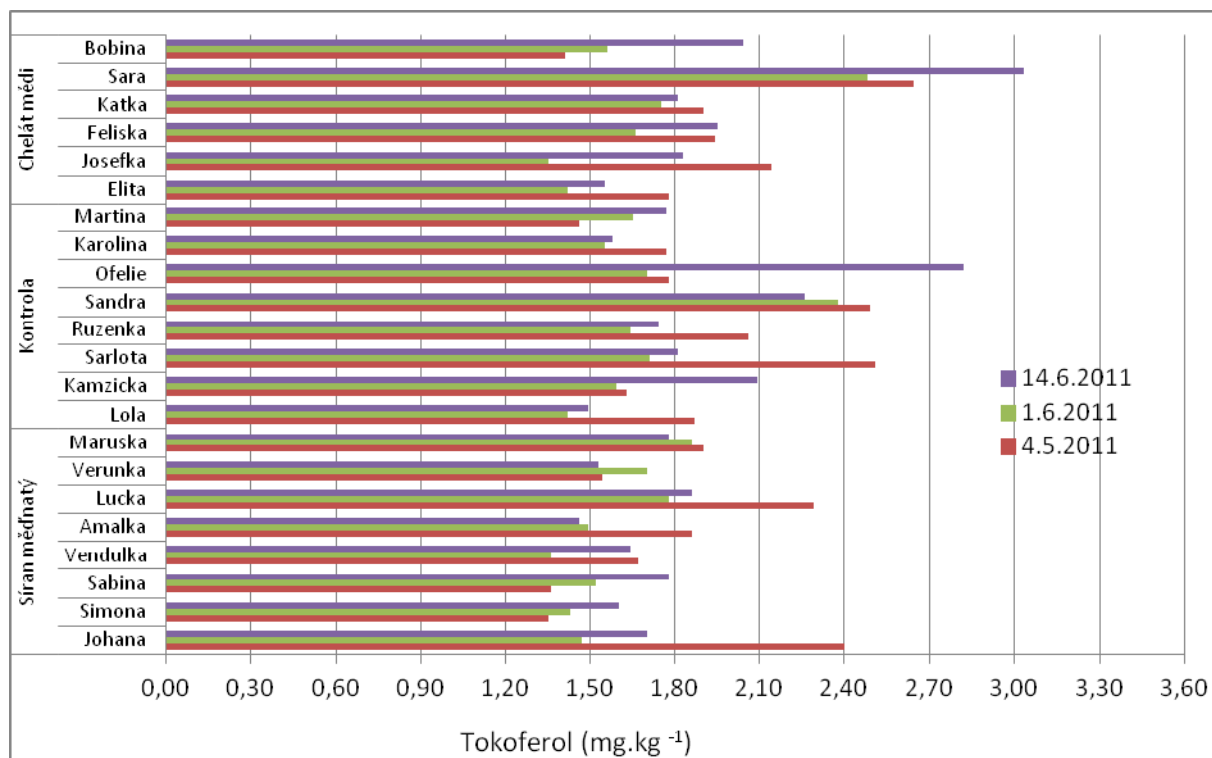
Výsledky



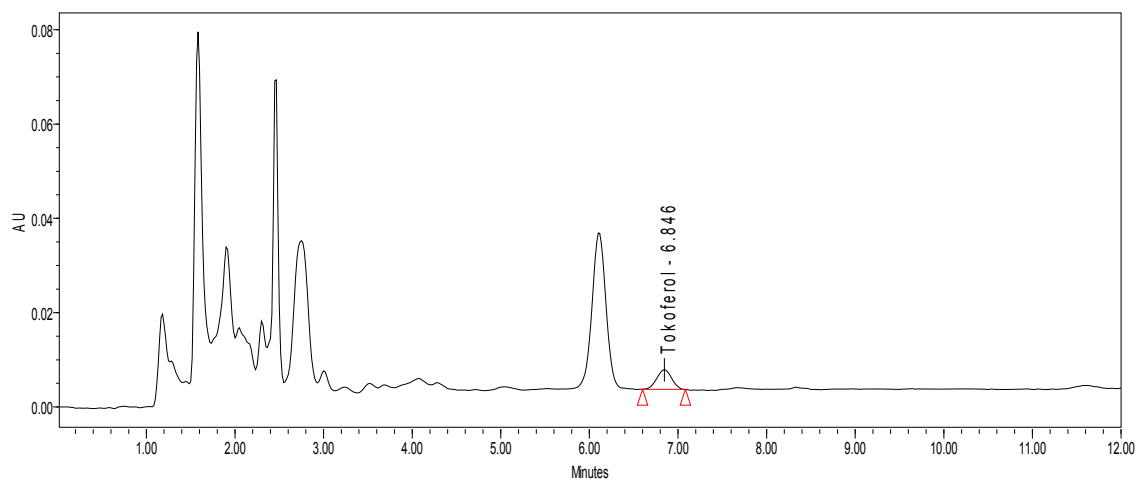
Obr. 1. Obsah retinolu v kozím mlieče



Obr. 2. Chromatografický záznam analýzy retinolu v kozím mlieče při $\lambda = 325$ nm



Obr. 3. Obsah tokoferolu v kozím mlieče

Obr. 4. Chromatografický záznam analýzy tokoferolu v kozím mlieče při $\lambda = 205$ nm

Závěr

Koncentrace obou vitamínů jsou ovlivněny ve velké míře individualitou jedince, genetickou predispozicí, laktací a krmní dávkou podávanou v daném období. Výsledky v naší studii ukázaly, že individualita jedince hraje větší roli v obsahu lipofilních vitamínů než samotné podávání měďnatých přípravků. Koncentrace vitamínů ve vzorcích mléka byly nejvyšší v prvním týdnu odběru vzorků. V tomto období měl sekret ještě charakter nezralého mléka, proto byly průměrné hodnoty vitamínů vyšší. Koncentrace retinolu se pohybovaly v druhém týdnu laktace od 2,04 mg kg⁻¹ do 5,05 mg kg⁻¹, v šestém týdnu od 1,79 mg kg⁻¹ do 2,65 mg kg⁻¹ a v osmém týdnu od 1,97 mg kg⁻¹ do 5,05 mg kg⁻¹. Obsah tokoferolu byl v druhém týdnu 1,43–2,43 mg kg⁻¹, v šestém 1,35–2,38 mg kg⁻¹, a v posledním odběru 1,46–2,82 mg kg⁻¹. Studie neprokázala statisticky významnou závislost mezi obsahem retinolu a tokoferolu v mléce a suplementací krmné dávky mědi.

Retinol a tokoferol patří mezi nutričně významné složky potravy a proto vyžadují další analýzu a studium exogenních a endogenních vlivů působících na jejich obsah v matrici. Stanovení vitamínů je vhodné také podle vyhlášky č. 450/2004 Sb. ve znění vyhlášky č. 330/2009 Sb., která vyžaduje označování hodnot vitamínů, pokud je jejich obsah vyšší než 15 % doporučené denní dávky ve 100 g nebo ve 100 ml potravině nebo v jednom balení či jednotlivé porci potravině.

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM6215712402.

LITERATURA

1. Albalá-Hurtado S., Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogués M. T., Mariné-Font A.: *J. Chromatogr.* 778, 243 (1997).
2. Kondyli E., Katsiari M. C., Voutsinas L. P.: *Food Chem.* 100, 226 (2007).
3. López-Cervantes J., Sánchez-Machado D. I., Ríos-Vázquez N. J.: *J. Chromatogr., A* 1105, 135 (2006).
4. Park Y. W., Juárez M., Ramos M., Haenlein G. F. W.: *Small Ruminant Res.* 68, 88 (2007).
5. Raynal-Ljutovaca K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Y. Chilliard Y.: *Small Ruminant Res.* 79, 57 (2008).

USE OF 7-HYDROXYCOUMARIN MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER IN ANALYSIS OF PROPOLIS AND PLANT SAMPLES

ANDREA SPEVAK^a, KATARÍNA HROBOŇOVÁ^{a*}, JOZEF LEHOTAY^a, and JOZEF ČÍZMÁRIK^b

^a *Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,*

^b *Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovakia*
katarina.hrobonova@stuba.sk

Coumarins are benzo- α -pyrone derivatives, and constitute an important group of natural products. Many of their analogues are found to be biologically active and have been proven to exhibit pharmacological activity¹. Molecularly imprinted polymers (MIPs) are selective sorption materials with a predefined selectivity for a given analyte or closely related compounds for which they were synthesized².

The MIP made with 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) as template molecule for imprints formation was prepared and tested for selective extraction of coumarin derivative from plant and propolis extract. In this work the influence of polymerization mixture composition on polymer properties and binding capacities were studied. MIP was prepared with acrylamide or methacrylic acid as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking monomer and ethanol, methanol, and acetonitrile as porogen. The specific binding capacity and the selectivity of prepared MIP were investigated towards structurally related coumarin derivatives. Non-imprinted polymers (NIPs) were prepared for each imprinted polymer by the same procedure. All MIPs and NIPs were prepared by non-covalent approach by bulk polymerization.

The binding capacities of prepared MIPs were evaluated in different solvents. The same procedure was performed on MIPs and NIPs, respectively. The type of porogen plays an important role during the formation of pre-polymerization complex. Capacities of polymers prepared with ethanol as porogen are very low, therefore the ethanol as porogen is not suitable for this type of template. When we compare the polymers prepared in different porogens, the higher capacities were obtained for less polar solvent.

The nature of solvent used for capacity studies influenced the relative swelling of the polymer which caused changes in the binding cavities and also is responsible to solvation process. The highest value of specific capacity (MIP capacity – NIP capacity) was obtained for polymers prepared with acetonitrile as porogen and for mixture methanol:water 1:1 (v/v) as solvent for capacity studies. The specific capacity value was 74.5 μg of 7-hydroxycoumarin for 100 mg of polymer. When the water was used as capacity determination solvent the very high binding capacities were obtained for all prepared MIPs and also for NIPs because the whole amount of loaded template (concentration 100 $\mu\text{g cm}^{-3}$) was sorbed onto the polymers. The results indicate that non-specific interactions (hydrophobic interactions) were responsible for 7-hydroxycoumarin retention. From this is evident that water samples are appropriate for extraction.

Since the main aim of this work was to incorporate the MIP prepared to 7-hydroxycoumarin into a SPE, the MIP was packed into cartridges a used for of-line procedure. To optimize the extraction, the wash step and the elution step were varied. The wash procedure was examined including 100% water and mixture methanol/water (50/50 v/v). On the base of HPLC analysis of fractions the water was selected as washing solvent, whereas some 7-hydroxycoumarin was eluted when mixture methanol/water were employed. The volume 2 ml of wash solution was found to be the most suited. The suitable elution solvent was methanol. It gave rise to the best recoveries (more than 92 %). Poor recovery (less than 30 %) was found with mixture methanol/water (80/20 v/v).

The prepared molecularly imprinted polymer was applied to selective sorption of 7-hydroxycoumarin from propolis and plant samples. The MIP-SPE procedure shows effective clean-up ability. The extract were analysed by HPLC with fluorescence detection.

This study was financially supported by the Grant Agency VEGA of Slovak Republic (grant no. 1/0164/11).

REFERENCES

1. Hoult J. R. S., Paya M.: *Gen. Pharmac.* 27, 713 (1996).
2. Tamayo F. G., Turiel E., Martin-Esteban A.: *J. Chromatogr., A* 1152, 32 (2007).

DEVELOPMENT OF FAST GAS CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETERMINATION OF PYRIDALYL IN FRUIT AND VEGETABLES

SVETLANA HROUZKOVÁ^{a*}, MÁRIA ANDRAŠČÍKOVÁ^a, SHERIF B. ABDEL GHANI^b, and ANDREA PURDEŠOVÁ^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, ^b Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Hadayek Shoubra 11241, Cairo, Egypt
svetlana.hrouzkova@stuba.sk

Pyridalyl (2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroallyloxy)phenyl 3-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]propyl ether) belongs to a new class of insecticides that has a phenoxy-pyridaloxo derivative structure. This compound displays a killing effect on the pests of order Lepidoptera and Thysanoptera on vegetables¹. Pyridalyl starts to be broadly used to control a key pest in Egypt. After application of pesticides some residues may remain in crops. In order to protect consumer's health and the environment, there is the growing interest in the identification and determination of such compounds in various matrices. For this purpose, an appropriate analytical method must be developed and validated.

The determination of pesticide residues is usually accomplished by chromatographic techniques and involves many preliminary steps like sampling, extraction, and clean-up for interference removal. For GC-amenable volatile/semivolatile pesticide residues gas chromatography (GC) methods are scientifically valid methods for the analysis at low concentration levels. The need for positive identification can be performed only by mass spectrometry (MS) detection. Negative chemical ionization (NCI) mode of GC-MS technique offers the advantage of chromatograms with less chance for the interference ions derived from the sample matrix, better signal-to-noise (S/N) ratio, higher sensitivity and selectivity and the determination of organic compounds at the ultratrace concentration level with low LODs². Fast GC as a modern analytical technique combined with mass spectrometry was shown to

satisfy the present-day demands on faster and cost-effective analysis with the desired resolution and efficiency achieved^{3,4}. Fast GC method utilizing narrow-bore column in combination with quadrupole MS detector in negative chemical ionization (NCI) mode was introduced by our research group⁵.

The aim of this paper was to develop the fast GC-MS method for the determination of pyridalyl in a complex matrix – non-fatty fruit and vegetable samples. Narrow-bore column approach to the fast GC-NCI-MS for the analysis of pyridalyl residues was compared to the analysis with EI (electron ionization)-MS set-ups, both operating in SIM (selected ion monitoring) mode. Both ionization techniques were compared in terms of selectivity and sensitivity. The focus was also on trueness of the proposed methodology in terms of recovery assays. Matrix-matched standards and analyte protectants as a tool to solve matrix effects were searched.

The proposed method was applied to the determination of pyridalyl residues in samples available on Slovak market. None of the samples contained detectable amounts of residues.

This work was supported by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic VEGA (project No. 1/0647/11).

REFERENCES

1. Sakamoto N., Saito S., Hirose T., Suzuki M., Matsuo S., Izumi K., Nagatomi T., Ikegami H., Umeda K., Tsushima K., Matsuo N.: *Pest. Management Sci.* 60, 25 (2004).
2. Húšková R., Matisová E., Hrouzková S.: *Chem. Listy* 104, 913 (2010).
3. Dömötörövá M., Matisová E.: *J. Chromatogr., A* 1207, 1 (2008).
4. Hrouzková S., Matisová E., in: *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*, Chap. 6, p. 131, InTech, Croatia.
5. Húšková R., Matisová E., Hrouzková S., Švorc L.: *J. Chromatogr., A* 1216, 6326 (2009).

ŠTÚDIUM SEPARÁCIE VYBRANÝCH CHIRÁLNYCH PESTICÍDOV TECHNIKOU PREPÍNANIA ACHIRÁLNA-CHIRÁLNA KOLÓNA

MÁRIA CHALÁNYOVÁ*, IVANA PETRÁNOVÁ a MILAN HUTTA

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
chalanyova@fns.uniba.sk

Úvod

V poslednom období vzrastá záujem verejnosti o zlepšovanie kvality života. Tieto zmeny súvisia tak so zabezpečením dostatočnej kvality životného prostredia ako aj kvality života ľudskej populácie. Rôznorodou skupinou chemických zlúčenín, ktoré sú schopné pomôcť zabezpečiť vysoké výnosy a dostatočnú kvalitu poľnohospodárskych produktov sú pesticídy. Napriek mnohým kladom sa pesticídy radia medzi toxické, veľakrát nestabilné a mobilné látky v životnom prostredí¹. Stále používanie pesticídov zvyšuje obavy zo znečistenia poľnohospodárskej pôdy, ale i ostatných zložiek životného prostredia. Preto je dôležité sledovať používanie pesticídov a kontrolovať ich reziduá a metabolity v životnom prostredí².

V súčasnosti viac ako 25 % komerčne dostupných pesticídov patrí do skupiny chirálnych látok³. Chiralita ovplyvňuje biologickú aktivitu⁴, a tým aj ich toxicitu⁵. Príčinou optickej aktivity organických molekúl je najčastejšie asymetricky substituovaný uhlík⁶, t.j. uhlík, na ktorom je každý substituent iný. Chirálné zlúčeniny medzi, ktoré patria i chirálne pesticídy sa v súčasnosti vo väčšine prípadov aplikujú ako racemické zmesi, v ktorých obvykle iba jeden enantiomér je biologicky aktívny⁷ a ostatné enantioméry sa prejavujú v lepšom prípade ako inaktívna nečistota preto narastajú snahy nahrádzať racemické zmesi chirálnych pesticídov enantiomérmi, ktoré sú nositeľom biologickej aktivity, čo má za následok významné zníženie rizík spojených s ich používaním.

Pyretroidy sú perzistentné zlúčeniny s vysokou hydrofobicitou a nízkou rozpustnosťou vo vode⁸. Permetrín vo svojej molekule obsahuje dve chirálne centrá a teda vytvára štyri stereoizoméry. Jeho akceptovateľná dávka pre 60 kg človeka je 3 mg/deň (cit.⁹). Cypermetrín obsahuje tri chirálne centrá a je racemickou zmesou ôsmich izomérov. Tieto izoméry sa rozdeľujú na štyri *cis*- a štyri *trans*-izoméry. *Cis*-izoméry sú účinnejšie voči hmyzu ako *trans*-. Najčastejšie sa využíva v poľnohospodárstve na ochranu plodín voči hmyzu napádajúcim listy. Akceptovateľná dávka pre konzumáciu živočíchmi je 0,01–0,2 mg kg⁻¹ (cit.¹⁰). Posledným zo študovaných analytov je epoxikonazol, ktorý patrí medzi triazolové fungicídy so širokospektrálnou aktivitou proti rastlinným patogénom v obilni-

nách. Začiatok jeho uvedenia na trh sa datuje rokom 1970. Triazolové fungicídy sa vyznačujú 1 alebo 2 chirálnymi centrami, ktoré sú lokalizované na susednom mieste 1,2,4 triazolového kruhu, ktorý je kostrou zlúčeniny¹¹.

Experimentálna časť

Chemikálie a roztoky

Štandardy analyzovaných látok boli: epoxikonazol 93,5% – (2RS, 3SR-1-[3-(chlorofenyl)-2,3-epoxy-2-(4-florofenyl)propyl]-1*H*-1,2,4-triazol, cypermetrín 95,8% – (RS)- α -kyano-3-fenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3RS)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimetylcyklopropánkarboxylát, permetrín 97,3% – 3-fenoxybenzyl(1RS,3RS;1RS,3RS)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimetylcyklopropánkarboxylát, Riedel-de Haën (Nemecko). Metanol gradien grade, Merck, Darmstadt, (Nemecko). Ultračistá voda Simplicity® UV, (Millipore S.A.S., Francúzsko).

Zásobné roztoky štandardov v rozmedzí koncentrácií 380–560 $\mu\text{g ml}^{-1}$ boli pripravené v 100% metanole. Roztoky boli uchovávané pri teplote $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pred svetlom boli chránené hliníkovou fóliou. Štandardné roztoky epoxikonazolu, cypermetrínu a permetrínu boli pripravené riedením z metanolických zásobných roztokov do 70% metanolu.

Prístroje

HPLC zariadenie: Kvapalinový chromatograf Lichrograph (Merck – HITACHI, Darmstadt, Nemecko), pozostával z pumpy Intelligent Pump L-6200 A (Merck, Darmstadt, Nemecko), UV-VIS detektora Model L-4250 Merck, Darmstadt, (Nemecko), mixera, Hitachi, Ltd. Tokyo, (Japonsko), 2 dvojcestných šesťvstupových ventilov Rheodyne 7125 a 7010 Cotati, California, (USA), vysokotlakovej pumpy Knauer, HPLC pump 64 (Nemecko), druhého detektora Knauer variable wavelenght monitor, D – 1000 Berlin, (Nemecko).

Krátka achirálna kolóna Silasorb Fenyl 30 \times 3 mm, 5 μm častice, Tessek, Praha (ČR), chirálna kolóna Chiradex 250 \times 4 mm, 5 μm častice Merck (Darmstadt, Nemecko). Namerané údaje boli vyhodnotené pomocou programu CSW verzia 1.0, s 20 bitovým integračným sigma delta A/D prevodníkom (DataApex s.r.o., Praha, ČR).

Chromatografické podmienky

Ako mobilná fáza bola použitá zmes metanol:voda s obsahom metanolu v koncentračnom rozmedzí 50–80 %. Prietok mobilnej fázy 0,5–1 ml min⁻¹. Injektovaný objem štandardov bol 20 μl . Detekčná vlnová dĺžka bola 230 nm.

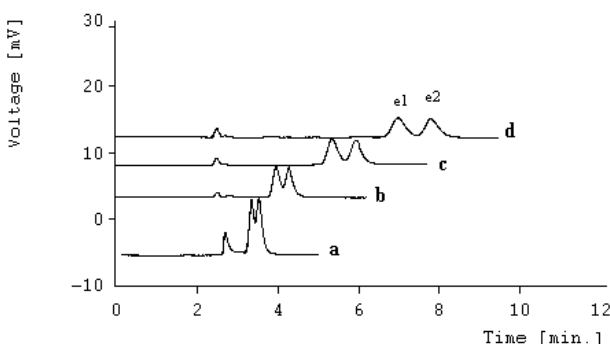
Výsledky a diskusia

Výber podmienok separácie analytov na chirálnej stacionárnej fáze

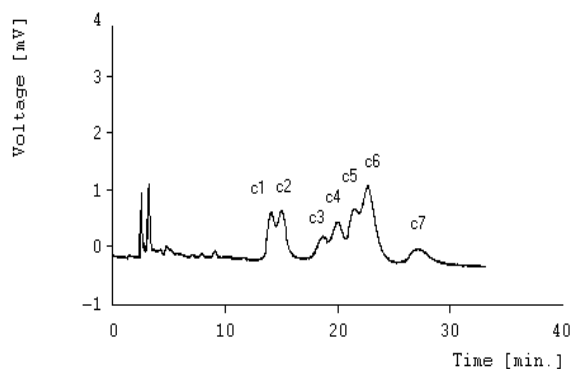
Na chirálnej kolóne Chiradex, ktorá patrí do skupiny cykloextrínových stacionárnych fáz bola uskutočnená séria meraní závislosti základných chromatografických parametrov od % obsahu organického modifikátora acetonitrilu, metanolu v mobilnej fáze, prietoku mobilnej fázy a od doby prenosu analytu z achirálny na chirálnu kolónu. Acetonitril ako organický modifikátor sa pri analýze študovaných pesticídov neosvedčil. Chromatografické záznamy separácie epoxikonazolu v závislosti od obsahu metanolu v mobilnej fáze sú na obr. 1. Najvyššie rozlíšenie enantiomérov epoxikonazolu bolo dosiahnuté v mobilnej fáze metanol:voda (50:50, v/v) s prietokom 1 ml min^{-1} s hodnotou 1,2 a s retenčným faktorom 1,82 pre prvý pik e1 a 2,15 pre druhý pik e2 (obr. 1d).

Najlepšia separácia enantiomérov cypermetínu (c1-c7), čo do počtu čiastočne separovaných jeho enantiomérov sa dosiahla v mobilnej fáze metanol:voda (55:45, v/v) s prietokom 1 ml min^{-1} . Bolo získaných 5 čiastočne separovaných píkov. 6 a 7 pik sa separovali na nulovú líniu s rozlíšením 1,5 (obr. 2). Retenčný faktor k' sa pohybuje v rozmedzí 1,16–18,11.

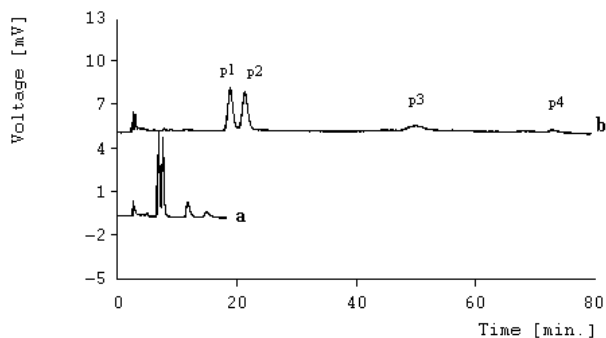
Na chirálnej kolóne sa permetrín separoval na štyri enantioméry (p1-p4). Rozlíšenie enantiomérov permetrínu p1-p2 malo v mobilnej fáze metanol:voda (60:40, v/v) hodnotu 1,52 a rozlíšenie enantiomérov p3-p4 bolo 13,39 (obr. 3b). Rozlíšenia enantiomérov permetrínu p1-p2 v mobilnej fáze metanol:voda (70:30, v/v) bolo 1,16 a pre enantioméry p3-p4 bolo 2,2 je (obr. 3a).



Obr. 1. Chromatografické záznamy separácie enantiomérov e1 a e2 epoxikonazolu na kolóne Chiradex ($250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) v závislosti od zloženia mobilnej fázy. Mobilná fáza metanol:voda a) (70:30, v/v); b) (60:40, v/v); c) (55:45, v/v); d) (50:50, v/v) s prietokom 1 ml min^{-1} ; UV detekcia pri 230 nm



Obr. 2. Chromatografický záznam separácie enantiomérov c1-c7 cypermetrínu na kolóne Chiradex $250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$. Mobilná fáza metanol:voda (55/45, v/v), s prietokom 1 ml min^{-1} , UV detekcia pri 230 nm

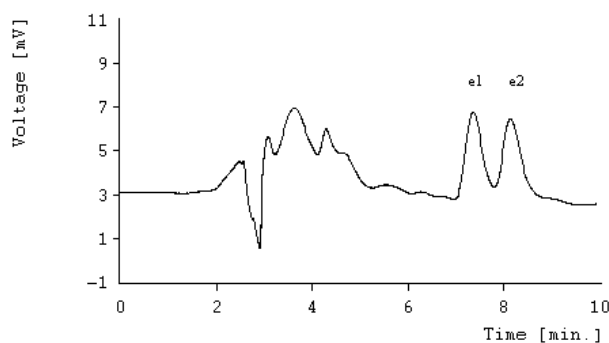


Obr. 3. Chromatografické záznamy separácie enantiomérov p1-p4 permetrínu na kolóne Chiradex ($250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) v závislosti od zloženia mobilnej fázy. Mobilná fáza metanol:voda a) (70:30, v/v); b) (60:40, v/v) s prietokom 1 ml min^{-1} ; UV detekcia pri 230 nm

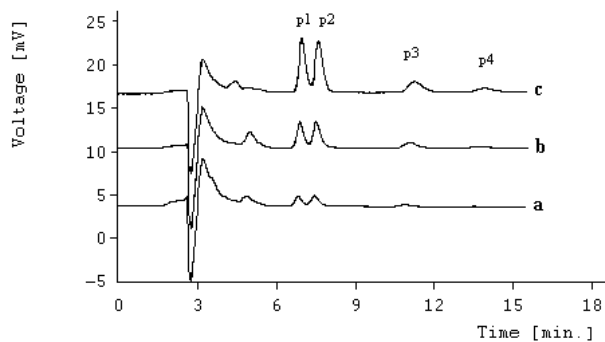
Zakonzentrovanie analytov na achirálny kolóne, vymytie technikou spätného toku (back-flush) a ich enantioména separácia na chirálnej kolóne

Ako achirálna náplň v krátkej sklenej CGC kolóne ($30 \times 3 \text{ mm}$) bol použitý sorbent Silasorb Fenyl s $5 \mu\text{m}$ časticami. Pri výbere sorbentu pre achirálnu kolónu sme vychádzali z literatúry^{12,13}. Na krátkej sklenej kolóne naplnenej sorbentom Silasorb Fenyl dochádza k čisteniu extraktu od koextraktov z komplexnej matrice a k zakonzentrovaniu analytu vo forme úzkej zóny (fokúsacia) na vstupe achirálny kolóny. Krátka kolóna pred zakonzentrovaním analytu bola premytá 100% metanolom a následne bola kondicionovaná 5 ml 2% metanolu. Na takto pripravenú kolónu bolo nadávkovaných $20 \mu\text{l}$ analytu, na ktorého trans-

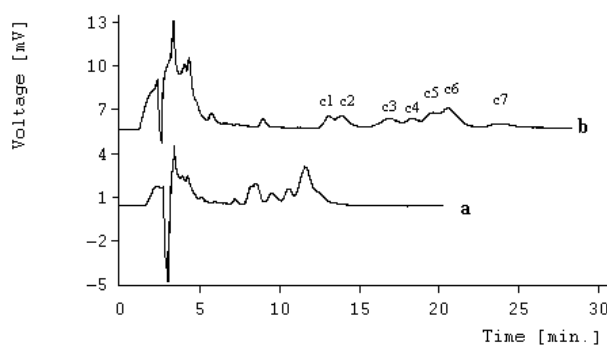
port boli použité 2 ml zmesi metanol:voda (50:50, v/v). Na pripojenom detektore D2 sa sledovala elúcia analytu z krátkej kolóny. Zo šírky chromatografického záznamu na detektore je možné určiť čas a dobu prepnutia prepínacieho ventilu, kedy sa analyt technikou spätného toku (back-flush) z krátkej kolóny vymýva mobilnou fázou na chirálnu kolónu, kde dochádza k separácii diastereoizomérov na enantioméry. Zloženie mobilnej fázy na chirálnej kolóne Chiradex pre epoxikonazol bolo metanol:voda (50:50, v/v), pre permetrín metanol:voda (70:30, v/v) a pre cypermetrín metanol:voda (55:45, v/v).



Obr. 4. Chromatografický záznam separácie enantiomérov epoxikonazolu po vymytí analytu z achirálny kolóny Silasorb Fenyl (30×3 mm, 5 μm) spätným tokom (back-flusch) na kolónu Chiradex (250×4 mm, 5 μm). Začiatok vymývania analytu spätným tokom mobilnej fázy metanol:voda 50:50 v/v s prietokom 1 ml min⁻¹ na kolónu Chiradex v 5 min; doba prenosu analytu z krátkej kolóny na kolónu Chiradex bola 2 min. Detekcia v UV oblasti pri 230 nm



Obr. 5. Chromatografické záznamy separácie enantiomérov permetrínu v závislosti od koncentrácie analytu. a) 10 μg ml⁻¹; b) 5 μg ml⁻¹, c) 1 μg ml⁻¹; UV detekcia pri 230 nm. Začiatok vymývania analytu spätným tokom mobilnej fázy metanol:voda 70:30 v/v s prietokom 1 ml min⁻¹ na kolónu Chiradex v 5 min; doba prenosu analytu z krátkej kolóny na kolónu Chiradex bola 2 min. Detekcia v UV oblasti pri 230 nm



Obr. 6. Chromatografické záznamy vymytia cypermetrínu spätným tokom z kolóny Silasorb Fenyl (30×3 mm, 5 μm) na kolónu Chiradex (250×4 mm, 5 μm). Začiatok vymývania analytu spätným tokom na kolónu Chiradex v 3 min; doba prenosu analytu z krátkej kolóny na kolónu Chiradex 3 min. so zložením mobilnej fázy na chirálnej kolóne a) metanol:voda (60:40, v/v), b) metanol:voda (55:45, v/v), s prietokom 1 ml min⁻¹. Detekcia pri 230 nm

Separácia epoxikonazolu technikou spätného toku

Štandard epoxikonazolu má vo svojej molekule jedno chirálne centrum. Rozlíšenie enantiomérov epoxikonazolu e1 a e2 malo hodnotou 1,23 (obr. 4).

Separácia permetrínu technikou spätného toku

Na obr. 5a-c sú znázornené chromatografické záznamy rozlíšenia enantiomérov permetrínu od ich koncentrácie v rozmedzí 1–10 μg ml⁻¹ pri prenose z achirálny kolóny Chiradex. Rozlíšenie enantiomérov permetrínu p1-p2 bolo 1,16 a p3-p4 bolo 2,27 (obr. 5).

Separácia cypermetrínu technikou spätného toku

Cypermetrín bol z dávkovacej slučky s objemom 20 μl vymytý 2 ml zmesou metanol:voda (50:50, v/v) s prietokom 0,1 ml min⁻¹ na krátku kolónu plnenú sorbentom Silasorb Fenyl. Na obr. 6a-b sú znázornené chromatografické záznamy pre dve rôzne zloženia mobilnej fázy na kolóne Chiradex. Po zakonzentrování cypermetrínu na krátkej kolóne otočením prepínacieho ventilu v tretej minúte analýzy na dobu 3 min v mobilnej fáze metanol:voda (55:45, v/v) (obr. 6b) došlo k jeho čiastočnej separácii na sedem píkoc c1-c7 s rozlíšením c1-c2: 0,67; c2-c3: 1,29; c3-c4: 0,86; c4-c5: 1,1; c5-c6: 0,42; c6-c7: 1,3.

Záver

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že navrhnutá optimalizácia separácie enantiomérov študovaných štandardov chirálnych pesticídov (cypermetrínu, permetrínu a epoxikonazolu) metódou RP-HPLC s využitím prepínania achirálny a chirálnej kolóny

(column-switching) so spätným vymývaním z achirálnych kolón na chirálnu kolónu Chiradex je vhodná pre ďalšie štúdiá a aplikáciu pre separáciu vyššie uvedených analytov z rôznych druhov pôdnych vzoriek. Výhodou prezentovanej metódy je možnosť použitia malých hmotností vzorky pôdy cca 200 mg, využitia on-line extrakcie analytu z tuhej vzorky pôdy s následným zakoncentrovaním na krátkej achirálnych kolóne a následnou enantiomérnou separáciou na chirálnej stacionárnej fáze.

Práca vznikla za podpory projektov APVV-0595-07 a VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

1. Fenik J., Tankiewicz M., Biziuk M.: Trends Anal. Chem. 30, 814 (2011).
2. Matisová E., Kirchner M.: Chem. Listy 98, 396 (2004).
3. Wang P., Liu D., Jiang S., Gu X., Zhou Z.: Chirality 19, 114 (2007).
4. Bicker W., Lämmerhofer M., Lindner W.: J. Chromatogr., A 1035, 37 (2004).
5. Lin K., Xu Ch., Zhou S., Liu W., Gan J.: Chirality 19, 171 (2007).
6. Zahradník P., Kollárová M.: Prehľad chémie, 2. časť, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava 1997.
7. Wang P., Zhou Z., Jiang S., Yang L.: Chromatographia 59, 625 (2004).
8. Feo M. L., Eljarrat E., Barceló D.: J. Chromatogr., A 1217, 2248 (2010).
9. Oudou CH. H., Hansen H.C.B.: Chemosphere 49 1285 (2002).
10. Guerra P., Eljarrat E., Barceló D.: J. Chromatogr., A 1203, 81 (2008).
11. Ye J., Wu J., Liu W.: Trends Anal. Chem. 28, 1148 (2009).
12. Chalányová M., Paulechová M., Hutta M.: J. Sep. Sci. 29, 2149 (2006).
13. Chalányová M., Hutta M., Pagáč M.: J. Sep. Sci. 33, 134 (2010).

SEPARATION OF ENANTIOMERS OF ALCOHOLS ON 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- AND 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β - AND γ -CYCLODEXTRIN TYPE STATIONARY PHASES

DARINA KAČERIAKOVÁ and IVAN ŠPÁNIK*

*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
ivan.spanik@stuba.sk*

Abstract

In this work, the capillary gas chromatographic enantiomer separation of chiral 2-alcohols, 3-alcohols and 1,2-diols on 6-O-tert-butyltrimethylsilyl-2,3-di-O-ethyl- β -cyclodextrin (6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD), 6-O-tert-butyltrimethylsilyl-2,3-di-O-ethyl- γ -cyclodextrin (6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD), 2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl- β -cyclodextrin (2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD) and 2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl- γ -cyclodextrin (2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD) stationary phases has been studied. By selection of proper compounds various aspects of chiral separation was studied in details. The first aspect includes the study of effect of prolongation of alkyl chains in 2- and 3-alcohols and chiral diols on quality of the enantiomer separation. The second, effect of position of hydroxyl group in alcohol molecule was also studied. Finally, the effect of addition of another hydroxyl groups on carbon chain on separation factors was studied. The effect of cavity size was studied on cyclodextrin with the same substituents, however, with different number of glucose units in cyclodextrins.

Introduction

Many natural compounds are chiral so it can be said that chirality is a fundamental property of living matter. Therefore, much attention is paid to monitoring of stereoselective behavior and consequences for the application of pharmaceuticals, agrochemicals and in the control of food ingredients. Enantioselective analysis can be used to control the technological process, identification of impurities, control of fermentation processes, aging, assessment of microbial contamination and storage conditions, determine the geographical origin and the study and control of flavors and additives in foods and beverages. Therefore, the analysis of optically active compounds is one of the important and also the specific functions of the existing analytical chemistry. Since the first separation of enantiomers, until today a variety of chiral stationary phases was introduced, which include derivatives of amino acids, complex metal compounds, calixarenes, rezorcinarens or chiral crown ethers. From those, the most common are cyclodextrin stationary phases¹, which are used to separate enantiomers of most chiral compounds. The cyclodextrins

are cyclic oligomers containing 6–8 glucose units in the D(+) configuration and chair conformation². Cyclodextrin shape looks like a torus with free hydroxyl groups bounded to carbon atoms at positions 2, 3 and 6. Hydroxyl groups bounded to carbon atoms in positions 6 can rotate and cause partial closure of narrow end of the cavity. Hydroxyl groups bounded to carbon atoms in positions 2 and 3 are located at the wider end of the cavity. Hydroxyl groups on the second carbon atom are oriented in the direction of the cyclodextrin cavity axis, while the hydroxyl groups at the third carbon atom are oriented towards the interior cavity³. Packing conformation consists of glucose units linked through oxygen atoms bound to the first and fourth carbon atom. Conformation is stabilized by hydrogen bonds between the hydroxyl groups on the second and third carbon atom. The cavity has a hydrophobic nature, in contrast to the hydrophilic surface of the cyclodextrin. In a previous paper, the separation of enantiomers of N-TFA-O-alkyl amino acid derivatives on 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD and 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD stationary phases has been studied in details. It was shown that separation of the enantiomers of studied amino acid derivatives depends on the length of linear alkyl chain bound stereogenic carbon and an ester group of amino acid derivative. The cyclodextrin cavity size also affected selectivity⁴.

In this work, the separation of enantiomers of alcohol on the 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD, 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD, 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD and 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD stationary phases has been studied. The mechanistic aspects of separation of enantiomers of alcohols and the chiral recognition process on the four cyclodextrin derivative stationary phases were investigated using gas chromatography. The chiral recognition process on cyclodextrin stationary phases is mainly influenced by the steric parameters of stationary phases and the structure of enantiomers.

Experimental

Equipment

Capillary GC was performed using Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a split-splitless injector and a flame ionization detector (FID). Helium with a flow rate 25–30 cm s⁻¹ was used as a carrier gas. Signal of FID was monitored by a Agilent Chemstation software. 1 μ l of samples was injected into the column by split injection with a split ratio of 50:1.

Columns

Column A: 24 m capillary column with 0.25 mm i.d. coated with 0.25 μ m film thickness of a mixed stationary

phase 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD diluted in a OV-1701 silicone polymer in ratio 3:7.

Column B: 24 m capillary column with 0.25 mm i.d. coated with 0.25 μ m film thickness of a mixed stationary phase 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD diluted in a OV-1701 silicone polymer in ratio 3:7.

Column C: 25 m capillary column with 0.25 mm i.d. coated with a 0.25 μ m film thickness of 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD dissolved in polysiloxane.

Column D: 25 m capillary column with 0.25 mm i.d. coated with a 0.25 μ m film thickness of 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD dissolved in polysiloxane.

Samples

The effect of alkyl substituents length in alcohols as well as position of OH group on resolution of enantiomers was studied in details. Similarly, the effect of cyclodextrin cavity size and prolongation of alkyl substituent in the position 3 on the columns A and B as well as in the position 6 on the columns C and D was studied. The alcohols were divided into three groups: the first group contains 2-alcohols (C4-C9), the second group contains 3-alcohols (C5-C8), and the third group contains 1,2-alcohols (C4-C6, C8).

Results and discussion

The separation of enantiomers of 3-alcohols and 1,2-diols by capillary gas-liquid chromatography on 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD and 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD columns are shown in figures 1A, 1B and 1C. On both columns, the separation was obtained for enantiomers of 3-alcohols and that of 1,2-diols was obtained only on 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD. The enantiomers of 2-alcohols were not separated on these stationary phases.

Increasing of cyclodextrin cavity size improves separation of enantiomers of 3-alcohols, while opposite effect was observed for resolution of enantiomers of other studied compounds. Similar behavior is observed also on columns 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD and 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD. The separation of enantiomers of 2-alcohols and 3-alcohols was obtained on the both stationary phases, while enantiomers of 1,2-diols were separated just on 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD. Figure 2 shows the separation of enantiomers of 2-alcohols and 3-alcohols on 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD and 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD.

A comparison of the chromatograms in Figures 1 and 2 shows that capillary columns coated with 2,6-di-O-Me-3-

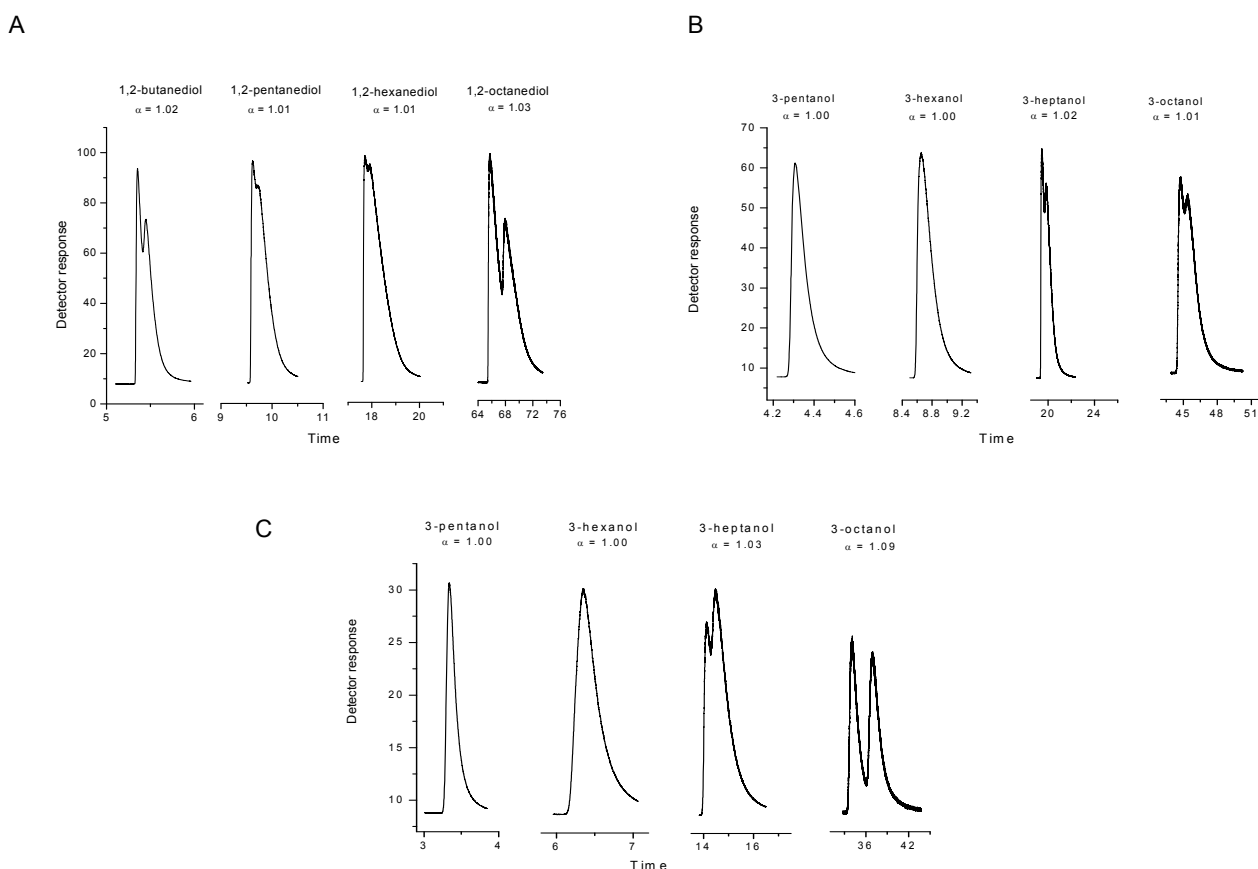


Fig. 1. Separation of enantiomers of 1,2-diols at 100 °C (A), 3-alcohols at 60 °C (B), obtained on 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD and 3-alcohols at 60 °C obtained on 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD (C)

-O-Pe-CD stationary phases exhibited lower separation efficiency than the 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et-CD for all studied analytes. Figure 3 shows the dependence of separation factor α ($\alpha = k_R/k_S = t'_{r,R}/t'_{r,S}$, k - retention factor and t'_r - reduced retention time of enantiomers R and S) obtained for enantiomers of all studied alcohols on the num-

ber of glucose units in the cyclodextrin derivative molecule (6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et-CD). It is clear that the separation of enantiomers of 3-alcohols improves with increasing number of glucose units in the cyclodextrin molecules. On the contrary, the separation of diols enantiomers becomes worse. The separation factor obtained for enanti-

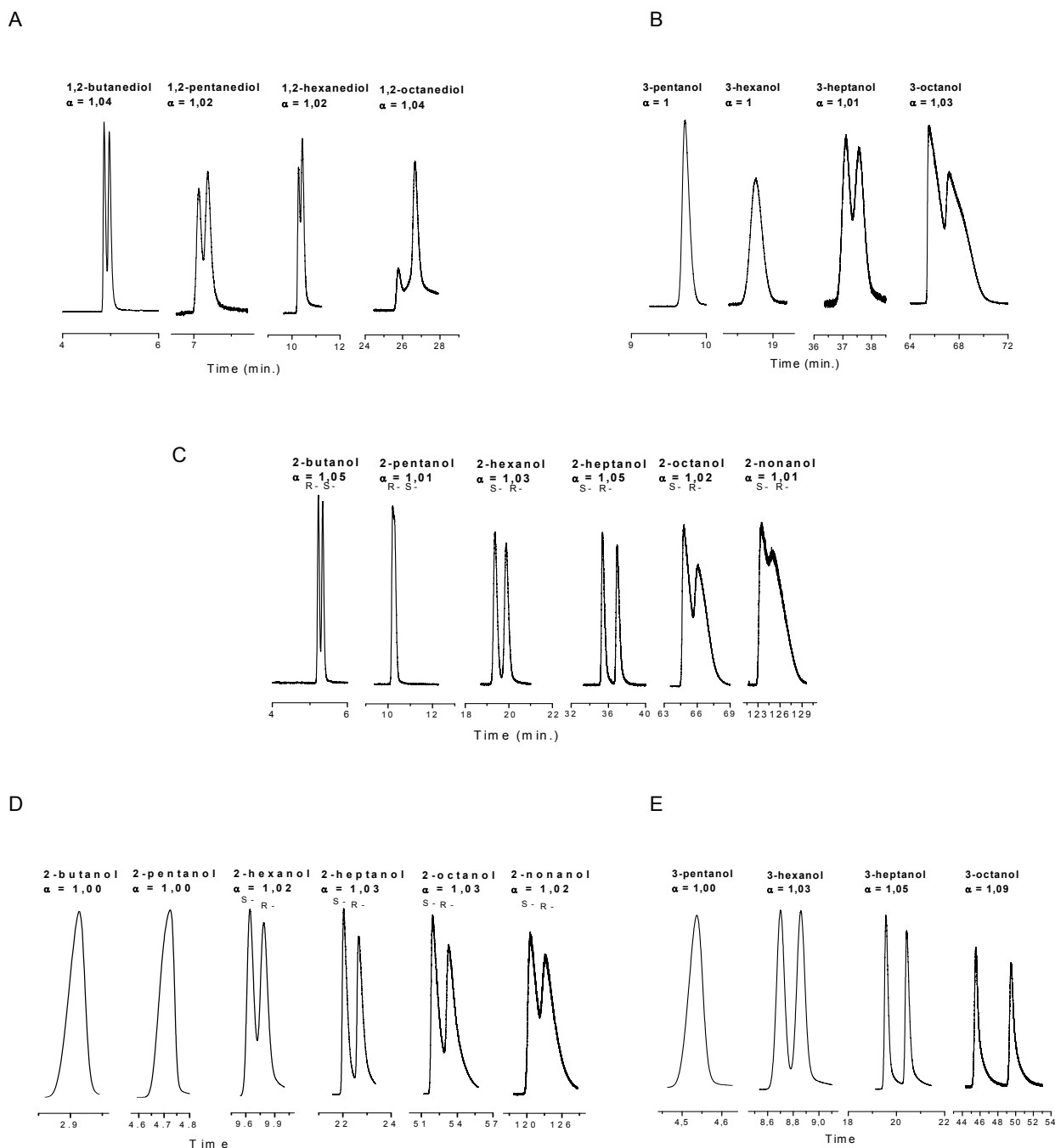


Fig. 2. Separation of enantiomers obtained on 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD for 1,2-diols at 120 °C (A), 3-alcohols (B), 2-alcohols at 70 °C (C), and on 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD for 2-alcohols (D) and 3-alcohols (E) at 50 °C

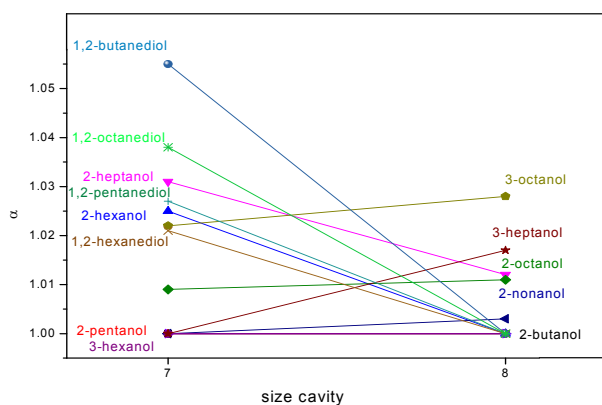


Fig. 3. Influence of the CD cavity size of 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et-CD on the separation factor α obtained at 90 °C

omers of 2-alcohols slightly improves with the increasing number of glucose units for alcohols with longer carbon chain, while for compounds with shorter carbon chain sharply decreases.

Conclusions

In this work, the capillary gas chromatographic enantiomer separation of chiral 2-alcohols, 3-alcohols and 1,2-diols on the 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- β -CD, 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- γ -CD, 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β -CD and 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- γ -CD stationary phases has been studied. On all studied columns only the separation of 3-alcohols enantiomers was achieved. The enantiomers of 1,2-diols were resolved only on the stationary phases containing CD with seven glucose units with better separation factor observed on the phase with TBDMS group in the 6 position.

This work was supported by VEGA grant No. 1/0972/12.

REFERENCES

- Schurig V.: Trends Anal. Chem. 21, 647 (2002).
- Spanik I., Krupcik J.: Chem. Listy 94, 10 (2000).
- Shitangkoon A., Vigh G.: J. Chromatogr., A 738, 31 (1996).
- Spanik I., Oswald P., Krupcik J., Benicka E., Sandra P., Armstrong D.W.: J. Chromatogr. Sci. 25, 45 (2002).

APLIKÁCIA DIFERENCIÁLNEJ SKENOVACEJ KALORIMETRIE PRI TESTOVANÍ NOVÝCH KOMPOZITNÝCH MATERIÁLOV

LUCIA KNAPČIKOVÁ
a JOZEF HUSÁR*

*Technická univerzita v Košiciach, Fakulta výrobných technológií so sídlom v Prešove, Bayerova 1, 080 01 Prešov, Slovenská republika
lucia.knapcikova@tuke.sk, jozef.husar@tuke.sk*

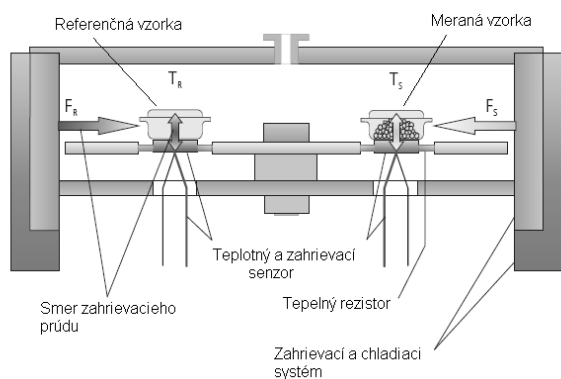
V príspevku sa venujeme využitiu diferenciálnej skenovacej kalorimetrie pri testovaní kompozitných materiálov, vyrobených na báze textílií z opotrebovaných pneumatík. Kompozitné materiály sú tvorené termoplastickou maticou – polyvinyl butyrátom (PVB) a textilnou zložkou, získanou z opotrebovaných pneumatík. Na stanovenie teplôt skleneného prechodu, teplôt topenia, tepelnej stability a zloženia, sme použili diferenciálnu skenovacíu kalorimetriu. Táto metóda bola využitá na identifikáciu jednotlivých zložiek obsiahnutých v opotrebovaných pneumatikách, konkrétne textílie, gumovej zložky a tiež zhomogenizovanej zmesi polyvinyl butyrátu a odseparovanej textílie.

