



XI. medzinárodná konferencia
SÚČASNÝ STAV A PERSPEKTÍVY
ANALYTICKEJ CHÉMIE V PRAXI

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

9. -12. mája 2010
v Bratislave



ORGANIZÁTORI

Ústav analytickej chémie

Fakulty chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave

v spolupráci

s Katedrou analytickej chémie, Prírodovedecké fakulty UK v Prahe,

Odbornou skupinou pre analytickú chémiu

Slovenskej chemickej spoločnosti

a

Odbornou skupinou pre analytickú chémiu

Českej spoločnosti chemické

ODBORNÝ GARANT

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

PROGRAMOVÝ VÝBOR

Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., PŘF UK v Prahe

Doc. Ing. Ernest Beinrohr, CSc., FCHPT STU

Doc. RNDr. Milan Hutta, CSc., PřF UK

Ing. Anton Kočan, CSc., SZU v Bratislave

Prof. Ing. Ján Krupčík, DrSc., FCHPT STU

Prof. Ing. Ján Labuda, DrSc., FChPT STU

Prof. Ing. Jozef Lehotay, DrSc., FCHPT STU

Doc. Ing. Tibor Liptaj, CSc., FCHPT STU

Prof. Ing. Ján Mocák, DrSc., FPV UCM v Trnave

Ing. Jozef Obernauer, SNAS

MVDr. Ján Pliešovský, CSc., ŠVPS SR

Doc. MUDr. Ivan Rovný, PhD., MPH, ÚVZ SR

Prof. Ing. Peter Šimko, DrSc., VÚP v Bratislave

ORGANIZAČNÝ VÝBOR

Ing. Svetlana Hrouzková, PhD.

Ing. Pavel Májek, PhD.

Ing. Ľubomír Švorc, PhD.

Doc. Ing. Katarína Hroboňová, PhD.

Ing. Antónia Janáčková, PhD.

Mgr. Vlastimil Vyskočil

Ing. Zuzana Hloušková, hospodár

NOVÉ MOŽNOSTI ELEKTROCHEMICKÉHO MONITOROVÁNÍ GENOTOXICKÝCH A EKOTOXICKÝCH ORGANICKÝCH LÁTEK

JIŘÍ BAREK a KAROLINA PECKOVÁ

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

Klíčová slova: voltametrie, amperometrie, amalgámové elektrody, borem dopované diamantové filmové elektrody, environmentální analýza

1. Úvod

V dnešní době jsme svědky rychle rostoucích nároků na citlivost a selektivitu moderních analytických metod používaných v analýze složek životního prostředí, které jsou často v rozporu se současnými požadavky na klesající cenu analýz a rychlost, jednoduchost a uživatelskou přívětivost používaných metod. Široké spektrum environmentálně významných analytů a rozmanitost analyzovaných matric nevyhnutelně vede i širokému spektru analytických metod používaných v této oblasti. Je zřejmé, že navzdory úžasným možnostem moderních analytických technik neexistuje a zřejmě ani v dohledné době nebude existovat analytická metoda obecně použitelná pro všechny typy analytů, matric, koncentrací, atp. Navíc se v legislativě Evropské unie objevuje požadavek několika nezávislých metod použitelných ke stanovení zejména toxických látek v životním prostředí, má-li být výsledek spolehlivý „nade vší rozumnou pochybnost“. Navzdory skutečnosti, že v současné environmentální analýze převažují moderní separační a spektrometrické metody, domníváme se, že i moderní elektroanalytické metody mohou v této oblasti hrát významnou roli a v řadě případů mohou vhodným způsobem doplňovat či dokonce nahrazovat finančně náročnější metody separační a spektrometrické. Tuto skutečnost lze snadno demonstrovat na příkladu monitorování genotoxických a ekotoxických látek, z nichž významná část obsahuje elektroaktivní funkční skupiny a k jejichž stanovení lze tudíž použít moderní elektroanalytické metody^{1–3}.

Mezi typické snadno elektrochemicky redukovatelné funkční skupiny přítomné v molekulách genotoxických a ekotoxických polutantů životního prostředí patří nitroskupina, nitroskupina či azoskupina, karbonylová skupina a celá řada heterocyklických systémů, mezi elektrochemicky snadno oxidovatelné funkční skupiny patří zejména amino či hydroxyskupina na aromatickém jádře. Jejich elektrochemické chování a mechanismus jejich elektrochemické redukce či oxidace jsou podrobně diskutovány např. v monografiích či přehledech^{4–9}. Ke stanove-

ní elektrochemicky redukovatelných polutantů je dosud nepřekonaným elektrodovým materiálem rtuť^{8–11}, ke stanovení elektrochemicky oxidovatelných sloučenin se dnes nejčastěji používají různé formy uhlíku^{12,13}, uhlíkové pastové elektrody^{14–18} a v poslední době i borem dopované diamantové filmové elektrody^{19–24}.

Za hlavní přednosti moderních elektroanalytických metod, zejména voltametrie používané při vsádkových stanoveních a amperometrie používané při průtokových měřeních (HPLC-ED, FIA-ED či SIA-ED) lze považovat vysokou citlivost, nízké pořizovací i provozní náklady, snadnou automatizovatelnost a v řadě případů i použitelnost v terénu. Selektivita, která bývá často označována za slabinu elektroanalytických metod, je přítom v řadě případů postačující i pro analýzu poměrně složitých environmentálních či dokonce biologických vzorků. Navíc lze snadno jak citlivost tak i selektivitu zvýšit pomocí předběžné separace a prekoncentrace, v současné době nejčastěji pomocí extrakce tuhou fází^{22–24} umožňující stanovení nanomolárních koncentrací elektrochemicky aktivních látek či pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie²⁵, umožňující rovněž stanovení nanomolárních koncentrací elektrochemicky aktivních organických látek avšak spíše v relativně jednodušších matricích.

Rozhodující roli při voltametrickém či amperometrickém stanovení environmentálních polutantů hraje pracovní elektroda, která rozhoduje o přístupném potenciálovém oknu, šumu a tím i mezi detekce, a v neposlední řadě i o problémech související s možnou pasivací pracovní elektrody. Důležitá je i její mechanická robustnost umožňující použití při průtokových měřeních či při práci v terénu. V následujícím textu budou diskutovány možnosti a omezení jednotlivých typů pracovních elektrod, které se v naší UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí osvědčily při stanovení mikro a submikromolárních koncentrací různých typů organických polutantů.

2. Polarografie a voltametrie na rtuťových elektrodách

Jak již bylo řečeno, rtuť je vynikajícím elektrodovým materiálem použitelným ke stanovení elektrochemicky redukovatelných látek. Potvrzují to i naše poslední studie věnované např. stanovení 6-nitrobenzimidazolu²⁶ pomocí diferenční pulsní polarografie (DPP) na kapající rtuťové elektrodě (DME) v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} či pomocí diferenční pulsní voltametrie (DPV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} , přičemž obě tyto metody jsou použitelné i ke stanovení této genotoxické látky v pitné vodě a z předběžných pokusů vyplývá, že po

předběžné separaci a prekoncentraci pomocí SPE budou použitelné i ke stanovení v říční vodě. Jako další příklad lze uvést stanovení genotoxického 4-nitroindanu pomocí DPP na DME a DPV na HMDE se srovnatelnými parametry²⁷. Další metody tohoto typu lze nalézt v detailním přehledu využití rtuťových elektrod v environmentální analýze¹¹ či v analýze pitné vody¹⁰.

Pro stanovení genotoxických látek ve složitějších maticích typu říční, povrchová či odpadní voda se lépe osvědčuje rtuťová kapající elektroda, jejíž povrch je v průběhu měření periodicky obnovován což zmenšuje problémy související s pasivací pracovní elektrody látkami v analyzovaném vzorku. Proto se jí zpravidla dává přednost navzdory menší citlivosti ve srovnání s HMDE. Ta se naopak upřednostňuje v případě jednodušší matrice typu pitná voda, kde je naopak využívána její vyšší citlivost a případně i možnost jejího dalšího zvýšení pomocí Ad-SV²⁵. Za hlavní nevýhodu rtuťových elektrod lze považovat jejich omezenou mechanickou stabilitu, která komplikuje jejich použití ve spojení s průtokovými metodami či při terénních měřeních. Kromě toho však jejich širšímu používání dnes brání zejména neopodstatněné obavy z toxicity rtuti a v některých případech i omezené potenciálové okno v anodické oblasti

3. Moderní elektrodové materiály

V současné době je věnována značná pozornost hledání nových elektrodových materiálů charakterizovaných co nejširším potenciálovým oknem, nejnižším šumem, vysokou rezistencí vůči pasivaci ať už produkty elektrodové reakce či interferenty přítomnými v analyzovaném vzorku a případně i snadným obnovou povrchu elektrody, což může eliminovat řadu problémů souvisejících s její pasivací.

Pro stanovení elektrochemicky redukovatelných chemických karcinogenů a dalších ekotoxických organických látek se v naší laboratoři osvědčily různé typy amalgámových elektrod, které jsou netoxické a tudíž kompatibilní s konceptem tzv. zelené analytické chemie, mají potenciálové okno téměř srovnatelné s elektrodami rtuťovými, a jejich povrch lze snadno obnovovat, nejnázne elektrochemickou předúpravou. Z celé řady různých typů amalgámových elektrod jsme s úspěchem použili leštěnou stříbrnou amalgámovou elektrodu (p-AgSAE), rtuťovým meniskem modifikovanou stříbrnou amalgámovou elektrodu (m-AgSAE), rtuťovým filmem modifikovanou stříbrnou amalgámovou elektrodu (MF-AgSAE) a pastové stříbrné amalgámové elektrody ať už s organickou pastovací kapalinou či bez ní. Zajímavé jsou i stříbrné tuhé amalgámové elektrody na bázi jediného krystalu tohoto materiálu, umožňující práci s malými objemy analyzovaného roztoku (100 μ l i méně) či jejich kombinaci s kapilárními separačními technikami (mikrokolonová HPLC či CZE) a porézní amalgámové elektrody u nichž lze očekávat možnost elektrochemické detekce v průtokovém uspořádání v coulometrickém režimu. Hlavní výho-

dou tuhých amalgámových elektrod je možnost elektrochemické eliminace jejich pasivace vhodnými čistícími potenciálovými programy, jejich mechanická robustnost umožňující kombinaci s průtokovými detektory typu „wall-jet“ nebo „thin-layer“ či s detektory tubulárními, a jejich kompatibilita s přenosnými měřicími systémy. Výhodou pastových amalgámových elektrod je možnost snadného mechanického obnovení jejich povrchu po vytlačení tenké vrstvy pasty z těla elektrody a jejím otření. Nevýhodou ve srovnání s elektrodami na bázi kapalné rtuti je horší opakovatelnost a reprodukovatelnost měření, větší šum a vyšší meze detekce a stanovitelnosti. Řadu detailních informací o amalgámových elektrodách lze získat v našich přehledných pracích^{3,30,31}.

Za perspektivní elektrodový materiál považujeme borem dopované mikrokrytalické či nanokrytalické diamantové filmy, které se vyznačují zejména mimořádně širokým potenciálovým oknem umožňujícím jejich využití pro katodické i anodické děje, nízkým šumem, který je předurčuje k detekci v průtokových systémech a vysokou odolností vůči pasivaci danou parafinickým charakterem jejich povrchu, který nepodporuje adsorpci většiny sledovaných analytů. Průtokové detektory typu „thin-layer“ či detektory využívající borem dopované diamantové filmové mikroelektrody vytvořené na platinových mikroelektrodách nabízejí zajímavé možnosti ve spojení s průtokovými technikami. Jako příklad jejich uplatnění lze uvést voltametrické²⁸ či amperometrické²⁹ stanovení genotoxického 1-aminopyrenu a 1-nitropyrenu v moči po předběžné separaci a prekoncentraci extrakcí na tuhou fázi. Přehled dalších aplikací tohoto perspektivního elektrodového materiálu v environmentální elektroanalýze lze nalézt v pracích^{19–24}.

4. Měření v průtokových systémech

Elektroanalytická měření v průtokových systémech jsou motivována jednak snahou po zkrácení doby stanovení a zvýšení produktivity (FIA či SIA) a jednak snahou o zvýšení selektivity (kombinace s HPLC, CZE, atp). Zvýšený přísun analytu konvekcí má při měření v proudících kapalinách za následek zvýšení citlivosti detekce a současně odplavování produktů elektrodové reakce od povrchu pracovní elektrody snižuje nebezpečí její pasivace. Kovová rtuť není příliš vhodná pro průtoková měření vzhledem k omezené mechanické stabilitě HMDE, která v těchto případech slouží nejčastěji jako pracovní elektroda. Pro detekci elektrochemicky redukovatelných látek se nám osvědčila její náhrada meniskem modifikovanou stříbrnou tuhou amalgámovou elektrodou ať už v uspořádání „wall-jet“ či v tenkovrstvém nebo tubulárním uspořádání^{30,31}. Za perspektivní považujeme i amalgámové porézní elektrody, které jsou v počátečním stadiu testování a krystalické stříbrné tuhé amalgámové elektrody kompatibilní s kapilárními separačními technikami. Konkrétně jsme amalgámové elektrody využili k průtokové detekci řady genotoxických nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a ekotoxických nitrofenolů a to se všemi výše

uvedenými detekčnými systémy. Pro detekci elektrochemicky oxidovatelných látek se v průtokovém režimu kromě různých typů uhlíkových pastových elektrod zpravidla ve „wall-jet“ uspořádání v naší laboratoři osvědčily i borem dopované diamantové filmové elektrody ať už ve „wall-jet“ nebo v tenkovrstvém uspořádání^{19,20}. V případě využití uhlíkových pastových elektrod k elektrochemické detekci ve spojení s HPLC zpravidla v naší laboratoři používáme uhlíkové pastové elektrody na bázi mikrokuliček ze skleného uhlíku¹⁵ kompatibilní i s vysokým obsahem organického rozpouštědla (methanolu či acetonitrilu), které jinak výrazně omezuje životnost uhlíkových pastových elektrod založených na klasických uhlíkových materiálech.

5. Perspektivy elektroanalytických metod v environmentální analýze

Navzdory fascinujícím možnostem moderních separačních a spektrometrických metod se domníváme, že i moderní elektroanalytické metody, ať už s klasickými či netradičními elektrodovými materiály diskutovanými výše, mohou být užitečné při stanovení stopových množství elektrochemicky aktivních látek v různých environmentálních matricích. V případě jednodušších matric s menším nebezpečím pasivace pracovní elektrody, jako jsou pitná či méně znečištěná říční voda, lze pro elektrochemicky redukovatelné polutanty v řadě případů bez problémů použít různé typy amalgámových elektrod, v případě složitějších matric s větším nebezpečím pasivace, je stále nutno použít kapající rtuťovou kapkovou elektrodu, jejíž periodicky obnovovaný povrch účinně eliminuje většinu problémů souvisejících s pasivací. V případě tuhých amalgámových elektrod lze někdy pasivaci účinně eliminovat elektrochemickou předúpravou, v případě pastových amalgámových elektrod snadnou obnovou povrchu pasty jejím mechanickým ořením. Jinou alternativou je možnost předběžné separace a prekoncentrace analytu např. pomocí extrakce tuhou fází, umožňující stanovení nano a často i subnanomolárních koncentrací elektroaktivních látek i v komplikovaných environmentálních matricích. Borem dopované diamantové filmové elektrody jsou použitelné pro oxidovatelné i redukovatelné analyty a v řadě případů není nutná předběžná separace vzhledem ke značné odolnosti těchto elektrod vůči pasivaci. Pro analýzu elektrochemicky oxidovatelných organických polutantů se nabízí různé typy uhlíkových pastových elektrod.

Ve všech případech je nutné zdůraznit, že elektroanalytické metody mají naději na praktické uplatnění v případech, kdy nám jde o cílené stanovení jednoho či několika málo známých elektrochemicky aktivních analytů po kterých pátráme. V těchto případech je možné poměrně rychle vypracovat a optimalizovat příslušný postup včetně předběžné separace a prekoncentrace. Pro stanovení neznámých polutantů je zpravidla nutné použít časově i finančně náročnější avšak neobvykle citlivé a selektivní metody zahrnující zpravidla i jednoznačnou identifikaci

neznámých analytů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Závěrem lze konstatovat, že v oblasti organických polutantů je nejsilnější stránkou moderních elektroanalytických metod jejich použitelnost k velkoplošnému monitorování předem vybraných organických polutantů. Jako příklad lze uvést selektivní stanovení řady nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků v přítomnosti elektrochemicky inaktivních matečných polycyklických aromátů, stanovení elektrochemicky oxidovatelných aromatických aminů v přítomnosti elektrochemicky neoxidovatelných azobarviv, které se z nich vyrábí, či stanovení řady elektrochemicky oxidovatelných metabolitů obsahujících OH skupinu na aromatickém jádře, které slouží jako biomarkery expozice řadě toxických či genotoxických organických sloučenin.

Jako mimořádně perspektivní se nám jeví vývoj chemicky či biologicky modifikovaných elektrod, kombinace elektrochemických a imunochemických přístupů, využití vtištěných polymerů či různých typů semipermeabilních membrán k modifikaci elektrod, využití různých typů nanočástic ke zvýšení citlivosti či efektivity elektroanalytických stanovení a kombinace elektroanalytických metod s předběžnou separací a prekoncentrací (kombinace s extrakcí tuhou fází, kapalinovou chromatografií či elektromigračními metodami).

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC 06035, MSM 002162085, RP 14/63), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt SVV 261204) a NATO grantem CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

1. Moreira J. C., Barek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
2. Barek J., Mejstrik V., Muck A., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30, 37 (2000).
3. Barek J., Moreira J.C., Zima J.: *Sensors* 5, 148 (2005).
4. Barek J., Zima J., v knize: *UNESCO Technical Report 25* (Štulík K; Kalvoda R., ed.), s. 137. UNESCO Venice Office, Prague 1996.
5. Bard A.J., Lund H.: *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements*, Vol.XI-XV: Organic Section. M. Dekker, New York 1973–1984.
6. Lund H., Beizer M.: *Organic Electrochemistry*. M.Dekker, New York 1991.
7. Smyth W.F., Voss J.G.: *Analytical Voltammetry*. Elsevier, Amsterdam 1992.
8. Barek J., Fogg A.G., Muck A., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 291(2001).
9. Barek J.: *G.I.T. Laboratory J. 11*, 30 (2007).
10. Vyskocil V., Barek J., Jiranek J., Zima J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M.H., Roux M.M., ed.), s. 171. Nova Science Publishers, New York 2008.
11. Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39,173 (2009).

12. Kisinger P.T., Heineman W.R.: *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, s. 289. M. Dekker, New York 1984.
13. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*, 3. vyd. John Wiley, Hoboken 2006.
14. Svancara I., Vytras K., Kalcher K., Walcarius A., Wang J.: *Electroanalysis* 21, 2815 (2009).
15. Zima J., Svancara I., Barek J., Vytras K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39,204 (2009).
16. Svancara I., Vytras K., Barek J., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 311 (2001).
17. Kalcher K., Svancara I., Metelka R., Vytras K., Walcarius A., v knize: *The Encyclopedia of Sensors*, Vol. 4, s. 283. (Grimes C.A., Dickey E.C., Pianko M.V.,ed.). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch 2006.
18. Zima J., Svancara I., Peckova K., Barek J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M.H., Roux M.M.,ed.), s. 1. Nova Science Publishers, New York 2008.
19. Peckova K., Musilova J. Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 148 (2009).
20. Peckova K., Musilova J., Barek J., Zima J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M. H., Roux M.M, ed.), s. 103. Nova Publishers, New York 2008.
21. Fujishima A., Einaha Y., Rao T.N., Tryk D.A.: *Diamond Electrochemistry*. Elsevier, New York 2005.
22. Barek J., Cabalkova D., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: *Environ. Chem. Lett.* , v tisku. DOI 10.1007/s10311-009-0250-x.
23. Cizek K., Barek J., Zima J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 1571 (2006).
24. Peckova J., Barek J., Moreira J.C., Zima J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 520 (2005).
25. Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 242 (2008).
26. Deylova D., Barek J., Vyskocil V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1443 (2009).
27. Burdová V.: *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.
28. Yosypchuk O., Pecková K., Barek J.: *Chem. Listy* 104, 186 (2010).
29. Yosypchuk O.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2010.
30. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
31. Yosypchuk B., Navratil T., Barek J., Peckova K., Fischer J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M.H., Roux M. M., ed.), s. 143. Nova Science Publishers, New York 2008.

ELEKTROCHÉMIA V PROCESNEJ ANALYTIKE

ERNEST BEINROHR

*Ústav analytickej chémie, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
ernest.beinrohr@stuba.sk*

Okrem nepretržitého sledovania niektorých fyzikálnych parametrov ako je teplota, tlak a prietok sa v procesnej analýze objavujú požiadavky aj na meranie vyslovene chemických parametrov ako sú koncentrácie niektorých látok a to vo veľmi širokom koncentračnom rozsahu. Ide predovšetkým o niektoré kovy ako je Hg, Pb, Cd, Zn a pod., ako aj nekovy ako sú chloridy, bromičnany, siričitany, atď. Laboratórne stanovenia týchto látok patrí v súčasnosti medzi rutinné činnosti, avšak ich nepretržité sledovanie v mnohokrát drsných procesných podmienkach také jednoduché už nie je.

Elektrochemické metódy poskytujú jedinečnú možnosť na riešenie týchto aplikácií a to hlavne z dôvodov jednoduchosti technického riešenia (žiadna optika a minimum pohyblivých častí), širokého koncentračného rozsahu s možnosťou merania aj extrémne nízkych kon-

centrácií, pričom sa vyznačujú výrazne vyššou selektivitou ako fotometrické metódy. Keďže senzor (elektroda) je v priamom kontakte so vzorkou, hrozí však nebezpečenstvo jeho pasivácie, dokonca úplné znefunkčnenie. A tohto dôvodu hrá výber a povrchová úprava elektródy kľúčovú úlohu.

Na použitie v procesnej analýze sa najviac osvedčili prietokové systémy s robustnou prietokovou elektrochemickou celou, ktorá vyžaduje len minimálnu údržbu. Vhodnou voľbou materiálu a rozmerov komponentov prietokového systému možno minimalizovať vnútorné objemy a tým aj spotrebu reagensov, odstrániť pamäťové efekty a zároveň výrazne skrátiť trvanie analýzy.

V príspevku sú uvedené spôsoby technického riešenia takýchto procesných analyzátorov a niektorá aplikácie napr. na bezobslužné monitorovanie obsahu ťažkých kovov v riečnych vodách, arzénu v odpadových vodách a vedľajších produktov dezinfekcie v pitných vodách.

Práca bola finančne podporovaná grantovou agentúrou VEGA (projekt č. 1/0500/08).

SEPARATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SYNTHETIC POLYMERS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

DUŠAN BEREK

Laboratory of Liquid Chromatography, Polymer Institute of the Slovak Academy of Science, 842 36 Bratislava, Slovakia
Dusan.Berek@savba.sk

High performance liquid chromatographic (HPLC) methods represent the most important tool for molecular characterization of synthetic polymers. Mean molar masses and molar mass distributions of linear and branched synthetic homopolymers are easily determined by size exclusion chromatography (SEC) called also gel permeation chromatography (GPC) or gel filtration chromatography (GFC). SEC is also widely used for separation of various natural polymers and for the purification of complex samples. The method is fast, simple, rather cheap, and well repeatable. Sample consumption for analytical purposes is small. As valuable by-products, several other data can be assessed with SEC, such as limiting viscosity numbers, (intrinsic viscosities), constants of viscosity law, information on aggregation and association, as well as on real sizes of macromolecules in solution, diffusion rates of macromolecules in porous bodies, – and even characteristics of preferential solvation of polymers in mixed solvents. Evidently, usefulness of SEC is enormous and the method substantially affected the progress in science and technology of macromolecular substances. SEC practically fully substituted numerous classical methods of separation and molecular characterization of macromolecules such as the solubility based fractionation, static light scattering, both vapor pressure and membrane osmometries, ebulliometry and cryometry, diffusion measurements, ultracentrifugation, and in part also conventional viscometry. Unfortunately SEC is often used improperly because several phenomena that can badly affect the quality of results are unknown, underestimated, overlooked, or deliberately ignored by many users of the method. Likewise, the SEC results are inadvertently or intentionally misinterpreted and the method is sometimes even misused to support the incorrect conclusions. In many laboratories, obsolete instruments are under use though new generation of moderately priced SEC instruments is available. Recent progress in SEC includes improved both instrumental hardware and data processing software. High sample throughput of the ultra fast SEC allows acceleration of analyses down to few minutes. This is especially important in combinatorial material chemistry and in production control. High-temperature SEC instruments allow molecular characterization of poorly soluble polymers such as for example polyolefins. Still, further improvements of the SEC method are needed, which include its instrumentation, especially columns and detectors, and also standardization

of sample preparation, measurement, and data processing. Concerning the SEC measurement proper, the columns should be periodically recalibrated because they may change their both pore sizes and interactivity due to irreversible retention of fractions of injected samples. Altered pore sizes affect retention volumes and consequently, the calculated molar mass values.

As a rule, SEC exhibits excellent short term intra-laboratory repeatability, which evokes a notion of high reliability of results. Recent series of the round robin tests, however, revealed surprisingly poor inter-laboratory reproducibility of SEC data. Molar masses and molar mass averages of identical samples of homopolymers measured in particular laboratories exhibited large disparities, readily several hundred percent and in extreme case even 2,000%! Evidently, accuracy of many SEC results may be rather limited. SEC exhibits low separation selectivity. This means that constituents of polymer blends cannot be separated if their molar masses are not substantially different. The SEC chromatograms are often bell shaped and/or exhibit bulges: in both cases the poorly separated sample constituents are hidden in this way. Separation and molecular characterization of minor (< 1 %) constituents of multicomponent polymer systems with help of SEC is generally impossible – even if their molar masses are substantially different from the major constituents. This is due to low sensitivity of common SEC detectors. If the sample concentration is increased so that the minor constituents could be monitored, the peaks of major constituents become extensively broadened and they “swallow” the minor constituents.

The practical aspects of SEC, its strong and weak features will be explained. Shortages, problems and inadequate applications will be discussed in detail from the practical point of view with the aim to furnish essential information to those method users who may want to ameliorate the quality of their results and who may need explanation of some unexpected outcomes of their measurements. Selected practical hints for improvement of both precision and accuracy of the SEC results will be included.

In most cases, SEC does not enable precise molecular characterization of complex polymers, which possess more than one distribution in their molecular characteristics. Typically, polymer mixtures, copolymers and functional polymers exhibit besides MMD also distribution in their chemical structure (composition), while e.g. stereoregular polymer species show also molecular architecture distribution. To assess multiple distributions in molecular characteristics of complex polymers, new HPLC procedures are developed. These are based on the controlled combinations of entropic (exclusion) and enthalpic (interaction) retention mechanisms within the same HPLC column or in a series of independent separation systems. The corre-

sponding approaches are denoted “coupled polymer HPLC” and “two-, or multi-dimensional polymer HPLC”, respectively. The controlled combination of retention mechanism with the same column is the basis of coupled methods of polymer HPLC. Separation according to size of macromolecules contained in the sample under study that is SEC process is mainly controlled by the changes of conformation entropy of macromolecules permeating the column packing pores. In order to suppress the effect of size of macromolecules, the enthalpic processes are employed in coupled methods of polymer HPLC. These include adsorption, enthalpic partition (absorption), phase separation and ionic effects. The retention mechanisms based on adsorption and enthalpic partition processes are most commonly applied in coupled methods of polymer HPLC. Their backgrounds and recent applications will be elucidated. The aim of the coupled polymer HPLC procedures is to either suppress or to enhance selectivity of separation according to one (usually molar mass) molecular characteristic. As a result, the effect of suppressed molecular characteristic on separation results can be neglected and value of non-suppressed molecular characteristic can

be determined without interference. The two-dimensional separation procedures (2D-LC) separate polymer samples in two steps. Two different chromatographic systems (columns, eluents) are applied. First LC system employs above mentioned “coupled” approach. Polymer sample is separated exclusively or at least presumably according to one molecular characteristic. The fractions from the first column are on-line transported into the second column, where macromolecules are separated according to molecular characteristic, which was suppressed in the first dimension column, molar mass. SEC is usual second dimension separation method. In this way, the comprehensive molecular characterization of complex polymer can be achieved. Peculiarities of two-dimensional polymer HPLC procedures, and their advantages, benefits and limits will be outlined, together with the anticipated future developments in this field.

This work was supported by the Slovak Grant Agencies APVV(Project 0592-07) and VEGA (Project 2/071/09).

ELEKTROCHEMICKÁ ÚPRAVA VZORIEK PRE ETAAS – STANOVENIE As, Sb, Se a Hg TECHNIKOU ETAAS PO ON-LINE ELEKTROCHEMICKÉJ PREKONCENTRÁCII

FRANTIŠEK ČACHO

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
cacho@atlas.sk*

Neustále zvyšovanie koncentrácie toxických prvkov (As, Hg, Sb, a iné) a ich zlúčenín vo vode, v pôde a aj v ovzduší je vážny problém, s ktorým ľudstvo v nasledujúcich desaťročiach musí zápasiť. Pri zvyšovaní obsahu toxických prvkov v pôde sa v mnohých prípadoch zvyšuje ich obsah v potravinách rastlinného i živočíšneho pôvodu, čo môže mať neblahé účinky na zdravie človeka.

Vyhláška Ministerstva zdravotníctva SR určuje najvyššiu povolenú koncentráciu pre arzén, antimón, selén a ortuť v pitnej vode na úrovni jednotiek $\mu\text{g l}^{-1}$ a nižšie¹. Stanovenie tak nízkych koncentrácií vyžaduje analytické metódy s vysokou citlivosťou a nízkou medzou stanoviteľ-

nosti. Najčastejšie sa pre As, Sb a Se používa AAS s generovaním hydridov. Pre ortuť zase technika studených pár. V tejto práci bude popísané ako možno tieto techniky nahradiť elektrochemickým prietokovým prekoncentračným systémom v on-line spojení s ETAAS. Takéto spojenie má niekoľko výhod:

- výrazné zníženie detekčných limitov
- dynamický pracovný rozsah kalibračných kriviek
- výrazné odstránenie rušivých vplyvov
- znížená možnosť kontaminácie

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied a projektom VEGA č. 1/0500/08.

LITERATÚRA

1. Vyhláška Ministerstva zdravotníctva SR č. 151/2004 Z.z.

VYUŽITIE KOMBINÁCIÍ VYSOKOÚČINNÝCH SEPARAČNÝCH METÓD NA CHARAKTERIZÁCIU HUMÍNOVÝCH LÁTOK

**RÓBERT GÓRA, MILAN HUTTA
a PAVOL ROHÁRIK**

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina CH-2, 842 15, Bratislava, Slovakia
gora@fns.uniba.sk*

Humínové látky (HL) patria medzi najrozšírenejšie enviromakromolekuly a majú priamy vplyv na najrôznejšie procesy a deje odohrávajúce sa v životnom prostredí. Predstavujú zmes organických látok žltého až čierneho sfarbenia, sú amorfné, hydrofilné, polydisperzné makromolekuly, z ktorých pravdepodobne žiadne dve nie sú identické¹. Vyskytujú sa na najrôznejších miestach v životnom prostredí, tvoria väčšiu časť organickej pôdnej matrice, sú prítomné vo vodách, v rope, v uhlí, sú tiež súčasťou vodných sedimentov, sú prítomné v rašelinách, sú viazané na vzdušné prachové častice a podobne. Z hľadiska všeobecných potrieb spoločnosti našli humínové látky využitie v rôznych odvetviach priemyslu, v medicíne, v poľnohospodárstve, v ochrane životného prostredia atď.².

HL patria medzi zlúčeniny, ktoré doteraz nemajú presnú definíciu ako chemické individuá, sú tzv. neurčito definované chemické systémy. Charakteristickým pre túto skupinu látok je nevýrazný, difúzny analytický signál, neposkytujúci presne definované fyzikálno-chemické údaje jedinou číselnou hodnotou, ale distribučnou funkciou a priemernou hodnotou maxima signálu. Táto skutočnosť je dôsledkom ich chemickej, štruktúrnej a fyzikálnej polydisperzity, ktorá sa prejavuje vo veľkej neurčitosti analytického signálu takmer vo všetkých analytických metódach, ktoré boli aplikované na charakterizáciu HL z makromolekulového pohľadu. Výrazný analytický signál poskytujú HL iba pri zjednodušujúcom pohľade, zameranom napr. na ich elementárne chemické zloženie. Štruktúrna variabilita a vlastnosti HL majú za následok veľmi rôznorodé prejavy v správaní sa za rôznych podmienok (napr. silná schopnosť agregovať a disagregovať, vytvárať supra-molekulové štruktúry). Táto komplexnosť vyžaduje pri ich

výskume okrem potreby vyvíjať nové techniky aj potrebu osvojiť si nové pohľady a prístupy pri interpretácii výsledkov.

Z uvedeného vyplýva, že je stále potrebné vyvíjať nové separačné metódy a techniky na analýzu a charakterizáciu týchto látok. K riešeniu podobných zložitých problémov môže napomôcť aplikácia nových postupov, ktoré poukazujú na možnosti kombinácie spájania dvoch alebo viacerých chromatografických alebo separačných metód pracujúcich na odlišných princípoch (napr. SEC-HPLC, RP-HPLC-SEC, ITP-CZE-HPLC)^{3,4} a taktiež využitie neobvyklých, doteraz menej používaných postupov v chromatografických metódach (skoková gradientová elúcia, voľba netradičného organického modifikátora mobilnej fázy – DMF a pod.)⁵⁻⁷.

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 1/0870/09, APVV-0595-07, VVCE-0070-07.

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., The Natural environment and the biogeochemical cycles, s. 1-24, Springer Verlag, Heidelberg 1989.
2. <http://www.humintech.com> (10.03.2010)
3. Whelan T.J., Shalliker R.A., McIntyre C., Wilson M.A.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 3229, 44 (2005).
4. 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, *Proc. Int. Conf. Humic Substances in Ecosystems 8, Šoporňa, 13-16 September 2009*, (Zaujec A., Bielek P., Gonet S.S., Debska B., Heczko J., ed.), s. 167–174. VUPOP, Bratislava 2009.
5. Hutta M., Góra R.: *J. Chromatogr., A* 67, 1012 (2003).
6. Góra R., M. Hutta: *J. Chromatogr., A* 39, 1084 (2005).
7. Góra R., Hutta M., Vrška M., Katuščák S., Jablonský M.: *J. Sep. Sci.* 2179, 29 (2006).

PROBLEMATIKA ZABEZPEČENIA KVALITY PRI SKÚŠKACH VODY

ANNA GRAMBLIČKOVÁ

*Západoslovenská vodárenská spoločnosť, a. s. Nitra, Za hydrocentrálou 4, Nitra, Slovenská republika
anna.gramblickova@zsvs.sk*

Výber metód pri skúškach parametrov vody je legislatívne limitovaný kritériami správnosti, presnosti a medzou detekcie. Z analytického hľadiska by nemali byť vylúčené verifikačné parametre ako citlivosť, výťažnosť, selektivita, robustnosť metódy. Taktiež pri názoroch a interpretáciách je výpovedná hodnota inak mnohých „presných“ výsledkov nízka ak sa neuvažuje k danému prostrediu, napr. miesta odberu vzorky a pod. Ide predovšetkým o reálnu hodnotu ukazovateľa vzhľadom

k požadovanej hodnote na prítomnosť ukazovateľa. Súčasný trendy hodnotenia a zabezpečenia správnosti výsledkov sú transparentnosť, nezávislosť, nestrannosť, odbornosť, dôverynosť, jednotnosť, kompatibilita. Skúšobné laboratória, ktoré sú výstupnou kontrolou výrobného procesu, resp. výrobný proces monitorujú, sa možno obmedzia iba na výkon skúšky. Pri trendoch vývoja kvality vody vo vodnom hospodárstve musí byť v prvom rade na zreteli zabezpečenie správnosti a kvality pri odbere vzorky vody podľa charakteru ukazovateľa, transport vzorky do laboratória, zaobchádzanie so vzorkou v laboratóriu až do vydania protokolu o skúškach vzorky vody. Je potrebné vždy sledovať a mať dôkaz, že vzorka reprezentuje celok, je homogénna. Látková bilancia makrozložiek a vzájomné pomery sú takýmto dôkazom.

JE IMAC METÓDA VHODNÁ NA FRAKCIONÁCIU HUMÍNOVÝCH LÁTOK?

RADOSLAV HALKO a MILAN HUTTA

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

Úvod

V súčasnosti mnohé vedecko-výskumné pracoviská vo svete venujú zvýšenú pozornosť problematike analýzy humínových látok (HL). Jej dôležitou súčasťou je aj výskum založený na potenciálnych interakciách HL s iónmi kovov. Výskum ich komplexných zlúčenín je robený s dôrazom na ďalšie potenciálne možnosti ich využitia v rôznych oblastiach priemyselnej výroby, vodohospodárstve, poľnohospodárstve alebo ochrane životného prostredia¹. HL predstavujú zmes organických látok, ktoré sú schopné vďaka zastúpeniu rôznych kombinácií chelutujúcich funkčných skupín podieľať sa na mobilizácii prvkov v pôdnych roztokoch². Výsledok viazania sa HL alebo nízkomolekulových pôdnych látok s anorganickou časťou pôdy môžeme rozdeliť do nasledujúcich skupín³: 1. soli nízkomolekulových organických kyselín; 2. soli HL s kationmi alkalických kovov a kovov alkalických zemín; 3. cheláty iónov kovov a 4. látky zadržané na ílovitých minerálnych povrchoch.

Pri izolácii, frakcionácii a charakterizácii HL hrajú významnú úlohu chromatografické separačné metódy. V súčasnosti v oblasti analýzy HL našla najširšie uplatnenie gélová chromatografia (SEC)⁴. Menej zriedkavým prístupom na charakterizáciu HL je využitie kvapalinovej chromatografie v systéme obrátených fáz (RP-HPLC)^{5,6}. Využitím znalostí z iných oblastí výskumu HL a ich komplexov s kovmi je možné úspešne navrhnúť viacero nových chromatografických systémov na analýzu HL⁷. Napríklad, možno využiť afinitnú chromatografiu s imobilizovanými iónmi kovu (IMAC), ktorá pracuje na inom separačnom mechanizme ako už spomenuté chromatografické techniky⁸. Princíp tejto chromatografickej metódy je založený na špecifických interakciách medzi molekulami analytu v roztoku a iónmi kovu naviazanými na povrchu stacionárnej fázy. Molekuly sú potom separované podľa ich rozdielnej afinity ku chelutujúcim iónom kovov, t.j. ich funkčné skupiny s elektrodonornými vlastnosťami majú schopnosť vytvárať koordinačné komplexy s iónmi kovov. Podmienkou IMAC separácie je, aby funkčné miesta analyzovanej molekuly vytvárali s imobilizovanými iónmi kovu dostatočne stabilné komplexy. Tento princíp separácie získal veľkú popularitu a dodnes sa využíva pre účinnú purifikáciu biologických makromolekúl (hlavne bielkovín, ale aj nukleových kyselín a nukleotidov)^{9,10}.