Úvod

Aktuálna situácia v Európe poukazuje na zvýšenie aktivity pre oblasť odpadového hospodárstva s opotrebovanými pneumatikami. Podľa zákona č.223/2001 Z.z. – O odpadoch, sú držiteľia odpadov povinní zbavovať sa odpadov, podľa možnosti ho zhodnocovať, musia uprednostniť zhodnotenie materiálove pred energetickým využitím (spaľovaním). Momentálne sa výskumné spoločnosti snažia o vývoj nových výhodnejších metód spracovania odpadových pneumatík, ako aj použitie známych spôsobov zhodnocovania a ich neustále inovovanie. Využívanie odpadových pneumatík len pre samotnú recykláciu nemá zmysel. V celej Európe sa zaoberá recykláciou pneumatík viac ako 100 nezávislých firiem vo všetkých členských štátoch. Spoločnosti, ktoré sa zaoberajú zbieraním a spracovávaním informácií o zhodnocovaní alebo zneškodňovaní opotrebovaných pneumatík vo svete a konkrétne v Európe je veľa. Jednou z hlavných organizácií je spoločnosť ETRA, (z angl. „European Tyre Recycling Association“), ktorá zhromažďuje informácie, štatisticky spracováva, hodnotí a informuje obyvateľstvo o nových možnostiach zhodnotenia a následného využitia tejto komodity. Z opotrebovaných pneumatík sa získava cenná surovina, ktorou je gumová drvina. Má široké využitie ako prímes do asfaltov, výplň betónov, podkladové vrstvy vozoviek, koľajové prechody, nátery, farby, bežec-ké dráhy, detské ihriská a pod. Oddelené oceľové časti sú ďalej využívané v strojárskom alebo hutníckom priemysle^{1,2}. Ostáva posledná zložka opotrebovaných

pneumatík – textílie. Ich dôležitými vlastnosťami sú zvuková pohltivosť, sorpčná schopnosť, tepelnoizolačné vlastnosti, pružnosť a elasticita. V súčasnosti sú známe rôzne technické riešenia na spracovanie opotrebovaných pneumatík a ich zložiek. Gumené materiály sú deliacimi zariadeniami spracovávané na malé kúsky alebo granulát, ktoré sú nasledujúco pridávané do asfaltov, betónových výrobkov či do železničných podvalov. Nevýhodou týchto riešení je neefektívne hodnotenie gumených materiálov a možné ekologické nebezpečenstvo pri ich likvidácii. Jednotlivé zložky zo zhodnotených pneumatík sú stále definované ako cenné zdroje surovín, rovnako ako životaschopné prostriedky na dosiahnutie udržateľného rastu a rozvoja. Samotná recyklácia zohráva významnú úlohu pri plnení cieľov EÚ, čo sa týka využitia druhotných surovín, konkrétne znižovanie spotreby energie a nové materiály. Existujúci a potenciálni užívatelia sú naklonení k používaniu druhotných materiálov, v porovnaní s tradičnými, často zisťujú, že to je podstatne viac ekonomické a dochádza tak k šetreniu životného prostredia. Efektívna recyklácia pneumatík, teda produkty recyklácie sa pokúšajú kopírovať vlastnosti prírodných materiálov. Na trhu s týmito materiálmi bolo preukázané, že sú považované za najvhodnejšie a použiteľné pre širokú škálu aplikácií. Nedávny výskum na Technickej univerzite vo Viedni pod vedením prof. Mariniho pomohol určiť široké spektrum nových produktov a aplikácií, ktoré sa spoliehajú na chemické a fyzikálne vlastnosti recyklovaných pneumatík, hlavne čo sa týka čistenia textilnej zložky a využitiu tejto odseparovanej zložky^{3,4}.

V nasledujúcich kapitolách sa budeme venovať kompozitným materiálom vyrobených na báze textílií z opotrebovaných pneumatík a identifikácií ich zložiek pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie. Vo všeobecnosti je známe, že ak je sledovanou fyzikálnou vlastnosťou rozdiel tepelných tokov do vzorky a referenčnej látky, hovoríme o diferenciálnej kompenzačnej kalorimetrii. Pre túto metódu je zaužívaná skratka DSC pochádzajúca z anglického názvu „differential scanning calorimetry“⁵. Oblasť použitia DSC kalorimetrov je väčšinou udávaná pre teploty v rozmedzí od -180 °C do $+500\text{ °C}$. Horný teplotný limit je determinovaný tým, že straty tepla žiarením sú úmerné štvrtej mocnine absolútnej teploty a v dôsledku tepelných strát žiarením nad horným limitom by meraný signál zanikol v šume. Metóda DSC je vhodná na meranie charakteristických teplôt fázových prechodov I. aj II. druhu ako aj na kvantitatívne stanovenie entalpických charakteristík spojených s fyzikálnymi aj chemickými premenami látok v kondenzovaných sústavách. Na obr. 1 je znázornená schéma zariadenia pre diferenciálnu skenovacíu kalorimetriu. Možno ju využiť na meranie tepelnej kapacity, stanovenie čistoty látok, popis reakčnej kinetiky a na iné špeciálne účely^{5,6}.



Obr. 1. Schéma zariadenia pre diferenciálnu skenovacíu kalorimetriu⁹

Pri tejto metóde sa vzorka podlieha lineárnemu ohrevu a rýchlosti tepelnému toku vo vzorke, ktorý je úmerný okamžitému mernému teplu. Vnútri merného plášťa, ktorý je normálne udržiavaný na izbovej teplote (cca 20 °C), sú vmontované dve symetrické nádobky. Odporový teplomer a zahrievací člen zabudovaný v nosiči vzorky slúži ako primárna teplotná kontrola systému. Sekundárny teplotný kontrolný systém meria teplotnú diferenciu medzi oboma nosičmi a tento rozdiel upravuje na nulovú kontrolu tepelného prúdu, ktorý je meraný^{3,5}. Inak sa dá povedať, že teplota vzorky je udržiavaná izotermicky so vzorkou porovnávacou (alebo blokom) dodávaním tepla do porovnávacej vzorky. Toto množstvo, potrebné k udržaniu izotermických podmienok, je zapisované (zakresľované) v závislosti na čase alebo teplote. Používajú sa malé vzorky (miligramové množstvá), ktoré sú umiestnené na kovových fóliách, to znižuje tepelný spád na minimum. Malá tepelná kapacita celého systému dovoľuje použiť veľké rýchlosti ohrevu (desiatky °C min⁻¹) a zaisťuje veľkú rozlišovaciu schopnosť. Množstvo uvoľneného tepla je preto úmerné množstvu elektrickej energie spotrebovanej na zahriatie vzorky⁵. Nasledujúca kapitola je už priamo venovaná nášmu experimentu, ktorý bol realizovaný v laboratórnych priestoroch Technickej vysokej školy vo Wildau, Nemecko (Technische Hochschule Wildau) pod vedením profesora Michaela Herzoga.

Vstupný materiál a podmienky merania

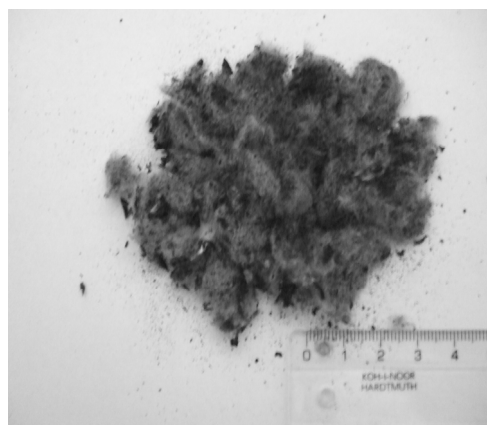
Východiskovým materiálom pri realizácii experimentu boli opotrebované pneumatiky, konkrétne textil z opotrebovaných pneumatík, poskytnutý spoločnosťou V.O.D.S a.s., Košice. Zber opotrebovaných pneumatík sa vykonáva prostredníctvom externej spoločnosti, ktorá opotrebované pneumatiky po zhromaždení na zberných miestach prostredníctvom veľkokapacitných kontajnerov odváža priamo ku spracovateľovi. Spracovanie opotrebovaných pneumatík prebieha na technologickej linke ELDAN, ktorá spĺňa požiadavky kladené na technológiu BAT (z angl.,

Best Available Technologie⁶) a BATNEEC^{7,8} (ide o technológiu BAT s najnižšími prevádzkovými nákladmi) a certifikáciu podľa európskej normy na výroby. Matricou je termoplast s názvom polyvinyl butyrál (PVB). Ide o termoplast, ktorý sa zvyčajne používa pre aplikácie vyžadujúce silné väzby, optické vlastnosti (priehľadnosť), priľnavosť k mnohým plochám, pevnosť a pružnosť^{10,12}. Pripravuje sa z polyvinylalkoholu po reakcii s butyraldehydom. Medzi hlavné aplikácie použitia je použitie na vrstvené bezpečnostné sklo pre automobilový priemysel.

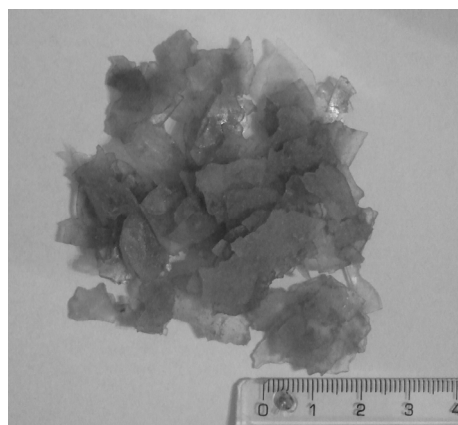
Pri meraní boli použité nasledujúce materiály a prístroje:

- vzorka textílií z opotrebovaných pneumatík (obr. 2),
- vzorka recyklovaného polyvinyl butyrálu (obr. 3),
- prístroj DSC 204 zn. NETZSCH (obr. 7),
- vyhodnocovací program NETZSCH Proteus,
- nádoba na vzorku z „Al“ (priemer cca 5 mm, obr. 5).

V tab. I sú uvedené vstupné parametre merania. Hmotnosť skúšobnej vzorky je 8,6 mg. Teplota je v rozmedzí od –50 °C až 300 °C. Priebeh merania začína najprv ochladzovaním vzorky na –180 °C a následným



Obr. 2. Textilie z opotrebovaných pneumatík



Obr. 3. Recyklovaný polyvinyl butyrál

Tabuľka I
Základné charakteristiky merania

Charakteristika merania	Hodnota
Hmotnosť skúšobnej vzorky	8,6 mg
Počiatočná teplota	-50 °C
Konečná teplota	+300 °C
Teplota v miestnosti	20,5 °C
Vlhkosť vzduchu	50 %
Norma	ISO 113 57



Obr. 4. Zhomogenizovaná zmes PVB a textílií



Obr. 5. Uloženie vzorky do skúšobného „téglika“

zahrievaním^{13,14}. Keď sa pri zahrievaní dosiahne teplota -50 °C, spustí sa meranie. Vzorka podlieha ohrevu až po hodnotu +300 °C.

Čas analýzy vzorky bol stanovený približne na 2 h. Počas tejto analýzy sa sledoval priebeh kriviek, teplota skleneného prechodu „T_g“ a teplota topenia materiálu „T_m“.



Obr. 6. Vzorka uložená v prístroji DSC 204 NETZSCH



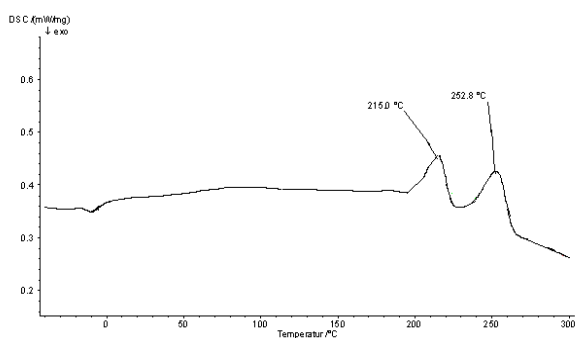
Obr. 7. Prístroj DSC 204 NETZSCH

Na obr. 5 je textília uložená vo vnútri skúšobného „téglika“ vyrobeného z hliníka – „Al“. Na obr. 6 je znázornený prístroj DSC 204 NETZSCH. Vzorka je v prístroji na pravej strane. Na ľavej strane je umiestnená referenčná vzorka, ktorá je prázdna.

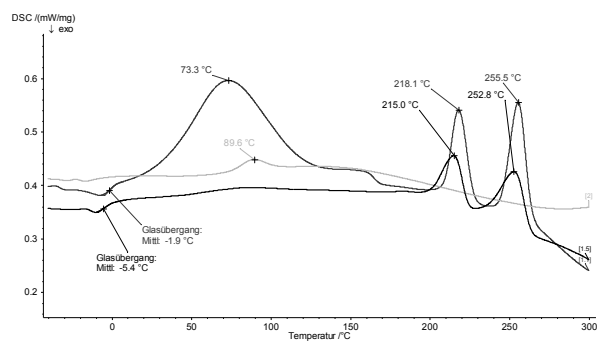
Po uplynutí stanoveného času merania sa analýza ukončila. V programe NETZSCH Proteus sa následne vyhodnotili údaje, ktoré sa počas merania získali.

Výsledky merania a diskusia

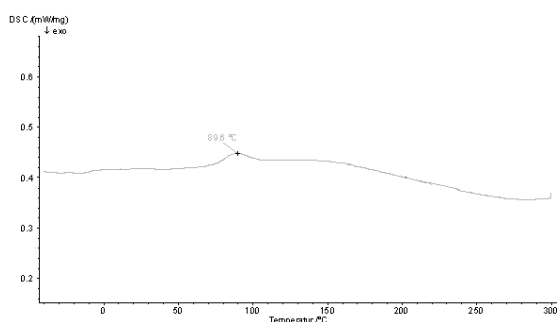
Rozdiel medzi prvým a druhým ohrevom neukazuje výrazné rozdiely v teplotách pre jednotlivé zložky. Prvé a druhé zahrievanie sa vykonáva z dôvodu odchýlok, ktoré vznikli medzi skúšobnou vzorkou a prístrojom. Na obr. 8 je vidieť hodnoty 215 °C a 252,8 °C, znamená to, že textília je tvorená dvoma typmi polyamidov PA6 a PA6.6 (cit.¹¹). Na začiatku grafu je vidieť „kráter“, ktorý je prí-



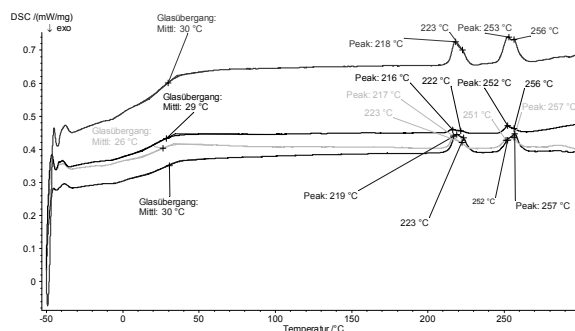
Obr. 8. Analýza textílií pomocou DSC – 2. ohrev



Obr. 10. Analýza textílií a gumovej časti; Glasübergangstemperatur – teplota skleného prechodu, Glasübergang – sklený prechod, Peak – vrchol, najvyššia hodnota, Temperatur – teplota, Mittl. – stredná hodnota nameraných hodnôt



Obr. 9. Analýza gumovej zložky pomocou DSC



Obr. 11. Analýza kompozitného materiálu s obsahom textílií od 10 % do 40 %; Glasübergangstemperatur – teplota skleného prechodu, Glasübergang – sklený prechod, Peak – vrchol, najvyššia hodnota, Temperatur – teplota, Mittl. – stredná hodnota nameraných hodnôt

značný hlavne kvôli prítomnosti vody alebo etanolu, tiež je tu možnosť, že sú to zvyšky rozpúšťadla. Obr. 8 popisuje gumovú zložku, ktorá je obsiahnutá v samotných textíliách. Hodnota T_g je 89,6 °C. Rozdiel medzi prvým a druhým zahrievaním znamená, že v prvom prípade vznikli anomálie medzi vzorkou a snímačom, napr. nerovnomerné „sadnutie“ vzorky do skúšobnej hliníkovej nádoby, v druhom prípade dostávame definitívnu kryštalinitu vzorky a analýzu materiálu ako takého. Tiež je zabezpečená lepšia príľnavosť vzorky a nádoby. Hodnota 89,6 °C pri gumovej zložke znamená topenie alebo vyparovanie vzorky, z grafu je vidieť, že ide o gumový materiál vysokej pevnosti.

Prvé a druhé zahrievanie sa vykonáva z dôvodu odchýlok, ktoré vznikli medzi skúšobnou vzorkou a prístrojom. V prvom prípade, je na obr. 9 vidieť hodnotu 73,33 °C, znamená to, že vo vzorke bola prítomná voda alebo etanol, tiež je možné, že sú to zvyšky rozpúšťadla. Tieto hodnoty platia pre testovanie odseparovanej textílie, hodnota T_g 89,6 °C. Obr. 10 predstavuje súhrne zobraze-

nie priebehu ohrievania vzoriek kompozitného materiálu s obsahom textílií od 10 % do 40 % textílií.

Diferenciálnou skenovacou kalorimetriou sa pri analýze jednotlivých zložiek^{9,10} (obr. 11) z opotrebovaných pneumatík dospelo k nasledujúcim záverom. Teplota skleného prechodu pre gumovú zložku, ktorá tvorí súčasť textílií, má hodnotu 89,6 °C. Teploty topenia T_m pre 10% podiel textílií sú 216 °C a 252 °C. Z analýzy sa zistilo, že textil je tvorený minimálne dvoma rozdielnymi typmi polyamidov. Na základe teoretických podkladov¹² sa stanovilo, že hodnota 216 °C prislúcha polyamid PA6. Hodnota T_m 252 °C zodpovedá polyamidu PA 6.6; okrem týchto zložiek sa v minimálnom množstve nachádzal vo vzorke aj polyester. Počas merania vzorky podliehali dvom ohrevom. Pri prvom ohreve sa eliminujú nežiaduce vplyvy, akými sú nedokonalé sadnutie vzorky do skúšobnej nádoby, príliš veľká nečistota vzorky a pod. V priebehu druhého ohrevu už dochádza k samotnému meraniu a stanoveniu požadovaných charakteristik.

Záver

Hlavným prínosom práce bolo stanovenie zloženia vstupných surovín pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie. Využitím dvoch druhotných (odpadových) surovín a vytvorenie nového materiálu s rôznou možnosťou aplikácie a využiteľnosti sme docielili šetrenie vstupných – primárnych surovín. Spracované výsledky pomôžu pri ďalšom skúmaní tejto problematiky, čo sa týka poznatkov o „nových“ kompozitných materiáloch s obsahom textílií z opotrebovaných pneumatík a tiež využiteľnosti druhej recyklovanej zložky a to polyvinyl butyrálu. Využitím diferenciálnej skenovacej kalorimetrie sme zistili zloženie obidvoch zložiek, tvoriacich kompozitný materiál. Textílie z opotrebovaných pneumatík sú tvorené PA 6, PA 6.6 a PET. Prednosťou tejto metódy bolo, že poznanie zloženia materiálu, nám uľahčilo hľadanie vhodného materiálu, potrebného k vytvoreniu kompozitného materiálu (vzhľadom na teploty T_g a T_m) a tým aj k výberu vhodnej technológie spracovania kompozitného materiálu.

LITERATÚRA

1. Reifen-Recycling-Anlagen, MeWa. www.mewa-recycling.de, stiahnuté 17. 2. 2012.
2. Zákon č.223/2001 Z.z. o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov. www.zbierka.sk, stiahnuté 17. 2. 2012.
3. Asplund J.: In: Rubber in the Environmental Age: progress in recycling: a one-day seminar, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, 18th November, 1996.
4. ETRA, <http://www.etra-eu.org>, stiahnuté 20. 2. 2012.
5. Haines P. J.: *Thermal Methods of Analysis – Principles, Applications and Problems*. Blackie Academic & Professional, London 1995.
6. Šimon P. Smrčková E., Svetík Š., Chochulová A.: In: *Letná škola termickej analýzy a kalorimetrie – učebné texty*, STU, Bratislava 2007.
7. Knapčíková L, Oravec P.: In: MendelNet 2010, Proc. Internatl. Ph.D. Students Conference, November 24th, 2010, Brno, 2010.
8. Zamfirova G., V. Gaydarov V., Zaharescu T. Silva L.G.A.: *Chem. Listy* 104, 283 (2010).
9. Knapčíková, L.: *Plastics Production* 5, 34 (2010).
10. Vaníček J.: *Metódy termické analýzy*, Technická univerzita v Liberci, Liberec 2010.
11. Ehrenstein G.,W., Riedel G., Travelle P.: *Praxis der Thermischen Analyse von Kunststoffen*, 355–358, Hanser Verlags, München 2003.
12. Kuraray, Product Mowital B 30 T, www.kuraray.com, stiahnuté 10. 3. 2012.
13. Schuermann H.: *Konstruieren mit Faser-Kunststoff Verbunden*, Springer, Berlin 2001.
14. Eichlerová R., Lukeš J., Konvičková S., Bradna P.: *Chem. Listy* 104, 307 (2010).

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF PLATINUM AND PALLADIUM IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

RENATA KOMENDOVÁ* and LUMÍR SOMMER

*Institute of Environmental Chemistry and Technology,
Faculty of Chemistry, Brno University of Technology,
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
komendova@fch.vutbr.cz*

Platinum group metals (PGMs) occur in the environment in very low concentrations (Pt 0,010 mg kg⁻¹ and Pd 0,015 mg kg⁻¹) and mainly platinum and palladium have the greatest economic importance. The introduction of platinum and palladium in automotive catalytic converters from 1990s to remove toxic components of vehicle exhaust gases leads to their occurrence in the environment. During this catalytic process micro amounts of platinum and palladium (and rhodium too) are released into the exhaust gases and spread into the air. These metals were detected in air, airborne particles, road dust, soils, plants and river sediments near to high ways and in tunnels. Thus, cars are the mobile and main sources of these metals¹⁻⁴.

Moreover, many chemical processes employ platinum group metals catalysts to improve the efficiency of various reactions. Platinum and palladium catalysts have now been used in the production of nitric acid for a century. During this process the losses of platinum can be as high as 300 mg per ton of acid produced. Some amounts of PGMs may also escape into the environment by nitrogenous fertilizers.

Platinum has the ability to inhibit the living processes of the cells. The discovery of this property in 1969 led to the development of platinum-based drugs to treat a wide of cancers. The first platinum anti-cancer drug – Cisplatin (1977), began to be used in treatment of testicular, ovarian and lung cancer, but this drug had a lot of negative toxic and carcinogenic effects. In 1986 was developed a compound similar to Cisplatin in terms of activity, but much less toxic – Carboplatin. Recent research has brought new platinum compounds which would treat tumors which do not respond to or which become resistant to Cisplatin and Carboplatin – Oxaliplatin and Satraplatin⁵. Pd(II) complexes containing various donor atom in ligands may have also anti-viral, -malarial, -fungal, -microbial and anti-tumor activities⁶. Platinum was monitored in the body fluids and tissues during cancer treatment and Pt(II) may appear on the equipment in hospitals and in waste waters of this institutions.

This is important because of several compounds of Pt (IV), especially PtCl₆²⁻ are gastrointestinal irritants and strong allergens already in the nano gram level for sensitive person and some their compounds may have toxic and carcinogenic properties¹.

In spite of these facts, traces of platinum and palladi-

um are still available in the environment, in comparison to common metals. For this purpose the preconcentration and separation by solid phase extraction (SPE) of platinum and palladium is often necessary and advantageous prior to their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

Various modified and unmodified silica coated with more and less strongly retained organic reagents or surfactants have been already reported for preconcentration and separation of platinum group metals from environmental samples⁷.

Modified silica gel sorbents Separon™ (octadecyl, octyl, phenyl, cyanoethyl, aminopropyl) and organic sorbents Amberlite XAD 2 and 4 were tested for preconcentration of platinum (II, IV) and palladium (II)⁸. The principle of preconcentration based on the sorption of ion associates of halogeno complexes of PGMs with the cationic surfactants⁹, such as carbethoxypentadecyltrimethylammonium bromide (Septonex®), dimethylaurylbenzylammonium bromide (Sterinol®), hexadecyltrimethylammonium chloride (CTAC) and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB). The recovery of preconcentrated metals was evaluated by ICP-AES.

Solutions were pumped through plastic cartridges with the sorbents placed in a water-pump-operated vacuum suction device DORCUSÓ (Tessek, Prague, Czech Republic). A peristaltic pump UNIPAP 315® (Poland) was attached with 3 mm silicone tubing to the cartridges and operated with an optimized solution flow rate of 1 cm³ min⁻¹. The cartridge with the sorbent was first washed with 10 cm³ of 96% ethanol and then conditioned with 10 cm³ of surfactant solution with selected concentration. Optimization studies were carried out with 50 cm³ of sample solution containing 0.4 µg cm⁻³ of Pt(IV) and Pd(II), 0.1 mol dm⁻³ HCl and selected surfactant concentration. The elution of platinum metals was performed by 10 cm³ of acetonitrile. After evaporation of eluate on Teflon® dish in the presence of 0.1 mol dm⁻³ HCl, the residue was diluted to 10 cm³ volumetric flask and analyzed by ICP-AES.

A 100 % recovery for Pd(II) and Pt(IV) was obtained for all tested sorbents based on modified silica and Amberlite XAD sorbents in the presence of 6 mmol dm⁻³ Septonex® or 3 mmol dm⁻³ Sterinol®, 6 mmol dm⁻³ TTAB and ®, 6 mmol dm⁻³ CTAC. The sample volume between 50–1000 cm³, little influence the sorption efficiency and the enrichment factor was easily reached up to 100. No interference of 0.02–1 mol dm⁻³ of chloride, nitrate, sulfate or 200 mg dm⁻³ of Al(III), Fe(III), Ca(II), Mg(II), Na(I), K (I) was observed. Similar results to the recovery of chloro complexes of Pt(IV) and Pd(II) were obtained for bromo complexes. The sorptions in this case were performed from solutions containing 0.1 mol dm⁻³ HBr.

This sorption and preconcentration process, under op-

timized conditions, was tested with spiked matrices of soil extracts, power station dust extract samples, both in *aqua regia*, and natural waters such as river and humic containing water. The recoveries for Pt(IV) and Pd(II) were from these all matrices again around 100 %.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the research project, number 1727, FCH-S-12-4.

REFERENCES

1. *Platinum, Environmental Health Criteria 125*. World Health Organization, Geneva 1991.
2. *Palladium, Environmental Health Criteria 226*. World Health Organization, Geneva 2002.
3. Zereini F., Alt F.: *Anthropogenic Platinum-Group Element Emission*, Springer, NY 1999.
4. Zereini F., Alt F.: *Palladium Emissions in the Environment*, Springer, Berlin 2006.
5. <http://www.platinum.matthey.com/>
6. Garoufís A., Hadjikakou S.K., Hadjiliadis N.: *Coord. Chem. Rev.* 253, 1384 (2009).
7. Vlašánková R., Sommer L.: *Chem. Pap.* 53, 200 (1999).
8. Komendová-Vlašánková R., Sommer L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 454 (2002).
9. Vlašánková R., Otruba V., Bendl J., Fišera M., Kanický V.: *Talanta* 48, 221 (1999).

MOŽNOSTI VYUŽITIA RP-HPLC S TANDEMOVOU MULTIDEKTCIOU NA CHARAKTERIZOVANIE VZORIEK PROTEÍNOVÝCH VÝŽIVOVÝCH DOPLNKOV S LIEČEBNÝM ÚČINKOM

MILAN HUTTA* a VERONIKA KOMOROWSKA

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
hutta@fns.uniba.sk

Úvod

Proteíny sú základnou súčasťou všetkých živých buniek, predstavujú látkový základ života. V organizme zabezpečujú funkcie takmer na všetkých úrovniach od stavebnej, cez pohybovú, transportnú, regulačnú, katalytickú až po obrannú. Preto je prirodzené, že stanovenie proteínov v biologických vzorkách je veľmi dôležitým aspektom v diagnostike a liečbe mnohých chorôb.

Vďaka najnovšiemu pokroku v oblasti molekulovej biológie, genomy, proteomiky a bioinformaiky rastie počet biotechnologických preparátov s liečebným účinkom obsahujúcich zložitú makromolekulovú látku enzýmovej povahy, ktoré sa získavajú či už izoláciou zo živočíšnych tkanív a rastlinných pletív alebo sú produkované rekombinantnými technikami¹. Potreba analýzy biotechnologických proteínových vzoriek je súčasťou kontroly kvality komerčne dostupných preparátov ako aj naplnením požiadaviek kladených na kvalitu proteínov produkovaných rekombinantnými technikami.

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC) patrí popri elektroforetických technikách medzi najpoužívanejšie analytické techniky na stanovenie proteínov. Na separáciu proteínov sa zjednoduchých chromatografických techník používa vysokoučinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach (RP-HPLC)^{2,3}, iónovo výmenná chromatografia^{4,6}, afinitná chromatografia v rôznych variáciách⁷⁻⁹ a gélová chromatografia^{10,11}. Spomenuté separačné techniky sú kombinované s detektormi vhodnými pre detekciu proteínových zložiek vzorky na princípe hmotnostnej spektrometrie s elektrosprejovou ionizáciou (ESI-MS) alebo MALDI-MS¹². Okrem hmotnostnej spektrometrickej detekcie je vhodná aj spektrofotometrická detekcia¹³⁻¹⁵. Keďže aminokyseliny ako fenylalanín či tryptofán obsahujú fluorofórne centrá, je pre proteínové vzorky možné použiť aj fluorimetrickú detekciu^{13,16}.

V predkladanej práci sme sa venovali štúdiu podmienok gradientovej elúcie v systéme RP-HPLC a štúdiu vplyvu pH prostredia mobilnej fázy na rozlíšenie a stabilitu enzýmovo aktívnych látok obsiahnutých vo zvolenej modelovej vzorke, ktorú predstavoval výživový doplnok s liečebným účinkom s komerčným názvom Wobenzym. Práca bola tiež zameraná na počiatočné overenie možností kombinovaných detekčných techník (spektrofotometrická

technika s využitím DAD a rýchla fluorimetrická detekcia) na charakterizovanie a analýzu komplexných komerčných vzoriek proteínov.

Experimentálna časť

Prístroje a zariadenia

Na analýzu bol využívaný kvapalinový chromatograf od Agilent Technologies, ktorý pozostával z nasledujúcich modulov: vákuový odplyňovač mobilných fáz (G1379B), dvojkanálová vysokotlaková binárna pumpa (G1312B), automatický dávkovač (G1329B), kolónový termostat (G1316B), detektory DAD (G1315), FLD (G1321A).

Pracovné podmienky detektorov:

DAD: snímané vlnové dĺžky 190–400 nm, krok 2 nm, šírka štrbiny 4 nm

FLD: excitačná vlnová dĺžka 250 nm, emisná vlnová dĺžka 300 nm, snímané vlnové dĺžky 300–700 nm, krok 5 nm

Súčasťou systému bola kolóna LiChrospher® WP 300 RP-18 (dĺžka kolóny 250 mm, 4 mm vnútorný priemer, 5 µm častice, veľkosť pórov 30 nm) termostatovaná na pracovnú teplotu 35±0.1 °C.

Pre záznam a vyhodnotenie chromatografických údajov sa použil program Agilent ChemStation.

Roztoky a chemikálie

Ultračistá voda Simplicity (Molsheim, Francúzsko), kyselina mravčia 98–100% p.a., kyselina octová 96% p.a., vodný roztok amoniaku 28–30 % p.a., acetonitril (ACN) 99,9% p.a. (všetko Merck, Darmstadt, Nemecko), komerčne dostupné tablety Wobenzym (MUCOS Pharma CZ, Průhonice, Česká republika), rutin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Príprava roztoku vzorky z prípravku Wobenzym

Tabletu Wobenzym sme pomocou skalpela zbavili povlaku, ktorý chráni enzýmy obsiahnuté v prípravku pred účinkom nízkeho pH tráviacich štiav. Následne sme tabletu rozdrvili v porcelánovej trecej miske. Zo vzniknutého prášku sme navážili do odmernej banky toľko, aby výsledný roztok v odmernej banke, po doplnení ultračistou vodou Simplicity po rýsku, mal hmotnostnú koncentráciu 1 mg ml⁻¹. Takto pripravený roztok sme premiešali a nechali 16 min v ultrazvukovej vani (UCM9, ECOSON, Slovensko) pri teplote 20 °C a výkone 100 %. Nakoniec sme roztok vzorky nechali 10 min. centrifugovať (Eppendorf AG, Hamburg, Nemecko) pri 13 400 otáčkach za minútu, aby sme odstránili nerozpustné zložky vzorky.

Tabuľka I

Enzymatické zloženie prípravku Wobenzym a niektoré fyzikálno-chemické vlastnosti daných enzýmov

Názov enzýmu	Množstvo ^a [mg]	Substrátová špecifickosť	pH katalytické optimum	Izoelektrický bod	Relatívna molová hmotnosť
Amyláza	10	polysacharidy	7 ¹⁷	6,34 ¹⁸	55 905 ¹⁹
Bromelaín	45	proteíny, peptidy, amidy	4,5–7,5 ²⁰	9,55 ²⁰	28 500 ²¹
Chymotrypsín	1	peptidy, amidy, estery	8 ²²	8,8 ²³	25 000 ²²
Lipáza	10	triacylglyceroly, oleje a tuky	7,7 ²⁴	5,8 ²⁵	45 000 ²⁶
Papaín	60	proteíny, peptidy	4–7 ²⁷	9,5 ²⁸	23 453 ²⁹
Trypsín	24	peptidy	7,5–8,5 ³⁰	10,5 ³⁰	23 500 ³¹
Pankreatín ^b	100	–	–	–	–

^a Množstvo daného enzýmu na 1 tabletu deklarované výrobcom. ^b Pankreatín je zmes enzýmov z pankreasu cicavcov. Jeho súčasťou sú proteázy (trypsin a chymotrypsín) ako aj enzýmy exokrinnej časti pankreasu (α -amyláza a lipáza), pričom obsahuje aj iné enzýmy a ďalšie látky bez enzymatickej aktivity³²

Príprava mobilnej fázy A

Mobilná fáza A s hodnotou pH 2,50 pozostávala z kyseliny mravčej riedenej s vodou na látkovú koncentráciu 56 mmol l⁻¹. Pri ostatných hodnotách pH pozostávala mobilná fáza A z tlmivého roztoku kyselina mravčia/mravčan amónny (pH 2,90; 3,30; 3,75; 4,10; 4,67) alebo kyselina octová/octan amónny (pH 3,75; 4,10; 4,67; 5,10; 5,50). Pri príprave oboch tlmivých roztokov sme postupovali rovnako. Do 1 litra ultračistej vody Simplicity sme zriedili kyselinu mravčiu alebo kyselinu octovú na látkovú koncentráciu 56 mmol l⁻¹. Následne sme pomocou pH metra s kombinovanou sklenenou/chlorido-striebornou elektródou (WTW InoLab pH 730, Wellhelm, Nemecko) titrovali roztok kyseliny roztokom amoniaku na požadovanú hodnotu pH.

Príprava mobilnej fázy B

Mobilná fáza B pozostávala z ACN a vody v pomere 70/30. K mobilnej fáze B sme pridali taký objem kyseliny a roztoku amoniaku, aký sa spotreboval na prípravu mobilnej fázy A s daným pH.

Mobilnú fázu sme pred použitím odplyňovali 20 min v ultrazvukovej vani pri teplote 20 °C a výkone 100 %.

Gradients použité pri prietoku 1 ml min⁻¹

Program Gradient 1 bol nastavený od 0–3 min ako izokratická elúcia so 100% A, od 3–33 min lineárne stúpala z 0% B na 95% B v A, nasledovala 2 min izokratická elúcia s 95% B v A, od 35–40 min lineárne klesala z 95% B v A na 100% A, nasledovala 5 min izokratická elúcia so 100% A.

Program Gradient 2 bol nastavený 0–3 min ako izokratická elúcia so 100% A, od 3–40 min lineárne stúpala z 0% B na 70 % B v A, nasledovala 5 min izokratická elúcia so 70% B v A, od 45–49 min lineárne klesala zo 70% B v A na 100 % A, nasledovala 6 min izokratická elúcia so 100% A.

Výsledky a diskusia

Štúdiom vplyvu doby státia roztoku vzorky od prípravy po detekciu na reprodukovateľnosť HPLC analýzy

Z porovnania chromatogramov, ktoré sme získali analyzovaním vzorky Wobenzym s odstupom niekoľkých hodín, sme zistili, že doba státia roztoku vzorky má vplyv na reprodukovateľnosť meraní. Časový faktor sa prejavuje ako strata respektíve pribúdanie nových píkov vo viacerých oblastiach získaných chromatografických záznamov, a to najmä v oblasti do 12. minúty separácie. Reprodukovateľnosť meraní klesala so stúpajúcim pH, čo sa prejavovalo najmä v oblasti skúmaných hodnôt nad pH 4. Keďže sa jedná o vzorku enzýmov, v ktorej sa nachádzajú 4 proteolytické enzýmy, je na mieste predpoklad, že môže dochádzať k ich vzájomnej proteolýze. Preto, aby sme zabezpečili získanie správnych výsledkov, sme pred každou separáciou pripravili nový roztok vzorky, pričom sme dodržiavali vždy rovnaký čas od prípravy roztoku vzorky po jej HPLC analýzu.

Výber vhodného gradientu elučného činidla na separáciu zložiek prípravku Wobenzym

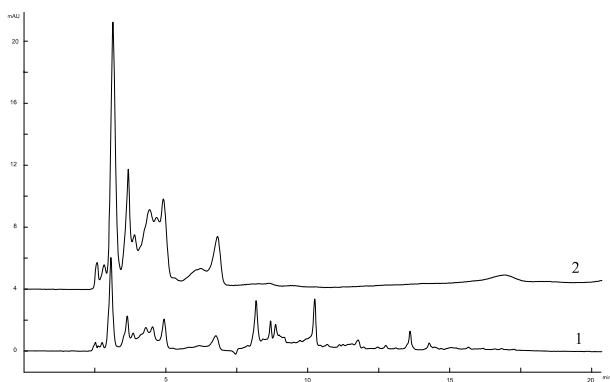
Pri riešení problému výberu tvaru gradientu sme použili dva rôzne gradienty elučného činidla. Záznamy získané pri separácii s použitím Gradientu 1 vykazujú, v porovnaní so záznamami pri použití Gradientu 2, väčšie množstvo viditeľných pík (viz obr. 1). Túto tendenciu majú záznamy získané pomocou DAD ako aj fluorescenčného detektora.

To, že pozorujeme viac pík pri použití Gradientu 1, pripisujeme zložitosti vzorky a veľkej dynamike signálov analytov. Keďže Gradient 1 je strmší ako Gradient 2, dochádza k situácii, kedy je píková kapacita sústredená do menšieho separačného priestoru kolóny v dôsledku čoho môže dochádzať k sčítaniu malých signálov a tvorbe multipletových pík. Miernejšie zvyšovanie elučnej sily vedie k lepšej separácii, a tým k splynutiu odseparovaných pík s nulovou líniou. Záznamy získané pri Gradiente 2, preto vykazujú zdanlivé zjednodušenie matrice.

Na základe vedeckých úvah uvedených vyššie a predpokladu, že pozvoľnejšie zvyšovanie koncentrácie organického rozpúšťadla v mobilnej fáze bude viesť k lepšej separácii analytov, sme pre nasledujúce analytické postupy vybrali Gradient 2.

Štúdium vplyvu hodnoty pH mobilnej fázy na HPLC analýzu modelovej vzorky proteínov

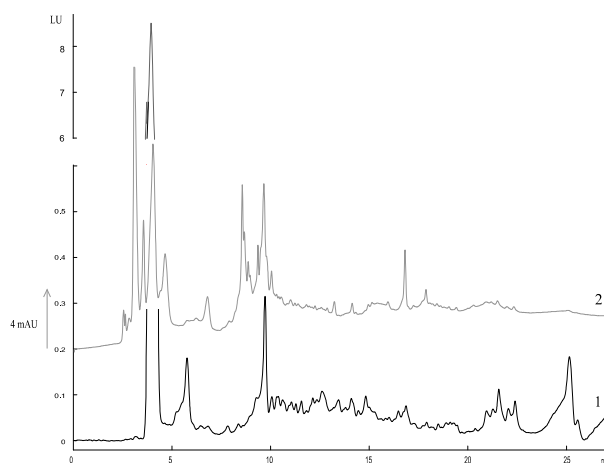
Z uvedených chromatogramov (obr. 3) je zjavné, že hodnota pH mobilnej fázy má významný vplyv na separáciu a tvar záznamu. Hoci sú záznamy vzorky pripravenej z tablety Wobenzym veľmi komplexné a zložené, je možné na ich základe spraviť jednoduché závery ohľadne vplyvu pH mobilnej fázy na separáciu našej vzorky.



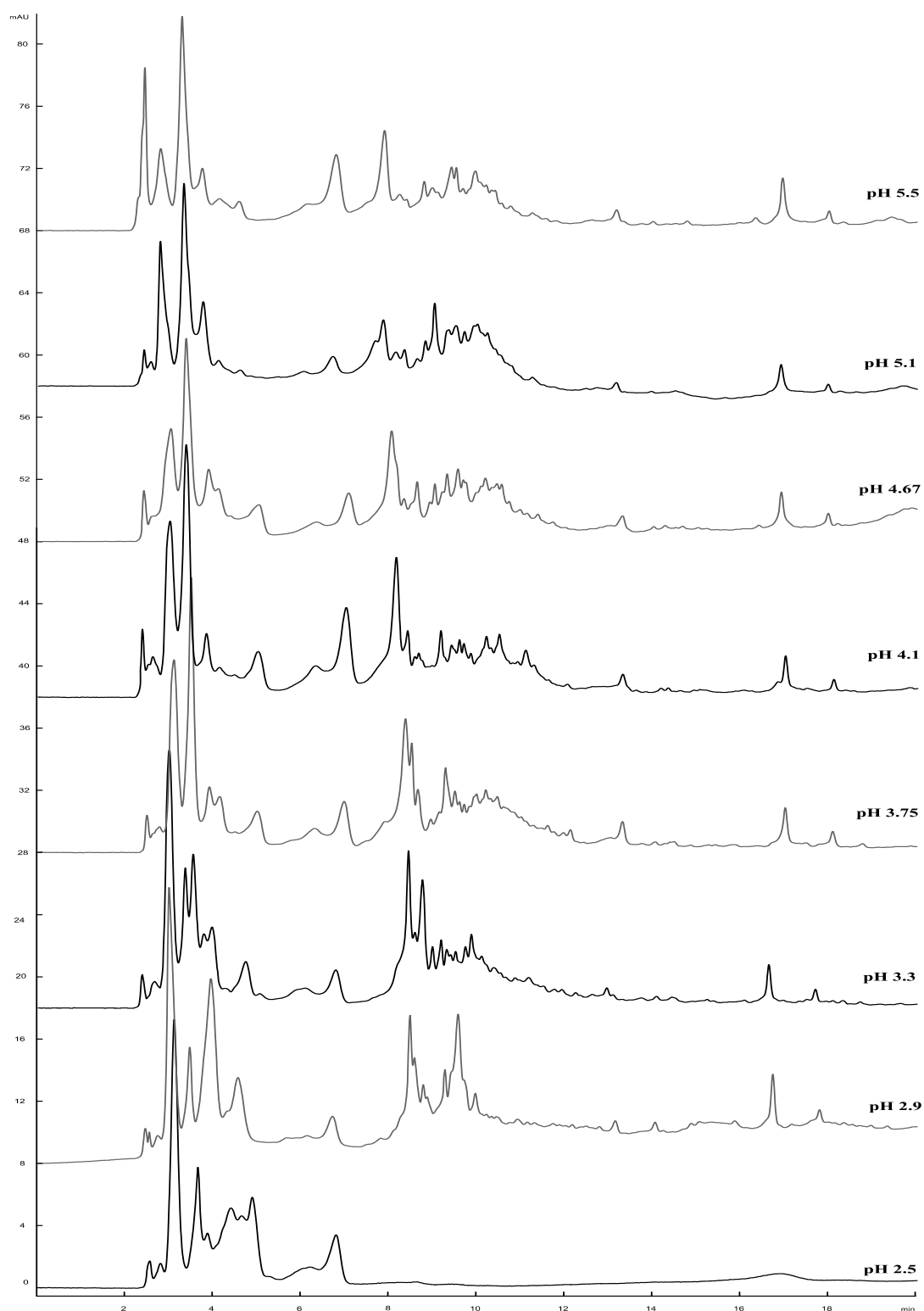
Obr. 1. Chromatografické záznamy roztoku vzorky Wobenzym získané pri dvoch rôznych gradientoch. Krivky: 1 – chromatogram získaný pri použití Gradientu 1, 2 – chromatogram získaný pri použití Gradientu 2. Chromatografická kolóna LiChrospher 300 RP-18 vyhrievaná na pracovnú teplotu 35 °C, injektovaný objem roztoku vzorky 100 μ l, mobilná fáza A: pH 2,5 kyselina mravčia, mobilná fáza B: ACN, Gradient 1 a Gradient 2 pri prietoku 1 ml min⁻¹, UV detekcia pri 280 nm

Pri porovnaní chromatografických záznamov vzorky získaných pri rozdielnych hodnotách pH mobilnej fázy A (viz obr. 3), je jednoznačne najvýraznejšou črtou odlišnosť chromatogramu získaného pri separácii s mobilnou fázou s pH 2,5 od všetkých ostatných chromatografických záznamov. Tento chromatogram je na píky, a tým aj na informácie podstatne chudobnejší než tie chromatogramy, ktoré boli zosťrožené z meraní pri vyšších hodnotách pH, pričom sa tento trend objavuje na záznamoch z DAD ako aj z fluorescenčného detektora. Uvedený jav môže súvisieť s denaturáciou niektorých analytov, ku ktorej dochádza pri takom nízkom pH. Tento záver súhlasí s údajmi v odbornej literatúre, kde sa uvádza, že denaturácii pri pH nižšom ako 3 resp. 2,8, z enzýmov prítomných vo výživovom doplnku Wobenzym, podlieha chymotrypsín²² a papaín²⁷. Preto hodnoty pH nižšie ako 3 nepovažujeme za vhodné na analýzu našej vzorky.

Pri analytickom procese v ktorom je cieľom systematické skúmanie separácie a stanovenia enzýmov, je nevýhodné ak pH v systéme nadobudne hodnoty, pri ktorých sú dané analyty enzymaticky aktívne, čo by malo za následok zníženú reprodukovateľnosť celého postupu. Riešením je použitie vhodného tlmivého roztoku s takým pH, aby sa počas separácie vylúčilo dosiahnutie takých hodnôt pH, pri ktorých sa dané enzýmy stávajú aktívnymi. Zo získaných záznamov (obr. 2) je vidieť, že pri použití pH vyšších ako 5 dochádza k značnej strate počtu pík oproti separáciám pri nižších hodnotách pH. Vzhľadom na tieto skutočnosti a na informácie získané z odbornej literatúry o katalytickej optime proteolytických enzýmov v našej vzorke (tab. I) sme zhodnotili, že pre separáciu tejto zmesi enzýmov sú vhodné hodnoty pH v rozmedzí od 3 do 4.



Obr. 2. Chromatografické záznamy roztoku vzorky Wobenzym získané pri tandemovom zapojení detektorov. Krivky: 1 – chromatografický záznam získaný z fluorescenčného detektora: excitačná vlnová dĺžka 250 nm, emisná vlnová dĺžka 300 nm, 2 – chromatografický záznam získaný z DAD detektora pri 280 nm. Chromatografická kolóna LiChrospher 300 RP-18 vyhrievaná na pracovnú teplotu 35 °C, injektovaný objem roztoku vzorky 100 μ l, mobilná fáza A: pH 3,3 kyselina mravčia/mravčan amónny, B: ACN/H₂O 70/30 (v/v), Gradient 2 pri prietoku 1 ml min⁻¹



Obr. 3. Chromatografické záznamy roztoku vzorky Wobenzym získané pri rôznych hodnotách pH mobilnej fázy A. Chromatografická kolóna LiChrospher 300 RP-18 vyhrievaná na pracovnú teplotu 35 °C, injektovaný objem roztoku vzorky 100 µl, mobilná fáza A: pH 2,5 kyselina mravčia, mobilná fáza A: pH 2,9; pH 3,3; pH 3,75; pH 4,1 a pH 4,67 kyselina mravčia/mravčan amónny, mobilná fáza A: pH 5,1 a pH 5,5 kyselina octová/octan amónny, mobilná fáza B: ACN/H₂O 70/30 (v/v), Gradient 2 pri prietoku 1 ml min⁻¹, UV detekcia pri 280 nm

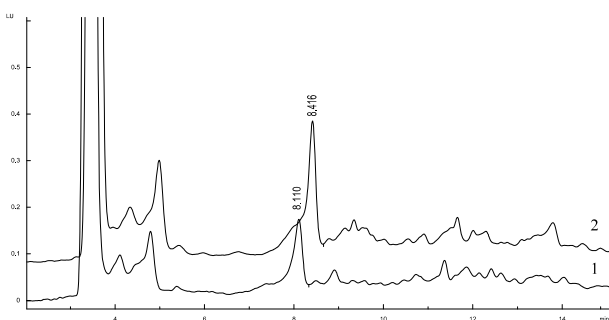
Porovnanie dvoch rôznych tlmivých roztokov

V oblasti pH hodnôt od 3,7 do 4, 7 je možné použiť oba tlmivé roztoky (kyselina mravčia/mravčan amónny, kyselina octová/octan amónny) pretože v tejto oblasti pH nie je ich tlmivá kapacita menšia než 20 % z celkovej tlmivej kapacity.

Tlmivé roztoky sme porovnávali na základe chromatogramov získaných pri troch hodnotách pH (3,75; 4,1; 4,67). Zistili sme, že dané tlmivé roztoky majú voči separovaným látkam mierne rozdielnu selektivitu a rozdielnu elučnú silu. Tlmivý roztok kyselina octová/octan amónny má vyššiu elučnú silu v dôsledku čoho majú separované látky o niečo nižšiu retenciu, čo je možné pozorovať na chromatogramoch ako posun píkov k nižším retenčným časom (viz obr. 4). Tento jav si vysvetľujeme prítomnosťou metylovej skupiny v molekulách tlmivého roztoku kyselina octová/octan amónny, čím majú molekuly tlmivého roztoku väčšiu možnosť tvoriť interakcie hydrofóbneho charakteru s nepolárnou stacionárnou fázou a tiež s nepolárnymi reťazcami aminokyselinových zvyškov proteínov.

Časový posun detektorov v tandemovom zapojení

Na zistenie časového posunu detektora DAD voči fluorescenčnému detektoru sme použili nízkomolekulovú štandardnú látku neproteínovej povahy s názvom rutin. Danú látku sme podrobili HPLC analýze s využitím vyššie spomenutých typov detekcie pri tých istých podmienkach ako pri separácii modelovej vzorky. Prepočtom je získaný objemový ekvivalent merania medzi DAD a fluorescenčným detektorom rovný 40 ± 1 μ l.