V posledných rokoch IMAC našla uplatnenie aj pre izoláciu prírodných organických ligandov z vodných environmentálnych vzoriek a tiež pre separáciu a frakcionáciu humínových látok s použitím Fe(III) a Cu(II) ako imobilizovaných iónov kovov^{11,12}. V kombinácii s ďalšími technikami, môžu byť izolované frakcie HL charakterizované na základe ich komplexačnej kapacity, molekulovej veľkosti resp. aminokyselinového zloženia¹³.

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť analytickú metódu na frakcionáciu HL, špeciálne humínových kyselín využitím IMAC metódy. Pre tento prípad boli vybrané Al(III) ióny na naviazanie na stacionárnu fázu. Model Al(III)-IDA IMAC bol zatiaľ použitý len pri purifikácii fosfoproteínov¹⁴ a čistení a charakterizácii ligandového viazania sa Al(III) na *Pisolithus tinctorius*¹⁵. Doteraz však s Al(III) iónom neboli evidované práce zaoberajúce sa frakcionáciou resp. charakterizáciou HL.

Experimentálna časť

Všetky vodné roztoky boli pripravené v demineralizovanej vode (Labconco, USA). Vodné octonové tlmivé roztoky s rôznymi hodnotami pH boli pripravené z 99% (v/v) kyseliny octovej (Merck, Darmstadt, Nemecko), z ktorej bol pripravený vodný roztok s koncentráciou 0,1 mol l⁻¹. Požadované pH bolo upravené titráciou s 25% (v/v) roztokom amoniaku (Merck) a odmerané na pH-metry WTW InoLab pH 730 (Wellhelm, Nemecko). 0,1 mol l⁻¹ vodný roztok Al(III), okyslený 1 ml 0,01 mol l⁻¹ roztokom HCl (Merck), bol pripravený z Al(NO₃)₃ · 9 H₂O (Lachema, Brno, ČR) do 250 ml umelohmotnej nádoby.

Na prípravu pracovného štandardu humínových kyselín bola použitá vzorka humínových kyselín izolovaná z rašeliny z oblasti Cérová, SR, na ktorej boli študované sorpcie vybraných iónov kovov^{16,17}. Odvážením na analytických váhach AR 0640 (Ohaus, USA) 0,2 g pôvodnej vzorky humínových kyselín bolo rozpustených v 20 ml vody. Nehomogénna zmes bola homogenizovaná 5 min v ultrazvukovej vani UCM 9 (Ecoson, Nové Mesto nad Váhom, SR) a následne bola jej tuhá časť oddelená v centrifúge Janetzki T30 (Lipsko, Nemecko). Vodná časť zmesi bola odobraná a prefiltrovaná cez 32 mm diskový filter s priemerom pôrov 0,2 μm (Acrodisc, Pall, USA). Takto upravená vzorka bola použitá pre IMAC merania.

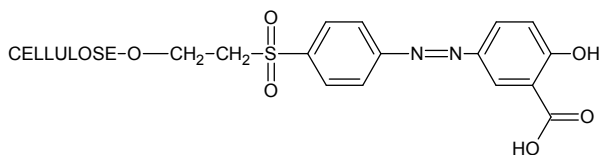
Sorpčné charakteristiky Al(III) iónov pre chelatačný sorbent boli uskutočnené pomocou peristaltickej pumpy PCR 01 (Labeco, Spišská Nová Ves, Slovenská republika) s off-line spektrofotometrickou detekciou použitím spektrofotometra Uvikon 810 (Katron, Švajčiarsko). Pracovný postup bol nasledujúci: 1. naplnenie (približne 250 mg sorbentu) a ekvalibrácia kolóny (5 ml vody a 10 ml octonového tlmivého roztoku); 2. imobilizácia iónov kovu (10 ml roztoku hliníka); 3. zber frakcií a 4. regenerácia kolóny

s 10 ml 0,05 mol l⁻¹ roztoku EDTA (Lachema). Na naplnenie chelatačným sorbentom Iontosorb Salicyl (Iontosorb, s.r.o., Ústí nad Labem, ČR) boli použité sklenené chromatografické CGC kolóny (30 × 3 mm, Tessek, Praha, ČR). Pri kroku imobilizácie iónu kovu na kolónu boli pri rôznych hodnotách pH tlmivého roztoku odobraté eluované frakcie (0,5–1 ml). V nich bolo uskutočnené spektrofotometrické stanovenie obsahu hliníka použitím chelatačného činidla SPADNS (Lachema), ktorý s Al(III) vytvára červenofialový komplex v pomere 1:1 ($\lambda_{\max} = 580$ nm).

Chromatografické analýzy boli robené na HPLC systéme Elite LaChrom (Merck–Hitachi, Darmstadt, Nemecko), ktorý bol zložený z nasledujúcich komponentov: L-2130 pumpa s kvartérnym nízkotlakovým gradientom s odvzdušňovačom rozpúšťadla, L-2200 automatický dávkovač vzoriek, L-2400 UV-VIS spektrofotometrický detektor, L-2300 termostat, organizér a PC s chromatografickým softvérom EZChrom Elite 3.1.7.

Výsledky a diskusia

Vzhľadom na to, že afinita komplexačných funkčných skupín analytu ku imobilizovaným iónom kovu môže byť ovplyvnená aj typom chelatajúceho ligandu, bolo v prvom kroku dôležité vybrať vhodný chelatajúci ligand. Pokiaľ by boli ióny kovu príliš silne imobilizované na stacionárnu fázu, znížila by ich schopnosť interagovať s funkčnými miestami analytu. Naopak, ak by boli ióny kovov slabo viazané, mohli by sa uvoľniť so stacionárnej fázy do roztoku mobilnej fázy. V našom prípade sme sa rozhodli použiť chelatačný sorbent Iontosorb Salicyl, ktorý obsahuje salicylovú skupinu viazanú cez azo skupinu v bočnom reťazci modifikovanej celulózy (obr. 1).



Obr. 1. Štruktúra chelatačného sorbentu Iontosorb Salicyl

Tento sorbent obsahuje len neutrálne skupiny a selektivita látok závisí len od ich reaktivity s kyselinou salicylovou. Koncentrácia jeho aktívnych skupín je 0,2 mmol g⁻¹. Okrem už uvedeného dôvodu, tento chelatačný sorbent bol vybraný aj z ďalších dvoch dôvodov. Prvý dôvod je, že salicylová funkčná skupina je jednou z funkčných, ktoré sa prirodzene vyskytujú v humínových látkach. Tento prístup môže reprezentovať model mobilizácie kovu vyskytujúcim sa v HL v prírodných systémoch. Po druhé, Al(III)-salicyl chelát má vysokú hodnotu konštanty stability komplexu (log $\beta = 14,1$).

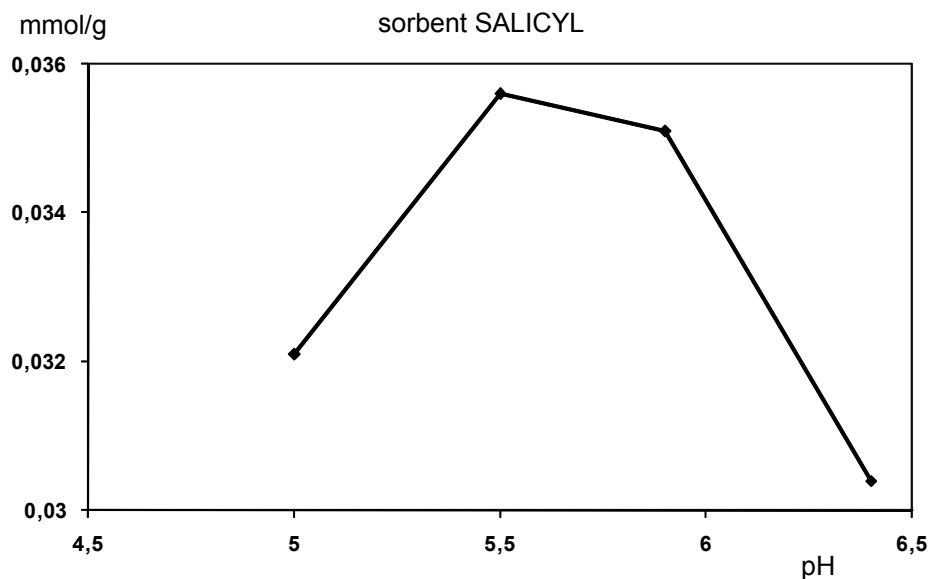
V ďalšej fáze optimalizácie metódy bol skúmaný vplyv pH prostredia na imobilizáciu hliníka na stacionárnu fázu. Z literatúry je známe, že Al(III) ión sa najviac viaže na salicylovú funkčnú skupinu v rozmedzí pH hodnôt 5–6.

Z toho dôvodu boli postupne preskúmané sorpčné charakteristiky hliníka pri nasledujúcich hodnotách pH 5,0; 5,5; 5,9 a 6,4. Pre možnosť kvantitatívneho stanovenia hliníka boli odobraté frácie s objemom 0,5–1,0 ml podrobené relatívne jednoduchému spektrofotometrickému stanoveniu hliníka pomocou SPADNS. Al(III)-SPADNS vytvára červenofialový komplex v pomere 1:1 s $\lambda_{\max} = 580$ nm.

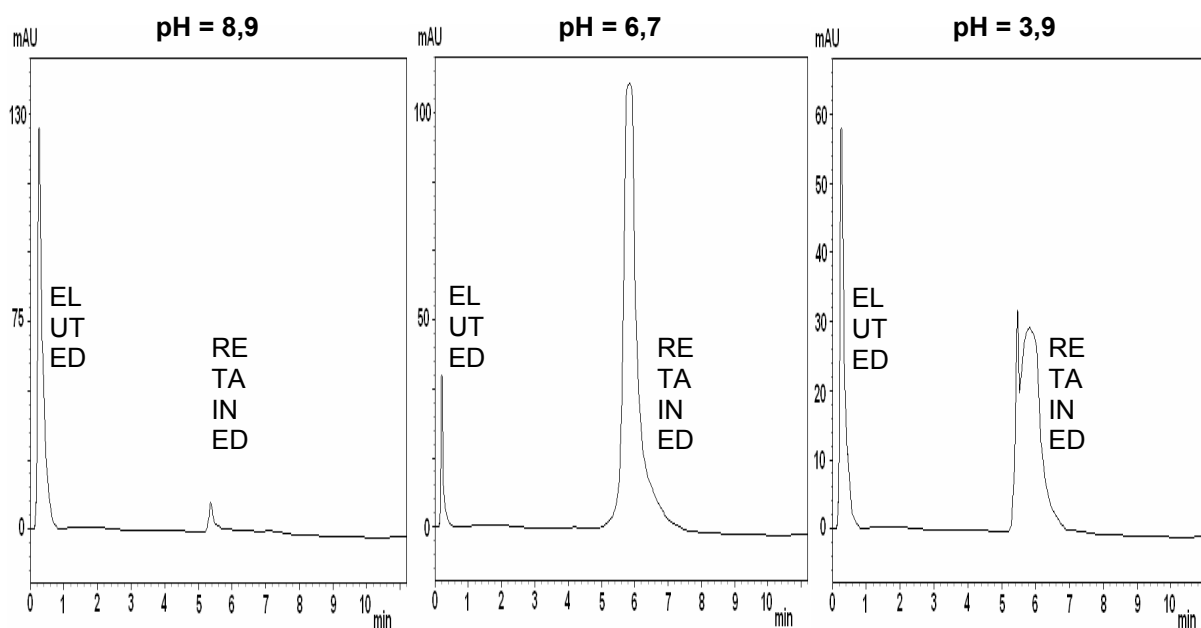
Z nameraných spektrofotometrických dát boli zostrojené prienikové krivky, pomocou ktorých sa vypočítali kapacity stacionárnej fázy pre ión Al(III) v závislosti od pH prostredia. Ako vidieť z grafického záznamu (obr. 2), najvyššia sorpčná kapacita bola vypočítaná pri pH hodnote 5,5, ktorá dávala hodnotu 36 μ mol hliníka na 1 g chelatačného sorbentu. najviac hliníka sa nasorbuje na kolónu so sorbentom Iontosorb Salicyl pri hodnote pH 5,5. O niečo menej pri hodnote pH 5,9. Z tohto dôvodu sme pre ďalšie merania pri aktivácii iónu kovu na kolónu používali prostredie s hodnotou pH 5,5. Pri vyšších resp. nižších hodnotách pH prostredia dochádza ku konkurenčnému obsadzovaniu aktívnych miest sorbentu. Táto pH hodnota bola použitá pre ďalšie merania pri imobilizácii hliníkových iónov na sorbent Iontosorb Salicyl.

Štandardná IMAC procedúra pozostáva z nasledujúcich piatich krokov: naplnenie a ekvilibriácia kolóny, imobilizácia iónov kovu, nadávkovanie vzorky, elúcia vzorky a regenerácia kolóny. Všetky experimenty boli uskutočnené na rovnakej kolóne, sorbente a za rovnakých podmienok ako v prípade stanovenia sorpčných charakteristík Al(III). Pracovný štandard humínových kyselín bol izolovaný z rašeliny z oblasti Cerová, SR. V prvej časti, bol pozorovaný vplyv pH octánového tlmivého roztoku na elúciu humínových kyselín. Po imobilizácii iónov kovu objem 10 μ l vzorky humínových kyselín bol nadávkovaný na IMAC kolónu. Nadávkovaný analyt bol eluovaný s 5 ml vodného octánového tlmivého roztoku len pri jednej z troch konkrétnych pH hodnôt (pH 8,9, 6,7 resp. 3,9). Zadržaná časť humínových kyselín na kolóne bola následne eluovaná s 5 ml 0,01 mol l⁻¹ HCl s pH hodnotou 2,0. Analýza vzorky humínových kyselín ako predstaviteľa humínových látok je znázornená na obr. 3. Ako vidieť z chromatografických záznamom najviac humínových kyselín sa zadržalo pri hodnote pH 6,7. Dá sa predpokladať, že humínové látky s veľkým množstvom funkčných skupín budú viac interagovať s iónmi Al(III) pri tej tejto hodnote pH prostredia.

Rozdielna schopnosť humínových kyselín zadržiavať sa na stacionárnej fáze pri rozdielnych pH hodnotách pH elučného prostredia bola využitá na navrhnutie IMAC metódy so skokovou zmenou pH mobilnej fázy. Tento typ gradientu bol realizovaný elúciou octánovým tlmivým roztokom od najväčšej hodnoty pH 8,9 až po elúciu vodným roztokom HCl s hodnotou pH 2. Analýza humínových kyselín ako potenciálne reprezentatívnej vzorky HL je ukázaná na obr. 4. Ako je vidieť z chromatografického záznamu humínové kyseliny je možné takýmto spôsobom úspešne separovať na individuálne frakcie podľa ich rôznej afinity k imobilizovanému iónu Al(III).



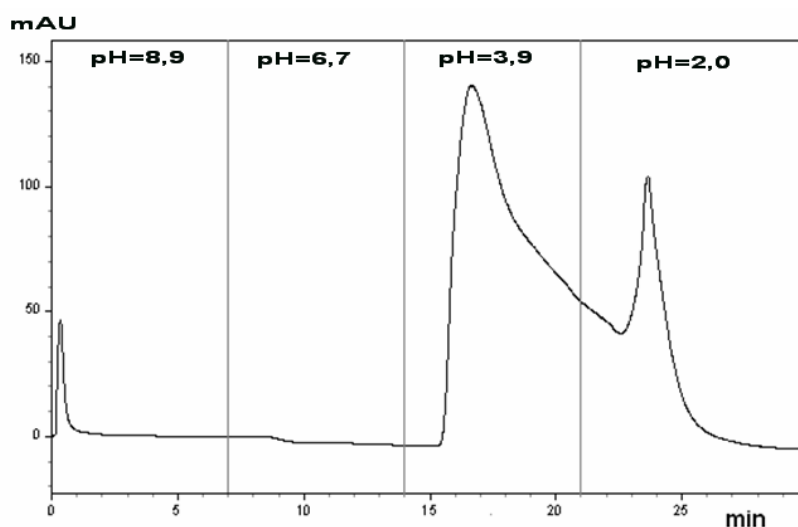
Obr. 2. Kapacita sorbentu Salicyl pre Al(III) pre rôzne hodnoty pH prostredia

Obr. 3. Chromatografické záznamy frakcií huminových kyselín získaných v Al(III)-IMAC experimente s rodielnymi pH hodnotami octánových tlmivých roztokov pH values (pH 8,9; 6,7 a 3,9). Zadržaná časť huminových kyselín bola eluovaná s eluentom s pH 2,00 (0,01 mol l⁻¹ HCl)

Záver

Rozdielna schopnosť huminových kyselín zadržiavať sa na stacionárnej fáze imobilizovanej Al(III) pri rôznych

hodnotách pH elučného prostredia bola využitá na navrhnutie IMAC metódy so skokovou zmenou pH mobilnej fázy. Na základe prezentovaných výsledkov môžeme konštatovať, že navrhnutá IMAC metóda je vhodná na frak-



Obr. 4. Chromatografický záznam frakcionácie humínových kyselín v systéme Al(III)-IMAC s použitím skokového pH gradient (pH 8,9; 6,7; 3,9 a 2,0)

cionáciu humínových látok. Získané frakcie môžu byť ďalej charakterizované viacerými metódami. S pomocou týchto jednoduchých metód je potom možné získať ďalšie informácie o ich charaktere, štruktúre, funkčnosti a možnosti ich ďalšieho použitia v rôznych oblastiach priemyslu, poľnohospodárstva a medicíny. Zároveň dané štúdium môže slúžiť ako potenciálny model čiastkových pôdných procesov.

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantov vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA 1/0329/10, APVV-0595-07 a VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

- Ghabbour A, Davies G. (ed.): *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001.
- E. Tipping: *Cation Binding by Humic Substances*. Cambridge University Press, 2002.
- <http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm> (20.08.2009).
- Janoš P., Zatloukalová I.: *J. Chromatogr., A 1160*, 160 (2007).
- Hutta M., Góra R.: *J. Chromatogr., A 1012*, 67 (2003).
- Góra R., Hutta M.: *J. Chromatogr., A 1084*, 39 (2005).
- Janoš P.: *J. Chromatogr., A 983*, 1 (2003).
- Wu F.C., Evans R.D., Dillon P.J.: *Anal. Chim. Acta 464*, 47 (2002).
- Chaga G. S.: *J. Biochem. Bioph. Meth.* 49, 313 (2001).
- Zatloukalová E.: *Chem. Listy 98*, 254 (2004).
- Burba P., Jakubowski B., Kuckuk R., Kullmer K., Heumann K.G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 368, 689 (2000).
- Paunovic I., Schulin R., Nowack B.: *Eur. J. Soil Sci.* 59, 198 (2008).
- Donat J. R., Kango R. A., Gordon A. S.: *Mar. Chem.* 57, 1 (1997).
- Machida M., Kosako H., Shirakabe K., Kobayashi M., Ushiyama M., Inagawa J., Hirano J., Nakano T., Bando Y., Nishida E., Hattori S.: *FEBS J.* 274, 1576 (2007).
- Baldwin C., Cumming J., Timperman A. T.: *Analyst 130*, 318 (2005).
- Procházková T., Góra R., Kandrác J., Hutta M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 229, 61 (1998).
- Paulenová A., Rajec P., Kandrác J., Saskoiová G., Tóthová E., Bartoš P., Švec V., Góra R.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 246, 617 (2000).

HPLC METHODS IN QUALITY CONTROL OF PROPOLIS – ANALYSIS OF ORGANIC ACIDS AND COUMARINS

KATARÍNA HROBOŇOVÁ^a, JOZEF LEHOTAY^a, and JOZEF ČÍZMÁRIK^b

^a Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Comenius University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovak Republic

katarina.hrobonova@stuba.sk

Propolis or “bee glue” is a generic name for the resinous hive product collected by bees from various plant sources. Propolis usually contains a variety of chemical compounds, such as polyphenols, terpenoids, steroids, aromatic alcohols, aliphatic acids and esters, sugars, amino acids, the exact composition of which is dependent upon the source plant(s).

The complete characterization of propolis activity involves both quantitative and qualitative chemical analysis. Chromatographic techniques provide the profile and identification of the individual compounds. HPLC represents the most popular and reliable analytical technique for the characterization of organic acids. Flavonoids, aromatic acids, diterpene acids, coumarins and phenolic compounds appear to be the principal components responsible for the biological activity of propolis samples. Phenolic compounds are the main components of propolis and are responsible for antimicrobial, and other biological effects. Dehydroabietic acid and abietic acid are the major acids of the abietic-type found in different types of resin or they are final products of isomerization of resin acids with conjugated double bonds. Quinic acid and shikimic acid are intermediate molecules produced in the “shikimate pathway”, the biosynthetic pathway of some acid, aromatic aminoacids, flavonoids and other compounds presented in plants and micro-organisms. Quinic and shikimic acid are often found in the free acid form or bound state with one of their hydroxyl functions esterified to a phenolic acid. Coumarins comprise a group of phenolic compounds widely distributed in natural plants, and they have recently attracted much attention because of their broad pharmaceutical activities.

The present work include the selection of appropriate stationary phase, mobile phase, and detection conditions for the separation and the detection of some phenolic acids (chlorogenic acid, rosmarinic acid, *p*-hydroxybenzoic acid), diterpene acids (abietic acid, dehydroabietic acid), shikimic acid, quinic acids and derivatives of coumarin (6,7-dihydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin, 4-methyl-7-hydroxycoumarin, 7-methoxycoumarin, 6,7-dimethoxycoumarin). The developed HPLC methods were used for the analysis of extracts of propolis and propolis pastilles. In the study, HPLC methods on C₁₈ column with on-line spectrophotometric detection (238 nm for abietic acid, 330 nm for chlorogenic acid and rosmarinic acid) and fluorimetric detection (ex 225nm, em 285 nm for dehydroabietic acid; ex 255 nm, em 320 nm for *p*-hydroxybenzoic acid; ex 320 nm, em 450 nm for 6,7-dihydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin, 4-methyl-7-hydroxycoumarin, 7-methoxycoumarin, 6,7-dimethoxycoumarin) and isocratic elution or gradient elution were used for the separation and determination analytes in ethanol and water extracts of propolis samples from Slovakia and propolis pastilles. Ion exclusion chromatography with spectrophotometric detection (210 nm) and isocratic elution was used for analysis of shikimic and quinic acids in water extract of propolis. The limits of determination were 0.1 µg ml⁻¹ for abietic acid, 0.05 µg ml⁻¹ for dehydroabietic acid, 0.2 µg ml⁻¹ for shikimic acid, 20 µg ml⁻¹ for quinic acid, 0.3 µg ml⁻¹ for chlorogenic acid, 0.5 µg ml⁻¹ for rosmarinic acid, 2 µg ml⁻¹ for *p*-hydroxybenzoic acid, and 0.1 µg ml⁻¹ for coumarin derivatives.

On the base of chromatographic characteristics and optical properties the dehydroabietic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, quinic acid, shikimic acid, 7-hydroxycoumarin and 4-methyl-7-hydroxycoumarin were identified and in studied propolis samples and pastilles. The content of acids in tested propolis samples was different depending on the source of propolis and on the vegetation at the site of collection.

Work was supported by Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences (grant No. 1/0058/08).

KALIBRAČNÉ MODELY ZLOŽITÝCH ZLOŽIEK ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA PRE ED XRF

EMÍLIA HRONCOVÁ a JURAJ LADOMERSKÝ

*Technická univerzita vo Zvolene, Fakulta ekológie a environmentalistiky, Katedra environmentálneho inžinierstva, T. G. Masaryka 24, 960 53 Zvolen, Slovenská republika
hroncova@vsld.tuzvo.sk*

Úvod

V rámci experimentálnych prác bol použitý – Energiodisperzný röntgenfluorescenčný spektrometer Elva X (Elvatech Ltd., Kyjev, Ukrajina). Spektrometer Elva X je výsledkom medzinárodnej kooperácie firiem z USA, Ruska a Ukrajiny. Spektrometer môže analyzovať akýkoľvek typ vzoriek (kovové zliatiny, prášky, kaly, organické kvapaliny, pasty, filtre, sedimenty atď.) s veľmi dobrými medzami detekcie a vysokým rozlíšením. Vykonáva sa ním kvalitatívna a kvantitatívna analýza v rozsahu prvkov od ^{11}Na po ^{94}Pu . V praxi sa napr. využíva pri kontrole kvality v metalurgii, pri výrobe pigmentov, keramických materiá-

lov a olejov v colníckych a kriminalistických laboratóriách, analýze Ca a P v kŕmnych zmesiach, a v mnohých iných^{1–3}. Všeobecne sa uvádza, že prístroj je využiteľný aj pre analýzu vzoriek životného prostredia, avšak nie je k tomu príslušná databáza a nie sú známe verifikácie metódik^{4,5}. Jeho najväčšou prednosťou je relatívne nízka cena. Z toho dôvodu po vypracovaní metód analýz a verifikácii by mohol byť využiteľný v rôznych prevádzkach nakladania s priemyselnými odpadmi, kompostmi, pôdami a podobne. Technické parametre ED XRF spektrometra Elva X sú uvedené v tabuľke I.

Materiál a metodika

Certifikované referenčné materiály

Pôdy 7001 až 7004, Czech Metrological Institute, Czech Republic.

Pôda S-SP, Slovenský metrologický ústav, Slovenská republika.

Pôdy 921 až 999, The Netherlands.

River Sediment NSC DC 78301, China National Accredi-

Tabuľka I
Technické parametre ED XRF spektrometra, ELVA X

Analyzované prvky	Od ^{11}Na po ^{94}Pu
Typy vzoriek	Tuhé, prášky, pasty, kvapaliny atď.
Detekčné limity (integračný čas 100 s, ľahká matrica)	He preplach, Ti röntgenová lampa $^{11}\text{Na} - ^{13}\text{Al}$ 1–0,1 % $^{14}\text{Si} - ^{19}\text{K}$ 0,01 % – 1 ppm $^{20}\text{Ca} - ^{23}\text{V}$ 5–10 ppm $^{24}\text{Cr} - ^{48}\text{Cd}$ 1 ppm $^{49}\text{In} - ^{59}\text{Pr}$ 5–10 ppm $^{60}\text{Nd} - ^{94}\text{Pu}$ 1 ppm
Vysokonapäťový zdroj	Napätie 4 – 50 kV, nastaviteľné s krokom 100 V Prúd 0 – 100 μA , nastaviteľný s krokom 0,2 μA Maximálny výkon 5 W
Röntgenová lampa	Ti röntgenka, Be okienko, chladená vzduchom
Detektor	Moxtek Si-pin, termoelektricky chladený (dvojstupňové chladenie) Be okienko 8 μm Rozlíšenie 200 eV
Procesor pulzov	Automatické nastavenie vzhľadom k cps ADC: 4096 kanálov, konverzný čas 2 μs Vyrovňavacia pamäť: 4096 kanálov s pulznou kapacitou 2 ³²
Vzorkový priestor	Maximálny rozmer vzorky: 250 × 200 × 60 mm
Napájanie	~ 230 V, 50 Hz, (konverzný zdroj 12 V ADC)
Príkon	50 W

tation of Registrars, Beijing China.
River Clay sediment LGC 6139, Laboratory of the Government Chemist, Queens Road, Teddington, Middlessex.
Sediment GBW7009 až 7012, Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, China.

Kalibrácia a voľba parametrov ED XRF spektrometra

Pre meranie röntgenfluorescenčných spektier kalibračných štandardov aj vzoriek boli na ED XRF spektrometri nastavené parametre, ktoré sú zhrnuté v tab. II.

Po nameraní sa spektrá kalibračných štandardov spracovali štyrmi rôznymi spôsobmi, ktoré umožňuje software spektrometra.

Tabuľka II

Podmienky merania XRF spektrometra ElvaX

Napätie na röntgenovej lampe	40 kV
Prúd na röntgenovej lampe	75 μ A
Doba integrácie signálu	600 s
Režim	dual*

* meranie spektra v rozsahu 0–10 keV s preplachom He,
+ meranie spektra v rozsahu 4–32 keV bez preplachu He

MODEL 1

V prvom prípade boli intenzity analytických čiar jednotlivých prvkov vypočítané po automatickom odpočte pozadia z nasnímaného spektra.

MODEL 2

V druhom prípade po automatickom odpočte pozadia bola vykonaná normalizácia vypočítaných intenzít analytických čiar na rovnakú hodnotu rozptýleného žiarenia matrice vzorky. V prípade ľahkých prvkov (Ca, K) sa pre výpočet rozptýleného žiarenia nastavilo spektrálne okno v rozsahu 3–10 keV a v prípade ťažkých prvkov (Mn, Fe, Zn ...) spektrálne okno v rozsahu 3–45 keV. Podľa výrobcu spektrometra by mal byť tento spôsob výhodný hlavne

v prípadoch, keď sa na analýzu použijú vzorky s rôznou hustotou a povrchovou úpravou.

MODEL 3

V treťom prípade boli intenzity analytických čiar jednotlivých prvkov vypočítané bez automatického odpočtu pozadia z nasnímaného spektra.

MODEL 4

V štvrtom prípade boli intenzity analytických čiar jednotlivých prvkov vypočítané bez automatického odpočtu pozadia z nasnímaného spektra pričom bola vykonaná normalizácia vypočítaných intenzít analytických čiar na rovnakú hodnotu rozptýleného žiarenia matrice vzorky.

Regresný model

Na kalibráciu XRF spektrometra sa použilo 26 vzoriek (20 pôd a 6 sedimentov) s tuhú matricou. Koncentrácia analytov v týchto vzorkách sa pohybuje v rozmedziach uvedených v tab. III.

Hodnoty integrálnych intenzít analytických čiar jednotlivých prvkov v $I \text{ s}^{-1}$ získané každým zo štyroch vyššie uvedených postupov boli vynesené oproti hodnotám koncentrácií príslušných prvkov v ppm.

Pre každý zo štyroch spôsobov výpočtu integrálnych intenzít sa navrhol regresný model v tvare:

$$c_i = k_i I_i \cdot \left(1 + \sum_{j=1}^n k_j I_j\right)$$

kde c_i je koncentrácia analytu, I_i je integrálna intenzita analytickej čiary meraného prvku, I_j je integrálna intenzita analytickej čiary prvku, ktorý pôsobí na čiaru analytu niektorým z efektov medziprvkového ovplyvňovania a k_i a k_j sú parametre regresnej rovnice.

Počet parametrov regresnej závislosti bol zvolený s použitím chyby modelu nazvanej v software spektrometra „general analyte error“ a je označený ako SD. Táto chyba je vyjadrením celkovej chyby použitého kalibračného modelu pre daný analyt a zahŕňa v sebe tak chybu deklarovaných koncentrácií jednotlivých prvkov v použitých kalibračných štandardoch ako i chybu spôsobenú zlým preložením kalibračných závislostí vzniknutú v dôsledku nedos-

Tabuľka III

Príklady rozsahov niektorých analytov, chyby, výtlačnosti a rozšírené neistoty a zvolený model

	Rozsah koncentrácie [mg kg^{-1}]	GEE [mg kg^{-1}]	$\bar{\mathbf{R}}_m$		U_r [%]	Model
			[%]			
			970	956		
Cr	30,7–267	9,46	56	73	15	1
Mn	35–2490	37,7	96	95	20	2
Zn	9,5–1071	12,5	111	112	15	3
Zr	70–577	17,3	97	97	10	4

tatočného počtu parametrov regresného modelu. Parametre regresnej závislosti sa pre každý z analytov postupne pridávali až do chvíle, kedy zvýšenie počtu parametrov ďalej nespôsobilo významný pokles uvedenej chyby.

Pre meranie neznámych vzoriek bol nakoniec zvolený ten spôsob výpočtu integrálnej intenzity analytickej čiary, pre ktorý vykazoval regresný model najmenšiu chybu modelu.

Na validáciu metódy boli použité dva certifikované referenčné materiály pôd (970 a 956).

Priemerná relatívna výťažnosť \bar{R}_m zo súboru analýz CRM bola vypočítaná:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{c}}{c_{CRM}}$$

kde \bar{c} je priemerná hodnota výsledku z analýz CRM, c_{CRM} je certifikovaná hodnota obsahu (koncentrácie) príslušného kovu v CRM.

Neistota priemernej relatívnej výťažnosti bola vypočítaná ako

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \cdot \sqrt{\left(\frac{s^2}{n \cdot \bar{c}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{CRM})}{c_{CRM}}\right)^2}$$

kde \bar{R}_m je priemerná relatívna výťažnosť, s je výberová smerodajná odchýlka výsledkov analýz CRM, n je počet analýz kovu v CRM, \bar{c} je priemerná hodnota výsledku z analýz CRM, $u(c_{CRM})$ je deklarovaná neistota koncentrácie kovu v CRM, c_{CRM} je deklarovaná koncentrácia kovu v CRM.

Relatívna neistota výťažnosti:

$$u_r(\bar{R}_m) = \frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m}$$

Pre odhad celkovej kombinovanej neistoty bola zlúčená relatívna neistota výťažnosti $u_r(\bar{R}_m)$ s neistotou charakterizujúcou najlepší odhad celkovej presnosti stanovenia u_r :

$$u_r(c) = \sqrt{u_r(\bar{R}_m)^2 + u_r^2}$$

Rozšírenú neistotu pre kovy v jednotlivých matrikách metódou ED XRF na hladine významnosti 95 %, $k = 2$:

$$U = k \cdot u_r(c) \cdot c$$

Rozšírená neistota v relatívnom vyjadrení sa vypočítala podľa vzťahu:

$$U_r = k \cdot u_r(c) \cdot 100$$

Výsledky a diskusia

Rozsahy koncentrácií vybraných analytov v týchto CRM ako i namerané jednotlivé neistoty modelu (v softvare Elva X ako general error for element-GEE), výťaž-

nosti pre CRM pôdy 970 a 956 ako i rozšírené neistoty a zvolený najlepší model sú uvedené v tab. III.

Pri prípadoch, kedy sa výťažnosti v navrhovanom modeli z meraní CRM 970 a 956 líšia nevýznamne od 100 % výťažnosti (odchýlka ± 15 %), navrhuje sa pre výpočet intervalu pokrytia (CI), v ktorom sa skutočná hodnota s danou pravdepodobnosťou nachádza vzťah:

$$CI = c_{\text{nameraná}} \cdot (1 \pm U_r)$$

V prípadoch kedy sa výťažnosť modelu významne líšia od 100 % výťažnosti, ale hodnoty výťažnosti pre CRM 970 a 956 sa od seba nevýznamne odlišovali navrhuje sa pre výpočet intervalu pokrytia (CI), v ktorom sa skutočná hodnota s danou pravdepodobnosťou nachádza vzťah:

$$CI = \frac{100 \cdot c_{\text{nameraná}}}{\bar{R}_m} \pm \frac{U_r}{100} \cdot c_{CRM}$$

V prípadoch kedy sa výťažnosť modelu významne líši od 100 % výťažnosti a hodnoty výťažnosti pre CRM 970 a 956 sa tiež od seba významne odlišovali je možné konštatovať, že zvolený regresný model pre výpočet koncentrácie je buď nepresný a je potrebné zvoliť iný regresný výpočet, prípadne urobiť korekcie výťažnosti a neistôt.

Príklady regresných rovníc stanovenia koncentrácií prvkov najlepších kalibračných modelov zistených metódou ED XRF:

$$c_{Cr} = 7,771 \cdot 10^3 \cdot I_{Cr} + 4,508 \cdot 10^4 \cdot I_{Cr} \cdot I_{Ti} + 1,476 \cdot I_{Ti} - 6,948 \cdot 10^3 \cdot I_{Ti}^2$$

$$c_{Mn} = 1092 \cdot 10^4 \cdot I_{Mn} + 3,815 \cdot 10^4 \cdot I_{Mn}^2 - 1,360 \cdot 10^3 \cdot I_{Mn} \cdot I_{Fe}$$

$$c_{Zn} = 3,820 \cdot 10^3 \cdot I_{Zn} + 2,043 \cdot 10^4 \cdot I_{Zn}^2 - 1,322 \cdot 10^5 \cdot I_{Zn} \cdot I_{Ni}$$

$$c_{Zr} = 2,517 \cdot 10^2 \cdot I_{Zr} - 3,724 \cdot 10^1 \cdot I_{Zr}^2 + 7,716 \cdot 10^2 \cdot I_{Zr} \cdot I_{Nb} - 2,060 \cdot 10^3 \cdot I_{Nb}^2$$

Ako najvhodnejší model pre stanovenie konkrétneho prvku sme volili model s najtesnejším rozpätím výťažnosti dvoch certifikovaných referenčných materiálov. Pritom sme vypočítali priemernú výťažnosť a priemernú rozšírenú kombinovanú neistotu.

Okrem uvedeného sme porovnávali výsledky ED XRF analýz reálnych vzoriek odpadov, kalov z výroby Al_2O_3 , pôd s výsledkami analýz ED XRF iného výrobcu a s výsledkami AAS. Lordovými testami boli potvrdené zhody výsledkov^{2,5}.

Záver

V práci je načrtnutá možnosť kalibrácie ED XRF spektrometra pre stanovenie kovov vo vybranej matrike pôd a sedimentov. Na základe veľkého počtu experimentov príprav vzoriek pre analýzy metódou ED XRF, optimalizáciou parametrov meraní pôd a sedimentov a rozsiah-

lych súborov získaných dát a ich matematicko-štatistickým vyhodnotením sa získali parametre v štyroch kalibračných modeloch pre 35 prvkov prítomných v pôde.

Boli vypracované a verifikované vhodné kalibračné modely pre spektrometer ELVA X a overená ich vhodnosť pre analýzy reálnych vzoriek životného prostredia.

Výsledky porovnávacích analýz reálnych vzoriek pôd potvrdili, že nová rýchla metóda stanovenia kovov v tejto matici je po dôkladnej analýze modelov a kvantometrických údajov porovnateľná z hľadiska presnosti s metódou AAS, ako aj inou technikou ED XRF.

Práca bola vypracovaná s podporou grantového projektu APVV-0555-07.

LITERATÚRA

1. Belikov K. N., Blank A. B., Shevtsov N. I., Nadzhafova O. Y., Tananaiko M. M.: *Anal. Chim. Acta* 383, 277 (1999).
2. Hroncová E., Ladomerský J.: *Röntgenfluorescenčná spektrometria – Analýza sedimentov a vzoriek životného prostredia*. s. 113. TU vo Zvolene, Zvolen 2007.
3. Pouzar M., Černoňorský T., Sákra T.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 51, 173 (2006).
4. Grieken R. E., Markowicz A. A.: *Handbook of X-Ray Spectrometry*. Marcell Dekker, Inc. New York Reserved USA, 2002.
5. Jenkins R., Gould R. W., Gedcke D.: *Quantitative X-ray Spectrometry*. Marcell Dekker, Inc. New York 1995.
6. Hroncová E.: *Dizertačná práca*. TU vo Zvolene, Zvolen 2009.