Obr. 4. Chromatografické záznamy roztoku vzorky Wobenzym získané pri rôznych druhoch mobilnej fázy A. Krivky: 1 – chromatogram vzorky pri použití mobilnej fázy A s pH 3,75: kyselina octová/octan amónny, 2 – chromatogram vzorky pri použití mobilnej fázy A s pH 3,75: kyselina mravčia/mravčan amónny. Chromatografická kolóna LiChrospher 300 RP-18 vyhrievaná na pracovnú teplotu 35 °C, injektovaný objem roztoku vzorky 100 μ l, mobilná fáza B: ACN/H₂O 70/30 (v/v), Gradient 2 pri prietoku 1 ml min⁻¹, fluorescenčná detekcia: excitačná vlnová dĺžka 250 nm, emisná vlnová dĺžka 300 nm

Záver

V predloženej práci sa nám podarilo splniť všetky stanovené ciele štúdie, ktorú sme vykonávali na modelovej vzorke. Za modelovú vzorku proteínov sme zvolili výživový doplnok s liečebným účinkom s komerčným názvom Wobenzym. Pre potreby nášho výskumu je vhodný vďaka viacerým skutočnostiam. Z ekonomického pohľadu je výhodná jeho cenová dostupnosť oproti štandardom enzýmov produkovaným a predávaným na analytické účely. Z hľadiska experimentálneho, je vhodná tabletová forma v ktorej sa nachádza a ktorej súčasťou je špeciálny obal chrániaci enzýmy pred nežiaducimi javmi ku ktorým môže dochádzať v priebehu skladovania, ako je oxidácia či denaturácia. Vďaka dobrej stabilite a nemennosti enzýmov je možné dosiahnuť reprodukovateľné experimentálne výsledky.

Pre štúdium podmienok gradientovej elúcie v systéme RP-HPLC sme použili dva gradienty elučného činidla, ktoré sa líšili svojim sklonom. Na základe nameraných meraní a predpokladu, že pozvoľnejšie zvyšovanie koncentrácie organického rozpúšťadla bude viesť k lepšej separácii analytov, sme pre nasledujúce analytické postupy vybrali tvar Gradientu 2.

Pri štúdiu vplyvu pH prostredia mobilnej fázy na retenciu enzýmovo aktívnych látok v systéme RP-HPLC sme použili dva tlmivé roztoky (kyselina mravčia/mravčan amónny; kyselina octová/octan amónny), pri výbere ktorých sme brali ohľad najmä na potreby detekcie. Kombináciou uvedených tlmivých roztokov sme modelovali pH od hodnoty 2,5 až po 5,5. Z nameraných chromatografických záznamov a na základe informácií získaných z odbornej literatúry sme usúdili, že pre separáciu danej zmesi enzýmov je vhodné použiť tlmivé roztoky s hodnotami pH v rozmedzí od 3 do 4, pretože pri týchto hodnotách pH by nemalo dochádzať k denaturácii daných enzýmov a zároveň by enzýmy mali dosahovať minimum enzymatickej aktivity čo je podstatné z pohľadu reprodukovateľnosti celého postupu.

V predloženej práci sme na detekciu využili dve detekčné techniky (spektrofotometrická technika s využitím DAD a rýchla fluorimetrická detekcia). Detektory boli zapojené tandemovo, čo predstavuje výhodu z hľadiska množstva informácií, ktoré je možné získať v priebehu jedného experimentu. Keďže fluorescenčný detektor je selektívny na isté štruktúrne črty analytov, poskytuje kvalitatívne odlišné informácie ako detektor DAD (obr. 2), čo možno v konečnom dôsledku zužitkovať pri problematike identifikácie jednotlivých zložiek vzorky.

Predložená práca predstavuje počiatočné štádium výskumu v oblasti proteínov na našom pracovisku.

Táto práca vznikla vďaka podpore projektu Priemyselny výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov, ITMS projektu: 26240220034. Agentúra Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ: Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.

LITERATÚRA

1. Korf U., Kohl T., Zandt H.: *Proteomics* 5, 3571 (2005).
2. Kanie Y., Enomoto A., Goto S., Kanie O.: *Carbohydrate Res.* 343, 758 (2008).
3. Thomä C., Krauseb I., Kulozi U.: *Int. Dairy J.* 16, 285 (2006).
4. Regnier F. E.: *Anal. Biochem.* 126, 1 (1982).
5. Rückert M., Wohlfarth M., Bringmann G.: *J. Chromatogr., A* 840, 131 (1999).
6. Adachi T., Takayanagi H., Sharpe A.D.: *J. Chromatogr., A* 763, 57 (1997).
7. Chaga G.S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 313 (2001).
8. Burgess R. R., Thompson N. E.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 304 (2002).
9. Xiong L., Andrews D., Regnier F. E.: *J. Proteome Res.* 2, 618 (2003).
10. García M.C.: *J. Chromatogr., B* 825, 111 (2005).
11. Shi Y., Xiang R., Horváth C., Wilkins J. A.: *J. Chromatogr., A* 1053, 27 (2004).
12. Alomirah H.F., Alli I., Konishi Y.: *J. Chromatogr., A* 893, 1 (2000).
13. Heath T. G., Giordani A. B.: *J. Chromatogr., A* 638, 9 (1993).
14. Dziuba J., Nałęcz D., Minkiewicz P.: *Anal. Chim. Acta* 449, 243 (2001).
15. Julka S., Folkenroth J., Young S. A.: *J. Chromatogr., B* 879, 2057 (2011).
16. Ravindran G., Bryden W.L.: *Food Chem.* 89, 309 (2005).
17. <http://www.worthington-biochem.com/AA/default.html>, stiahnuté 30. apríla 2011.
18. Rosenmund H., Kaczmarek M. J.: *Clin. Chim. Acta* 71, 185 (1976).
19. <http://www.pdb.org/pdb/explore/biologyAndChemistry.do?structureId=1XGZ>, stiahnuté 30. apríla 2011.
20. <http://www.biozym.de/datasheets/bromelain.php>, stiahnuté 30. apríla 2011.
21. Wharton Ch. W.: *Biochem. J.* 143, 575 (1974).
22. <http://www.biozym.de/datasheets/chymotrypsin.php>, stiahnuté 30. apríla 2011.
23. Ghosh K. K., Verma S. K.: *Ind. J. Biochem. Biophys.* 45, 350 (2008).
24. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/lipase_olive_oil.Par.0001.File.dat/lipase_olive_oil.pdf, stiahnuté 30. apríla 2011.
25. Caro A. D., Figarella C., Amic J., Michel R., Guy O.: *Biochim. Biophys. Acta* 490, 411 (1977).
26. <http://www.worthington-biochem.com/PL/default.html>, stiahnuté 30. apríla 2011.
27. <http://www.biozym.de/datasheets/papain.php>, stiahnuté 30. apríla 2011.
28. Sangeetha K., Abraham T. E.: *J. Molec. Catal. B: Enzymatic* 38, 171 (2006).
29. <http://www.pdb.org/pdb/explore/biologyAndChemistry.do?structureId=1PPN>, stiahnuté 30. apríla 2011.
30. <http://www.worthington-biochem.com/TRY/default.html>, stiahnuté 30. apríla 2011.
31. Barman T. E.: *Enzyme Handbook*, 2. zväzok. Springer, New York 1985.
32. <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=227>, stiahnuté 30. apríla 2011.

SLEDOVÁNÍ OBSAHU CHOLESTEROLU V KOZÍM MLÉCE PO SUPLEMENTACI KRMNÉ DÁVKY CHLORELOU

ROMANA KOSTRHOUNOVÁ^{*a}, LUCIA HODULOVÁ^a, IVANA BORKOVCOVÁ^a, LENKA VORLOVÁ^a a ALENA PECHOVÁ^b

^a Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ^b Klinika chorob přežvýkavců, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika
kostrhounovar@vfu.cz

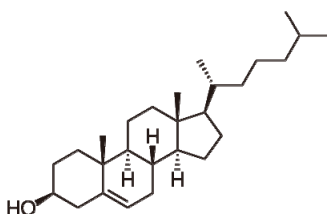
Úvod

Cholesterol (obr. 1) je steroidní sloučenina, která je přirozenou součástí živočišných tkání. Je klíčovou komponentou řady biochemických procesů. Příjem cholesterolu z potravin živočišného původu je významný pro lidské zdraví, je spojován se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Znalost obsahu cholesterolu v potravinách je proto významná při řešení zdravotních problémů.

V naší studii jsme se zabývali stanovením celkového cholesterolu v syrovém kozím mléce z chovu VFU. Byl sledován vliv suplementace krmné dávky chlorellou na obsah cholesterolu v odebraném mléce. Jako metoda stanovení cholesterolu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi s isokratickou elucí a detekcí v UV oblasti spektra při vlnové délce 205 nm. Vlastnímu chromatografickému stanovení předcházela izolace celkového cholesterolu z matrice saponifikací alkoholickým roztokem hydroxidu draselného a následná extrakce do hexanu.

Materiál a metody

Odběr vzorků mléka: Vzorky kozího mléka pocházely z chovu VFU od koz bílých krátkosrstých. Celkový počet vzorků v jednom odběru byl 22. Vzorky mléka byly rozdě-



Obr. 1. Struktura cholesterolu

leny do 2 skupin. První skupinu tvořily kontrolní vzorky ($n=11$), druhou skupinu vzorky od koz, jejichž krmná dávka byla suplementována chlorellou ($n=11$). Přidávky chlorelly byly podávány perorálně po dobu 6 týdnů v období od 30. 6. do 11. 8. 2011.

Chemikálie a standardy: cholesterol (Sigma-Aldrich, USA), methanol, hexan (Merck, Německo), fenolftalein, hydroxid draselný, síran sodný (Penta, ČR). Všechny použité chemikálie byly p.a nebo HPLC kvality. Ze zásobního roztoku cholesterolu o koncentraci 1000 mg l^{-1} byly připraveny pracovní roztoky v metanolu v koncentračním rozsahu $1\text{--}500 \text{ mg l}^{-1}$. Tyto roztoky byly použity pro sestavení kalibrační křivky.

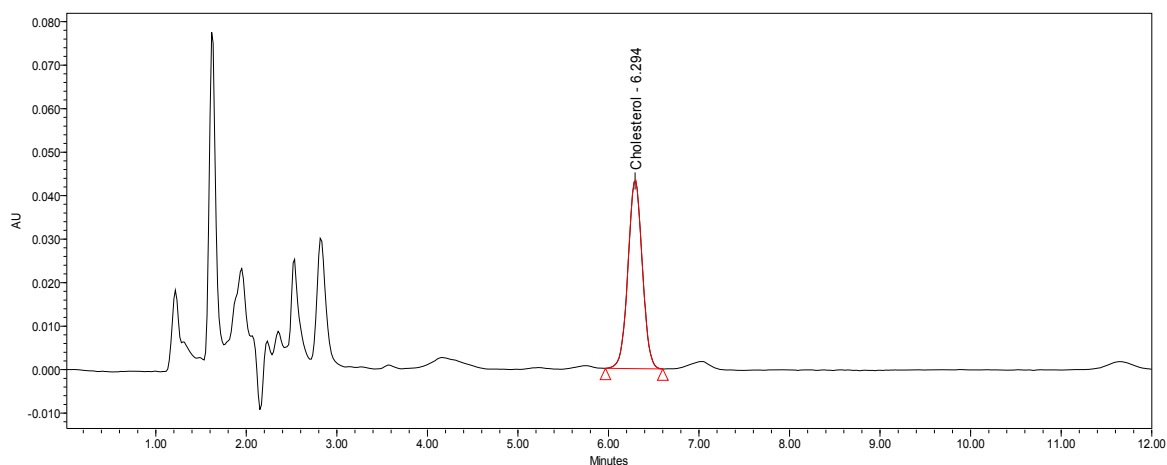
Přístroje a vybavení: Stavebnicový kapalinový chromatograf Breeze (Waters, USA), skládající se z modulů: 2487 Dual λ Absorbance Detector, 1525 Binary HPLC Pump, 717 plus Autosampler, termostat kolon. Chromatografická kolona Zorbax Eclipse XDB C8, $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (Agilent, USA) Analytické váhy (Kern, Německo), laboratorní třepačka, sklokeramická topná deska, rotační vakuová odparka.

Pracovní postup: 1 g vzorku mléka byl umístěn do 50ml varné baňky a bylo přidáno 10 ml methanolickeho roztoku KOH (1 díl 10M KOH a 9 dílů methanolu). Směs byla zahřívána pod refluxem 30 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 5 ml deionizované vody a 10 ml hexanu a intenzivně třepáno 10 min. Pomocí separačního nástavce byla oddělena hexanová vrstva, byla promývána destilovanou vodou do neutrální reakce a vysušena síranem sodným. Maximální alikvotní podíl hexanu byl na rotační vakuové odparce odpařen téměř dosucha. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu, zfiltrován přes $0,45 \mu\text{m}$ nylonový filtr a přenesen do HPLC vialky.

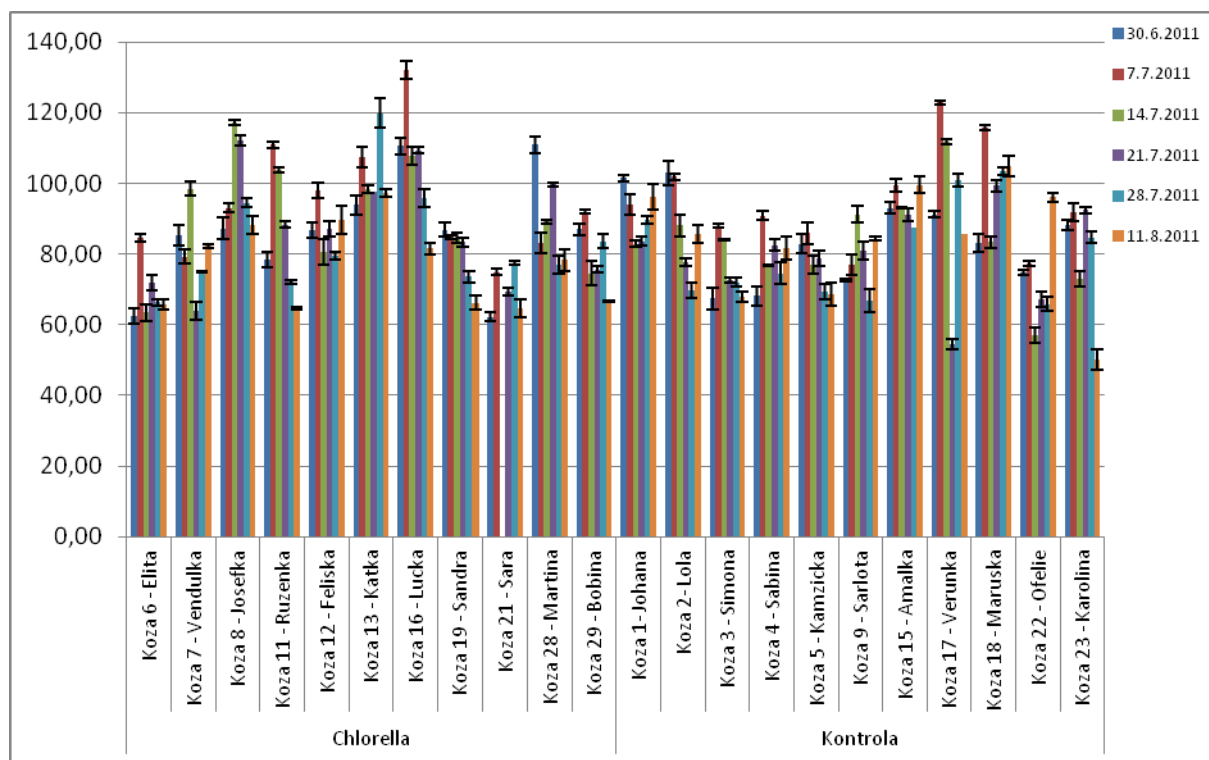
Podmínky HPLC stanovení: mobilní fáze: methanol/voda (95:5), isokratický režim, průtok $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, nástřik $20 \mu\text{l}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$, detekce při $\lambda = 205 \text{ nm}$. Doba analýzy byla 12 min, kvantifikace prováděna metodou vnější kalibrace. Každý vzorek byl analyzován v minimálně dvou paralelních stanoveních, s každou sérií byl měřen slepý vzorek. Celkem bylo analyzováno 132 vzorků.

Výsledky a diskuse

Chromatogram vzorku kozího mléka je uveden na obr. 2. Naměřené hodnoty cholesterolu v kozím mléce pro kontrolní skupinu i skupinu s krmnou dávkou obohacenou chlorellou jsou uvedeny na obr. 3.



Obr. 2. Chromatogram vzorku syrového kozieho mlieka



Obr. 3. Grafické znázornění obsahu cholesterolu v kozím mliece, suplementace chlorellou (Koza 6 – Koza 29), kontrola (Koza 1 – Koza 23)

Závěr

Byl sledován vliv suplementace krmné dávky chlorellou na obsah cholesterolu v kozím mliece. Vzorky byly odebírané v intervale 30.6.–11.8. 2011. Vzorky byly roz-

děleny do dvou skupin – vzorky kontrolní a vzorky suplementované chlorellou. Obsah cholesterolu u kontrolních vzorků se pohyboval v rozmezí 57–123 mg kg⁻¹, u vzorků s chlorellou 62–131 mg kg⁻¹. Při přepočtu koncentrace cholesterolu na g tuku se výsledky nelišili. Nebyla tedy

nalezena významná závislosť medzi obsahom cholesterolu v mliečnej a suplementácii krmnej dávky chlorellou.

Práce vznikla za finančnej podpory výskumného záměru MSM6215712402.

LITERATURA

1. Fenton M.: J. Chromatogr. 624, 369 (1992).
2. Daneshfar A., Khezeli T., Lotfi H. J.: J. Chromatogr., B 877, 456 (2009).
3. Metre Prates J. A., Goncalves Quaresma M. A., Branquinho Bessa R. J., Andrade Fontes C. M. G., Matcus Alfaia C. C. M: Food Chem. 94, 469 (2006).
4. Sieber R.: Internatl. Dairy J. 15, 191 (2005).
5. Katsanidis E., Addis P. B.: Free Radical Biol. Med. 27, 1137 (1999).

GC-MS ANALÝZA MASTNÝCH KYSELÍN V RIASACH

**RÓBERT KUBINEC^{a*}, JAROSLAV
BLÁŠKO^a, RENÁTA GÓROVÁ^a,
GABRIELA ADDOVÁ^a, IVAN
OSTROVSKÝ^a, LADISLAV SOJÁK^a,
PETER PODOLEC^a, ALEXANDRA
SZABÓOVÁ^a, JOZEF VIŠŇOVSKÝ^a
a JOZEF MIKULEC^b**

^a Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava 4, ^b Slovnaft VÚRUP, Vlčie hrdlo, 820 03 Bratislava 23, Slovenská republika
kubinec@fns.uniba.sk

Pripravené metylestery mastných kyselín C₈–C₂₄ sa separovali vysoko rozlišovacou kapilárnou plynovou chromatografiou v 100 m dlhých kolónach s polárnou stacionárnou fázou CP-Sil 88 s MS detekciou. Pozornosť sa zameriavala na separáciu a identifikáciu najobtiažnejšie separovateľných *trans*-izomérov kyseliny olejovej. Na identifikáciu separovaných izomérov sa využili dostupné štandardné referenčné materiály, korelácia retencia-štruktúra, publikované charakteristiky a hmotnostná spektrometria.

Kultivácia sa uskutočnila s riasami: *Auxenochlorella prothocoides*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*,

Chlamydomonas reinhardtii, *Chlorella kessleri*. Kultivácia rias prebiehala v klimatizovanej komore, pod svetelnou rampou fluorescenčného žiarenia štyroch žiariviek (8000 až 9000 lux) na trepačke (rpm = 110) bez prebublávania. Najviac sa darilo v raste *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella kessleri* a *Chlorella vulgaris*.

Lipidy boli z vysušených rias extrahované pomocou chloroformu v Soxhlete resp. extrakciou v extraktore TE-CAT. Po odparení sa lipidy (trans)esterifikovali metanolom za katalýzy BF₃-etanolátu.

Zloženie lipidov extrahovaných z jednotlivých kultivovaných rias je významne odlišné. Na zloženie lipidov má vplyv aj zloženie kultivačného média a pravdepodobne aj koncentrácia CO₂ pri kultivácii. Pri nízkej koncentrácii CO₂ vznikajú acyly s vyšším stupňom nenasýtenia. Identifikovali sa tiež kyseliny s nepárnym počtom uhlíkov, ktoré nie sú bežne prítomné v olejoch z rastlín.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Výskum a vývoj nových technológií chemickej analýzy pre metabonomiku/metabolomiku“ ITMS: 26240220007 a projektu „Dobudovanie centra excelentnosti metód a procesov zelenej chémie“ ITMS: 26240120025 na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Prácu podporila Agentúra na podporu výskumu a vývoja pod číslom projektu APVV-0416-10 a APVV-0665-10.

LC/MS METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS OF ANTHOCYANIN DYES

LUKÁŠ KUČERA*, **ONDŘEJ KURKA,**
and PETR BEDNÁŘ

*RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic
lukaskucera@volny.cz*

Anthocyanins are water soluble pigments belonging to the group of flavonoids. Those compounds are responsible for color of plant tissues. Anthocyanins are considered as natural and safe food colorants with many positive effects on human health¹. The stability of anthocyanins is strongly influenced by many factors such as pH, temperature, concentration, presence of oxygen or enzymes, irradiation, etc.². Quality of food with respect to anthocyanins is therefore sensitive to insufficient change of technology or storage conditions. During degradation of anthocyanins a cleavage of sugar moiety and formation of phenolic acids (i.e. protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic, syringic, vanillic and gallic acid depending on B-ring substitution) and phloroglucinaldehyde is commonly described to occur³. Those compounds can be therefore used as potential markers of food quality (e.g. controlling of winemaking technology and/or wine storage). However, such application requires a minute knowledge of degradation products profile. The aim of the contribution is to investigate the processes of anthocyanin degradation in detail by means of combination of liquid chromatography with high resolution tandem mass spectrometry.

First part of the study involved development of HPLC method with UV/VIS detection. Separation selectivity and efficiency towards standard mixture of six commercially available phenolic acids and phloroglucinaldehyde was tested on three chromatographic reversed-phase columns – one fully porous column Gemini C18 and two core-shell columns Kinetex C18 and Ascentis Express C18. The best results described by resolution of critical pairs and COF function⁴ were achieved using core-shell column Ascentis Express C18. This column was used for consequent experiments.

Then, optimized LC system was hyphenated with mass spectrometer (Acquity UPLC/Q-TOF Premier, Waters, Milford, USA) and used for study of degradation of cyanidin chloride, malvidin-3-galactoside and phloroglucinaldehyde. Very fast decomposition was observed when the model solutions was heated (i.e. $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 1.0$; 3.5 or 7.0) In one hour anthocyanins completely disappeared and significant increase of phenolic acids (syringic in solution of malvidin-3-galactoside and protocatechuic in solution of cyanidin) was observed. Surprisingly phloroglucinaldehyde was not observed at all. When a solution of phloroglucinaldehyde standard was heated, a very fast decomposition was observed as well (in one hour decrease on 11.3 % of total amount, calculated from peak areas). From those experiments we can conclude that concentration of phenolic acids is potentially utilizable parameter describing the anthocyanin decomposition. On the other hand stability of phloroglucinaldehyde is not sufficient for such purpose at least at heated solutions (used for instance during a “hot maceration“ involved in some wine-making processes). Identification of products of phloroglucinaldehyde decomposition and study of real wine degradation is now in progress.

Authors thank to the Grant Agency of Czech Republic (GAČR P206/10/0625), Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operational Program Research and Development for Innovations – European Social Fund) and Palacky University (project No.: PrF_2012_020) for financial support.

REFERENCES

1. Gris E. F., Ferreira E. A., Falcao L. D., Bordignon-Luiz M. T.: *Food Chem.* 100, 1289 (2007).
2. Castaneda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M. D., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A.: *Food Chem.* 113, 859 (2009).
3. Sadilova E., Stintzing F. C., Carle R.: *J. Food Sci.* 71, C504 (2006).
4. Churáček J., et. al. *Analytická separace látek*, SNTL, Praha 1990.

COMPARISON OF PROCEDURES FOR EXTRACTION OF SACCHARIDES FROM WHEAT FLOUR – ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION VS. SONICATION AND ORBITAL SHAKER

ELENA BELAJOVÁ, KRISTÍNA KUKUROVÁ*, and ZUZANA CIESAROVÁ

Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovakia
kukurova@vup.sk

Introduction

Wheat flour is a rich source of saccharides. It contains 65–74 % of starch and up to 3.5 % of simple saccharides (fructose, glucose, sucrose and maltose)¹. Depending on flour type, protein content ranges from 7 to 13 %. Other constituents such as water, fibre, fat, minerals and vitamins complement the composition of wheat flour.

For analytical purposes of saccharides determination, several procedures have been used to isolate extractable saccharides from flours using water and various water-ethanol mixtures^{2–4}, which are frequently assisted by temperature. Crude flour extracts usually need to be cleaned up due to some amount of present soluble protein and other natural flour components. Deproteinization of such extracts has been achieved by chemical precipitation with Carrez I and II solutions^{4,5}, perchloric acid⁶, or trichloroacetic acid². According to some published information sample clean-up has been applied on crude extracts from flour, dried bakery products and dough by SPE cartridge with reversed phase RP18^{3,7} or by thin layer chromatography on silica gel plates².

Accelerated solvent extraction (ASE) is an automated technique using solvents for extraction under increased pressure and temperature conditions. A big advantage of ASE technique is a short time, less labour and saving solvents in comparison to other common extraction techniques. Up to now, ASE technique has been applied in extraction of different plant and food materials, information on extraction of flour matrix have not yet been revealed.

The aim of this preliminary study was to adjust an experimental ASE technique for extraction of soluble mono- and disaccharides from wheat flour and compare the efficiency of this method with some classic isolation procedures. Detection and quantitative determination of saccharides were performed using a high performance liquid chromatography with use of amino-bounded stationary phase and refractive index detection (RID).

Experimental

Chemicals, materials and samples

All used chemicals and solvents were of analytical and HPLC purity grade – fructose, glucose, sucrose, xylose, acetonitrile isocratic grade, ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and maltose (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Potassium hexaferrocyanate and zinc sulphate p.a. (Slavus Bratislava, Slovakia) were used for preparation of Carrez I and II solution. Water was processed in Rodem 6 purification device (Ecotest Zemnė, Slovakia). A syringe micro – filters with 0.45 μm pore size and cellulose membrane from Agilent (Germany) were used for micro-filtration. Diatomaceous earth – ASE Prep DE from Dionex was used as a dispersing agent in ASE procedure.

Aqueous standard solutions containing fructose (0.0125–10 g l^{-1}), glucose (0.025–10 g l^{-1}), sucrose (0.0125–10 g l^{-1}) and maltose (0.025–10 g l^{-1}) were used for external calibration. Xylose (aqueous solution 1 g l^{-1}) was used as an internal standard (IS) and it was added to the sample prior to extraction in a constant volume.

Finely, milled white wheat flour Špeciál 00 Extra, type 530 (Castello), was used throughout the experiments.

Accelerated solvent extraction procedure

ASE procedure was performed with Dionex ASE 350 instrument (Sunnyvale, CA, USA). 5 g of flour was mixed with a dispersing agent and loaded in a 34 ml stainless-steel extraction cell. The cell was placed in the cell tray and the extraction cycle started as follows: the cell was loaded into tempered oven and filled with an extraction solvent of ethanol:water, 60:40, v/v under pressure. Once the pressure 1500 psi (10.34 MPa) was reached the cell was heated to 60 °C during 5 min. After thermal equilibration a static extraction was accomplished within 5 min. Then, the cell was rinsed with fresh extraction solvent (the solvent volume was adequate to 60 % of the extraction cell volume) and the extract was purged out of the cell with nitrogen (for 100 seconds) into a collection glass bottle. The extraction was performed in three cycles maximally and the obtained extracts from each cycle were sampled and treated separately.

0.5 ml of 15% Carrez I and 0.5 ml of 30% Carrez II solution were added to the supernatant in a centrifugation tube, each tube was shortly shaken, left for 5 min to precipitate present proteins and centrifuged in MLW T52.1 centrifuge (VEB MLW Zentrifugenbau, Engelsdorf, Germany) at $1,957 \times g$ for 10 min. Protein precipitation step was repeated again. In next step an extract was evaporated in a vacuum evaporator to dryness at water bath tempera-

ture 50 °C, a residue was dissolved in 1 ml of mobile phase by ultrasonic bath assistance and filtered through a micro-filter before HPLC analysis.

Comparing extraction procedures

Ultra-sonication: 5 g of flour was dispersed in 40 ml of extraction mixture in an Erlenmeyer flask and inserted in ultrasonic bath K-5.E with a programmable temperature (Kraintek, Podhájska, Slovakia) for 20 min. Extraction was carried out at ambient temperature and 60 °C.

Orbital shaker: 5 g of flour was dispersed in 40 ml of extraction mixture in an Erlenmeyer flask which was placed in the orbital shaker OS-20 (Boechel & co., Scientific Equipment Hamburg, Germany). The mixture was shaken for 20 min at the velocity level 200. The extraction was performed in one step.

For both methods, further treatment of the sample is described in ASE procedure.

HPLC analysis

For determination of saccharides in flour a high performance liquid chromatography HPLC-RID method was used, previously validated for quantification of separate saccharides present in liquid matrices.

A HPLC system Agilent Technologies 1100 Series equipped with RID, quaternary pump, degasser, column thermostat and autosampler (Agilent, Waldbronn, Germany) was used. The separation of saccharides was carried out on a Kromasil 100-5NH₂ column, 250 × 4.6 mm i.d. (EKA Chemicals AB, Bohus, Sweden) at 30 °C. The RID optical unit was tempered at 40 °C. Isocratic elution was performed with acetonitrile:water, 75:25 (v/v) at the flow rate 1.0 ml min⁻¹. Samples were injected in 20 µl volume.

Individual saccharides were identified by retention times and quantified *via* calibration curve designed by external calibration, with respect to pre-concentration of the sample. Extraction process was checked by constant addition of the internal standard solution (D-xylose, 1 g l⁻¹).

Results and discussion

For optimization of ASE method particular parameters such as extraction temperature (50, 60, 70 °C), portion of ethanol in water (40 % and 60 %) and number of extraction cycles (up to 3) were tested.

It was observed that the efficacy of extraction was increased by temperature. On the other hand, at the temperature above 60 °C starch gelatinization, protein denaturation and inactivation of alpha amylase can be induced⁸. Therefore this temperature was considered as a limit for ASE procedure.

Based on preliminary results, the extraction solvent ethanol:water, 60:40, v/v and temperature 60 °C were chosen. At these conditions, a volumetric yield of extracts was examined after one extraction cycle (i.e. 36.0 ± 3.6 ml of the initial fresh solvent volume of 40 ml). A partial gelati-

nization of starch normally occurs in wheat flour at about 60 °C (ref.⁹), accordingly a small portion of water from extraction solvent might have been presumably consumed by starch swelling. Further consequence of ASE procedure was a presence of proteins in extract, likely water soluble albumins and partially gliadins that are native constituents of wheat flour. For this reason extracts were hard to evaporate under vacuum because of excessive foaming. The application of Carrez solutions for clarification led to an extract with few residual proteins, but on the other hand, with an increased salt content. Therefore an optimal addition of Carrez I and II solution was investigated in order to facilitate next extract processing. The impact of Carrez solution addition in various volumes and precipitation steps is illustrated for glucose yield in Fig. 1. Salts from Carrez solutions were precipitated from extract at final operation and removed by micro-filtration.

Application of three cycles in ASE procedure showed higher extraction completeness for all saccharides, checked by an internal standard (IS) recovery. The choice of D-xylose as IS was conditioned by its good solubility in both water and ethanol. In the first, second and third extraction cycle the recovery of IS was 52±4 %, 22±2 % and 12±5 %, respectively. The peak of IS was recognized from slightly interfering matrix compound as depicted in Fig. 2. The extracts were cleared sufficiently for simpler quantification of saccharides.

For assessment of ASE efficiency, several techniques commonly used in extraction of various saccharides were compared to ASE, i.e. extraction by ultra-sonication and shaking. In the first one, ASE temperature condition was simulated by heating a water bath of the ultrasonic device. In contrast to ASE technique, only one-step extraction was carried out in comparing procedures. All extraction techniques comprised coincident sample batch ($n = 4$). In ANOVA statistical assessment the significance between mean values of individual saccharides was set at $P < 0.05$ (95 % confidence level). The results of the comparative

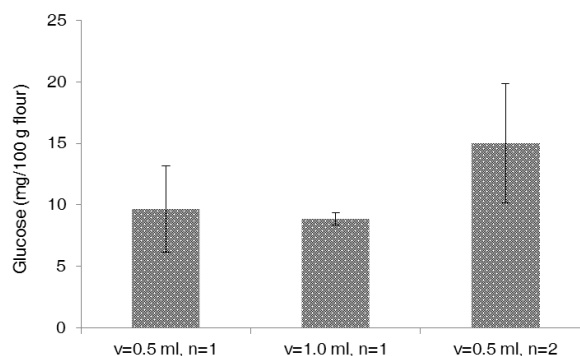


Fig. 1. Impact of clarification procedure by Carrez solutions on glucose yield after one cycle ASE with 60 % aqueous ethanolic solution (variables: v – volume of each Carrez solution I and II; n – number of extraction steps)

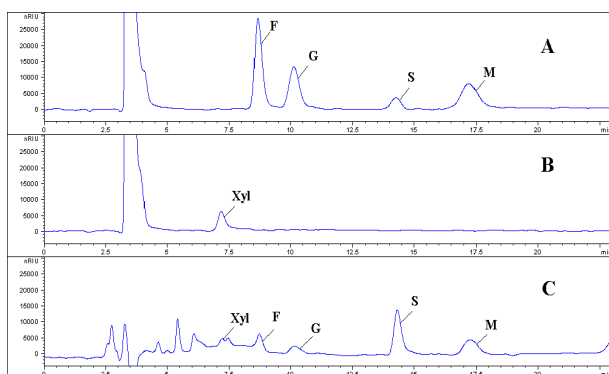


Fig. 2. HPLC-RID records of saccharides: F – fructose, G – glucose, S – sucrose, M – maltose and Xyl – xylose; A – standard solution of saccharides, 1 g l^{-1} ; B – internal standard solution, 1 g l^{-1} ; C – sample of flour, extract after the first cycle of ASE with ethanol:water, 60:40, v/v at 60°C

examinations are summarized in Fig. 3 that demonstrate different quantitative composition of saccharides in extracts.

It is evident that ASE technique can compete successfully with other extraction procedures. Regarding the reproducibility of ASE method the relative standard deviations (RSD) obtained by this technique were proportional

to those obtained by comparing techniques, even a bit better (the highest RSD 19.9 % was calculated for fructose in ASE). The dispersion ranged from 11.4 to 13.8 % for glucose, sucrose and maltose whereas maximum RSD 22.8 % was acquired for comparing techniques. The yield of fructose and maltose was not significantly different ($P > 0.05$) using any extraction procedure tested. Extraction *via* ultrasonication with bath warming led to significantly lower yields of sucrose ($P < 0.002998$). Anomalous results were achieved for glucose (Fig. 3B) which was significantly low ($P < 0.04793$ – 0.020013) when any of comparing procedures was applied.

Conclusion

This study performs the initial investigation focused on determination of content of soluble saccharides in flour that represent significant precursors of acrylamide formation in the process of Maillard reaction in baked cereal products such as biscuits or bread. The main target of presented part of the research was to use ASE technique, as a modern promising method, for isolation of soluble saccharides from flour for further HPLC-RID determination.

ASE extraction method was optimized and compared with other commonly used extraction procedures using ultra sonication and orbital shaker. ASE method proved out

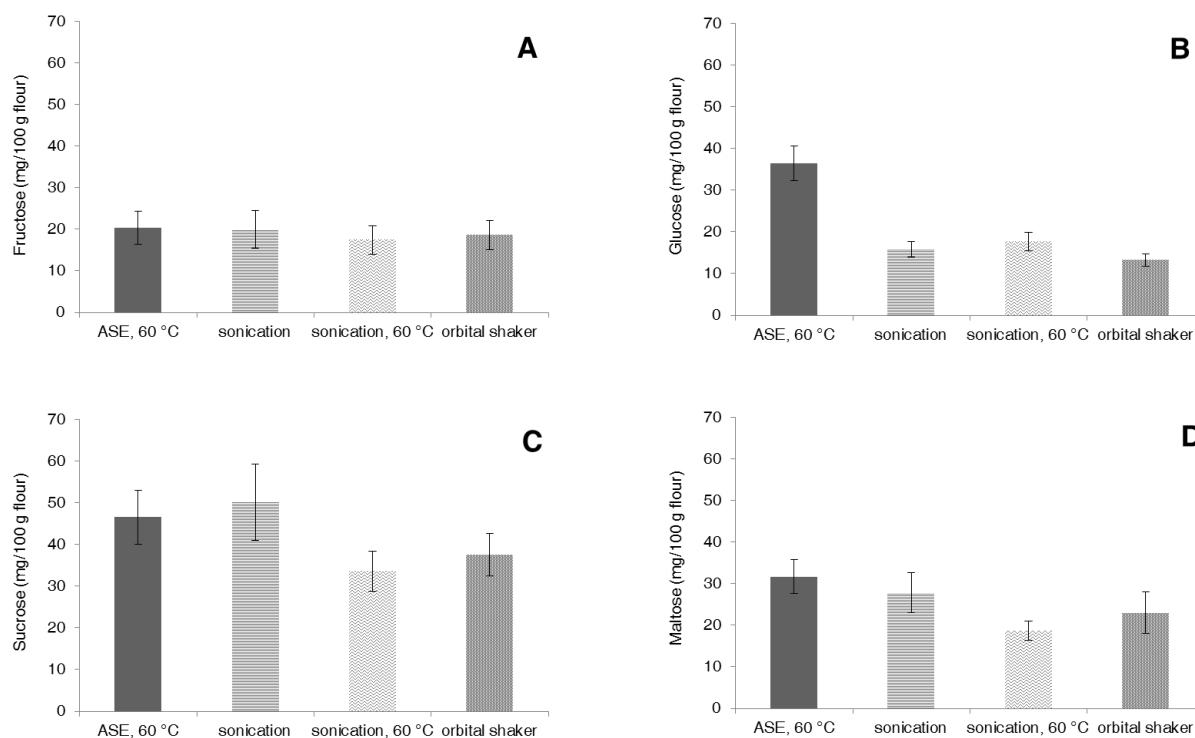


Fig. 3. Impact of extraction procedure (ASE, ultra-sonication at laboratory temperature, ultra-sonication with heating of water bath at 60°C , orbital shaker at laboratory temperature) on individual saccharides yield (A – fructose, B – glucose, C – sucrose, D – maltose)

to have the highest yield, especially for glucose, nevertheless all tested extraction procedures are acceptable for extraction of soluble saccharides from flour with comparable efficacies.

It has to be mentioned that flour is not so suitable food matrix for ASE technique due to high content of starch and protein which results in a turbidity of supernatant. For this reason the final clarification of extracts using Carrez solutions with two-step addition is highly recommended.

This contribution is the result of the project implementation The Centre of Excellence for Contaminants and Microorganisms in foods "supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

REFERENCES

1. Marques C. D., Auria L., Cani P. D., Baccelli Ch., Rozenberg R., Ruibal-Mendieta N. L., Petitjean G., Delacroix D. L., Quetin-Leclercq J., Habib-Jiwan J. L., Meurens M., Delzenne M.: *Food Chem.* 100, 1265 (2007).
2. Cegla G. F., Bell K. R.: *JAOCS* 54, 150 (1976).
3. Langemeier J. M., Rogers D. E.: *Cereal Chem.* 72, 349 (1995).
4. Ameer L. A., Mathieu O., Lalanne V., Trystram G., Birlouez-Aragon I.: *Food Chem.* 101, 1407 (2007).
5. Lefebvre D., Gabriel V., Vayssier Y., Fontagne-Faucher C.: *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 35, 407 (2002).
6. Bervas E.: *Ph.D. Thesis*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France 1991.
7. AOAC Official Method 982.14: AOAC Int. 16th ed. (1997).
8. Schlauri M.: *Getreide Mehl Brot* 53, 308 (1999).
9. Mettler Toledo Collected Application of TA: Food, Swerzenbach, Switzerland 1998.

ANALÝZA AROMATICKÝCH LÁTOK VO VÍNE POMOCOU HS-SPMCE-GC-MS

JANA LAKATOŠOVÁ*^{a,b}, MARTIN SÁK^a, IVANA DOKUPILOVÁ^{a,b} a TIBOR JAKUBÍK^b

^a Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky Bratislava, CVRV Piešťany, Matúšková 25, 831 01 Bratislava, ^b Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
xlakatosova@is.stuba.sk, lakatosova@vurv.sk

Abstrakt

Práca je zameraná na stanovenie prchavých aromatických zlúčenín úpravou injektora plynového chromatografu s hmotnostnospektrometrickým detektorom, pre použitie mikroextrakcie na tuhú fázu v mikrokolóne (SPMCE). Optimalizácia metódy umožnila stanoviť viac senzoricky aktívnych metabolitov jednou analýzou vín, v porovnaní s výsledkami pred úpravou prístroja.

Úvod

Najpoužívanejšími metódami na meranie prchavých zlúčenín vo fermentovaných nápojoch sú plynová chromatografia (GC) a plynová chromatografia s hmotnostnospektrometrickým detektorom (GC-MS). Priamy nástrek fermentovaných nápojov nie je vhodný na kvantitatívnu analýzu vzoriek, pretože obsahuje veľké množstvo neprchavých zlúčenín, ktoré môžu znehodnotiť kolónu. Metódou headspace (HS) sú odoberané len prchavé zlúčeniny, čo je výhodnejšie ako priame dávkovanie, nevýhodou je nižšia citlivosť. Bolo preskúmaných niekoľko extrakčných metód, ktoré možno použiť na prípravu vzoriek pred meraním prchavých látok. Z nich sú najvhodnejšie mikroextrakcia na tuhú fázu (SPME), mikroextrakcia jednotlivých kvapiek (SDME)¹ a mikroextrakcia na tuhú fázu v mikrokolóne (SPMCE). Tieto extrakčné metódy sa dajú kombinovať s headspace technikami.

Metódu SPME navrhol v polovici 90. rokov Janusz Pawliszyn na Univerzite of Waterloo Ontario, Kanada. Jedná sa o veľmi jednoduchú a účinnú adsorpčno-desorpčnú techniku zakoncentrovania analytu, určenú na analýzu organických látok znečisťujúcich životné prostredie, vonných alebo chuťových látok a pod. Voľbou vhodného typu vlákna možno dosiahnuť reprodukovateľnosť výsledkov aj pre nízke koncentrácie analytov. SPME je perspektívna metóda najmä na analýzu prchavých nepolárnych látok vo vodách, vodných roztokoch, vzduchu, pôdy, kalu, piesku, výfukových plynov, kondenzátu cigaretového

dymu a pod². Meraním pomocou SPME sú analyty zo vzorky adsorbované na polymérne vlákno. Následne sa tepelne desorbujú v dávkovacom priestore GC a nosným plynom sa vedú do kolóny. Súčasne tak možno merať rôzne typy alkoholov, esterov ako aj uhľovodíkov. Je to rýchla, citlivá a bezrozpušťadlová metóda. SDME metóda je jednoduchá a lacnejšia v porovnaní so SPME^{3,4}.

Mikroextrakcia na tuhú fázu je výhodná na zachytenie vysoko prchavých zlúčenín⁵. Je to bezrozpušťadlová metóda, s reprodukovateľnými výsledkami. Pri tejto technike sa známy objem vzorky nadávkuje do mikrokolóny naplnenou adsorbentom. Naadsorbované analyty z mikrokolóny sa tepelne desorbujú do dávkovacieho priestoru a prúdom nosného plynu sa pretlačia na kapilárnu kolónu a analyzujú⁶. Počas analýzy zostáva mikrokolóna v dávkovacom systéme GC a je čistená prúdom nosného plynu. Dodatočné kondicionovanie adsorbenta medzi dvomi meraniami⁵ nie je potrebné.

Použitie mikrokolóny vyžaduje úpravu GC dávkovacieho systému⁷, ktorý je znázornený na obr. 1 a je lacnejšou alternatívou termálnej desorpčnej jednotky. Upravený dávkovací systém je možné vrátiť do pôvodného stavu split/splitless behom niekoľkých minút⁵.

Kapilárna kolóna vyčnieva z dna jamky, do ktorej je vsunutá mikrokolóna, pričom plynovochromatická kolóna siaha 1–2 mm do mikrokolóny. Spoj medzi septom a mikrokolónou je plynotesný avšak nie mechanicky pevný, čo umožňuje jej vytiahnutie po skončení analýzy. Výhodou tohto usporiadania je vyradenie mŕtveho objemu pôvodného dávkovacieho priestoru z chromatografického systému. Súčasným dávkovacím priestorom je vlastne mikrokolóna, čo sa prejavuje potlačením rozmývania píkov na chromatogramoch. V skutočnosti ide o priame dávkovanie na kolónu⁶. Mikrokolónu je možné použiť na veľké množstvo analýz s minimálnym vplyvom na jej adsorpčnú účinnosť⁵.



Obr. 1. Mikrokolóna naplnená adsorbentom a časť upraveného dávkovacieho systému⁷

Ďalšou možnosťou ako zabrániť zriedňovaniu vzorky nosným plynom je znižovanie jeho prietoku počas desorpcie. Preto je chromatografický proces rozdelený na dve časti, a to na časť desorpcie pri nízkom prietoku a na časť chromatografickej separácie pri zvýšenom, optimálnom prietoku. Experimentálne bol zistený optimálny prietok pri desorpcii 5–10 kPa (cit.^{6–12}).

Na rozmývanie píkov pôsobí aj doba desorpcie, čím je dlhšia, tým viac sa uplatňuje pozdĺžna difúzia. Doba desorpcie, okrem už spomínaných parametrov, závisí aj od veľkosti povrchu adsorbenta. Pre najuniverzálnejší adsorbent Tenax sú postačujúcou dobou desorpcie len 2 min (cit.⁹). Kráľovičová a kol.¹³ použili SPMCE metódu na meranie emisie kože. Použili 15 mg Tenaxu o zrnitosti 60 až 80 mesh a plynovou chromatografiou s FID detektorom namerali acetón, metylizopropylketón a izopropylbenzén, ktoré sú hlavnými zložkami spracovanej kože. Hrivňák a kol.¹⁴ použili SPMCE metódu na stanovenie prchavých zlúčenín vo víne, od acetaldehydu po 2-fenyletanol. Na stanovenie prchavých organických zlúčenín použili len 2,5 mg Tenaxu. Veľmi dobré výsledky stanovovania aromatických látok pomocou mikrokolóny dosiahol Hrivňák a kol.^{15,16} aj pri analýze piva.

Za predpokladu, že mŕtvny objem mikrokolóny je kompatibilný s mŕtvym objemom kolóny, stáva sa mikrokolóna s adsorbentom prakticky časťou kapilárnej kolóny, čo sa prejavuje možnosťou plného využitia účinnosti kapilárnej kolóny. V týchto prípadoch je možné použiť aj menšie priemery kolón s tenkými filmami stacionárnej fázy⁶.

Metóda SPMCE možno použiť na stanovenie prchavých organických zlúčenín nachádzajúcich sa nielen v pive. Hrivňák a kol.⁵ vo svojej práci použili metódu headspace SPMCE na prípravu vzoriek z papiera pre stanovenie prchavých látok pomocou plynovej chromatografie (GC) s hmotnostnospektrometrickým detektorom (MS). Vďaka tejto príprave vzoriek sa im podarilo identifikovať 21 prchavých organických zlúčenín z papiera jednou analýzou. Uvedenou metódou boli úspešne analyzované BTEX (benzén, toluén, etylbenzén a xylény) v plynných a vodných vzorkách^{6,17}.

Experimentálna časť

Do 500ml Erlenmeyerovej banky sa nalialo 100 ml vzorky vína (riedenej 50- a 100krát) a pridalo 20 g NaCl. Po 1 minútovom pretrepávaní uzavretej banky, bolo odobraných 10 ml (2–3 ml min⁻¹) zo vzduchu nad hladinou kvapaliny sklenenou injekčnou striekačkou priamo do mikrokolóny s adsorbentom Tenax TA (2,5 mg, zrnitosť 60–80 mesh, Alltech, Deerfield, IL, USA).

Mikrokolóna bola vložená do upraveného dávkovacieho systému prístroja GC-MS 2010 (úprava Ing. Hrivňák), ktorý bol vyhriaty na 220 °C. Počas 1 minútovú desorpcie v *split* móde (1:30) bola teplota kolóny 40 °C a tlak 10 kPa, potom teplotný gradient 5 °C min⁻¹ do 200 °C a tlak sa zvýšil na 60 kPa v priebehu 1 min. Konečná teplota kolóny bola udržiavaná ešte ďalších 6 min. Použitá chromatografická kolóna bola VF-WAXms 30 m * 0,25

mm * 0,25 μm (Varian, Lake Forest, CA, USA) a nosný plyn hélium. Energia ionizujúcich elektrónov – 70 eV a teplota iónového zdroja – 200 °C. Rozsah skenovaných hmotností *m/z* bol od 50 do 350.

Arómagramy boli merané programom fy. Shimadzu a všetky vzorky boli analyzované dvakrát. Chyba merania bola ≥ 5 %. Zlúčeniny nameraných hmotnostných spektier boli identifikované porovnaním so spektrami v knižnici NIST a v nižšie uvedených prípadoch potvrdené kvantitatívnym vyhodnotením štandardov.

Na potvrdenie identifikácie niektorých píkov sa použili tieto štandardy; izobutylacetát (Chem Service), etylbutyrát (Fluka), butylacetát (Z. D. Chemipan), butanol (Z. D. Chemipan), izoamylacetát (Merck), amylacetát (Merck), etylhexanoát (Merck), etyldekanoát (Merck), hexylacetát (Fluka), etylloktanoát (Merck), hexanol (Fluka), heptanol (Fluka). Kvantitatívne vyhodnotenie odmeraných štandardov bolo pomocou modelových vzoriek, z ktorých sa zostrojila kalibračná krivka.

Výsledky a diskusia

Dávkovací systém plynovej chromatografie s MS detektorom bol upravený podľa obr. 2. Upravený dávkovací systém zabezpečuje tesnosť systému, preto sa po vložení mikrokolóny do systému dosiahne prednastavený tlak už za pár sekúnd a môže byť spustená analýza.

Pre prítomnosť vysokých koncentrácií aromatických významných látok boli vzorky vín riedené 50krát a kvôli vysokému obsahu 3-metylbutanolu 100krát. Chromatogram aromatických zložiek vín analyzovaných podľa vyššie uvedených podmienok (viď Experimentálna časť) je znázornený na obr. 3. Identifikovali sa zlúčeniny 16 píkov za pomoci knižnice NIST, čo znázorňuje tab. I. Z toho 10 píkov bolo potvrdených analýzou štandardov za rovnakých podmienok. Kvantitatívne stanovenie zlúčenín vo vzorkách vín bola uskutočnená pomocou 5 bodovej kalibračnej krivky a výsledky sú zaznamenané v tab. I. Butylacetát a amylacetát neboli detegované v bulharských odrodových vínach, 2010.



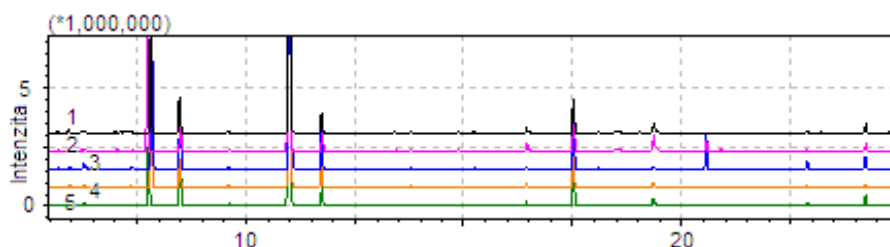
Obr. 2. Upravený injektor GC-MS pre použitie SPMCE metódy

Tabuľka I

Identifikácia zlúčenín pomocou knižnice NIST, koncentrácia niektorých identifikovaných zlúčenín, ich retenčné časy, plocha a výška pík v analyzovanom bulharskom odrodovom víne Muškát Ottonel, Bulharsko, ročník 2010

Retenčný čas [min]	Plocha píku	Výška píku	Identifikácia pomocou NIST [zhoda]	Koncentrácia [$\mu\text{l l}^{-1}$]
5,696	848325	340038	izobutylacetát 95%	0,11
6,257	2450926	955964	etylbutyrát 96%	0,33
6,323	1191253	449296	1-propanol 80%	–
6,632	161219	77994	etyl, 2-metylbutyrát 81%	–
7,013	278753	124927	etylizovalerát 80%	–
7,835	34522794	13025811	izobutanol 96%	–
8,485	23618327	8114381	izoamylacetát 98%	1,70
9,222	114267	55840	1-butanol 92%	0,98
11,014	79009816	26322827	izoamylalkohol 95% *	–
11,732	19160256	7195181	etylhexanoát 98%	1,21
12,894	241178	110757	hexylacetát 88%	0,02
15,225	362570	148629	1-hexanol 92%	0,95
17,516	33086467	12195566	etyloktanoát 97%	2,08
18,087	670359	214312	1-heptanol 91%	0,69
20,555	8607591	3215326	linalool 95%	–
22,880	5930804	2183122	etyldekanoát 95%	0,99

* Informácie dosiahnuté pri riedení vzorky 100krát



Obr. 3. Chromatogram aromatických látok stanovovaných v bulharských odrodových vínach, ročník 2010; 1 – Dimyat, 2 – Muškát Vrachansky, 3 – Muškát Ottonel, 4 – Rizling, 5 – Chardonnay

S pribúdajúcim množstvom vykonaných analýz nedochádzalo k zhoršovaniu odozvy jednotlivých pík. Metóda je jednoduchá a rýchla na prípravu vzorky, čo ju uprednostňuje pred použitím extrakcie aromatických látok do organického rozpúšťadla, ale aj pred SPME technikou.