E. Hroncová and J. Ladomerský (*Technical University in Zvolen, Faculty of Ecology and Environmental Sciences, Department of Environmental Engineering, Zvolen*): **Calibration Models of Complex Environment Compounds for ED XRF ELVA X**

The results of comparing analyses of real samples (soils) confirmed that new fast method of metal determination in environmental samples ED XRF by technique Elva X is comparable with AAS method or other technique ED XRF according to the close analysis of models and quantitative data from the accuracy point of view. To write out and verify the suitable calibration model for spectrometer ELVA X and to verify its propriety for real environmental samples is a very demanding task, more challenging than in the case of the first-rate but more expensive technique.

FAST GAS CHROMATOGRAPHY FOR ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS DETERMINATION

SVETLANA HROUZKOVÁ, ANDREA HERCEGOVÁ, MÁRIA ANDRAŠČÍKOVÁ, and EVA MATISOVÁ

*Institute 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*

The possibility that many chemical substances of natural or anthropogenic origin may influence the endocrine system of life has received considerable attention in the scientific and public community. The group of compounds is highly heterogeneous and may be man-made (xenobiotic compounds), e.g. crop protection chemicals, synthetic chemicals used as industrial solvents and their by-products (polychlorinated biphenyls, polybrominated biphenyls, dioxins), plastics (bisphenol A), plasticizers (phthalates), pharmaceuticals, or they may be natural like the phytoestrogens. It is expected that even minute amounts of these chemicals are able to disrupt the endocrine system and cause cancer, harm to male and female reproductive systems, and other adverse effects¹. Therefore these substances are called “endocrine disruptors”. More definitions were published, based on EU definition² an endocrine disruptor 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) populations.

Monitoring the EDCs requires highly sophisticated analyses methods, as their concentration levels exhibiting some harmful effects are very low (pg/l – µg/l) in the environment. Fast gas chromatography (GC) fulfills the demands on faster and cost-effective analyses³. Fast GC technique provides obvious advantage compared to conventional capillary GC, mainly shorter analysis time, increased laboratory throughput, reduced costs per sample and improved precision and sensitivity. Trends in GC are the increasing needs for positive identification and for

more flexible methods that enable analysis of wide variety of samples in one system. This clearly results for the need of mass spectrometry detection (MS) for analyte identification. The detection by mass spectrometry (MS) in SIM mode offers the possibility of simultaneous confirmation and quantification of a large number of pesticides at ultra-trace concentration levels.

The purpose of the work was to develop a method for multiresidue analysis of endocrine disrupting pesticides in a non-fatty samples by fast GC with programmed temperature vaporizer injection in solvent-vent mode and using a narrow-bore capillary column. Matrix-matched standard solutions were used for calibration. The MS in EI and NCI mode was evaluated for multiresidue analysis of pesticides from different chemical classes acting as endocrine disruptors in different fruit and vegetable matrices. The NCI mode provided significantly higher selectivity and sensitivity. Better results for the NCI mode were obtained as a consequence of minimizing the background interferences and a better signal to noise ratio. The validated fast GC-MS (EI/CI) method was applied to the analysis of real samples (variety fruit and vegetable commodities) by using external calibration with matrix-matched standards and standard addition method.

The presented study shows potential for the utilization of the developed method in ultratrace analysis of pesticide residues with endocrine disruption behavior.

This work was supported by the Grant Agency VEGA project No. 1/0390/09.

REFERENCES

1. Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A.: *Pure Appl. Chem.* 75, 631 (2003).
2. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.html
3. Dömötörövá M., Matisová E.: *J. Chromatogr., A* 1207, 1 (2008).
4. Húšková R., Matisová E., Hrouzková S., Švorc E.: *J. Chromatogr., A* 1216, 6326 (2009).

PREČO SÚ HUMINOVÉ LÁTKY ZAUJÍMAVÉ AJ PRE ANALYTICKÉHO CHEMIKA ?

**MILAN HUTTA, MÁRIA
CHALÁNYOVÁ, RÓBERT GÓRA,
RADOSLAV HALKO, JANKA
RÁCZOVÁ a PAVOL ROHÁRIK**

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

Kľúčové slová: humínové látky, interferencia, pesticídy,
pokročilé techniky HPLC analýzy

Úvod

Metódy analýzy cudzorodých látok (pesticídov) v pôde, vode a sedimentoch sú často znehodnocované malou spoľahlivosťou analýz a premenlivou výťažnosťou analytov spôsobenou prítomnosťou takých organických látok, ktoré sú týmto prostrediam vlastné alebo látkami, ktoré tieto prostredia znečisťujú neuváženou ľudskou činnosťou. Nereprodukovateľnosť výsledkov je možné v dôsledku pôsobenia týchto látok pozorovať dokonca aj v prípade odberu vzoriek z tej istej lokality a v tom istom čase. Výskum individuálnych a kombinovaných účinkov týchto látok na výťažnosť analytov a na analytický výsledok je potrebný kvôli lepšiemu porozumeniu transportným a koncentračným procesom a tiež pre lepšie definovanie tých faktorov, ktoré ovplyvňujú výťažnosť analytov. Chemické zložky, ktoré sa vyskytujú v pevných vzorkách alebo sú rozpustené v prírodných vodách môžu znižovať výťažok analytu mnohých metód úpravy vzorky. Konštitučná pôdna organická hmota alebo rozpustené organické látky nachádzajúce sa vo vode spôsobujú, ako hlavné konštituenty environmentálnych vzoriek, interferencie s mnohými látkami (napríklad reziduiami pesticídov) pri ich stopovej analýze.

Veľký podiel rozpustných alebo extrahovateľných látok pôd, sedimentov a prírodných vôd pozostáva z humínových kyselín a fulvokyselín, ktoré sú komplexnými, amorfnými, aromatickými a silne sfarbenými hydrofilnými polyelektrolytovými a makromolekulovými kyselinami^{1,2}.

Vo vodách sa častejšie vyskytujú fulvokyseliny, ktoré majú viac kyslíkatých funkčných skupín a menšiu distribúciu veľkostí molekúl ako humínové kyseliny³. Hlavné typy funkčných skupín sú u oboch kyselín podobné (karboxylové skupiny a fenolové hydroxyskupiny), avšak ich relatívny výskyt sa môže meniť a preto aj ich interferenčný účinok môže byť premenlivý podľa aktuálnych podmienok.

V HPLC postupoch, zvlášť pri postupoch analýzy pevných látok (napr. pôda, sediment), je všeobecne akceptovaná postupnosť nasledujúcich krokov: vzorkovanie – uvoľnenie analytov z pevnej matrice viac alebo menej selektívnym vyluhovaním alebo extrakciou – čistenie a úprava kvapalného extraktu – zmenšenie objemu extraktu – zriedenie alebo rozpustenie extrahovaných látok a analytov vo vhodnej mobilnej fáze – koncová HPLC analýza – vyhodnotenie údajov – výsledky a ich interpretácia. S malými obmenami sa tento postup využíva aj na analýze prírodných vôd.

Napríklad zmena pri užívaní enantioméne obohatených alebo enantioméne čistých agrochemikálií namiesto klasických agrochemikálií (pesticídov) si vyžaduje vylepšenie už existujúcich metód stereoselektívnej analýzy a tiež návrh nových metód a zvládnutie nových netradičných prístupov k analytickým postupom. Splnenie týchto požiadaviek je zvlášť aktuálne a náročné v prípade analýzy chirálnych zlúčenín v environmentálnych vzorkách (prírodné vody, pôdy, sedimenty). Problém je komplikovaný tým, že oproti klasickým pesticídov, ktoré sa dávkovali v efektívnych dávkach rádovo kilogram na hektár, nové chirálne pesticídy sa kvôli ich vyššej biocídnej aktivite aplikujú v dávkach jednotiek až stoviek gramov na hektár. Dôsledkom je zväčšenie pomeru koncentrácie organických a anorganických zložiek environmentálnych matric ku hmotnosti analytu, čo kladie podstatne vyššie nároky na každý operačný krok analytického postupu.

Cieľom tejto práce je poukázať na niektoré zovšeobecnenia a možnosti ako znížiť alebo eliminovať dostupnými prostriedkami matricové efekty a interferujúce účinky prevažne humínových kyselín a fulvokyselín na príkladoch analýzy rôznych skupín pesticídov vo vzorkách pôd rôzneho pôvodu.

Experimentálna časť

Vysokoúčinné kvapalinové chromatografy (HPLC) s technikou prepínania kolón (column-switching CSW-HPLC), veľkoobjemové dávkovanie (large-volume injection LVI-HPLC), LVI-SP (dávkovanie pumpovaním kvapalných vzoriek)-HPLC, "dávkovanie tuhých vzoriek ("solid sample injection") HPLC.

Výsledky a diskusia

Po aplikácii pesticídov v zložkách životného prostredia (napríklad na poliach) je, z rôznych dôvodov, často potrebné analyzovať stopy reziduí pesticídov v pôde, vode a v zboží metódami stopovej a ultrastopovej analýzy. Väčšina týchto metód a nimi získaných výsledkov je však často nepriaznivo ovplyvnená látkami extrahovanými z matrice spolu s analyt-

mi. Analýzy sú obyčajne komplikované všeobecnou všadeprítomnosťou konštitučnej organickej hmoty (napríklad pôdnej organickej hmoty alebo rozpustenej organickej hmoty vo vodách). Zaregistrovanie ich prítomnosti v environmentálnej vzorke je z pohľadu analytického chemika veľmi dôležité, pretože pokiaľ ich účinky nemáme pod kontrolou tak môžu spôsobovať popri pôdnych mikroorganizmoch vo vzorkách také efekty ako sú nevratná alebo selektívna adsorpcia analytov na koloidy humínových látok alebo ich častice, oklúzia analytov v zrazeninách humínových látok, nevratná alebo dostatočne silná adsorpcia humínových látok na rôzne povrchy zložiek analytických alebo preparatívnych chromatografických systémov (tesniace plasty dávkovačov, vnútorné povrchy kapilár (nerez, fluoroplasty, PEEK...), frity v kolónach, povrchy stacionárnych fáz, okienka detektorov, povrchy elektród a podobne. Dôsledkami ich negatívneho pôsobenia môžu byť zmeny selektivity, retencie a účinnosti kolón, upchatie kolón a jeho dôsledky – zvýšený tlak, zborštenie častíc sorbentov, zničenie kolón (náchylné sú zvlášť drahé chirálne kolóny), chelatovanie a rozpúšťanie kovových povrchov HPLC prístrojov: Priamo vo vzorke môžu humínové látky katalyzovať alebo indukovať rozklad analytov, spôsobovať (stereo)selektívny rozklad niektorých pesticídov v pôde, sedimentoch a vode, spôsobovať enantio-merizáciu chirálnych látok. Pri vývoji analytických metód humínové látky dosť často spôsobujú interferenciu ich signál s analytickými signálmi rôznorodých analytov počas meraní pomocou väčšiny detekčných techník. Ich prítomnosť môžeme pozorovať a zaregistrovať aj pri stopovej a ultrastopovej analýze látok pomocou takých citlivých a selektívnych detekčných metód ako sú fluorimetrické metódy v HPLC aj v pozadiach mobilných fáz pripravených z chemikálií čistoty pro analysi (p.a.).

Z pohľadu výskumného a vývojového analytického chemika tieto skutočnosti komplikujú efektívnosť práce pri vývoji a vypracovaní analytických postupov tým, že vnášajú prvky neistoty do interpretácie výsledkov meraní získaných napríklad pri štúdiu výtlačnosti analytov z matrice.

V našom laboratóriu sme rozpracovali rôzne prístupy zamerané na potlačenie nepriaznivých účinkov humínových látok na environmentálnu stopovú analýzu reziduí pesticídov pomocou HPLC. Tieto prístupy sú založené na využití kombinácie micelárnej extrakcie nad teplotou zákalu (cloud point extraction) a micelárnej HPLC⁴⁻⁷, LVI-nechirálna/chirálna kolóna CSW-HPLC⁸, LVI-SP-HPLC^{9,10}, off-line prietokovej extrakcie pôdnych mikrovzoriek kombinovanej s LVI HPLC^{11,12}, on-line prietokovej extrakcie pôdnych mikrovzoriek kombinovanej s CSW-LVI HPLC¹³.

V mnohých prípadoch sme s výhodou využili riedenie pôdnych extraktov vhodným zriedovacím roztokom a priamym dávkovaním veľkých objemov (až 20 mililitrov) do štandardných HPLC kolón (4,6 mm × 100 mm). Tento prístup je protichodný ku klasickej Soxhletovej extrakcii, pri ktorej sa v konečnom kroku extrakt zahusťuje, čo často vedie ku vzniku zrazenín, emulzií a presýtených roztokov. Pred vlastnou HPLC analýzou nasleduje viac-menej úspešné znovurozpustenie analytov a niektorých extrahovaných zložiek matrice v mobilnej fáze kombinované s dávkovaním

objemov na úrovni desiatok mikrolitrov do HPLC kolóny.

HPLC metóda založená na LVI zriadených extraktov pôdnych vzoriek umožňuje znížiť nepriaznivé matricové efekty vyskytujúce sa pri bežných dávkovacích technikách, ktoré sú spôsobené častým presýtením analyzovaných roztokov a rýchlym vyžrazením humínových látok v malom priestore na vrchu vysokoúčinnnej kolóny, kde dochádza len k malej disperzii injektovanej zóny vzorky.

Humínové látky – humínové kyseliny a fulvokyseliny – sú pravdepodobne hlavnými interferujúcimi zložkami izolovanými z pôdy a prírodných vôd, ktoré nemajú príliš dobre definovanú štruktúru, sú polydisperzné, sú definované len operačne a musia byť z rôznych dôvodov charakterizované a analyzované veľmi rôznorodými metódami^{14,15}. Humínové látky sú zaujímavé aj ako analyty.

Súčasný stav využitia HPLC pri riešení problémov s pesticídmi alebo problémov environmentálnej analýzy pesticídov v sebe zahŕňa optimalizáciu separačných a detekčných systémov HPLC s cieľom dosiahnuť požadované rozlíšenie pesticídov a tiež ich zmesí s humínovými látkami v modelových systémoch s dôrazom na analýze technických vzoriek a preparatívne aplikácie. Do týchto oblastí záujmu HPLC spadajú napríklad vývoj metód na (enantio-) selektívnu separáciu chirálnych pesticídov ako súčasť ich testovania a výroby; (enantio-)selektívna analýza reziduí pesticídov v životnom prostredí ako kľúčová súčasť výskumu pôsobenia (chirálnych) pesticídov a ich premien a environmentálneho osudu; stopová a ultrastopová (enantio-) špecifická HPLC analýza v environmentálnych vzorkách (vzdušné prachové častice, pôda, sediment a voda), pri ktorej humínové látky často pôsobia ako vážne interferenty.

Záver

Budúce trendy vo vývoji analytických metód a postupov na stanovenie reziduí pesticídov v komplexných množozložkových zmesiach budú zamerané nielen na vývoj kombinovaných techník, napríklad techník kombinujúcich chromatografiu a pokročilú detekciu, kombinácie chromatografických a elektro-separačných metód s hmotnostnou spektrometriou, ale aj na získanie hlbších poznatkov o humínových látkach a ich pôsobení pri rôznych podmienkach s cieľom nielen ich analyzovať, ale aj eliminovať ich negatívne vplyvy na chemickú analýzu pesticídov a iných látok nachádzajúcich sa v pôde, vode a sedimentoch (napríklad produktov metabolizmu mikroorganizmov, fragmentov DNA a podobne.)

Táto práca bola finančne podporená projektami APVV-0597-07, VVCE-0070-07 and VEGA 1/0870/09.

LITERATÚRA

1. Ghabbour E., Davies G. (ed.), *Humic Substances: Nature's Most Versatile Materials*. Taylor and Francis,

- Inc., New York 2003, Taylor and Francis e-Library, 2005.
2. Tan K. H.: *Humic Matter in Soil and the Environment, Principles and Controversies*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2003.
 3. Tan K. H.: *Soil Sampling, Preparation and Analysis*, s. 350-362. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton 2005.
 4. Halko R., Hutta M.: Chem. Listy 94, 990 (2000).
 5. Halko R., Hutta M.: Fresenius Environ. Bull. 11, 1 (2002).
 6. Halko R., Hutta M.: Anal. Chim. Acta 466, 325 (2002).
 7. Románová K., Hutta M.: Chem. Listy 96, 738 (2002).
 8. Hutta M., Rybár I., Chalányová M.: J. Chromatogr., A 959, 143 (2002).
 9. Hutta M., Chalányová M., Halko R., Góra R., Rybár I., Pajchl M., Dokupilová S.: J. Sep.Sci. 29, 1977 (2006).
 10. Hutta M., Chalányová M., Halko R., Góra R., Dokupilová S., Rybár I.: J. Sep.Sci. 32, 2034 (2009).
 11. Chalányová M., Paulechová M., Hutta M.: J. Sep. Sci. 29, 2149 (2006).
 12. Rybár I., Góra R., Hutta M.: J. Sep. Sci. 30, 3164 (2007).
 13. Chalányová M., Hutta M., Pagáč M.: J. Sep. Sci 33, 1 (2009).
 14. Hutta M., Góra R.: J. Chromatogr., A 1012, 67 (2003).
 15. Góra R., Hutta M.: J. Chromatogr., A 1084, 39 (2005).

ON-LINE SPOJENIE ÚPRAVY PÓDNEJ VZORKY A STOPOVEJ RP-HPLC ANALÝZY VYBRANEJ SKUPINY PYRETOIDOV ZA POUŽITIA TECHNIKY PREPÁJANIA KOLÓN

MÁRIA CHALÁNYOVÁ,
MILAN HUTTA a MARTIN PAGÁČ

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

Kľúčové slová: pyretroidy, prepájanie kolón, mikrovzorka pôdy, on-line HPLC analýza

Úvod

Pyretroidy tvoria viac ako 30 % z celkového objemu použitých pesticídov, pomocou ktorých sa v poľnohospodárstve zabezpečuje ochrana rastlín, čo má za následok zvyšovanie výnosnosti poľnohospodárskej pôdy a kvality poľnohospodárskych produktov. Sú však známe i nepriaznivé účinky pesticídov na životné prostredie, živočíchov a človeka, čo vyústilo do potreby sledovania ich používania a kontroly reziduí a ich metabolitov v životnom prostredí¹. Pyretroidy sa vďaka ich vysokej lipofilite a nízkej rozpustnosti vo vode² rýchlo a silne sorbujú na pôdu³. Spôsob ich správania sa v pôde (stálosť v pôde, metabolizmus a viazanie) závisí od fyzikálnych a chemických vlastností. Komplexné matrice môžu spôsobovať problémy pri stanovení analytov na nízkych koncentračných úrovniach^{4,5}. Preto sa pred samotnou analýzou musí obvykle vzorka podrobiť úprave⁶, ktorá zahŕňa izoláciu, zakoncentrovanie a čistenie analytov zo zložitých matric⁷. Úprava vzorky je obvykle časovo najnáročnejším a najkritickejším krokom celej analýzy⁵. Základom úspešnej analytickej metódy stanovenia reziduí pesticídov je selektívna izolačná technika schopná izolácie s výťažnosťou blížiacou sa 100 % s minimálnym množstvom koextrahovaných látok z matrice¹. Nevýhody takých bežných extrakčných techník ako sú Soxhletova extrakcia a extrakcia v systéme kvapalina – kvapalina u ktorých je vysoká spotreba organických rozpúšťadiel a časová náročnosť, viedli k vývoju nových úpravných metód ako napríklad extrakcia tuhou fázou (SPE), disperzia matrice na tuhej fáze (MSPD) alebo mikrovlnová extrakcia (MAE), a ďalšie, kde hlavnými výhodami sú rýchlosť a menšia spotreba použitých rozpúšťadiel⁸. Stanoveniu pyretroidov v pôdach je venovaný obmedzený počet prác. Stanovením cypermetrinu, fenvaleratu, *cis*- a *trans*-permetrinu v pôde a v podzemnej vode technikou HPLC sa zaoberali Galera a spol.⁹. Chromatografická separácia bola uskutočnená na kolóne Hypersil C18. Mobilnou fázou bola zmes ACN : H₂O (85:15, v/v) pri vlnovej dĺžke 210 nm. Na izoláciu

analytov zo vzorky vody použili dvojité extrakciu *n*-hexánom. Výťažnosť extrakcie bola 70,2–126 %. Vzorku pôdy extrahovali *n*-hexánom v Soxhletovom extraktore, extrakt odparili do sucha a zvyšok rozpustili v acetonitrile. Na odstránenie nežiadúcich interferentov použili extrakciu tuhou fázou. Výťažnosť analytov sa pohybovala v rozmedzí 80–115,4 %. Manisankar a spol.¹⁰ sa zaoberali štúdiom elektrochemických vlastností piatich pesticídov dicofol, cypermetrin, monocrotopos, pyrifos a posalon v pôde metódou square wave stripping voltampérometrie (SWSV). Na stanovenie použili modifikovanú poly 3,4-etyléndioxytiofénovú sklenenú uhlíkovú elektródu (PEDOT/GCE). Detekcia a stanovenie bolo založené na redoxných vlastnostiach pesticídov. Výťažnosti z pôdných vzoriek boli 95,4 ± 5,4 % pre dicofol, 93,7 ± 4,2 % pre cypermetrin, 85,3 ± 8,4 % pre monocrotopos, 94,6 ± 6,6 % pre pyrifos a 93,5 ± 4,9 % pre posalon. Esteve-Turrillas a spol.¹¹ sa zaoberali mikrovlnnou extrakciou syntetických pyretroidov tetrametrinu, cyflutrinu, flucytrinátu, deltametrinu, bifentrinu, permetrinu, cypermetrinu a fluvalinátu z pôd a následnou GC-ECD a GC-MS analýzou. Pôdnu vzorku, po zvlhčení toluénom a vodou podrobili dvojnásobnej extrakcii ultrazvukom v PTFE reaktore. Extrakt po čistení na florisile bol desorbovaný zmesou octan etylový/hexán. Výťažnosť tetrametrinu bola 96 % a pre ostatné pyretroidy sa výťažnosti pohybovali v intervale 97–106 %. Výsledky analýzy reálnych vzoriek dosiahnuté mikrovlnnou extrakciou boli porovnateľné s výsledkami, ktoré získali extrakciou ultrazvukom. Limity detekcie boli v intervale 1–200 µg kg⁻¹. Goncalves a spol.¹² zisťovali úroveň kontaminácie pôd organochloridmi, pyretroidmi a herbicídmi použitím techník GC-ECD a GC-MS. Pôdne vzorky zvlhčené octanom etylovým podrobili trojnásobnej extrakcii ultrazvukom po dobu 15 min. Cieľový extrakt odparili do sucha prúdom dusíka. Koncentračné úrovne sledovaných analytov boli 0,05–7,0 µg kg⁻¹ s presnosťou 13,7 % RSD. Účinnosť extrakcie bola 69–118 %. Výťažnosti pyretroidov λ-cyhalotrinu, α-cypermetrinu a deltametrinu boli 103, 103 a 111 %. Limity stanovenia boli 4,4 a 1,0 µg kg⁻¹. Analýzou pôd zo záhradkárskej oblasti dospeli k záveru, že 28 % všetkých analyzovaných pôdných vzoriek nebolo kontaminovaných pesticídmi. Cieľom predkladanej práce je vypracovanie on-line metódy stanovenia pyretroidov v pôdných mikrovzorkách (cca 200 mg) na stopových koncentračných úrovniach. Pri vypracovaní on-line metódy sme vychádzali zo záverov prác^{13,14}, ktoré boli venované optimalizácii podmienok pre off-line izolácie a HPLC stanoveniu skupiny vybraných pyretroidov v mikrovzorkách na nízkych koncentračných úrovniach s využitím veľkoobjemového dávkovania (1 ml) extraktu analytov, so spektrofotometrickou detekciou s programovanou zmenou vlnových dĺžok.

Experimentálna časť

Zostava pre HPLC stanovenie pozostávala z nasledovných častí

Vysokotlaková pumpa Knauer HPLC 64, SRN, pumpa LichroGraph^R, Model L – 6200 A, Merck – Hitachi, Darmstadt, SRN, UV-VIS detektor Model L – 4250, Merck – Hitachi, Darmstadt, SRN. Dávkovací ventil Valco N 60 s 1 ml dávkovacou slučkou, dva trojcestné šesťvstupové dávkovacie ventily Rheodyne 7125, a Rheodyne 7010 (Cotati, California, U. S. A.). Analytická kolóna Purospher RP 18e (125 × 4) mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Nemecko). Sklené SPE kolóny (30 × 3) mm plnené za sucha: Silasorb Fenyl 10 μm, Silasorb DIOL 10 μm, Lachema Brno, ČR, Separon SGX NH₂ C a Separon SGX CN 10 μm, Tessek Praha. Oxid hlinitý LS 5/4, Silikagél 40/100, Lachema, Brno, a Separon SGX NH₂ Tessek, Praha, ČR boli testované ako prídavok na dno kolón so vzorkou pôd.

Namerané údaje boli vyhodnotené programom CSW verzia 1.0, s 20 bitovým integračným sigma delta A/D prevodníkom, DataApex s.r.o., Praha, ČR. Kalibračné závislosti boli vyhodnotené v programe AdStat, TriloByte verzia 1.20, Pardubice, ČR.

Štandardy analyzovaných látok: kadetrin (5-benzyl-3-furylmetyl(*E*)-(1*R*,3*S*)-2,2-dimetyl-3-(2-oxotiolan-3-ylidenmetyl)cyklopropánkarboxylát) s čistotou 93,5 %, cypermetrin ((*RS*)- α -kyano-3-fenoxybenzyl(1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*RS*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimetylcyklopropánkarboxylát) 95,8 % a permetrin(3-fenoxybenzyl(1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*RS*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimetylcyklopropánkarboxylát) 97,3 %, boli zakúpené u Riedel-de Haën, SRN.

Na prípravu mobilnej fázy bol použitý metanol Merck, SRN a ultračistá voda z čistiaceho systému Labconco, Waters, Pro-PS, Labconco, Cansas City, USA., kyselina citrónová Lachema Brno, ČR.

Zásobné roztoky štandardov kadetrinu, cypermetrinu a permetrinu boli pripravené v 100% metanole. Ostatné štandardné roztoky boli pripravené riedením zásobných roztokov do 70% metanolu.

Príprava kontaminovaných vzoriek pôdy

5 g pôdy bolo zvlhčených 5 ml 100% metanolu. Do pôdy boli pridané vypočítané objemy štandardných roztokov kadetrinu, cypermetrinu a permetrinu. Pôda bola sušená v tme pri laboratórnej teplote 4 dni. Vzorky pôdy pre meranie slepého pokusu boli zmočené 100% metanolom a sušené za rovnakých podmienok ako kontaminovaná pôda.

Plnenie pôdnej vzorky do krátkej kolónky 30 × 3 mm

Na spodok krátkej kolónky bolo poklepávaním vnosených 50 mg silikagélu. Na silikagél bola potom poklepáva-

ním za sucha nanosená (nekontaminovaná) kontaminovaná vzorka pôdy. Krátka kolóna bola odvážená a uzavretá. Takto pripravené kolóny boli použité pre určenie výťažnosti pyretroidov pri dynamickom prevedení extrakcie v prietoku metódou off-line i on-line s desorpčným činidlom metanol / kys. citrónová 5·10⁻³ mol l⁻¹ (70 / 30, v/v) s rôznymi prietokovými rýchlosťami do vhodne experimentálne vybraného objemu extraktu. Pri off line analýzach bol dávkovaný 1 ml zmesného štandardného roztoku pyretroidov i extraktov pôd.

Meranie prierazových objemov pyretroidov

Krátka kolóna 30 × 3 mm plnená sorbentom bola premytá 2 ml 100% metanolu, následne bola kondicionovaná 5 ml 2% metanolu. Na predkolónu boli aplikované roztoky kadetrinu, permetrinu a cypermetrinu s definovanou koncentráciou v zmesiach o rôznom zložení metanol/voda. Po zaznamenaní prierazovej krivky boli pyretroidy desorbované zo sorbentu 100% metanolom. Z nameraných prierazových kriviek boli určené prierazové objemy analytov.

Popis zariadenia

V 1; V 2 – prepínacie ventily

V 1 ———

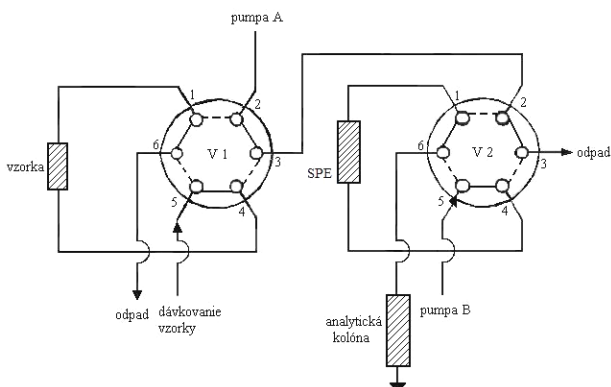
V 2 - - - - -

pumpa A kondicionovanie predkolónky Silasorb Fenyl 10 μm (30 × 3) mm 100% metanolom, následne zmesou metanol : voda (2 / 98, v/v) s prietokovou rýchlosťou mobilnej fázy 0,5 ml min⁻¹; pumpa B kondicionovanie analytickej kolóny zmesou metanol / voda (80 / 20, v/v) s prietokovou rýchlosťou mobilnej fázy 0,8 ml/min; pri tomto usporiadaní sa vymieňa kolónka plnená vzorkou.

V 1 - - - - -

V 2 - - - - -

pumpou A desorpcia pyretroidov z kolónky označenej ako vzorka 30 × 3 mm na kolónu naplnenú sorbentom Silasorb



Obr. 1. HPLC zariadenie pre on-line zakoncentrovanie a analýzu pyretroidov z pôd

Fenyl 10 μm zmesou metanol / kys citrónová $c=5\cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} (70 / 30, v/v) s prietokovou rýchlosťou 0,5 ml min^{-1} ; súčasne prebieha kondicionovanie analytickej kolóny pumpou B zmesou metanol / voda (80 / 20, v/v) s prietokovou rýchlosťou 0,8 ml min^{-1} .

V 1 ———

V 2 - - - - -

vymytie pyretroidov technikou spätného toku “backflush“ z kolóny naplnenej sorbentom Silasorb Fenyl 10 μm na analytickú kolónu; po 5 minútach sa ventil V2 prepne do opačnej polohy; analýza pyretroidov vymytých na analytickú kolónu Purospher RP 18e mobilnou fázou metanol / voda (80 / 20, v/v) s prietokovou rýchlosťou 0,8 ml min^{-1} .

V 1 ———

V 2 - - - - -

výmena kolónky so vzorkou pôdy; premytie kolóny Silasorb Fenyl 10 μm 100% metanolom; následne kondicionovanie kolóny naplnenej sorbentom Silasorb Fenyl 10 μm zmesou metanol / voda (2 / 98, v/v). Pri meraní bodov kalibračnej závislosti sa postupuje rovnakým pracovným postupom ako pri analýze vzoriek pôd s jedinou zmenou a to na obr. 1 kolónka so vzorkou je nahradená 1 ml dávkovacou slučkou.

Výsledky a diskusia

Pri vypracovaní on-line metódy stanovenia pyretroidov v pôdnych mikrovzorkách (cca 200 mg) na stopových koncentračných úrovniach sme vychádzali z optimálnych podmienok ktoré boli vypracované v off-line móde izolácie a následnej RP-HPLC analýzy kadetrinu cypermetrinu a permetrinu v pôde MP 17. Zo štúdia optimálnych podmienok extrakcie a následnej off-line RP-HPLC analýzy skupiny pyretroidov vyplnuli tieto závery^{13,14}.

Vhodným desorpčným činidlom, pre extrakciu pyretroidov z pôd, ktoré bude kompatibilné so zložením mobilnej fázy pri HPLC analýze sa javí zmes metanol/kyselina citrónová $5\cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} s desorpčnou rýchlosťou 0,5 ml min^{-1} (obr. 2). Optimálny objem desorpčného činidla metanol/kyselina citrónová $5\cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} je 1,5 ml. Bol odskúšaný vplyv Silikagélu s rôznymi veľkosťami častíc a hmotnosťou na dne kolónky so vzorkou pôdy na účinnosť extrakcie analytov zo vzorky pôdy. Z výsledkov experimentu vyplynulo, že pre približne 200 mg vzorky pôdy v kolónke je vhodný s veľkosťou častíc Silikagél L 40/100 o hmotnosti 50 mg. Pre meranie signálu kadetrinu bola použitá vlnová dĺžka 270 nm a pre cypermetrinu a permetrinu 235 nm. Účinnosť extrakcie študovaných analytov z pôdnej matrice v závislosti od zmien parametrov bola vyhodnotená z kalibračných závislostí. Tieto boli namerané dávkovaním 1,0 ml štandardného roztoku analytov v koncentračnom rozmedzí 40–800 ng ml^{-1} . Limity detekcie a limity stanovenia skupiny analytov pre off-line izoláciu a následnú RP-HPLC analýzu sú zhrnuté v tab. I.

Výtťažnosti pri off-line prevedení analýz pre pôdne vzorky kontaminované kadetrinom na koncentračných

Tabuľka I

Limit detekcie a limit stanovenia pre študované pyretroidy stanovené z kalibračných závislostí pri dávkovaní objemu $V=1,0$ ml pri off-line prevedení analýzy

Analyt	Kadetrin	Cypermetrin	Permetrin
Limit detekcie, ng ml^{-1}	30	37	65
Limit stanovenia, ng ml^{-1}	235	187	320

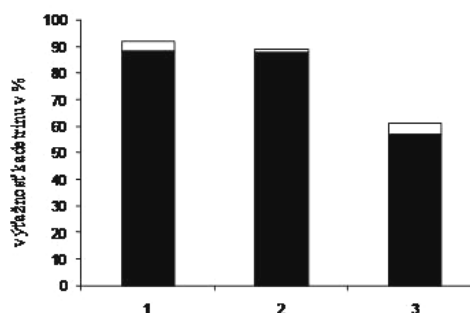
úrovniah 0,5–5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ sa pohybovali v rozmedzí 83,5–95,1 % a cypermetrinom a permetrinom na koncentračných úrovniach 1,0–2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ sa pohybovali v rozmedzí 77,3–101,0 % pre cypermetrin a 84,2–92,5 % pre permetrin¹³. Všetky experimenty boli uskutočnené s pôdnou vzorkou MP 17. Výsledky ktoré sa dosiahli pri dynamickej izolácii a následnej off-line RP-HPLC analýze pyretroidov vytvorili základ pre vypracovanie metódy on-line izolácie a následného stanovenia trojice pyretroidov s využitím techniky prepájania kolón (column switching).

On-line stanovenie pyretroidov

Na on-line zakoncentrovanie a následnú analýzu pyretroidov zo vzorky pôd sa použila technika spájania kolón, ktorej cieľom je selektívny prenos frakcií mobilnou fázou z výstupu jednej kolóny na vstup druhej kolóny pomocou prepínacieho ventilu. Výhodou techniky spájania kolón je začlenenie predúpravy vzorky do automatizovaného chromatografického postupu. Ďalšou výhodou okrem automatizácie je zlepšenie citlivosti a selektivity prenosom presného množstva požadovaných analytov na analytickú kolónu.

Prierazové objemy

Výber vhodnej náplne do SPE kolóny pre zakoncentrovanie analytov pri on-line stanovení zohráva významnú



Obr. 2. Výťažnosti kadetrinu v % pri off-line dynamickom prevedení extrakcie pre rôzne rýchlosti desorpcie analytu; extrakcia kadetrinu pri desorpčnej rýchlosti 1 – 0,1 ml min^{-1} , 2 – 0,5 ml min^{-1} , 3 – 0,8 ml min^{-1}

Tabuľka II
Sorpčné kapacity pyreteroidov

Sorbent	Kapacita sorbentov [$\mu\text{g g}^{-1}$]			
	metanol [% v/v]	kadetrin	cypermetrin	permetrin
Separon SGX NH ₂	70	0,38	1,1	1,2
Silasorb DIOL	70	1,87	1,8	1,7
Separon SGX CN	70	1,24	1,8	1,8
Silasorb Fenyl	70	6,1	13,0	15,2

úlohu. Na jednej strane vybraný sorbent musí mať dostatočnú sorpčnú kapacitu pre študované analyty, ale na strane druhej jeho kapacita pre zakoncentrovanie koextraktov z matrice musí byť minimálna. Za týchto podmienok väčšina interferentov je odvádzaná z SPE kolóny do odpadu pred nástrekom zakoncentrovaných analytov na analytickú kolónu. Prierazové objemy skupiny pyreteroidov boli namerané na štyroch rôznych typoch sorbentov a následne z nich boli vypočítané sorpčné kapacity pyreteroidov (tab. II). Najlepšiu sorpčnú kapacitu a i čistiaci efekt bol dosiahnutý na sorbente Silasorb Fenyl 10 μm .

Kalibračné závislosti

Kalibračné závislosti analytov boli namerané na zariadení, ktorého schematické zapojenie je zobrazené na obr. 1. kde kolóna so vzorkou pôdy bola nahradená 1 ml dávkovacou slučkou. Analyty boli desorbované desorpčným činidlom metanol / kyselina citrónová $s c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} (70/30, v/v) a on-line zakoncentrované na predkolóne Silasorb Fenyl 30 \times 3 mm, 10 μm . Zakoncentrované analyty boli vymyté z SPE kolónky technikou spätného toku (back flush) na analytickú kolónu Purospher RP 18 e kondiciovanú mobilnou fázou metanol/voda (80/20, v/v). Prietoková rýchlosť mobilnej fázy bola 0,8 ml min^{-1} . Na zostrojenie kalibračných závislostí plochy pík od hmotností analytov v nastrekovanom objeme boli pripravené zmesné štandardné roztoky kadetrinu, cypermetrinu a permetrinu s koncentráciou: 10–200 ng ml^{-1} . Parametre kalibračných závislostí pre 1 ml dávkovanie študovaných analy-

Tabuľka III
Parametre kalibračných závislostí pyreteroidov

Pyrethroid	Koncentrácia [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Rovnica priamky	R ²	LOD [$\mu\text{g l}^{-1}$]
Kadetrin	10–200	$y=1.077x+6.5586$	0,9981	4,2
Cypermetrin	10–200	$y=0.962x-4.025$	0,9988	3,8
Permetrin	10–200	$y=0.916x+0.502$	0,9988	3,7

tov on-line režime sú zhrnuté v tab. III.

Vplyv výberu sorbentu do krátkej kolóny so vzorkou na analýzu pôdy

Dôležitým krokom pri vypracovaní on-line metódy zohráva štúdium vplyvu sorbentu plneného na dno krátkej kolóny 30 \times 3 mm na chromatografickú analýzu trojice pyreteroidov kadetrin, cypermetrin a permetrin. Vrstva sorbentu na dne kolóny so vzorkou zohráva dôležitú úlohu. Zabezpečuje priechodnosť sitka na spodu kolóny a jej charakter ovplyvňuje i čistotu eluátu. Bol odskúšaný vplyv troch sorbentov Silikagélu L 40-100, Oxidu hlinitého LS 5/4 a Separonu SGX NH₂. Hmotnosť sorbentu bez ohľadu na typ bola 50 mg a hmotnosť študovanej pôdnej vzorky bol približne 200 mg. Experiment bol uskutočnený s pôdnou vzorkou MP 17, ktorá bola kontaminovaná pyreteroidmi na koncentračnej úrovni 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$. Okrem chromatografických záznamov kontaminovaných pôdných vzoriek boli namerané aj chromatografické záznamy slepých pokusov (blank) študovanej pôdy s tromi vyššie uvedenými druhmi sorbentov. Z nameraných výsledkov, ktoré sú zhrnuté v tab. IV vyplynulo, že najvhodnejším sorbentom na analýzu trojice študovaných pyreteroidov je Silikagél L 40-100. Za jeho použitia sa dosiahol najvyšší čistiaci efekt od koextraktov a výťažnosti analytov sa pohybovali v intervale 60,9–87,7 %. Z porovnania dvojíc chromatogramov (kontaminovaná vzorka a blank) vyplynuli ďalšie skutočnosti. Pri použití sorbentu oxidu hlinitého LS 5/4 v retenčnom čase permetrinu eluovala látka, ktorá bola súčasťou matrice. Táto látka prekryla pík permetrinu, ktorý sme nemohli vyhodnotiť.

Vplyv objemu desorbátu na účinnosť extrakcie

V rámci optimalizácie podmienok úpravy vzorky sme venovali pozornosť vplyvu objemu desorpčného činidla metanol : kyselina citrónová $s c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} (70:30, v/v) na výťažnosť študovaných analytov. Boli odskúšané objemy desorpčného činidla v rozmedzí od 1–3 ml. Najvyššie výťažnosti analytov sme dosiahli použitím sorbentu Silikagélu L 40-100. Pre látky s rovnakým retenčným faktorom ako má kadetrin, cypermetrin a permetrin je optimálny objem desorpčného činidla 2 ml (obr. 3).

Tabuľka IV

Výtlačnosť pre pôdnu vzorku MP 17 kontaminovanú kadetrinom, cypermetrinom a permetrinom na koncentračnej úrovni $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ pôdy pri objeme 2,0 ml desorpčného činidla metanol : kyselina citrónová s $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (70:30, v/v) na predkolónu Silasorb Fenyl $30 \times 3 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$, pre rôzne typ sorbentov

Sorbent	Výtlačnosť [%]		
	kadetrin	cypermetrin	permetrin
Al_2O_3 LS 5/4	48,4	51,4	
Separon SGX NH_2	58,9	39,4	50,5
Silikagél L 40/100	87,7	61,5	60,9

Výtlačnosť pyreteroidov

Po výbere vhodného sorbentu do krátkej kolóny plenej vzorkou pôdy, výbere vhodnej náplne SPE kolóny a optimalizácii objemu desorpčného činidla z krátkej kolóny na predkolónu Silasorb Fenyl $30 \times 3 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$ sme pristúpili k štúdiu výtlačností analytov v koncentračnom rozmedzí $0,25\text{--}1 \mu\text{g g}^{-1}$ pôdy MP 17. Krátka kolóna obsahovala 50 mg Silikagélu L 40-100 a asi 200 mg pôdnej vzorky. Desorpcia analytov bola uskutočnená desorpčnou rýchlosťou $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, analyty boli desorbované 2 ml desorpčného činidla metanol / kyselina citrónová s $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (70:30, v/v) na SPE kolónu Silasorb Fenyl $30 \times 3 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$, odkiaľ boli desorbované spätným tokom na

Tabuľka V

Výtlačnosti pyreteroidov zo vzorky pôdy MP-17

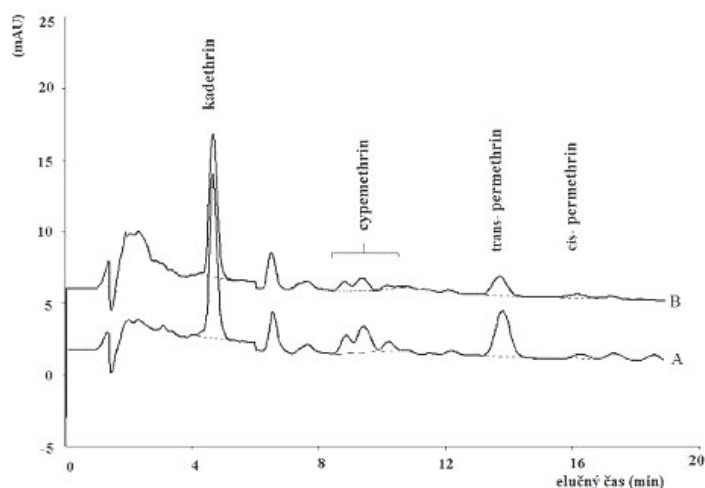
Kontaminácia pôdy [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Výtlačnosť [%]		
	kadetrin	cypermetrin	permetrin
1	$83,7 \pm 1,9$	$58,8 \pm 1,7$	$63,4 \pm 3,3$
0,5	$82,7 \pm 2,3$	$57,8 \pm 2,7$	$60,9 \pm 3,8$
0,25	$80,7 \pm 3,8$	$56,3 \pm 3,5$	$57,7 \pm 4,2$

analytickú kolónu Purospher RP 18 $125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$. Detekcia kadetrinu bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 270 nm a cypermetrinu a permetrinu pri vlnovej dĺžke 235 nm. Výtlačnosti analytov sú v tab. V. Chromatografické záznamy pre koncentračné úrovne analytov v rozmedzí $0,25\text{--}1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ pôdy sú na obr. 4.

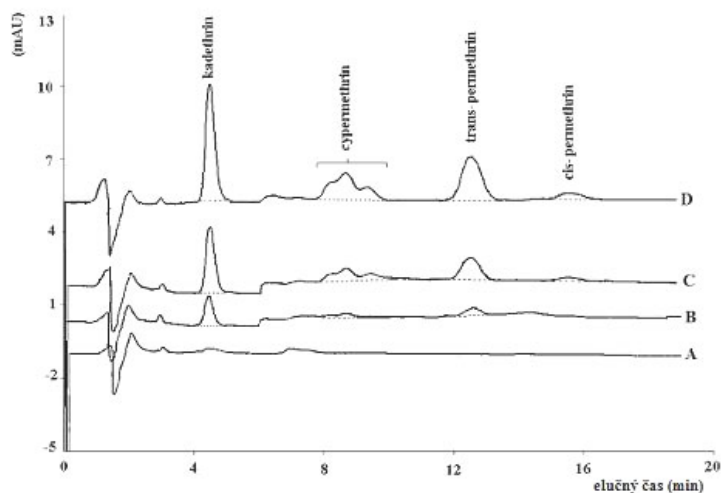
Záver

Pri štúdiu možností využitia priameho spojenia úpravy vzorky pôdy a HPLC analýzy pyreteroidov (kadetrin, cypermetrin a permetrin) a veľkoobjemového dávkovania štandardov pyreteroidov (1 ml) pre využitie vyhodnotenia výtlačností vyplynuli nasledovné závery:

Z kalibračných závislostí veľkoobjemového dávkovania ($V = 1,0 \text{ ml}$) v on-line prevedení analýz sme vypočítali v programe Chemstat. Detekčný limit pre kadetrin je $4,2 \text{ ng g}^{-1}$, pre cypermetrin je $3,8 \text{ ng g}^{-1}$ a pre permetrin je



Obr. 3. Vplyv objemu desorpčného činidla na výtlačnosť extrakcie, A – 1 ml; B – 2 ml. Chromatografické podmienky: Analytická kolóna Purospher RP 18 $125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; predkolóna Silasorb Fenyl $30 \times 3 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$; mobilná fáza metanol : voda (80:20, v/v); prietoková rýchlosť $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Programovaná zmena vlnovej dĺžky UV-VIS detektora: 0–6 min \rightarrow 270 nm; 6–20 min \rightarrow 235 nm. Detekcia kadetrinu bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 270 nm a cypermetrinu a permetrinu pri vlnovej dĺžke 235 nm



Obr. 4. Chromatografický záznam on-line zakonzentrovania a následnej analýzy 1 – kadetrinu, 2 – cypermethrinu, 3 – permethrinu kontaminovanej pôdy na 3 suchej pôdy koncentračných úrovniach pri objeme 2 ml desorpčného činidla s použitím Silikagél L 40-100 v krátkej kolóne. A – slepý pokus, B – 0,25 $\mu\text{g g}^{-1}$; C – 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$; D – 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ na suchú pôdu. Chromatografické podmienky, viď obr. 3.

3,7 ng g^{-1} . Štvorce korelačných koeficientov sa pohybovali v rozmedzí 0,9981–0,9988. Najlepší čistiaci efekt a najvyššia účinnosť extrakcie sa dosiahla pri použití sorbentu Silikagél L 40-100 na dno kolóny so vzorkou pôdy a pri použití SPE kolóny plnenej sorbentom Silasorb Fenyl, pričom optimálny objem desorpčného činidla činidla metanol : kyselina citrónová s $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (70:30, v/v) bol 2 ml. Dosiahnuté výťažnosti pyreteroidov pre pôdnu vzorku MP 17 kontaminovanú kadetrinom, cypermethrinom a permethrinom na koncentračnej úrovni 0,25–1 $\mu\text{g g}^{-1}$ pôdy MP 17 sa pohybovali v rozmedzí: 80,7–83,7 % pre kadetrin, 56,3–58,8 % pre cypermethrin a 57,7–63,4 % pre permethrin.

Práca vznikla za podpory grantov VEGA 1/0870/09, APVV-0595-07 a VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

1. Kirchner, Matisová E.: Chem. Listy 98, 396 (2004).
2. Esteve-Turrillas F. A., Aman C. S., Pastor A., Guardia M. D. L.: Anal. Chim. Acta 522, 73 (2004).
3. Zhou J. L., Rowland S., Mantoura R. F. C.: Wat. Res. 29, 1023 (1995).
4. Packham A. J., Fielden P. R.: J. Chromatogr. 552, 575 (1991).
5. LiChrolut^R, Extrakce na tuhú fázi, Merck (firemný materiál).
6. Chichilla T. M. P., Edlung P. O., Henion J. D., Wilson R., Epstein R. L.: J. Chromatogr. 488, 389 (1989).
7. Poole C. F.: Trends Anal. Chem. 22, 362 (2003).
8. H. Prosen, L. Zupančič-Kralj: Trends Anal. Chem. 18, 272 (1999).
9. Galera M. M., Vidal J. L. M., Frenich A. G, García M. D. G.: J. Chromatogr., A 727, 39 (1996).
10. Manisankar P., Viswanathan S., Pusphalatha A. M., Rani C.: Anal. Chim. Acta 28, 157 (2005).
11. Esteve-Turrillas F. A., Aman C. S., Pastor A., Guardia M.: Anal. Chim. Acta 522, 73 (2004).
12. Goncalves C., Alpendurada M. F.: Talanta 65, 1179 (2005).
13. Chalányová M., Paulechová M., Hutta M.: J. Sep. Sci. 29, 2149 (2006).
14. Mamrošová M.: Diplomová práca. PRIF UK, Bratislava 2004.

PCDDs, PCDFs AND DIOXINE-LIKE PCBs IN BREAST MILK AND ESTIMATION OF INFANT INTAKE

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

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

The most important source of dioxin and PCB exposure of infants in their first months of life is breast milk. The infant exposure from breast milk depends on mother's age, number of deliveries and lactations, place of residence, dietary habits^{1–4}.

This study presents for the first time the daily intake (DI) of dioxins and dioxin-like compounds for the most vulnerable breast-fed infant population in Slovakia. Comparison of infant intake and levels of monitored POPs in breast milk with data in other countries was performed.

Congener-specific analyses of 17 toxic polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and 12 toxic dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) were performed in 106 individual breast milk samples from primiparae and multiparae mothers living in or close industry regions, municipal and waste incinerators, which are known to be a contributor to dioxin and related compound emissions. Milk samples were obtained from mothers without any pregnancy and delivery complications from regions Šaľa, Košice, Krompachy and Michalovce during the period of 2006–2008.

The milk fat was isolated by liquid-liquid extraction and gravimetrically determined as described before⁵. Aliquots of the fat (1–5 g) were spiked with 17 ¹³C-labelled PCDD/F and 12 ¹³C-labelled PCB congeners. After removal of fat on a high-capacity acid-silica gel column, PCDDs/Fs and dl-PCBs were separated on a Power-Prep™ semi-automated cleanup system (Fluid Management Systems, Waltham, MA, USA) with pre-packed multi-layer silica, basic alumina and carbon columns⁶.

The measurements were performed by HRGC/HRMS using a MAT 95XP Finnigan mass spectrometer coupled to a HP 6890 gas chromatograph. A fused silica capillary DB-5MS column (60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) using helium as carrier gas was used. For each substance two isotope masses were measured. A minimum dynamic mass resolution of 10000 was maintained.

Calibration and quantification for PCDDs/PCDFs, dl-PCBs were carried out by isotope dilution methods USEPA 1613 and 1668. Each analytical batch consisted of 12 samples and a method blank. For check of accuracy of the analytical process a QC sample (certified reference

material milk powder BCR-607, Community Bureau of Reference) was used. All measurements were carried out in accredited laboratory (ISO/IEC 17 025) which successfully participated in interlaboratory study of PCDDs/PCDFs and dl-PCBs in human milk (Interlaboratory Comparison on Dioxins in Food 2006, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway).

Toxic equivalents (TEQ) were calculated using toxic equivalency factors established by World Health Organisation (WHO-TEFs)⁷. The concentrations of the not detected congeners were calculated with half the limit of detection (LOD).

Daily intakes of PCDDs/Fs and dl-PCBs for infant during the first two months of life have been estimated assuming daily consumption of 120 ml of breast milk per 1 kg infant body weight and fat content of individual milk samples. Dietary intake in this study ranged between 6.0–245 pg TEQ PCDDs/PCDFs/kg b.w./day, and 6.8–898 pg TEQ dl-PCBs/kg b.w./day. The values of estimated intakes can be partially distorted, because the calculation do not includes factor of gastrointestinal absorption of monitored analytes. Duarte-Davidson and Jones⁸ present value of 80 % for this factor, and Patandin et al.⁹ assumed of 95 % absorption of received compounds by gastrointestinal tract from breast milk. Median DI calculated from PCDD/F content in breast milk samples was the highest for infants from region Krompachy (40.5 pg TEQ/kg b.w.) and the lowest for infants from region Šaľa (18.7 pg TEQ/kg b.w.). Our results also showed that the median dl-PCB dietary intake for infants from area Michalovce is significantly higher in comparison with intakes estimated for infants from areas Krompachy, Košice and Šaľa. The markedly higher value of PCB dietary intake of infants from area Michalovce is due to the former PCB production in Chemko Strážske (district Michalovce) where in years 1959–1984 totally 21,482 tones of products based on PCBs were produced. It is assumed, that up to 20 % of used amount of PCBs released to the environment and contaminated air, soil, water and subsequently also food of animal origin.

Average PCDD/F dietary infant intake (34.6 pg TEQ/kg b.w./day) in this study is significantly lower than those referred for breast-fed infants from Belgium¹¹ and Germany.¹² Our results also indicate that DI of total TEQ PCDDs/Fs and dl-PCBs estimated from individual breast milk samples are noticeably higher than tolerable daily intake established by WHO (1–4 pg/kg/day)¹⁰.

Total PCDDs/PCDFs and dl-PCBs in breast milk samples ranged from 5.0 to 203.7 pg TEQ/g fat, with a median value of 18.4 pg TEQ/g fat. We found out that exposure of mothers residing in areas Krompachy and Košice to PCDDs/PCDFs are comparable (8.9 and 7.8 pg TEQ/g fat, respectively) and higher than in areas Šaľa

(5.3 pg TEQ/g fat) and Michalovce (6.7 pg TEQ/g fat).

Average TEQ PCDD/F value (8.6 pg TEQ/g fat) in analysed breast milk samples is lower in comparison with TEQ value for milk from Belgium¹¹, Germany¹³ and Russia¹⁴ and is little higher than previous study reported by Costopoulou et al.¹⁵ from Greece and by Schumacher et al.¹⁶ from Spain. Finally, we observed that TEQ value of dl-PCBs for mothers from area Michalovce (average 22.2 pg TEQ/g fat) was more than 2-times higher in comparison with other three monitored areas in this study (9.4 pg TEQ/g fat). In Europe, Wittsiepe et al.¹³ and Raab et al.¹⁷ reported 13.4 and 9.92 pg TEQ/g fat, respectively in Germany and Schumacher et al.¹⁶ 9.0 pg TEQ/g fat in Spain for mothers living in the vicinity of industrialized area and hazardous waste incinerators.

This work was supported by the Ministry of Health of the Slovak Republic (project No. MZSR/30-SZU-08, MZSR/35-SZU-13). The authors would like to thank Mrs. Jarmila Pauliková and Mrs. Jarmila Salajová for their skilled technical assistance.

REFERENCES

1. Czaja K., Ludwicki J.K., Góralczyk K., Strucinski P.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 769 (1977).
2. Czaja K., Ludwicki J.K., Góralczyk K., Strucinski P.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59, 407 (1977).
3. Tajimi M., Watanabe M., Oki I., Ojima T., Nakamura Y.: Japan. Acta Paediatr. 93, 1098 (2004).
4. Takekuma M., Saito K., Ogawa M., Matumoto R., Kobayashi S.: Chemosphere 54, 127 (2004).
5. Petrik J., Drobná, B., Kočan A., Chovancová, J., Pavúk, M.: Fresen. Environ. Bull. 10, 342 (2001).
6. Chovancová, J., Kočan, A., Jursa, S.: Chemosphere 61, 1305 (2005).
7. Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunström, 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 Persp. 106, 775 (1998).
8. Duarte-Davidson, R., Jones, K.C., Sci. Total Environ. 151, 131 (1994).
9. Patandin S., Dagniele P. C., Mulder P. G. H., Op de Coul E., Van der Veen J. E., Weisglas-Kuperus N., Sauer P. J. J.: Environ. Health Persp. 107, 1 (1999).
10. Van Leeuwen F.X.R., Feely M., Schrenk D., Larsen J.C., Farland W., Younes M.: Chemosphere 40, 1095 (2000).
11. Focant J.-F., Pirrard C., Thielen C., De Pauw E.: Chemosphere 48, 763 (2002).
12. Beck H., Dross A., Mathar W.: Health. Perspect. 102 (Suppl 1), 173 (1994).
13. Wittsiepe J., Fürst P., Schrey P., Lemm F., Kraft M., Eberwein G., Winneke G., Wilhelm M.: Chemosphere 67, S286 (2007).
14. Poled A., Savinova T.N., Becher G., Skaare J.U.: Organohalogen Compounds 66, 2761 (2004).
15. Costopoulou D., Vassiliadou I., Papadopoulos A., Makropoulos V., Leondiadis L.: Chemosphere 65, 1462 (2006).
16. Schumacher M., Kiviranta H., Ruokojäri P., Nadal M., Domingo J. L.: Environment International 35, 607 (2009).
17. Raab U., Schwegler U., Preiss U., Albrecht M., Fromme H.: Int. J. Hyg. Env. Health 210, 341 (2007).

STANOVENIE VYBRANÝCH PERZISTENTNÝCH ORGANICKÝCH POLUTANTOV POMOCOU IZOTOPOVEJ ZRIEĎOVACEJ METÓDY VYUŽÍVAJÚCEJ PLYNOVÚ CHROMATOGRAFIU A VYSOKOROZLIŠOVACIU HMOTNOSTNÚ SPEKTROMETRIU

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

*Oddelenie toxických organických polutantov, Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika
anton.kocan@szu.sk*

Úvod

Medzi perzistentné organické polutanty (POPs) sa podľa Štokholmského dohovoru o POPs¹ zaraďujú polychlórované dibenzo-*p*-dioxíny (PCDD), polychlórované dibenzofurány (PCDF), polychlórované bifenyly (PCB), polybrómované difenylétery (PBDE), polybrómované bifenyly (PBB), pentachlórbenzén (PeCB), hexachlórbenzén (HCB), perfluóroktánsulfónová kyselina (PFOS) a jej soli, perfluóroktánsulfonyl fluorid (PFOS-F) a viaceré organochlórové pesticídy, ako sú izoméry hexachlórcyklohexánu (HCH), skupina DDT, aldrin, dieldrin, endrin, heptachlór, chlórđan, chlórdekon, mirex a toxafén. Tieto látky, ktoré z výrobných procesov alebo následkom intenzívneho používania (okrem PCDD a PCDF) prenikli do životného prostredia, odolávajú rozkladu v životnom prostredí, kumulujú sa v živých organizmoch a potravinovom reťazci a sú toxické pre zvieratá a človeka. Štruktúrne vzorce kongenérovc PCDD, PCDF a PCB s najvyššou tzv. dioxínovou toxicitou sú na obr. 1.

POPs sa vyskytujú vo vzorkách zo životného prostredia, krmivách, potravinách, ako aj v ľudskej populácii vo veľmi nízkych hladinách^{2–7}. Z pohľadu Slovenskej republiky sa pozitívne nálezy týkajú zatiaľ najmä 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF, PCB, vrátane indikátorových PCB (ind-PCB) a dioxínom podobných PCB (dl-PCB), PBDE, HCB, skupiny DDT a HCH^{8–10}. Tieto polutanty sú sprevádzané v matriciach, v ktorých sa stanovujú, obrovským množstvom iných látok, ktoré majú často podobné fyzikálne a chemické vlastnosti, a teda rušia analýzu. Pretože pre viaceré z nich sú určené najvyššie prípustné limity, napr. v potravinách a krmivách, sú požiadavky na kvalitu analytických meraní týchto látok značne prísne^{11,12}. Ich splnenie si vyžaduje náročné analytické postupy založené na použití vysoko citlivej a selektívnej prístrojovej techniky a striktnom dodržiavaní správnej laboratórnej praxe.

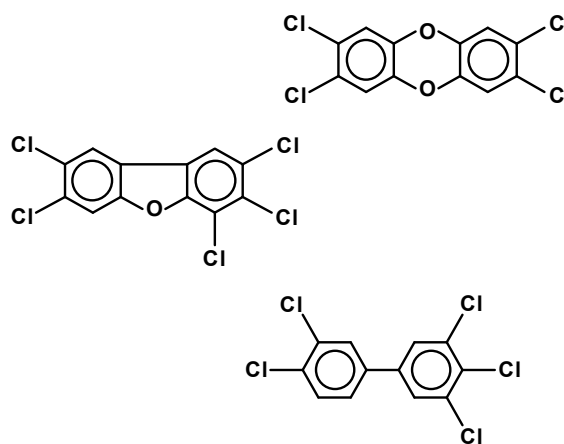
Tento príspevok sa venuje postupom na odbery environmentálnych (ovzdušie, pôda, vodný sediment) a biologických (krmivá, potraviny, krv, materské mlieko) vzoriek, ich spracovaniu a stanoveniu vybraných POPs, konkrétne 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF, dl-PCB a ind-PCB pomocou izotopovej zriedovacej (ID) metódy využívajúcej prepojenie kapilárnej plynovej chromatografie s vysokorozlišovacou hmotnostnou spektrometriou (HRMS) s dvojitou fokusáciou.

Stanovenie PCDD, PCDF a PCB

Odber vzoriek

Prvým nevyhnutným predpokladom získania správneho analytického výsledku je odber vzorky, ktorá bude reprezentatívne charakterizovať odberové miesto tak po kvalitatívnej ako aj kvantitatívnej stránke. Hoci POPs látky sú pomerne stabilné, je potrebné zabezpečiť, aby sa vzorky počas transportu a skladovania nezmenili (chrániť pred svetlom, vysokými teplotami, kontamináciou). Pre viaceré typy odberov existujú normy alebo iné pokyny, ktoré určitým spôsobom štandardizujú získanie vzoriek.

Ak sa odoberá vzorka vonkajšieho ovzdušia, ktorej odber sa vykonáva vysokoobjemovou aparátúrou spravidla 24 h, je dôležité, za akých poveternostných podmienok sa odber vykonáva. Pretože POPs sú v prevažnej miere adsorbované na tuhých časticách vznášajúcich sa v ovzduší, menej veterné a daždivé počasie znižuje koncentráciu čas-



Obr. 1. Štruktúrne vzorce 2,3,7,8-TCDD, ktorý má najvyššiu dioxínovú toxicitu (faktor ekvivalentnej toxicity TEF=1), 2,3,4,7,8-PeCDF (TEF=0,5) a 3,3',4,4',5-PeCB (PCB-126) (TEF=0,1)

tíc v ovzduší a tým aj koncentráciu analytov. Je tiež dôležité, či sa odber vykonáva na náveternej alebo záveternej strane od zdrojov znečistenia, čo sú v prípade PCDD/PCDF najmä spaľovacie a niektoré metalurgické procesy. Pozorovalo sa, že koncentrácie PCDD/PCDF sú vyššie v zimných mesiacoch, keď je vykurovacia sezóna, keďže ich zdrojom je aj spaľovanie uhlia, dreva a rôznych odpadových materiálov. Naopak, v prípade PCB, ktoré sa uvoľňujú do ovzdušia odparovaním z kontaminovanej pôdy a skládok, zvyknú byť koncentrácie v ovzduší vyššie v letných mesiacoch než v zimných. Odberom sa získajú tuhé častice s adsorbovanými analytmi zachytené na sklenenom filtri a analyty zachytené v zátku z polyuretánovej peny, ktoré prešli cez filter buď z dôvodu, že boli v parnej fáze, alebo častice boli tak malé, že prenikli cez filter. Pre správnosť stanovenia je dôležité presné zmeranie objemu vzduchu, ktorý prešiel cez odberové médiá. Tento objem sa prepočítava na referenčné podmienky, ktoré v tomto prípade bývajú 101 325 Pa a 25 °C.

Odber vzoriek pôdy je v prípade PCDD, PCDF a PCB relatívne jednoduchý, pretože tieto látky sa silne adsorbujú na humusovité častice, a tak stačí, ak sa odobere vzorka z pôdnej vrstvy 0 cm až 20 cm. Zvykne sa to realizovať zatĺčením alebo zavítaním kovovej rúrky a následným vytlačením pôdneho stĺpca do zbernej nádoby. Prirodzene, jeden takýto odber nemôže charakterizovať skúmanú lokalitu. Musí sa preto urobiť kompromis a závislosti od plochy lokality vykonať viacero takýchto odberov. Po vysušení v laboratóriu a vytriedení kameňkov, korieňkov a pod. sa po homogenizácii použije na ďalšie spracovanie primeraná časť vzorky.

Odber vzoriek vodného dnového sedimentu sa musí v hlbších vodách vykonávať pomocou špeciálnych zariadení, napr. jadrového vzorkovača (*core sampler*) alebo drapáka, podľa typu sedimentu. Ak je odberová hĺbka malá, je vhodné použiť na odber sedimentu ručnú lopatku. Pretože dnový sediment, sa aktívne preskupuje, napr. po búrkach alebo povodniach a obsah analytov sa mení aj hĺbkou sedimentu, je potrebné, podobne ako v prípade odberov pôdy, vykonať viacero odberov v danej časti vodného telesa, aby sa získala priemerná vzorka.

Na odbery vzoriek krmív a potravín na úradnú kontrolu obsahu PCDD, PCDF a PCB v potravinách a krmivách sú v platnosti nariadenia Komisie (ES) č. 1883/2006 (cit.¹¹) a č. 152/2009 (cit.¹²). Základnou požiadavkou tak ako na odber hociktorého média je reprezentatívnosť vzorky. V prípade potravín a krmív je to odber na rôznych miestach, v množstvách a počte, ktoré sú dané hmotnosťou alebo počtom kusov v kontrolovanej zásilke. Napríklad, odber vzorky rýb zo zásilky, ktorá má hmotnosť viac než 500 kg a obsahuje ryby približne rovnakej veľkosti a hmotnosti, sa vykonáva takto: Odobere sa 10 prírastkových vzoriek, t. j. 10 rýb (spolu musí byť hmotnosť súhrnnej vzorky najmenej 1 kg). Ak je hmotnosť jednej ryby < 1 kg, odobere sa 10 kusov celých rýb. Avšak, ak by tým hmotnosť súhrnnej vzorky presiahla 3 kg, stačí odobrať z každej ryby iba najmenej 100 g z jej strednej časti, t. j. jedlej časti v oblasti medzi žiabrovými otvo-

rmi a konečným. Ak je hmotnosť ryby medzi 1 kg až 6 kg, tak sa odobere z každej z 10 rýb plátok od chrbtovej kosti a brušnej časti v strednej časti ryby. Napríklad, odber vzorky z voľne uloženého (nebaleného) krmiva, ktorého hmotnosť nepresahuje 2,5 t sa vykonáva takto: Kontrolovaná oblasť sa imaginárne rozdelí na 7 sektorov a z každého sa odobere, napr. vzorkovacou rúrkou, najmenej 1 vzorka. Čiastkové vzorky sa starostlivo zmiešajú (prípadné hrudky sa roztľú), čím sa vytvorí súhrnná vzorka. Ak je hmotnosť kontrolovaného krmiva medzi 1–10 t, tak sa vytvorí 2 súhrnné vzorky. Hmotnosť každej súhrnnej vzorky musí byť najmenej 2 kg. V prípade potreby sa hmotnosť vzorky zredukuje mechanickým alebo automatickým deličom alebo kvartáciou na hmotnosť najmenej 500 g. Tieto vzorky sa zabalia, dopravujú a skladujú tak, aby nedošlo k zmene zloženia vzorky, jej kontaminácii alebo znehodnoteniu.

Do akej miery sú ľudia exponovaní PCDD, PCDF, PCB, či organochlórovým pesticídom sa najčastejšie zisťuje v krvnom sére a v materskom mlieku. Je potrebné odobrať niekoľko mL krvi (v prípade stanovenia PCDD a PCDF by tento objem mal byť niekoľko desiatok mL) do injekčných striekačiek bez prídavku antikoagulátora, čím sa po zrazení krvi získa sérum. Čo sa týka materského mlieka, postačuje 100 mL. Sérum a mlieko sa pred analýzou skladujú zmrazené v sklenených nádobách s teflonovým uzáverom.

Spracovanie vzoriek

Predúprava

Pod predúpravou sa myslí úprava vzoriek pred extrakciou. Spočíva napr. v drvení (pôda, sediment), mletí – mixovaní (niektoré potraviny a krmivá), sušení buď na vzduchu, v sušiarňach alebo lyofilizáciou, homogenizácii a odvážení alikvotnej časti na extrakciu, ktorá je ďalším krokom pri spracovaní vzorky. Často sa vzorka pred extrakciou zmieša so sušidlom, napr. bezvodým Na₂SO₄, silikagélom alebo hydromatrixom (vyčistená a preosiata rozsievková zemina), ktoré má za úlohu nielen vzorku vysušiť ale aj uľahčiť prietok extrahovadla cez stúpec. Pretože v prípade stanovenia PCDD, PCDF a PCB pomocou MS sa používa metóda izotopového zriedenia, je potrebné niekoľko hodín pred extrakciou pridať ku vzorke známe množstvo ¹³C₁₂-označených extrakčných štandardov (bližšie o tejto metóde ďalej).

Extrakcia

Látky typu POPs sú lipofilné, t. j. sú podstatne lepšie rozpustné v menej polárnych rozpúšťadlách, ako je hexán, benzén, toluén, dichlórmetán, a pod. ako vo vode a iných polárnych rozpúšťadlách. Preto sa ako extrahovadlá používajú práve tieto menej polárne organické rozpúšťadlá, buď samostatne alebo v zmesiach. Pre PCDD a PCDF je najlepším extrahovadlom benzén pre jeho štruktúrnu podobnosť s extrahovanou látkou, avšak z dôvodu karcinogenity benzénu sa nahrádza toluénom, prípadne zmesou toluénu a etanolu. Pretože POPs sa dobre rozpúšťajú

v živočíšnych tukoch a rastlinných/minerálnych olejoch, a často sa ich obsah vzťahuje na hmotnosť lipidov, požaduje sa v týchto prípadoch kvantitatívna extrakcia lipidov zo vzorky. Práve kvantitatívna izolácia lipidov môže byť významný zdroj chyby pri stanovení. Sú totiž vzorky, ktoré obsahujú aj lipidy pomerne silne viazané k matici, napr. fosfolipidy sú súčasťou bunkových membrán. V prípade stanovovania POPs v rybách, v ktorých fosfolipidy tvoria významnú časť celkových lipidov, býva práve nedostatočná extrakcia lipidickej časti fosfolipidov zdrojom vysokých chýb stanovenia. Preto je aj najvyšší prípustný obsah toxického ekvivalentu (TEQ) z PCDD, PCDF a dl-PCB v rybách daný nariadením Komisie (ES) č. 1881/2006 vyjadrovaný na čerstvú hmotnosť, v tomto prípade jedlú časť ryby.

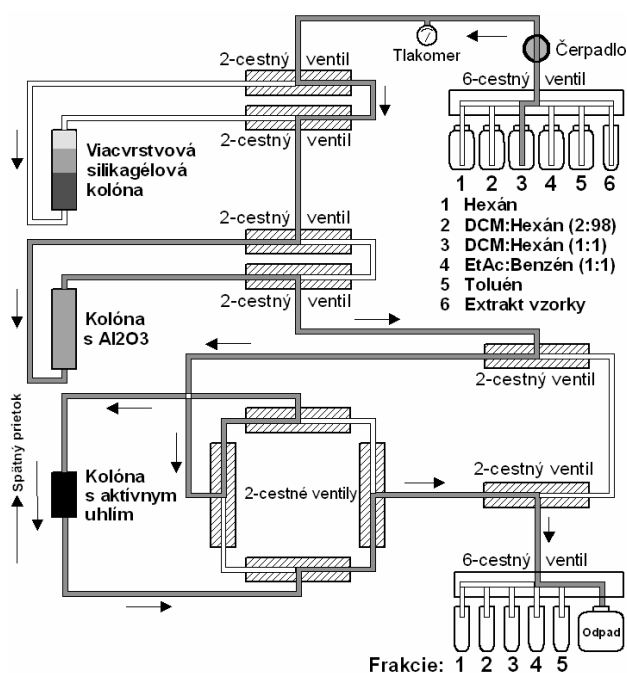
Klasickým spôsobom extrakcie je extrakcia podľa Soxhleta, ktorá je založená na opakovanej extrakcii čistým rozpúšťadlom alebo azeotropickou zmesou rozpúšťadiel pri teplote blízkej k teplote varu extrahovadla. Jej nevýhodou je dlhé trvanie extrakcie – bežne je to 8 až 24 h. Pretože extrahovadlo preteká stĺpcom vzorky v patrône iba pri hydrostatickom tlaku, môže v prípade vzoriek zložených z jemných častíc dôjsť k minimalizovaniu prietoku, a tým k zníženiu účinnosti extrakcie. Vyčítá sa jej aj vysoká spotreba rozpúšťadiel. Výhodou je, že extrakcia sa vykonáva v sklenených zariadeniach, a tak môže byť proces extrakcie pod vizuálnou kontrolou a aparatúra sa dá jednoducho rozobrať a vyčistiť, čo je pri ultrastopovej analýze veľmi dôležité. Zdlhavosť extrakcie sa dá kompenzovať súčasným použitím viacerých extraktorov. Najväčším nedostatkom tzv. zrýchlenej rozpúšťadlovej extrakcie (ASE) alebo tlakovej kvapalinovej/rozpúšťadlovej extrakcie (PLE, PSE) je krížová kontaminácia. Prejavuje sa tak, že po extrakcii vzorky, ktorá má vysoký obsah analytov, dochádza ku kontaminácii nasledujúcej vzorky najmä, ak je obsah analytov v tejto vzorke výrazne nižší než v predchádzajúcej. Medzi výhody patrí podstatné skrátenie doby extrakcie na niekoľko desiatok minút, jednoduchá možnosť použitia zmesi rozpúšťadiel (v prípade Soxhletovej extrakcie sa musí voliť azeotropická zmes) a zníženie objemu extrahovadla. Ak je však potrebné kvôli potlačeniu krížovej kontaminácie zariadenie zrýchlenej extrakcie a extrakčné patróny výdatne prepláchnuť, výhoda menšieho objemu rozpúšťadiel sa stráca.

Objem extrakčných patrón pre ASE/PLE sa zvykne pohybovať od 10 ml až do 250 ml. Aký objem patróny sa zvolí závisí od typu vzorky a predpokladaného obsahu analytov, ako aj množstva koextrahovaných a najmä balastných látok. Dôležitá je aj priepustnosť stĺpca pre extrahovadlo. Napr. na vysušenú trávu sa použije patróna s vyšším objemom, pretože táto matica nepredstavuje výraznejší odpor pre prietok extrahovadla a obsah analytov býva nízky, takže je potrebné zvoliť vyššiu navážku. Hoci sa používa tlak až 10 MPa, niektoré matrice predstavujú príliš veľký odpor pre pretlačenie extrahovadla. Príkladom je lyofilizovaný jogurt a iné bielkovinové produkty, najmä ak sa použije vyššia extrakčná teplota a dôjde k zrazeniu bielkovín. Problémy spôsobujú aj vzorky hovädzieho ale-

bo jelenieho mäsa s vyšším obsahom loja, pretože tento rýchle tuhnúci tuk upcháva rúrky a ventily malých priemerov v extraktore, ktoré spravidla nie sú vyhrievané. Takisto extrakcia lyofilizovaných rýb s vysokým obsahom tuku je problémová kvôli upchávaniu odtokovej rúrky. Na extrakciu POPs sa používa najmä toluén alebo zmes toluénu s etanolom (9:1, v/v), hexán alebo hexán v zmesi s acetónom (4:1, v/v) alebo dichlórmetánom (1:1, v/v). Definované vyextrahovanie tukovej zložky nie je až také jednoduché, ako by sa mohlo zdať. Napríklad, extrakcia lipidov z rýb zmesou *n*-hexán : 2-propanol (65:35, v/v) pri 115 °C v 1. cykle a zmesou *n*-hexán : dietyléter (9:1, v/v) v 2. cykle poskytla najlepšiu zhodu s modifikovanou Jensenovou metódou^{13,14}, resp. s klasickými referenčnými metódami podľa Folcha¹⁵ alebo Bligh-Dyera¹⁶. Najmä pre mliečne lyofilizované vzorky (mlieko, jogurt, smotana) sa osvedčila zmes hexán : dichlórmetán : metanol v rôznych pomeroch, pretože zistená tukovosť sa zhodovala s tukovosťou stanovenou referenčnou Röse-Gottliebovou metódou. Treba si uvedomiť, že tlaková extrakcia, najmä ak sa používa vyššia teplota, je v podstate autokláv, v ktorom sa urýchlia chemické reakcie. Napríklad, z chlórovaných fenolov alebo difenyléterov môžu vznikať PCDD a PCDF, a tak spôsobovať falošne pozitívne výsledky. Pretože tlak nie je vhodné znižovať kvôli lepšej účinnosti extrakcie, odporúča sa voliť čo možno najnižšiu teplotu extrakcie. Bežne postačujú dva extrakčné cykly. Žiadna extrakcia sa samozrejme nevyžaduje, ak sa analyzuje 100% rastlinný alebo rybí olej. K navážke takéhoto oleja sa iba pridajú príslušné extrakčné štandardy a pristúpi sa k čistiacim krokom.