Práca bola financovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja, projekt číslo APVV 550-07 a SK-BG-0012-08.

LITERATÚRA

1. Kobayashi M., Shimizu H., Shioya S.: J. Biosci. Bioeng. 106, 317 (2008).
2. <http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPME.pdf>, 02.03.2012
3. Pinho O., Ferreira I., Santos L.: J. Chromatogr., A 1121, 145 (2006).

4. Veselý P., Lusk L., Basarova G., Seabrooks J., Ryder D.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 6941 (2003).
5. Hrivňák J., Tölgyessy P., Fígedyová S., Katuščák S.: *Talanta* 80, 400 (2009).
6. Hrivňák J., Kráľovičová E.: *Chem. Listy* 104, 119 (2010).
7. Kružlicová D., Mocák J., Hrivňák J.: *J. Food Nutr. Res.* 47, 37 (2008).
8. Hrivňák J., Kráľovičová E., Tölgyessy P.: *Petrol. Coal* 50, 10 (2008).
9. Kráľovičová E., Hrivňák J., Tölgyessy P.: *Petrol. Coal* 48, 61 (2006).
10. Tölgyessy P., Hrivňák J., Šilhárová K.: *Petrol. Coal* 46, 88 (2004).
11. Tölgyessy P., Hrivňák J.: *J. Chromatogr., A* 1127, 295 (2006).
12. Tölgyessy P., Vrana B., Hrivňák J.: *Chromatographia* 66, 815 (2007).
13. Kráľovičová E., Lakatošová J., Hrivňák J.: *Chem. Listy* 104, 609 (2010).
14. Hrivňák J., Lakatošová J., Repka V., Jaroslava Kaňuchová Pátková: *Chem. Listy* 104, 611 (2010).
15. Hrivňák J., Šmogrovičová D., Lakatošová J., Nádaský P.: *J. Inst. Brew.* 116, 167 (2010).
16. Hrivňák J., Šmogrovičová D., Nádaský P., Lakatošová J.: *Talanta* 83, 294 (2010).
17. Lakatošová J., Šmogrovičová D.: *Diplomová práca*, Slovenská technická univerzita, Bratislava 2010.

ANALYSIS OF SPIRIT AROMA COMPOUNDS BY HEAD-SPACE SOLID-PHASE MICROCOLUMN EXTRACTION

JANA LAKATOŠOVÁ*, LENKA
PRIESOLOVÁ, MILAN TERNENI,
DUŠAN BACHÁR, and DANIELA
ŠMOGROVIČOVÁ

*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of
Chemical and Food Technology, Radlinského 9, 812 37
Bratislava, Slovakia
xlakatosova@is.stuba.sk, daniela.smogrovicova@stuba.sk*

Abstract

Headspace method for analysis of spectrum spirit aroma compounds (from methyl acetate to octanol) using microcolumn filled with 2.5 mg of Tenax TA (60–80 mesh) was presented. In this study aromatic profile of Slovak distilled spirit was measured by headspace solid-phase microcolumn extraction gas chromatography with flame ionization detector.

Introduction

Both gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry are widely used for measuring concentration of volatile compound in beverages. Direct injection is not suitable for the quantitative analysis of beverages samples because they contain large amounts of non-volatile compounds that may damage the column. Although the headspace sampling technique has an advantage over direct injection when only the volatile compounds in the sample can be injected, its sensitivity is low. Three main types of extraction method have been investigated: solid-phase microextraction (SPME), single-drop microextraction (SDME)^{1–3} and solid-phase microcolumn extraction (SPMCE)⁴.

Solid-phase microextraction is a solvent-free extraction method introduced by Pawliszyn and co-workers^{4,5}. However, conventional SPME has some drawbacks such as fibre fragility, and low sorption capacity^{4,6}. In SDME microdroplets is held in a large flowing aqueous phase or above an aqueous sample solution and the analytes in the sample are extracted into the droplet^{1–3}.

Lakatošová et al.⁷ and Kružlicová et al.⁸ quantitatively analysed wines and Hrivňák et al.^{9,10} quantitatively analysed beer by GC using SPMCE performed in a glass microcolumn inserted into the GC inlet. The volatile compounds, creating beverages aroma, were extracted from the headspace into a Tenax microcolumn. The microcolumn was then transferred into a modified GC injection port for thermal desorption and the compounds were released and analyzed.

Material and methods

The distilled spirits were obtained from small distillery in Slovakia. A volume of 100 ml of diluted spirit sample (10times) plus 20 g NaCl was transferred into a 500 ml volumetric flask and the flask was vigorously shaken for 2 min at ambient temperature. Immediately after shaking, an appropriate volume of headspace (10 ml) was taken through the microcolumn using a glass syringe with a glass plunger luer (Poulten and Graf, Wertheim, Germany). The distance between the microcolumn and the surface of the liquid was about 1 cm. The loaded microcolumn, with sorbed volatile compounds, was transferred into the GC inlet at the pressure of 20 kPa of carrier gas and the desorbed compounds were analysed.

Analyses were carried out on Shimadzu GC model 14A, modernized by Hrivňák in 2010. The outlet of the microcolumn afforded a tight connection with the capillary column. The fused silica capillary column DB-FFAP with parameters 60 m * 0,25 mm * 0,25 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) was used. The GC inlet temperature was 230 °C and the detector temperature was 250 °C. The initial column temperature was maintained at 40 °C. Thermal desorption was performed at a pressure of 20 kPa min⁻¹, then the pressure was increased to 60 kPa and the column temperature was programmed at a rate of 3 °C min⁻¹ up to 220 °C and maintained at 220 °C for 5 min. Helium was used as a carrier gas. Analysis of each spirits sample was repeated twice.

A computer program Class-VP 7.2 SP1 (Shimadzu, Columbia, Maryland, USA) was used for data acquisition.

Chemicals

Methyl acetate, ethyl acetate, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, 2-butanol, isobutanol, butyl acetate, amyl acetate, hexyl acetate, ethyl isovalerate, ethyl butyrate, isoamyl acetate were used like inside standards for qualitative interpretation and for created calibration rate.

Results and discussion

Aromatic compounds were analyzed by headspace solid phase microcolumn extraction gas chromatography. There were analyzed alcohols – propanol, butanol, 2-butanol, isobutanol, hexanol, heptanol and octanol, esters – methyl acetate, ethyl acetate, propyl acetate, isobutyl acetate, ethyl butyrate, ethyl isovalerate, butyl acetate, isoamyl acetate, amyl acetate and hexyl acetate. Fig. 1 shows a chromatogram of cherry spirit with aroma compounds which were analysed according to previous conditions.

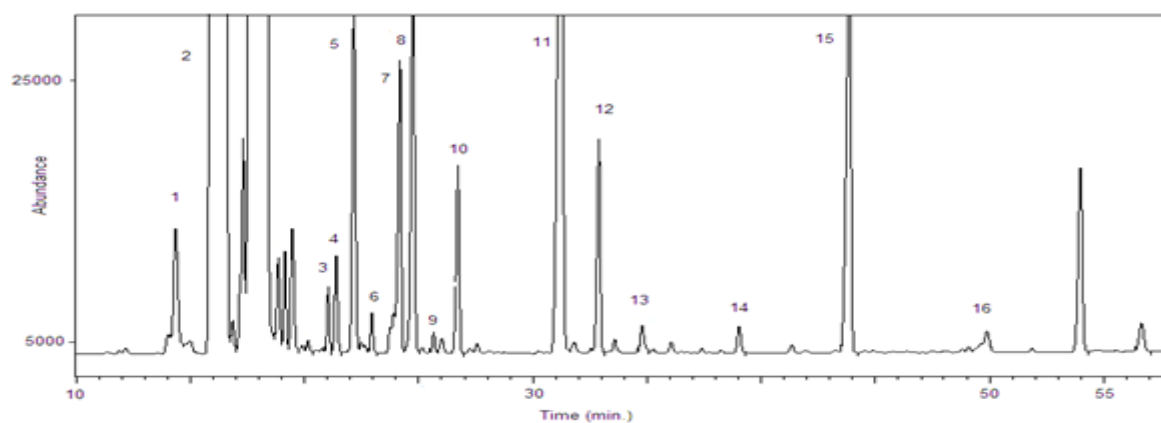


Fig. 1. **Chromatogram of cherry spirit.** Peaks: (1): methyl acetate, (2): ethyl acetate, (3): propanol, (4): 2-butanol, (5): ethyl butyrate, (6): ethyl isovalerate, (7): butyl acetate, (8): butanol, (9): amyl acetate, (10): isobutanol, (11): isoamyl acetate, (12): pentanol, (13): hexyl acetate, (14): hexanol, (15): heptanol, (16): octanol

The identification of peaks was performed by analysing model mixtures which contain pure compounds.

The static headspace was preferred, because in a relatively short time the highest possible concentration of analytes in the gas phase can be obtained. The limiting factor of the amount of an adsorbent in the microcolumn is the breakthrough volume of analytes and the aspirated volume of headspace. 2.5 mg of Tenax TA in the microcolumn was used and worked beyond the breakthrough volume of ethanol. In such condition, the compounds obtaining up to 3–4 carbon atoms are beyond their breakthrough volumes, therefore their peaks are lower and the ethanol peak narrower, but still can be used for analysis⁴.

Advantage of the method is the low dead volume of the microcolumn. The distance between the adsorbent and the head of a column in the inlet is only 10 mm (0.25 mm I.D.). This means that the microcolumn is practically a part of the capillary column and these results in obtaining of non-dispersed peaks even at the beginning of a chromatogram (without cryofocustion or subambient temperatures)⁴.

Conclusion

A simple and inexpensive headspace method for analysis of aroma compounds of spirits was described. Sixteen volatile compounds (from acetaldehyde up to octanol) was analysed by microcolumn filled with 2,5 mg of Tenax TA. The microcolumn was thermally desorbed in the modified inlet of gas chromatograph (Shimadzu A14) during analysis, conditioning was not necessary between two analyses.

This project is co-financed by the Scientific Grant Agency of Ministry of Education of the Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences VEGA (registration number 1/0096/11) and the Slovak Research and Development Agency (APVV - 0550-07). We would like to thank to Ing. Ján Hrivňák, CSc. for technical help.

REFERENCES

1. Kobayashi M., Shimizu H., Shioya S.: *J. Bios. Bioengin.* 106, 317 (2008).
2. Pinho O., Ferreira I., Santos L.: *J. Chromatogr., A* 1121, 145 (2006).
3. Veselý P., Lusk L., Basarova G., Seabrooks J., Ryder D.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 6941 (2003).
4. Hrivňák J., Lakatošová J., Repka V., Kaňuchová Pátková J.: *Chem. Listy* 104 (S), 611 (2010).
5. Arthur C. L., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 62, 2145 (1990).
6. Bigham J., Medlar J., Kabir A., Shende C., Alli A., Malik A.: *Anal. Chem.* 74, 752 (2002).
7. Lakatošová J., Hrivňák J., Kaňuchová Pátková J.: In: *Proceedings (CD), 33rd World Congress of Vine and Wine and 8th General Assembly of the OIV, June 20 – 27 2010, Tbilisi, Georgia.* p. P. II. 45-No 166.
8. Kružlicová D., Mocák J., Durčeková T., Hrivňák J., Pátková J.: In: *Proceedings (CD), 30th World Congress of Vine and Wine and 5th General Assembly of the OIV, 10 -16 June 2007, Budapest, Hungary.* p. S2-Po 19.
9. Hrivňák J., Šmogrovičová D., Lakatošová J., Nádaský P.: *J. Inst. Brew.* 116, 167 (2010).
10. Hrivňák J., Šmogrovičová D., Nádaský P., Lakatošová J.: *Talanta* 83, 294 (2010).

DETERMINATION OF ALCOHOL, SUGAR, AND VOLATILE ACIDS IN WINE BY FTNIR

JARMILA LAŠTINCOVÁ*^a, ĽUBICA POSPÍŠILOVÁ^b, and ERNEST BEINROHR^c

^a Central Controlling and Testing Institute in Agriculture, Matúškova 21, 833 16 Bratislava, Slovakia, ^b Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republik, ^c Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Radlinskeho 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
lastincovaj@uksup.sk

In Slovakia there are 6 wine growing regions (Tokaj, East Slovakia region, South Slovakia region, Middle Slovakia region, Nitriansky region and Small-Carpathian region) where the quality wines with protected designation of origin /PDO/ are produced. The Central Controlling and Testing Institute in Agriculture in Bratislava has an accredited laboratory for testing wine products before introducing them to the market.

A novel method for measuring of some important parameters in wine like sugar, alcohol, and volatile acids by FT/NIR was tested. The calibrations were made for

numerous wines from Slovakian regions. These wines always contain different sugar content depending of region and year of harvest. The southern regions wines are sweeter than northern and therefore the alcohol content could be higher. The content of volatile acids depends on the technological procedure. We determined these three parameters in 359 wine samples which were from vintage year of 2008. All studied parameters were first determined by commonly used standard methods and the results were used to perform calibrations for the same samples by FT/NIR spectroscopy. In the white and red dry wines there were no significant differences between measurement results of alcohol and both methods can be used. We reached correlation coefficient 0.9963 for alcohol in 2 mm cuvetts. The reducing sugars were determined with the correlation coefficient of 0.9983 while volatile acids with the correlation coefficient of 0.9848. Today, Fourier transform infrared spectroscopy in combination with multivariate regression is used as a screening of beverages, which allows us to determine alcohol content in less than 2 minutes.

The work was done with support of the projects MŠMT2B08039 a QH 72039 and QH 81200.

MEDZILABORATÓRNE POROVNÁVACIE SKÚŠKY V AKREDITOVANÝCH SUBJEKTOCH

JARMILA LAŠTINCOVÁ^{a*}, ĽUBICA POSPÍŠILOVÁ^b a ERNEST BEINROHR^c

^a Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky, Odbor vinohradníctva a vinárstva, Matúškova 21, 833 16 Bratislava, Slovensko, ^b Mendelova zemедělská univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, ^c Slovenská technická univerzita v Bratislave, FCHPT, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
Jarmila.Lastincova@uksup.sk

Medzinárodné kruhové testy tzv. „Proficiency tests“ sú výbornou metódou potvrdenia správnosti meraní v akreditovanom laboratóriu. Preto akreditačné orgány vyžadujú k procesu uznania certifikácie resp. akreditácie úspešnosť v medzinárodných testoch spôsobilosti. Programy porovnávacích skúšok medzi jednotlivými akreditovanými laboratóriami sa uskutočňujú na národnej aj medzinárodnej úrovni. Pravidelné nezávislé hodnotenie technickej výkonnosti skúšobného laboratória je vo všeobecnosti odporúčané ako dôležitá pomôcka pre zistenie kvality analytických meraní¹.

V súčasnom období je v záujme Európskej Únie aby všetky laboratória zaoberajúce sa analýzou potravín a nápojov ako víno spĺňali najprísnejšie kritériá vychádzajúce z nariadení EU. Keďže je voľná zóna obchodu v rámci EU víno s chráneným označením pôvodu pred jeho uvedením na trh musí byť riadne preskúšané, zatriedené a certifikované^{2,3}. Naše akreditované pracovisko Skúšobňa vinárska (SV) na Odbore vinohradníctva a vinárstva, ÚKSÚP v Bratislave sa pravidelne zúčastňuje medzilaboratórnych testov spôsobilosti (MTS)⁴.

Cieľom tohto odborného príspevku je zoznámiť čitateľov s výsledkami medzinárodných testov FAPAS v r. 2010 a 2011 (testovací materiál bol distribuovaný medzi účastníkov z 28 krajín sveta) a medzinárodných testov spôsobilosti laboratórií (MTZL) organizovaných Štátnou poľnohospodárskou a potravinárskou inšpekciou (SZPI) v Brne v r. 2010 pre akreditované skúšobné laboratória analýzy vína v ČR a na Slovensku.

Materiál a metóda

Skúšanie vín spočívalo v stanovení parametrov ako sú alkohol, cukry, prchavé kyseliny, celkové kyseliny, SO₂ celkový, alebo iné cudzorodé látky vo vínach. Na stanovenie sme použili klasické metódy schválené Medzinárodnou organizáciou pre vinič a víno (OIV).

Naše akreditované skúšobné laboratórium dostalo vzorku vína na stanovenie od SZPI v ČR, ktorá v r. 2010 pre 33. kolo IX série pripravila 2 rady vzoriek.

Vzorka A – testovaný materiál biele víno bolo odobrané u výrobcu z tanku a stočené do 25 fliaš o objeme 0,75 litra, ktoré boli hermeticky uzavreté. Vzorka B bolo víno odobrané z tanku a fortifikované roztokom etanolu, glukózy a fruktózy a po dôkladnom zhomogenizovaní v bareli bolo stočené do 25 fliaš o objeme 0,75 litra. My sme robili len vzorku A lebo sme nestanovovali glukózu a fruktózu.

Druhý test FAPAS bol organizovaný Centrálnymi laboratóriami v Yorku (Anglicko) a použitý testovaný materiál bolo biele víno v r. 2010 a v r. 2011 bol testovaný materiál pripravený z červeného austrálskeho vína (FAPAS Wine Report 1355, 1360)^{5,6}. Vzorky boli skladované pri teplote +4 °C. Tieto inštitúcie nám zaslali vzorku, ktorá bola už homogenizovaná a bol urobený aj test stability a homogenity^{7,8}.

Výsledky a diskusia

Prehľad výsledkov medzilaboratórnych testov SZPI-Brno z roku 2010 a štatistické spracovanie tohto testu MTZL: Serie IX Klasické metódy zkoušení a serie II. stanovení aditivních látek⁹ bolo dôkladne vyhodnotené. Laboratória SV uspeli v týchto testoch dobre (viď tabuľka I a II). Za uspokojivé sa považujú hodnoty z-skóre od –2 do +2. Za neuspokojivé sa označujú hodnoty z-skóre, ktoré sú mimo intervalu ±2 a za sporné možno považovať hodnoty z-skóre väčšie než 3. Číslo nášho laboratória je vyznačené v príslušnej tabuľke inou farbou. V testovanom materiáli (vzorka A) boli sledované analyty: alkohol, prchavé kyseliny, celkové kyseliny a bezcukorný extrakt. Každému výsledku bolo priradené z-skóre vypočítané zo vzťahu: $z = (x - x_i) / \sigma$, kde x je koncentrácia analytu, x_i je vzťažná hodnota (prijatá referenčná hodnota), určená ako najlepší odhad správnej hodnoty koncentrácie analytu a σ je cieľová hodnota smerodajnej odchýlky pre hodnoty x .

Výsledky a vyhodnotené z-skóre pre jednotlivé laboratória sú v tabuľke I a II a sú uvedené anonymne pod číselným kódom. Zúčastnené laboratória použili rôzne metódy stanovenia. Jedná sa zväčša o metódy analýzy vína podľa nariadenia Komisie EU č. 2676/90 (cit.¹⁰) a podľa metódik O.I.V. Naše laboratórium použilo metódy OIV pre stanovenie relatívnej hustoty – pyknometrické stanovenie, pre stanovenie skutočného alkoholu – pyknometrické stanovenie, pre stanovenie prchavých kyselín titráciu po destilácii, pre bezcukorný extrakt výpočet po odčítaní cukru z celkového extraktu a pre celkové kyseliny titráciu.

Prehľad výsledkov medzinárodných testov v roku 2010 a 2011 na jar (február–marec), ktoré organizoval FAPAS na stanovenie alkoholu, SO₂, celkových kyselín a prchavých kyselín je vyhodnotený v tabuľke III a IV. Tento test je skúškou šikovnosti a kompetentnosti štátnej organizácie s akreditovaným laboratóriom na skúšanie kvality potravín a vína a je v súlade s čl. 12 nariadenie EU

Tabuľka I

MTZL série IX, 33: Klasické metódy skúšania vín, rok 2010

Č. lab.	Alkohol [%]	11,35	Prchavé kyseliny [g l ⁻¹]	0,49	Bezucor-ný extrakt [g l ⁻¹]	25,1	Kyseliny [g l ⁻¹]	7,2
	výsledok	z-skóre	výsledok	z-skóre	výsledok	z-skóre	výsledok	z-skóre
1	11,27	-1,0	0,54	1,8	25,2	0,2	7,0	-0,7
2	11,22	-1,6	0,44	-1,8	25,3	0,4	7,3	0,3
11	11,35	0,0	0,49	0,0	25,0	-0,2	7,1	-0,3
12	11,31	-0,5	0,49	0,0	25,1	0,0	7,1	-0,3
13	11,80	5,5	0,51	0,7	26,6	2,8	7,4	0,7
14	11,36	0,1	0,75	9,1	24,9	-0,4	7,7	1,7
15	11,36	0,1	0,44	-1,8	22,5	-4,8	7,2	0,0
16	11,40	0,6	0,50	0,4	25,3	0,4	7,3	0,3
17	11,34	-0,1	0,44	-1,8	25,0	-0,2	7,1	-0,3

Tabuľka II

MTZL: serie II: Kolo 25: Stanovenie aditívnych látok vo víne, rok 2010

Č. lab.	SO ₂ voľný 36 [mg l ⁻¹]	z-skóre	SO ₂ celkový 245 [mg l ⁻¹]	z-skóre	Kyselina sorbová 149,0 [mg l ⁻¹]	z-skóre
1	30	-1,8	144	-18,9	153	0,4
2	35	-0,3	249	-0,8	–	–
3	42	1,8	243	-0,4	152	0,3
4	28	-2,4	268	4,3	150	0,1
5	41	1,5	252	1,3	147	-0,2
6	38	0,6	227	-3,4	149	0,0
8	37	0,3	235	-1,9	–	–
9	38	0,6	249	0,8	135	-1,3
10	35	-0,3	233	-2,2	–	–
11	36	0,0	243	-0,4	–	–

882/2004 (cit.¹¹) ako aj s ISO 17025:2005 (cit.¹²). Ak účastník testu leží v intervale z-skóre ± 2 jeho výsledky sú štatisticky normálne rozložené. Ak má z-skóre viac ako 2, je šanca 1:20, že výsledky sú akceptovateľné v extrémnej distribúcii a ak je z-skóre väčšie ako 3 je šanca len 1:300 že sú výsledky akceptovateľné. Každý účastník dostal testovací materiál, zúčastnilo sa až 70 laboratórií, stanovená hodnota bola vypočítaná ako konsenzus z výsledkov poskytnutých účastníkmi, vylúčené boli výsledky ktoré boli odchýlené 10, 100, alebo 1000× viac (menej) ako väčšina výsledkov laboratórií a preto tieto boli považované za chybné stanovenia. Keďže merania celko-

vého SO₂ v r. 2011 boli medzi laboratóriami veľmi odlišné, nedala sa stanoviť hodnota väčšiny a tým pádom ani vypočítať z-skóre. Preto u tohto testu vyhodnotili len alkohol (stanovená hodnota 12,13 %), z-skóre menej ako 2 malo 48 laboratórií, celkové kyseliny (stanovená hodnota 5,99 g l⁻¹) a z-skóre malo v norme 35 účastníkov a pre prchavé kyseliny (stanovená hodnota 0,549 g l⁻¹) a v intervale ± 2 bolo 35 laboratórií. Výsledky niektorých účastníkov testu spôsobilosti sú uvedené v tabuľkách a naše výsledky sú vyznačené tučným písmom.

Tabuľka III

Výsledky stanovenia alkoholu, SO₂, celkových kyselín a prchavých kyselín. FAPAS test v roku 2010

Č. lab.	Obsah alkoholu 15,23 [%]	z-skóre	Celkové kyseliny 4,09 [g l ⁻¹]	z-skóre	Celkový SO ₂ 117,5 [mg l ⁻¹]	z-skóre	Prchavé kyseliny 0,226 [g l ⁻¹]	z-skóre
016	7,63	-30	4,19	0,5	107	-1,1	-	-
017	15,12	-0,5	4,07	-0,1	117	-0,1	0,07	-2,1
018	14,70	-2,1	4,10	0,1	152	3,8	1,0	10,4
019	14,90	-1,3	4,06	-0,1	107	-1,1	0,25	0,3
020	15,30	0,3	4,20	0,6	116	-0,2	0,30	1,0
023	15,24	0,0	4,01	-0,4	118	0,1	0,12	-1,4
024	15,20	-0,1	4,01	-0,4	86,4	-3,4	0,312	1,2
026	15,26	0,1	4,00	-0,5	126	0,9	0,22	-0,1
027	14,85	-1,5	4,35	1,4	127,2	1,1	-	-
028	15,3	0,3	-	-	118	0,1	-	-
029	15,10	-0,5	3,99	-0,5	107	-1,1	0,61	5,2
030	15,28	0,2	4,08	0,0	119	0,2	0,08	-2,0

Tabuľka IV

Výsledky stanovenia alkoholu, SO₂, celkových kyselín a prchavých kyselín. FAPAS test v roku 2011

Č. lab.	Obsah alkoholu 12,13 [%]	z-skóre	Celkové kyseliny 5,99 [g l ⁻¹]	z-skóre	Celkový SO ₂ [mg l ⁻¹]	z-skóre	Prchavé kyseliny 0,549 [g l ⁻¹]	z-skóre
018	12,19	0,2	5,97	-0,1	72	-	0,55	0,0
019	11,64	-2,0	5,90	-0,3	54	-	0,59	0,2
021	12,20	0,3	6,35	1,4	46	-	0,49	-0,3
023	12,13	0,0	6,1	0,4	53,1	-	0,61	0,3
024	12,40	1,1	6,40	1,6	46	-	0,57	0,1
027	11,60	-2,1	3,01	-11	102	-	0,34	-1,2
028	12,51	1,5	5,91	-0,3	34	-	0,31	-1,3
029	12,15	0,1	6,40	1,5	72	-	0,67	0,7
030	12,64	2,0	6,26	1,1	56	-	-	-
031	11,20	-3,7	5,90	-0,3	81,2	-	0,65	0,6
032	12,30	0,7	0,58	-20	32,2	-	0,54	0,0

Záver

Z výsledkov vyplýva, že akreditácia každej skúšky je dôležitá. Neakreditované skúšky môžu ľahko sklznúť a spôsobiť systematickú chybu, keďže nie sú pravidelne zapájané do porovnávacích testov. Všetky laboratóriá, ktoré majú z-skóre hodnotu väčšiu ako 2 nevyhoveli a ich výsledky sú neuspokojivé. Následne by preto mali byť prijaté nápravné opatrenia. Naše laboratórium splnilo vo

všetkých parametroch ukazovatele na požadovanej úrovni a výsledky sa nevyvíkajú limitu, takže môžeme konštatovať, že prezentované výsledky sú presné a správne.

Požiadavky na akreditované skúšobné laboratóriá sú vysoké, ale iba tak je možné zabezpečiť, že budú správne vykonané a vyhodnotené všetky špecifické činnosti v oblasti štátneho odborného dozoru a kontroly nielen v SR, ale v rámci celej EU. Znamená to, že zákazník si môže dať zanalyzovať a vyhodnotiť svoju vzorku v akomkoľvek akreditovanom laboratóriu EU. Podľa na-

riadenia Komisie EU sa prevádzajú kontroly a hodnotí sa systém výkonu auditov, ktorý je veľmi dobre prepracovaný najmä v oblasti potravín rastlinného pôvodu.

LITERATÚRA

1. Central Science Laboratory: Proficiency News, Vol. 7., pp. 4, February 2003.
2. Laštincová J.: Certifikácia vína pred uvedením na trh po novom, in: *Zborník konferencie „Zmeny vo vinárskej legislatíve, nové označovanie a pohľady na regionálnu kvalitu vína“*, p. 115-117, Modra 9.-10. marec 2010. ŠVPS, Botanická 17, 842 13 Bratislava.
3. *Zákon o vinohradníctve a vinárstve č. 313/2009 z 30. júna 2009*, www.zbierka.sk.
4. Laštincová J., Kovárová, D.: Medzinárodné porovnávacie testy, Book of Abstracts, *II. Conference of reference materials and interlaboratory comparisons*, pp. 159-160, Medlov, 7.-9. November, 2005, 2theta, Medlov, ČR.
5. Knaggs M.: FAPAS Proficiency Test Wine Report 1355 (2010).
6. Knaggs M.: FAPAS Proficiency Test Wine Report 1360 (2011).
7. Fearn, T. Thompson, M.: *Analyst* 126,1414 (2001).
8. Thompson M., Ellison S. L. R., Wood R.: *Pure Appl. Chem.* 78, 145 (2006).
9. SZPI, Ústřední Inspektorát Brno: *Závěrečná zpráva MTZL II/25 a MTZL IX/33* (2010).
10. Commission Regulation /EEC/ No 2676/1990, determining Community methods for the analysis of wines, *Úradný vestník európskych spoločenstiev (Official Journal) L 272*, (1990).
11. Regulation EC 882/2004 of the Eur.parliament on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law. *Official Journal L 364*, 20/12/2006.
12. EN ISO/IEC 17025: 2005.

VYUŽITIE UV ROZKLADU V PRIETOKOVÝCH ELEKTROCHEMICKÝCH ANALYZÁTOROCH

LUKÁŠ LAUKO* a ERNEST BEINROHR

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
lukas.lauko@centrum.sk*

Je dobre známe, že elektroanalytické metódy, najmä voltametrické techniky, umožňujú rozlišovanie voľných iónov, nestálych kovových iónových komplexov ale aj kovov silne viazaných do komplexov¹. Vo väčšine prípadov sa na stanovenie takýchto kovov využíva anodická rozpúšťacia voltampérometria (ASV). Ak sú kovové ióny viazané do rozpusteného organického materiálu silno je potrebné ešte pred samotným stanovením pomocou ASV použiť nejaký typ rozkladu. Na stanovenie celkového obsahu kovov sa najčastejšie využívajú mokré rozklady.

Hlavnou výhodou UV rozkladov oproti mokrým rozkladom je to, že nevyžadujú veľké prídavky oxidačných činidiel, čo z nich robí čistou metódu na úpravu vzoriek. Okrem toho sú efektívne a pomerne ľahko zabudovateľné do elektrochemického prietokového systému². Kombinácia prietokových techník FIA (prietoková injekčná analýza) a SIA (sekvenčná injekčná analýza) s voltampérometrickými metódami je výhodná z toho dôvodu, že zvyšuje stupeň

automatizácie a priepustnosť vzoriek. Najčastejšie sa používajú rôzne typy pevných pracovných elektród³, ale v praxi nie sú výnimkou ani rozličné ortuťové elektródy. Druhé menované majú síce vyššiu citlivosť a reprodukovateľnosť avšak aj oveľa zložitejšiu konštrukciu meracej cely⁴.

V tejto práci sa použil ako zdroj UV žiarenia UV lampa s výkonom 11 W. Prietokový reaktor bol vyrobený z PTFE hadičiek (d = 1 mm) obtočených okolo lampy zabalený do hliníkovej fólie. Ako oxidačné činidlo sa použil peroxid vodíka, pričom sa autori zamerali hlavne na určenie vhodnej koncentrácie peroxidu a na zistenie času potrebného na dokonalé rozloženie organickej matrice.

Práca bola podporovaná grantovou agentúrou VEGA, č. projektu 1/0419/12.

LITERATÚRA

1. Florence T.M.: *Analyst* 117, 551 (1992).
2. Bott A.W.: *Curr. Sep.* 14, 24 (1995).
3. Abate G., Lichtig J., Masini J. C.: *Talanta* 58, 433 (2002).
4. Fernandez-Bobes C., Fernandez-Abedul M. T., Costa-García A.: *Electroanal.* 10, 701 (1998).

CHERAKTERIZÁCIA LIEHOVÍN AROMATIZOVANÝCH BORIEVKAMI UV-VIS ABSORPČNOU SPEKTROMETRIOU

DIANA MARKECHOVÁ*, PAVEL MÁJEK a JANA SÁDECKÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

diana.markechova@stuba.sk

Úvod

Borievka obyčajná (*Juniperus communis*) je kerovitá až stromovitá drevina z čeľade cyprusovité (*Cupressaceae*). Plody (*Fructus juniperi*) sú čierno-modré, majú silnú arómu a rôzne fyziologické účinky (protizápalový, močopudný, antimikrobiálny), a preto sa využívajú ako koreniny, v arómach, parfumoch, farmaceutických prípravkoch, na aromatizovanie alkoholických nápojov (gin, borovička), vyrába sa z nich aj lekvár. Niektoré druhy sa používali aj na vyvolanie potratu, z čoho pramení ľudové pomenovanie borievky – jalovec.

Zloženie plodov, dreva a ihličia borievok a éterických olejov, ktoré sa z nich pripravujú, závisia od rôznych faktorov ako sú geografická poloha, typ porastu, vek borievky, zloženie pôdy, zrelosť plodov a iné. Plody borievky obsahujú 2–6 % éterických olejov, 10–30 % tukov, 20 % bielkovín, 10 % živice, 5 % trieslovín, sacharidy (glukóza a fruktóza), horké látky (juniperín), kumarín, kyselinu askorbovú, kyselinu mravčiu, kyselinu octovú, kyselinu jablčnú, flavonoidy (flavónové glykozidy), biflavonoidy. Najvýznamnejšie liečivé účinky vykazujú silice – zmes voňavých prchavých látok – zložené hlavne z terpénov a seskviterpénov. Asi 58% obsahu esenciálneho oleja získaného z plodov borievky tvoria monoterpény (α -pinén, sabién, myrcén, β -pinén, limonén, *p*-cymén, terpinén-4-ol) a asi 32 % seskviterpény (germacren- D)¹. Špecifická chuť závisí hlavne od prchavých olejových zlúčenín. Plody borievky obsahujú polyfenoly a flavonoidy, ktoré vykazujú antioxidačnú aktivitu^{2,3}. Celkový obsah polyfenolov³ v borievkových plodoch je okolo 190 mg g⁻¹, celkové množstvo flavonoidov² sa pohybuje v intervale 1–4 mg g⁻¹ a biflavonoidov od 1 až do 1,4 mg g⁻¹. Zrelé plody sú základom pre viaceré nápoje, napr. borovičky, gin, grappa, talianske gineprino, bittery (horké liehoviny).

Liehoviny aromatizované borievkami sú liehoviny, ktoré sa vyrábajú aromatizovaním liehu, obilného destilátu alebo obilného brandy látkami získanými z bobúľ borievky obyčajnej (*Juniperus communis L.*)⁴. Možno k nim pridávať vonné látky a chuťové látky, vôňa a chuť borievok musí byť rozlíšiteľná. Liehoviny, ktoré sa

vyrábajú na Slovensku aromatizovaním liehu, obilného destilátu alebo obilného brandy látkami získanými destiláciou z bobúľ borievky cédrovitej (*Juniperus oxicedris L.*), do ktorých možno pridávať vonné a chuťové látky; vôňa a chuť borievok musí byť rozlíšiteľná; takto vyrobenú liehovinu možno nazvať „borovička“.

Spektrometrické metódy, obzvlášť infračervená spektrometria, nukleárna magnetická rezonancia a hmotnostná spektrometria, sú široko používané pri autentifikácii potravín. Často sa využívajú v kombinácii s chemometriou, ktorá používa matematické a štatistické metódy na získanie maximálnej chemickej informácie analyzovaním chemických dát⁵. Voľba metódy závisí hlavne od chemických vlastností a fyzikálneho stavu vzorky, predošlých znalostí o vzorke a času potrebného na získanie výsledkov⁶. Ďalšie významné faktory sú cena samotného zariadenia a jeho prevádzkové náklady.

UV-VIS absorpčná spektrometria predstavuje lacnú a jednoduchú techniku, ktorá našla široké uplatnenie v analýze potravín. Medzi dobre známe aplikácie možno zahrnúť stanovenie obsahu proteínov podľa Bradforda, sledovanie hydrolýzy proteínov použitím ninhydrínu, fotometrické stanovenie pigmentov (napríklad karotenoidov v margaríne⁷), ale aj zistenie falšovania panenského olivového oleja rafinovanými druhmi oleja. Nedávno bola publikovaná klasifikácia Ligurijského olivového oleja viacrozmernou analýzou dát získaných UV-VIS spektrofotometriou⁸. Prenosný spektrofotometer sa použil pri určovaní autenticity škótskej whisky⁹. Ďalšie zaujímavé použitie UV-VIS spektrofotometrie je stanovenie celkového obsahu antokyanínových pigmentov, ktoré vykazujú typický absorpčný pás v oblasti 490 až 550 nm. Tvar spektra antokyanínov môže poskytnúť informáciu aj čo sa týka počtu a pozície glykozidovej substitúcie a acylácie sacharidového podielu¹⁰. Napriek nepochybným výhodám UV-VIS spektrofotometrie, táto technika neprešla veľkým množstvom inovácií v porovnaní s inými metódami používanými v potravinovej autentifikácii.

Experimentálna časť

Prístroje a zariadenia

Na meranie UV-VIS absorpčných spektier sa použil Shimadzu UV Spectrophotometer 18000, ktorý bol pripojený k počítaču. Merali sa absorpčné spektrá vzoriek destilátov v 1×1 cm kremennej kvete v rozsahu vlnových dĺžok 200–500 nm. Na štatistické zhodnotenie sa použil štatistický balík *STATISTICA*, ver. 7.1 na osobnom počítači PC Pentium 4 s operačným systémom Windows XP 2.6 GHz a 1 GB RAM.

Vzorky destilátov

Merali sa absorpčné spektrá 39 vzoriek destilátov slovenských producentov (S01-S39) zakúpených v maloobchodnej sieti v SR (napr. Pravá Zbojnica borovička Original (St. Nicolaus) obsahujúca bobule borievky, Liptovium borovička (St. Nicolaus), Borovička Slovenská (St. Nicolaus), Borovička Inovecká (St. Nicolaus), Slovenská borovička Juniperus (Old Herold), Slovenská borovička Koniferum (Old Herold), Borovička Slovenská (Old Herold), Original Slovak Juniper brandy (Imperator), Spišská borovička (Frucon Trade Košice)), 3 českých (C01-C03) (Slovácká borovička (R. Jelínek)), 6 nemeckých (G01-G06) (napr. Landwirth's Steinhäger (Landwirth's GmBh)), 12 belgických (B01-B12) (napr. Smeets Extra Hasseltse (graanjenever), Hasselt Smeets (Genievre de Grain), Balegemsche Graangenever) a 3 britské borievkové destiláty (U01-U03) (napr. Plymouth English Gin (Black Friars Distillery, V&S Plymouth Ltd.)).

HCA

Na hodnotenie a porovnanie jednotlivých vzoriek sa použili viacrozmerné štatistické metódy PCA a HCA. HCA je klasifikačná technika, ktorá zoskupuje podobné objekty do zhukov (klastrov) na základe miery podobnosti. Miera podobnosti je definovaná pomocou vzdialeností (štvorec Euklidovej vzdialenosti, Euklidova vzdialenosť a Hammingova vzdialenosť (city-block distance, Manhattan distance)). Objekty sú tým podobnejšie, čím menšia je vzdialenosť medzi nimi – vo vypočítanej matici podobnosti sa nachádzajú vzdialenosti všetkých párov, ktoré možno z objektov vytvoriť. Hierarchické algoritmy CA ako finálny výstup poskytujú dendrogram, na ktorom vidieť postupné spájanie objektov – od najpríbuznejších až po najmenej príbuzné¹¹.

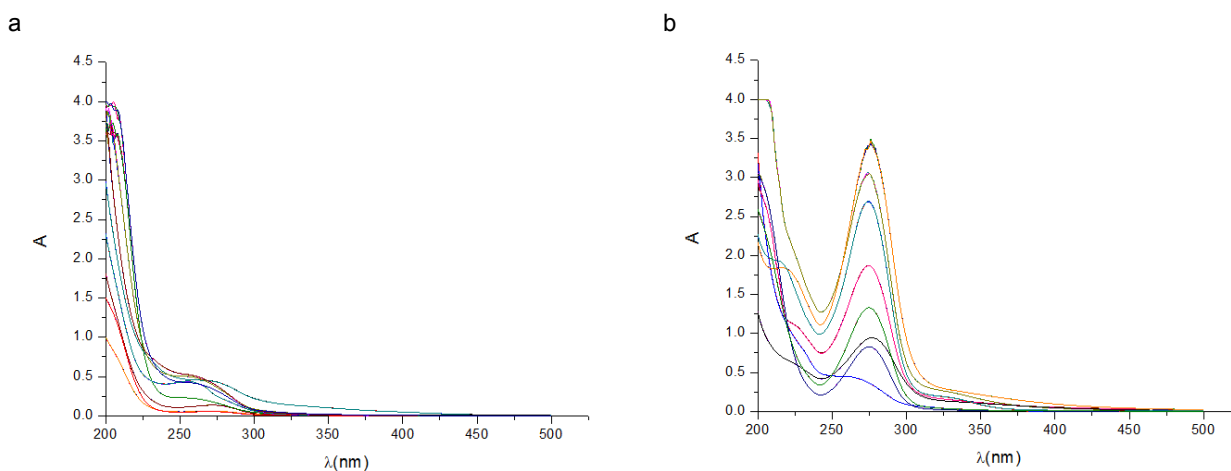
PCA

PCA je najpoužívanejšou metódou na redukovanie veľkého počtu vzájomne súvisiacich premenných na hlavné komponenty, pri čo najmenej strate informácií. Využíva takú lineárnu kombináciu pôvodných premenných, ktorá vysvetľuje variabilitu dát (zachováva rozptýlenie dát v najväčšej možnej miere). Hlavné komponenty PC_1, \dots, PC_r sú nové (latentné) a nekorelované premenné, hierarchicky usporiadané. Počet r hlavných komponentov PC je obvykle menší ako počet p originálnych premenných: $r \leq p$. Obvyčajne na opis systému postačuje len limitovaný počet $r < p$ z hlavných komponentov, ostatné premenné tvoria šum. Tento postup podstatne zmenší rozmernosť dát, umožňuje účinné zobrazenie, klasifikáciu a regresiu viacrozmerných dát¹².

Výsledky a diskusia

UV-VIS spektrometria

Na obr. 1 sú uvedené absorpčné spektrá vzoriek slovenských a zahraničných borievkových destilátov. Všetky slovenské borovičky vykazujú absorpčný pás v intervale vlnových dĺžok 245–285 nm s maximum intenzity okolo 260 nm a nulovou absorpciou od 320 nm. Pre všetky zahraničné vzorky borievkových destilátov je charakteristický intenzívnejší absorpčný pás v oblasti 240 až 300 nm, pričom maximum je okolo 275 nm. Jednotlivé borievkové destiláty sa odlišujú nielen polohou maxim absorpčných pásov, ale hlavne intenzitou absorpcie v tejto oblasti.



Obr. 1. Absorpčné spektrá liehovín aromatizovaných borievkami a) slovenskí výrobcovia, b) zahraniční výrobcovia

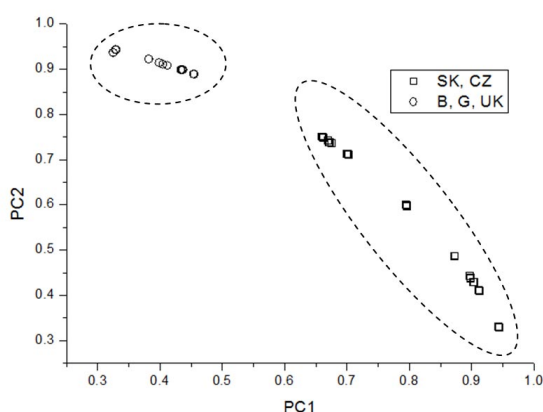
PCA

Na zistenie rozdielov medzi jednotlivými vzorkami sa použila analýza hlavných komponentov (PCA). Vstupnými dátami boli spektrá namerané pre všetky vzorky v intervale 250–325 nm. Dve nové latentné premenné opíšu rozptyl nameraných dát v dátovej matici s celkovou hodnotou 99,73 %, pričom prvý komponent PC1 s vlastnou hodnotou (eigenvalue) 56,50 opísal 89,68 % a druhý komponent PC2 s vlastnou hodnotou 6,33 vysvetľuje 10,04 % z celkového rozptylu dát. Na obr. 2 je 2D priemet koeficientov nových premenných, ktorý umožňuje dobré rozlíšenie medzi jednotlivými liehovinami. Z grafického vyjadrenia výsledkov možno vidieť odlišné dve oblasti, pričom prvá je tvorená slovenskými a českými vzorkami a druhú oblasť tvoria vzorky z Belgicka, Nemecka a Veľkej Británie.

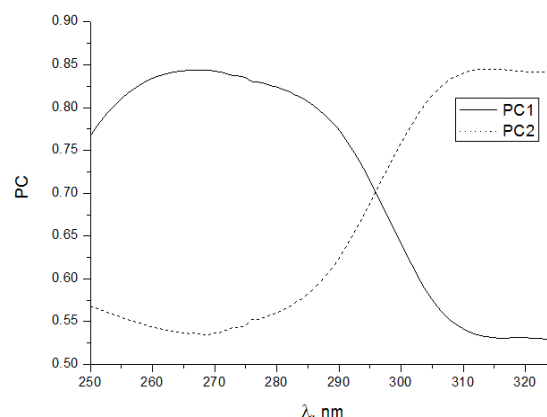
Spektrálne profily (obr. 3) zodpovedajúce jednotlivým komponentom PC umožňujú zistiť charakteristické vlnové dĺžky, ktoré sa môžu použiť na diskrimináciu medzi spektrami. PC1 zodpovedá zmenám absorpčného pásu v intervale 250–290 nm, zatiaľ (loading) pre PC2 ukazuje význam pásu s maximom pri 310 až 325 nm.

HCA

Na potvrdenie výsledkov získaných vizuálnym zhodnotením spektier a výsledkov z PCA, to znamená nájsť istú podobnosť, prípadne rozdielnosť vzoriek, sa použila hierarchická klastrová analýza. Vstupnými dátami boli spektrá namerané pre všetky vzorky v intervale 250 až 325 nm. Na hodnotenie sa použila hierarchická aglomeratívna zhluková analýza. Za mieru podobnosti sa vybrala Manhattanova vzdialenosť, pretože je robustnejšia v p-rozmernom priestore a Wardova metóda spájania



Obr. 2. Hodnoty skóre hlavných komponentov PC1, PC2 pre vzorky slovenských, českých, belgických, nemeckých a britských borievkových liehovín

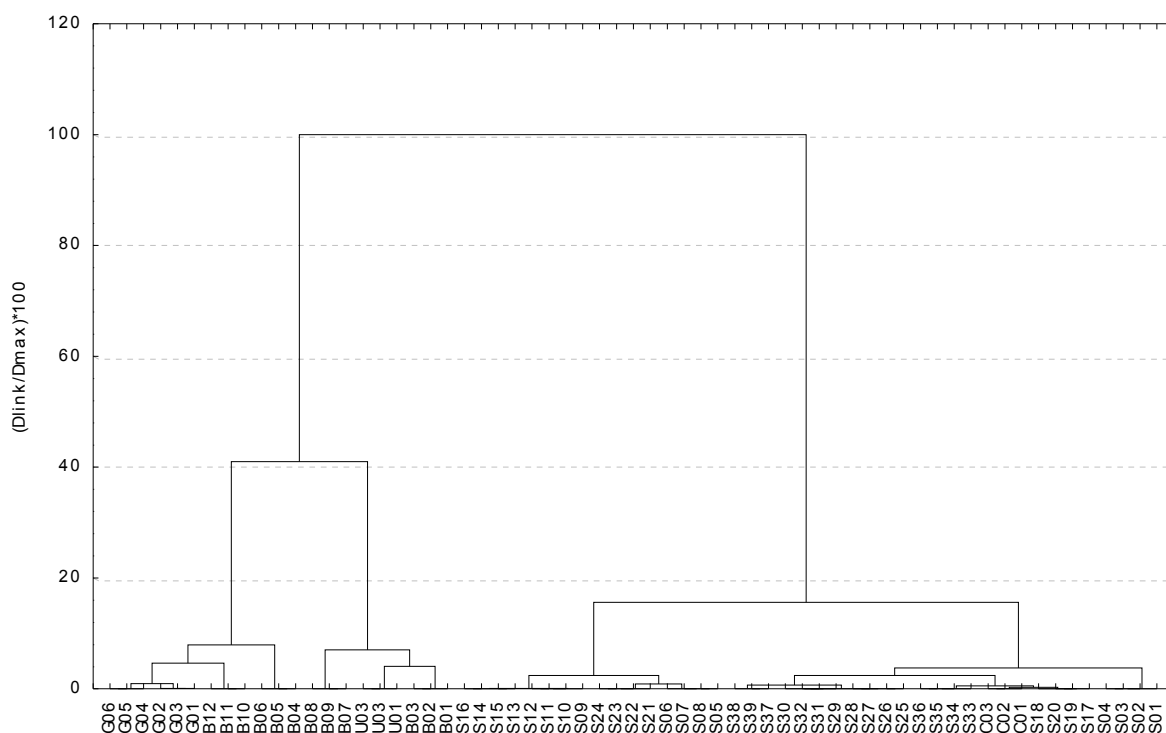


Obr. 3. Spektrálne profily zodpovedajúce komponentom PC1, PC2 pre UV-VIS spektrá u slovenských a zahraničných vzoriek

jednotlivých tried do zhlukov, pretože je veľmi účinná, i keď preferuje vytváranie zhlukov malých veľkostí. Výsledkom takéhoto chemometrického spracovania je grafický výstup – dendrogram – obr. 4. Z dendrogramu vidno, že vzorky borievkových liehovín vytvárajú dva klastre (zhluky), ktoré sú si veľmi podobné (obsahujú podobné informácie) v rámci daného klastra. Prvý klastre obsahuje len liehoviny aromatizované borievkami od zahraničných výrobcov a druhý klastre obsahuje slovenské a české vzorky. V klastri zahraničných výrobcov sa vytvorili dva podklastre, pričom prvý je tvorený nemeckými vzorkami (G01-G06) a liehovinami od belgických výrobcov (B04-B06, B10-B12) a druhý podklastre obsahuje belgické vzorky (B01-B03, B07-B09) a gin z Veľkej Británie (U01-U03). Klastre tvorený slovenskými a českými liehovinami sa tiež delí na niekoľko menších klastrov. Prvý zahŕňa vzorky slovenských liehovín bez označenia geografického pôvodu (S05-S16, S21-S24). Druhý podklastre tvoria borovičky s označením geografického pôvodu (Spišská borovička (Frucon Trade Košice), Trenčianska borovička Juniperus (Old herold Trenčín)), české liehoviny (Slovácká borovička (R. Jelínek)), a ďalšie slovenské liehoviny (Slovenská borovička Juniperus (Old herold Trenčín), Slovenská borovička (Old herold Trenčín), Prvá zbojnická borovička (St. Nicolaus Lipt. Mikuláš)).

Záver

Výsledky uvedené vyššie poukazujú na to, že UV-VIS spektrometria umožňuje rozlíšiť slovenské a české borievkové destiláty od zahraničných vzoriek liehovín aromatizovaných borievkami na základe vizuálneho zhodnotenia spektier. V kombinácii s chemometrickými metódami ako je PCA a HCA je odlišenie vzoriek jednoduchšie, a preto tieto metódy ponúkajú sľubný



Obr. 4. Dendrogram hierarchickej zhlukovej analýzy

spôsob charakterizácie a klasifikácie liehovín aromatizovaných borievkami.

Práca vznikla za podpory Vedeckej grantovej agentúry VEGA, projekt č. 1/0182/11.

LITERATÚRA

- Pashalina S., Stavros T. K.: *Planta Med.* 59, 554 (1993).
- Innocenti M., Michelozzi M., Giaccherini C., Ieri F., Vincieri F. F., Mulinacci N.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 6596 (2007).
- Hayouni E. A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M.: *Food Chem.* 105, 1126 (2007).
- VÝNOS Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 15. apríla 2004 č. 1010/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca lieh a liehoviny.
- Leardi R., v: *Food Authenticity and Traceability*, Lees M. (ed.), str. 299–320. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge 2003.
- Belton P.: *Biotechnol., Agron., Soc. Environ.* 4, 204 (2000).
- Luterotti S., Bicanic D., Požgaj R.: *Anal. Chim. Acta* 573, 466 (2006).
- Casale M., Armanino C., Casolino C., Forina M.: *Anal. Chim. Acta* 589, 89 (2007).
- MacKenzie W. M., Aylott R. I.: *Analyst* 129, 607 (2004).
- Giusti M. M., Wrolstad R. E., v: *Handbook of Food Analytical Chemistry Vol. 2: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*, Wrolstad R. E. (ed.), str. 19–31. J. Wiley, New York 2005.
- Otto M., v: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley VCH, Weinheim 2007.
- Geladi P.: *Spectrochim. Acta, Part B* 58, 767 (2003).

STUDIUM PRODUKTŮ ANODICKÉ OXIDACE 2,4,6-TRIBROMFENOLU

EVA MARKOVÁ*, **PETRA NOVÁKOVÁ**,
HANA ŠVECOVÁ, **JANA SKOPALOVÁ**
a **PETR BARTÁK**

*RCPTM, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Česká republika
markova.e@email.cz*

2,4,6-Tribromfenol (TBP) a další bromované deriváty fenolu jsou častými kontaminanty v životním prostředí. Tyto látky vykazují ve většině případů antropogenní původ, výjimkou však nejsou ani přírodní zdroje. Zejména mono-, di- a tribromfenoly jsou produkovány některými mořskými živočichy, jedná se mořské řasy, červy, mnohoštětinatce a polostrunatce¹. Byla vyslovena domněnka, která předpokládá, že přírodní produkce bromovaných derivátů je ve skutečnosti obranným mechanismem proti predátorům². Bromované fenoly mohou vznikat také biodegradací ostatních polutantů, jako jsou bromované benzeny a některé bromované difenyl ethery¹.

Daleko rozsáhlejší je antropogenní produkce bromovaných derivátů fenolu. 2,4,6-Tribromfenol se využívá jako meziprodukt při výrobě zpomalovačů hoření, jež omezují šíření požáru nebo jako fungicid k ochraně dřeva. Dále mohou tyto látky vznikat jako vedlejší produkty v potravinářském průmyslu. Jako polutant se TBP vyskytuje v ovzduší, půdě a říčních sedimentech¹. Byl nalezen také v lidské plasmě³ a lidském séru⁴. Lidé mohou být vystaveni účinkům bromovaných fenolů přes potravní řetězec, přímým kontaktem, či inhalací.

Celosvětová produkce bromovaných fenolů je značně vysoká, např. produkce TBP byla v roce 2001 přibližně odhadována na 9500 tun/rok. Od roku 1998 je TBP zapsán v Seznamu nebezpečných látek Úřadu pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency, EPA, USA)⁵.

Studium bromovaných derivátů fenolu souvisí s vlivem těchto látek na lidský organismus a na životní prostředí. Bromované fenoly podléhají řadě degradačních procesů, ale zdaleka ne u všech je znám jejich mechanismus. Podstatou většiny degradačních procesů jsou oxidačně-redukční děje, které mohou být výhodně realizovány pomocí elektrochemických reaktorů a využity k eliminaci nežádoucích polutantů z životního prostředí. To zvyšuje

zájem o získávání dalších informací o mechanismech elektrochemických přeměn a jejich produktech. V odborné literatuře můžeme najít řadu prací, které se zabývají studiem bromovaných fenolů, ale téměř žádná se nevěnuje přímo anodické oxidaci těchto sloučenin.

Cílem naší práce bylo studovat produkty, které vznikají anodickou oxidací 2,4,6-tribromfenolu (TBP). Z voltametrických experimentů vyplývá, že ve vodném nebo vodně-alkoholickém prostředí s nízkým obsahem alkoholu dochází k silné adsorpci TBP a jeho oxidačních produktů na povrchu elektrod⁶. V rámci této studie byla oxidace prováděna na platinové síťkové elektrodě v různém prostředí a vzniklé oxidační produkty byly analyzovány pomocí GC-MS. Z dřívějších experimentů bylo zjištěno, že anodická oxidace TBP v prostředí s nižším obsahem vody (50 % (v/v) methanol/voda), vede k tvorbě dimerních produktů, jež zůstávají adsorbovány na povrchu elektrody⁶. Na základě tohoto zjištění byla oxidace zopakována v prostředí s obsahem 90 % (v/v) alkoholu (methanol, ethanol, propanol, 2-propanol). Následně byly sledovány oxidační produkty vznikající v těchto prostředích.

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operační program výzkum a vývoj pro inovace – Evropský fond pro regionální rozvoj) a Univerzitě Palackého v Olomouci (projekt č. PrF_2012_020).

LITERATURA

1. Howe P., Dobson S., Malcolm H. M.: 2,4,6-Tribromophenol and Other Simple Brominated Phenols. Concise International Chemical Assessment Document 66. World Health Organization, Geneva 2005.
2. Kicklighter C. E., Kubanek J., Hay M. E.: *Limnol. Oceanogr.* 49, 430 (2004).
3. Hovander L., Malmberg T., Athanassiadis I., Rahm S., Bergman A., Wehler E. K.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 105 (2002).
4. Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 1414 (2002).
5. Contreras D., Oviedo C., Valenzuela R., Freer J., Rojo K., Rodríguez J.: *J. Chil. Chem. Soc.* 54, 141 (2009).
6. Marková E., Smyslová P., Macíková P., Skopalová J., Barták P.: *Chem. Listy* 106, 195 (2012).

STANOVENIE PROTEINOGENNÝCH AMINOKYSELÍN V ROZKLADNÝCH PRODUKTOCH HUMÍNOVÝCH KYSELÍN IZOLOVANÝCH Z PÔD METÓDOU REVERZNO-FÁZOVEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE S VYUŽITÍM KOLÓN MONOLITOVÉHO TYPU A PREDKOLÓNOVEJ DERIVATIZÁCIE

NATÁLIA MASARYKOVÁ, RÓBERT GÓRA, MILAN HUTTA a GABRIELA GRMANOVÁ

*Univerzita Komenského Bratislava, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovensko
masarykova@fns.uniba.sk*

Úvod

Humínové látky (HL) sú zložené makromolekulové látky, ktoré sú značne rozšírené v životnom prostredí a to v prírodných vodách, pôde, sedimentoch a predstavujú významný podiel organického uhlíka v životnom prostredí¹. HL izolované z pôd a sedimentov je možné rozdeliť na základe rozpustnosti v zriedených roztokoch kyselín a zásad do troch frakcií: humínové kyseliny (HK), fulvokyseliny (FK) a humin². Pôdne HK tvoria významnú časť pôdnej organickej hmoty (SOM) (t.j. 20 % z celkového obsahu organických látok nachádzajúcich sa v pôde). Majoritnú časť SOM tvoria nehumínové látky, ktorými sú zvyčajne jednoduché organické zlúčeniny ako napr. lipidy, aminokyseliny (AK), sacharidy a pod. Podiel HK na celkovom kolobehu uhlíka v životnom prostredí je až 16 %, u FK a humínu je to približne 8 % (cit.³).

Pôdne humínové kyseliny (HK) sú zmesi prírodných organických zlúčenín, ktoré obsahujú viac aromatických štruktúr a karboxylových skupín ako fulvokyseliny⁴. Vznikajú predovšetkým dôsledkom (bio)chemickej degradácie rastlinného a živočíšneho odpadu a syntetickou mikrobiálnou činnosťou. Okolo 20–50 % celkového dusíka (N) v SOM je prítomná vo forme AK, ktoré sa vyskytujú ako štruktúrne jednotky peptidovej väzby a je možné ich uvoľniť kyslou hydrolýzou⁵. Z celkového organického N prítomného v pôde je možné uvoľniť AK napr. degradáciou organickej hmoty, rozkladom rastlinnej biomasy alebo autolýzou mikroorganizmov. Vzhľadom na to, že mikroby rýchlo rozkladajú voľné AK, väčšina AK sa v pôde vyskytuje vo viazanej forme napríklad v huminopeptidových štruktúrnych jednotkách a sú obyčajne viazané k centrálnemu jadrú HK a FK, čo ich chráni pred rýchlou degradáciou mikroorganizmami⁶.

Medzi veľmi často využívané techniky na analýzu AK je použitie automatických analyzátorov na báze iónovo-výmennej chromatografie. Avšak, prijatý postup je časovo náročný a môže spôsobiť tvorbu interferencií⁷. Aby sa predišlo tomuto problému, zaviedli sa metódy pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu AK s použitím derivatiza-

cie. Spojenie reverzno-fázovej vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (RP-HPLC) s predkolónovou alebo pokolónovou derivatizáciou predstavuje efektívny prístup k riešeniu danej problematiky⁸. Istou nevýhodou sú však obmedzené možnosti priamej spektrofotometrickej a fluorimetrickej detekcie s nízkou citlivosťou a zvýšenou mierou interferencií⁹, keďže väčšina aminokyselín nevykazuje fluorescenciu a len niektoré z nich obsahujú vo svojej molekule štruktúrne jednotky s chromofórmami.

Reakciou AK s vhodným derivatizačným činidlom vznikajú molekuly, ktoré už obsahujú potrebné chromofóry alebo fluorofóry a umožňujú použitie fluorimetrickej alebo spektrofotometrickej detekcie v širšej oblasti UV a VIS spektra. Používané derivatizačné činidlá na analýzu aminokyselín by mali spĺňať nasledujúce predpoklady¹⁰:

- a) činidlo musí byť schopné reagovať so všetkými AK, tak s primárnou ako aj so sekundárnou aminoskupinou.
- b) derivatizácia musí byť reprodukovateľná,
- c) derivatizované AK musia byť stabilné.

Na selektívnu detekciu AK sa často využíva aj pokolónová derivatizácia s použitím derivatizačných činidiel ninhydrín¹¹, fluorskamín¹² a *o*-ftalaldehyd¹³ v kombinácii s iónovo-výmennou chromatografiou (IEC). Vypracovaná metóda je relatívne presná, vysoko reprodukovateľná, ale na druhej strane jej nedostatkami sú časová náročnosť, nižšia citlivosť a relatívne vysoké náklady¹⁴.

V snahe vyhnúť sa nákladnej a náročnejšej pokolónovej derivatizácii pri analýze AK sa zvykne používať RP-HPLC s využitím pred-kolónovej derivatizácie¹⁴. Na predkolónovú derivatizáciu AK bolo vyvinutých niekoľko postupov. Najčastejšie sa jedná o reakcie AK s derivatizačnými činidlami za presne definovaných podmienok. Medzi najčastejšie používané derivatizačné činidlá patria 6-aminochinolyl-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC)⁵, dansylchlorid (Dans-Cl)¹⁵, *o*-ftalaldehyd (OPA)¹⁶, fenyliizotiokyanát (PITC)¹⁷, 4-nitrofenyliizotiokyanát (NPITC)¹⁸, 9-fluorenylmetyl chloroformát (FMOC)¹⁹ a dietyloxyethylmalonát (DEMM)²⁰.

Predložená práca sa zaoberá analýzou aminokyselín v degradačných produktoch humínových látok metódou kvapalinovej chromatografie s použitím predkolónovej derivatizácie s DEMM.

Experimentálna časť

Chemikálie a činidlá

Voda pre HPLC čistená zariadením Simplicity (Molsheim, Francúzsko), kyselina trifluóroctová 99%, metanol 99,9% pre LC, HCl 37%, MeOH (Merck, Darmstad,

Nemecko), tetraboritan dvojsodný (dekahydrát), dietylénoxydimetylmalonát 99,9% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Štandardy aminokyselín zaobstarané od spoločnosti Merck (Darmstadt, Nemecko). Vzorka pôdnej HK extrahovaná modifikovanou IHSS frakcionačnou schémou z rašeliny z lokality z okolia mesta Dunajská Streda²¹.

Hydrolyza vzoriek HK

Do ampuliek sme si navážili 50 mg vzorku HK a k nej sme pridali 500 μ l kyseliny chlorovodíkovej (HCl) s látkovou koncentráciou 6,0 mol l⁻¹. HK sme hydrolyzovali v zatavenej ampulke pri teplote 110 °C po dobu 24 h.

Derivatizácia AK a vzoriek HK

Najprv sme si zo štandardov AK pripravili zásobné roztoky. Do odmernej banky s objemom 25 ml sme navážili 50 mg štandardu AK a doplnili odmernú banku ultračistou vodou Simplicity. Do čistej odmernej banky s objemom 25 ml sme pridali 5 ml tetraboritanu sodného s koncentráciou 0,1 mol l⁻¹, 200 μ l dietylénoxydimetylmalonátu a 1 ml zo zásobného roztoku AK. Reakciu sme nechali prebiehať pri teplote 55 °C vo vodnom kúpeli po dobu 60 min. Do vychladeného roztoku štandardu AK sme pridali 2 ml metanolu (MeOH) a doplnili ultračistou vodou Simplicity po rysku. Príprava zásobného roztoku tyrozínu si vyžiadala špecifickú úpravu. Do odmernej banky s objemom 25 ml sme si navážili 10 mg štandardu tyrozínu a doplnili odmernú banku roztokom tetraboritanu sodného o koncentrácii 0,1 mol l⁻¹. Po rozpustení štandardu tyrozínu sme postupovali podľa postupu opísaného vyššie.

Hydrolyzovanú vzorku HK sme pred otvorením ampulky centrifugovali. Následne sme ampulky otvorili a supernatant odobrali do čistej odmernej banky s objemom 25 ml. K supernatantu sme pridali 10 ml tetraboritanu sodného s koncentráciou 0,1 mol l⁻¹ a 200 μ l DEMM. Reakcia prebiehala pri teplote 55 °C (termostatovaný vodný kúpeľ) po dobu 60 min. Do vychladenej vzorky HK sme pridali 2 ml MeOH a doplnili ultračistou vodou Simplicity po rysku.

Inštrumentácia

Chromatografické záznamy štandardov AK a vzoriek HK sme získali pomocou chromatografického systému LaChrom Merck – Hitachi (Merck, Darmstadt, Nemecko). Systém sa skladal z vysokotlakového čerpadla L-7100, autosampleru L-7200, kolónového termostatu L-7300 (s presnosťou \pm 0,5 °C), spektrofotometrického detektora s diódovým poľom L-7450, fluorimetrického detektora L-7480, rozhrania D-7000, s vyhodnocovacím programom HSM, verzia 4.0 a on-line štvorkanálového prietokového vákuového odplyňovača MF L-7612.

Metóda

Na separáciu štandardov AK a vzoriek HK sme použili chromatografickú kolónu Chromolith Performance RP-18e (100 mm \times 4,6 mm), ktorá bola vyhrievaná na 35 \pm 0,1 °C. Na separáciu sme použili gradientovú elúciu pri prietoku 1 ml min⁻¹. Mobilnú fázu A tvorila kyselina trifluóroctová (TFA) s látkovou koncentráciou 20 mmol l⁻¹, mobilnou fázou B bol metanol. Na detekciu sa použil detektor DAD rozsah vlnových dĺžok bol zvolený v rozmedzí od 200–400 nm, monitorovacia vlnová dĺžka bola nastavená na 280 nm.

Gradientový program 1 na analýzu štandardov AK sme nastavili nasledovne: od 0,0 do 3 minút izokratický úsek 15 % B. Od 3,1 minúty sme zaradili začiatok stúpania lineárneho gradientu na 99 % B za 33 minút, čo predstavuje zmenu zloženia mobilnej fázy 2,8 % za minútu. Od 33,1 do 35 minúty prebiehala izokratická elúcia s 99 % B a od 35,1 do 40 minúty bola zaradená zmena zloženia mobilnej fázy na začiatkové podmienky 15 % B. Na záver od 40,1 do 45 minúty prebiehala izokratická elúcia pri 15 % B z dôvodu ustálenia podmienok separácie pre nasledujúcu analýzu.

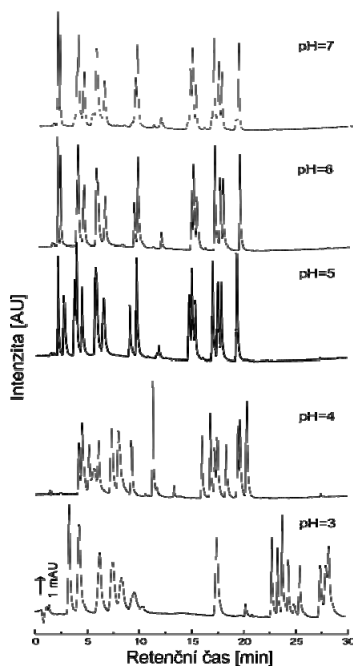
Výsledný gradient 2, pri ktorom sme analyzovali vzorku HK sme nastavili nasledovne: od 0,0 do 5 minút izokratický úsek 5 % B. Od 5,1 minúty sme zaradili začiatok stúpania lineárneho gradientu na 80 % B za 25 minút. Od 30,1 do 31 minúty sme zaradili stúpania lineárneho gradientu na 99 % B a od 31,1 do 35 minúty bola zaradená zmena zloženia mobilnej fázy na začiatkové podmienky 5 % B. Na záver od 35,1 do 40 minúty prebiehala izokratická elúcia pri 5 % B.

Výsledky a diskusia

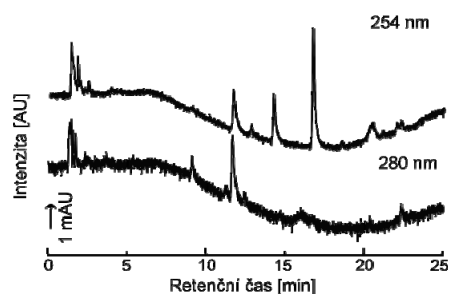
Na základe poznatkov z preštudovanej literatúry⁶ a vzhľadom na charakter riešeného problému sme si zvolili 20 proteínogénnych AK, ktoré by mohli byť s veľkou pravdepodobnosťou prítomné v degradačných produktoch HK izolovaných z pôdy alebo z rašeliny. Pri samotnom návrhu metódy gradiendovej RP-HPLC sme vychádzali okrem poznatkov získaných z literatúry aj z našich predchádzajúcich skúseností pri analýzach zložitých zmesí, vrátane aminokyselín napríklad v extraktoch z koreňov kukurice²² alebo v komerčných prípravkoch s vysokým obsahom humínových látok²³. Na derivatizáciu aminokyselín v skúmaných vzorkách sme uprednostnili činidlo DEMM a to najmä kvôli jeho výborným vlastnostiam. Medzi tie nesporne patrí vznik termodynamicky aj kineticky stabilných produktov s charakteristickým spektrom pásu pri 280 nm, čo je dôležitým predpokladom pre navrhnutie robustnej RP-HPLC metódy s použitím spektrofotometrickej detekcie.

V úvodnej časti práce sme sa zamerali na optimalizáciu podmienok separácie aminokyselín v závislosti od zloženia mobilnej fázy. Na základe našich predbežných meraní a doteraz uverejnených výsledkov^{23,24} sme kyselinu trifluóroctovú (TFA) vybrali ako anorganickú (vodnú)

zložku mobilnej fázy, vzhľadom na jej priaznivé vlastnosti a potenciálnu možnosť využitia MS detekcie v budúcnosti. Na začiatku sme sa sústredili na vplyv hodnoty pH v mobilnej fáze TFA v rozmedzí pH od 3,00 do 7,00. Z nameraných výsledkov vyplynulo, že optimálne pH tlmivého roztoku TFA v mobilnej fáze na separáciu štandardov AK a AK prítomných vo vzorkách hydrolyzátov HK bolo pri pH 5,00 (obr. 1). Ďalej sme sa sústredili na štúdium vplyvu iónovej sily na priebeh separácie pri použití kolóny



Obr. 1. Chromatografický záznam 20 proteinogénnych AK získaných pri vybraných hodnotách pH. Separačné podmienky: Gradientová elúcia 1 miešaním 20 mmol l⁻¹ TFA pri vybraných hodnotách pH od 3,00 do 7,00 (A) a metanol (B) dávkovaný objem štandardu 20 AK 20 µl, teplota kolóny 35 °C, prietok 1 ml min⁻¹



Obr. 2. Chromatografický záznam DEMM pri 280 a 254 nm. Separačné podmienky: Gradientová elúcia 1 miešaním 20 mmol l⁻¹ TFA pri pH 5,0 (A) a metanol (B) dávkovaný objem štandardu 20 AK 20 µl, teplota kolóny 35 °C, prietok 1 ml min⁻¹

Chromolith Performance RP-18e (100 × 4,6 mm) a pre ďalšie merania sme si zvolili koncentráciu TFA 20 mmol l⁻¹.

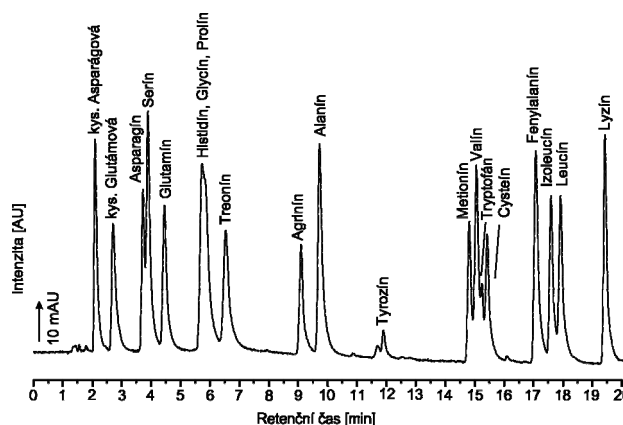
Na obr. 2 je chromatografický profil samotného derivatizačného činidla DEMM pri 280 a 254 nm. Zo záznamu vyplýva, že DEMM poskytuje pri vlnovej dĺžke 254 nm pomerne vysokú odozvu a celkom 3 systémové píky, na druhej strane odozva DEMM pri vlnovej dĺžke 280 nm, ktorú sme využívali pri stanovení AK, vykazuje jeden pík a pomerne nízku odozvu v porovnaní s odozvami derivatizovaných AK, pre ktoré je táto vlnová dĺžka charakteristická a špecifická.

Matematické spracovanie získaných retenčných údajov nám odhalilo skutočnosť, že výsledná gradientová metóda poskytla možnosť rozdelenia 18 proteinogénnych AK, avšak pri dvojici histidín a glycín sme dosiahli iba nedostatočné rozlíšenie, preto sme na vyhodnotenie ich obsahu vo vzorkách museli použiť matematickú dekonvolúciu (obr. 3).

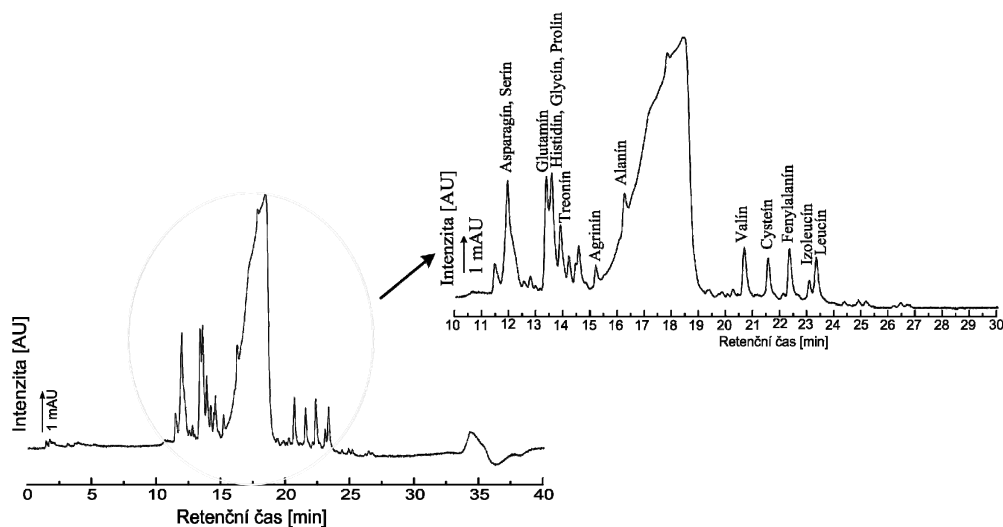
Na obr. 4 je znázornený chromatografický záznam vzorky HK izolovanej z rašeliny s použitím priblíženia pre detailnejší pohľad na priebeh separácie. Po vyhodnotení nameraných výsledkov a porovnaní UV spektier látok, ktoré vykazovali odozvu pri vlnovej dĺžke 280 nm, sa nám podarilo potvrdiť prítomnosť väčšiny proteinogénnych aminokyselín.

Záver

Predložená práca sa zaoberá stanovením AK vo vzorkách degradačných produktov huminových kyselín a môžeme skonštatovať, že metódou RP-HPLC s využitím gradientovej elúcie sa nám podarilo v analyzovanej vzorke stanoviť prítomnosť väčšiny proteinogénnych AK.



Obr. 3. Chromatografický záznam 20 proteinogénnych AK získaných pri 280 nm. Separačné podmienky: Gradientová elúcia 1 miešaním 20 mmol l⁻¹ TFA pri pH 5,0 (A) a metanol (B) dávkovaný objem štandardu 20 AK 20 µl, teplota kolóny 35 °C, prietok 1 ml min⁻¹



Obr. 4. Chromatografický záznam vzorky HK extrahovanej z rašeliny z okolia mesta Dunajská Streda pri 280 nm; Separáčne podmienky: Gradientová elúcia 2 miešaním 20 mmol l⁻¹ TFA pri pH 5,0 (A) a metanol (B) dávkovaný objem bol 20 µl, teplota kolóny 35 °C, prietok 1 ml min⁻¹

Táto práca bola podporovaná projektami VEGA 1/1349/12, VEGA 1/1176/12.

LITERATÚRA

- Choudhry G. G., v: (Hutzinger O., ed.): *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 1., Part C., The Natural environment and the biogeochemical cycles*, p. 1. Springer Verlag, Heidelberg 1989.
- Wu C. F., Evans D. R., Dillon J. P.: *Anal. Chim. Acta* 464, 47 (2002).
- Allard B.: *Geoderma* 130, 77 (2006).
- Skybová M.: *Acta Montan. Slov.* 2, 362 (2006).
- Hou S., He H., Zhang W., Xie H., Zhang X.: *Talanta* 80, 440 (2009).
- Szajdak L., Jezierski A., Cabrera M. L.: *Org. Geochem.* 34, 693 (2003).
- Reilly A. A., Bellissario R., Pass A. K.: *Clin. Chem.* 44, 317 (1998).
- Gatti R., Gioia G. M., Andreatta P., Pentassuglua G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 399 (2004).
- Gómez-Ariza J. L., Villegas-Portero M. J., Bernal-Daza V.: *Anal. Chim. Acta* 540, 221 (2005).
- Oravec P., Podhradský D.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 30, 145 (1995).
- Donahue P. E., Brown L. L., Flakoll J. P., Abumrad N. N.: *J. Chromatogr., B* 571, 29 (1991).
- Huff T., Muller C., Hannappel E.: *Anal. Chim. Acta* 352, 239 (1997).
- Fiorino A., Frigo G., Cucchetti E.: *J. Chromatogr., A* 476, 83 (1989).
- Gheshlaghi R., Scharer M. J., Young-Moo M., Douglas L. P.: *Anal. Biochem.* 383, 93 (2008).
- Negro A., Garbisa S., Gotte L., Spina M.: *Anal. Biochem.* 160, 39 (1987).
- Cotte F. J., Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Loustalot-Grenier F. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1342 (2004).
- Brashy-El M. A., Ghannam-Al M. S.: *Analyst* 122, 147 (1997).
- Cohen A. S.: *J. Chromatogr., A* 512, 283 (1990).
- Jámbor A., Perl M. I.: *J. Chromatogr., A* 1216, 3064 (2009).
- Hermosín I., Chicón M. R., Cabezudo D.: *Food Chem.* 83, 263 (2003).
- Prochácková T., Góra R., Kandrác J., Hutta M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 229, 61 (1998).
- Hutta, M., Chalányová, M., Góra, R.: In: *Proc. 11th Int. Symposium, Advances and applications of chromatography in industry, August 27-31, 2001, Bratislava, Slovak Republic.* Slovak University of Technology in Bratislava, 2001.
- Masaryková N., Góra R., Hutta M.: In: *Zborník (CD), Študentská vedecká konferencia PriF UK, 27. apríl 2011, Bratislava, Univerzita Komenského v Bratislave, 2011.*
- Masaryková N., Góra R., Hutta M.: In: *Proc. 7th ISC Modern Analytical Chemistry, September 29-30, 2011, Prague, Czech Republic, Charles University in Prague, 2011.*

DERIVATIZACE RESVERATROLU A JEHO GC/MS ANALÝZA VE VÍNĚ

PETRA NOVÁKOVÁ*, HANA
**ŠVECOVÁ, EVA MARKOVÁ, JANA
SKOPALOVÁ, PETR BEDNÁŘ a PETR
BARTÁK**

*RCPTM, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká
fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu
12, 771 46 Olomouc, Česká republika
petnovako@seznam.cz*

Resveratrol je polyfenolická látka, která byla stanovena u více než 72 rostlinných druhů¹ a je bohatě obsažena zejména v hroznech révy vinné. Obecně resveratrol spadá do skupiny tzv. fytoalexinů, které vznikají jako odpověď rostlin na biotický a abiotický stres způsobený např. mechanickým poškozením, UV zářením, ozónem, napadením mykotoxiny nebo bakteriální či virovou infekcí, a je tedy součástí jejich obranného mechanismu². Jelikož se této látce přisuzují příznivé účinky na lidský organismus (významný antioxidant, prevence proti cukrovce, zánětům, infekcím aj.), je výzkum resveratrolu na poli vědy stále aktuální. Většina studií je zaměřena na analýzu resveratrolu ve víně metodou HPLC s využitím různých detekčních systémů³⁻⁷. Nicméně ani plynová chromatografie není v této oblasti opomíjena, vyžaduje však derivatizaci, která obecně vede ke zlepšení chromatografické analýzy (snížení polarit, zvýšení těkavosti, blokování reaktivních center, zlepšení selektivity aj.). Nejpoužívanější typ derivatizace je silanizace činidly *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA)^{8,9} nebo *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (MSTFA)¹⁰. Z důvodu vysoké citlivosti silanizačních činidel vůči vodě, je nutné před započítím derivatizace příslušný polyfenol z vína nejprve izolovat. Běžně využívanou izolační technikou je extrakce na tuhé fázi (SPE)^{11,12} a mikroextrakce na tuhé fázi (SMPE)^{13,14}.

Předmětem výzkumu je navrzení vhodné derivatizační techniky pro plynovou chromatografii, která umožní derivatizaci resveratrolu ve vodném prostředí. Důležitým parametrem pro řadu derivatizačních reakcí ve vodném prostředí je hodnota pH. V rámci této studie byla pozornost zaměřena na studium derivatizace resveratrolu acetanhydridem v přítomnosti karbonátového pufru (1,5 mol l⁻¹ K₂CO₃ a 1,5 mol l⁻¹ KHCO₃). Konverze resveratrolu byla provedena v přítomnosti různého objemu pufru a byly sledovány optimální podmínky pH reakční směsi, při kterých bylo dosaženo maximálních výtěžků. Jako vnitřní standard pro kvantifikaci byl zvolen β-naftol. Zvoleným acetylačním postupem bylo docíleno možnosti derivatizovat resveratrol přímo ve víně a zlepšit tak extrahovatelnost do nepolárních rozpouštědel, jako je např. heptan. Metoda byla aplikována na analýzu resveratrolu v různých typech běžných vín, ve

kterých se resveratrol vyskytuje v koncentračním rozmezí cca 0,2–6 mg l⁻¹ (cit.¹).

Z hlediska struktury zkoumané látky se acetylace jeví jako velmi prospěšná derivatizační technika umožňující stanovení resveratrolu nebo strukturně analogických látek ve víně metodou plynové chromatografie a odstraňuje tak některé nevýhody v současnosti hojně využívaných silanizačních postupů.

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operační program výzkum a vývoj pro inovace – Evropský fond pro regionální rozvoj), Grantové agentuře České republiky (projekt č. P206/10/0625) a Univerzitě Palackého v Olomouci (projekt č. PrF_2012_020).

LITERATURA

1. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., BUCKIOVÁ D., KŘISA B.: Chem. Listy 95, 602 (2001).
2. Aggarwai B., B., Shishodia S., in: *Resveratrol in health and disease*, Chap. 2, p. 640. CRC/Taylor & Francis, 2006.
3. Sun B., Leandro M., C., Freitas V., Spranger M. I.: J. Chromatogr., A 1128, 27 (2006).
4. Revilla E., Ryan J. M.: J. Chromatogr., A 881, 461 (2000).
5. McMurtrey D., Minn J., Pobanz K., Schultz T. P.: J. Agric. Food Chem. 42, 2077 (1994).
6. Viñas P., Campillo N., Hernández-Pérez M., Hernández-Córdoba M.: Anal. Chim. Acta 611, 119 (2008).
7. Lyons M. M., Yu Ch., Toma R., B., Cho S. Y., Reiboldt W., Lee J., Vreemen R. B.: J. Agric. Food Chem. 51, 5867 (2003).
8. Soleas G. J., Yan J., Goldberg D. M.: J. Chromatogr., B 757, 161 (2001).
9. Rimando A. M., Kalt W., Magee J. B., Dewey J., Ballington J. R.: J. Agric. Food Chem. 52, 4713 (2004).
10. Ragab A. S., Fleet J., Jankowski B., Park J.-H., Bobzin S. C.: J. Agric. Food Chem. 54, 7175 (2006).
11. Montes R., García-López M., Rodríguez I., Cela R.: Anal. Chim. Acta 673, 47 (2010).
12. Rodríguez I., Llompart M. P., Cela R.: J. Chromatogr., A 885, 291 (2000).
13. Luan T., Li G., Zhang Z.: Anal. Chim. Acta 424, 19 (2000).
14. Cai L., Koziel J. A., Dharmadhikari M., Hans van Leeuwen J.: J. Chromatogr., A 1216, 281 (2009).

THE DETERMINATION OF ENANTIOMER DISTRIBUTION OF MAIN CHIRAL VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN MONOFLORAL HONEYS

ALEXANDRA PAŽITNÁ, and IVAN ŠPÁNIK*

*Department of analytical chemistry FCHPT STU,
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
ivan.spanik@stuba.sk*

Abstract

Honey has a long history of human consumption, and is used in various foods and beverages as a sweetener and flavouring. It is used not only in food, but also in cosmetics and medicine. Honey is classified by the floral source of the nectar from which it was made. Monofloral honey is primarily produced from the nectar of one type of flower and, on the other hand, polyfloral honey from the nectar of many types of flowers. Sugar (glucose, fructose and sucrose), water, acids, proteins, pigments and minerals belong to major constituents of honey. Moreover, volatile fraction of honey represents a complex mixture of various organic compounds. These compounds are present at low concentration levels, thus effective extraction techniques, e.g. solid phase microextraction (SPME), have to be used to preconcentrate VOC from honey. Many of these organic compounds such as terpenes, furanoid compounds etc., are chiral and some of them could be also responsible for specific honey aroma. In this work, enantiomer ratios of furanoid linalool oxides, linalool, hotrienol, 4-terpineol, α -terpineol and all isomers of lilac aldehydes are determined and multidimensional gas chromatography (MDGC) is proposed as an effective method for the determination of enantiomer ratio.

Introduction

Honey belongs to the one of the most appreciated natural product in the world. Based on the origin, honeys can be divided into two categories – monofloral and polyfloral honey. Up to these days, various analytical methods have been used for determination of botanical origin of monofloral honeys e.g. analysis of sugar content¹, profile of phenolic compounds and flavonoids², mineral content, colour³ etc. VOC in honey is a complex mixture of different components containing various chemical functional groups⁴ with relatively low molecular weight that are present at low concentration levels. There are several ways how to extract VOC from honey in order to reach required sensitivity, recovery and reliability. The most widely used is SPME (Solid Phase Micro Extraction). Another extraction method is liquid-liquid extraction into organic solvent which was widely used before invention of SPME. This method is used for its simplicity and ability to extract thermolabile compounds. Some works also reports simultaneous steam distillation extraction method⁵, static headspace⁶ or purge and trap⁷. Many of volatile organic compounds (VOC) present in honeys are chiral, so they can exist as two enantiomers. Chiral compounds in plants and animal organisms are synthesized by various enzymatic reactions. The presence of specific enantiomer ratio of chiral compounds depends on the used raw material, processing technology or ageing. Any changes in these ratios could indicate illegal manipulation with products, incorrect treatment procedure or addition of synthetically produced chemicals.

The aim of this work was to determine enantiomer ratio of selected volatile organic compounds in eucalyptus, buckwheat, chestnut, rosemary, sage, lavender and thyme honeys and investigate the possibility to use this ratio for evaluation of honey botanical origin.

Table I
Honey samples investigated in this work

Kind	Country					
	Italy	Rep. of South Africa	Greece	Ukraine	Lithuania	Croatia
Eucalyptus	1	1	1			
Buckwheat				1	1	
Rosemary						1
Lavender						1
Sage						1
Chestnut	2					
Thyme			1			

Experimental

Sample

11 monofloral honey samples were obtained at local markets in various countries and studied in this work (Table I).

SPME

Solid Phase Micro Extraction (SPME) was performed by using Agilent autosampler GC 80. 5 g of honey and 0.5 g of NaCl were dissolved in deionization water in a 20 ml glass vials. The solution was stirred with a PTFE-coated magnetic stir bar at 450 rpm. Vials were sealed with hole-caps and PTFE/silicone septa. A mixed sample solution was heated at 60 °C for 30 min in order to establish equilibrium between liquid and vapour phases. VOCs were extracted by PDMS/CAR/DVB (50/30 µm thickness) SPME fiber obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The adsorption on fiber took 30 min at 60 °C and 400 rpm. Desorption was realized in injection port of GC in splitless mode at 220 °C for 2 min.

Gas chromatography

Gas chromatograph Agilent 7890A connected to Agilent 5975C MS detector was used in GC-MS experiments. The sample was introduced into GC via split/splitless injector heated at 250 °C working in splitless mode by Agilent SPME autosampler GC 80. Helium with purity 99,995 % was used as a carrier gas with a flow rate 1 ml min⁻¹. A 30 m DB-FFAP column (Agilent J & W Column, Agilent Technologies, USA) with i.d. 0.25 mm and film thickness 0.25 µm was used in GC-MS experiments. A temperature program started at 60 °C, after than temperature increased with a gradient 2 °C min⁻¹ to 150 °C followed by 10 °C min⁻¹ to 250 °C

Enantiomer separations were performed in two dimensional GC system containing two independent GC ovens. In this approach the VOC extracted from honeys were firstly separated in GC oven at achiral stationary phase. When chiral compound eluted from the first

column, a switching system switched this compound to the second GC oven with chiral stationary phase. The first gas chromatograph, identical with this used in GC-MS experiments, was connected via Dean's microfluidic switching system (Agilent Technologies, USA) to the second gas chromatograph Hewlett Packard 5890, which was equipped with FID detector. Helium with purity 99,995 % was used as a carrier gas with a flow rate in the DB-FFAP column 1 ml min⁻¹. The carrier gas flow was switched in Dean's microfluidic device either to restrictor (length 8.8 m, i.d. 0.18 mm) that ends in MS detector, or, if chiral compound has eluted from DB-FFAP column, to 20 m capillary column with 0.25 mm i.d. coated with permethyl-β-cyclodextrin anchored to silicone polymer – ChirasilDex (CHROMPACK International, The Netherlands) inserted in the second GC oven. The VOC separation in the first GC oven was performed under the same conditions as GC-MS experiments. Chiral separations of selected compounds were performed isothermally at 50 °C (linalool) or 75 °C.

Chemicals

Anhydrous NaCl used in sample treatment procedure was obtained from Mikrochem (Pezinok, Slovakia). DI water was prepared in laboratory using NANOpure device from Wilkem Werner GmbH. The racemic mixtures of linalool, 4-terpineol, α-terpineol, furanoid cis- and trans-linalool oxides, as well as, R-linalool were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The racemates of lilac aldehydes A, B, C and D were prepared in laboratory according to procedure published by Mosandl et al⁸. The racemate of hotrienol was prepared in laboratory from linalyl acetate by procedure described by Yuasa and Kato⁹. The studied VOC were identified by comparison of measured retention times and mass spectra with those obtained for racemic mixtures of standards injected under identical conditions. The elution order of linalool was determined by injection of racemic mixture enriched by pure R-linalool enantiomer. The elution order of other compounds on permethylated-β-CD was taken from published results¹⁰, except of lilac aldehydes and hotrienol, which according to our best knowledge, is not available in the literature.

Results and discussion

First of all, one of chestnut honey was analyzed to obtain a profile of volatile organic compounds. More than 270 compounds were detected. After closer look in composition of organic compounds it was found that those belong to various chemical classes (mostly terpenes, methyl and ethyl esters of higher fatty acids, aldehydes and ketons) and many of them are chiral. So, for enantiomer separation, chiral compounds with highest concentration that do not coelute with other compounds were selected for further studies, e.g. cis-linalool oxide, trans-linalool oxide, linalool, hotrienol, 4-terpineol, α-terpineol, lilac aldehyde,

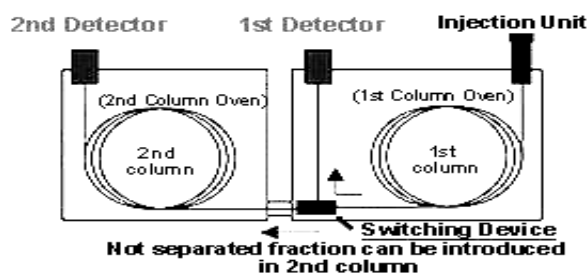


Fig. 1. Scheme of the multidimensional gas chromatography (MDGC) system used for enantiomer separations

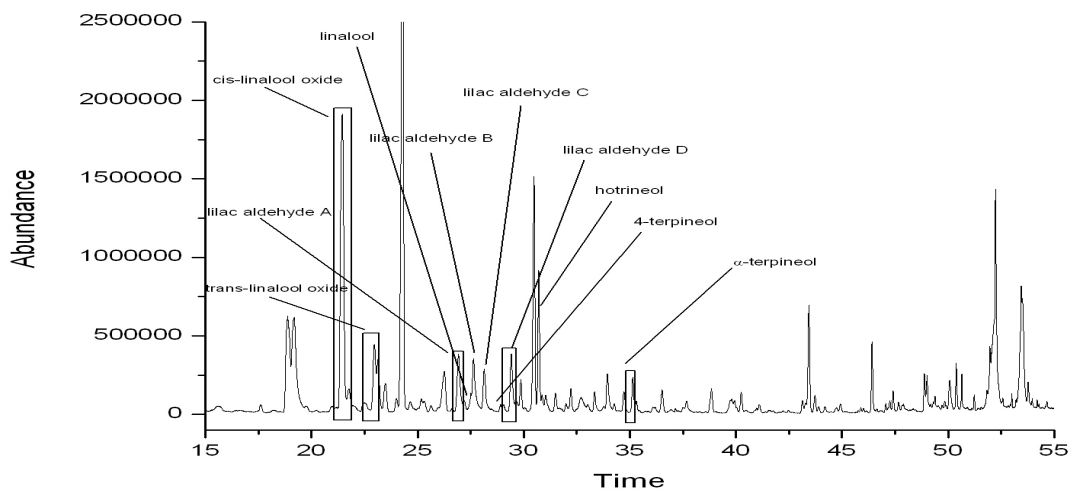


Fig. 2. The chromatogram obtained for eucalyptus honey on the DB-FFAP column under optimized working conditions

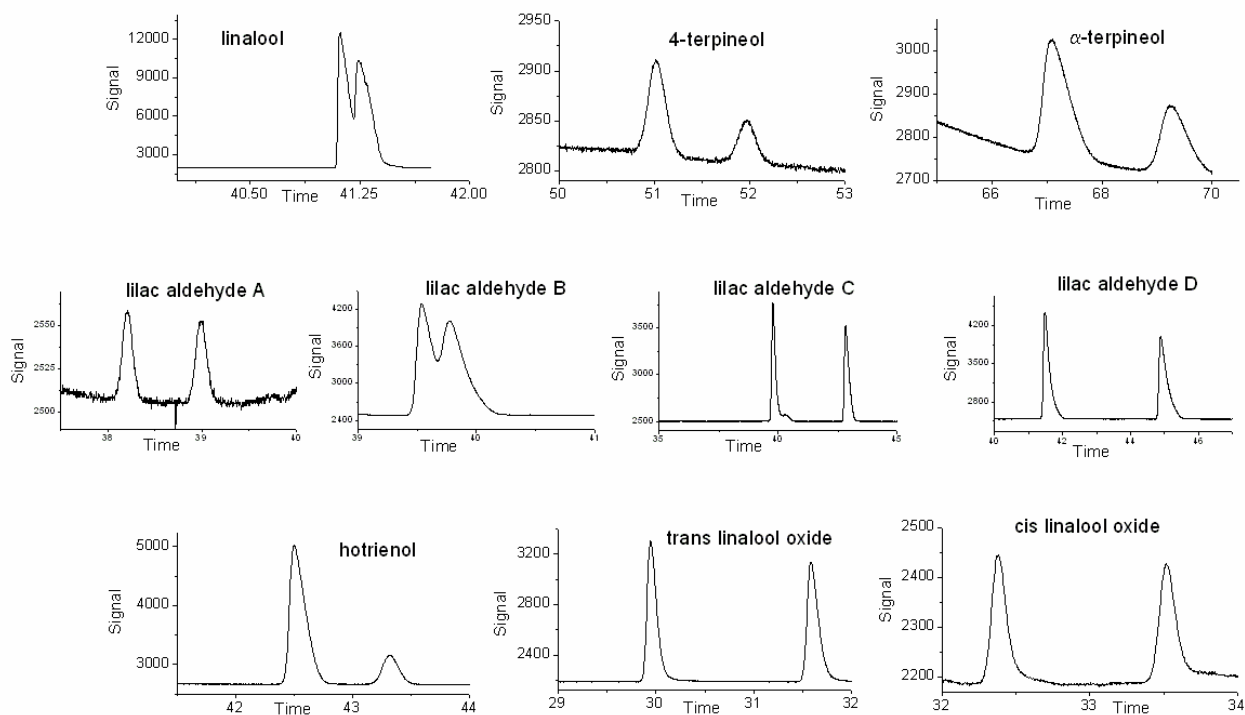


Fig. 3. Enantiomer separation of standards of studied VOC on ChirasilDex

isomer A, lilac aldehyde, isomer B, lilac aldehyde, isomer C, lilac aldehyde, isomer D.

Fig. 2 shows the chromatogram obtained for eucalyptus honey on the DB-FFAP column under optimized working conditions. Marked compounds were cut to the second dimension. Identification of these marked compounds was performed not only by MS, but also by injection of standards obtained from Sigma Aldrich. For these compounds the enantiomer ratio was determined. Nowadays, enantiomer ratio for linalool, cis- and trans-linalool oxides is determined, and enantiomer ratio for other compounds will be discussed in the next work. In the second step elution order of enantiomer was confirmed by injection of racemic mixture enriched with pure enantiomer into MDGC system under the same condition as real honeys samples. Enantiomer separation of standards of studied VOC on ChirasilDex can be seen on Fig. 3.

Previous results show that in case of cis-linalool oxide in eucalyptus honey enantiomer ratio varies in range between 70–80 %. In honeys from Italy and South Africa the first eluted enantiomer of linalool oxide is present at lower concentration level compare to second eluted enantiomer, while in Greece eucalyptus honey the first eluted enantiomer was predominant. The first eluted enantiomer of linalool in eucalyptus honey is predominant. In case of honey from Italy the first eluted enantiomer of cis-linalool oxide enantiomer ratio varies within range 42–48 %. It can be seen that all samples except of honeys from Italy (chestnut honey) have predominant the first eluted enantiomer of cis-linalool oxide. Only in chestnut honeys the first eluted enantiomer is minor. First eluted enantiomer of trans linalool oxide in sage honey from Croatia can be used as a marker for this honey, because almost pure first eluted enantiomer was found in this honey (purity better than 97 %). A characteristic enantiomer ratio 20:80 (first eluted enantiomer/second eluted enantiomer) was found in chestnut honeys from Italy.

Conclusion

The enantiomer ratios of furanoid linalool oxides, linalool, hotrienol, 4-terpineol, α -terpineol and all isomers of lilac aldehydes were determined in each honey of different botanical origin. The one dimensional GC with chiral stationary phases has a limited possibility to determine correct distribution of enantiomers in complicated matrices. Based on the results obtained in this work, MDGC is proposed as an effective method for the determination of enantiomer ratio.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA grant No. 1/0972/12.

REFERENCES

1. Kukurova K., Karovicova J., Kohajdova Z., Bilikova K.: *J. Food Nutr. Res.* 47, 170 (2008).
2. Escriche I., Kadar M., Juan-Borras M., Domenech E.: *Food Res. Int.* 44, 1504 (2011).
3. Vanhanen L. P., Emmertz A., Savage G. P.: *Food Chem.* 128, 236 (2011).
4. Castro Vázquez L., Díaz-Maroto M. C., Guchu E., Pérez-Coello M. S.: *Eur. Food Res. Technol.* 224, 27 (2006).
5. Bicchi C., Belliardo F., Frattini C.: *J. Apic. Res.* 22, 130 (1983).
6. Cuevas-Glory L. F., Pino J. A., Santiago L. S., Sauri-Duch E.: *Food Chem.* 103, 1032 (2007).
7. Soria A. C., Martínez-Castro I., Sanz J.: *J. Chromatogr., A* 1216, 3300 (2009).
8. Kreck M., Mosandl A.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2722 (2003).
9. Yuasa Y., Kato Y.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 4036 (2003).
10. Baigrie B. D., Chisholm M. G., Mottram D. S., in: *Flavour Science: Recent Developments*, p. 151. Hartnolls Ltd, Bodmin 1996.

INFLUENCE OF LOW HgCl₂ CONCENTRATIONS ON PRODUCTION CHARACTERISTICS AND MERCURY ACCUMULATION IN RAPESEED PLANTS

MATÚŠ PEŠKO^{a*} and KATARÍNA KRÁĽOVÁ^b

^a Department of Ecosozology and Physiotactics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, ^b Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic
pesko@fns.uniba.sk

Introduction

Nieboer a Richardson¹ used covalent index χ_m^2/r (where χ_m is electronegativity of the ions and r is ion radius) to describe softness of metal ions. This parameter indicates the ability of the ion to accept electrons and form covalent bonds and it increases with increasing softness. The ionic index Z^2/r (where Z is the ion charge and r is ion radius) correlates well with ionic interactions and indicates the propensity of the ion to form ionic bonds. Mercury is characterized by high value of covalent index (4.10) a low value of ionic index (3.63)² indicating that Hg prefer covalent binding mainly to *S*-donor ligands.

The study of the complex formation of Hg(II) with the twenty essential amino acids (present in all proteins), in aqueous solutions in the pH range 2.7–8.5 showed that cysteine had the highest stability constant (39.4), attributed to the binding with the sulfhydryl (thiol) group³. Thus, Hg may directly inhibit enzymes by interacting with protein SH-groups causing protein conformation changes and subsequent enzyme inactivation. Presently, about a hundred of enzymes are known to be inhibited by SH-group binding, with concomitant metabolic disorders⁴.

On the other hand, chelating of Hg(II) by the sulfhydryl group of phytochelatin is one of the most important mechanisms for Hg detoxification in plants^{5,6}. Binding of Hg to small biothiols such as glutathione and cysteine was confirmed as well^{7,8}.

The exposure of plants to excess Hg results in visible symptoms of phytotoxicity, such as reduced growth, chlorosis, etc.^{9,10}, and physiological disorders in plants¹¹. Mercury inhibits photosynthetic electron transport^{12,13} and it can substitute the central atom of chlorophyll Mg, what results in a breakdown of photosynthesis¹⁴. Binding of Hg (II) to water channel proteins is connected with the closure of leaf stomata and physical obstruction of water flow in plants^{15,16}. Excess Hg inhibits nutrient uptake¹⁷ and it can induce oxidative stress in plants by triggering the generation of reactive oxygen species^{18,19}.

Non-specific absorption of Hg to cell walls could be a way to immobilize the metal at the root level beside its

sequestration in the vacuoles of the root cells²⁰. Mercury belongs to elements with very low root to shoot translocation^{9,21,22} and it was reported that 95–99 % of the Hg taken up by the roots was immobilized and did not reach the shoots^{21,23}.