Čistenie extraktu

Extrakt, nezávisle od toho či pochádza zo Soxhletovej extrakcie alebo z ASE/PLE/PSE, obsahuje okrem analytov aj veľký počet ďalších látok prítomných vo vysokých koncentráciách, ktoré rušia analytické stanovenie. Z pohľadu stanovenia PCDD, PCDF a PCB medzi ne môžu patriť lipidy, minerálne oleje, farbivá, sírne zlúčeniny, chlórované fenoly a difenylétery, atď. Čistenie vzorky má v podstate dva hlavné účely. V prvom kroku sa treba zbaviť balastných látok, ktoré sa nachádzajú v extrakte vo veľkých množstvách (lipidy, farbivá, sírne látky) a v druhom kroku sa musia odstrániť zlúčeniny, ktoré rušia stanovenie tým, že napr. eluujú z GC kolóny v blízkosti analytov alebo v hmotnostnom spektrometre produkujú ióny s hmotnosťami blízkymi iónom analytov. Na odstránenie balastných látok v 1. kroku sa využíva najmä gélová permeačná chromatografia alebo rozklad koncentrovanou H₂SO₄. Zmydelňovanie roztokmi alkalických hydroxidov sa neodporúča, pretože dochádza k dechlorácii najmä vyššie chlórovaných kongenéro. GPC dokáže odseparovať látky lipidickej povahy od látok typu POPs na základe rozdielných objemov molekúl. Výhodou je, že to nie je deštruktívna metóda, takže nerozkladá niektoré POPs zlúčeniny, ktoré sa chemicky menia, ak sa na ne pôsobí s H₂SO₄, napr. polycyklické aromatické uhľovodíky a niektoré organochlórové pesticídy (dieldrin, endrin).



Obr. 2. Schematický diagram automatizovaného zariadenia od Fluid Management Systems na čistenie a frakcionáciu vzoriek v kroku, keď PCDD, PCDF a PCB elujú z Al_2O_3 kolóny s CH_2Cl_2 : *n*-hexán (1:1, v/v) a prenášajú sa na kolónu s aktívnym uhlím

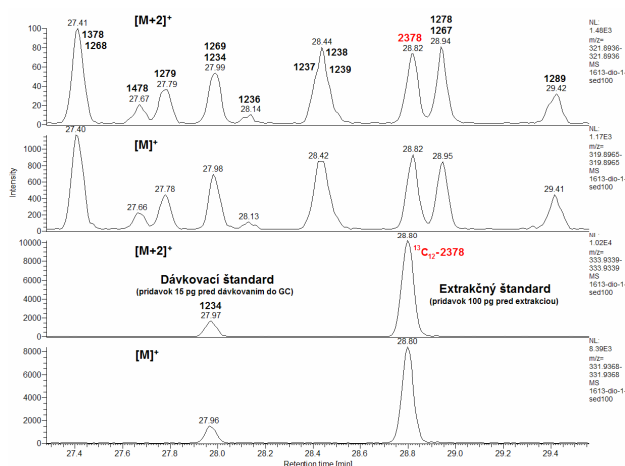
Odstránenie lipidov však nie je dokonalé a aj tak sa musí GPC eluát dočistiť od zvyškov lipidov. V prípade analýzy PCDD, PCDF a PCB však konc. H_2SO_4 nemá žiaden deštruktívny účinok na tieto látky. Naopak, už v tomto 1. čistiacom kroku odstráni, popri rozklade lipidov, aj koextrakty, ktoré podliehajú dehydratácii, oxidácii, sulfonácii alebo sú zásaditej povahy a tým prebehnú acidobázické reakcie. Pretože priame pôsobenie na extrakt konc. H_2SO_4 nie je bezproblémové, v praxi sa to realizuje tak, že sa pripraví homogénna zmes konc. H_2SO_4 so silikagélom (najčastejšie 44 hm. %) a extrakt sa preleje cez túto zmes naplnenú v kolóne. Takto prečistený extrakt, ktorý je už bezfarebný a zbavený triglyceridových lipidov sa musí podrobiť ďalším čistiacim krokom. V súčasnosti sú na výber dva spôsoby: Manuálny spôsob, ktorý je zdĺhavejší ale lacnejší a automatizovaný spôsob (obr. 2), ktorý urýchlil analýzu, ale si vyžaduje vyššie náklady z dôvodu používania jednorazových kolón a zvyčajne aj vyššie objemy rozpúšťadiel. Z dôvodu, že automatizované zariadenie je plné ventilov a rúrok, je tu väčšie riziko krížovej kontaminácie, podobne ako v prípade ASE/PLE/PSE. Tak manuálny ako aj automatizovaný spôsob majú ale rovnaký princíp. Používa sa kombinovaná silikagélková kolóna obsahujúca vrstvy silikagél/ H_2SO_4 , silikagél/ KOH , prípadne silikagél/ AgNO_3 . Tieto vrstvy v kolóne odvodené od publikácie Smitha a spol.¹⁷ odstránia zvyšky triglyceridových lipidov, zlúčeniny kyslej a zásaditej povahy a alifatické

sulfidy a chloridy. V eluáte zostávajú iba neutrálne zlúčeniny, mnohé z nich však rušia GC-HRMS stanovenie. Preto sa pri stanovení PCDD, PCDF a dl-PCB aplikujú ešte ďalšie dva čistiace kroky, a to kolóna plnená s Al_2O_3 a kolóna obsahujúca aktívne uhlie na neaktívnom nosiči. Kolóna s Al_2O_3 oddelí od analytov zvyšky látok lipidickej povahy a niektoré neutrálne zlúčeniny, napr. chlórované difenylétery, ktoré môžu konvertovať v horúcom dávkovacom priestore plynového chromatografu na PCDF. Pomocou tejto kolóny je možné oddeliť aj PCB od PCDD/PCDF. Pretože PCDD a PCDF a časť dl-PCB, konkrétne 4 kongenéry PCB, ktorých chlórsubstituent nie je ani v jednej zo štyroch *orto* polôh, majú svoje benzénové jadrá v približne v jednej rovine, t. j. sú koplanárne, vykazujú tieto zlúčeniny oveľa väčšiu retenciu na kolóne s aktívnym uhlím než PCB nižšou koplanaritou, t. j. mono*orto*-a multi*orto*-substituované kongenéry. Týmto spôsobom sa dajú od seba oddeliť ind-PCB, dl-PCB a PCDD/PCDF. Investícia do automatizovaného systému a použitie jednorazových kolón síce zvýšia náklady na analýzu, avšak výrazne skráti čas potrebný na čistenie vzoriek z niekoľkých dní na niekoľko hodín. Eluáty z posledných kolón sa po odparení rozpúšťadla prenesú do vialiek, z ktorých sa budú dávkovať do GC. Pridá sa tzv. dávkovací štandard, ktorým je ^{13}C -označený kongenér (príp. viac kongenérov) PCDD, PCDF alebo PCB. V izotopovej zriedovacej metóde má dávkovací štandard úlohu pri zisťovaní výťažnosti pridaných extrakčných štandardov, ktorá je jedným z parametrov kvality stanovenia (bližšie ďalej).

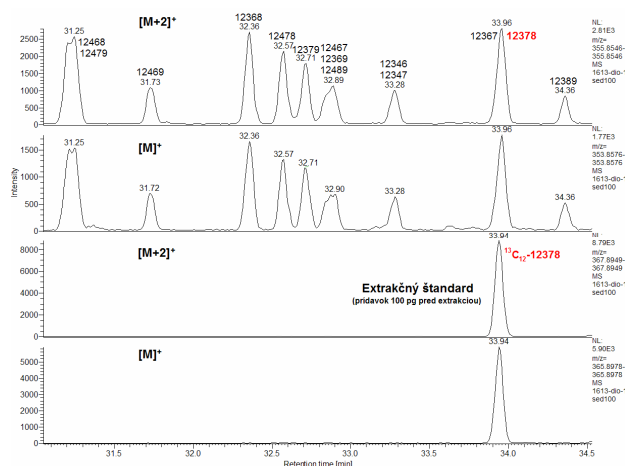
Stanovenie pomocou GC-HRMS

GC separácia

Úlohou GC separácie pri stanovení PCDD, PCDF a PCB je odseparovanie siedmich 2,3,7,8-substituovaných PCDD od ostatných kongenérov PCDD, desiatich 2,3,7,8-substituovaných PCDF od ostatných kongenérov PCDF, ôsmich mono*orto*-substituovaných PCB, štyroch non*orto*-substituovaných PCB a šiestich ind-PCB od ostatných kongenérov PCB. Zatiaľ nie je komerčne dostupná kapilárna kolóna, ktoré by dokázala oddeliť vyššie uvedených 17 kongenérov PCDD a PCDF. Preto je potrebné najmä vzorky, ktoré nepochádzajú z teplokrvných živočíchov, analyzovať na dvoch kolónach s rôznou polaritou stacionárnej fázy, napr. mierne polárnu $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ kolónu Rtx-Dioxin 2 a polárnu $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ kolónu Rtx-2330 (90 % biskyanopropyl / 10 % fenylkyanopropyl polysiloxán). Až 13 zo sedemástich 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF eluje ako samostatný pík, ak sa použije kolóna Rtx-Dioxin 2. Dostatočne sa nedelí: 1,2,3,7,8-PeCDD, ktorý eluje spolu s 1,2,3,6,7-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF eluje s 1,2,3,4,9-PeCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF eluje s 1,2,3,6,8,9-HxCDF a 1,2,3,7,8,9-HxCDF s 1,2,3,4,8,9-HxCDF. Tieto štyri nedostatočne separované kongenéry však elujú ako samostatné piky na kolóne Rtx-2330. Ukážky separácie TCDD a PCDD izomérov na kolóne Rtx-Dioxin 2 sú na obr. 3 a 4.



Obr. 3. GC-HRMS chromatogram časti homologovej skupiny tetrachlórdibenzo-*p*-dioxínov prítomných vo vzorke dnového sedimentu; $R_{MS}=10\ 000$; Rtx-Dioxin 2 (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm, 120 °C (1,5 min) / 30 °C/min / 200 °C / 3 °C/min / 320 °C, 1 ml min⁻¹ He; Toxický 2,3,7,8-TCDD eluje ako samostatný pik



Obr. 4. GC-HRMS chromatogram pentachlórdibenzo-*p*-dioxínov prítomných vo vzorke dnového sedimentu; $R_{MS}=10\ 000$; GC kolóna a podmienky rovnaké ako na obr. 3. Keďže toxický 1,2,3,7,8-PeCDD eluje spolu s netoxickým 1,2,3,6,7-PeCDD, je na jeho stanovenie potrebné použiť kolónu napr. Rtx-2330

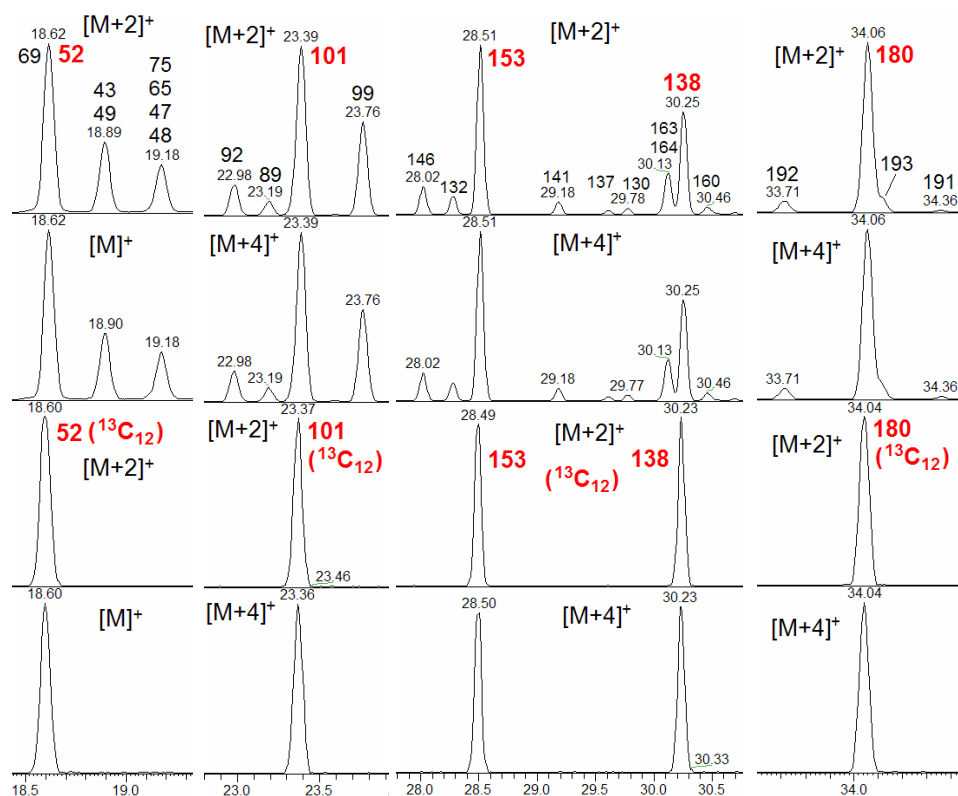
Na separáciu ind-PCB je vhodné použiť 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm kolónu SGE-HT8 (8% fenyl polykarboran-siloxán). Ukážka týchto separácií je na obr. 5. Niektoré zo šiestich ind-PCB síce neeluujú ako samostatné píky, konkrétne PCB-28 eluje spolu s PCB-53, PCB-52 s PCB-69, PCB-101 s PCB-150, PCB-138 eluje samostatne, PCB-153 s PCB-122 a PCB-180 s PCB-193. Avšak ak sa použije na detekciu MS, PCB-28 nie je rušený, pretože je to trichlórovaný, kým PCB-53 je tetrachlórovaný kongenér. PCB-52 síce obsahuje 4 Cl rovnako ako PCB-69, a teda nie je rozlíšiteľný MS, ale PCB-69 sa nachádza v PCB produktoch (Aroclor, Delor, atď.) v minimálnych koncentráciách, a teda nie je predpoklad intenzívnejšieho výskytu ani v environmentálnych a potravinových vzorkách. PCB-101 eluje spolu s PCB-150, ale MS detektor ich rozlíši, pretože PCB-101 je pentachlórovaný a PCB-150 hexachlórovaný kongenér. Podobne, PCB-153, ktorý eluje spolu s PCB-122, sa dá odlíšiť, pretože jeho molekula obsahuje 6 Cl, kým PCB-122 iba 5 Cl. PCB-180 je heptachlórovaný izomér rovnako ako nedostatočne separovaný PCB-193, avšak výskyt PCB-193 je podstatne nižší než PCB-180.

Princíp izotopovej zriedovacej metódy^{18,19}

Veľkou výhodou použitia hmotnostnej spektrometrie je možnosť aplikovať metódu izotopového zriedenia. V prípade analýzy PCDD, PCDF a PCB sa používajú výhradne neaktívne ¹³C₁₂-označené štandardné látky, t. j. všetkých 12 uhlíkov v molekulách týchto zlúčenín tvorí uhlík s nukleónovým číslom 13. V prirodzene sa vyskytujúcich zlúčeninách uhlík tvorí 98,89 % uhlíka ¹²C a 1,11 % uhlíka ¹³C. To znamená, že relatívna molekulová hmotnosť ¹³C₁₂-označených PCDD, PCDF a PCB je približne

o 12 hmotnostných jednotiek (amu) vyššia než hmotnosť prirodzene sa vyskytujúcich zlúčenín. To je v podstate jediný rozdiel medzi prirodzenými zlúčeninami a ich ¹³C₁₂-označenými ekvivalentmi, pretože ich chemické a fyzikálno-chemické vlastnosti sú prakticky totožné, t. zn., že sa tieto skupiny látok správajú rovnako v procese spracovania vzorky (rovnaká rozpustnosť v rozpúšťadlách, inertnosť voči H₂SO₄, rovnaké elučné objemy z adsorpčných kolón) a GC separácii. Avšak neoznačené a označené PCDD, PCDF a PCB sa dajú bezproblémovo rozlíšiť hmotnostnou spektrometriou. Napríklad, relatívna hmotnosť najintenzívnejšieho molekulového iónu [M+2]⁺ ¹²C₁₂-TCDD je 321,8936 a toho istého iónu v ¹³C₁₂-TCDD je 333,9339.

ID metóda si vyžaduje tri typy roztokov štandardných látok: (1) Kalibračné roztoky (zvykne ich byť päť a koncentrácie štandardných látok sa musia nachádzať v lineárnej oblasti odozvy MS násobiča), ktoré obsahujú všetky analyty, t. j. v prípade PCDD a PCDF sedemnášť 2,3,7,8-substituovaných kongenérov, v prípade dl-PCB 12 kongenérov a v prípade ind-PCB 6 kongenérov, ako aj ich ¹³C₁₂-ekvivalenty, ktoré sú súčasťou extrakčných a dávkovacích štandardov. Z týchto meraní sa vypočítajú relatívne odozvové faktory (RRF) pre každý analyt a jeho extrakčný ekvivalent i : $RRF_i = A_{i,12} / A_{i,13} \times m_{i,13} / m_{i,12}$, kde A je intenzita signálu (plocha píku) a m je hmotnosť analytu a jeho ¹³C₁₂-ekvivalentu v kalibračných roztokoch. Pretože sa získa pre každý analyt toľko RRF, koľko je kalibračných roztokov, na ďalšie vyhodnocovacie výpočty sa použije ich aritmetický priemer; Takisto sa vypočítajú RRF pre extrakčné štandardy a použitý dávkovací štandard. (2) Extrakčný štandard, ktorý obsahuje známe presné množstvá ¹³C₁₂-označených ekvivalentov podľa možnosti



Obr. 5. HRGC separácie šiestich indikátorových kongenénov PCB vo vzorke rybieho oleja na kolóne SGE-HT8 (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm, 120 °C (1,5 min) / 30 °C/min / 200 °C / 3 °C/min / 320 °C, 1 ml min⁻¹ He; R_{MS}=10 000

všetkých stanovovaných kongenénov PCDD, PCDF a PCB. V prípade, že pre niektorý analyt nie je k dispozícii jeho ¹³C₁₂-ekvivalent, ale koncentrácia sa vyhodnocuje na niektorý iný ¹³C₁₂-štandard, už to nie je metóda izotopového zried'ovania ale vnútorného štandardu; (3) Dávkovací štandard, ktorý obsahuje známe množstvo jedného alebo niekoľkých ¹³C₁₂-označených kongenénov zo skupiny PCDD, PCDF alebo PCB.

Extrakčné štandardy sa pridávajú do vzorky spravidla pred extrakčným krokom. Ak sa výsledok stanovenia vzťahuje na tukový podiel, je možné pridať tieto štandardy až do navážky vyextrahovaného tuku pred čistiacim procesom. Ak sa analyzujú krmivá, ktoré obsahujú menej než 10 % tuku, extrakčné štandardy sa musia pridať do vzorky pred jej extrakciou. V prípade, že sa na analýzu použije HRMS, zvykne sa pridávať 50 až 200 pg každého z ¹³C₁₂-ekvivalentov. Odporúča sa, aby sa extrakčný štandard pridal do vzorky v extrakčnej patrône najmenej 24 h pred extrakciou. Je to z toho dôvodu, aby tieto pridávané látky mali dosť času na distribúciu vo vzorke, a tak sa priblížili k stavu, v akom sa vo vzorke nachádzajú analyty. Hmotnostný zlomok či koncentrácia kongenéru *i* sa potom vypočíta: $c_i = A_{i,12C} / A_{i,13C} \times m_{i,13C} / RRF_i \times 1 / N$, kde *A* sú plochy pík, *m* je hmotnosť pridaného extrakčného štandardu,

RRF je priemerný relatívny faktor stanovovaného analytu a *N* je navážka vzorky. Z dôvodu plnenia požiadaviek na kvalitu analýzy je potrebné zistiť aj výťažnosti *R* prídavných ¹³C-extrakčných štandardov. Tieto výťažnosti totiž nesmú byť nižšie ako 60 % (prípadne 50 % pri stanovení ind-PCB) a vyššie než 120 %. Pretože finálny objem vzorky pred dávkovaním do GC je spravidla veľmi malý (okolo 10 až 50 μl), tento objem potrebný k výpočtu *R* sa zisťuje nepriamo cez prídavok tzv. dávkovacieho štandardu (štandardov) do vialky, z ktorej sa vzorka dávkuje do GC. Výťažnosť extrakčného štandardu *i* sa potom vypočíta: $R_{i,E\check{S}} = A_{i,E\check{S}} / A_{i,D\check{S}} \times m_{i,D\check{S}} / RRF_i \times 100 / m_{i,E\check{S}}$, kde *A* sú plochy píkov príslušného extrakčného (EŠ) a dávkovacieho (DŠ) štandardu, *m* sú hmotnosti pridaného extrakčného a dávkovacieho štandardu a *RRF* je odozovový faktor extrakčného štandardu k dávkovaciemu štandardu.

Veľkou prednosťou izotopovej zried'ovacej metódy je potlačenie viacerých možných zdrojov chýb vznikajúcich v priebehu analýzy. Napríklad, chyby spôsobené stratami analytov v procese spracovania vzorky, či už sú spôsobené nekvantitatívnou elúciou z kolón, stratami pri koncentrovaní a prenose extraktu a eluátov, sú rovnaké ako ich ¹³C-ekvivalentov, takže sa kompenzujú; Podobne, nie je dôležité, či je objem dávkovaný do GC presný alebo či sa pre-

vádzkový stav analytických prístrojov mení v priebehu analýz. Napríklad, ak sa zníži citlivosť, poklesne rovnakým pomerom plocha GC píkov ^{12}C -analytov ako aj ^{13}C -extrakčných štandardov. Kvalitné vyčistenie vzorky je však dôležité, pretože, ak v rovnakom čase ako analyt a jeho ^{13}C -ekvivalent eluuje aj nejaká látka prítomná pri vysokej koncentrácii, dochádza k zníženiu MS odozvy, a tým aj k zníženiu citlivosti MS detekcie.

Kvantifikácia pomocou GC-HRMS

Súčasná HRMS s dvojistou fokusáciou (obsahuje magnetický a elektrostatický analyzátor) s elektrónovou ionizáciou a detekciou pozitívnych iónov používaná na dôkaz a stanovenie PCDD, PCDF a PCB musí byť nastavená na rozlíšenie $R_{\text{MS}} \geq 10\,000$ pri 10% údolí medzi dvomi susediacimi MS píkmami. To znamená, že napr. pri nominálnej hmotnosti 320 sa pri $R_{\text{MS}}=10\,000$ ($\Delta M = M/R_{\text{MS}}=320/10000=0,032$) rozlíši molekulový ión TCDD s m/z 319,894 od iónov, ktorých m/z je $\leq 319,862$ alebo $\geq 319,926$. Je teda zrejme, že selektivita HRMS je podstatne vyššia než selektivita nízkorozlišovacej MS (LRMS). Môžu sa však vyskytnúť prípady, keď nepostačuje ani rozlišovacia schopnosť HRMS nastavená na požadovaných 10 000. Napríklad, pentachlórovaný *nonorto*-substituovaný PCB-126 eluuje z GC kolóny v oblasti, kde už eluujú prvé z heptachlórovaných *multiorto*-substituovaných PCB. Kvantifikačný ión $[M+2]^+$ pre pentaCB má relatívnu hmotnosť 325,8804, avšak z heptaCB vzniká v iónovom zdroji pomerne intenzívny fragment $[M+4-2\text{Cl}]^+$, ktorého relatívna hmotnosť je 325,8618. Aby sa tieto dva ióny dali rozlíšiť za podmienky 10% údolia, je potrebná $R_{\text{MS}}=M/\Delta M=326/(325,8804-325,8616)=17527$. Vyvarovať sa tohto rušenia je však možné výberom takej GC kolóny, z ktorej PCB-126 eluuje ako samostatný pik alebo do čistiaceho postupu zaradiť krok, v ktorom sa *nonorto*-substituované PCB oddelia od *multiorto*-substituovaných PCB (napr. kolóna s Al_2O_3 alebo aktívnym uhlím).

Ďalšou výhodou HRMS voči LRMS je výrazne vyššia citlivosť HRMS, pretože v dôsledku vyššej selektivity klesne úroveň chemického šumu, a tým sa zvýši pomer signál/šum (S/N). Výsledkom je, že HRMS dokáže detegovať podstatne nižšie množstvá látok než LRMS. Pri optimálne nastavenom HRMS prístroji modernej konštrukcie, rozlišovacej schopnosti 10 000 a vhodných GC parametroch poskytuje už 1 fg 2,3,7,8-TCDD kvantifikovateľný signál ($S/N > 10$). Samozrejme, chemický šum sa výrazne zvyšuje v prípade analýzy reálnych vzoriek, ale aj tak 20 fg až 50 fg prítomných v dávkovanom objeme poskytuje kvantifikovateľný signál.

Základným predpokladom HRMS prístroja pracujúcom vo vysokom rozlíšení v dynamickom spojení s GC je, že pri každom meracom cykle musí byť urýchľovacie napätie U_a nastavené tak, aby snímanie signálu prebiehalo v maximách MS píkov sledovaných iónov. Realizuje sa to relatívne jednoducho. Počas celej GC/HRMS analýzy vstupuje do iónového zdroja aj stabilný tok tzv. referenčnej látky, napr. perfluórtributylamínu (PFTBA, FC43)

alebo perfluórkerozínu (PKF). Tieto látky poskytujú hmotnostné fragmenty, ktoré sú rovnomerne rozložené po celom ich hmotnostnom spektre. Zo spektra použitej referenčnej látky sa vyberú vhodné dva fragmenty pre každú skupinu (okno, sekciu) snímaných iónov. Hmotnosť prvého fragmentu v skupine, tzv. „uzamykacieho“ iónu (lock mass), je z oblasti sledovaných iónov analytov s najnižším m/z . Naopak, hmotnosť druhého fragmentu, tzv. „kalibračného“ iónu (calibration mass), je z oblasti iónov, ktorých m/z je najvyššia v skupine. HRMS merania potom fungujú v tzv. „lock“ móde, čo znamená, že pre snímaním iónov analytov v určitom okne sa zmenou intenzity magnetického poľa nastaví prístroj na snímanie m/z tesne pred najnižšie m/z v danej skupine. Platí nepriama úmera, že znižovaním U_a sa zvyšuje m/z iónov, ktoré preletia celým MS a dopadnú na detekčné zariadenie hmotnostného spektrometra a naopak. Prístroj najprv preskenuje malou zmenou U_a oblasť, kde sa má nachádzať uzamykací m/z a signálu s najvyššou intenzitou v tejto oblasti pridelí hodnotu U_a . Podobným spôsobom sa pridelí hodnotu U_a aj kalibračnému m/z . Z takto získanej rovnice priamky, v ktorej nezávisle premenné predstavujú hodnoty m/z a závisle premenné hodnoty U_a , prístroj vypočíta a nastaví U_a pre m/z iónov zlúčenín sledovaných v danej skupine. Rovnica priamky sa koriguje v každom ďalšom skenovanom cykle. Tento spôsob zabezpečí, že sa v každom cykle (obvykle každú $\frac{1}{2}$ s) sa kompenzujú prípadné zmeny stavu prístroja spôsobené znečistením iónového zdroja, kolísaním napätia, teploty magnetu a elektronických súčiastok a podob.

Všeobecne platí, že čím vyšší je čas snímania iónu, tým vyšší, t. j. priaznivejší je pomer S/N. Veľkosť tohto času závisí od času trvania skenovacieho cyklu. Maximálny čas trvania cyklu je však daný minimálnym počtom cyklov (odporúča sa najmenej 10) na chromatografický pik, aby sa neprejavila zvýšená chyba pri integrácii píku. Druhým parametrom, ktorý ovplyvňuje veľkosť času snímania iónu je počet iónov snímaných v danej skupine – čím viac iónov tým menší je čas snímania. V prípade stanovenia PCDD, PCDF a PCB metódou ID HRMS musí byť v skupine minimálne 6 iónov. Napríklad, v prípade stanovenia TCDD sú to tieto ióny: $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}^{19}\text{F}_{12}$ (313,9839) ako uzamykací ión z PFTBA, $^{12}\text{C}_8^{14}\text{N}^{19}\text{F}_{14}$ (375,9807) ako kalibračný ión z PFTBA, M^+ (313,8965) pre $^{12}\text{C}_{12}$ -TCDD, $[M+2]^+$ (321,8936) pre $^{12}\text{C}_{12}$ -TCDD, M^+ (331,9368) pre $^{13}\text{C}_{12}$ -TCDD a $[M+2]^+$ (333,9339) pre $^{13}\text{C}_{12}$ -TCDD. V prípade, že sa musia snímať aj ióny TCDF, pretože eluujú v približne rovnakom čase ako TCDD, pribudnú do tejto skupiny ešte 4 ióny pre TCDF.

Analýza pomocou GC-HRMS sa delí na kvalitatívnu a kvantitatívnu časť. Prítomnosť určitého kongeneru je potvrdená, ak rozdiel medzi retenčným časom analytu a jeho ^{13}C -ekvivalentu nie je väčší než 2 s a odchýlka plôch GC pík meraného kvantifikačného iónu a dôkazového iónu nie je väčšia než $\pm 15\%$ od teoretického pomeru sledovaných izotopických iónov. V prípade PCDD, PCDF a PCB kongenerov sa ako kvantifikačný ión vyberá vždy najintenzívnejší ión z molekulového klastra,

tak pre ^{12}C -analyty ako aj ^{13}C -ekvivalenty. Napr. pre $^{12}\text{C}_{12}$ -TCDD je to ión $[\text{M}+2]^+$, ktorého molekulový vzorec je $^{12}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_4^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}$ a relatívna hmotnosť je 321,8936. Pre $^{13}\text{C}_{12}$ -TCDD je to taktiež ión $[\text{M}+2]^+$, ktorého molekulový vzorec je $^{13}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_4^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}$ a relatívna hmotnosť je 333,9339. Ako dôkazový ión sa zvykne voliť druhý najintenzívnejší ión v molekulovom klastri. V prípade TCDD je to ión M^+ , ktorého teoretická intenzita je 77 % z iónu $[\text{M}+2]^+$. Ešte treba zdôrazniť, že MS nedokáže rozlíšiť medzi izomérmí v homológových skupinách PCDD, PCDF a PCB, pretože hmotnostné spektrá izomérov sú prakticky totožné. V tomto prípade je rozhodujúca GC separácia, pomocou ktorej sa musia oddeliť stanovované izoméry od ostatných izomérov.

Požiadavky na kvalitu stanovenia PCDD, PCDF a PCB

Každé laboratórium akreditované v súlade s ISO Guide 58 podľa normy EN ISO/IEC 17025, ktoré navyše vykonáva úradnú kontrolu napr. potravín a krmív na obsah PCDD, PCDF a PCB metódou ID GC/HRMS, musí striktné dodržiavať požiadavky dané v oficiálnych metódach^{18,19} alebo normách, podľa ktorých sa vzorky analyzujú, ako aj v prípadných právnych predpisoch – v tomto prípade sú to nariadenia Komisie (ES) č. 1883/2006 a č. 152/2009. Sú to najmä tieto QA/QC úkony a kritériá:

- Relatívna štandardná odchýlka (RSD) vyjadrujúca presnosť merania má byť < 15 %. Relatívna chyba merania, t. j. rozdiel medzi priemernou hodnotou a referenčnou hodnotou delený referenčnou hodnotou, vyjadrujúca správnosť merania, by nemala byť vyššia než $\pm 20\%$.
- Analytické laboratórium musí aspoň raz ročne absolvovať skúšku spôsobilosti; V prípade, že nesplní určené kritériá, musí prijať opatrenia na odstránenie nedostatkov, ktoré spôsobili chyby.
- Kontinuálne sa vedú tzv. (Shewhartove) regulačné diagramy obzvlášť pre výsledky z analýz (certifikovaných) referenčných materiálov, ale aj vzoriek na slepý pokus; Tieto diagramy prehľadne ukazujú časový trend kvality laboratórnych meraní.
- Výťažnosť ^{13}C -označených extrakčných štandardov musí byť určenom intervale (60–120 % pre PCDD a PCDF a 50–120 % pre PCB).
- Rozlišovacia schopnosť hmotnostného spektrometra musí byť pri GC-HRMS meraní nastavená na minimálne 10 000 (podmienka 10 % údolí, t. j. signálu v strede medzi dvomi píkmi). Keďže v praxi sa obťažne realizuje nastavenie R_{MS} pri 10 % údolí, určuje sa R_{MS} na šírku píku pri jeho 5 % výške, čo približne zodpovedá R_{MS} pri 10 % údolí.
- Izotopický pomer kvantifikačného a dôkazového iónu musí byť určenom intervale $\pm 15\%$ vzhľadom na teoretickú hodnotu ($\pm 10\%$ v prípade ind-PCB).
- Odchýlka GC retenčného času analytu od jeho ^{13}C -ekvivalentu nesmie byť väčšia než ± 2 s.

- Koncentrácia analytu vo vzorke na slepý pokus, resp. rušiackej látky dávajúcej HRMS signál v oblasti elučného času analytu môže byť najviac 1/10 koncentrácie analytu v analyzovanej vzorke.
- Pre kvantitatívnu analýzu musí byť pomer signálu v maxime píku dôkazového iónu a šumu vyšší než 3.
- Rozdiel medzi sumárnym výsledkom (TEQ alebo suma ind-PCB), ak sa do výpočtu použije hodnota medze stanovenia (LOQ) pre analyty prítomné pod LOQ (koncept „hornej hranice“) a sumárnym výsledkom, ak sa do výpočtu použije 0 (koncept „dolnej hranice“), nesmie byť vyšší než 20 % v koncentračnej oblasti najvyšších prípustných limitov a vyšších.
- V prípade, že sa vykoná väčší zásah v GC a MS prístrojoch (výmena GC kolóny, čistenie iónového zdroja, výmena násobiča) je potrebné opätovne zmerať všetky kalibračné roztoky.

Záver

Polychlórované dibenzo-*p*-dioxíny a dibenzofurány, polychlórované bifenyly, ale aj ďalšie perzistentné organické polutanty sa nachádzajú vo vzorkách zo životného prostredia, krmivách, potravinách a iných biologických materiáloch vo veľmi nízkych hladinách (ng g^{-1} až fg g^{-1}). Pri stanovení takýchto malých množstiev dochádza veľmi ľahko k vysokým chybám najmä z dôvodov nedostatočnej separácie analytov od rušiacich látok, nízkej citlivosti a selektivity detektora, nedostatočného vyčistenia vzorky od balastných a rušiacich látok a kontaminovaného laboratórneho skla, adsorbentov, rozpúšťadiel a ďalších použitých materiálov.

Viacere problémy rieši aplikácia izotopovej zriedovacej metódy realizovanej prídavkom známych množstiev neaktívnych izotopicky označených analytov ešte pred extrakciou vzoriek. V prípade PCDD, PCDF a PCB sa ako extrakčné štandardy používajú stanovované kongenéry, avšak všetkých 12 atómov uhlíka tvorí iba uhlík s nukleónovým číslom 13. Potom je jediným rozdielom medzi prirodzene sa vyskytujúcou zlúčeninou a jej ^{13}C -ekvivalentom iba rozdielna hmotnosť molekuly. Ostatné chemické a fyzikálno-chemické vlastnosti sú prakticky totožné, čo znamená, že obe zlúčeniny sa chovajú počas spracovania vzorky rovnako. Avšak ich rozdielna hmotnosť a teda aj hmotnostné spektrum umožňujú ich rozlíšenie hmotnostnou spektrometriou.

Vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria (HRMS) s dvojistou fokusáciou výrazne zvyšuje selektivitu stanovenia a na základe potlačenia chemického šumu aj citlivosť analýzy. HRMS pri rozlišovacej schopnosti nastavenej na 10 000 v spojení s kapilárnou plynovou chromatografiou je určená právnyimi predpismi Európskej únie ako konfirmačná metóda na stanovenie PCDD, PCDF a PCB v potravinách a krmivách. PCDD, PCDF a dl-PCB s dioxínovou toxicitou sa môžu totiž stanovovať aj inými metódami, napr. GC-MS/MS alebo bioanalytickou metódou.

dou CALUX a ind-PCB s GC-MS/MS alebo GC-ECD. Tieto metódy sa však považujú za skríningové metódy. V praxi to znamená, že všetky vzorky, v ktorých bol obsah stanovovaných zlúčenín nadlimitný sa musia podrobiť opakovanej analýze konfirmačnou GC-HRMS metódou. Dokonca aj predpísaná časť vzoriek, v ktorých bol podľa skríningových metód obsah analytov podlimitný, musí byť overená konfirmačnou metódou.

Nakoľko sa stanovujú len niektoré kongenéry zo 75 kongenéro PCDD, 135 kongenéro PCDF a 209 kongenéro PCB, je dôležité pred vstupom do HRMS prístroja separovať tieto stanovované kongenéry od ostatných kongenéro, ale najmä od vlastných izomérov. V súčasnosti sa to dá iba plynovou chromatografiou na vhodnej kapilárnej kolóne (v prípade stanovenia PCDD a PCDF v environmentálnych a časti živočíšnych vzoriek je potrebná opakovaná analýza na ďalšej kapilárnej kolóne s rozdielnou polaritou).

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-21-004205 a Európskou komisiou na základe zmluvy č. GOCE 511237 (projekt MODELKEY).

LITERATÚRA

1. <http://www.pops.int>, stiahnuté 25. marca 2010.
2. Hayakawa K., Takatsuki H., Watanabe I., Sakai S.: *Chemosphere* 57, 343 (2004).
3. Abalos M., Parera J., Abad E., Rivera J.: *Chemosphere* 71, 1115 (2008).
4. Solomon G. M., Weiss P. M.: *Environ. Health Perspect.* 110, A339 (2002).
5. Malisch R., Dilara P.: *Chemosphere* 67, S79 (2007).
6. Yu Z., Palkovicova L., Drobna B., Petrik J., Kocan A., Trnovec T., Hertz-Picciotto I.: *Chemosphere* 66, 1012 (2007).
7. Harden F. A., Toms L. M. L., Paepke O., Ryan J. J., Müller J. F.: *Chemosphere* 67, S318 (2007).
8. Kočan A., Petrik J., Drobna B., Chovancová J.: *Chemosphere* 29, 2315 (1994).
9. Kočan A., Petrik J., Jursa S., Chovancová J., Drobna B.: *Chemosphere* 43, 595 (2001).
10. Chovancová J., Kočan A., Jursa S.: *Chemosphere* 61, 1305 (2005).
11. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0032:0043:EN:PDF>, stiahnuté 25. marca 2010.
12. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:054:0001:0130:EN:PDF>, stiahnuté 25. marca 2010.
13. Isaac G., Waldebäck M., Eriksson U., Odham G., Markides K.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 5506 (2005).
14. Jensen S., Häggberg L., Jörundsdóttir H., Odham G.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 5607 (2003).
15. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957).
16. Bligh E. G., Dyer W. J.: *Can. J. Biol. Physiol.* 37, 911 (1959).
17. Smith L. M., Stalling D. L., Johnson J. L.: *Anal. Chem.* 56, 1830 (1984).
18. U.S. Environmental Protection Agency: Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS, Method 1613, Revision B, EPA-821/B-94-005 (U.S. EPA 1994).
19. U.S. Environmental Protection Agency: Chlorinated Biphenyls Congeners in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS, Method 1668, Revision A, EPA-821-R-00-002 (U.S. EPA 1999).