Kopittke et al.²⁴ evaluated the effects of Hg(II) on plants grown in solution across a range of plant species and experimental conditions and found that Hg toxicity (median toxic concentration 0.47 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg) exceeded that of Cu, Cd, As, Co, Ni, Zn and Mn. On the other hand, Peško et al.²⁵ investigated the phytotoxic effects of seven metal ions on germination and root length of five rapeseed (*Brassica napus* L. *subsp. napus*) cultivars registered in Slovakia and found that the inhibitory effectiveness of metal ions decreased in the following order: Cu > Cr > Hg > Cd > Pb > Ni > Zn.

The aim of this paper is to study the influence of low HgCl₂ concentrations on production characteristics and mercury accumulation in rapeseed plants (*Brassica napus* L., cv. Viking).

Material and methods

Analytical reagent-grade chemicals purchased from Centralchem (Bratislava) were used for the preparation of all solutions. Freshly distilled water was used in all experiments. For metal treatments HgCl₂ was used. The seeds of rapeseed (*B. napus* L.), cv. Viking were purchased from Slovak Centrum of Agricultural Production, Research Institute of Plant Production in Piestany, Slovakia. Viking is a medium early variety of rapeseed with 45 % oil content in dry mass of seeds which provides steady yield in all production regions and high yields in rapeseed production region²⁶.

Cultivation of rapeseed plants in the presence of HgCl₂

Seeds of rapeseed, cv. Verona were sown into the soil and after 3 weeks they were cultivated in hydroponic solution at controlled conditions (photoperiod 16 h light/8 h dark; irradiation: 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR; mean air temperature: 25 °C): control variant in Hoagland solution and metal variants containing Hg (0.1, 0.5, 1.0, 3.0 and 6.0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) and the response of plants to metal treatment was evaluated 7 d after metal application. For each experiment six plants were used. Then length of roots and shoots, fresh mass of leaves and dry mass of roots, stems and leaves were estimated and the results were evaluated by the multifactorial ANOVA algorithm ($P \leq 0.05$) after verification of normality and homogeneity of the variance. The multiple comparisons of means were based on the method of Tukey contrast.

Determination of water content in plant organs

Fresh (FM) and dry mass (DM) of roots and shoots was estimated and water content in plant organs (in g g^{-1} dry mass) was calculated as follows: $(\text{FM}-\text{DM})/\text{DM}$ (ref.²⁷).

Determination of Hg content in plants

Roots of plants used for Hg analysis were thoroughly washed by tap water to remove test solution from the exterior of roots. Plants organs were dried at 70°C and cut to small pieces ($< 1\text{ mm}$). All plants were processed for Hg analysis and the total root and shoot accumulation of Hg was determined. Mercury contents were determined using single-purpose atomic absorption spectrometer (AMA 254) based on *in situ* dry ashing followed by gold amalgamation cold vapour AAS. Standard reference Hg stock solution (1 g dm^{-3} , Merck, Germany) and the certified standard reference materials NCS DC 73350 Poplar Leaves (China) and NCS DC 733 49 Bush Branches and Leaves (China) were used to quality assurance of the results. The detection limit for Hg was $0.3\ \mu\text{g dm}^{-3}$. The precision of Hg determination ($n = 3$) expressed by relative standard deviation varied in the range from 1 % to 3 %.

Results and discussion

Plants exposed to $0.1\text{--}3.0\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ HgCl_2 did not show visual symptoms of phytotoxicity. On the other hand, the roots of plants treated with $6.0\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ of HgCl_2 were brownish, the leaves were slightly wilting but symptoms of chlorosis were not observed, nevertheless the height of plants was clearly lower than that of control plants. The dependence of root and shoot length of rapeseed plants treated with HgCl_2 is presented in Fig. 1A. The results clearly show that the length of roots was more reduced than that of shoots, although this reduction was rela-

tively low. The adverse effect of Hg on dry mass of rapeseed plant organs was similar (Fig. 1B), being also more pronounced for roots. These results are in agreement with previous findings^{9,28,29}. Du et al.¹⁰ estimated that Hg(II) applied at concentrations of 1.0 and $2.5\ \text{mg dm}^{-3}$ caused 50 % reduction in root biomass of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, while a 50 % reduction in shoot biomass occurred at Hg(II) concentrations of around $0.5\ \text{mg dm}^{-3}$. It can be assumed that this reduction of plant growth can be connected mainly with impaired uptake of nutrients³⁰, inhibition of photosynthesis^{12,13} and adverse effects of Hg on the water content of plant organs^{18,28,31}.

Dependence of water content in roots and leaves of *B. napus* plants on the applied HgCl_2 concentration is shown in Fig. 2. In the investigated concentration range the loss of water content in roots was linear with increasing HgCl_2 concentration. On the other hand, significant reduction of water content in leaves was observed only at the highest applied HgCl_2 concentration ($6\ \mu\text{mol dm}^{-3}$). These results are in agreement with findings of Esteban et al.²⁸ that water content of the roots and shoots of 28-day-old lupine plants treated with $5\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg was significantly lower than that of the untreated plant organs, although loss of water in roots was more pronounced. Shiyab et al.¹⁸ observed that *B. juncea* plants initially lost their cell moisture linearly with an increase in Hg concentration and when Hg concentrations reached certain level (10 and $100\ \text{mg kg}^{-1}$ in shoots and roots, respectively, for 2-week old plants), the relative water content already remained at approximately 72 % of the control plants. Moreno-Jimenez et al.³¹ found that *R. induratus* roots suffered higher reductions in water content (8 % and 20 % at 10 and $50\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg doses, respectively) and *M. vulgare* showed higher loss of water in shoots than in roots, and also than in *R. induratus* shoots.

Mercury content in roots and shoots of rapeseed plants increased linearly with the increasing HgCl_2 concentration (Fig. 3), nevertheless the Hg concentration ac-

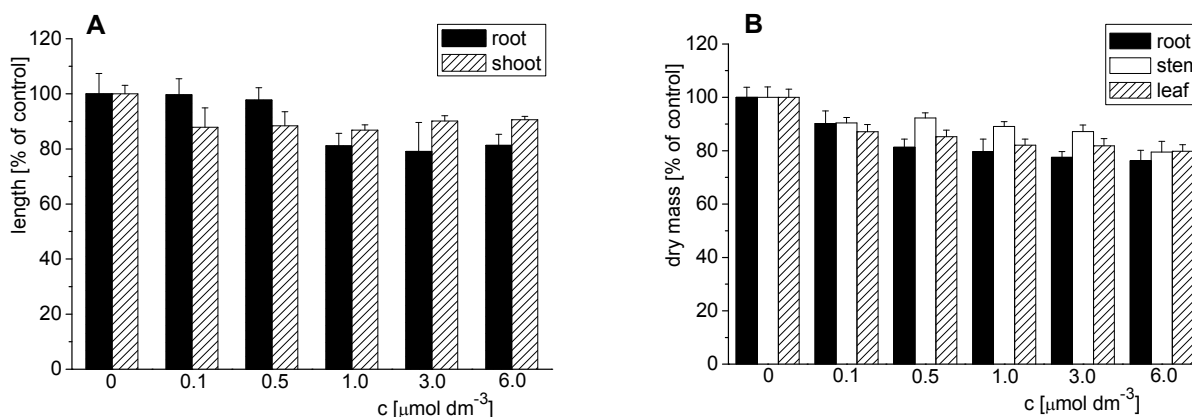


Fig. 1. Dependence of root and shoot length (A) and dry mass of roots, stems and leaves (B) of rapeseed plants on the applied HgCl_2 concentration. Mean \pm S.E; S.E. – standard error

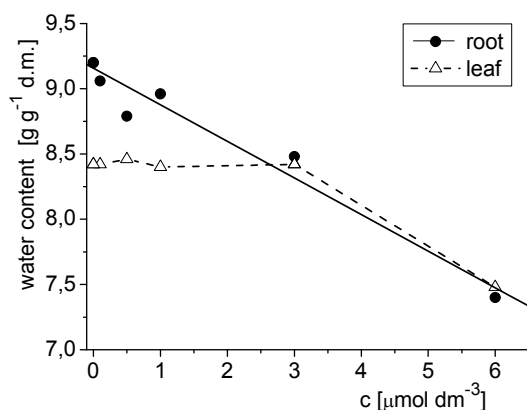


Fig. 2. Dependence of water content in roots (circles) and leaves (triangles) of *B. napus* plants on the applied HgCl_2 concentration

accumulated in rapeseed roots (in mg kg^{-1} dry mass) was significantly higher than that accumulated in the shoots. These results support previous findings of several researchers indicating that Hg is predominantly bound in cell wall of plant roots or it is stored in complex form with phytochelatins in plant root vacuoles²⁰. On the other hand, mercury concentration in plant organs of ten day old seedlings of *Brassica chinensis* which were exposed for three days to $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg were estimated $26\,089 \text{ mg g}^{-1}$ dry mass in roots and 2839 mg g^{-1} dry mass in shoots¹⁹.

Bioaccumulation factor (BAF) expresses the ratio of the metal concentration in biological material (in μmol or μg per g of the plant dry mass) to the metal concentration in external solution or soil (in μmol or $\mu\text{g dm}^{-3}$ soil) and it can be used to determine the effectiveness of plants in re-

moving metals from soils³². In the investigated concentration range of HgCl_2 (0.1 – $6.0 \mu\text{mol dm}^{-3}$) the BAF values related to roots varied in the range from 5520 to 3322, the BAF values related to shoots were considerably lower and they varied from 66.5 ($0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) to 5.47 ($6.0 \mu\text{mol dm}^{-3}$). These results indicate that *B. napus* could be used for preventing the leakage of Hg from contaminated soils via phytostabilisation. Low BAF values determined for shoots suggest low efficiency of rapeseed plants in phytoremediation of Hg-polluted substrate.

The translocation factor (TF), or shoot to root ratio corresponds to the ratio of accumulated metal concentration in shoots and roots, respectively and it can be used to determine the effectiveness of plants to translocate metal from the root to the shoot^{32–34}. The values of TF determined for studied rapeseed plants treated with low HgCl_2 concentrations were very low and they varied in the range from 0.0128 ($0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg) to 0.0013 ($6.0 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg). The dependence of TF on the applied HgCl_2 concentration showed exponential decrease with the increasing Hg concentration (Fig. 4A). The portion of Hg accumulated in shoots from the total metal amount up-taken by rapeseed plants varied from 26.12 % in plants treated with $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg to 3.8 % in plants exposed to $6.0 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg (Fig. 4B).

The results confirmed previous findings of several researchers indicating extremely low Hg mobility within the plants^{9,21,22}. Moreno-Jiménez et al.³¹ estimated shoot to root ratios of the Hg concentration in plants grown in perlite substrate in the presence of $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg as 0.099 for *Rumex induratus* and 0.121 for *Marrubium vulgare* plants. The TF in rice plants¹⁰ and in willow³⁵ cultivated in solution and treated with $0.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg was found to be 0.006 and 0.001, respectively. The values of TF determined in 28 day old lupine plants treated with 5 and $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Hg were 0.0054 and 0.0046 (ref.²⁸). Pérez-Sanz et al.³⁶ found that translocation factor for mercury in *Silene vulgaris* plants grown on contaminated spiked soils

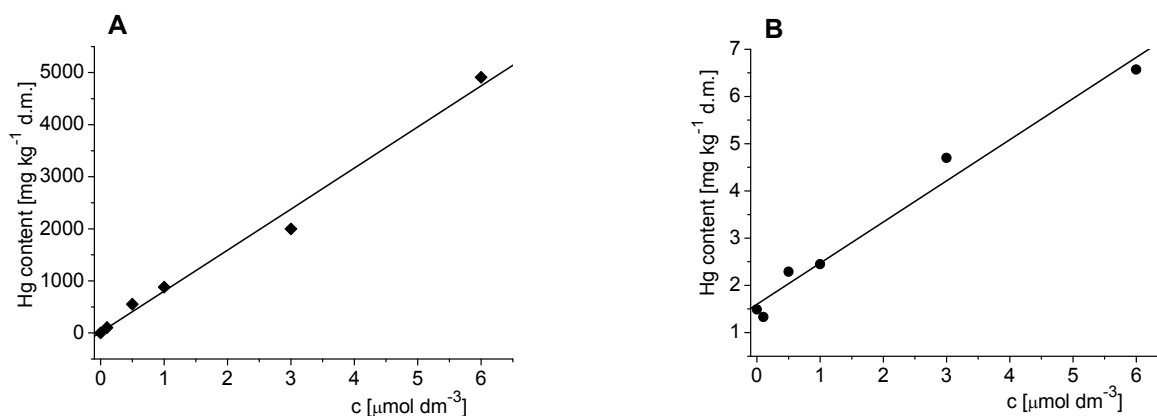


Fig. 3. Dependence of mercury content in roots (A) and shoots (B) of rapeseed plants on the applied HgCl_2 concentration; d.m. – dry mass

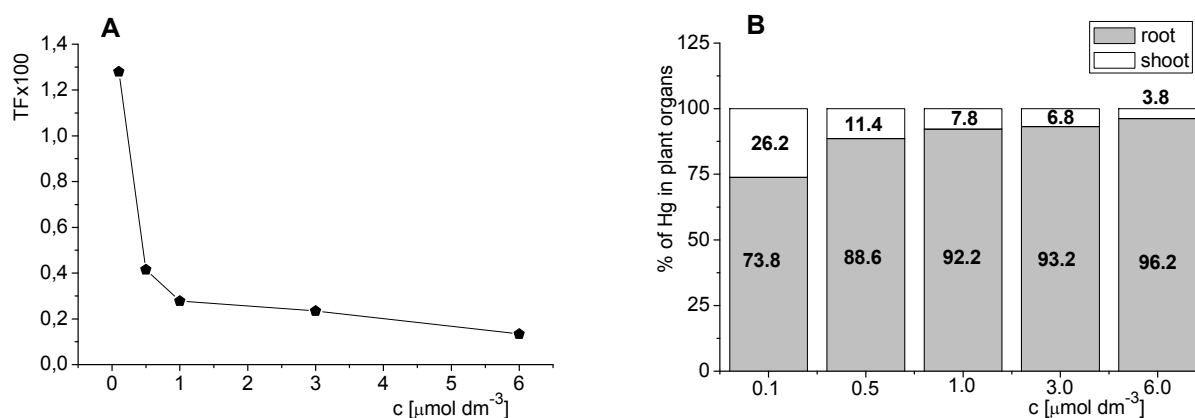


Fig. 4. Dependence of translocation factors (A) as well as portion of Hg occurring in roots (gray) and shoots (white) (B) of rapeseed plants on the applied HgCl_2 concentration

depended on the soil characteristics as well as on the external metal concentration. For plants grown in sandy clay loam (pH 8.5) containing 0.6 and 5.5 mg Hg kg^{-1} soil, the determined TF values were 0.27 and 0.15, whereas in plants cultivated in loam of pH 7.1, these values were 0.20 and 0.50, respectively.

Conclusion

Growth of *B. napus* plants, c.v. Viking cultivated in hydroponic solutions which were exposed to low mercury concentrations (0.1–6.0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) was adversely affected. This was reflected in reduced length of roots and shoots as well as reduced biomass of individual plant organs. Treatment with mercury decreased water content of roots and shoots of rapeseed plants. The loss of water content in roots was linear with increasing HgCl_2 concentration, nevertheless significant reduction of water content in leaves was observed only at the highest applied HgCl_2 concentration (6 $\mu\text{mol dm}^{-3}$).

Single-purpose atomic absorption spectrometer based on *in situ* dry ashing followed by gold amalgamation cold vapour AAS was used for monitoring mercury translocation within rapeseed plants cultivated in hydroponic solutions and treated with low HgCl_2 concentrations (0.1–6.0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, i.e. 0.02–1.20 mg dm^{-3}). Accumulated Hg concentration in plant organs increased linearly with increasing external Hg concentration, though Hg accumulation in roots of rapeseed plants was considerably higher than its accumulation in the shoots. This finding was reflected in low values of root to shoot translocation expressed by translocation factors which confirmed low mobility of Hg within rapeseed plants.

Due to high efficiency in accumulating Hg in the roots and very low translocation to the shoots, the plants of *B. napus*, cv. Viking could be used for preventing leakage of Hg from contaminated soils via phytostabilisation.

This study was financially supported by Development fund of Comenius University in Bratislava under the contract No, UK/210/2012 and by Sanofi Aventis Pharma Slovakia.

REFERENCES

- Nieboer E., Richardson D.H.S.: *Environ. Pollut.*, B 1, 3 (1980).
- Andersen O.: *Environ. Health Persp.* 54, 249 (1984).
- Van der Linden W.E., Beers C.: *Anal. Chim. Acta* 68, 143 (1973).
- Seregin V., Kozhevnikova A.D.: *Rus. J. Plant Physiol.* 53, 257 (2006).
- Morelli E., Ferrara R., Bellini B., Dini F., Di Giuseppe G., Fantozzi L.: *Sci. Total Environ.* 408, 286 (2009).
- Carrasco-Gil S., Alvarez-Fernandez A., Sobrino-Plata J., Millan R., Carpena-Ruiz R.O., Leduc D.L., Andrews J. C., Abadia J., Hernandez L.E.: *Plant Cell Environ.* 34, 778 (2011).
- Krupp E.M., Milne B.F., Mestrot A., Meharg A.A., Feldmann J.: (2008). *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1753 (2008).
- Chen L., Yang L., Wang Q.: *Metallomics* 1, 101 (2009).
- Patra M., Sharma A.: *Bot. Rev.* 66, 379 (2000).
- Du X., Zhu Y.G., Liu W.J., Zhao X.S.: *Environ. Exp. Bot.* 54, 1 (2005).
- Zhou Z.S., Huang S.Q., Guo K., Mehta S.K., Zhang P.C., Yang Z.M.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 1 (2007).
- Murthy S.D.S., Mohanty P.: *J. Biosci.* 18, 355 (1993).
- Šeršeň F., Kráľová K., Bumbálová A.: *Photosynthetica* 35, 551 (1998).
- Küpper H., Küpper F., Spiller M.: *J. Exp. Bot.* 47, 259 (1996).
- Zhang W.H., Tyerman, S.D.: *Plant Physiol.* 120, 849 (1999).

16. Maggio A., Joly R.J.: *Plant Physiol.* 109, 331 (1995).
17. Gupta M., Chandra P.: *Environ. Pollut.* 103, 327 (1998).
18. Shiyab S., Chen J., Han F.X., Monts D.L., Matta F.B., Gu M.M., Su Y.: *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 619 (2009).
19. Chen J., Shiyab S., Han F.X., Monts D.L., Waggoner C.A., Yang Z., Su Y.: *Ecotoxicology* 18, 110 (2009a).
20. Valega M., Lima A.I.G., Figueira E.M.A.P., Pereira E., Pardal M.A., Duarte A.C.: *Chemosphere* 74, 530 (2009).
21. Beauford W., Barber J., Barringer A.R.: *Physiol. Plant.* 39, 261 (1977).
22. Cavallini A., Natali L., Durante M., Maserti B.: *Sci. Total Environ.* 243/244, 119 (1999).
23. Cocking D., Rohrer M., Thomas R., Walker J., Ward D.: *Water, Air, Soil Pollut.* 80, 1113 (1995).
24. Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Asher C.J., Menzies N.W.: *J. Exp. Bot.* 61, 945 (2010).
25. Peško M., Kráľová K., Masarovičová E.: *Proceedings of ECOpole* 5, 83 (2011).
26. Descriptions of registered rapeseed varieties [In Slovak]. UKSUP Bratislava, 2009. http://www.uksup.sk/download/odrody/20090728_opisy_repka.pdf
27. Drazic G., Mihailovic N.: *Plant Sci.* 168, 511 (2005).
28. Esteban E., Moreno E., Peñalosa J., Cabrero J.I., Millán R., Zornoza P.: *Environ. Exp. Bot.* 62, 316 (2008).
29. Ling T., Fangke Y., Jun R.: *Res. J. Phytochem.* 4, 225 (2010).
30. Godbold D.L.: *Water, Air, Soil Pollut.* 56, 823 (1991).
31. Moreno-Jiménez E., Peñalosa J.M., Esteban E., Carpena-Ruiz R.O.: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 485 (2007).
32. Tu C., Ma L.Q.: *J. Environ. Qual.* 31, 641 (2002).
33. Stoltz E., Greger M.: *Environ. Exp. Bot.* 47, 271 (2002).
34. Deng H., Ye Z.H., Wong M.H.: *Environ. Pollut.* 132, 29 (2004).
35. Wang, Y., Greger, M.: *J. Environ. Qual.* 33, 1779 (2004).
36. Pérez-Sanz A., Millán R., Sierra M.J., Alarcón R., García P., Gil-Díaz M., Vazquez S., Carmen Lobo M.: *J. Environ. Manag.* 95, 233 (2012).

STANOVENIE SEVOFLURÁNU A JEHO METABOLITU HEXAFLUÓRIZOPROPANOLU METÓDOU GC-MS/MS

PETER PODOLEC*, JAROSLAV
BLAŠKO, RÓBERT KUBINEC,
GABRIELA ADDOVÁ, RENÁTA
GÓROVÁ, LADISLAV SOJÁK, IVAN
OSTROVSKÝ, ALEXANDRA
SZABÓOVÁ a JOZEF VIŠŇOVSKÝ

*Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta Univerzity Ko-
menského v Bratislave, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bra-
tislava 4, Slovenská republika
podolec@fns.uniba.sk*

Sevoflurán bol do klinickej praxe zavedený v roku 1990 ako inhalačné anestetikum a dnes patrí medzi sveto-vo najpoužívanéjšie anestetiká. Vďaka nízkemu rozdeľo- vaciemu koeficientu krv-plyn, teda nízkej rozpustnosti sevofluránu v krvi, umožňuje rýchle a bezproblémové uvedenie do anestézie a zároveň sa ľahko vylučuje z cen- trálneho nervového systému, čo umožňuje rýchle prebú- dzanie pacienta z anestézie. Sevoflurán sa rýchlo metaboli- zuje na primárny metabolit hexafluórizopropanol, ktorý je vylučovaný močom. Hexafluórizopropanol cirkuluje v krvi predovšetkým vo forme glukuronidu konjugátu. Nekonju- govaný hexafluórizopropanol predstavuje $\leq 15\%$ z celko- vej koncentrácie hexafluórizopropanolu. Stanovením se- vofluránu a hexafluórizopropanolu v biologických matri- ciach sa zaoberajú viaceré štúdie, ktoré využívajú headspa- ce v spojení s GC (HS-GC-FID alebo HS-GC-MS) systé- mom. Na rozdiel od sevofluránu, hexafluórizopropanol je vysoko polárna látka. Má vysoký rozdeľovací koeficient krv-plyn, čo spôsobuje problémy pri jeho stanovení metó- dou headspace.

Vypracovala sa rýchla a citlivá metóda simultánneho stanovenia anestetika sevofluránu a jeho polárneho meta- bolitu hexafluórizopropanolu priamym dávkovaním ľud- skej plazmy do plynového chromatografu. Priamym dáv- kovaním vzorky sa eliminoval vplyv strát prchavých zlo- žiek pri predúpravných krokoch spracovania vzoriek. Me- tóda je založená na priamom dávkovaní až 150 vzoriek

plazmy do GC systému bez nutnosti čistenia lineru injekto- ra. Pri teplote injektora $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nedochádza k degradácii makromolekúl, resp. polárnych látok nachádzajúcich sa v plazme a ani ku vzniku látok, ktoré by koeluovali s analytmi. Nepozorovalo sa zníženie účinnosti kolóny, ktoré by mohlo byť spôsobené znečistením začiatku koló- ny rozkladnými produktami. Metóda umožňuje simultánne stanovenie nepolárnych aj polárnych prchavých zložiek v plazme. Vypracovaná analytická metóda je veľmi rýchla, nevyžaduje si žiadnu úpravu vzorky. Navyše výsledok meraní v porovnaní s headspace metódou nie je zvyšova- ním teploty vzorky pred dávkovaním ovplyvnený a v prí- pade polárnejšieho, menej prchavého analytu stanovený obsah nezávisí od objemu vzorky vo vialke pri dávkovaní. V porovnaní s predchádzajúcimi metódami simultánneho stanovenia týchto analytov sa vyznačuje vyššou citlivos- ťou ako aj elimináciou chýb súvisiacich s manipuláciou vzorky v laboratóriu. Vyznačuje sa vysokou opakovateľ- nosťou a citlivosťou s detekčným limitom $0,009\text{ mg l}^{-1}$ pre sevoflurán a $0,018\text{ mg l}^{-1}$ pre hexafluórizopropanol v lineárnom rozsahu $0,050\text{--}150\text{ mg l}^{-1}$. Metóda sa použila na stanovenie koncentrácie sevofluránu a hexafluórizo- propanolu v plazme 7 pacientov po narkóze. Priemerná koncentrácia sevofluránu a voľného hexafluórizopropano- lu v plazme bola $57,2\text{ mg l}^{-1}$ a $0,39\text{ mg l}^{-1}$. Vyvinutá metó- da stanovuje voľný, nekonjugovaný hexafluórizopropanol. Najkritickejšim bodom metódy stanovenia sevofluránu a hexafluórizopropanolu je odber a spracovanie plazmy kvôli riziku odparenia a straty stanovovaných zlúčenín pri odbere krvi.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Výskum a vývoj nových technológií chemickej analýzy pre metabonomiku/metabolomiku“ ITMS: 26240220007 a projektu „Dobudovanie centra excelentnosti metód a procesov zelenej chémie“ ITMS: 26240120025 na zákla- de podpory operačného programu Výskum a vývoj finan- covaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Prá- cu podporila Agentúra na podporu výskumu a vývoja pod číslom projektu APVV-0416-10.

ŠTÚDIUM ANIÓNNOVO-VÝMENNEJ CHROMATOGRAFIE VYUŽÍVAJÚCEJ SKOKOVÉ GRADIENTY NA CHARAKTERIZOVANIE HUMÍNOVÝCH LÁTOK V ALKALICKOM PROSTREDÍ

**JANKA RÁCZOVÁ, MILAN HUTTA*
a JURAJ PESSL**

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
hutta@fns.uniba.sk

Úvod

Humínové látky (HL) sú prírodné materiály vyskytujúce sa v relatívne veľkom zastúpení v pôde, sedimentoch a vodách ako produkty chemickej a biologickej premeny zvieracích a rastlinných zvyškov¹. Humínové látky najčastejšie pozostávajú zo substituovaných aromatických zlúčenín, ktoré sú navzájom spojené pomocou alifatických reťazcov (polyoly, peptidy, cukry atď.)². Hlavné funkčné skupiny, ktoré prispievajú k ich povrchovému náboju a reaktivite sú fenolové, hydroxylové a karboxylové skupiny a preto HL môžu tvoriť cheláty s viacvalentnými kationmi ako sú Mg^{2+} , Ca^{2+} a Fe^{3+} . Vďaka chelátnym schopnostiam HL sú schopné viazať živiny pre rastliny ale aj remobilizovať ťažké kovy³. Humínové látky, ako prirodzené súčasti životného prostredia, ovplyvňujú mechanické a fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy, najmä štruktúru a textúru pôdy a jej stálosť, odolnosť a sorpčnú kapacitu. V súčasnosti je preto analýza a charakterizácia týchto prírodných materiálov veľmi žiadaná, hlavne kvôli ich dôležitosti pre pôdohospodárstvo, prvotnú úpravu vôd a ekológiu. Taktiež analýza humínových látok zohráva dôležitú úlohu v oblasti analytickej chémie.

Štruktúra HL ešte doposiaľ nie je celkom objasnená a to aj napriek tomu, že sú študované už takmer 200 rokov^{1,2}. Táto skutočnosť súvisí s ich chemickou, štruktúrnou a fyzikálnou polydispersitou, ktoré majú potom za následok veľkú neurčitost' analytického signálu takmer vo všetkých analytických metódach, ktoré sa zaoberajú výskumom a meraním humínových látok z makromolekulového pohľadu.

Analýza zložitých látok patrí v súčasnom období medzi aktuálne problémy, ktoré vedú k vývoju novej instrumentácie a nových separačných techník⁴. Dôležitosť separačných metód v chémii humínových látok, vrátane LC metód je vyzdvihnutá práve v prehľadovom článku Janaša a kol.¹. Z literatúry vyplýva, že najčastejšie používané separačné metódy pre analýzu a charakterizáciu humínových látok sú kolónové LC metódy (najmä RP-HPLC, SEC a ich kombinácie HPLC-SEC)⁵⁻⁷ a elektroseparačné metódy (najmä CZE, PAGE a mnohé iné)⁸⁻¹¹. Hutta a kol.^{5,13}, Góra a kol.¹⁴ a Halko a kol.¹⁵ poukázali na užitočnosť skokových gradientov v RP-HPLC, kombináciách RP-HPLC a SEC a tiež v IMAC na

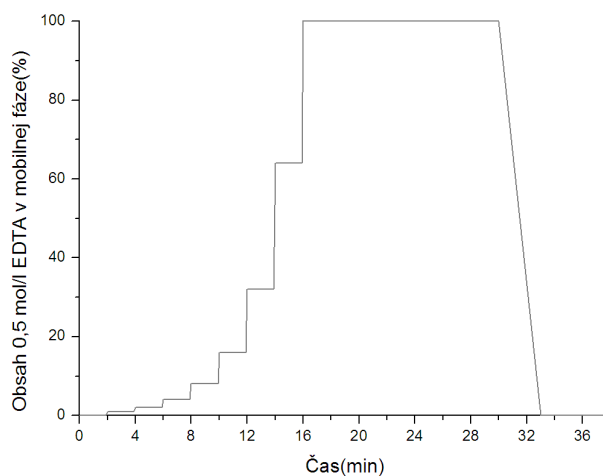
charakterizáciu humínových látok a tiež lignínu¹⁶ ako jedného z prekursorov humínových látok a humínovým látkam podobných látok¹⁷. Napriek priamemu dôkazu možného iónovo-výmenného mechanizmu, je nedostatočný počet článkov na túto tému. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli vyhodnotiť analytickú možnosť aplikácie skokového gradientu⁵ s aniónovo-výmennou chromatografiou pre charakterizovanie humínových kyselín (rôzneho pôvodu) v alkalickom prostredí.

Experimentálna časť

Prístroje a zariadenia

Štúdium retenčného správania a vyhodnocovanie spektrálnych charakteristík vybraných skupín humínových látok bola uskutočnená na HPLC systéme LaChrom (Merck-Hitachi, Darmstadt, Nemecko), ktorý sa skladal z pumpy L-7100, automatického dávkovača L-7200, termostatu L-7300, fluorescenčného detektora L-7480, rozhrania D-7000, počítača na zberanie dát so softvérom HSM ver. 3.1 a on-line 4 kanálovým odplyňovačom rozpúšťadla L-7612. Digitálny pH meter WTW inoLab pH 730 (Weilheim, Nemecko) vybavený kombinovanou sklenenou/AgCl elektródou bol používaný na meranie pH mobilnej fázy.

Separácia bola robená použitím sklenenej kolóny (30 × 3 mm) naplnenej ionexom Separon HEMA-BIO 1000 DEAE (Tessek, Praha, Česká republika) so 60 μm časticami. Prietoková rýchlosť bola nastavená v jednotlivých pokusoch na 0.50, 1.0, 1.5 a 2.0 ml min⁻¹. Zloženie mobilnej fázy A bolo nasledovné: vodný roztok dvojsodnej soli EDTA stitovaný NaOH na pH 12.0, kon-



Obr. 1. Schéma a tvar použitého skokového gradientu

centrácia EDTA⁴⁻ bola 5 mmol l⁻¹. Zloženie mobilnej fázy B bolo nasledovné: vodný roztok dvojsodnej soli EDTA stitovaný NaOH na pH 12.0, koncentrácia EDTA⁴⁻ bola 500 mmol l⁻¹. Tvar použitého skokového gradientu je vyobrazený na obr. 1. Rovnaký gradientový program bol použitý pre všetky prietokové rýchlosti jednotlivo. Teplota vnútri kolónového termostatu bola udržiavaná na 40.0±0.1 °C. Injektovaný objem roztoku vzorky bol 25 µl. Parametre fluorescenčnej detekcie boli nastavené na 480 nm (excitačná vlnová dĺžka) a 530 nm (emisná vlnová dĺžka) podľa publikovaných údajov¹².

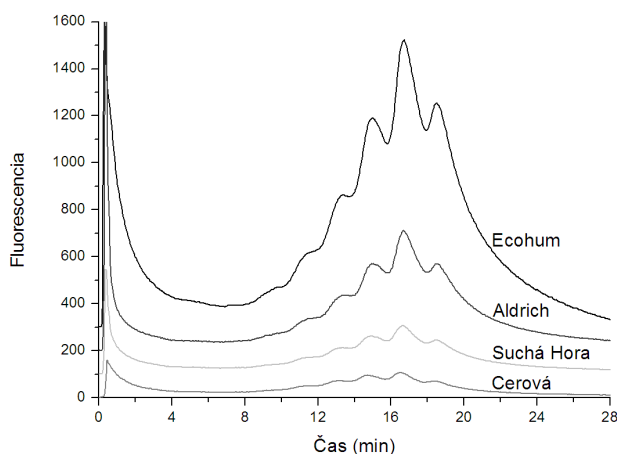
Chemikálie a roztoky

Komerčná humínová kyselina s relatívnou molovou hmotnosťou 500–1000 (podľa produktového cenníka) bola kúpená od firmy Sigma-Aldrich. Humínová látka Ecohum (izolovaná z rašeliny) bola komerčne dostupné hnojivo. Humínové kyseliny z lokalít Cerová a Suchá Hora boli izolované z rašeliny použitím frakcionačného postupu odporúčaného IHSS⁵.

Roztoky humínových látok boli pripravované denne čerstvé rozpustením naváženej humínovej kyseliny na koncentračnej úrovni 3 mg ml⁻¹ v 0.01 M NaOH. EDTA (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemecko) analytickej kvality bola použitá na prípravu tmivých roztokov mobilných fáz. Voda pre gradientovú HPLC bola pripravená z Labconco Pro-PS jednotky (Labconco, Kansas City, KS, USA). Hydroxid sodný (Merck, Darmstadt, Nemecko) analytickej kvality bol používaný na prípravu roztokov humínových látok.

Výsledky a diskusia

Navrhnutá chromatografická metóda využívajúca skokový gradient s fluorimetrickou detekciou bola použitá



Obr. 2. Chromatografické profily vybraných humínových látok (HK Cerová, HK Aldrich, HK Ecohum). Podmienky: prietoková rýchlosť: 1.0 ml min⁻¹, teplota 40 °C, injektovaný objem 25 µl. Ostatné podmienky sú popísané v Experimentálnej časti

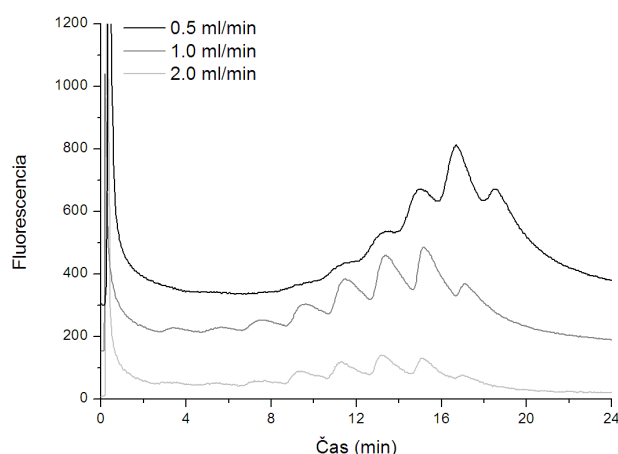
na charakterizáciu humínových látok pomocou ich chromatografických profilov. Na obr. 2 je vidieť charakteristické vzory profilov pochádzajúcich z analýzy humínových látok rôzneho pôvodu. Profily pík sú vytvorené pomocou tvaru skokového gradientu. Chromatografické profily študovaných HL sme rozdelili na 2 časti: nezadržané látky (eluované slabou elučnou zložkou, integrácia od 0 min do 4 min) a zadržané látky (eluované so silnou elučnou zložkou, integrácia od 4 min do 30 min).

Z chromatografického záznamu je zjavné, že profily vybraných humínových látok sú rozdielne, kvôli rôznemu pôvodu týchto humínových látok (humínová kyselina Aldrich bola kúpená od firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko), humínová kyselina Ecohum bol komerčne dostupný preparát a humínové kyseliny Cerová a Suchá hora boli získané vďaka postupom, ktoré publikovali Hutta a kol.⁵). Ďalej sme porovnávali profily týchto vybraných humínových kyselín pri rôznych prietokových rýchlostiach (0.5, 1.0 a 2.0 ml min⁻¹). Tieto chromatografické profily môžeme vidieť na obr. 3.

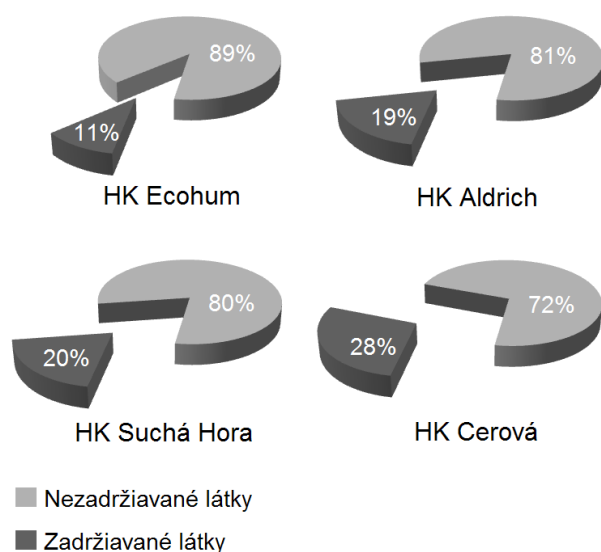
Z tohto chromatografického záznamu vyplýva, že so vzrastajúcou prietokovou rýchlosťou dochádzalo k znižovaniu fluorescenčného signálu, kvôli zriedeniu separovaných zložiek humínových látok väčším objemom rozpúšťadla v každom danom skoku gradientu mobilnej fázy pri vyšších prietokových rýchlostiach. Pri vyšších prietokových rýchlostiach (1.0 a 2.0 ml min⁻¹) sme pozorovali nárast rozlíšenia pri separácii chromatografických pík humínových látok.

Ako ďalšiu úlohu sme sa rozhodli vyhodnotiť percentuálny podiel zadržovaných a nezadržovaných látok pre jednotlivé vybrané humínové kyseliny. Tento percentuálny podiel vo forme koláčových diagramov je znázornený na obr. 4.

Z vyššie uvedeného diagramu vyplýva, že každá humínová kyselina obsahuje odlišné percento ako zadrživa-



Obr. 3. Chromatografické profily vybranej humínovej látky (HK Aldrich) pri rôznych prietokových rýchlostiach (0.5, 1.0 a 2.0 ml min⁻¹). Podmienky: teplota 40 °C, injektovaný objem 25 µl. Ostatné podmienky sú popísané v Experimentálnej časti



Obr. 4. Koláčový diagram znázorňujúci percentuálny podiel zadržovaných a nezadržovaných látok pre vybrané humínové látky

ných tak aj nazadržovaných látok. Najmenšie percento zadržovaných látok obsahuje HK Ecohum (11 %), nasleduje HK Aldrich (19 %), potom HK Suchá Hora (20 %) a najväčšie percento zadržovaných látok obsahuje HK Cerová (28 %). Naopak najmenšie percento nezadržovaných látok teda obsahuje HK Cerová (72 %), nasleduje HK Suchá Hora (80 %), potom HK Aldrich (81 %) a najväčšie percento zadržovaných látok obsahuje HK Ecohum (89 %). Je to spôsobené najmä ich rozličným pôvodom a mnohými inými faktormi, ktorých výskum je predmetom ďalšieho výskumu.

Záver

Z dosiahnutých výsledkov môžeme povedať, že navrhnutá metóda aniónovo-výmennej chromatografie založená na krátkych kolónach naplnených stredne bázičným anexam obsahujúcim dietylamoetylové funkčné skupiny, kombinovaná so skokovou gradientovou elúciou pomocou roztokov EDTA⁴⁻ s pH 12, je sľubnou metódou, ktorá umožňuje charakterizovať rôzne humínové látky a typy pôd s ohľadom na prírodný pomer humínových a fulvokyselín.

Táto práca bola finančne podporená projektmi VEGA 1/1349/12, APVV-0597-07 v rámci činnosti Centra excelentnosti VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

- Janoš P.: J. Chromatogr., A 983, 1 (2003).
- Wood S. A.: Ore Geology Reviews 11, 1 (1996).
- http://en.wikipedia.org/wiki/Humic_acid (01.03.2012)
- Ráčzová J.: *Rigorózna práca*, Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Bratislava 2011
- Hutta M., Góra R.: J. Chromatogr., A 1012, 67 (2003).
- Janoš P., Zatrepáľková I.: J. Chromatogr., A 1160, 160 (2007).
- D'Orario V., Senesi N.: Soil Biol. Biochem. 41, 1775 (2009).
- Kopáček I., Kaniansky D., Hejzlar J.: J. Chromatogr., A 545, 461(1991).
- Nagyová I., Kaniansky D.: J. Chromatogr., A 916,191 (2001).
- Lourdes Pacheco M., Havel J.: Electrophoresis 23, 268 (2002).
- Cavani L., Ciavatta C., Trubetskaya O. E., Reznikova O. I., Afanaseva G. V., Trubetskoj O.A.: J. Chromatogr., A 983, 263 (2003).
- Zeichmann W.: *Huminstoffe*, Chap.1, p.191, Verlag Chemie, Weinheim 1980.
- Hutta M., Góra R., Halko R., Chalányová M.: J. Chromatogr., A 1218, 8946 (2011).
- Góra R., Hutta M., Rohárik P.: J. Chromatogr., A 1220, 44 (2012).
- Halko R., Neuročný T, Hutta M.: Polish J. Soil Sci. XLII/2, 149 (2009).
- Góra R., Hutta M., Vrška M., Katuščák S., Jablonský M.: J. Sep. Sci. 29, 2179 (2006).
- Góra R., Hutta M.: J. Chromatogr., A 1084, 39 (2005).

VOLTAMPÉROMETRICKÉ STANOVENIE KOFEÍNU NA BÓROM DOPOVANEJ DIAMANTOVEJ ELEKTRÓDE

MIROSLAV RIEVAJ^a, LUBOMÍR ŠVORC^{a*}, JANA SVÍTKOVÁ^a, PETER TOMČÍK^b a DUŠAN BUSTIN^a

^a Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,
^b Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Katolícka univerzita v Ružomberku, Hrabovská cesta 1, 034 01 Ružomberok, Slovenská republika
lubomir.svorc@stuba.sk

Elektroanalytické metódy predstavujú vďaka svojej jednoduchosti, rýchlosti, cenovej a časovej nenáročnosti často spoľahlivú alternatívu k rutinne používaným separačným metódam. Študovaná látka – kofeín je xantínový alkaloid, ktorý sa pridáva do rôznych energetických nápojov a farmaceutických produktov ako sú lieky proti nádche a chrípke. V potravinách sa najčastejšie stanovuje kvapalinovou chromatografiou alebo fotometricky. Práca sa za-

oberá vývojom novej elektrochemickej metódy na stanovenie stopových množstiev kofeínu založenej na využití bórom dopovanej diamantovej elektródy ako citlivého a selektívneho elektrochemického senzora bez modifikácie povrchu a elektrochemickej predúpravy. Elektrochemicky možno kofeín stanoviť jeho oxidovaním pri značne kladných potenciáloch (+1.5 V vs. Ag/AgCl). Cieľom práce bol výber vhodného elektrolytu, štúdium a optimalizácia experimentálnych a inštrumentálnych podmienok pre elektrochemickú oxidáciu kofeínu (vplyv pH a polarizačnej rýchlosti) pomocou cyklickej a diferenciálnej pulzovej voltampérometrie. Dosiagnuté analytické parametre charakterizujúce výkonnosť metódy boli: medza detekcie LOD = 0.15 $\mu\text{mol l}^{-1}$, lineárny koncentračný rozsah 0.4–25 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a opakovateľnosť RSD = 2.1 %. Aplikovateľnosť metódy bola overená na modelových a reálnych vzorkách niektorých komerčných nápojov so spoľahlivými výsledkami.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (projekty č. 1/0182/11 a 1/0008/12) a Programom na podporu mladých výskumníkov (č. 6406).

POROVNANIE OBSAHU TOXICKÝCH A MINERÁLNYCH PRVKOV V ODRODÁCH MAKU REGISTROVANÝCH A PESTOVANÝCH NA SLOVENSKU

MÁRIA KOREŇOVSKÁ* a JANA SÁDECKÁ

*Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75
Bratislava, Slovensko
korenovska@vup.sk, sadecka@vup.sk*

V súčasnom období je mak pestovaný prevažne na potravinárske účely (používa sa v cukrovinkárstve a na výrobu oleja) a pre farmaceutické účely, ale napriek medzinárodným dohodám je v mnohých oblastiach pestovaný tiež ako „nelegálny“ zdroj ópia (najmä v chudobnejších ázijských štátoch). Medzi najvýznamnejších pestovateľov vo svete patria Turecko, India, Pakistan a Macedónsko.

Na Slovensku sa pestuje mak siaty asi na 2000 ha (v roku 2010) a odrody, ktoré sa pestujú sú publikované v Spoločnom katalógu EU odrôd poľných plodín. Zaregistrovaných je 9 odrôd maku, z toho 7 slovenskej proveniencie (Albín, Bergam, Gerlach, Major, Malsar, Maratón, Opal) vyšľachtených vo Výskumno-šľachtiteľskej stanici Malý Šariš. Priemerný obsah morfinu je v nich 0,4–0,6 %, a preto je makovina týchto odrôd pre spracovateľa nezáujímavá. Mak siaty odroda Lazur, ktorá je ekonomicky zaujímavá hlavne pre predaj makoviny, je zase z hľadiska spotreby maku na potravinárske účely nepoužiteľná. V našej práci sme sa zamerali na tieto odrody a sledovali sme obsahy toxických a rizikových prvkov (olova, kadmia, ortuti, chrómu, niklu, molybdénu) a tiež obsahy minerálnych prvkov (sodíka, vápnika, horčíka, železa, medi a zinku) v nich. Všetky odrody boli dopestované na pokusných poličkách v Malom Šariši v roku 2007 a 2011.

Na stanovenie prvkov sme použili metódu atómovej absorpčnej spektrometrie v grafitovej piecke a na plameni (Perkin Elmer 4100, HGA700). Vzorky maku sme pred samotným meraním rozkladali v prostredí kyseliny dusičnej vo vysokotlakovom mikrovlnnom systéme Milestone 1200 MEGA 2000. Správnosť metódy sme potvrdili metódou výtlačnosti stanovovaného prvku prídavkom do matrice pred mineralizáciou vzorky na dvoch koncentračných hladinách, nakoľko CRM danej matrici sme nemali. Výťažnosť sa pohybovala v rozmedzí 96–105 %. Ortuť sme

merali na jednoúčelovom ortuťovom analyzátore AMA 254 priamo bez predchádzajúceho rozkladu.

Zistili sme, že obsah toxického prvku ortuti vo všetkých odrodách maku bol v rozsahu od 0,0062 po 0,0102 mg kg⁻¹, najnižší obsah bol v odrode Lazur a najvyšší v odrode Maratón. Rozsah obsahu kadmia bol od 0,288 po 0,662 mg kg⁻¹, najmenšie množstvo bolo v odrodách Lazur, Malsar a Gerlach, najväčšie v odrode Albín. Olovo bolo v rozsahu od 0,028 po 0,210 mg kg⁻¹, najmenšie množstvo bolo opäť v odrodách Gerlach, Malsar a najväčšie v odrodách Lazur a Albín. Množstvo niklu bolo v rozmedzí 1,53 až 2,85 mg kg⁻¹ pričom najmenej niklu bolo namerané v odrode Bergam a najviac opäť v odrode Albín. Množstvá chrómu boli vo všetkých odrodách približne rovnaké od 0,165 po 0,264 mg kg⁻¹, ale najviac chrómu sme namerali znovu v odrode Albín. Molybdén bol však nameraný v najmenšom množstve práve v odrode Albín (0,324 mg kg⁻¹) a najväčšom v odrodách Opal (1,66 mg kg⁻¹) a Malsar (1,45 mg kg⁻¹). Minerálne prvky sodík, horčík a meď boli približne v rovnakých množstvách zistené vo všetkých odrodách maku: Na (114 až 158 mg kg⁻¹), Mg (1611 až 1649 mg kg⁻¹) a Cu (13,8 až 17,4 mg kg⁻¹). Zinok sa v najväčšom množstve nachádzal v odrode Albín (95,4 mg kg⁻¹) a najmenšom v odrode Malsar (54,2 mg kg⁻¹) rovnako to bolo aj v prípade železa (Albín 320 mg kg⁻¹ a Malsar 54,2 mg kg⁻¹). Obsah minerálneho prvku vápnika bol opäť najvyšší v odrode Albín (16 899 mg kg⁻¹) a najnižší v odrode Lazur (12 818 mg kg⁻¹).

Na záver môžeme konštatovať, že obsahy niektorých toxických, ale aj minerálnych prvkov (Cd, Pb, Ni, Mo a Fe) sa líšia v závislosti od pestovanej odrody, nakoľko východiskové podmienky pestovania všetkých sledovaných odrôd boli rovnaké. Najväčšie množstvo toxických, ale aj minerálnych prvkov však obsahovala odroda Albín. Tieto naše zistenia sú len predbežné a v ďalšej fáze riešenia tejto problematiky sa zameriame na ich overenie.

Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu APVV-0248-10 pod názvom “ Rastliny maku siateho produkujúce semeno s lepšími vlastnosťami pre potravinársky priemysel”.

KOMPARÁCIA EKOLOGICKEJ A KONVENČNEJ PRODUKCIE VYBRANÝCH SLOVENSKÝCH ODRODOVÝCH VÍN RÔZNYMI ANALYTICKÝMI METÓDAMI

JANA SÁDECKÁ* a MILAN SUHAJ

*Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75
Bratislava, Slovensko
sadecka@vup.sk, suhaj@vup.sk*

Anionické profilové dáta diskriminujúce slovenské organické a konvenčné vína boli získané metódou kapilárnej izotachofórey. Bolo analyzovaných 17 biovín (12 bielych a 5 červených) a 21 konvenčných (19 bielych a 10 červených) odrodových vín s obsahom alkoholu 11 až 13 % obj. s atribútom „neskorý zber“ alebo „špeciálny zber“ troch bielych odrôd (Chardonnay, Rulandské biele a Tramín červený) a dvoch červených odrôd (Rulandské modré a Cabernet Sauvignon). Vzorky biovín a konvenčných vín pochádzali zo susediacich vinohradov v modrokamenskom vinohradníckom rajóne. Väčšina analyzovaných vzoriek mala chránené označenie pôvodu (PDO) a bola získaná v r. 2007–2009 od jediného slovenského producenta biovín Víno Natural Domin & Kušický, s.r.o. a od konvenčného producenta Agro-Movino, s.r.o., Veľký Krtíš. Kapilárna elektroforéza bola realizovaná na elektroforetickom analyzátore EA 202M (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko). Vodiaci elektrolyt: 5 mM HCl obsahujúcej 0.1 % MHEC (methylhydroxyethylcellulose) s pH 3.5; zakončujúci elektrolyt: 5 mM kaprónová kyselina; nástrek vzorky 30 μ l; prúd v predseparačnej kapiláre 200 μ A; prúd v analytickej kapiláre 20 μ A; konduktometrická detekcia. Predseparačná kapilára (80 mm \times 0.8 mm i.d.) a analytická kapilára (160 mm \times 0.3 mm i.d.) boli vyrobené z etylpropylénového kopolyméru. Štatistická analýza: Viacnásobné štatistické porovnanie anionických obsahov organických kyselín v biovínach a konvenčných vínach boli realizované metódou Kruskal-Wallis One-Way ANOVA s “t” distribúciou a pomocou viacnásobného mediánového testu. Hladina štatistickej významnosti bola posudzovaná pri hodnote $P \leq 0.05$ a bola považovaná za vysoko významnú pod hodnotou $P < 0.001$. Z viacrozmerných pattern recognition technik sa použili faktorová analýza (FA) and kanonická diskriminačná analýza (KDA) s klasifikačnou procedúrou. Pre uvedené účely sa použil štatistický program Unistat v.5.6 (Unistat, London, United Kingdom).

Pri zisťovaní štatisticky významných rozdielov medzi vzorkami podľa ich príslušnosti k bio-, resp. konvenčnému typu vín sa zistili diferencie v priemernom obsahu kyseliny vínnej, citrónovej, mliečnej, jantárovej, glykovej, síranov a fosforečnanov. Organické vína vykazovali vyššie hodnoty v celkovom obsahu aniónov v porovnaní s príslušnými konvenčnými vzorkami. Prezentácia dát metódami hlavných komponentov, ako aj faktorovou analýzou rezultovala tvorbou klastrov, v ktorých sa vzorky

delili prevažne do dvoch skupín príslušných produkčných typov vín. Kanonická diskriminačná analýza vín klasifikovala vzorky so 100% správnosťou do sledovaných typov organických a konvenčných vín v prípade, že sa zvlášť analyzovali vína biele a zvlášť vína červené. Rozpoznávací schopnosť tohto modelu klesla iba o 10 %, keď sa vzorky bielych a červených vín klasifikovali spoločne. V prípade testovania predikčnej schopnosti anionického modelu, kedy časť dát bola v systéme anonymná, bola úspešnosť klasifikácie bielych i červených vín na úrovni 90 %. Nájdené diskriminujúce markery môžu byť užitočné v kombinácii s inými študovanými deskriptormi v súčasnosti vyvíjaných autentifikačných procedúr organických vín.

Pre štúdium a zostavenie profilov prchavých organických zlúčenín – ako nositeľov senzorických vlastností – ekologicky a konvenčne produkovaného slovenského odrodového vína variety Rulandské biele 2008 (suché, neskorý zber) boli použité metódy plynovej chromatografie (GC/FID, GC/MS). Cieľom štúdie bolo zistiť kvalitatívne a kvantitatívne diferencie v profíloch prchavých frakcií vína odlišujúcich organickú produkciu vína od konvenčnej.

Isolácia prchavých frakcií vína bola zrealizovaná podľa metódy uvedenej v publikácii Ferreira a kol.¹ extrakciou freónom 113 (1,1,2-trichlórtfluoretán). Extrakty prchavých aromatických zlúčenín boli separované a analyzované hmotnostnou spektrometriou, využitím plynového chromatografu Agilent Technologies 6890N, vybaveného hmotnostným detektorom Agilent Technologies 5973. Vzorky sme dávkovali bezdeličovou technikou (splitless) na kapilárnu kolónu ULTRA 1 (50 m \times 0,20 mm \times 0,33 μ m), pri teplotnom programe 35 $^{\circ}$ C (0,5 min), 2 $^{\circ}$ C min⁻¹, 250 $^{\circ}$ C. Teplota injektora bola 250 $^{\circ}$ C. Ako nosný plyn sa použilo hélium. Ionizačná energia bola 70 eV. Namerané MS spektrá jednotlivých zlúčenín prchavej frakcie vína boli porovnávané s knižnicami hmotnostných spektier (NIST, WILLEY) referenčných materiálov.

V ďalšom kroku extrakty boli analyzované na plynovom chromatografe Hewlett Packard HP 5890 II, vybavenom plameňovo-ionizačným detektorom. Vzorky boli dávkovane splitless technikou na kapilárnu kolónu ULTRA 1 (50 m \times 0,32 mm \times 0,52 μ m) pri teplotnom programe 35 $^{\circ}$ C (0,5 min), 2 $^{\circ}$ C min⁻¹, 250 $^{\circ}$ C. Teplota injektora bola 250 $^{\circ}$ C. Ako nosný plyn bol použitý vodík, $u_{H_2} = 34,6$ cm s⁻¹. Lineárne retenčné indexy (LRI) prchavých zlúčenín – ako nezávislé identifikačné údaje k údajom získaným pomocou MS-spektier – boli vypočítané podľa vzťahu Van den Doola a Kratz² s využitím *n*-alkánov C₆-C₂₀ ako porovnávacích štandardov a porovnané s databázou LRI referenčných materiálov. Relatívne zastúpenie jednotlivých zlúčenín bolo vypočítané metódou vnútornej normalizácie a vyjadrené ako relatívne percentá.

Na základe získaných výsledkov sa dá usúdiť, že typ produkcie vína vo vzorkách Rulandské biele 2008 (suché, neskorý zber) nemal významný vplyv na kvalitatívne zastúpenie týchto profilov, okrem zlúčenín β -cyklocitral, etyl-3-metylbutyl sukcinát a etylfenyl laktát. β -Cyklocitral a etyl-3-metylbutyl sukcinát neboli detegované vo vzorke biovína, naopak, etylfenyl laktát nebol detegovaný v konvenčnej vzorke vína.

Iná situácia je však z pohľadu kvantitatívnej analýzy: dominantnými látkami v analyzovaných vzorkách biovína i konvenčného variantu, čo sa týka relatívneho zastúpenia, sú tieto zlúčeniny: 3-metyl-butanol, etylhydrogén sukcinát + kyselina octová + etyl oktanoát, etyl acetát + 2-metyl-1-propanol, 2-fenyletanol + linalol, dietyl sukcinát a β -tujén + β -pinén + kyselina hexánová + etyl hexanoát, avšak s inými hodnotami ich relatívneho zastúpenia v prchavej frakcii vína v závislosti na type produkcie (bio versus konvenčná). Zastúpenie 3-metyl-1-butanolu vzrástlo vplyvom typu produkcie z cca 23 % v konvenčnej vzorke vína na cca 33 % v biovíne. Podobne je to aj v prípade 2-fenyletanolu + linalolu, ktorých sumárne relatívne zastúpenie vo vzorke biovína významne vzrástlo na dvojnásobok (z cca 5 % v konvenčnej vzorke na cca 10 % v biovíne). Obsah dietyl sukcinátu mierne poklesol v konvenčnej vzorke vína (6,6 %) v porovnaní s ekologickou produkciou (7,2 %). Naopak, v predmetnom type biovína bol nameraný nižší celkový obsah – cca 12 % – trojice zlúčenín etylhydrogén sukcinát + kyselina octová + etyl oktanoát v komparácii s konvenčnou vzorkou vína (cca 22 %). Podobne, čo sa týka zhodnotenia vplyvu oboch typov produkcie vína na relatívne zastúpenie prchavých aromatických látok β -tujén + β -pinén + kyselina hexánová + etyl hexanoát, biovíno vykazovalo cca 1/2-ný podiel týchto zlúčenín v porovnaní s konvenčným variantom (4,5 % vs. 8,6 %). Naopak, obsah etyl acetátu + 2-metyl-1-propanolu bol cca o 1/3 vyšší vo vzorke biovína v porovnaní s klasickým typom produkcie.

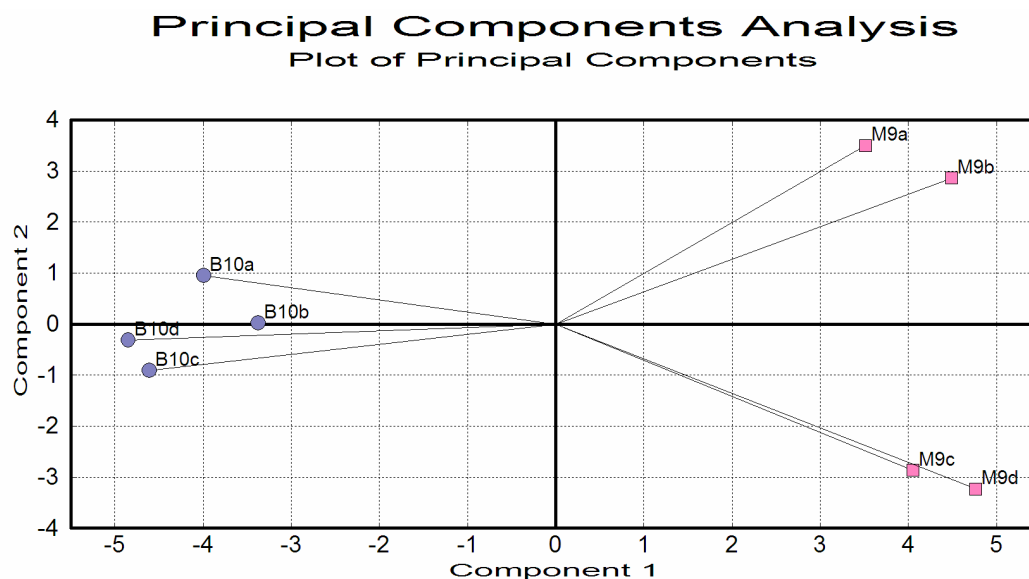
Z porovnania získaných profilov prchavých aromatických zlúčenín vína oboch variantov produkcií je dôležitý fakt, že prítomné estery v počte 10 – ako jedna zo skupín látok podstatne ovplyvňujúcich organoleptické vlastnosti vína – boli spravidla zastúpené v ekologickej produkcii v nižších koncentráciách ako v konvenčnej produkcii vín. Výnimkou je však ester etyl laktát (látka s maslovo-smotanovou arómou s podtónom kokosu), kde je to vo významnej miere naopak (4,2 % v biovíne vs. 0,3 % v konvenčnom víne). Na margo toho, analýzy predmetného Rulandského bieleho korelujú so zisteniami v publikácii zahraničných autorov³, že organoleptický charakter konvenčných vín býva v porovnaní s ekologickou produkciou spravidla viac ovocný, s výraznejšími kvetinovými a rastlinnými podtónmi, čo sú práve deskriptory typické pre estery. Avšak, známy je fakt, že obsah esterov vo víne môže byť ovplyvnený rozličnými faktormi od pôdných charakteristik, cez klimatické podmienky, až po stupeň zrelosti hrozna v čase zberu, najmä však spôsobom spracovania hroznových bobúľ a hroznového muštu, teda technológiou. Autori³ poukazujú na to, že v porovnaní s konvenč-

nou produkciou, organický spôsob pestovania viniča a výroby biovín nerezultuje vo vyššom obsahu aromatických látok v hrozne a ani v ich intenzívnejšom senzorickej prejav v biovínach, čo sa javí z určitého uhla pohľadu aj z výsledkov inštrumentálnej analýzy našej štúdie. Na druhej strane, prikláňame sa k názoru, že na buket vína vo väčšej miere zrejme vplyva samotný technologický postup výroby vína, ako spôsob pestovania viniča³⁻⁵.

Navyše, čo sa týka terpenov, ktoré sú len v malej miere ovplyvnené technologickým postupom výroby vína^{4,5} a sú prítomné v šupke hrozna, kde je ich obsah a pomerné zastúpenie dané geneticky a prechádzajú do vína prakticky nezmenené, tieto sú taktiež veľmi významným prispievateľom k celkovej aróme vína, hoci v našom prípade majú v prchavej frakcii vín spravidla minoritné zastúpenie, ale často nízku prahovú koncentráciu senzorickeho vnemu. Z našich výsledkov je zrejme, že ich relatívne zastúpenie vo vzorkách biovína je taktiež nižšie ako v konvenčnej produkcii. Teda aj tento fakt zrejme významne spolupôsobí na plnosť arómy vína produkovaného z konvenčne pestovaného hrozna.

Avšak, z hľadiska organoleptiky, vyvažujúco tu na celkový buket biovína iste vplyvajú senzoricke aktívne alkoholy, ktoré v protiklade s esterami a terpenmi, vykazujú významne vyššie relatívne zastúpenie v ekologicke produkovaných vínach v porovnaní s konvenčnými vínami. V prípade týchto zlúčenín ide o nasledovné odorické deskriptory arómy: sladová, opečená, vínová, slamová, nepríjemná prenikavá maslová, po whisky, alkoholovo-fermentáčna, trávová, zelené jablko, sladko-karamelová s jemne potuchnutým pozadím, vôňa ruže, ďalšie kvetinové a ovocné podtóny – teda atribúty typické pre konštituovanie komplexnej harmonickosti vína. Opäť treba brať do úvahy jednotlivé príspevky týchto zlúčenín zo skupiny alkoholov k celkovej intenzite arómy vína, ktoré významne závisia od ich prahových koncentrácií senzorickeho vnemu. Z uvedeného vyplýva, že koncentrácia prchavej látky nie je vždy rozhodujúcim kritériom v posudzovaní intenzity jej arómy; rozhodujúca je jej prahová koncentrácia vonného/chuťového vnemu, ktorá je nepriamo úmerná hodnote arómy a pre rôzne zlúčeniny môže variovať cez niekoľko poriadkov. Vzorky biovína (Rulandské biele, neskorý zber, suché, 13% alkoholu, r. 2008) a konvenčne vyrobeného vína (Rulandské biele, suché, neskorý zber, 12,5% alkoholu, r. 2008) boli napokon komparované využitím ich profilov aromatických látok multivariačnou štatistikou.

Tieto profily sú vlastne komplexné zmesi tvorené 38 prchavými organickými zlúčeninami, ktoré sú rôznej chemickej podstaty. Metóda hlavných komponentov umožnila zredukovať 38 jednotlivých zložiek arómy na nové premenné – komponenty tak, že prvé dva komponenty (obr. 1) vysvetľujú až 85 % celkovej variability pôvodných dát. Graf hlavných komponentov jasne diferencuje biovína (B) od konvenčne vyrobených vín (M), pričom najdiskriminujúcejšími zložkami prchavého profilu vína boli v prvom komponente tieto zlúčeniny: etyl laktát, 1-hexyl acetát, β -cyklocitral; a v druhom komponente



Obr. 1. Diferenciácia biovína (B) a konvenčného vína (M) Rulandské biele 2008 metódou hlavných komponentov na základe GC analýz 38 prchavých aromatických zlúčenín, tvoriacich ich profily arómy

2,3-butandiol, D-limonén a benzyl salicylát. Diskriminačná analýza (Kth nearest neighbour) so 100% správnosťou klasifikácie vzoriek diferencovala konvenčné vzorky od biovína danej odrody. Kroková diskriminácia selektovala zo študovaných profilov aromatických zlúčenín β -cyklocitral, 3-metylbutyl acetát, etyl-3-metylbutyl sukcinát, α -pinén, 2-hydroxy-3-metyldietyl sukcinát a 1-hexyl acetát ako významné markery vhodné na diferenciaciu Rulandského bieleho vína podľa spôsobu pestovania hrozna – či už ekologickým alebo konvenčným variantom.

Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu MPRV SR, č. 4697/2009-810: SLEDOVANIE GEOREFERENČNÝCH A ENVIRONMENTÁLNYCH MARKEROV SLOVENSKÝCH BIOVÍN S CIEĽOM ICH AUTENTIFIKÁCIE A VYPRACOVANIE POSTUPOV PRE ICH ODLIŠENIE OD VÍN VYRÁBANÝCH KLASICKÝMI POSTUPMI. Vďaka patrí Vínovému Natural Domin & Kušický, s.r.o. a Agro-Movino, s.r.o., za bezplatné poskytnutie niektorých vzoriek vína a Ing. Emilovi Kolekovi, PhD. za zrealizovanie GC/MS analýz.

LITERATÚRA

1. Ferreira V., Rapp A., Cacho J.F., Hastrich H., Yavas, I.: *J. Agric. Food Chem.* 41, 1413 (1993).
2. Van den Dool H., Kratz P.D.: *J. Chromatogr.* 11, 463 (1963).
3. Dupin I., Schlich P., Fischer U., v: *Proceedings of the 6-th International Congress on Organic Viticulture, Basel, 26-28 August 2000*, (Helga Willer & Ursula Meier, ed.), p. 262. IFOAM 2000, Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Convention Center Basel.
4. Rapp A., v: *Proceedings of the 4th Wartburg Aroma Symposium, Eisenach, March 1-4, 1994*, (Rothe, M. and Kruse, H.P., ed.), p. 339. Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Postdam-Rehbrücke 1994.
5. Sedláčková B.: *Bulletin potravinárskeho výskumu* 33, 133 (1994).

DEVELOPMENT OF THE PLASTICIZED MEMBRANE VITAMIN B₁-SELECTIVE ELECTRODES

IRYNA ANTAL^{a,b}, YAROSLAV BAZEL^b,
ZHOLT KORMOSH^a, and RASTISLAV
SERBIN^b

^a Department of Analytical Chemistry and Ecotechnology, Volyn National University, Voli ave., 13, 43025 Lutsk, Ukraine, ^b Department of Analytical Chemistry, P.J. Safarik University, Moyzesova 11, 04154 Kosice, Slovakia rastislav.serbin@gmail.com

Vitamin B₁, also called thiamine, is one of the eight vitamins that make up the powerful group called the vitamin B complex. Like all of the B vitamins, this nutrient plays a major role in the good health of the body as well as in sound mental health. Vitamin B₁ serves many purposes in the body. It is an essential part of converting carbohydrates to energy and is necessary for the proper functioning of the nervous system, the heart, and the musculature system. Thiamine is very important to the brain, particularly in terms of emotional health and well-being, and also is useful for focus and concentration.

The present communication describes new forms of ion associates (IAs) of vitamin B₁ with an inorganic anion BiI₄⁻ and an organic anion brilliant yellow BY²⁻ (Fig. 1) that were successfully used as electrode-active substances (EASs) for the preparation of PVC-based potentiometric sensors for the determination of vitamin B₁.

The influence of solvent mediators, pH, and the concentration of internal reference solution and other characteristics on the potentiometric response of ISEs based on IAs (VB₁²⁺)(2BiI₄⁻) and IA (VB₁²⁺)(BY²⁻) were investigated. The potentiometric selectivity for vitamin B₁-selective membrane electrodes $K_{A,M}^{pot}$ was determined for a number of cations and substances including vitamins B₂ and B₆. The logarithmic selectivity coefficients for the membrane electrode based on IA (VB₁²⁺)(2BiI₄⁻) to vitamins B₂ and B₆ were -1.0 and -4.4, respectively. The logarithmic selectivity coefficients for the membrane electrode based on IA (VB₁²⁺)(BY²⁻) to vitamins B₂ and B₆ were -2.1 and -4.2, respectively. Various parameters for the determination of the Vitamin B₁ have been evaluated and conditions have been optimized. It was established that the best plasticizers for the membranes based on IAs (VB₁²⁺)(BiI₄⁻) and (VB₁²⁺)(BY²⁻) is dioctyl phthalate, with the electrode function slope 33.0 and 33.1 mV decade⁻¹ and the detection limit 5.5×10⁻⁶ M and 8.3×10⁻⁵ M, respectively. The lifetime of these electrodes was 7–8 months since the production date.

The developed sensors were successfully used to determine the content of vitamin B₁ in medicine forms, namely "Neurobex" drops (Balkanpharma-Dupnica, Bulgaria), "Complevit" capsules (Kyiv Vitamin Factory, Ukraine), bioactive nutritional supplement "New life" (4 life Products Inc., USA), and injection solutions "Thiamine chloride" (People's health, Ukraine).

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences VEGA (Grant No. 1/1096/12). Iryna Antal gratefully acknowledges the financial support from SAIA.

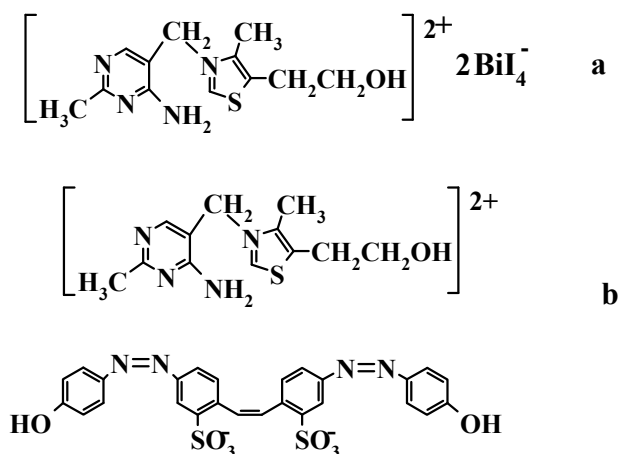


Fig. 1. Composition of ion associates: a) (VB₁²⁺)(2BiI₄⁻), b) (VB₁²⁺)(BY²⁻)

EXTRACTIVE SEPARATION, PRECONCENTRATION, SPECTROPHOTOMETRIC AND ATOMIC ABSORPTION DETERMINATION OF PLATINUM AS AN ION ASSOCIATE WITH ASTRAPHLOXINE FF

RASTISLAV SERBIN^a, YAROSLAV BAZEL^a, VASIL ANDRUCH^a, and IRYNA ANTAL^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, P.J. Safarik University, Moyzesova st., 11, 04154 Kosice, Slovakia, ^b Department of Analytical Chemistry and Ecotechnology, Volyn National University, Voli ave., 13, 43025 Lutsk, Ukraine
rastislav.serbin@gmail.com

Platinum is the main element of the platinum group. It is mainly used in automobile exhaust catalytic converters and as a catalyst in a wide variety of processes. Platinum also finds applications in chemical, glass and electronic industries. Some platinum co-ordination compounds (cisplatin, carboplatin, oxaliplatin etc.) are used in chemotherapy for some types of cancer. Another field of application of platinum is the manufacture of jewellery. The increased medical and industrial use of platinum has led to a growing need for its determination in pharmaceutical and environmental samples.

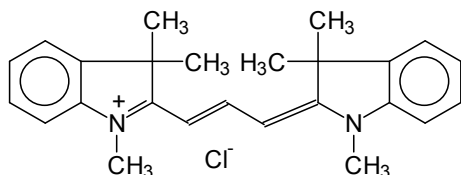


Fig. 1. The structure of Astraphloxine FF

This work describes the procedure for the extractive separation, preconcentration, spectrophotometric and AAS determination of platinum. The specificity of extractive separation, preconcentration, spectrophotometric and AAS determination of platinum in the form of ion associate (IA) with tiokyanate ions and the basic polymethine dye Astraphloxine FF (AF) (Fig. 1) from aqueous and aqueous-organic media was studied.

An introduction of the water-soluble donor-active organic solution (DAS) substantially increases the extraction of IA and simultaneously suppresses the extraction of the simple dye salt. Toluene (amyl acetate) was used as extractant for further experiments due to its lower toxicity. The concentration of DAS necessary for achieving the maximum extraction of IA decreases in the row of solvents: *N*-methylformamide – *N,N*-diethylformamide – *N,N*-dimethylformamide – *N,N*-diethylacetamide – hexamethylphosphortriamide. In the optimal conditions of complexation and extraction of platinum the basic chemo-analytical characteristics of the coloured extracts were found. The molar absorptivities of the IA extracts are $(8.1\text{--}13.3) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Recovery of the extraction of platinum IA by aromatic hydrocarbons and esters of acetic acids is in the range 84–96 % at the ratio of aqueous : organic phase (1–50) : 1.

A new extractive spectrophotometric and AAS method for the determination of micro amounts of platinum in the presence of various elements such as Cu, Ag, Pb, Pd, Ir, Rh, Ru was developed. The optimized method was applied for the determination of platinum in the pharmaceutical and model samples.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences VEGA (Grant No. 1/1096/12). Iryna Antal gratefully acknowledges the financial support from SAIA.

HPLC ENANTIOSEPARATION OF NEW AMINO ANALOGS OF INDOLE PHYTOALEXINS

JÁN PETROVAJ^{a*}, TAĽÁNA GONDOVÁ^a, PETER KUTSCHY^b, MATEJ BALÁŽ^b, and RASTISLAV SERBIN^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, P.J. Šafárik University, Moyzesova 11, 040 01 Košice,

^b Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, P.J. Šafárik University, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovakia

jan.petrovaj@upjs.sk

High-performance liquid chromatography remains the dominant method for the separation (or preparation) and analysis of enantiomers. HPLC with various chiral stationary phases is the method of first choice for direct enantiomeric separations of various kinds of racemic mixtures. More than one hundred chiral stationary phases are nowadays commercially offered and amongst them only about 20–30 chiral stationary phases are most frequently used. Chiral stationary phases employed in HPLC are based on different types of chiral selectors, including polysaccharides, macrocyclic antibiotics, proteins, cyclodextrins, crown-ethers, recently introduced cyclofructans, and many other¹.

Phytoalexins are natural secondary metabolites produced by plants in response to several forms of stress including microbial attack. These compounds are of great interest because of their biological activity, including antibacterial, antitumor and cancer chemoprotective proper-

ties². At present time are synthesized new analogs of indole phytoalexins with required biological activity. These compounds are chiral, therefore, stereoselective separation methods are required for their separation, determination of optical purity and evaluation of enantiomeric excess of new prepared compounds. There are very few literature reports on the analysis of spiroindoline phytoalexins^{3,4}.

The aim of the present work was the study of direct stereoselective separation of newly synthesized biologically active amino analogs of indole phytoalexins with different structures using high-performance liquid chromatography with various chiral stationary phases. The effects of the mobile phase composition, column temperature, type of chiral selector, and the structure of the analytes on retention and enantioseparation were investigated.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA (project No.1/1096/12).

REFERENCES

1. Lämmerhofer M.: J. Chromatogr., A 1217, 814 (2010).
2. Monde K., Taniguchi T., Miura N., Kutschy P., Čurillová Z., Pilátová Z., Mojžiš M.: Bioorg. Med. Chem. 13, 5206 (2005).
3. Monde K., Harada N., Takasugi M., Kutschy P., Suchý M., Dzurilla M.: J. Nat. Prod. 63, 1312 (2000).
4. Gondová T., Petrovaj J., Kutschy P., Čurillová Z., Salayová A., Armstrong D.W.: Chromatographia 74, 751 (2011).

GC EVALUATION OF THE QUALITY OF SLOVAK EWE MILK PRODUCTS BASED ON FATTY ACIDS HEALTH AFFECTING COMPOUNDS

LADISLAV SOJÁK^a, RÓBERT KUBINEC^a,
JAROSLAV BLAŠKO^{a*}, ALEXANDRA
SZABÓOVÁ^a, PETER PODOLEC^a,
and MILAN MARGETÍN^b

^a Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, ^b Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, SK-949 92 Lužianky, Slovakia
blasko@fns.uniba.sk

There is increased awareness that food contains certain compounds with potential health promoting effects. The most important output of ewe farming in Slovakia is bryndza cheese with yearly production of $4 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^6$ kg. Traditional bryndza is made of non-pasteurized milk of ewes grazed on natural pasture. The fatty acids (FAs) profile of raw milk influences the bryndza characteristics. The qualitative presence and quantitative amounts of certain milk FA can contribute to nutritional specific types of cheese. In addition, various milk FAs are known to have beneficial (most unsaturated FAs, i.e. ruminic and trans-vaccenic acid TVA) or adverse (some saturated FAs, i.e. myristic and palmitic acid) health effects. Therefore, biological effects and nutritional values are related to individual FA milk content. The isomers of conjugated linoleic acid, mainly *cis*-9, *trans*-11 isomer (CLA) were found to have anticarcinogenic, antiatherosclerotic, antidiabetic and other relevant health effects in animal models. The content of CLA milk fat can be a suitable parameter of milk quality.

There are several exogenous factors affecting ewe milk FA profile, such as diet, season, and climate as well as physiological factors, i.e. individuality, breed, lactation stage and parity. Our objective was to determine a detailed composition of 70 C4-C24 individual straight-chain saturated, branch-chain, monounsaturated, and polyunsaturated FA milk fat content of Slovak ewe milk products from pasture and winter season. The ewe milk samples of grazed ewes were collected at 4 farms in Trenčianska Teplá, Ružomberok, Liptovská Anna and Tajov, and winter ewe milk samples were collected at Trenčianska Teplá. The effect of individuality, breed, lactation stage and parity of grazed ewes is investigated at Trenčianska Teplá farm which keeps 330 dairy ewes belonging to three breeds: 148 Tsigai, 124 improved Valachian and 58 Lacaune with parity 1 – 8. Milk samples were taken on the same day from morning machine milking. The contents of individual FA in milk samples as well as in pasture plant species during whole pasture season were determined by GC-MS. GC unseparated CLA isomers, mainly tripled *trans*-7, *cis*-9, *cis*-9, *trans*-11, and *trans*-8, *cis*-10 isomers, were resolved by chemometric deconvolution. Statistical

analysis of GC determined content of FA in analyzed samples was carried out using a one-way ANOVA statistical package.

The content of health beneficial FAs in milk fat of grazed ewes is up to 4-fold higher for CLA, 3-fold for TVA, and 2-fold higher for α -linolenic acid (ALA) than in the same fat during winter diet. The content of CLA (3.2 %) and TVA (7.2 %) in milk of pasture grazed ewes is higher than that in milk of pasture grazed ewes and cows published so far. The variations in CLA content in milk fat of grazed ewes during pasture season and FA content in pasture suggest that these are primarily determined by the ALA content in pasture forage. Both CLA and TVA content in milk fat decreased from May to mid-summer and then increased until mid-September. The ALA content in pasture changed correspondingly. The ewe milk and related products (“bryndza”) produced in mid-September have a similar FA composition to that in May in relation with corresponding changes of composition of pasture plant species and their ALA content. The seasonal changes in CLA milk fat content were also affected by meteorological conditions during pasture season.

The FA milk profile of cows grazing on Alpine pastures is rather similar to Slovak milk profile of ewes grazing on pasture despite different botanical composition of plant species and significant altitude differences. The second-most abundant CLA isomer in milk fat from cows grazing on high-altitude Alpine pastures was *trans*-11, *cis*-13 isomer, and this isomer was presented as a useful indicator of milk products of Alpine origin. We observed identical result for milk of ewes grazing on natural pastures in altitude range of 250–800 m above m. s. l., but not in the milk of ewes fed with winter diet. Thus, *trans*-11, *cis*-13 CLA isomer is the second-most abundant isomer in the milk of ewes or cows grazing on natural pasture.

The investigated Slovak pasture ewe milk products show at least comparable content of beneficial FAs as the best foreign milk products. Determined contents of beneficial FAs in cheese, “bryndza” and “žinčica” are similar to these in milk fat from which these products are produced. Further improvement in quality of ewe milk products can be achieved by selecting individual ewes with higher CLA milk fat content (up to 5-fold inter-individual variation) and milk yields (up to 12-fold inter-individual variation), and by increasing of ALA pasture content after over-sowing pastures.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract Nos. APVV-0416-10, APVV-0458-10, APVV-0163-06, LPP-0198-06 and LPP-0098-06.

SÚČASNÁ ANALYTICKÁ METODIKA NA STANOVENIE ALERGÉNOV V POTRAVINÁCH A PRESNOSŤ ELISA METÓDY V PRAXI

LADISLAV STARUCH* a MARCEL MATI

Ústav biotechnológie a potravinárstva, FCHPT STU, Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
ladislav.staruch@stuba.sk, marcel.mati@gmail.com

Úvod

Potravinový kódex Slovenskej republiky rozoznáva 14 základných a teda najčastejších potravinových alergénov, na obsah ktorých v potravinách musí byť na ich obale upozornené. Ide o tieto: obilie obsahujúce glutén (pšenica, raž., jačmeň, ovos, špalda, kamut a odrody vyšľachtené z nich); kôrovce a výrobky z kôrovcov; vajcia a výrobky z vajec; ryby a výrobky z rýb; podzemnica olejná a výrobky z podzemnice olejnej; sója a výrobky zo sóje; mlieko a výrobky z mlieka vrátane laktózy; orechy t. j. mandle (*Amygdalus communis* L.), lieskovce (*Corylus avellana*), vlašské orechy (*Juglans regia*), kešu (*Anacardium occidentale*), pekanové orechy (*Carya illinoensis* (Wangenh. Koch), brazílske orechy (*Bertholletia excelsa*), pistácie (*Pistacia vera*), makadamské orechy a queenslandské orechy (*Macadamia ternifolia*) a výrobky z orechov; zeler a výrobky zo zeleru; horčica a výrobky z horčice; sezamové semená a výrobky zo sezamových semien; oxid siričitý a siričitany o koncentrácii viac ako 10 mg kg⁻¹ alebo 10 mg l⁻¹ vyjadrenej ako oxid siričitý (SO₂); vľčí bôb a výrobky z neho; mäkkýše a výrobky z nich¹. Potravinová alergia je zafinovaná ako negatívna odozva imunitného systému jedinca na konzumáciu niektorých potravín. Táto reakcia imunitného systému je výsledkom tzv. rozpoznania alergénnych proteínov prostredníctvom imunoglobulín E (IgE) alergén-špecifických protilátok². Z uvedeného vyplýva, že najvyšší alergénny potenciál majú práve proteínové zložky potravín, akým je napríklad gliadín z pšenice, raže (sekalíny) a jačmeňa (hordeíny).

Existuje viacero možností analytickej detekcie frakcií (prolamínových) cereálnych proteínov (gliadínu, sekalínov, hordeínov a iných). Ide o imunochemické chromatografické, elektroforetické metódy a metódy molekulárnej biológie. Elektroforetické metódy sú využívané na separáciu a charakterizáciu zásobných bielkovín obilnín, ktorá prebieha na základe veľkosti molekúl alebo ich pohyblivosti v elektrickom poli. Elektroforetické metódy sa spájajú s metódami typu imunoblot alebo westernblot. Frakcie proteínov získané pri elektroforetickej metóde sa prenášajú na nitrocelulóзовú membránu pomocou elektroprenosu alebo odtlačkovou metódou. Elektroforetické metódy sú takýmto spôsobom prepojené s následnou imunochemickou detekciou separovaného analytu pomocou špecifickej protilátky. Pomocou označenej sekundárnej protilátky sa

deteguje komplex antigén-protilátka. Medzi takto používané elektroforetické metódy patrí izoelektrická fokusácia (IEF), elektroforéza v polyakrylamidovom géli s dodecylsulfátom sodným (SDS-page), elektroforéza v kyslom prostredí (acid-PAGE), vysokoúčinná dvojrozmerná HPLC-HPCE a kapilárna zónová elektroforéza. Izoelektrická fokusácia sa používa k separácii niektorých bielkovín. Zásadnú úlohu pre použitie tejto metódy má rozpustnosť analytu. Izoelektrická fokusácia v polyakrylamidovom géli s dodecylsulfátom sodným využíva na rozdelenie jednotlivých bielkovinových frakcií iba ich rôznu molekulovú hmotnosť. Nevýhodou tejto metódy je práca s nebezpečným akrylamidom, problematická kvantifikácia izolovaných proteínových frakcií a nutnosť vizualizácie separovaných proteínov. Dodecylsulfát sodný tvorí s bielkovinami komplexy. Elektrické náboje týchto komplexov sú porovnateľné a v elektrickom poli migrujú rovnakou rýchlosťou. Elektroforéza v kyslom prostredí rozdeľuje proteíny na základe veľkosti i náboja molekúl v géli. Využíva sa hlavne na analýzu špecifického zastúpenia gliadínových frakcií (fingertint), glutelínových proteínov v jednotlivých odrodách cereálií – prevažne pšenice a hordeínov jačmeňa.

Vysokoúčinná dvojrozmerná HPLC-HPCE sa využíva na separáciu gliadínov i hordeínov. Jej použitím získavame dvojrozmernú mapu proteínov (prípadne aj trojrozmernú mapu pre kvantitatívnu analýzu) s možnosťou identifikovať jednotlivé zásobné proteíny obilnín. Kapilárna zónová elektroforéza (vysokoúčinná modifikácia HPCE) umožňuje dosiahnuť v krátkom čase vysoké rozlíšenie vďaka použitiu malého priemeru separačnej kapiláry (25 až 100 μm), ktorým je zvýšené pracovné napätie až na 30 kV. Moderné HPCE metódy prinášajú plnú automatizáciu a menej nebezpečného odpadu. Skupina chromatografických metód využíva prístroje HPLC. Využívajú sa metódy HPLC na iontomeničoch, gélové permeačné HPLC (size exclusion HPLC) a HPLC na reverznej fáze (RP-HPLC)³. V porovnaní s gélovou elektroforézou majú HPLC techniky vyššiu citlivosť, možnosť výberu spôsobu zmenšenia častíc a možnosť prímeho spojenia so systémami hmotnostnej spektrometrie a možnosť automatizácie analýz⁴. Chromatografickými metódami sa dajú pripraviť lepšie definovateľné skupiny proteínov a dajú sa tiež lepšie prečistiť. Nevýhodou je nešpecifickosť.

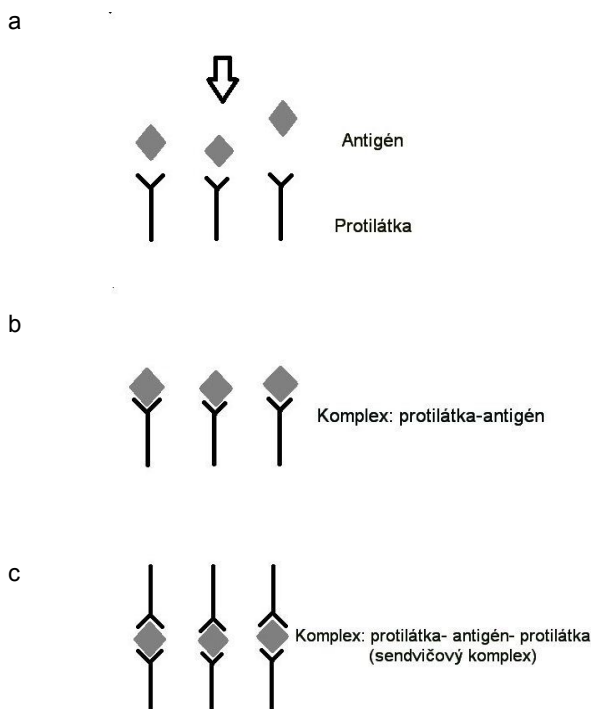
Inou metódou je využitie hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF). Využíva ionizáciu bielkovín dusíkovým laserom vo vhodnej nízkomolekulárnej matrixi, ktorá zabraňuje rozpadu makromolekúl. Vzniknuté ionty sú následne urýchľované jednosmerným elektrickým poľom na krátkom úseku. Meria sa čas letu vzniknutých iontov k detektoru v trubici bez elektrického poľa. Tento čas je rovný pomeru ich hmotnosti k náboju iontov. Využíva sa k určaniu známych peptidov a ako kontrolná porovnávacía

metóda pre odhalenie falošne pozitívnych výsledkov imunoanalytických meraní. Nevýhodou metódy je vysoká prístrojová a finančná náročnosť³. Naopak výhodami hmotnostnej spektrometrie sú: možnosť stanoviť priamo proteíny, alebo peptidy a môže tak slúžiť ako metodika pre potvrdenie inej analýzy. Metóda umožňuje jasnú identifikáciu sekvencií aminokyselín napríklad ich opakovaným sekvencovaním. Najväčšou výhodou je však možnosť stanovenia viacerých proteínov naraz v rámci jednej analýzy, čo umožňuje multiskríning⁵. Lutter so svojim kolektívom v roku 2011 potvrdili využiteľnosť hmotnostnej spektrometrie ako konfirmačnú metódu pri analýze stopových množstiev mlieka v potravinových matriciach. Použitá bola metodika spojenia hmotnostnej spektrometrie (MS), hmotnostnej spektrometrie s monitoringom vybranej reakcie (SRM-MS) a kvapalinovou chromatografiou (LC). Táto metóda preukázala limit detekcie na spodných hraniciach 0,2–0,5 mg kg⁻¹ (ppm) a limit kvantifikácie na úrovni 5 mg kg⁻¹ (ppm). Výsledky boli porovnateľné s tými, ktoré sa dosiahli simultánne testami ELISA⁶. Za veľmi dôležitú môžeme považovať prácu Heicka s kolektívom. Títo vykonali detekciu 7 rôznych alergénov (mlieko, vajcia, arašidy, sója, lieskové orechy, vlašské orechy a mandle) prostredníctvom metódy LC/MS/MS (kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou) a zároveň pomocou ELISA testov. Analýzy boli vykonané pred tepelným opracovaním vzoriek a po ňom. LC/MS/MS metóda preukázala lepšiu detekčnú schopnosť pri mlieku v opracovaných vzorkách než ELISA, ktorý poukazuje na jej nižšiu citlivosť pri analýze tepelne opracovaných vzoriek. Podobné výsledky sa dosiahli u vajec⁷. Metóda PCR sa používa na detekciu a kvantifikáciu stôp nepoškodenej DNA alergénnych bielkovín v potravinách. PCR metóda má až desaťkrát vyššiu citlivosť ako ELISA metóda (real-time s protilátkou R5 má detekčný limit 0,16 mg kg⁻¹). Ako výborná vzájomná kontrola sa ukázala kombinácia ELISA s PCR³.

Testy ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, enzýmová imunoanalýza) vo všeobecnosti umožňujú stanovenie prítomnosti (skrytých) alergénnych proteínov v potravinárskych výrobkoch detegovateľných na základe kolorimetrickej reakcie a cena tejto metódy je nižšia v porovnaní s ostatnými spomenutými technikami stanovenia, pričom výsledky sa dosahujú v relatívne krátkom čase³. Pomocou štandardov, obsahujúcich čistý referenčný typ alergénu o známych koncentráciách vyhotovíme kalibračnú krivku umožňujúcu kvantifikáciu alergénu prítomného v testovaných vzorkách. Na detekciu potravinových alergénov sa využívajú 2 typy metód ELISA. Prvou je sendvičová ELISA, a druhou je kompetitívna metóda ELISA. Sendvičová metóda je najčastejšie využívanou imunoanalýzou. Využíva protilátky imobilizované na tuhej fáze, ktorou býva najčastejšie takzvaná mikrotitračná platnička. Schematické znázornenie princípu sendvičovej ELISA metódy je znázornené na obr. 1. Pomocou takto zakotvených protilátok sú z analyzovaných vzoriek zachytávané špecifické (alergénne) bielkoviny a sú detegované ďalšími proteín-špecifickými protilátkami značenými enzýmom

umožňujúcim kolorimetrickú detekciu. Intenzite zafarbenia, nameraná pomocou spektrofotometra, je priamo úmerná výslednej koncentrácii antigénu/alergénu. Sendvičové metódy ELISA boli vyvinuté na detekciu niekoľkých rozličných druhov potravinových alergénov.

V súčasnosti existuje viacero komerčne dostupných testovacích kitov, ktoré sa takto dostupnými stali iba v priebehu poslednej dekády. Kompetitívna ELISA je často preferovaná práve vtedy, ak sa snažíme detegovať bielkoviny o relatívne malých veľkostiach a na detekciu bielkovinových frakcií. Na rozdiel od sendvičovej ELISA metódy kompetitívna ELISA využíva imobilizovaný antigén. Protilátky sa pridávajú k extraktom získaným zo vzoriek, čoho výsledkom je vytvorenie komplexu protilátka-antigén. Takto inkubované extrakty sa následne dávajú na pevnú fázu (napríklad mikrotitračnú platničku) kde sa nachádza imobilizovaný antigén. Ak samotná testovaná vzorka neobsahuje antigén (alergénu bielkovinu), nastáva väzba medzi imobilizovaným antigénom na pevnej fáze a protilátkami, pridanému k extraktu zo vzorky. Táto väzba sa prejaví vysokou absorbanciou produktu kolorimetrickej reakcie. V prípade prítomnosti antigénov (alergénnych bielkovín) vo vzorke tieto blokujú väzbu protilátok na imobilizovaný antigén na pevnej fáze, čo sa prejaví zníže-



Obr. 1. Princíp sendvičovej ELISA metódy: a) alergénna bielkovina (antigén) je prítomná vo vzorke, b) tvorba komplexu protilátka-antigén (alergénna bielkovina), c) tvorba komplexu protilátka-antigén (alergénna bielkovina)-protilátka

ním absorbancie. Z uvedeného vyplýva, že nameraná absorbanca je nepriamo úmerná koncentrácii antigénu (alergénnej bielkoviny) vo vzorke. Kompetitívna ELISA metóda bola vyvinutá, rovnako ako sendvičová ELISA, na detekciu niekoľkých rozličných druhov potravinových alergénov⁸.

Experimentálna časť

V práci boli použité dve metodiky ELISA: sendvičová ELISA a kompetitívna ELISA. Sendvičová ELISA bola použitá na analýzu vzoriek 18 mäsových výrobkov od troch výrobcov zo Slovenskej republiky. Detekčný limit metódy je 2 mg kg⁻¹ gliadínu, čo zodpovedá po prepočítaní

Tabuľka I

Obsah gliadínu a gluténu vo vzorkách mäsových výrobkov a koreniacej zmesi od troch výrobcov pomocou sendvičovej ELISA metódy

Vzorka	Firma	Obsah gliadínu [μg kg ⁻¹]	Prepočet s riediacim faktorom 500 [μg kg ⁻¹]	Obsah gliadínu [mg kg ⁻¹]	Obsah gluténu [mg kg ⁻¹]
Liptovská saláma	Berto	<10	<5000	<5	<10
Holandská saláma	Berto	<10	<5000	<5	<10
Bratislavské párky	Berto	<10	<5000	<5	<10
Chudé párky	Berto	<10	<5000	<5	<10
Viedenské párky	Berto	<10	<5000	<5	<10
Dusená šunka	Berto	<10	<5000	<5	<10
Šunková saláma	Tauris	<10	<5000	<5	<10
Parížska saláma	Tauris	<10	<5000	<5	<10
Bravčová klobása	Tauris	<10	<5000	<5	<10
Vysočina saláma	Tauris	<10	<5000	<5	<10
Alpinka saláma	Tauris	<10	<5000	<5	<10
koreniaca zmes Gombasecká	Tauris	<10	<5000	<5	<10
Drugetova šunka	Mecom	<10	<5000	<5	<10
Kinder šunka	Mecom	<10	<5000	<5	<10
Gombasecká klobása	Mecom	12,14	6070	6,07	12,14
Kohút klobása	Mecom	<10	<5000	<5	<10
Malokarpatská saláma	Mecom	<10	<5000	<5	<10
Dunajské párky	Mecom	<10	<5000	<5	<10

Tabuľka II

Obsah gliadínu a gluténu vo vzorkách piva od rôznych výrobcov za použitia kompetitívnej ELISA metódy

Vzorka	Obsah Gliadínu [μg kg ⁻¹]	Prepočet s riediacim faktorom 500 [μg kg ⁻¹]	Obsah gliadínu [mg kg ⁻¹]	Obsah gluténu* [mg kg ⁻¹]
Up Beer	<6	<3000	<3	<6
Pilsner Urquell- svetlý ležiak	<6	<3000	<3	<6
Zlatý Bažant 10° - svetlé pivo	<6	<3000	<3	<6
Topvar 10° - svetlé pivo	6,60	3300	3,30	6,60

*Obsah gluténu (lepku) v mg kg⁻¹ vypočítaný z obsahu gliadínu prostredníctvom prepočítavacieho faktora 2

4 mg kg⁻¹ gluténu (lepku). Dolný kvantifikačný limit testu je 5 mg kg⁻¹ gliadínu, čo zodpovedá 10 mg kg⁻¹ gluténu (lepku) a vrchný limit je 80 mg kg⁻¹ gliadínu. Kompetitívna ELISA metóda bola použitá na analýzu 4 druhov piva od rôznych výrobcov. Dolný kvantifikačný limit testu je nižší, čo znamená 3 mg kg⁻¹ gliadínu, čomu zodpovedá 6 mg kg⁻¹ gluténu (lepku).

Hodnoty absorbancie štandardov a vzoriek boli získané prostredníctvom prístroja Labsystems Multiskan MS, ktoré boli ďalej podrobené spracovaniu softvérom RIDA® SOFT Win. Výpočet bol realizovaný pomocou funkcie cubic spline. Zo získaných kalibračných kriviek sme dostali odčítaním hodnoty absorbančii a tým zároveň koncentráciu gliadínu vo vzorkách v µg kg⁻¹ (ppb) hotového vý-

robku. Prepočítaním hodnôt riediacim faktorom 500 a následným vydelením hodnôt číslom 1000 sme dostali skutočný obsah gliadínu v mg kg⁻¹ hotového výrobku.

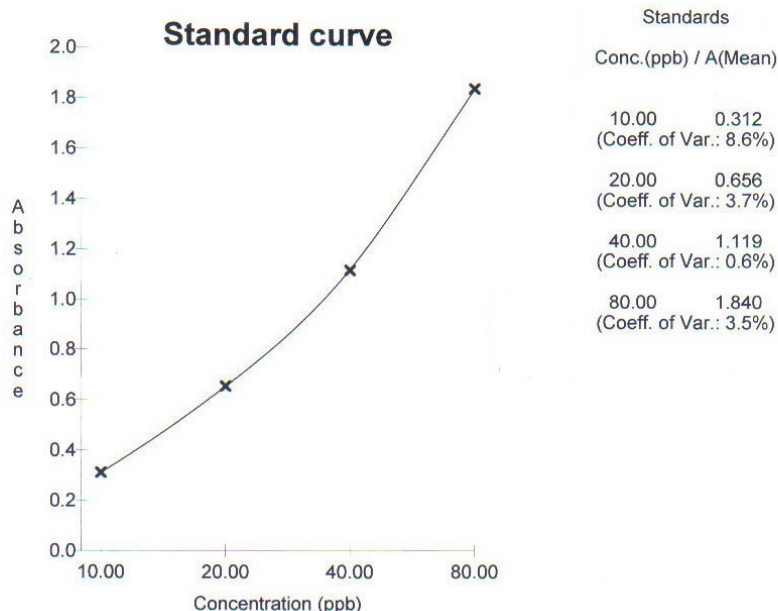
Výsledky a diskusia

Tab. I podáva výsledky obsahu gliadínu v rôznych druhoch tepelne opracovaných a tepelne neopracovaných mäsových výrobkoch pochádzajúcich od troch výrobcov pôsobiacich v Slovenskej republike. Pri tejto analýze bola použitá sendvičová ELISA metóda. Z 18 vzoriek obsahovalo až 17 nedetegovateľný obsah gliadínu. Jedine vzorka koreniacej zmesi Gombasecká, používaná pri výrobe rovnomenného druhu mäsového výrobku prekročila limit

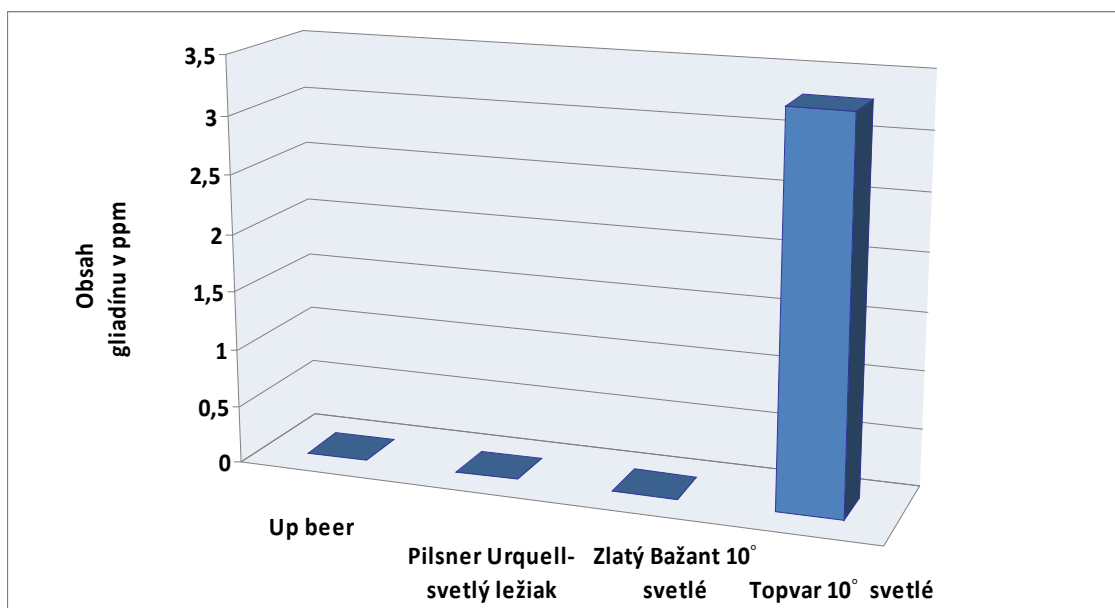
FAST Gliadin
14. Apr. 2011, Spline, Ser.No: 123456, Version: 1.76

Plate Values

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.091E	0.065E	0.070E	0.046E	0.045E	0.048E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.331E	0.293E	0.081E	0.086E	0.042E	0.059E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.673E	0.639E	0.053E	0.093E	0.185E	0.049E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	1.124E	1.114E	0.039E	0.048E	0.023E	0.069E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E	1.885E	1.795E	0.049E	0.093E	0.089E	2.514E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.096E	0.105E	0.083E	0.103E	0.228E	0.127E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	0.073E	0.067E	0.092E	0.114E	0.089E	2.405E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.044E	0.044E	0.058E	0.084E	0.402E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



Obr. 2. Namerané hodnoty absorbančii a výsledná kalibračná krivka



Obr. 3. Obsah gliadínu a gluténu vo vzorkách piva od rôznych výrobcov za použitia kompetitívnej ELISA metódy

kvantifikácie s hodnotou obsahu gliadínu na úrovni $6,07 \text{ mg kg}^{-1}$. Nevýhodou sendvičovej ELISA metódy je teda pomerne vysoký limit kvantifikácie gliadínu vo vzorkách. Oproti iným metódam, akou je napríklad PCR sa tento fakt pri analýze alergénneho obsahu v potravinách javí ako jeden z mála „hendikepov“ tohto druhu testu. Ďalšou nevýhodou je tiež nemožnosť stanoviť viac alergénov pomocou jedného testu. Pri úvahe použiť práve ELISA metódu u potravín obsahujúcich viac druhov alergénnych zložiek treba zväžiť finančné hľadisko celej analýzy. Tab. II a obr. 3 prezentujú výsledky analýzy 4 druhov piva na obsah gliadínu. Analýzy boli v tomto prípade uskutočnené druhou formou ELISA metódy, ktorá sa nazýva kompetitívna. Nižší limit kvantifikácie je nespornou výhodou oproti použitiu klasickej sendvičovej analýzy. Kompetitívna ELISA umožnila vyšší záchyt gliadínu, čoho dôkazom je záchyt v pive Topvar na úrovni $3,30 \text{ mg kg}^{-1}$ gliadínu. Z analytického hľadiska je kompetitívna ELISA často preferovaná práve vtedy, ak sa snažíme detegovať bielkoviny o relatívne malých veľkostiach a na detekciu bielkovinových frakcií. Z týchto dôvodov bola táto metóda použitá práve u piva. Z výsledkov vyplýva, že 3 vyššie uvedené druhy piva obsahovali nedetegovateľné množstvá gliadínu.