ANALYTICKÉ METODY HODNOCENÍ ÚČINNOSTI ANTIOXIDANTŮ VE VYBRANÝCH DRUZÍCH KOŘENÍ

**LENKA KOUŘIMSKÁ^a, DIANA CHRPOVÁ^b, JAN PÁNEK^b, LENKA KOLESÁROVÁ^a
a VERONIKA LEGAROVÁ^a**

^a Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbát, ^b Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Česká republika
kourimska@af.czu.cz, dianach@centrum.cz,
jan.panek@vscht.cz, lenikk@email.cz, legarova@af.czu.cz

Klíčová slova: koření, antioxidanty, fenoly, metoda DPPH, Schaalův test

Úvod

Velmi významnými sekundárními metabolity většiny rostlin jsou hydrofilní i lipofilní sloučeniny vykazující antioxidační efekt. Z hydrofilních antioxidantů jsou to hlavně fenoly a askorbová kyselina. Jednotlivé látky mají různou účinnost a kromě toho mezi aktivními složkami může existovat synergismus nebo antagonismus. Proto je odhad antioxidačního působení v reálném materiálu obtížný a celkový antioxidační efekt je nutno stanovit experimentálně. Nejsou zatím ale k dispozici práce, které by charakterizovaly antioxidační efekt rostlinných fenolů v reálném potravinářském materiálu. Je několik skupin rostlinných fenolů u kterých je znám nebo se předpokládá antioxidační efekt: jednoduché fenoly – např. thymol; fenolové kyseliny a jejich estery – např. gallová kyselina, rosmarinová kyselina; fenolové diterpeny – např. karnosová kyselina, rosmanol; flavonoidy – např. rutin; katechiny a gallokatechiny a prokyanidiny. Z výše uvedeného výčtu je zřejmé, že se jedná o širokou a velmi perspektivní skupinu látek u kterých lze předpokládat výrazný antioxidační potenciál^{1–5}.

Antioxidační účinnost rostlin (obvykle ve formě nějakého extraktu) se hodnotí třemi různými typy metod:

1. Screeningové metody pro hodnocení celkové antioxidační kapacity;
2. Metody pro stanovení složení fenolů a jejich celkového obsahu;
3. Metody pro posouzení antioxidační účinnosti v tucích.

Screeningové metody pro hodnocení celkové antioxidační kapacity jsou většinou založeny na inhibici některé radikálové reakce probíhající v hydrofilním nebo částečně lipofilním prostředí. Jako inhibitor působí fenolové sloučeniny, askorbová kyselina, ale v některých případech i tokoferoly a další látky⁴. Při reakcích v hydrofilním prostředí se uplatňuje schopnost antioxidantu zhaset volné radikály. Výsledky stanovení v bylinách někdy (není to ale pravidlem) dobře korelují s obsahem veškerých fenolů. Druhou možností je využití redukčních schopností některých antioxidantů. Využívají se obvykle tyto metody stanovení: Metoda zhasení radikálu 2,2'-difeny-1-pikrylhydrazylu (DPPH)^{6–8}, metoda redukce Fe (III) na Fe (II)⁹, metoda zhasení ABTS radikálu někdy též označována jako TEAC metoda^{6,7}, metoda FRAP (ferric reducing ability of plasma)¹⁰ a metoda měření inhibice vzniku superoxidových radikálů¹¹.

Pro stanovení obsahu veškerých fenolů v rostlinných extraktech se prakticky výhradně používá metoda podle Folina-Ciocalteu^{11,7}. Pro stanovení složení silic a těkavých fenolů v nich obsažených se využívá plynové chromatografie často spojené s hmotnostní detekcí^{12–14}. Pro stanovení obsahu jednotlivých fenolů v extraktech se, vzhledem k jejich malé těkavosti, využívá metody HPLC v reversní fázi obvykle ve spojení s detektorem diodového pole (DAD), nebo UV detektorem s proměnlivou vlnovou délkou, případně hmotnostním detektorem^{15,16}.

Z metod pro posouzení antioxidační účinnosti v tucích se nejvíce využívá Schaalův test, kdy vzorky tuku jsou podrobeny oxidaci za volného přístupu atmosférického kyslíku, ve tmě a obvykle za zvýšené teploty^{14,17}. Poměrně často se zkouší použití aromatických rostlin jako inhibitorů oxidace v mase a výrobcích z masa. Jako analytická koncovka se často využívá spektrofotometrická metoda stanovení vznikajícího malondialdehydu (sekundární produkt oxidace) pomocí 2-thiobarbiturové kyseliny^{13,18}. V uspořádání tzv. Rancimat testu jsou vzorky tuku podrobeny oxidaci za nuceného přívodu kyslíku, ve tmě a za výrazně zvýšené teploty – obvykle 120 °C (cit.¹²).

Experimentální část

Pro sledování antioxidační aktivity rostlinných materiálů byly vybrány tyto druhy koření: Oregano, Dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.); Řecké oregano „rigani“ (*Origanum heracleoticum* L.); Majoránka zahradní (*Origanum majorana* L.); Saturejka zahradní (*Satureja hortensis* L.) a Rozmarýna lékařská (*Rosmarinus officinalis* L.). Rostliny byly pěstovány na parcelkách o rozloze 1 m² ve sklenících a na demonstračním pokusném poličku. Dle rozboru byla půda pro pěstování bylin klasifikována jako hlinitopísčité a méně propustná (pH 6,49; kationtová

výmenná kapacita pôdy (KVK) byla 171 mmol kg⁻¹; obsah vápníku 4,3 g kg⁻¹; hořčíku 0,3 g kg⁻¹; draslíku 0,5 g kg⁻¹ a fosforu 0,2 g kg⁻¹). Semena byla vyseta do truhlíků koncem dubna a od konce května předpěstována v sadbovačích. Vysázení na pole a do skleníku (36 rostlin na 1 m²) bylo začátkem června. Rostliny byly pěstovány bez přihnojení nebo začátkem července přihnojeny na stejnou hladinu dusíku (2 g N na 1 m²) buď minerálním hnojivem síranem amonným či organicky anaerobně fermentovanou prasečí kejdou (obsah dusíku 2,5 g/100 g). Byliny byly v průběhu vegetace v polovině srpna sestřihány. Pro analýzu byla začátkem listopadu provedena celková sklizeň všech rostlin. Z každého druhu koření a způsobu hnojení byly odebrány tři reprezentativní vzorky pro analýzu.

Antioxidační aktivita byla stanovena metodou DPPH^{14,19,20} a modifikována pro analyzovaný materiál. Extrakty z listů rostlin byly připraveny dvakrát opakovanou extrakcí vroucí demineralizovanou vodou. Navážka vzorku (4–6 g čerstvých listů v závislosti na druhu koření) v kádince byla přelita 50 ml vroucí demineralizovanou vodou a udržována 10 min na vodní lázni 70 °C za občasného promíchání. Extrakt byl přefiltrován do 100 ml odměrné baňky. Zbytek částečně vyextrahovaného vzorku byl znovu přelit 50 ml vroucí demineralizované vody a kádinka znovu byla udržována 10 minut při 70 °C za občasného promíchání. Druhý extrakt byl přefiltrován do téže odměrné baňky. Baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou a nechána ve tmě, aby vychladla. Pro vlastní měření byly pak používány ředěné zásobní roztoky extraktů vzorků. Ředění extraktu bylo upravováno tak, aby absorbance roztoků při $\lambda = 522$ nm byla v rozsahu kalibrační křivky připravené ze standardu askorbové kyseliny. Absorbance byla měřena proti metanolu.

Celkový obsah fenolů byl stanoven spektrofotometriky²⁰ s použitím Folinova – Ciocalteuova činidla. Byly

použity stejné extrakty sušených listů jako při stanovení antioxidační aktivity DPPH. Absorbance při $\lambda = 760$ nm byla proměřována proti slepému vzorku. Kalibrační křivka byla sestavena z roztoku gallové kyseliny.

Antioxidační účinnost Schaalovým testem¹⁷ spočívala ve sledování průběhu oxidace sádra měřením hmotnostního přírůstku oxidačních produktů vzniklých za volného přístupu kyslíku namáháním zvýšenou teplotou při 60 °C. Hmotnostní přírůstek byl sledován v sádle samotném a v sádle s přidávkou 2 g čerstvých bylin. Všechna měření byla prováděna v paralelních stanoveních.

Výsledky analýz byly statisticky zpracovány programem Statistica verze 8 (StatSoft Inc.) za použití analýzy rozptylu (ANOVA). Průměry byly porovnány pomocí Tukeyova HSD testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Korelační koeficienty (r) pro zjištění závislosti mezi naměřenými hodnotami byly vypočteny pomocí korelační matice. Jako statisticky významné byly považovány korelace na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$.

Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení antioxidační aktivity bylin pěstovaných na poli vyjádřené jako obsah askorbové kyseliny (metoda DPPH), jako celkový obsah gallové kyseliny (stanovení celkových fenolů) a jako protekční faktor (PF), který byl vypočten jako podíl indukční periody vzorku s antioxidantem ku indukční periodě vzorku bez antioxidantu (Schaalův test), jsou uvedeny v tab. I. Výsledky analýz bylin pěstovaných ve skleníků jsou v tab. II. Hodnoty jsou uvedeny ve tvaru: průměr ze třech odběrů vzorku \pm směrodatná odchylka.

Statistickým porovnáním naměřených hodnot nebyl zjištěn průkazný rozdíl v hodnotách celkové antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH a Schaalovými testy

Tabulka I
Antioxidační aktivita bylin pěstovaných na poli

Bylina	Hnojení	Obsah askorbové kyseliny [mg/100 g]	Obsah gallové kyseliny [mg/100 g]	Protekční faktor
Dobromysl obecná	nehnojené	1260 \pm 160	680 \pm 100	9,2 \pm 0,1
	minerální hnojivo	1350 \pm 120	1230 \pm 200	9,1 \pm 0,2
	organické hnojivo	1020 \pm 60	1470 \pm 100	9,4 \pm 0,1
Řecké oregano	nehnojené	1010 \pm 260	1850 \pm 30	11,4 \pm 0,1
	minerální hnojivo	1820 \pm 520	1760 \pm 140	13,0 \pm 0,3
	organické hnojivo	2340 \pm 850	1670 \pm 40	13,4 \pm 0,1
Majoránka zahradní	nehnojené	1170 \pm 450	670 \pm 100	9,1 \pm 0,2
	minerální hnojivo	1110 \pm 310	190 \pm 50	9,6 \pm 0,1
	organické hnojivo	820 \pm 180	160 \pm 30	11,0 \pm 0,1
Saturejka zahradní	nehnojené	140 \pm 20	80 \pm 10	5,1 \pm 0,2
	minerální hnojivo	170 \pm 20	170 \pm 10	4,5 \pm 0,1
	organické hnojivo	210 \pm 20	190 \pm 10	4,4 \pm 0,2

Tabulka II
Antioxidační aktivita bylin pěstovaných ve skleníku

Bylina	Hnojení	Obsah askorbové kyseliny [mg/100 g]	Obsah gallové kyseliny [mg/100 g]	Protekční faktor
Dobromysl obecná	nehnojené	1540 ± 180	490 ± 30	6,8 ± 0,3
	minerální hnojivo	570 ± 250	710 ± 20	5,8 ± 0,1
	organické hnojivo	270 ± 170	910 ± 220	6,3 ± 0,1
Řecké oregano	nehnojené	780 ± 150	1470 ± 320	4,8 ± 0,2
	minerální hnojivo	360 ± 40	990 ± 90	4,3 ± 0,1
	organické hnojivo	580 ± 220	1070 ± 410	4,9 ± 0,1

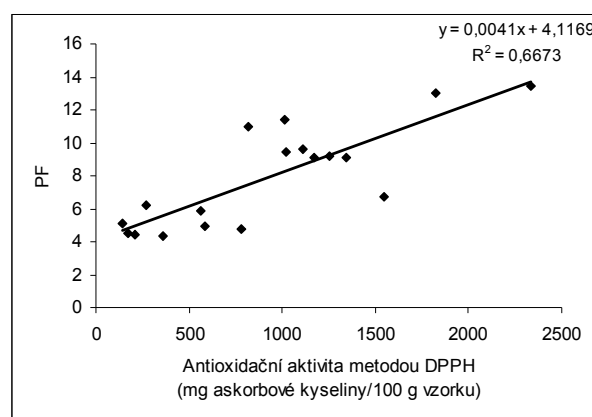
v závislosti na druhu koření a způsobu hnojení. Výsledky jsou ve velmi dobré shodě s výsledky screeningové studie¹⁰, pouze v případě majoránky byly naše výsledky významně vyšší než v citované práci. Podobné závislosti byly publikovány i v dalších pracích^{4,7,11,12}. V případě stanovení obsahu celkových fenolů nebyly též zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi způsobem hnojení, ale byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými druhy koření. Nejvyšších hodnot obsahu fenolických látek vykazovalo řecké oregano (1469 mg/100 g), následované dobromyslí obecnou (914 mg/100 g), majoránkou zahradní (339 g/100 g) a saturejkou zahradní (148 g/100 g). Obsah fenolických látek v řeckém oreganu se statisticky průkazně odlišoval od obsahu těchto látek ve všech ostatních bylinách ($P_{\text{dobromysl}} = 0,048$; $P_{\text{majoránka}} = 0,001$ a $P_{\text{saturejka}} < 0,001$). Statisticky průkazný rozdíl byl též mezi dobromyslí obecnou a saturejkou zahradní ($P = 0,024$). Při hodnocení výsledků analýz řeckého oregana a dobromyslí obecné pomocí všech třech metod byl dále prokázán vliv způsobu pěstování na stanovené hodnoty, neboť byliny pěstované na poli vykazovaly v průměru vyšší hodnoty než byliny pěstované ve skleníku ($P_{\text{DPPH}} = 0,020$; $P_{\text{fenoly}} = 0,049$ a $P_{\text{PF}} < 0,001$). Výsledky stanovení antioxidační aktivity a obsahu fenolových sloučenin v některých méně známých druzích rodu *Thymbra*, *Satureja* a *Origanum* byly publikovány v přehledové studii⁹. Výsledky jsou dobře srovnatelné s výsledky naší studie, pouze obsah fenolů v *Satureja cuneifolia* Ten. byl v citované studii výrazně vyšší.

Většina prací, ve kterých byla sledována antioxidační účinnost extraktů bylin v tucích, uvádí, že významnou aktivitu mají pouze extrakty šalvěže a rozmarýny¹². Získané výsledky jsou s těmito údaji v rozporu, protože protekční faktor vyšší než 4 je považován za významný (tuto hodnotu mají všechny posuzované vzorky) a aktivita daná protekčním faktorem vyšším než 10 je již považována za zcela mimořádnou. Tomuto hodnocení odpovídají polní vzorky *Origanum heracleoticum* a organicky hnojená *Majorana hortensis*.

Při posuzování závislosti mezi jednotlivými metodami použitými pro hodnocení antioxidační aktivity různých druhů koření byla zjištěna středně silná korelační závislost mezi hodnotami stanovenými metodou DPPH a celkovým obsahem fenolických látek (korelační koeficient $r =$

0,526). Stejný závěr můžeme konstatovat i v případě korelace mezi celkovým obsahem fenolů a hodnotami PF ($r = 0,471$). Velmi silná korelační závislost byla zjištěna mezi hodnotami zjištěnými pomocí DPPH metody a Schaalovým testem ($r = 0,817$). Aproximace tohoto vztahu lineární regresní přímkou je znázorněna na obr. 1.

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že všechny tři použité metody se jeví jako vhodné pro stanovení antioxidační aktivity vzorků čerstvých listů sledovaných druhů koření. U čerstvých vzorků koření k celkové antioxidační aktivitě přispívají jednak sloučeniny chemicky více stabilní (fenoly) a jednak i sloučeniny snadno podléhající degradaci (např. askorbová kyselina), což se odráží na silné korelaci mezi celkovou antioxidační aktivitou stanovenou metodou DPPH a hodnotami PF. Vzhledem k rozdílnému obsahu fenolických látek v jednotlivých druzích koření by ale tato závislost nemusela platit v souvislosti s možnou degradací labilních antioxidantů v průběhu dalšího technologického zpracování bylin (sušení, mražení, tepelné úpravy).



Obr. 1. Závislost mezi hodnocením antioxidační aktivity vybraných druhů koření metodou DPPH a Schaalovým testem

Závěr

Sledováním antioxidační aktivity vybraných druhů čerstvých vzorků koření čeledi *Lamiaceae* pomocí třech metod byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi hodnotami obsahu celkových fenolů v závislosti na druhu koření. Porovnáním stejných rostlin pěstovaných ve skleníku a na poli byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly ve všech sledovaných hodnotách. Silná korelační závislost byla zjištěna mezi hodnotami celkové antioxidační aktivity stanovenými metodou DPPH a Schaalovým testem. Všechny posuzované vzorky vykazovaly významnou inhibiční aktivitu u autooxidace sádla jako reálného tukového materiálu.

Práce byla podpořena záměry MŠMT č. MSM 6046070901 a MSM 6046137305.

LITERATURA

- Pokorný J., Pánek J.: *Výživa a potraviny* 53, 87 (1998).
- Nakatani N.: *BioFactors* 13, 141 (2000).
- Dimitrios B.: *Trends Food Sci. Tech.* 17, 505 (2006).
- Yanishlieva N. V., Marinova E., Pokorný J.: *Eur. J. Lipid Sci.* 108, 776 (2006).
- Velíšek J.: *Chemie potravin 1, 2*. Osis, Tábor 2009.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R., van Beek T. A.: *Food Chem.* 85, 231 (2004).
- Su L., Yin J. J., Charles D., Zhou K., Moore J., Yu L.: *Food Chem.* 100, 990 (2007).
- Lo Scalzo R.: *Food Chem.* 107, 40 (2008).
- Dorman H. J. D., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 762 (2004).
- Dragland S., Senoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R.: *J. Nutr.* 133, 1286 (2003).
- Cervato G., Carabelli M., Gervasio S., Cittera A., Cazzola R., Cestaro B.: *J. Food Biochem.* 24, 453 (2000).
- Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I. P., Troganis A., Boskou D.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5294 (2002).
- Fasseas M. K., Mountzouris K. C., Tarantilis P. A., Polissiou M., Zervas G.: *Food Chem.* 106, 1188 (2007).
- Kulisic T., Radonic V., Milos M.: *Grasas y Aceites* 56, 284 (2005).
- Justesen, U., Knuthsen P.: *Food Chem.* 73, 245 (2001).
- Ziaková A., Brandšteterová E.: *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 26, 443 (2003).
- Pánek J.: *Habilitační práce*. VŠCHT, Praha 2001.
- Simitzis P. E., Deligeorgis S. G., Bizelis J. A., Dardamani A., Theodosiou I., Fegeros K.: *Meat Science* 79, 217 (2008).
- Buřičová L.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2006.
- Dorman H. J. D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M.J.: *Food Chem.* 83, 255 (2003).

L. Kouřimská^a, D. Chrpová^b, J. Pánek^b, L. Kolesárová^a, and V. Legarová^a (*Department of Quality of Agricultural Products, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology in Prague, Praha, Czech Republic*): **Analytical Methods for Monitoring of Antioxidant Capacity of Selected Spice Species**

Three analytical methods were applied to assess the antioxidant capacity of selected spices of *Lamiaceae* (*Origanum vulgare* L., *Origanum heracleoticum* L., *Origanum majorana* L., *Satureja hortensis* L. and *Rosmarinus officinalis* L.). Antioxidant capacity of fresh plant samples was determined by the DPPH method, the Schaal test and spectrophotometric determination of total phenolic compounds. Statistically significant differences in content of total phenolic compounds between the spice species were found. There were also differences between plants planted in the field and in the greenhouse in all monitored parameters. A strong correlation was found between the values determined by the DPPH method and the protection factors calculated from the Schaal test. All tested samples showed an effective antioxidant activity in lard used as a real fat food material.

CHEMOMETRIC CHARACTERIZATION OF AIR POLLUTANTS AND INFLUENCE OF METEOROLOGICAL FACTORS

**FILIP KRAIC^a, ZUZANA KIRÁLYOVÁ^b,
and JÁN MOCÁK^a**

^a Department of Chemistry, University of Ss. Cyril and Methodius, J. Herdu 2, 917 01 Trnava, ^b BEL/NOVAMANN International, s.r.o., Kollárovo nám. 9, 811 07 Bratislava, Slovak Republic
jan.mocak@ucm.sk

Key words: air monitoring, pollutants, meteorological data, multivariate data analysis

Introduction

Air pollutants are substances which are brought into air by human activities and which may have unhealthy influence on human or environment. In this work, the quality of the air from Liptov region (central Slovakia) was assessed using the concentrations of sulphane, ammonia, nitrogen oxides, gross dustiness and heavy metals content, namely cadmium, lead, and copper^{1,2}. In addition, actual atmospheric conditions like temperature, rainfall, humidity and speed of the wind were included into this complex analysis of toxic species in environmental air. The analytical data were monitored during four years as the day values as well as the month averages. Multivariate data analysis techniques (MVA) and descriptive statistics were used for the atmospheric data evaluation as the main chemometric tools. Mostly used MVA techniques were principal component analysis (PCA), canonical correlation analysis (CCA), cluster analysis (CA), and linear discriminant analysis (LDA).

Experimental

Air monitoring was built up in Liptovský Mikuláš (two sampling sites) and Ruzomberok (one sampling site). Air pollution at these towns is heterogeneous due to the structure and character of the industry present. Characteristic pollutants are sulphane, ammonia, nitrogen oxides, the particulate matter (PM₁₀) and heavy metals present in PM₁₀.

The air samples were analysed up to two hours after sampling. Photometric methods were used for analysis of ammonium, sulphane and nitrogen oxides. The particulate matter was analysed by gravimetric methods. Lead, copper, and cadmium, as the particulate matter components, were analysed by differential pulse stripping voltammetry.

The monitoring indices, found by photometric and gravimetric analyses, were evaluated daily, heavy metals were analysed as the sum for the whole month. In addition to the quality control described below, the final step in quality assurance was the analysis of the blind and control samples prepared in the accredited laboratory and their verification using the Shewhart regulation charts.

The air sampling was organized during 24 hours of the day, starting at about 7 a.m. and ending at approximately the same time 24 hours later. Air flow and required air volume were regulated by the Hygiene regulations 52/1981 No 60, published by the Ministry of Health of the Czechoslovak Republic.

Meteorological data were obtained from the regional meteorological stations. Rainfall was measured 24 hours from 7 a.m. until the following day as the summary value corresponding to that day. If the rainfall started after midnight, it was counted to the date when it started. Temperature during the year was characteristic for continental climate. The high mountain range on the north and northwest create a barrier to the air flow. Unfavourable conditions for dispersion and prevailing west-east winds result in high concentration of the air contaminants.

A majority of calculations was done by software packages Statgraphics Centurion and SPSS 15.0.

Results and Discussion

Principal Component Analysis

Principal component analysis (PCA) is a linear and unsupervised pattern recognition technique used for analyzing and reducing the dimensionality of numerical data sets in a multivariate problem^{3–8}.

The principal component analysis has revealed mutual relationships among the polluting components and meteorological factors. The purpose of PCA was to obtain a small number of linear combinations of 15 studied variables, which account for most of the variability (variance) in the data. In this study, the average month values of variables were examined so that 96 studied cases were considered (=2x12x4, which corresponds to the number of towns x number of months x number of years). The following variables were determined or monitored (without subscripts, which are not allowed as the variable names in the employed software packages): PM₁₀ (particulate matter), NO_x, H₂S, NH₃, Cd, Pb, Cu, Temp (temperature), Vapor (vapor pressure of water), Humidity, Wind (speed), Clouds (the number of cloudy days), Fog (the number of foggy days), mRain (millimeters of the accumulated rain during the day), hRain (rain hours during the day). The dependences of the pairs of five significant principal components

(which account for 72 % variability) were calculated in the form of scatterplots, loading plots and biplots. The most important loading plot for variables is shown on Fig. 1. Interposition of the variables in this plot shows a high correlation if two variables are located close together or if they are situated on the opposite sides of an imaginary straight-line – in this case their trends are inverse. Thus, a strong correlation can be seen e.g. between a couple of variables H_2S –Clouds and NH_3 –Vapor. Also several opposite effects are there demonstrated, concerning e.g. the couples NH_3 – NO_x , mRain–Pb, etc. A task for a chemometrician is to assign some meaning to the main two principal components considering the position of original variables along two axes. With regard to the chemical sense the first principal component axis can be assigned as the acid – base axis (acidic at high PC1 values) and with regard to meteorological aspects it is considered mainly as the temperature axis – with high temperature values at low PC1 and low temperature at high PC1. Combining together it means that NO_x and H_2S are in the monitored air mainly when temperature is low. The PC2 axis reflects mostly wet weather (high PC2 values) and dry weather (at low PC2 values). It is also evident that PM10 is absent in the monitored air during heavy rain.

Concerning PM10 it can be seen that higher values are reached during at lower temperature, which may be connected to the heating period and frequent use of burning brown coal or furnace oil in the winter time. The same reason may be valid also for elevated winter concentrations of sulphane and nitrogen oxides. In the monitored locations, sulphane is released into the air from technological processes and industrial chemical modifications of some materials, especially in Ruzomberok.

Canonical Correlations

Canonical Correlation Analysis (CCA) is a multivariate data analysis technique which finds the linear combina-

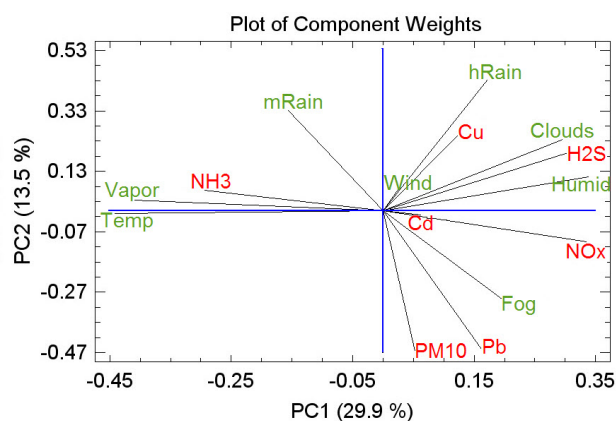


Fig. 1. Plot of loadings showing interposition of 15 studied variables (indicated in the text) in the plane of the most important principal components PC2 vs. PC1

tions of two sets of variables with the highest correlation between them. The variable sets should not be created by chance but using some principle stemming from a deeper analysis of the data^{6–9}. In our case the first set, called C1m, was created by 8 meteorological variables: Temp, Vapor, Humidity, Wind, Clouds, Fog, mRain, and hRain. The second set, C1p, contains 7 chemical variables (pollutants): PM10, NO_x , H_2S , NH_3 , Cd, Pb, and Cu. The number of cases is again 96 as in the above mentioned PCA study (month averages). A specimen of the results obtained by canonical correlation analysis is depicted in Fig. 2 where it is attempted to show the influence of the year season.

In canonical correlation analysis, similarly to the PCA, the variables have been first standardized by subtracting the corresponding variable means and then the result was divided by the variable standard deviation. According to the estimated correlation between each set of canonical variables only the first set has a statistically significant correlation at the 95 % confidence level. From Fig. 2 it is possible to see that both sets highly correlate and the transformed data exhibit a straight-line where the high values of C1m corresponds to the high values of C1p and vice versa. With regard to the year season, both sets exhibit high values in winter; the lowest values are typical for summer.

The first set of canonical variates, C1m and C1p, given by the optimal combinations of the respective variables is represented by the following two equations (1) and (2).

The high value of canonical variable C1m (reflecting meteorological variables) is reached when the variables with the positive sign have large values and those with the negative sign have small values, e.g. small temperature or

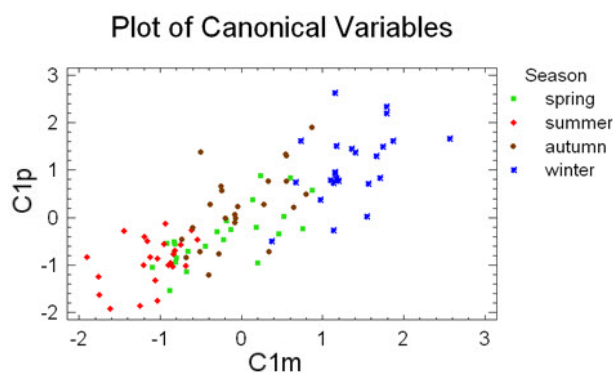


Fig. 2. Canonical Correlation Analysis of two sets of variables created by chemical factors (C1p) and meteorological factors (C1m). Four different symbols in the diagram (and four colours in the original picture) represent four year seasons: Spring – March, April, May, Summer – June, July, August, Autumn – September, October, November, Winter – December, January, February. Further details are in the text

$$C1m = -1.4847*Temp + 0.5246*Vapor - 0.2260*Wind - 0.1474*hRain + 0.1432*Humidity - 0.1240*Clouds - 0.0741*mRain - 0.0438*Fog \quad (1)$$

$$C1p = 0.5127*NOx + 0.4695*H2S - 0.2632*NH3 + 0.1779*Pb - 0.1454*Cu + 0.0902*Cd - 0.0371*PM10 \quad (2)$$

wind speed, less number of cloudy, foggy and rainy days, but large vapor pressure and humidity. Similarly, the high value of C1p (reflecting chemical variables) is reached at low NH_3 , Cu and PM10 values but large values of NO_x , H_2S , Pb and Cd (all variables express the concentrations in the analyzed air). It is worth mentioning that the variables with largest coefficients in eqs. (1) and (2) are the most important. All CCA results are in a good accord with the previously discussed PCA outputs.

Cluster Analysis

The goal of cluster analysis is to find similarities among the objects (air samples in this study) or the utilized variables, grouping them into classes. By hierarchical clustering each object or variable is initially considered as an isolate individual, then all individuals are grouped together according to the maximum likelihood principle (or the minimum dissimilarity) until all the entities are joined into a common cluster. The result of cluster analysis is the clustering scheme based on the distance as the similarity measure; it joins the most similar objects or variables into groups visible in a graphical form as a dendrogram^{7,8,10,11}. Fig. 3 shows the dendrogram, where Ward's method of clustering and the squared Euclidean distance were employed. Seven chemical variables (pollutants), namely NO_x , H_2S , NH_3 , PM10, Cd, Pb, and Cu, and eight meteorological variables – Temperature, Vapor, Humidity, Wind, Clouds, Fog, Rmm, and Rhrs were used in this study. The variables joined at lower distances are most similar. The cluster analysis output fits well to the PCA results.

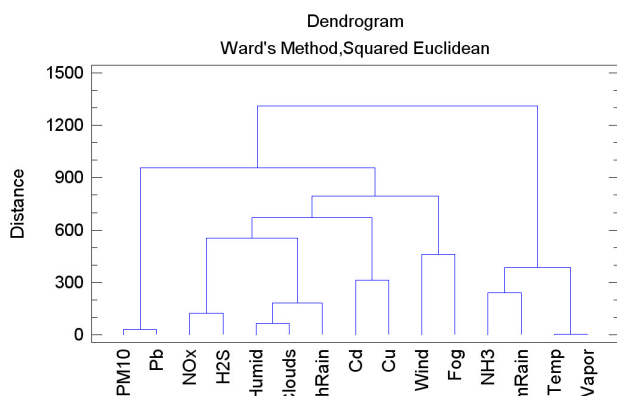


Fig. 3. Cluster analysis of 15 variables indicated at the horizontal axis using 96 samples (month averages of the day samples)

Linear discriminant analysis

The linear discriminant analysis (LDA) is a multivariate technique focused on separating distinct sets of objects into two or more groups (populations) and then allocating the objects, not readily known where they belong to, into one of the considered populations. Its main goal is to ensure a maximal discrimination among the groups (classes) of objects^{12–16}. Taking this into account, the original variables are linearly combined into discriminant functions, the number of which is equal to the number of the classes minus one.

Categorical variable *YSeas3* was created for three classes of the air samples according to three year periods expressed as spring/autumn (1) – April, May, October, November, summer (2) – June, July, August, September, winter (3) – December, January, February, March. *YSeas3*

Table I

Original output of software SPSS 15.0 – classification results expressed in percents of correct classifications for of 96 air samples categorized into 3 classes by year seasons – spring/autumn (1), summer (2), winter (3). All 15 pollutants and meteorological factors were used. Classification Results^{a,b,c}

		YSeas3	Predicted Group Membership			Total
			1	2	3	
Original	Count	1	10	14	8	32
		2	5	26	1	32
		3	9	1	22	32
	%	1	31.3	43.8	25.0	100.0
		2	15.6	81.3	3.1	100.0
		3	28.1	3.1	68.8	100.0
Cross-validated ^a	Count	1	8	16	8	32
		2	7	24	1	32
		3	10	1	21	32
	%	1	25.0	50.0	25.0	100.0
		2	21.9	75.0	3.1	100.0
		3	31.3	3.1	65.6	100.0

^a Cross validation is done only for the cases located in the bottom part of this table. In cross validation, each case is classified by the calculation model derived from all cases other than that case. ^b 60.4 % of original grouped cases (the training set) were correctly classified. ^c 55.2 % of cross-validated grouped cases were correctly classified

was used for discrimination of the samples using the LDA calculations. In the output 60.4 % of the originally grouped objects were correctly classified when calculating the discrimination model using the training set of the data and 55.2 % of the cross-validated grouped objects were correctly classified using the leave-one-out method¹⁷. This result also means that 43 objects out of 96 were categorized into a different category than supposed. When using three classes, no discrimination of the objects (investigated month averages of the day samples) corresponds theoretically to only 33.3 % of the correct classifications, so that achieved 55.2 % may be assigned as significant discrimination, however, this result is not too convincing and the season variation can be therefore regarded only as a moderate effect.

In summary, it can be concluded that several important relations among the chemical pollutants themselves and also with respect to the meteorological conditions have been discovered, which may be effectively used for evaluation of further permanent air monitoring in the Liptov region.

The authors wish to acknowledge and thank to the project VVCE-0004-07 and VEGA projects 1/1005/09 and 1/0066/09 for support of this work.

REFERENCES

1. Kim L., Lim J.: *Key Eng. Mat.* 277, 492 (2005).
2. Malec L., Skacel F., Sec K., Tekac V.: *Chem. Listy* 101, 150 (2007).
3. Jolliffe I.T.: *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York 2002.
4. Sharma S.: *Applied Multivariate Techniques*. Wiley, New York 1996.
5. Pytela O.: *Chemometrie pro organické chemiky*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2003.
6. Vandeginste B.G.M., Massart D.L., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J.: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Elsevier, Amsterdam 1998.
7. Malinowski E.R., Howery D.G.: *Factor Analysis in Chemistry*. 2nd ed. Wiley, New York 1991.
8. Beebe K.R., Pell R.J., Seasholtz M.B.: *Chemometrics: A Practical Guide*. Wiley, New York 1998.
9. Otto M.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley, Weinheim 1999.
10. Everitt B.S., Landau S., Leese M.: *Cluster Analysis*. Wiley, New York 2001.
11. Kaufman L., Rousseeuw P.J.: *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*. Wiley, New Jersey 2005.
12. Khattree R., Naik D.N.: *Multivariate Data Reduction and Discrimination*. SAS Institute, Cary, NC 2000.
13. Mocák J., Balla B.: *Lab. Diag.* 5, 23 (2000).
14. Everitt B.S., Dunn G.: *Applied Multivariate Data Analysis*. Arnold, London 2001.
15. Khattree R., Naik N.N.: *Multivariate data reduction and discrimination with SAS software*. SAS Institute, Cary, NC 2000.
16. Lankmayr E., Mocak J., Serdt K., Balla B., Wenzl T., Bandoniene D., Gfrerer M., Wagner S.: *J. Biochem. Bioph. Meth.* 61, 95 (2004).
17. Duda R.O., Hart P.E., Stork D.G.: *Pattern Classification*. 2nd ed. Wiley, New York 2001.

Abstract

Air pollutants are substances which are brought into air by human activities and which have unhealthy influence on human or environment. The quality of the air in the Liptov region was assessed by means of chemical and physical properties of the measured air samples – the concentrations of sulphane, ammonia and nitrogen oxides, gross dustiness (PM10) with different concentrations of heavy metals (cadmium, lead, and copper) as well as actual atmospheric conditions.

The air data were monitored during four years either as the day values or the month averages. All performed measurements and calculations were separately made for two close Slovak towns. The main chemometric tools used for atmospheric data evaluation were the techniques of multivariate data analysis (MVA). Mostly used MVA techniques were principal component analysis (PCA), canonical correlation analysis (CCA), cluster analysis (CA) and linear discriminant analysis (LDA). Mutual important relationships among the pollutants as well as their relations to the meteorological conditions were described in detail.

KOMPRESÍVNA DVOJROZMERNÁ PLYNOVÁ CHROMATOGRÁFIA

JÁN KRUPČÍK

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, STU, Radlinského 9, 812 37
Bratislava, Slovenská republika
jan.krupcik@stuba.sk

Abstrakt

V analytickej praxi často treba analyzovať veľmi komplikované vzorky alebo vzorky ktorých zložky sa líšia nepatrne fyzikálnymi vlastnosťami. Do prvej skupiny možno zaradiť mnohozložkové vzorky, ktoré obsahujú stovky až tisícky zložiek s rozmanitými vlastnosťami. Do druhej skupiny patria vzorky, v ktorých treba analyzovať priestorové a polohové izoméry. V praxi však treba často analyzovať optické antipódy (enantioméry), ktoré nemožno zaradiť ani do jednej z vyššie uvedených skupín, pretože fyzikálne vlastnosti enantiomérov sa v achirálnych prostrediach nelíšia a na ich priamu separáciu treba použiť chirálne prostredie (stacionárnu alebo mobilnú fázu). Je zrejmé, že tak na analýzu mnohozložkových vzoriek, ako aj na analýzu izomérov (polohových, priestorových alebo optických) treba použiť účinné separačné systémy. Kapilárna plynová chromatografia sa svojou separačnou účinnosťou radí medzi najvýznamnejšie spomedzi nich.

Separáciu v jednej kolóne však často nemožno dosiahnuť požadovanú separáciu jednotlivých zložiek vzorky. Separáciu veľmi zložitých vzoriek možno zlepšiť spojením dvoch kapilárnych kolón do série, formou (i) dvojkolónovej alebo (ii) dvojrozmernej chromatografie.

(i) V dvojkolónovej chromatografii sa spájajú do série dve kolóny s rôznou polaritou. Pri tomto spojení vteká celý efluent z prvej kolóny do druhej kolóny. Polaritu, alebo selektivitu dvojkolónového systému možno meniť v intervale, ktorý určujú vlastnosti oboch kolón.

(ii) Pri dvojrozmernej chromatografii sa do série spájajú dve nezávislé (ortogonálne) chromatografické kolóny.

Dvojrozmernú chromatografiu možno realizovať:

1. Klasickou dvojrozmernou chromatografiou, pri ktorej sa z prvej do druhej kolóny vpúšťajú vhodným prepínačom vybrané frakcie efluentu. Na prenos vybraných frakcií možno využiť viaccestné ventily, alebo Deansov tlakový prepínač toku, ktoré sa často kombinujú s vymrazením časti efluentu na začiatku druhej kolóny a jeho tepelnou desorpciou. Týmto medzichlánkami možno úspešne preniesť z prvej do druhej kolóny len niekoľko frakcií. Preto sa tieto medzichlánky doteraz nepoužili na separáciu mnohozložkových vzoriek úplnou dvojrozmernou plynovou chromatografiou.