Záver

Výsledky poukazujú na fakt, že napriek tomu, že ELISA metódy sú spoľahlivými a pomerne rýchlymi detekčnými metódami, na kvantifikáciu množstva alergénov v potravinách už v súčasnosti existujú metódy

s možnosťou vyššieho záchytu alergénnych bielkovín zo vzoriek. Oproti komerčne dostupným testom však nie sú natoľko dostupné hlavne z cenového hľadiska. Budúcnosť by mala priniesť znižovanie spodných hraničných limitov detekcie so zachovanou kvalitou používaných protilátok, skrátenie inkubačných časov a celkové vylepšenie extrakčných postupov u vzoriek potravín. Tieto postupy by mali byť rýchlejšie, jednoduchšie a efektívnejšie s poskytnutím najvyššej výťažnosti skúmaného alergénu zo vzorky. Veľkou výhodou by bola existencia medzinárodne schválených referenčných materiálov pre všetky druhy potravinových alergénov⁹. Nové možnosti detekcie sa tiež otvárajú v súvislosti s ELISA metódami pre stanovenie gliadínu. Nová metóda je analyticky založená na kovalentnej imobilizácii gliadínu orientovaným spôsobom na aktivovaných magnetických guľičkách. Po naviazaní gliadínu sa magnetické guľičky zachytia magnetickou grafitovo-epoxidovou kompozitnou elektródou (m-GEC). Takýto druh stanovenia je možný u natívnych i tepelne opracovaných vzorkách¹⁰.

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantu VEGA č. 1/0234/09 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied.

LITERATÚRA

1. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 7. januára 2008 č. 2319/2007-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospo-

- dárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100.
2. Hengel van J. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 5, 389 (2007).
 3. Hulín p., Dostálek p., Hochel i.: *Chem. Listy* 5, 102 (2008).
 4. Faeste Ch. K., Rønning H. T., Christians U.: *J. Food Protect.* 2, 74 (2011).
 5. Popping B., Godefroy S. B.: *J. AOAC Int.* 4, 94 (2011).
 6. Lutter P.: *J. AOAC Int.* 1, 75 (2011).
 7. Heick J.: *J. AOAC Int.* 1, 94 (2011).
 8. Picó Y., v: *Food toxicants analysis: techniques, strategies and development*, str. 762. Elsevier, Oxford 2007.
 9. Koppelman S. J., Hefle S. L., v: *Detecting Allergens in Food*, 440 p. Woodhead Publishing, Nebraska 2006.
 10. Laube T., et al.: *Biosens. Bioelectron.* 1, 27 (2011).

STUDIUM AGREGACE FOSFOLIPIDŮ VOLTAMETRICKÝMI METODAMI

**HANA ŠVECOVÁ*, EVA MARKOVÁ,
PETRA NOVÁKOVÁ, JITKA SOUČKOVÁ,
JANA SKOPALOVÁ a PETR BARTÁK**

RCPTM, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Česká republika
hanka.svec@seznam.cz

Fosfolipidy jsou velmi důležitou skupinou lipidů, neboť jsou základním stavebním prvkem buněčných membrán. Hojně se nacházejí zejména v myelinových obalech nervových buněk, semenech či vejcích. Amfifilní molekuly fosfolipidů, tvořené dvěma hydrofobními řetězci mastných kyselin esterově vázanými na hydrofilní *sn*-glycero-3-fosfátový skelet, spontánně agregují ve vodném prostředí¹. V závislosti na jejich koncentraci v roztoku se tvoří micely, dvojvrstvy či sférické duté váčky (vesikuly, liposomy)², které našly široké uplatnění jako modely biologických membrán. Díky své schopnosti enkapsulovat látky do vnitřního prostoru či je inkorporovat do fosfolipidové dvojvrstvy, našly liposomy uplatnění v mnoha vědních oborech a průmyslových odvětvích, především ve farmacii a lékařství³, kosmetice či potravinářském průmyslu⁴.

Kritické koncentrace, při nichž dochází ke změnám ve velikosti a struktuře fosfolipidových agregátů, jsou parametry důležité z hlediska jejich praktické aplikace. Kromě běžně používaných metod ke stanovení kritické micelární koncentrace (CMC), jako je měření indexu lomu⁵, rozptylu světla či povrchového napětí⁶, lze použít i experimentálně nenáročné elektroanalytické metody, např. konduktometrii⁷, adsorpční⁸ či cyklickou voltametrii⁹ nebo AC polarografii (tenzametrii)¹⁰.

Předmětem výzkumu jsou agregační vlastnosti fosfolipidových molekul v roztoku a na povrchu pevných elektrod. Agregace 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DSPC) byla studována v roztoku v procesu spontánní revesikulace⁷. K tomuto účelu byla využita instrumentálně jednodušší a dostupnější modifikace tenzometrie založená na měření kapacitních proudů cyklickou voltametrií s visící rtuťovou kapkovou elektrodou. Ze závislosti potenciálu a proudu kapacitních píků na koncentraci DSPC v roztoku byla stanovena kritická agregační koncentrace (CAC1), jejíž hodnota je kolem jedné desetiny mmol l⁻¹ a která pravděpodobně odpovídá koncentraci, při které se mění tvar a velikost (morfologie) micel. Taková kritická agregační koncentrace již byla popsána u dipalmitoylfosfatidylcholinu¹¹. Stejným způsobem byla vyhodnocena i druhá agregační koncentrace (CAC2), jejíž hodnota je kolem dvou desetín mmol l⁻¹ a která pravděpodobně souvisí s počátkem formování liposomů. Podobné hodnoty kritických agregačních koncentrací fosfolipidu byly určeny i nefelometricky¹².

Na povrchu tuhých elektrod byla studována agregace komerčně dostupné směsi fosfolipidů cyklickou voltametrií. Na povrch uhlíkové elektrody byla nanášena fosfolipidová vrstva, jejíž přítomnost byla prokázána záznamem cyklické voltametrie modelového redoxního systému 5 mmol l⁻¹ roztoku hexakynoželeznatanu draselného v 1 mol l⁻¹ chloridu draselném. Za přítomnosti fosfolipidu se molekuly hexakynoželeznatanu draselného nedostávají až k povrchu elektrody, a proto nejsou zaznamenány žádné odezvy. Dále byl studován vliv fosfolipidové vrstvy na odezvy elektrody v přítomnosti lipofilní elektroaktivní látky. Byly zaznamenány cyklické voltamogramy 1 mmol l⁻¹ roztoku dihexylviologenu v 50 mmol l⁻¹ fosfátovém pufru, pH 7. Bylo pozorováno, že dochází k proudovým a potenciálovým změnám píků dihexylviologenu v čase a to v katodickém i anodickém směru polarizace elektrody. Získané poznatky mohou být využity jak k přípravě analytických sensorů, tak ke studiu mechanismu pronikání látek přes fosfolipidovou vrstvu.

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operační program výzkum a vývoj pro inovace – Evropský fond pro regionální rozvoj) a Univerzitě Palackého v Olomouci (projekt č. PrF_2012_020).

LITERATURA

- Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. J. Wiley, Chichester 2003.
- Weissman G., Sessa G.: *J. Lipid Res.* 9, 310 (1968).
- Torchilin V. P., Weissig V. (ed.): *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York 2003.
- Lasic D. D., Barenholz Y. (ed.): *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*. CRC Press, Boca Raton 1996.
- Roholt O. A., Schlamowitz M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 364 (1961).
- De Haas G. H., Bonsen P. P. M., Pieterse W. A., van Deenen L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 239, 252 (1971).
- Megová M., Müller L., Barták P.: *Acta Univ. Palacki Olomuc., Fac. Rerum Natur. Chemica* 47, 1 (2007).
- Ma Ch., Li G., Xu Y., Wang H., Ye X.: *Colloids Surf., A* 143, 89 (1998).
- Mandal A. B., Nair B. U.: *Ramaswamy D.: Langmuir* 4, 736 (1988).
- Vollhardt D.: *Colloid Polym. Sci.* 254, 64 (1976).
- Li J. B., Miller R., Vollhardt D., Möhwald H.: *Thin Solid Films* 327–329, 84 (1998).
- Švecová H., Součková J., Skopalová J., Novotný R., Barták P.: *Chem. Listy* 106, 200 (2012).

BIOLOGICKÝ MONITORING PRI EXPOZÍCIÍ RÔZNYM CHEMICKÝM FAKTOROM – PROJEKT DEMOCOPHES

TATIANA TAKÁČOVÁ, JANA ŠTURDÍKOVÁ, KATARÍNA HALZLOVÁ a MILAN KALIŠ

Úrad verejného zdravotníctva SR, Trnavská 52, 826 45
Bratislava, Slovensko
tatiana.takacova@uvzs.sr.sk

Biologické monitorovanie je dlhodobé sledovanie koncentrácie chemických faktorov a ich metabolitov v organizme človeka. Umožňuje sledovať vzťah medzi expozíciou chemickým faktorom zo životného i pracovného prostredia, dávkou, účinkom a poškodením zdravia. Využíva sa pri odhade expozície človeka chemickým faktorom z prostredia a aj k odhadu ich potenciálnych zdravotných rizík.

Európsky akčný plán pre životné prostredie a zdravie pre obdobie 2004–2010 sa odvoláva na potrebu harmonizovaného prístupu k ľudskému biomonitoringu (HBM) v Európe. Pre naplnenie tejto požiadavky Európska komisia spolufinancuje dva projekty COPHES a DEMOCOPHES.

Do projektu COPHES je zapojených 35 inštitúcií v 27 štátoch Európy. Cieľom je vytvoriť funkčný rámec, ktorý umožní zber porovnateľných údajov z biomonitoringu v Európe. Projekt je teoretickou základňou a podporou pre projekt DEMOCOPHES. DEMOCOPHES je medzinárodný pilotný projekt, ktorý má prakticky overiť harmonizovaný prístup pre hodnotenie expozície populácie vybraným chemickým faktorom v 16 zúčastnených krajinách. Bude sa vyšetrovať 120 dvojíc matka, dieťa z mestskej a vidieckej oblasti každej krajiny. V biologickom materiáli sa bude sledovať ortuť, kadmium, ftaláty a kotinín.

Boli vypracované štandardné pracovné postupy pre všetky použité analytické metódy. Laboratóriá zúčastnených krajín museli splniť prísne kritériá medzilaboratórnych porovnaní. Získané údaje z biomonitoringu budú prepojené s informáciami o stave životného prostredia a zdravotnom stave obyvateľstva. V Slovenskej republike je koordinátorom projektu Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky v spolupráci s Regionálnym úradom verejného zdravotníctva v Banskej Bystrici, s podporou Ministerstva zdravotníctva SR a Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR.

STANOVENIE TERPÉNOV PRI TERMICKOM ZAŤAŽENÍ JEDĽOVÉHO DREVA

VERONIKA VELKOVÁ^{a*}, PAVEL ŠMÍRA^b a DANICA KAČÍKOVÁ^a

^a Technická univerzita vo Zvolene, T. G. Masaryka 24, 960 53 Zvolen, Slovenská republika, ^b Thermo Sanace, s.r.o., Chamrádova 475/23, 718 00 Ostrava-Kunčičky, Česká republika
velkova@vsl.d.tuzvo.sk

Terpény sú prírodné zlúčeniny, ktoré sa ako sekundárne metabolity vyskytujú prevažne v rastlinnej biomase. Ich biologická funkcia nie je v plnej miere objasnená, zohrávajú úlohu pri imunite a obranyschopnosti organizmu, reprodukcii a raste, mnohé majú prirodzené insekticídne a antimikrobiálne účinky, iné patria k feromónom a pôsobia ako atraktanty pre hmyz¹⁻³.

Množstvo a zloženie terpénov závisí od druhu dreveni, lokality rastu, veku, obdobia a podmienok pri ťažbe. V ihličnatom dreve bolo zistené množstvo terpénov 0,1–0,6 % (cit.^{4,5}). Pri využití ihličnatého dreva ako stavebného a konštrukčného materiálu (trámy, podlahy, krovky, stĺpy ap.) patrí prítomnosť terpénov k faktorom prispievajúcim k poškodzovaniu materiálu hmyzom. Terpény sú z dreva počas spracovania a manipulácie s ním (odkôrňovanie, pílenie, preprava, skladovanie, sušenie) uvoľňované, mení sa ich zloženie a množstvo postupne klesá. Tepelnú nestálosť terpénov je možné využiť pri

ochrane dreva, či už čerstvého pred použitím alebo ochrane hotových škodcami napadnutých konštrukčných súčastí.

V príspevku sa venujeme sledovaniu zmien množstva terpénov v jedľovom dreve z hľadiska jeho tepelnej úpravy. Vzorky jedľového dreva boli termicky upravené pri teplotách 60 a 120 °C v sušiarňi počas 10 hodín. Následne boli pôvodné drevo aj upravené drevo dezintegrovane na piliny a extrahované hexánom, zahustené a analyzované metódou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou.

Pre jedľové drevo je typický výskyt α - a β -pinénu, limonénu, Δ^3 -karénu, kamfenu, felandrénu, myrcénu. V nami analyzovaných vzorkách boli stanovené α -pinén, kamfén, β -pinén, α -felandrénu, cymén, limonén, fenchol, borneol, tymol, myrtenal, verbenón. Ich množstvo s teplotou výrazne klesalo zo 186,49 mg kg⁻¹ v pôvodnej vzorke na cca 1 mg kg⁻¹ vo vzorke spracovanej pri 120 °C. Pri strednej teplote bol pokles približne na 1/3 pôvodného množstva, no výrazné zníženie nastalo u α -pinénu, ktorý môže tvoriť až 80 % z celkového množstva terpénov, najmä v čerstvom dreve.

Dané výsledky podčiarkujú výhodnosť použitia tzv. termosanácie, pri ktorej sa drevo ošetruje vzduchom zohriatym na teplotu 120 °C. Cieľom je dosiahnuť teplotu v celom dreve minimálne 55 °C, ktorá postačuje na degradáciu bielkovín drevokazného hmyzu a zároveň sa zníži množstvo terpénov prítomných v dreve, ktoré je potom menším lákadlom pre hmyz.

Tabuľka I

Množstvo terpénov stanovené vo vzorke jedľového dreva pred a po termickom zaťažení v mg kg⁻¹

Zlúčenina	pôvodné	T60	T120
α -Pinén	115,5±1,1	43,552±0,035	0,1687±0,0033
Kamfén	12,315±0,087	8,460±0,011	0,1746±0,0002
β -Pinén	20,986±0,041	0,8930±0,0076	0,0059±0,0001
α -Felandrénu	1,645±0,047	0,960±0,028	0,0077±0,0013
Cymén	6,16±0,12	3,8669±0,0032	0,0672±0,0002
Limonén	6,17±0,30	0,723±0,026	0,0163±0,0033
Fenchol	2,38±0,17	0,5609±0,0071	0,0399±0,0022
Borneol	3,338±0,079	1,266±0,024	0,0459±0,0009
Tymol	4,31±0,13	3,3447±0,0089	0,0252±0,0009
Myrtenal	6,10±0,21	3,027±0,056	0,0413±0,0004
Verbenón	7,62±0,13	3,152±0,086	0,4551±0,0086
Σ	186,5±1,9	69,805±0,076	1,048±0,020

Autori ďakujú za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre VEGA, projekt 1/0446/12.

LITERATÚRA

1. Dvořáková M., Valterová I., Vaněk T.: Chem. Listy 105, 839 (2011).
2. Holubová V., Hrdlička P., Kubáň V.: Phytochem. Anal. 12, 243 (2001).
3. Singer A. C., Crowley D. E., Thompson I. P.: Trends Biotechnol. 21, 123(2003).
4. Manninen A. M., Tarhanen S., Vuorinen M., Kainulainen P.: J. Chem. Ecology 28, 211(2002).
5. Granström K. M.: Forest Products J. 53, 48 (2003).

CRYSTAL STRUCTURE AND CHARACTERIZATION OF CHIRAL INDOLIZINE DERIVATIVES

**VIKTOR VRÁBEL^{a*}, LUBOMÍR ŠVORC^a,
and ŠTEFAN MARCHALÍN^b**

^a Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Institute of Organic Chemistry, Catalysis and Petrochemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
viktor.vrabel@stuba.sk

Introduction

Organic compounds containing two fused carbon rings (five and six membered) and nitrogen as a heteroatom are generally known as indolizines. Indolizine circle is part of a large number of natural compounds found in plant and animal kingdom, with a wide spectrum of biological activities. These are important bioactive substances, which are widely used in biology, pharmacology and agrochemistry. Saturated hydroindolizines have been isolated mainly from plants, microorganisms and animals (ants, beetles, amphibians). The most important group are polyhydroxyl-indolizines, which proved to be potent inhibitors of important biological processes such as inhibition of glycosidases^{1,2}. These alkaloids exhibit anticancer, antifungal and antiviral activity *in vitro* and *in vivo*, including the HIV virus^{3–5}.

Synthetic indolizines some interesting biological effects, eg. the central nervous and cardiovascular system⁶. They also have interesting physical properties (e.g. new synthetic dyes). Indolizines were also tested as antimycobacterial agents (especially in the treatment of tuberculosis)⁷. The above mentioned pharmacological effects of natural alkaloids in recent years led to intensive study and development of new synthetic methods for their preparation. Aromatic indolizine derivatives are not in nature, but their synthetic analogues are essential for their pharmacological and physical properties. The synthesis of polycyclic indolizine derivatives have recently attracted much research interest in the search for new opto-electric materials⁸. Thus, there is a growing interest in the synthesis and study of crystal and molecular structures of indolizine derivatives.

As part of our recent efforts to synthesize novel polycyclic indolizine derivative, we report here crystal and molecular structure of the (6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-7-bromo-6-(2-bromoethyl)-3-oxooctahydroindolizin-8-yl acetate (I) (Fig. 1).

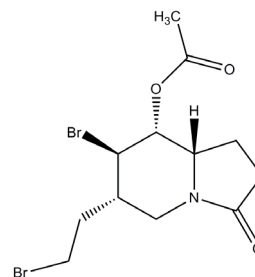


Fig. 1. The molecular structure of the compound (I)

Results and discussion

The absolute configuration of the indolizine derivative under study (I) is known from the synthesis (Fig. 1) and has been established without ambiguity from the anomalous dispersion of the Br atoms [absolute structure parameter 0.01 (1) (Ref.⁹)]. The molecular geometry and the atom-numbering scheme of the compound (I) is shown in Fig. 2. The expected stereochemistry of atoms C5, C6, C7 and C8 was confirmed as *S*, *R*, *R* and *S*, respectively. The central six-membered *N*-heterocyclic ring is not planar and adopts a chair conformation¹⁰. A calculation of least-squares planes shows that this ring is puckered in such a manner that the four atoms C5, C6, C8 and C9 are coplanar to within 0.010 (2) Å, while atoms N1 and C7 are displaced from this plane on opposite sides, with out-of-plane displacements of –0.595 (2) and 0.563 (2) Å, respectively. The pyrrolidin-2-one ring is distorted towards a flat-envelope conformation, with atom C4 on the flap. Atom C4 is 0.191 (2) Å from the mean plane defined by atoms N1, C2, C3 and C5. Dihedral angle between plane defined by atoms C5, C6, C8 and C9 and plane defined by atoms N1, C2, C3 and C5 is 125.5 (1)°. The N1–C5 and N1–C9 bonds are approximately equivalent and both are much longer than the N1–C2 bond. Moreover, the N1 atom is sp² hybridized as it is evidenced by the sum of the valence angles around it [359.9 (2)°]. The bond length of the carbonyl group C2=O1 of 1.220 (3) Å is somewhat longer than typical carbonyl bonds. This may be due to the fact that atom O1 participates in weak intermolecular interactions. In the crystal structure, neighboring molecules are linked and stabilized through weak van der Waals forces.

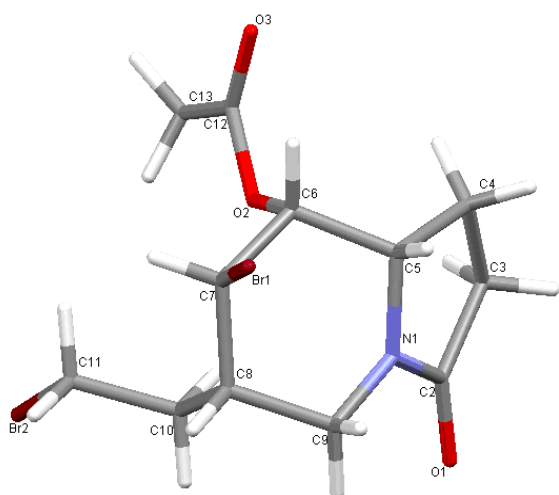


Fig. 2. The molecular structure of the compound (I) with the atomic numbering scheme

Conclusions

Based on the structural studies of 15 indolizine (hydroindolizine) type compounds we should claim the following conclusions:

- crystal structures of the mentioned compounds are created by discrete molecules;
- central six-membered ring N1-C5-C6-C7-C8-C9 is not planar and adopts chair conformation with atoms N1 and C7 displaced on opposite sides the rest of structures exhibits envelope conformation with atoms N1 or C5 displaced from the plane of remaining atoms of the ring;
- five-membered N1-C2-C3-C4-C5 oxopyrrolidine ring is not planar and also exhibits envelope conformation with atoms C4 or C5 displaced from the plane of remaining atoms of the ring;

- all rings except of hydrofuran ring (envelope conformation) joined to indolizine skeleton are planar with maximum displacement from the mean plane less than 0.01 Å;
- N1—C5 and N1—C9 bond lengths are approximately equivalent and both are much longer than N1—C2 bond length. These data are consistent with conjugation of the lone-pair electrons on N1 (is sp^2 hybridized) with the adjacent carbonyl group C2=O1;
- bond length of carbonyl group C2=O1 is somewhat longer than typical carbonyl bonds. This may be due to the fact that atom O1 participates as acceptor in intermolecular hydrogen bonds;
- dominance of intermolecular O-H...O hydrogen bonds in crystal structures;
- in structures with heavy atoms Flack parameter values are close to zero, so correct absolute structure has been confirmed.

The authors thank the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic (grant No. 1/0429/11) and the Slovak Research and Development Agency (contract No. APVV-0204-10) for financial support of this research program.

REFERENCES

1. Sears P., Wong C. H.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2300 (1999).
2. Heightman T. D., Vaella A.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 750 (1999).
3. Medda S., Jaisankar P., Manna R. K., Pal B., Giri V. S., Basu M. K.: *J. Drug Target.* 11, 123 (2003).
4. Gerber-Lemaire S., Juillerat-Jeanneret L.: *Mini-Rev. Med. Chem.* 6, 1043 (2006).
5. Liu Y, Hu H.-Y., Liu Q.-J., Hu H.-W., Xu J.-H.: *Tetrahedron* 63, 2024 (2007).
6. Gupta S.P., Mathur A.N., Nagappa A.N., Kumar D., Kumaran S.: *Eur. J. Med. Chem.* 38, 867 (2003).
7. Gundersen L. L., Negussie A.H., Rise F., Ostby O.B.: *Arch. Pharm. (Weinheim)* 336, 191 (2003).
8. Mitsumori T., Bendikov M., Dautel O., Wudl F., Shioya T., Sato H., Sato Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16793 (2004).
9. Flack, H. D.: *Acta Cryst.* A39, 876 (1983).
10. Cremer D., Pople J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1354 (1975).

CONTENTS

Lectures

<i>J. Balla</i>	Flexible scope of accreditation in clinical biochemistry and immunochemistry	s147
<i>J. Berek</i>	Elektroanalytické metódy v klinickej analýze	s149
<i>E. Beinrohr, F. Čácho</i>	Netypické elektroanalytické aplikácie	s151
<i>T. Bertók, P. Gemeiner, J. Tkáč</i>	Vysokocitlivé biorozpoznávanie pomocou lektínových biosenzorov a ich biomedicínske aplikácie	s152
<i>R. Bodor, M. Halašiová, A. Pastierová, J. Ševčík, M. Masár</i>	Využitie kapilárnej elektroforézy na separáciu látok v mnohozložkových vzorkách	s153
<i>H. Dejmková, J. Berek, J. Zima</i>	Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze liečiv a jejich metabolitů	s154
<i>N. Denderz, J. Lehotay, J. Čižmárik</i>	The effect of temperature on the thermodynamic distribution of some potential local anaesthetics on molecularly imprinted polymer stationary phases	s157
<i>J. Dolinová</i>	Jednoduchá řešení pro obtížné HPLC separace	s161
<i>J. Ďurčanská</i>	Monitoring reziduí pesticídov v potravinách na Slovensku	s162
<i>Z. Fáberová, E. Ševčíková</i>	Prezentácia výsledkov monitoringu reziduí pesticídov v detskej a dojčenskej výžive metódou LC/MS/MS v roku 2011	s164
<i>M. Fišera, P. Valášek</i>	Determination and identification of polyphenolic compounds by LC-MS (IT)	s165
<i>J. Fischer, J. Berek</i>	Využití amalgamových a od nich odvozených elektrod v analýze liečiv a jejich metabolitů	s171
<i>R. Góra, M. Hutta, N. Masaryková, P. Rohárik, L. Imriščík</i>	Analýza a charakterizácia humínových kyselín kombináciou metód kvapalinovej chromatografie	s173
<i>A. Horna</i>	Elektrochemická detekce s coulometrickou účinností v HPLC – včera, dnes a zítra	s178
<i>K. Hroboňová, M. Tibensky, J. Lehotay, J. Čižmárik, D. W. Armstrong</i>	Use of derivatized cyclofructans as chiral selectors in HPLC	s180
<i>J. Hrouzek, S. Hrouzková</i>	Systems biology from the point of view of analytical chemistry	s181
<i>S. Hrouzková, E. Matisová, M. Andraščíková</i>	Chromatographic methods for endocrine disrupting chemicals: state-of-the-art and future trends	s182
<i>M. Hutta, R. Góra, M. Chalányová, R. Halko, R. Bodor, M. Masár</i>	Humínové látky – analyty a interferenty chemickej analýzy významných skupín látok	s184

<u>J. Chovancová</u> , K. Čonka, A. Fabišiková, M. Dömötörövá, Z. Stachová Sejáková, B. Drobná, A. Kočan	PCDD/PCDF and PCB concentrations in raw milk in the vicinity of various incinerators and metallurgical plants in Slovakia	s188
<u>K. Juríková</u>	Medicínske laboratóriá a systémy manažerstva kvality	s192
<u>J. Kalaš</u>	Odhad neistoty výsledkov merania vyplývajúci z odberu vzorky	s194
<u>P. Kotianová</u> , Z. Cejpková	Voda ovplyvnila moje chromatografické stanovenie?!	s196
<u>T. Křížek</u> , V. Doubnerová, H. Ryšlavá, P. Coufal	Využití kapilární elektroforézy pro stanovení enzymové aktivity	s199
<u>A. Kubičková</u> , P. Coufal	Kontrola čistoty kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí pomocí kapilární elektroforézy	s201
<u>E. Kurejová</u> , Z. Fáberová, E. Ševčíková, E. Perczelová	Chemická analýza cyanotoxínov vo vodárenských nádržiach a v prírodných kúpaliskách	s202
<u>J. Labuda</u> , K. Beníková, L. Hlavatá, A. Ambrózy, G. Ziyatdinova, V. Vyskočil, A. Ciucu	Concepts of construction and detection with DNA-based biosensors	s206
<u>J. Lehotay</u> , J. Čížmarík, K. Hroboňová	Štúdium rozkladu niektorých lokálnych anestetík v biologických vzorkách metódou HPLC	s207
L. Bačiak, S. Kašparová, <u>T. Liptaj</u>	<i>In vivo</i> kvantitatívna analýza metabolitov v mozgu	s208
<u>D. Mackových</u> , A. Majchrák, J. Nováková, K. Uhrinová	Analýza vybraných prvkov v polymetalických konkréciách metódou AES-ICP a RFS	s210
<u>A. Manová</u> , E. Beinrohr, F. Čacho, L. Lauko	Electrochemical hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of inorganic selenium	s215
<u>D. Milde</u>	Vyhodnocování nejistoty měření – od vydání pokynu pro vyjadřování nejistoty měření (GUM:1995) po současnost	s219
<u>R. Mistrík</u>	Utilizing molecular evolutionary patterns for mass spectra interpretation	s222
J. Mocák, <u>V. Mrázová</u>	Prehľad aplikácií chemometrie v medicíne	s223
<u>J. Petr</u> , P. Ginterová, K. Poláková, J. Znaležiona, Z. Marková, K. Vítková, V. Procházka, V. Maier, R. Zbořil, J. Ševčík	Charakterizace mikro a nanoobjektů pro medicínu pomocí kapilární elektroforézy	s224
<u>M. Polovka</u> , F. Kajdi, B. Tobolková, M. Suhaj, A. Bednáriková	Influence of growing conditions and technological processing on properties of flours assessed by spectroscopic methods	s225
<u>J. Škubák</u> , S. Nagy, T. Liptaj, J. Lehotay	Možnosti využitia HPLC-NMR pri stanovení antioxidantov, komplexov a ďalších látok	s231
<u>E. Štullerová</u> , O. Kovárová	Skúšky spôsobilosti ako účinný nástroj zabezpečenia kvality výsledkov skúšok v skúšobnom laboratóriu štátneho veterinárneho a potravinového ústavu Bratislava	s234
<u>E. Švorc</u> , J. Sochr, P. Tomčík, M. Rievaj, D. Bustín	Simultánne stanovenie vybraných liečiv využitím bórom dopovanej diamantovej elektródy	s237

Chem. Listy 106, s359–s363 (2012)	ACP 2012 – Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<u>B. Tobolková</u> , M. Polovka, M. Suhaj	Verification of wines origin by means of spectroscopic techniques	s238
<u>P. Ulbrich</u>	Metódy skúmania kriminalistickej chémie	s243
<u>M. Vojinović Miloradov</u> , I. Špánik, J. Radonić, M. Turk Sekulić, D. Milovanović, M. Đogo, O. Vyviurska	The monitoring of emerging substances of municipal and industrial waste water from Novi Sad area discharged in to the Danube River	s244
<u>I. Vojsová</u> , A. Šlezárová	Výskyt mykotoxínov v potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu a v krmivách	s246
<u>V. Vyskočil</u> , J. Berek	Využití elektrochemických biosenzorů v klinické analýze	s247
Posters		
<u>A. Ambrózy</u> , J. Labuda	Multi-layer systems for functional and detection design of electrochemical biosensors	s248
<u>M. Andraščíková</u> , S. Hrouzková, S. C. Cunha	Development, validation and application of method based on quechers-dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS for the determination of pesticides in acid fruit samples	s250
<u>L. Andrežalová</u> , Z. Ďuračková	Application of some chemical methods to the investigation of metal complex-DNA interactions	s251
<u>A. Bednáriková</u> , Z. Ciesarová	Validation of HPLC-ESI-MS-MS method for acrylamide determination in bakery products (comparison of simple and improved electrospray ionization)	s252
V. Grigerová, <u>E. Benická</u>	Metodika SPME-GC-MS analýzy prchavej frakcie ovocných džúsov	s257
L. Soják, R. Kubinec, <u>J. Blaško</u> , A. Szabóová, P. Podolec, M. Margetin	GC analysis of the effect of ewe individuals on milk fatty acid composition	s259
<u>F. Čacho</u> , L. Jankuv, L. Lauko, A. Manová, E. Beinrohr	Elektrochemické stanovenie kofeínu v nápojoch s využitím prietokovej injekčnej analýzy	s260
<u>A. Ciucu</u> , O. Covaci, I.-G. David, V. David	Development of novel chemically modified electrodes for assessment of neurotransmitters involved in neuro-degenerative diseases	s261
<u>A. Ciucu</u> , O. Covaci, I.-G. David, K. Beníková, J. Labuda	Improved electrocatalytic voltammetric determination of guanine at a cobalt phthalocyanine modified carbon nanotubes paste electrode	s262
<u>R. Gorovenko</u> , J. Krupčík, P. Májek, I. Špánik	Detailed analysis of C6-C12 aromatic hydrocarbons in low boiled petrochemical products by flow modulated comprehensive two dimensional gas chromatography	s263
<u>N. Grujić</u> , N. Milić, M. Turk Sekulić, J. Radonić, M. Milanović, I. Mihajlović, M. Vojinović Miloradov	Quantification of emerging organic contaminants in the danube river samples by HPLC	s264
<u>L. Hodulová</u> , R. Kostrhounová, I. Borkovcová, L. Vorlová, A. Pechová	Vliv přídavku mědi do krmné dávky na obsah retinolu a tokoferolu v kozím mléce	s267

Chem. Listy 106, s359–s363 (2012)	ACP 2012 – Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<i>A. Spevak, K. Hroboňová, J. Lehotay, J. Čížmárik</i>	Use of 7-hydroxycoumarin molecularly imprinted polymer in analysis of propolis and plant samples	s271
<i>S. Hrouzková, M. Andraščíková, S. B. Abdel Ghani, A. Purdešová</i>	Development of fast gas chromatography method for determination of pyridalyl in fruit and vegetables	s272
<i>M. Chalányová, I. Petráňová, M. Hutta</i>	Štúdium separácie vybraných chirálnych pesticídov technikou prepínania achirálna-chirálna kolóna	s273
<i>D. Kačeriaková, I. Špánik</i>	Separation of enantiomers of alcohols on 6-O-TBDMS-2,3-di-O-Et- and 2,6-di-O-Me-3-O-Pe- β - and γ -cyclodextrin type stationary phases	s277
<i>L. Knapčíková, J. Husár</i>	Aplikácia diferenciálnej skenovacej kalorimetrie pri testovaní nových kompozitných materiálov	s281
<i>R. Komendová, L. Sommer</i>	Development of an analytical method for the determination of platinum and palladium in environmental samples	s286
<i>M. Hutta, V. Komorowska</i>	Možnosti využitia RP-HPLC s tandemovou multidetekciou na charakterizovanie vzoriek proteínových výživových doplnkov s liečebným účinkom	s288
<i>R. Kostrhounová, L. Hodulová, I. Borkovcová, L. Vorlová, A. Pechová</i>	Sledování obsahu cholesterolu v kozím mléce po suplementaci krmné dávky chlorellou	s294
<i>R. Kubinec, J. Blaško, R. Górová, G. Addová, I. Ostrovský, L. Soják, P. Podolec, A. Szabóová, J. Višňovský, J. Mikulec</i>	GC-MS analýza mastných kyselín v riasach	s297
<i>L. Kučera, O. Kurka, P. Bednář</i>	LC/MS method development for the determination of degradation products of anthocyanin dyes	s298
<i>E. Belajová, K. Kukurová, Z. Ciesarová</i>	Comparison of procedures for extraction of saccharides from wheat flour – accelerated solvent extraction vs. sonication and orbital shaker	s299
<i>J. Lakatošová, M. Sák, I. Dokupilová, T. Jakubík</i>	Analýza aromatických látok vo víne pomocou HS-SPMCE-GC-MS	s303
<i>J. Lakatošová, L. Priesolová, M. Terneni, D. Bachár, D. Šmogrovičová</i>	Analysis of spirit aroma compounds by head-space solid-phase microcolumn extraction	s307
<i>J. Laštincová, L. Pospíšilová, E. Beinrohr</i>	Determination of alcohol, sugar, and volatile acids in wine by FTNIR	s309
<i>J. Laštincová, L. Pospíšilová, E. Beinrohr</i>	Medzilaboratórne porovnávacie skúšky v akreditovaných subjektoch	s310
<i>L. Lauko, E. Beinrohr</i>	Využitie UV rozkladu v prietokových elektrochemických analyzátoroch	s314
<i>D. Markechová, P. Májek, J. Sádecká</i>	Charakterizácia liehovín aromatizovaných borievkami UV-VIS absorpčnou spektrometriou	s315
<i>E. Marková, P. Nováková, H. Švecová, J. Skopalová, P. Barták</i>	Studium produktů anodické oxidace 2,4,6-tribromfenolu	s319

Chem. Listy 106, s359–s363 (2012)	ACP 2012 – Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<i>N. Masaryková, R. Góra, M. Hutta, G. Grmanová</i>	Stanovenie proteinogénnych aminokyselín v rozkladných produktoch humínových kyselín izolovaných z pôd metódou reverzno-fázovej kvapalinovej chromatografie s využitím kolón monolitového typu a predkolónovej derivatizácie	s320
<i>P. Nováková, H. Švecová, E. Marková, J. Skopalová, P. Bednář, P. Barták</i>	Derivatizace resveratrolu a jeho GC/MS analýza ve víně	s324
<i>A. Pažitná, I. Špánik</i>	The determination of enantiomer distribution of main chiral volatile organic compounds in monofloral honeys	s325
<i>M. Peško, K. Kráľová</i>	Influence of low HgCl ₂ concentrations on production characteristics and mercury accumulation in rapeseed plants	s329
<i>P. Podolec, J. Blaško, R. Kubinec, G. Adžová, R. Górová, L. Soják, I. Ostrovský, A. Szabóová, J. Višňovský</i>	Stanovenie sevofluránu a jeho metabolitu hexafluórizopropanolu metódou GC-MS/MS	s334
<i>J. Ráčzová, M. Hutta, J. Pessl</i>	Štúdium aniónovo-výmennej chromatografie využívajúcej skokové gradienty na charakterizovanie humínových látok v alkalickom prostredí	s335
<i>M. Rievaj, L. Švorc, J. Svítková, P. Tomčík, D. Bustín</i>	Voltampérometrické stanovenie kofeínu na bórom dopovanej diamantovej elektróde	s338
<i>M. Koreňovská, J. Sádecká</i>	Porovnanie obsahu toxických a minerálnych prvkov v odrodách maku registrovaných a pestovaných na Slovensku	s339
<i>J. Sádecká, M. Suhaj</i>	Komparácia ekologickej a konvenčnej produkcie vybraných slovenských odrodových vín rôznymi analytickými metódami	s340
<i>I. Antal, Y. Bazel, Z. Kormosh, R. Serbin</i>	Development of the plasticized membrane vitamin B ₁ -selective electrodes	s343
<i>R. Serbin, Y. Bazel, V. Andruch, I. Antal</i>	Extractive separation, preconcentration, spectrophotometric and atomic absorption determination of platinum as an ion associate with astraphloxine FF	s344
<i>J. Petrovaj, T. Gondová, P. Kutschy, M. Baláž, R. Serbin</i>	HPLC enantioseparation of new amino analogs of indole phytoalexins	s345
<i>L. Soják, R. Kubinec, J. Blaško, A. Szabóová, P. Podolec, M. Margetín</i>	GC evaluation of the quality of slovak ewe milk products based on fatty acids health affecting compounds	s346
<i>L. Staruch, M. Matí</i>	Súčasná analytická metodika na stanovenie alergénov v potravinách a presnosť ELISA metódy v praxi	s347
<i>H. Švecová, E. Marková, P. Nováková, J. Součková, J. Skopalová, P. Barták</i>	Studium agregace fosfolipidů voltametričnými metodami	s353
<i>T. Takáčová, J. Šturdíková, K. Halzlová, M. Kališ</i>	Biologický monitoring pri expozícii rôznym chemickým faktorom – projekt Democophes	s354
<i>V. Velková, P. Šmíra, D. Kačíková</i>	Stanovenie terpenov pri termickom zaťažení jedľového dreva	s355
<i>V. Vrábek, L. Švorc, Š. Marchalín</i>	Crystal structure and characterization of chiral indolizine derivatives	s357

AUTHOR INDEX

- Abdel Ghani S. B. s272
Addová G. s297, s334
Ambrózy A. s206, s248
Andraščíková M. s182, s250, s272
Andrežalová L. s251
Andruch V. s344
Antal I. s343, s344
Armstrong D. W. s180
- Bachár D. s307
Bačiak L. s208
Baláž M. s345
Balla J. s147
Barek J. s149, s154, s171, s247
Barták P. s319, s324, s353
Bazel Y. s343, s344
Bednár P. s298, s324
Bednáriková A. s225, s252
Beinrohr E. s151, s215, s260, s309, s310, s314
Belajová E. s299
Benická E. s257
Beniková K. s206, s262
Bertók T. s152
Blaško J. s259, s297, s334, s346
Bodor R. s153, s184
Borkovcová I. s267, s294
Bustín D. s237, s338
- Cejpková Z. s196
Ciesarová Z. s252, s299
Ciucu A. s206, s261, s262
Coufal P. s199, s201
Covaci O. s261, s262
Cunha S. C. s250
- Čacho F. s151, s215, s260
Čižmárik J. s157, s180, s207, s271
Čonka K. s188
- David I.-G. s261, s262
David V. s261
Dejmková H. s154
Denderz N. s157
Đogo M. s244
Dokupilová I. s303.
Dolinová J. s161
Dömötörövá M. s188
Doubnerová V.
Drobná B. s188
Đuračková Z. s251
Đurčanská J. s162
- Fáberová Z. s164, s202
Fabišiková A. s188
Fischer J. s171
Fišera M. s165
- Gemeiner P. s152
Ginterová P. s224
Gondová T. s345
Góra R. s173, s184, s320
Górová R. s297, s334
Gorovenko R. s263
Grigerová V. s257
Grmanová G. s320
Grujić N. s264
- Halašiová M. s153
Halko R. s184
Halzlová K. s354
Hlavatá L. s206
Hodulová L. s267, s294
Horna A. s178
Hroboňová K. s180, s207, s271
Hrouzek J. s181
Hrouzková S. s181, s182, s250, s272
Husár J. s281
Hutta M. s173, s184, s273, 288, s320, s335
- Chalányová M. s184, s273
Chovancová J. s188
- Imriščák L. s173
- Jakubík T. s303
Jankuv L. s260
Juriková K. s192
- Kačeriaková D. s277
Kačíková D. s355
Kajdi F. s225
Kalaš J. s194
Kališ M. s354
Kašparová S. s208
Knapčíková L. s281
Kočan A. s188
Komendová R. s286
Komorowska V. s288
Koreňovská M. s339
Kormosh Z. s343
Kostrhounová R. s267, s294
Kotianová P. s196
Kovárová O. s234
Kráľová K. s329
- Křížek T. s199
Krupčík J. s263
Kubičková A. s201
Kubinec R. s259, s297, s334, s346
Kučera L. s298
Kukurová K. s299
Kurejová E. s202
Kurka O. s298
Kutschy P. s345
- Labuda J. s206, s248, s262
Lakatošová J. s303, s307
Laštincová J. s309, s310
Lauko L. s215, s260, s314
Lehotay J. s157, s180, s207, s231, s271
Liptaj T. s208, s231
- Mackových D. s210
Maier V. s224
Majchrák A. s210
Májek P. s263, s315
Manová A. s215, s260
Marchalín Š. s357
Margetín M. s259, s346
Markechová D. s315
Marková E. s319, s324, s353
Marková Z. s224
Masár M. s153, s184
Masaryková N. s173, s320
Mati M. s347
Matisová E. 182
Mihajlović I. s264
Mikulec J. s297
Milanović M. s264
Milde D. s219
Milić N. s264
Milovanović D. s244
Mistrík R. s222
Mocák J. s223
Mrázová V. s223
- Nagy S. s231
Nováková J. s210
Nováková P. s319, s324, s353
- Ostrovský I. s297, s334
- Pastierová A. s153
Pažitná A. s325
Pechová A. s267, s294
Perczelová E. s202
Peško M. s329

- Pessl J. s335
Petr J. s224
Petranová I. s273
Petrovaj J. s345
Podolec P. s259, s297, s334, s346
Poláková K. s224
Polovka M. s225, s238
Pospíšilová L. s309, s310
Priesolová L. s307
Procházka V. s224
Purdešová A. s272
- Ráčzová J. s335
Radonič J. s244, s264
Rievaj M. s237, s338
Rohárik P. s173
Ryšlavá H. s199
- Sádecká J. s315, s339, s340
Sák M. s303
Serbin R. s343, s344, s345
Skopalová J. s319, s324, s353
Sochr J. s237
Soják L. s259, s297, s334, s346
- Sommer L. s286
Součková J. s353
Spevak A. s271
Stachová Sejáková Z. s188
Staruch L. s347
Suhaj M. s225, s238, s340
Svítková J. s338
Szabóová A. s259, s297, s334, s346
- Ševčík J. s153, s224
Ševčíková E. s164, s202
Škubák J. s231
Šlezárová A. s246
Šmíra P. s355
Šmogrovičová D. s307
Špánik I. s244, 263, s277, s325
Štullerová L. s234
Šturdíková J. s354
Švecová H. s319, s324, s353
Švorc L. s237, s338, s357
- Takáčová T. s354
Terneni M. s307
Tibenský M. s180
- Tkáč J. s152
Tobolková B. s225, s238
Tomčík P. s237, s338
Turk Sekulic M. s244, s264
- Uhrinová K. s210
Ulbrich P. s243
- Valášek P. s165
Veřková V. s355
Višňovský J. s297, s334
Vítková K. s224
Vojinović Miloradov M. s244, s264
Vojsová I. s246
Vorlová L. s267, s294
Vrábel V. s357
Vyskočil V. s206, s247
Vyviurska O. s244
- Zbořil R. s224
Zima J. s154
Ziyatdinova G. s206
Znaležiona J. s224

LM1**APLIKÁCIE TERMICKÝCH METÓD PRI HODNOTENÍ TERMICKEJ STABILITY HASIACICH PRÁŠKOV NA BÁZE HYDROGENFOSFOREČNANOV****IVETA MARKOVÁ* a JÁN ZELENÝ**

*Technická univerzita vo Zvolene, T. G. Masaryka 24,
960 53 Zvolen, Slovenská republika
markova@tuzvo.sk

Hasiace prášky v súčasnosti patria k stále viac zastúpeným hasiacim prostriedkom, ktoré sa využívajú na rýchlu a prvotnú likvidáciu požiaru. Objasnenie hasiaceho účinku BC a ABCD práškov je potvrdené radou experimentov^{1,2}. Spaľovanie je reťazová reakcia pri, ktorej vznikajú krátkodobé existujúce radikály, aktívne molekuly a atómy, ktoré spôsobujú rozvetvenie reťazcov a podporujú tak ďalšie horenie. Ak sú do plameňa vnesené častice prášku to znamená, že sa vytvorí prášková „stena“, ktorá odoberá vzniknutým radikálom, aktívnym molekulám a atómom energiu. Táto ich vlastná energia – aktivačná energia – bude potom tak malá, že nebude môcť ovplyvniť pri vzájomnej reakcii radikálov ďalší priebeh reťazovej reakcie. Ak nastane prerušenie reťazovej reakcie, plameň zhasne. Hovorí sa preto jednoducho o „stenovom efekte“ eventuálne o negatívnej katalýze v heterogénnej fáze³. Vyššie uvedené tvrdenie je veľmi kontraverzné. Pre účely sledovania mechanizmu hasenia práškami, boli vykonané termické analýzy vybraných vzoriek hasiacich práškov.

Pre účely sledovania termickej stability a následného rozpadu hasiaceho prášku bola zvolená metóda termogravimetrie (TG), kde sa sleduje hmotnostný úbytok vzorky v závislosti od plynulého ohrevu ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$) a získaná TG krivka ako funkcia závislosti úbytku hmotnosti od narastajúcej teploty sa následne derivuje (derivačná termogravimetria, DTG) pre účely kvantifikácie termickej degradácie sledovanej tepelne zaťažovanej vzorky. Experimenty sa realizovali v atmosfére vzduchu.

Pre účely sledovania procesu „prášok odoberá vzniknutým radikálom plameňa, aktívnym molekulám a atómom plameňa energiu“ sa zvolila diferenciálna skenovacia kalorimetria (DSC), ktorá sleduje množstvo uvoľneného prípadne spotrebovaného tepla pri termickom rozklade

vzorky. Experimenty sa realizujú za rovnakých podmienok ako pri TG a DTG analýze. Pre účely analýzy boli vybrané vzorky FUREX, BAVEX, ktorých chemická báza je dihydrogenfosforečnan amónny, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Základnou látkou skúmaných práškov sú fosforečnany amónne ako hydrogenufosforečnan diamónny, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, a dihydrogenfosforečnan amónny. Aby sa fosforečnany amónne mohli použiť v požiarnej technike, je nutné ich vyrobiť vo forme malých kryštálov (o priemere asi 0,1 mm), musia byť tekuté a odolné voči vlhkosti. Ich vlastnosti sa nesmú meniť ani počas dlhodobého skladovania. Vzniknutý amoniak, uvoľnený pri rozklade fosforečnanov amónnych, tiež pôsobí na plameň inhibične. Napriek tomu, že amoniak sa vyskytuje v malých koncentráciách, pôsobí podobne ako halogénové uhľovodíky, ako negatívny katalyzátor v homogénnej fáze. Fosforečnany amónne a hydrogenuhličitan sodný prispievajú k vytvoreniu zuhoľnatej vrstvy.

Práškovité tuhé látky, zavedené do pásma horenia, pôsobia väčšinou izolačne dovtedy, kým sú tepelne stabilné. Ich chladiace pôsobenie je relatívne malé vzhľadom k nízkemu mernému teplu a vysokým teplotám topenia a vyparovania. Ich pôsobenie závisí od stupňa disperzity a rýchlosti usadzovania. Napriek uvedeným skutočnostiam sme zistili istú tepelnú stabilitu cca do 170°C u všetkých vzoriek hasiacich práškov. Prášky vykazovali príslušné endotermické reakcie, ktoré súvisia s ich termickým rozkladom v prípade ich aplikácie do pásma horenia.

Príspevok vznikol vďaka finančnej podpory VEGA 1/0345/12.

LITERATÚRA

1. Balog K., v: *Hasiace látky a jejich technológie*, str. 173. Edícia SPBI SPEKTRUM 37, Ostrava 2004.
2. Marková I.: *SPEKTRUM 10*, 370 (2010).
3. Orliková K., Štroch P., v knihe: *Hasiva klasická a moderní*, str. 72. SPBI SPEKTRUM, Ostrava 2002.

LM2**AUTOMATED ELECTROCHEMICAL SYSTEM FOR DETERMINATION OF POLLUTANTS IN WATER****KATARÍNA LENGHARTOVÁ***
a ERNEST BEINROHR

*Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Fakulta prírodných vied,
Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovakia
katarinalenghart@gmail.com*

In recent years, there has been an increasing interest in using of electroanalytical methods in flow systems¹. The reason is in the demand for continuous and fast analysis which can be performed the best by means of flow systems. The aim of this work was to review such techniques with emphasis on possible utilisation of electroanalytical methods with flow-through systems and outline some applications in process analytical chemistry.

Flow-through systems with electrochemical detection allow to analyse large number of samples in short time, to obtain reliable results and to work with small volumes of reagents. Other advantages are low capital and

operating costs and possibility of miniaturization. Characteristics of flow-through techniques predispose these as a suitable option wherever it is necessary to determine the analytes in a single sample or monitor the changes in concentration of the analytes during the ongoing process especially in process analytical chemistry.

Presently is process analysis² in high technical and professional level not just because of advanced computer technology or robotics, but also because of employing flow systems. The development of industrial automation is a logical response to the requirement of quality demands and performance requirements of technologies to increase productivity.

REFERENCES

1. Helán V., v knihe: *Elektroanalytické metódy*, 2 Theta, Český Těšín 2001.
2. Workman J., Jr., Koch M., Veltkamp D.: *Anal. Chem.* 79, 4345 (2007).