2. Úplnou (komprehensívnou) dvojrozmernou chromatografiou, pri ktorej sa efluent vytekajúci z prvej kolóny rozdelí do veľkého počtu malých frakcií, z ktorých každá sa separuje v druhej kolóne. Separácia v druhej kolóne musí byť oveľa rýchlejšia než v prvej. Kľúčovým prvkom inštrumentácie v dvojrozmernej plynovej chromatografii je prevodník (modulátor) medzi kolónami, ktorý umožňuje cyklicky dávkovať úzke frakcie efluentu z prvej do druhej kolóny. Malé objemy efluentu vytekajúce z tejto kolóny sa modulátorom zaostria (fokusuje) a vo veľmi krátkych časových intervaloch dávajú do druhej kolóny. Druhá kolóna je kratšia a s menším vnútorným priemerom, čo umožňuje separovať jednotlivé zložky predchádzajúcej frakcie pred nadávkovaním nasledujúcej frakcie. Pri úplnej dvojrozmernej chromatografii sa ako prevodníky najčastejšie používajú teplotné a vymrazovacie modulátory.

Voľbou nepolárnej kolóny v prvom rozmere sa separácia v tejto časti realizuje na základe prchavosti analytov. Separácia v druhej kolóne, ktorá sa realizuje veľmi rýchlo, je určená selektívnymi alebo špecifickými interakciami, ktoré závisia od polarít zložiek, priestorového usporiadanie substituentov, veľkosti molekúl, alebo optickej aktivity.

Úplná dvojrozmerná chromatografia vykazuje značnú píkovú kapacitu, ktorá je takmer rovná súčtu píkových kapacít kolón spojených do série.

Úplnú dvojrozmernú separáciu možno znázorniť formou kontúrových chromatogramov. Píky zložiek sú na retenčnej ploche usporiadané podľa chemických vlastností, rozmerov molekúl, ich štruktúry a tvaru. Zložky s „rovnakými“ chemickými vlastnosťami eluujú z druhej kolóny s podobnými elučnými časmi, čoho dôsledkom je zoskupenie týchto zložiek v pásoch (skupinách) pozdĺž dvojrozmernej retenčnej plochy. Dvojrozmerný kontúrový chromatogram teda poskytuje prehľad o skupinovom zložení vzorky.

V prednáške sa uvedie princíp komprehensívnej dvojrozmernej plynovej chromatografie a na vybraných príkladoch sa demonštruje jej využitie v praxi.

LITERATÚRA

1. Bertsch W. : J. High Resolut. Chromatogr. 22, 647 (1999).
2. Bertsch W.: J. High Resolut. Chromatogr. 23, 167 (2000).
3. Giddings J.C.: Anal. Chem. 6, 1258A (1984).
4. Marriott P.J., Morrison P.D., Shellie R.A., Dunn M.S., Sari E., Ryan D.: LC-GC Europe 21, 2 (2003).
5. Harynuk J., Górecki T.: J. Sep. Sci. 27, 431 (2004).
6. Hinshaw J.V.: LC-GC Europe 22, 32 (2004).

AKTUÁLNY STAV V JEDNOTNOSTI POUŽÍVANIA METROLOGICKÝCH POJMOV V ANALYTICKEJ CHÉMII

**JÁN LABUDA^a, PAVOL TARAPČÍK^a
a JÁN GARAJ^b**

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

^b EURACHEM-SLOVAKIA, Slovenská republika
jan.labuda@stuba.sk

Úvod

Potreba komunikácie a dorozumenia sa v podmienkach globalizácie výkonu meraní a skúšok ako aj prezentácie ich výsledkov bola a ostáva imperatívom aj pre oblasť analytickej chémie. V tomto ohľade pribudlo v ostatnom čase niekoľko významných medzinárodne prijatých a platných dokumentov, ktoré opätovne aktualizujú zaužívané alebo nanovo zavádzajú novšie metrologické koncepcie a pojmy. Pokiaľ jednou stránkou tejto problematiky je medzinárodný konsenzus vo formulácii pojmov, druhou stránkou je ich pochopenie, preklad a používanie v národných jazykoch spoločenstva. Ukazuje sa, že práve toto je vysoko aktuálnou úlohou platnou pre mnohé krajiny, Česko a Slovensko nevynímajúc. Nadväzne prijímané dokumenty, publikácie v analytických časopisoch, ako aj príspevky na našej konferencii a odborné diskusie poukazujú nielen na potrebu osvety v uvedenom zmysle, ale tiež na problémy v jednotnom chápaní viacerých základných pojmov. Cieľom tohto príspevku je upozorniť na aktuálne vydania medzinárodných dokumentov v oblasti merania v chémii a na stav ich transformácie u nás.

Základné dokumenty a vybrané pojmy

Metrologické aspekty merania v chémii a laboratórnej medicíne vo všeobecnej rovine zohľadňuje nové, v poradí 3. vydanie Medzinárodného metrologického slovníka z r. 2007 (cit.¹). Toto vydanie nahrádza 2. vydanie slovníka z r. 1993 a v tlačenej verzii bolo publikované aj ako dokument ISO (ISO/IEC Guide 99-12:2007, *International Vocabulary of Metrology — Basic and General Concepts and Associated Terms*, VIM). Jeho potrebu vyvolali tiež koncepcie metrologickej nadväznosti, neistoty merania a nominálnych vlastností, ktoré sa stali neoddeliteľnou súčasťou súčasnej metrologie. Slovník nerobí podstatný rozdiel medzi základnými princípmi merania vo fyzike, chémii, laboratórnej medicíne, biológii, alebo technike. Snaží sa zohľadniť požiadavky meria v biochémii, potravinárskych vedách, forensných vedách a molekulárnej biológii. K ďalším zmenám patrí vypustenie koncep-

cií času odozvy, meracích zariadení, manažmentu kvality, pri ktorých odkazuje čitateľa na iné dokumenty. Metrologický slovník si vytyčuje úlohu byť spoločným referenčným základom pre vedcov a technikov, učiteľov aj pracovníkov z praxe, zapojených do plánovania a výkonu merania bez ohľadu na úroveň neistoty merania a oblasť aplikácie, ale tiež pre štátne a medzištátne orgány, akreditačné orgány, profesné spoločnosti a ďalšie. Slovník je bilingválny (anglicko-francúzsky) a má podporiť globálnu harmonizáciu terminológie používanej v metrologii.

Medzinárodný metrologický slovník sa člení do 5 sekcií [Veličiny a jednotky, Meranie, Zariadenia pre meranie, Vlastnosti meracích zariadení, Štandardy merania (Etalóny)], ďalej obsahuje prílohu s koncepčnými diagramami a bohatú bibliografiu. Medzi odkazmi na ISO normy slovník uvádza ISO 5725-1: 1994 „*Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions*“, ktorej sa budeme venovať nižšie.

V časti „Meranie“ definuje metrologický slovník samotné meranie a naň nadväzujúce pojmy vrátane princípu, metódy a postupu merania, výsledku merania, a hodnoty veličiny. Sú zavedené pojmy „Measurement accuracy“ definovaný ako tesnosť zhody medzi nameranou hodnotou a pravdivou („true“) hodnotou, „Measurement trueness“ predstavujúci tesnosť zhody medzi priemerom nekonečného počtu opakovaní nameranej hodnoty a referenčnou hodnotou (s poznámkou, že tieto pojmy sa nemajú zamieňať). Ďalej sa zaviedol pojem „Measurement precision“ ako tesnosť zhody medzi indikáciami alebo nameranými hodnotami získanými opakovaným meraním na tom istom alebo podobných objektoch za špecifických podmienok. Slovník uvádza, že „Measurement precision“ sa zvyčajne vyjadruje číselne, napr. smerodajnou (štandardnou) odchýlkou; používa sa pre definovanie opakovateľnosti a reprodukovateľnosti merania. Ďalej je zavedená chyba merania, neistota merania a s nimi súvisiace pojmy, interval pokrytia (coverage interval), ktorý sa nemá označovať ako interval spoľahlivosti (confidence interval), aby sa vylúčila zámena/miešanie so štatistickou koncepciou. Zaviedli sa tiež pojmy kalibrácia a metrologická nadväznosť, verifikácia, validácia a s nimi súvisiace pojmy, pričom novum je zmena naderadenosti pojmov, keď verifikácia je naderadená validácii. Všetky definície sú doplnené vysvetľujúcimi poznámkami.

Ďalším aktuálnym dokumentom je odporúčanie Medzinárodnej únie čistej a aplikovanej chémie, IUPAC, pod názvom „*Metrological Traceability of Measurement Results in Chemistry: Concepts and Implementation*“ z r. 2009 (cit.²). Tento dokument sa hlási k novému vydaniu Medzinárodného metrologického slovníka a zavádza pojmy v zhode s ním. Dokument obsahuje pojmy koncepcie metrologickej nadväznosti, kalibrácie meracieho systému,

metrologickej nadväznosti vo vzťahu k verifikácii a validácii, medzilaborátneho porovnávania, príklady reťazcov metrologickej nadväznosti výsledkov merania, odporúčania na postupy a i.

Kompendium nomenklatúry analytickej chémie, tzv. Orange Book, vydané IUPAC³ a v súčasnosti dostupné v podstatných častiach aj v elektronickej verzii (www.iupac.org) uvádza pojmy „Accuracy“ a „Precision“ obdobne, ako je uvedené vyššie.

Slovník analytických pojmov (*Glossary of Analytical Terms*) ako produkt EURACHEM, publikovaný v časopise Accreditation and Quality Assurance 1 (1996), 2 (1997) a 3 (1998) a preložený do nemčiny⁴, uvádza celkom 23 základných pojmov používaných v meraní v analytickej chémii a to s pomenovaním pojmov v 16 európskych jazykoch vrátane slovenčiny a češtiny. Pojmy „Trueness“ [pravdivosť (SK), pravdivosť (CZ)], „Accuracy“ [správnosť (SK), správnosť (CZ)] a „Precision“ [presnosť (SK), presnosť (CZ)] majú zmysel v súlade s vyššie uvedenými dokumentami.

Slovenská technická norma STN ISO 5725-1: 2000 „Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania, Časť 1: Všeobecné zásady a definície“⁵ vychádzajúca z ISO 5725-1: 1994, vyjadruje vyššie uvedené 3 základné všeobecné pojmy príslušnej ISO normy a Medzinárodného metrologického slovníka nasledovne:

- presnosť; exaktnosť: tesnosť zhody medzi výsledkom skúšky a prijatou referenčnou hodnotou,
- správnosť: tesnosť zhody medzi priemernou hodnotou získanou z veľkého radu výsledkov skúšok a prijatou referenčnou hodnotou,
- zhodnosť; precíznosť: tesnosť zhody medzi nezávislými výsledkami skúšok získanými pri vopred špecifikovaných podmienkach. V poznámke 10 sa uvádza: „Miera zhodnosti sa zvyčajne vyjadruje pomocou nezhodnosti a počíta sa ako smerodajná odchýlka výsledkov skúšok“.

Pri použití termínov v slovenskom jazyku je evidentný posun voči v staršej domácej odbornej literatúre aj v praxi zaužívanými ekvivalentmi accuracy = správnosť a precision = presnosť. Aj dnes sa neraz, akosi pre istotu či ozrejmenie, v odborných textoch stretávame s duplicitným vyjadrením vo forme „presnosť (precision)“ a pod. V anglickej verzii ISO normy je zaujímavé všimnúť si zoskupenie „Accuracy (trueness and precision)...“, ktoré pripomína niekdajší pojem „spoľahlivosť“, používaný pre výsledky merania charakterizované ako správne a presné. STN však vo význame „accuracy“ používa pojem presnosť.

Metodický list 2 „Jak překládat precision, accuracy a trueness?“, vydaný v r. 2009 EURACHEM-ČR⁶, v úvode konštatuje, že „V České republice se metrologické názvosloví potýká se specifickým problémem, jímž je nejednotnost překladů i některých základních metrologických termínů. Jedná se především o používání českých ekvivalentů anglických termínů precision, accuracy a true-

ness. Tyto termíny se tradičně překládají jinak v oblasti klasické metrologie fyzikálních veličin a jinak v oblasti analytické chemie. Tento metodický list uvádí konsensus, ke kterému se dospělo při překladu třetího vydání Mezinárodního metrologického slovníku, na kterém se podílela řada odborníků.“ Konkrétné pojmy sú uvedené nasledovne: „Překlad zavádí zcela nový ekvivalent pro jeden ze základních termínů nejistotního přístupu k měření „Precision“ a to „precíznost“ (tesnosť shody medzi indikacemi alebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek). „Measurement trueness“ se překládá jako „pravdivost měření“ (tesnosť shody medzi aritmetickým průměrem konečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny) a konečně poslední z trojice sporných termínů „measurement accuracy“ je překládán jako „presnosť měření“ (tesnosť shody medzi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou veličiny měřené veličiny).“ Z uvedeného vyplýva, že rovnako ako v slovenčine, aj v češtine došlo nielen k zavedeniu nových pojmov, ale aj k významovému posunu oproti minulosti a to v podobe accuracy = presnosť.

K „metrologickým“ problémom či hriechom nášho jazyka patria viaceré ďalšie, ako napríklad používanie slova meranie (analytu) v prípade, ak ide o stanovenie, tiež meranie (vzorky), ak ide o analýzu, či meranie v prípade, ak ide o výsledok merania. Častým je ďalej nedostatočné rozlišovanie a zamieňanie samotných pojmov „trueness“ a „accuracy“, „precision“ a smerodajná (štandardná) odchýlka, či chyba a neistota. V špeciálnych oblastiach analytickej praxe sa pre hodnotenie výsledkov merania používajú parametre, s ktorými Medzinárodný metrologický slovník nepracuje.

Záver

V anglickej literatúre teda existuje potrebná kontinuita zmyslu pojmov accuracy a precision, kým na Slovensku a v Česku pri preklade nastala zmena vo význame týchto termínov. Podľa názoru autorov vyvoláva tento stav vážne nedorozumenia v komunikácii ako v odborných kruhoch tak aj vo výučbe. Táto situácia tiež sťažuje prácu so zahraničnou literatúrou a publikovanie v nej podobne, ako je tomu pri používaní niektorých veličín a najmä jednotiek v meraní. Vhodné používanie metrologických pojmov v analytickej chémii si vyžaduje trvalú pozornosť a angažovanosť chemikov pri preklade Medzinárodného metrologického slovníka.

Táto práca bola podporená vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied, projekt č. 1/0852/08.

LITERATÚRA

1. *International Vocabulary of Metrology — Basic and General Concepts and Associated Terms*, 3. vyd., 2007, JCGM (Joint Committee for Guides in Metrology) 200:2008.
2. *Metrological Traceability of Measurement Results in Chemistry: Concepts and Implementation*, IUPAC Recommendations, 2009.
3. *Compendium of Analytical Nomenclature, The Orange Book*, 3rd edition, (J. Inczedy, T. Lengyel, A.M. Ure, ed.), Blackwell Science, 1998.
4. *Illustriertes Glossar zur analytischen Terminologie*, (B. Neidhart, H. E. Albus, ed.), GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Geesthacht 2001.
5. STN ISO 5725-1: 2000 „*Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania, Časť 1: Všeobecné zásady a definície*“, Slovenský ústav technickej normalizácie, Bratislava 2000.
6. Metodický list 2 „*Jak prekládat precision, accuracy a trueness*“, (Z. Plzák, ed.), EURACHEM-ČR, 2009.

SENZORICKÉ HODNOTENIE AKO SÚČASŤ ANALÝZY VÍNA

JARMILA LAŠTINCOVÁ
a **JOZEF KALAŠ**

Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky,
Odbor vinohradníctva a vinárstva, Matúškova 21, 833 16
Bratislava, Slovenská republika
Jarmila.Lastincova@uksup.sk

Úvod

Senzorická analýza je hodnotenie kvality vína zmyslovými orgánmi zrakom, čuchom a chuťou. Hroznové víno je totiž nositeľom takých charakteristík, ktoré chemickou, fyzikálnou, či mikrobiologickou analýzou nemožno určiť. Stupeň zrelosti, sviežosť vína, jeho odrodový charakter, harmóniu, pachute, príchute vína možno spoľahlivo klasifikovať len metódou senzorickej analýzy, hodnotiteľom, ktorý má schopnosti a skúsenosti.

Princíp metódy

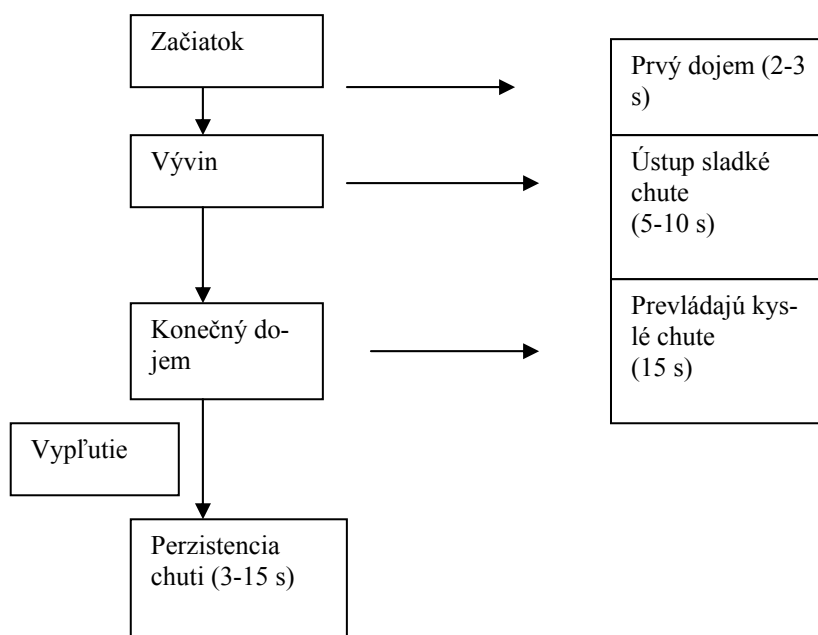
Pri dlhodobej tradícii výroby hroznového vína má osobitné miesto senzorické posúdenie. Kvalitu hroznového vína určujú chemické a senzorické ukazovatele. Chemická analýza vína objektívne informuje o zložení vína a zastúpení jednotlivých zložiek. Neoddeliteľnou a nenahraditeľnou formou celkového hodnotenia vína je aj senzorické hodnotenie.

Niektoré výrazy zo senzorickeho slovníka¹:

1. Senzorická analýza – skúšanie organoleptických vlastností výrobku zmyslovými orgánmi, vrátane spracovania výsledkov ľudským centrálnym nervovým systémom, ktorá je vykonávaná za takých podmienok, kedy je zabezpečené objektívne, presné a reprodukovateľné meranie.
2. Organoleptický – vzťahujúci sa k vlastnosti výrobku vnímanej zmyslovými orgánmi.
3. Senzorický – vzťahujúci sa k použitiu zmyslov.
4. Hodnotiteľ – osoba, ktorá senzoricke hodnotí víno.
5. Základné chute – kyslá, sladká, horká, slaná, kovová a umami (mäsová chuť glutamátu).
6. Zvieravá, trpká – popisuje komplexný pocit sprevádzaný zvieraním alebo sťahovaním pokožky sliznice ústnej dutiny (nejedná sa o základnú chuť).
7. Flavour (chuť a vôňa) – kombinácia čuchových, chuťových a iných pocitov.
8. Hedonický – vzťahujúci sa k obľube.

Víno možno správne hodnotiť len za predpokladu, že posudzovateľ má teoretické i praktické znalosti a schopnosti rozlíšiť, oceniť a popísať rozmanité vlastnosti vína. Pri chutnaní vína treba postupovať veľmi opatrne. Do úst treba vždy vziať rovnaký objem vína. Vínom dookola opláchnuť jazyk, poprípade prebublať, aby sa zvýraznili arómy a nedostatky a potom víno vyplúť².

Keď posudzovateľ nie je schopný presne rozpoznať príslušnú chuť alebo chuťový rozdiel, je dobré ak si vypláchnu ústa, prípadne použije chuťový neutralizá-



tor, odpočinie si 2–3 min a až potom posudzovanie opakuje.

Na súťažiach vín posudzujeme podľa O.I.V. bodovacieho hárku tieto ukazovatele:

- vzhľad – čírosť a farbu (jej sýtosť),
- vôňa – intenzita, jemnosť a kvalita,
- chuť – intenzita, jemnosť a kvalita,
- celkový dojem.

Zrakom posudzujeme čistotu, hustotu a farbu vína a to proti bielu pozadiu. Čuch je tiež nepostrádateľný zmyslový orgán. Nádychom sa vonné látky vína dostávajú k sliznici a reakcia nosnej sliznice je veľmi rýchla (neprekoná ju žiaden plynový chromatograf). Senzorické hodnotenie poukazuje na vyrovnanosť zložiek vína, na kvalitu, intenzitu, harmóniu, či nedostatky ako choroby vo voni a chuti vína.

Pracovné pomôcky a potreby

Hodnotiteľ nesmie byť unavený, musí byť v dobrom fyzickom stave pri sensorickom hodnotení vína. Pred sensorickým hodnotením ani v priebehu hodnotenia nesmie byť ovplyvňovaný názormi iných osôb.

Laboratórium sensorického hodnotenia má mať zabezpečené priestory a podmienky prostredia v zmysle STN ISO 8589, STN ISO 6658 a EA-4/09 (cit.³) pre nerušený priebeh hodnotenia. Hodnotiteľ nesmie byť rušený vonkajšími vplyvmi (hluk) a priestory sensorického laboratória musia byť vyhovujúce. Každý hodnotiteľ má vlastné pracovisko-kóju (box) s dostatočným pracovným priestorom, osvetlením a s dostatočným počtom pracovných pomôcok (minimálne 2 poháre a jeden džbán na odlievanie). Na hodnotenie tichých – bielych, ružových, červených a tokajských vín sa používajú jednoduché poháre z tenkého bezfarebného skla tulipánového tvaru so stopkou. Na hodnotenie akostných šumivých vín a pestovateľského sektu sa používajú poháre z tenkého bezfarebného skla úzke, vysoké so stopkou.

Výsledky hodnotiteľ zapisuje len do záznamu o zmyslovom hodnotení a pre vlastné poznámky počas hodnotenia môže použiť pomocný papier.

Ako regeneračný záhryz sa podáva málo aromatický chlieb, nekvasený chlieb a tvrdý syr neutrálnej chuti po 30-tich vzorkách.

Zásady pri sensorickom hodnotení

Predkladanie vzoriek vína pri sensorickom hodnotení podľa farby je v nasledovnom poradí: ako prvé sa ochutnávajú vína biele, ružové a potom červené.

Predkladanie vína pri sensorickom hodnotení podľa členenia v deklarovanej odrode je nasledovné:

1. Vína s chráneným zemepisným označením – regionálne vína.
2. Vína s chráneným označením pôvodu s tradičnými názvami: akostné víno odrodové, akostné víno

značkové, akostné vína s prívlastkom (od kabinetného po slamové víno), akostné šumivé víno V.O., Pestovateľský sekt, akostné aromatické šumivé víno, tokajské vína (samorodné suché, sladké, a od tokajského výberu 3-putňového po tokajský výber 6-putňový).

Predkladanie vína podľa ročníka musí byť v nasledovnom poradí: postupujeme od najmladších ročníkov po najstaršie ročníky. Predkladanie vín v deklarovanom ročníku je nasledovné: najprv sa nalievajú slabo aromatické vína, po nich vína s výraznejším buketom a nakoniec vína silne aromatické (s vôňou muškátu).

Predkladanie vína pri sensorickom hodnotení podľa deklarovaného zvyškového cukru v ročníku v nasledovnom poradí: suché, polosuché, polosladké a sladké. Pri šumivých vínach v poradí: extra brut, brut, extra suché, suché, polosuché alebo polosladké a sladké.

Podľa odrody:

- a) biele – Rizling vlašský, Veltlínske zelené, Veltlínske červené skoré, Bouvierovo hrozno, Dievčie hrozno, Feteasca regala, Silvánske zelené, Neuburské, Müller Thurgau, Rizling rýnsky, Chardonnay, Rulandské biele, Rulandské šedé, Aurélius, Sauvignon, Devín, Pálava, Tramin červený, Irsai Oliver, Muškát moravský, Muškát Ottonel
- b) tokajské – Furmint, Lipovina, Muškát žltý, tokajské samorodné suché, tokajské samorodné sladké, tokajský výber 3-putňový až 6-putňový, tokajská výberová esencia
- c) červené – Portugalské modré, Zweigeltrebe, Svätovavrinecké, Frankovka modrá, Rulandské modré, Dunaj, André, Cabernet Sauvignon, Neronet, Alibernet.

Záver

Každá Komisia, ktorá zasadá na ÚKSÚP na sensorické hodnotenie vína, pracuje podľa týchto kritérií, podľa Štatútu Komisie a podľa § 26 zákona č. 313/2009 Z.z. Komisia zasadá v degustačnej miestnosti, ktorá je súčasťou akreditovanej skúšobne vinárskej na Odbore vinohradníctva a vinárstva. Predsedu Komisie a jej členov menuje minister pôdohospodárstva SR. Všetci členovia musia mať platné degustačné skúšky, ktoré zložili na ÚKSÚP na Odbore vinohradníctva a vinárstva. Tieto sa konajú každoročne⁴, platnosť je 5 rokov a sú akreditované podľa ISO 17024: 2004, vykonáva ich certifikačný orgán certifikujúci osoby.

LITERATÚRA

1. STN-ISO 5492: 2009.
2. Bujan J., Artajona J.: *Degustácia vína*, exkluzívne vydanie pre Freixenet, S.A., Rubes Editorial, Barcelona, 1997. Slov. preklad Erich Minárik, Fedor Malík.
3. STN ISO 8589, STN ISO 6658 a EA-4/09.
4. Laštincová J., Kalaš J.: Vinič a víno 3, 5 (2009).

NANOTECHNOLÓGIE, SÚČASNÁ SITUÁCIA A BUDÚCNOSŤ V OBLASTI OCHRANY EURÓPSKÝCH SPOTREBITEĽOV

MILAN MACHALEC

AGRIFOOD, s.r.o., T. Vansovej 28, 971 01 Prievidza,
Slovenská republika
milan.machalec@agrifood.sk

Nanotechnológie sú z hľadiska rozsahu technológie, ktoré používajú materiály neuveriteľne malého rozmeru. Jeden nanometer je milióntina milimetra. Materiály tohto malého rozmeru predstavujú rozdielne vlastnosti v porovnaní väčších častíc (napr. väčšej reaktivity a pohyblivosti v ľudskom tele) a sú stále viac používané v priemyselnom sektore. Nanomateriály sa už používajú v rôznych produktoch dostupné na európskych trhoch ako potraviny, kozmetické výrobky, textilné výrobky, elektrických výrobkoch a v medicíne. V kozmetickom priemysle napríklad niektoré výrobky používajú nanomateriály na výrobu napr. krému proti stárnutiu, a pod.

Nanotechnológie na jednej strane majú potenciál ponúknuť úžitok obzvlášť spotrebiteľom a životnému prostrediu, dávajú nové možnosti. Mohli by byť použité na zlepšenie zdrojov a energetickú efektívnosť zariadení, skladovaciu objemnosť a životnosť batérie, vedúci k príležitostiam novej medicínskej liečbe alebo produktov lepšej výkonnosti, kvality.

Akokoľvek tieto technológie a materiály môžu taktiež predstavovať nové nebezpečenstvo ktoré doposiaľ nebolo hodnotené. Vzhľadom na stúpajúci počet produktov obsahujúce nanomateriály, ktoré sú a budú predávané na európskom trhu zatiaľ bez riadneho posúdenia, mal by sa prezentovať spotrebiteľovi názor na nanotechnológie a nanomateriály a na jeho kladné ale aj záporné stránky, ktoré budú ovplyvňovať jeho život. Používanie nanotechnológií vo výrobe potravín narastá, avšak nie sú stanovené pravidlá na označovanie takýchto potravín. Taktiež nie sú známe riziká, ich posudzovanie, nie je jasná definícia čo sú nanoproducty a nanotechnológie, ale i ďalšie ktoré neupravuje žiadny právny predpis Európskej únie.

Názory na bezpečnosť a zdravie spotrebiteľa sa v tomto smere v odborných kruhoch líšia. O nebezpečí sa zatiaľ nehovorí a preto je potrebné stanoviť pravidlá na posudzovanie rizík u týchto produktoch a ich vplyv na bezpečnosť a zdravie človeka. Príslušná európska legislatíva by mala spotrebiteľovi garantovať, že takéto potraviny sú bezpečné a nemajú negatívny dopad na ich zdravie a na ich život.

BEUC, The European Consumers Organization, so sídlom na 80 rue d'Arlon, 1040 Bruxelles, je spotrebiteľská organizácia, ktorej členmi sú spotrebiteľské organizácie v rámci krajín Európskej únie, ktorej cieľom je chrániť záujmy spotrebiteľov, presadzovať ich požiadavky a vyvíjať tlak na tvorbu legislatívy Európskej únie, stanovením jasných pravidiel v záujme ochrany práv spotrebi-

teľov. Jednou s takýchto požiadaviek je aj bezpečnosť potravín a ochrana zdravia spotrebiteľov.

Moderná doba prináša veľké zmeny, ktoré sa týkajú aj výroby potravín, ako napríklad geneticky modifikované potraviny, prítomnosť alergénov, v neposlednej rade aj tzv. nanopotraviny, o ktorých vieme veľmi málo a spotrebiteľ je často cez médiá doslova bombardovaný informáciami, ktoré cez zrozumiteľný výklad asi ťažko dokáže spracovať. BEUC, Európska spotrebiteľská organizácia úzko spolupracuje a vyvíja aktivity s EFSA, Európskym Úradom pre Bezpečnosť potravín so sídlom v Parme v Taliansku, ktorý má za úlohu hodnotiť na základe vedeckých štúdií dopad a vplyv potravín na bezpečnosť a zdravie spotrebiteľa.

Nanopotraviny patria do zložiek potravín, ktoré sa v súčasnej dobe už vyskytujú na trhu Európskej únie avšak bez predchádzajúceho posúdenia dopadu na bezpečnosť a zdravie spotrebiteľa.

BEUC, Európska spotrebiteľská organizácia k tejto problematike zaujala stanoviska a cez spotrebiteľské organizácie jednotlivých krajín EU požaduje stanoviť jasné pravidlá používania nanotechnológií a nanomateriálov v potravinárstve.

Medzi požiadavky patria:

- **jasná definícia nanomateriálov a nanotechnológií**, v súčasnosti chýbajú takéto definície vedúce k právnej neistote a prekážkam vývoju regulačných požiadaviek.
- **princípy prevencie použité v oblasti nanotechnológií**,
- **hodnotenie bezpečnosti nanomateriálov**, cez nezávislé vedecké výbory predtým ako majú byť použité v spotrebiteľských produktoch s ktorými príde spotrebiteľ do kontaktu,
- **stanovenie primeraných metód na posúdenie bezpečnosti a rizík**, hodnotením všetkých charakteristík nanomateriálov,
- **aktualizácia existujúcej európskej legislatívy**, týkajúcej sa nanotechnológie aplikovanej v predpise na ochranu spotrebiteľského zdravia a bezpečnosti ako aj životného prostredia,
- **aktualizácia, alebo vytvorenie právnych požiadaviek na bezpečnosť**, ako napr. limity nanomateriálov v produktoch a normotvorba použitá na tvorbu testovacích metód a ďalších technických špecifikácií,
- **zvýšená transparentnosť použitých nanomateriálov a označovanie spotrebiteľských produktov obsahujúce nanomateriály**, v produktoch s ktorými príde spotrebiteľ do styku, kde musí byť jasne zadaná prítomnosť takýchto materiálov, dať možnosť spotrebiteľovi na výber
- **účinný účastnícky proces**, v príslušných predpisoch zadefinovať možnosť spotrebiteľom sa zapojiť do

rozhodovania, ktoré budú mať dopad na ich každodenný život.

Na to aby sa požiadavky v záujme spotrebiteľa presadili je potrebné zapojenie sa spotrebiteľských organizácií jednotlivých krajín Európskej únie, s cieľom presadzovania záujmov v rámci ochrany spotrebiteľa a vytvorením jednotných pravidiel v rámci Európskej únie.

Záver

Určitá neistota vyplýva z neznalosti a nedostatku informácii o nanoproduktoch laickej verejnosti, ale aj v odborných kruhoch. Nedostatočné informácie ale aj informovanosť vedú ku krokom, kedy je potrebné stanoviť pravidlá pre občanov Európskej únie.

Je potrebné stanoviť pravidlá a zabezpečiť informovanosť spotrebiteľov aj v tejto oblasti ako sú nanoprodukty, zvlášť nanopotraviny, ktoré môžu mať aj negatívny dopad na bezpečnosť a zdravie spotrebiteľa. Názor spotrebiteľa by mal v každom prípade braný do úvahy pri tvorbe legislatívy Európskej únie, ako aj zabezpečená dostatočná informovanosť spotrebiteľov, ktorá častokrát chýba. Pravidlá v oblasti nanotechnológií sa stávajú nevyhnutné a požiadavka v záujme nebezpečnosti a ochrany spotrebiteľa vyžaduje ich čo najskôr prijať.

V každom prípade je predčasné sa obávať takýchto produktov z hľadiska bezpečnosti a dopadu na zdravie spotrebiteľa. Nanoprodukty treba chápať aj ako produkty, ktoré môžu byť prínosom pre každodenný život spotrebiteľa. Ale to je už úloha odborných inštitúcií, aby nás ako spotrebiteľov o tomto presvedčili.

Abstract

Nanotechnologies are a range of technologies that use materials on an incredibly small scale. One nanometre is a millionth of a millimetre. Materials at this small scale present different properties compared to “bigger” particles and are increasingly being used by industrial sectors to create new products or applications. Nanomaterials are already used in various products available on the EU market such as food, cosmetics, textiles, electric appliances and medicines. Nanotechnologies have a potential to offer benefits in particular to consumers and the environment. However, these technologies and materials may also present new risks which have never been evaluated.

STANOVENIE HYDRAZÍNU V KOTLOVÝCH VODÁCH COULOMETRICKOU TITRÁCIU

**ALENA MANOVÁ, ERNEST BEINROHR
a ROMAN HUDEC**

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita,
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
alena.manova@stuba.sk*

Abstrakt

Cieľom predkladanej práce je stanovenie hydrazínu metódou prietokovej chronopotenciometrie, výber vhodných podmienok merania, určenie vybraných validačných parametrov a aplikovanie postupu na analýzu reálnych kotlových vzoriek vôd z elektrární.

Úvod

Jedným z najdôležitejších problémov v modernom svete je ochrana životného prostredia. V dnešnej dobe dochádza čoraz viac k rozsiahlejšiemu a nekontrolovanému znečisťovaniu prostredia spôsobenému vývojom ľudstva. Znečistenie sa dotýka všetkých zložiek životného prostredia, najmä však pôdy, vody a vzduchu. V súčasnosti je dokázané, že mnohé látky sú škodlivinami a stále sa k nim pridávajú ďalšie, o ktorých sa v minulosti neuvažovalo ako o nebezpečných. Ministerstvo životného prostredia SR v zmysle zákona č.364/2004 Z.z.(vodný zákon) vypracovalo v roku 2003 Program znižovania znečistenia vôd škodlivými látkami a obzvlášť škodlivými látkami, ktorý sa aktualizuje najmenej každých šesť rokov.

Detekcia hydrazínu v ekologických a potravinových vzorkách je dôležitá oblasť výskumu kvôli jeho vysokej toxicite a zdravotným problémom, ktoré spôsobuje v ľudskom organizme. Náležitá pozornosť bola venovaná rôznym derivátom hydrazínu, ktoré sú používané v priemysle, v poľnohospodárstve a iných oblastiach.

V súčasnosti existuje veľa metód na stanovenie hydrazínu vo vzduchu, vode, pôde a iných vzorkách. Mnohé z týchto metód sú zložité na prípravu vzorky a prevedenie samotného merania, čo je samozrejme z ďalšieho hľadiska aj finančne náročné. Naším zámerom bolo navrhnúť jednoduchú, spoľahlivú, presnú a ekonomicky nenáročnú metódu stanovenia hydrazínu. Konkrétne našou snahou bolo navrhnúť coulometrickú alebo chronopotenciometrickú metódu na stanovenia hydrazínu vo vodných vzorkách.

Teoretická časť

Hydrazín (N_2H_4), ($M = 32,045 \text{ g mol}^{-1}$) je molekulový hydrid, ktorý sa skladá z molekúl N_2H_4 (obr. 1).

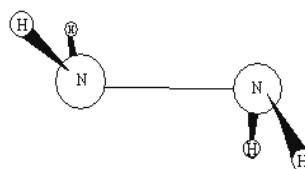
Je to polárna látka tvorená molekulami s nerovinnou geometriou s nepolárnymi kovalentnými väzbami medzi atómami dusíka, konkrétne ide o jednoduchú väzbu H_2N-NH_2 .

Hydrazín je za normálnych podmienok bezfarebná, na vzduchu dymiaca kvapalina ($t_f = 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_v = 113 \text{ }^\circ\text{C}$). Hydrazín N_2H_4 je produkt štvorelektrónovej redukcie didusíka s následnou protonáciou. Pri horení sa uvoľňuje značné teplo, preto sa hydrazín dá použiť ako palivo. Produkty horenia nie sú ekologicky škodlivé polutanty. Hydrazín sa mieša s vodou v každom pomere, pričom stáťím alebo účinkom katalyzátora (napr. Pt) sa disproportionuje. Hydrazín sa v roztoku správa ako dvojsýtna slabá zásada (slabšia ako NH_3).

Výskyt hydrazínu: Hydrazín sa vyskytuje ako vo vode, v pôdach, v potravinách, tabaku, tabakových výrobkoch a keďže ide o prchavú kvapalinu aj vo vzduchu. V biologických vzorkách sa hydrazín nachádza v plazme pečenej a mozgového tkaniva, plazme a moči.

Vplyv hydrazínu na človeka: Hydrazín je dráždivý, dráždi kožu a oči, absorbovatelný cez kožu a jeho vdychovanie vyvolá dráždenie dýchacích ciest, bromchitídu a pulmonárny edém. Tiež je podozrenie, že je mutagénny a karcinogénny. Je génotoxický v bunkách. Je vysoko reaktívny, pomaly sa rozkladá na vzduchu, silne sa adsorbuje na väčšine tuhých povrchov. Je rýchlo metabolizovateľný a vylúčiteľný z tela. Pôsobí na ochranné orgány ako pečeň, obličky a centrálny nervový systém.

Využitie hydrazínu: Hydrazín a jeho deriváty sú používané v priemysle, v poľnohospodárstve a v iných oblastiach. Používajú sa napr. aj na vyvolávanie fotiek. Významné je použitie na prečistenie kyslíka, v raketách, vo výbušninách, insekticídach a nafukovacích čímdlách



Obr. 1. Štruktúra hydrazínu

v plastoch, na chemické syntézy hlavne v agropríemysle i farmaceutickom priemysle a v energetickom priemysle k alkalizácii, ako deoxygenačné činidlo a ku konzervácii teplovodných okruhov. Derivát 1,1-dimetyl-hydrazín sa používa ako palivo rakiet a je tiež rozkladným produktom rastlinného vzrastového regulátora diaminozidu.

Metódy, ktorými sa hydrazín a jeho deriváty dajú stanoviť sú kvapalinová chromatografia, plynová chromatografia, kolorimetricky, titračne-bromátometricky, voltampérometricky, ampérometricky, coulometricky so spätnou titráciou, spektrofotometricky, voltametricky, chemiluminiscenčne, iónovo selektívnou elektródou a nepriamymi metódami^{1–10}.

Experimentálna časť

Pri analýzach sa používala deionizovaná voda dodatočne prečistená zariadením NANOpure firmy Wilkem Werner GmbH. Pre chronopotenciometriu sa táto prečistená voda navyše zbavovala plynov prevarením. Základné roztoky pre chronopotenciometriu boli: elektrolyt $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ hydrogénfosforečnan sodný a roztok hydrazínu 1 g dm^{-3} ; Tritonu X-100, $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ HCl.

Prístroj používaný pri týchto meraniach vyrába firma ISTRAN[®] s označením EcaFlow[®] model GLP 150.

Je to kompaktný laboratórny analyzátor riadený počítačom. Obsahuje meraciu jednotku s mikro počítačom a prietokovým systémom, ktorý je umiestnený na prednom paneli prístroja pod odklopiteľným krytom. Meracia jednotka s programovo prepínateľným potenciostatom/galvanostatom a veľmi rýchlymi a presnými prevodníkmi umožňuje rôzne druhy elektrochemických meraní a rýchle spracovanie meraných údajov. Zariadenie obsahuje elektrochemickú prietokovú celu, do ktorej sa vkladá mikropórovitá uhlíková elektróda s označením E-53C alebo makropórovitá uhlíková elektróda s označením E-104C. Kompaktná prietoková meracia cela ECA^{cell} 353 je



Obr. 2. Prístroj Eca Flow[®] model GLP 150

cela s poréznu uhlíkovou pracovnou elektródou z inertného materiálu, platinovou pomocnou elektródou a termodynamickou chloridostriebornou referenčnou elektródou. Cela nepotrebuje prakticky žiadnu údržbu. Vyznačuje sa vysokou, v mnohých prípadoch 100% elektrochemickou účinnosťou, čo umožňuje úplné vylúčenie aj stopových prvkov na povrchu pracovnej elektródy a tým merať tieto prvky coulometricky, bez potreby kalibrácie.

Výsledky a diskusia

Hlavným cieľom práce bolo navrhnúť jednoduchú, spoľahlivú, presnú a ekonomicky nenáročnú metódu na stanovenie hydrazínu vo vodných roztokoch. V prvom kroku sa optimalizovali parametre merania, hlavne sa zisťovala oblasť potenciálov, kde sa hydrazín oxiduje. Stanovenie hydrazínu metódou galvanostatickej chronopotenciometrie je založené na elektrochemickej premene hydrazínu v póroch pracovnej elektródy pomocou konštantného prúdu. Pri tomto kroku sa zaznamenáva zmena potenciálu v čase a zo získaného chronopotenciogramu sa určí chronopotenciometrický prechodový čas – analytický signál.

Ako pracovnú elektródu sme testovali mikropórovitú elektródu typu E-53C vyrobenú z pórovitého sklovitého uhlíka. Táto elektróda sa vyznačuje veľkým aktívnym povrchom (až 25 cm^2) a malým vnútorným objemom (len $20 \mu\text{l}$). Táto geometria elektródy umožňuje merania tak vo voltametrickom ako aj v plne coulometrickom móde a je základom mnohých techník hydrodynamickkej aj statickej elektrochémie. Vďaka vysokému pomeru povrch/objem prebiehajú elektrochemické deje mimoriadne rýchlo a kvantitatívne a to v celom objeme elektródy. Túto vlastnosť mikropórovitých elektród možno potom úspešne využiť na účinnú, prakticky 100% elektrolyzu roztokov v objeme elektródy, dokonca aj za prietoku roztoku. Pre stanovenie viacerých látok to znamená, že ich možno účinne nahromadiť v objeme elektródy a následne rozpustiť a merať. Ďalšou výhodou mikropórovitej štruktúry elektródy je možnosť následne elektrolyzovať (oxidovať alebo redukovať) analyt v stacionárnom roztoku v objeme elektródy.

Mikropórovité elektródy sú však veľmi citlivé na prítomnosť nerozpustných a koloidných častíc, ktoré pomerne rýchlo upchávajú póry elektródy, a tým ich znefunkčnia. Z tohto dôvodu cez tieto elektródy môžu tiecť len číre roztoky. Táto mikropórovitá elektróda nám umožnila merať hydrazín pri vyšších koncentráciách, čo nebolo pre navrhovanú metódu významné a podstatné.

Preto sme následne ako pracovnú elektródu testovali makropórovitú elektródu typu E-104C taktiež vyrobenú z pórovitého sklovitého uhlíka. Elektróda sa tiež vyznačuje aktívnym povrchom (10 cm^2) a veľkým objemom ($300 \mu\text{l}$). Výhodou je, že nie je tak citlivá na prítomnosť nerozpustných a koloidných častíc, ktoré by mohli upchávať póry. Touto elektródou sa dajú merať aj nie

Tabuľka I

Výsledky stanovenia hydrazínu prietokovou chronopotenciometriou s použitím rôznych elektród v porovnaní s výsledkami získanými spektrofotometrickými metódami

Použitá elektróda	Stanovená koncentrácia (prietoková chronopotenciometria)	Stanovená koncentrácia (spektrofotometrická metóda)
Elektróda E-53C	$(3,02 \pm 0,05) \text{ mg dm}^{-3}$	$(3,05 \pm 0,03) \text{ mg dm}^{-3}$
Elektróda E-104C bez stabilizácie	$(84,0 \pm 6,6) \mu\text{g dm}^{-3}$	$(103,56 \pm 0,05) \mu\text{g dm}^{-3}$
Elektróda E-104C so stabilizáciou	$(116,2 \pm 1,8) \mu\text{g dm}^{-3}$	$(117,16 \pm 0,04) \mu\text{g dm}^{-3}$

úplne číre roztoky a v porovnaní s mikropórovitou má väčšiu životnosť. Ďalšou výhodou elektródy je, že pri použití nižších prúdov je citlivejšia ako mikropórovitá elektróda a z tohto dôvodu sa ňou dajú merať oveľa nižšie koncentrácie, čo bolo pre cieľ danej práce dôležité.

Z chronopotenciometrických záznamov so zvolenými elektródami a elektrolytom vyplynulo, že táto navrhovaná metóda by mohla slúžiť na stanovenie vyšších i nižších koncentrácií hydrazínu. Počas našich meraní sa preukázalo, že mikroporézna uhlíková elektróda E-53C je vhodná na meranie vyšších koncentrácií hydrazínu. Lineárny rozsah sa pohyboval niekoľkých stoviek $\mu\text{g dm}^{-3}$ až po desiatky mg dm^{-3} . Naproti tomu makroporézna uhlíková elektróda E-104C je vhodná na meranie nižších koncentrácií, ako to vyplýva z nameraných výsledkov. Tento typ elektród je vhodný pre koncentrácie hydrazínu od $23 \mu\text{g dm}^{-3}$ vyššie. V kotlových vodách v elektrárnach sa nachádzajú rôzne látky a ióny, ktoré môžu ovplyvňovať stanovenie hydrazínu pri prietokovej chronopotenciometrii. K takýmto látkam patria ióny prítomné v kotlových vodách (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) a amoniak. Merania prebiehali v potenciostatickom móde a prejavovali sa tu interferencie látok, ktoré majú rušivý vplyv pri meraní, tým že spôsobujú zníženie signálu, zvýšenie pozadia a posun píkov k vyšším potenciálom v závislosti od ich prítomnej koncentrácie. Ak sú prítomné anorganické kationy, možno ich odstrániť zapojením vhodných ionexov. Najväčšie interferencie sme zaznamenali pri železnatých a mednatých katiónoch, menšie pri železitých katiónoch a najmenšie pri amoniaku. Uvedené interferujúce kationy v prítomnosti hydrogenfosforečnanu sodného spôsobujú vznik zrazeniny, čo vedie k vyššie uvedeným rušivým vplyvom a k upchávaniu elektród. Diagramy získané pre opakovateľnosť a reprodukovateľnosť na mikroporéznej elektróde E-53C poukazujú, že táto je vyhovujúca, ale pri makroporéznej elektróde E-104C pokiaľ nie je modelová vzorka hydrazínu stabilizovaná je to horšie. Pre zlepšenie signálu, v prípade modelovej vzorky hydrazínu bez stabilizácie, sme použili Triton X-100, ktorý napomáha, aby sa v póroch elektródy nezadržiavali bublinky vzduchu a nerušili signál a teda stanovenie hydrazínu. Signál na makroporéznej elektróde E-104C pri nízkych koncentráciách hydrazínu klesá, pretože hydrazín nie je stály a oxiduje sa prítomným

kyslíkom. Z tohto dôvodu sa použila stabilizácia modelovej vzorky hydrazínu kyselinou chlorovodíkovou. Po stabilizácii je signál vyšší a stály dlhšiu dobu až niekoľko dní. Bol skúmaný aj vplyv koncentrácie hydrogenfosforečnanu sodného ako elektrolytu na stanovenie hydrazínu. Zistilo sa, že koncentrácia hydrogenfosforečnanu bude mať vplyv na stanovenie hydrazínu až pri omnoho vyšších koncentráciách ako je nami zvolená a používaná koncentrácia. Ďalej sme našu navrhnutú metódu prietokovej chronopotenciometrie porovnali s používanou spektrofotometrickou metódou (tabuľka I).

Získané výsledky sme podrobili Studentovmu t-testu a f-testu. Pomocou t-testu sme zistili, že nami vyvinutá metóda je správna na mikroporéznej elektróde E-53C aj na makroporéznej elektróde E-104C pokiaľ je vzorka stabilizovaná pomocou HCl a f-testom sme zistili, že navrhovaná metóda poskytuje presné výsledky na mikroporéznej elektróde E-53C ale na makroporéznej elektróde E-104C sú výsledky nepresné. Týmto dvoma testami sme na mikroporéznej elektróde E-53C vyhodnotili vplyv interferentov a zistili kedy štatisticky významne ovplyvňujú meranie hydrazínu a zároveň, že nami uskutočnené merania boli presné.

Záver

Predkladaná práca je zameraná na štúdium možnosti stanovenia hydrazínu metódami coulometrie a chronopotenciometrie, na navrhnutie jednoduchej, účinnej metódy a výber vhodných podmienok pre jeho stanovenie. Práca je tiež zameraná na určenie vybraných validačných parametrov stanovenia hydrazínu navrhnutou metódou, na validáciu samotnej metódy a automatizovať tento elektrochemický merací systém pre bezobslužné meranie a aplikovať postup na analýzu reálnych kotlových vzoriek vôd z elektrární.

Použitá metóda, prietoková chronopotenciometria, umožňuje stanoviť koncentrácie hydrazínu od $23 \mu\text{g dm}^{-3}$ vyššie v závislosti od použitej elektródy a použitého stripovacieho prúdu. Ďalej bolo dôležité optimalizovať parametre, ktoré meranie ovplyvňujú, hlavne výber vhodného prúdu. Tu sme sa rozhodli pre $200 \mu\text{A}$ pre

mikroporéznu elektródu E-53C a 10 μA pre makroporéznu elektródu E-104C aj z dôvodu technickej praxe kvôli dĺžke stripovacieho času, ktorý podľa úvahy má byť čo najkratší.

Detekčný limit (LOD) stanovenia hydrazínu na zariadení EcaFlow bol na makroporéznej elektróde E-104C $7,8 \mu\text{g dm}^{-3}$ s medzou stanovenia (LOQ) $23,4 \mu\text{g dm}^{-3}$ a na mikroporéznej elektróde E-53C empiricky zistený detekčný limit (LOD) bol $0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ s medzou stanovenia (LOQ) $0,7 \text{ mg dm}^{-3}$.

Testovaním inerferencií látok typických pre kotlové vody v elektrárňach na stanovenie hydrazínu sme zistili, že stanovenie ovplyvňujú hlavne meďnaté, železnaté a železité katióny z dôvodu vzniku zrazenín s hydrogenfosforečnanom sodným (elektrolyt) a amoniak, ktorý zvyšuje pozadie.

Metóda prietokovej chronopotenciometrie hydrazínu je jednoduchá, pomerne rýchla metóda s dobrou opakovateľnosťou a reprodukovateľnosťou. Na mikroporéznej elektróde poskytuje presné a správne výsledky a na makroporéznej elektróde správne pokiaľ je vzorka stabilizovaná.

Metóda je vhodná na stanovenie hydrazínu v kotlových vodách v elektrárňach a tiež je vhodná pre priemyselné odpadové vody vypúšťané do povrchových vôd z energetického priemyslu (teplárne a elektrárne).

Prezentovaná práca vznikla za pomoci grantovej agentúry - VEGA (Project No. 1/0500/08).

LITERATÚRA

1. Garaj J., Bustín D., Hladký Z.: *Analytická chémia I*, str. 201. STU, Bratislava 1996.
2. Čakrt M., Krupčík J., Mocák J., Polonský J., Síleš B.: *Praktikum z analytickej chémie*, str. 396. Alfa, Bratislava 1989.
3. Shabani A.M.H., Dadfarnia S., Dehghan K.: *Bull. Korean Chem. Soc.* 25, 213 (2004).
4. Afkhami A., Zarei A.R.: *Talanta* 62 (3), 559 (2004).
5. Safavi A., Abdollahi H., Sedaghatpour F., Nezhad M.R.H.: *Talanta* 59, 147 (2003).
6. Safavi A., Ensafi A.A.: *Anal. Chim. Acta* 300, 307 (1995).
7. Afkhami A., Afshar-E-Asl A.: *Anal. Chim. Acta* 419, 101 (2000).
8. Ortega-Barrales P., Molina-Díaz A., Pascual-Reguera M.I., Capitán-Vallvey L.F.: *Anal. Chim. Acta* 353, 115 (1997).
9. Ensafi Ali A.: *Microchem. J.* 56, 269 (1997).
10. Ensafi Ali A., Chamjangali M. *Arab. J. Anal. Chem.* 59, 129 (2004).

DETERMINATION OF DISSOLVED CATIONIC ALUMINIUM SPECIES AFTER THEIR EXTRACTION BY NANOMETER-SIZED TITANIUM DIOXIDE USING ATOMIC SPECTROMETRY TECHNIQUES

PETER MATUŠ^{a,b}, INGRID HAGAROVÁ^{a,b}, MAREK BUJDOŠ^{a,b}, JANA KUBOVÁ^{a,b}, and PAVEL DIVIŠ^c

^a Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina 1, 842 15 Bratislava 4, Slovakia,

^b Slovak Spectroscopic Society, member of the Association of Slovak Scientific and Technological Societies, Mlynská dolina 1, 842 15 Bratislava 4, Slovakia, ^c Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, Královo Pole, 61200 Brno, Czech Republic
matus@fns.uniba.sk

During the last few decades aluminium and its distribution in the environment has attracted much attention. Its concentration in different environmental samples varied widely. While determination of high aluminium concentrations can be realized without serious problem, reliable determination of its trace and ultratrace concentrations requires the development of enrichment techniques capable of improving both the selectivity and the sensitivity for this analyte. The distribution of monomeric aluminium species in pure water solution shows that „free“ Al^{3+} cations dominate below pH 3.5. The soluble cationic Al-hydroxycomplexes $[\text{Al}(\text{OH})_2]^{2+}$ and $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ are present above pH 3.5 and the colloid $\text{Al}(\text{OH})_3$ exists at pH > 6.0. The $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ species begin to form in solutions above pH 7.0 and are predominant at pH 8.0–9.0. The cationic and anionic sulphato, fluoro, phosphato and some organic complexes of Al are also present in common soluble forms. The extent of Al complexation depends mainly on the availability of Al, solution pH, concentrations of complexing ligands, ionic strength and temperature. Mainly dissolved aluminium labile cationic species („free“ Al^{3+} , $[\text{Al}(\text{OH})]^{2+}$, $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$) are responsible for its toxic effects. The toxicity of $[\text{AlSO}_4]^+$ ions is not always accepted. Complexes of Al with fluorides, phosphates and organic ligands are considered practically nontoxic. Anyway, the knowledge of Al speciation (i.e. the distribution of its physico-chemical forms) is important because this factor predominantly controls the toxicity of Al^{1-13} .

In this work, a solid-phase extraction (SPE) using nanometer-sized titanium dioxide (anatase) as a solid sorbent by batch technique and spectrometric methods such as solution and slurry electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) were employed for the separation, preconcentration and quantification of total dissolved cationic Al species in synthetic and natural water samples¹³.

The TiO_2 sorption kinetics, isotherm and capacity, TiO_2 regeneration and stability, Al desorption and elution,

effect of sample volume, TiO_2 mass, extraction time, pH and coexisting ions were studied. A critical parameter of TiO_2 based SPE is the pH value. In most cases the adsorption of cations proceeds when the solution pH value is higher than the isoelectric point (IEP) of TiO_2 (~ 6.2–6.8), whereas for anion adsorption a pH value lower than IEP is required. In general, it is believed that the adsorption of ions proceeds with the participation of TiO_2 surface hydroxyl groups. Two types of such hydroxyl groups are suggested to exist. One kind of OH groups is assumed to be bound to one Ti^{4+} site (terminal OH) and the second one is bound to two Ti^{4+} sites (bridged OH). At pH values higher than IEP, TiO_2 surface is covered by OH groups and is negatively charged. It becomes active towards cation adsorption. In contrast, the positive surface charge at low pH is caused by adsorbed protons and is able to adsorb anions.

The optimal conditions for the proposed SPE procedure (50 mg TiO_2 , 10 min extraction time, HCl and HNO_3 as eluents), solution and slurry ET AAS (1500 °C pyrolysis and 2600 °C atomization temperatures, magnesium nitrate as matrix modifier) and ICP OES measurements were found. The pH 6.0 was chosen for further SPE experiments in spite of the fact that it is slightly lower than the IEP value for TiO_2 . The reason for this choice was finding that at higher pH the soluble cationic Al species can convert to colloid $\text{Al}(\text{OH})_3$. These colloid species can not be extracted by TiO_2 SPE because of their neutral character. Further, during the centrifugation after TiO_2 SPE the nonsoluble $\text{Al}(\text{OH})_3$ can be separated from the supernatant together with the TiO_2 phase. This can cause the overestimation of the extracted Al fraction concentration. Another factor, which can be affected by the pH, is the stability of TiO_2 slurry for slurry ET AAS measurement. When the pH of the TiO_2 suspension is lower, the spontaneous adsorption of H^+ on titania results in a positive charge on the anatase surface. The reaction among these ions with the same positive charge can keep the slurry stable. In our experiments, RSD values less than 5 % were achieved at the pH 6.0 and the TiO_2 slurry remained stable at least 10 min. At higher pH values, the RSD increased. Finally, the pH 6.0 was chosen and used in the optimized TiO_2 SPE procedure. The same pH value was used for SPE of Al using TiO_2 modified by 8-hydroxyquinoline by Liang et al.¹⁴. It can be assumed that at a working pH value of 6.0 only dissolved cationic Al species are present in filtered samples. The adsorption capacity of 4.1 mg Al g^{-1} TiO_2 was evaluated experimentally from Al adsorption isotherm. This parameter determines the required amount of TiO_2 for quantitative separation of Al from a given solution. This value was close to the adsorption capacity of 5.23 mg Al g^{-1} TiO_2 -oxine¹⁴.

Two modes of the proposed SPE procedure were

Sample	Al determined by solution ET AAS [ng ml ⁻¹]	Al determined by batch & slurry TiO ₂ SPE [ng ml ⁻¹]	Al recovery [%]
NLW1	14.07 ± 1.25	13.94 ± 0.49	99.1
NLW2	13.48 ± 1.87	13.73 ± 0.62	102
NLW3	< LOQ	3.76 ± 0.17	–
NLW4	< LOQ	2.10 ± 0.15	–
NLW5	< LOQ	3.01 ± 0.21	–
NLW6	< LOQ	2.74 ± 0.28	–
NLW7	35.13 ± 2.59	36.18 ± 0.84	103
NLW8	< LOQ	5.91 ± 0.21	–

compared, (I) batch & elution mode with the elution of Al from TiO₂ phase by nitric or hydrochloric acid, and (II) batch & slurry mode (without elution) with the direct TiO₂ phase-slurry sampling. Unfortunately, even such highly concentrated mineral acids as 5 mol l⁻¹ hydrochloric or 5 mol l⁻¹ nitric acid did not provide sufficient results for complete elution of Al from TiO₂ phase (only 75 % Al recovery for HCl eluate analyzed by ICP OES and 55 % Al recovery for HNO₃ eluate analyzed by solution ET AAS). Besides that, increasing chloride concentration in the HCl eluate causes significantly decreasing Al absorbance signals down to 14 % for 5 mol l⁻¹ HCl in ET AAS measurement. Similarly, increasing concentration of nitric acid decreases intensity signals of Al down to 86 % for 5 mol l⁻¹ HNO₃ in ICP OES measurement. From these reasons Al recoveries in the HCl eluates were determined by ICP OES and Al recoveries in the HNO₃ eluates were determined by solution ET AAS. The TiO₂ phase samples, from which Al was completely eluted by neither HNO₃ nor HCl acids, were subsequently analyzed for Al by slurry ET AAS. The amounts of Al recoveries obtained from the eluate and TiO₂-slurry samples were in all cases higher than 90 % of the total measured Al. These data confirmed the accuracy of the obtained results. Finally, the slurry ET AAS was found to be the most suitable measurement method for given purpose because the complete Al elution from TiO₂ by HNO₃ and HCl is not possible. Therefore it is necessary to analyze the solid TiO₂ phase for Al directly, without elution, using SPE mode (II).

Finally, the batch & slurry mode of nano-sized TiO₂ SPE with slurry ET AAS detection and quantification was preferred and used for the determination of total dissolved cationic Al species in synthetic river water, drinking tap water and non-contaminated natural lake water samples filtered through 0.40 µm cellulose nitrate membrane filters. The table shows the batch & slurry TiO₂ SPE results for non-contaminated natural lake water (NLW) samples from Lubietová, NE part of Slovenské Stredohorie Mts, Slovakia. For the comparison of the obtained results the concentrations of Al in filtered NLW samples were directly determined also by solution ET AAS (limit of quantification (LOQ) of ET AAS = 12 ng ml⁻¹). The concentrations of Al in filtered NLW samples were unfor-

tunately lower than the LOQ of ICP OES (50 ng ml⁻¹). The method accuracy was checked by the analysis of filtered lake water CRM TMDA-61 and by the technique of analyte addition (sample spiking). The major matrix components of natural water samples such as K, Na, Mg and Ca do not influence the results. Proposed batch & slurry TiO₂ SPE is limited mainly by linearity of slurry ET AAS calibration curve, limit of detection (LOD) and LOQ, respectively. Under the optimal conditions, the calibration curve for batch & slurry TiO₂ SPE with a 10-fold preconcentration was linear up to 40 ng ml⁻¹ Al. The LOD and LOQ were 0.11 ng ml⁻¹ Al and 0.35 ng ml⁻¹ Al, respectively, with a preconcentration factor of 20 and a relative standard deviation (RSD) lower than 5 %.

The developed method of batch & slurry TiO₂ SPE offers the advantages of separation, preconcentration and direct quantification of total dissolved cationic Al species fraction mostly responsible for its toxic effects in the environment. The developed procedure is relatively simple, rapid and without the need of high-cost instrumentation and can be a useful tool in the Al environmental risk assessment. In certain conditions its separation/preconcentration step can be used directly in the field using the TiO₂ filled plastic microsyringes with filter holder.

The work was supported by Science and Technology Assistance Agency under the contracts No. APVT-20-010204, LPP-0038-06 and SK-CZ-0044-07, by Scientific Grant Agency of Ministry of Education of Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences under the contract No. VEGA 1/0272/08.

REFERENCES

1. Matúš P., Kubová J.: Chem. Listy 96, 174 (2002).
2. Dlapa P., Kubová J., Matúš P., Streško V.: Fresenius Environ. Bull. 11, 626 (2002).
3. Matúš P., Kubová J., Streško V.: Chem. Pap. 57, 176 (2003).
4. Matúš P., Kubová J., Bujdoš M., Streško V., Medved' J.: Anal. Bioanal. Chem. 379, 96 (2004).
5. Matúš P., Kubová J., Bujdoš M., Medved' J.: Anal. Chim. Acta 540, 33 (2005).

6. Kubová J., Matúš P., Bujdoš M., Medved' J.: *Anal. Chim. Acta* 547, 119 (2005).
7. Matúš P., Kubová J.: *J. Inorg. Biochem.* 99, 1769 (2005).
8. Matúš P., Kubová J.: *Anal. Chim. Acta* 573-574, 474 (2006).
9. Matúš P., Kubová J., Bujdoš M., Medved' J.: *Talanta* 70, 996 (2006).
10. Matúš P.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 1214 (2007).
11. Matúš P., Kubová J., in: *Soil contamination: New research*, Chap. 2, p. 43. Nova Science, New York 2008.
12. Bujdoš M., Diviš P., Dočekalová H., Fišera M., Hagarová I., Kubová J., Machát J., Matúš P., Medved' J., Remeteiová D., Vitoulová E.: *Špeciácia, špeciálna analýza a frakcionácia chemických prvkov v životnom prostredí*, Chap. 10, p. 155. Univerzita Komenského, Bratislava 2008.
13. Matúš P., Hagarová I., Bujdoš M., Diviš P., Kubová J.: *J. Inorg. Biochem.* 103, 1473 (2009).
14. Liang P., Yang L., Hu B., Jiang Z.: *Anal. Sci.* 19, 1167 (2003).

RECURRENT RELATIONSHIPS IN CHROMATOGRAPHY AND ELECTROCHEMISTRY

JÁN MOCÁK and ESTERA RÁBAROVÁ

*Department of Chemistry, University of Ss. Cyril and Methodius, J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovak Republic
jan.mocak@ucm.sk*

Key words: sequences, recurrent relations, physicochemical constants, chromatography, linear scan voltammetry

Introduction

In characterization and identification of organic substances various physicochemical constants of organic compounds are widely used like boiling point, melting point, refractive index, permittivity, relative density, dynamic viscosity, surface tension, etc. Importance of these constants emanate from the possibility to use them for recalculation of some important analytical characteristics like retention indices in gas chromatography, which can be used for identification of chromatographic signals. Even though there exist electronic databases and many exploitable handbooks containing detailed information on the constants of organic substances, still not all compounds are described by reliable values, which stems from many reasons like not sufficiently separated contaminants, thermal decomposition, etc. Sometimes the tabulated values are just obsolete. This is the reason why the reliability of experimental data should be permanently checked and the values renewed.

Most of homologous properties (y) of organic compounds change regularly with the number of carbon atoms in the molecule (n), however, these dependences are rarely linear, which creates problems mainly in accurate extrapolations and, in a smaller extent, also in accurate interpolation since the appropriate non-linear function y vs. n may not be known. Contrarily, many of these relationships can exist in a linear form when transformed into recurrent equations like (in the most simple case)

$$y(n+1) = c_0 + c_1 y(n) \quad (1)$$

Recurrent equations were discovered in mathematics many centuries ago and nowadays they are described in standard mathematical texts^{1,2} as well as on various web sites^{3,4} (key word Recurrent Relations). In chemistry, the utilization of linear recurrent relations started probably in 2005 by I. G. Zenkevich⁵ and since that time several important papers were published by him and coworkers^{6–14} concerning different kinds of physicochemical constants and chromatographic outputs.

The present authors used recurrent equations (but

non-linear ones) in simulations of voltammetric signals. Here the most accurate way of calculating current – potential curves ($I - E$) is based on infinite series derived from the original set of partial differential equations^{15–17}. Unfortunately, corresponding infinite series do not converge in the most desired potential region at and beyond the maximum peak current, which is basic for quantitative analysis. Just using non-linear recurrent equations used in epsilon transformation or other transform techniques they can be transformed into convergent sequences¹⁸.

The aim of this work is to give an overview on the use of recurrent relations in general and, particularly, in analytical and physical organic chemistry. The main target will be the application of recurrent relations in (1) chromatography, including examples of accurate calculation of physicochemical constants and retention characteristics, and (2) voltammetry, where the ways of very accurate extrapolation will be firstly presented.

Experimental

Experimentally measured values of physicochemical constants for various groups of organic compounds were acquired from handbooks and databases and the examples of chromatographic retention characteristics were taken from the literature cited in the relevant part of the text. Microsoft Excel was used for calculation of recurrent relationships in all demonstrated cases. Basic calculations in linear scan voltammetry were made using Mathematica¹⁹, ver. 5.0, and UBasic²⁰, ver. 8.8f.

Results and Discussion

Theory of recurrence relations

In mathematics, a sequence is an ordered list containing an ordered set of terms (or elements). The number of terms n is called the length of the sequence, which may be also infinite, so that the sequences can be finite (converging to some limit) or infinite (e.g. all odd positive integers 1, 3, 5, ...). The terms of the sequence can be integer numbers (forming integer sequences), real numbers, etc.

A recurrence relation is an equation that defines a sequence recursively: each term of the sequence is defined as a function of the preceding terms:

$$y_{n+1} = f(y_{n-k}), \quad 0 \leq k \leq n-1 \quad (2)$$

The linear recurrence relation of the $k+1$ order is

$$y_{n+1} = c_0 + c_1 y_n + c_2 y_{n-1} + c_3 y_{n-2} + \dots + c_{k+1} y_{n-k}, \quad 0 \leq k \leq n-1 \quad (3)$$

which is equivalent to another form of equation

$$y(n+1) = c_0 + c_1 y(n) + c_2 y(n-1) + c_3 y(n-2) + \dots + c_{k+1} y(n-k), \quad 0 \leq k \leq n-1 \quad (4)$$

where only the first powers of previous terms y are used and the coefficients c_i are constants (in non-linear recurrence relations the y terms may have another power, may be also in denominator, and the coefficients may depend on n). If $c_0 = 0$ the recurrence relation is called homogeneous otherwise it is called non-homogeneous. Some of the coefficients in eqs. (3) and (4) may be zero, the order of recurrence relation is given by the last non-zero term $y(n-k)$, i.e. by the value of $k+1$.

Originally, recurrent relations were applicable to discrete functions of arguments expressed e.g. by integer values of n . However, the recurrent relations can also be used for approximation of some properties dependent on the arguments x expressed by rational numbers. In this case equidistant argument values must be used:

$$y(x + \Delta x) = c_0 + c_1 y(x) + c_2 y(x - \Delta x) + c_3 y(x - 2\Delta x) + \dots + c_{k+1} y(x - k\Delta x) \quad (5)$$

where the increment Δx is constant.

In mathematics there are several well known examples of using integer arguments, e.g. in recursive definition of factorial:

$$(a) 0! = 1; (b) n! = n(n-1)! \quad \text{where } n \geq 1 \quad (6)$$

or in recursive definition of power:

$$(a) a_0 = 1; (b) a_n = a_{n-1} a \quad \text{where } n \geq 1 \quad (7)$$

In both examples there is (a) a basis, where the function is explicitly evaluated for one or more values of its argument, (b) a recursive step, stating how to compute the function from its previous values. Another often cited example, originated in middle ages, is the Fibonacci sequence 0, 1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, ... , defined as a sequence whose two first terms are $F_0 = 0$, $F_1 = 1$ and each subsequent term is the sum of the two previous ones:

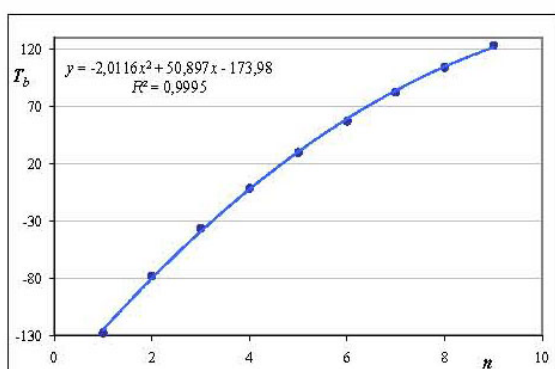


Fig. 1. Typical non-linear dependence of boiling points (in °C) vs. number of carbon atoms n for perfluoro- n -alkanes C_nF_{2n+2}

$$F_{n+1} = F_n + F_{n-1} \quad \text{for } n \geq 1 \quad (8)$$

This is the basis for calculation of golden section ratio frequently used in art and architecture but also for unidimensional optimization in mathematics. Formally, it is the linear homogeneous second order recurrence relation.

The most well-known integral argument in chemistry is the number of carbon atoms in molecules of organic compound homologues. This allows recurrence equations to be effectively used to approximate diverse properties of homologues. Zenkevich applied this principle for calculation of boiling points, critical temperature, viscosity, partition coefficient, chromatographic retention index, refractive index, density surface tension, critical pressure, ionization potential, permittivity and dipole moment (ref.¹² and further papers cited therein).

Recurrent algorithm for estimation of boiling points at the reduced pressure¹³ is an example of using non-discrete arguments and eq. (5) in chemistry. Further utilization of this type of recurrences will be described in further text on voltammetry.

Examples of application of recurrence relations in evaluation of physicochemical constants and in chromatography

An illustrative example of advantageous use of recurrent relations is the dependence of boiling points of a homologous series of compounds vs. number of carbon atoms in the molecule. Fig. 1 shows such a typical dependence for perfluoro- n -alkanes from CF_4 up to C_9F_{20} . The corresponding boiling point data are available in Beilsteins Handbuch der organischen Chemie and are collected also in Ref.⁷. In contrast to the dependence in Fig. 1, the corresponding recurrence relation (Fig. 2) is perfectly linear and exhibits excellent correlation. In constructing the recur-

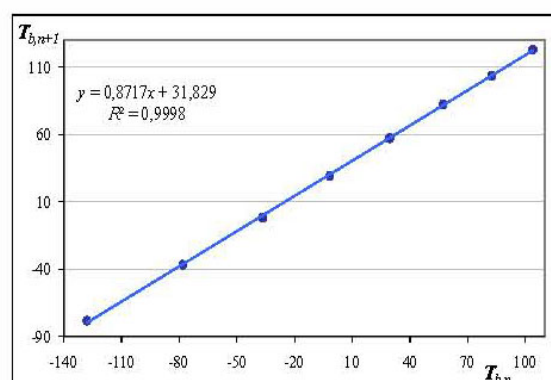


Fig. 2. Linear dependence of the 1st order non-homogeneous recurrence relation $T_b(n+1) = c_0 + c_1 T_b(n)$ for boiling points (in °C) for perfluoro- n -alkanes

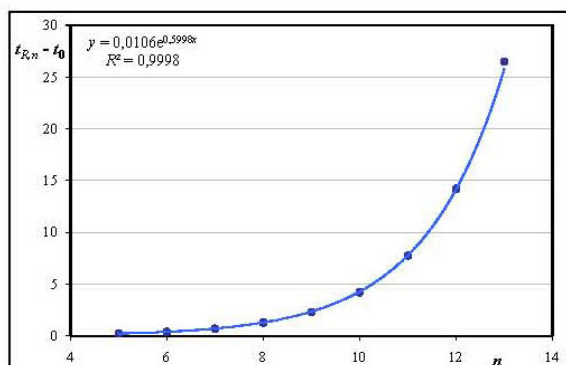


Fig. 3. Non-linear dependence of the net retention time (in min) upon number of carbon atoms n in alkanes C_nH_{2n+2}

rence relation the boiling point data on vertical axis are just shifted by one row with respect to the data corresponding to horizontal axis. It is evident that the calculated linear recurrence dependence allows not only a very accurate interpolation, important when some experimental point within the dependence seems to be dubious, but, what may be even more important, it provides a very good way for extrapolation – here the accuracy of the extrapolation result depends on the accuracy of individual points employed in this dependence.

An important relationship in chromatography relates the selected retention parameter of the homologous series to the number of carbon atoms in the molecule, n . Dependence of retention time t_R on n is non-linear and the same is valid for the net retention time corrected for the dead time t_0 as demonstrated in Fig. 3 constructed for the homologous series of n -alkanes (C_5 to C_{13}). Surprisingly, the relevant first order non-homogeneous recurrence relation of the type $t_R(n+1) = c_0 + c_1 t_R(n)$ provides a perfect linear plot with an excellent coefficient of determination. Such a perfect linearity is achieved regardless of using the not corrected or the net values of retention time, however, the not corrected values are more recommended since any error in t_0 has an adverse effect on the calculation accuracy.

There exists another possibility to plot the net retention time in logarithmic form¹⁴, $\log(t_R - t_0)$ vs. n , which equivalent²¹ to the use of Kovats retention indices:

$$\log(t_R - t_0) = b_0 + b_1 n \quad (9)$$

We have proved a very good linearity of this dependence for the investigated n -alkane series: $b_0 = 1.9753$, $b_1 = 0.2605$, $R^2 = 0.9998$. However, Zenkevich in his more detailed study¹⁴ found that for extrapolation the recurrence relation of the type $t_R(n+1) = c_0 + c_1 t_R(n)$ is much more accurate than the relationship (9); the extrapolation error

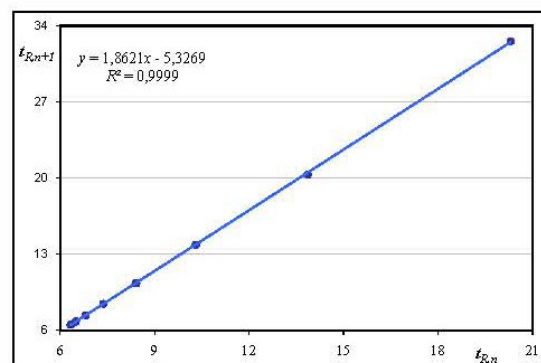


Fig. 4. Linear dependence of the 1st order non-homogeneous recurrence relation $t_R(n+1) = c_0 + c_1 t_R(n)$ demonstrating linearity even for the not corrected values of retention time (in min) for alkanes

of eq. (9) was quite large even for extrapolating by 2 or 3 carbon atoms.

Accurate calculation of voltammetric current by infinite series solution and extrapolation by recurrent relations

Infinite series corresponding to reversible electrode reduction in linear scan voltammetry was given by Nicholson and Shain¹⁵ and later on it was converted for the oxidation process to the form¹⁶

$$I^* = \sum_{j=0}^{\infty} (-1)^j \sqrt{j+1} e^{(j+1)E^*} \quad (10)$$

where I^* and E^* denote dimensionless current and potential, resp., and j is summation index. Only few terms of this series are needed for an accurate current I^* calculation if potential E^* is sufficiently negative (corresponding to the real potential values smaller than formal redox potential of the investigated electroactive compound). However, for the values $E^* \geq 0$ the series (10) is divergent and a good way how to overcome this problem is the use of some transformation of the infinite series into a converging sequence. Generally, several ways of such a transformation were described e.g. by Wimp¹⁸ as well as in our papers^{16,17}. With regard to the use of recurrences it is worth to demonstrate epsilon algorithm, which performs two-dimensional non-linear recurrence equations:

$$\varepsilon_{-1}^{(j)} = 0, \quad \varepsilon_0^{(j)} = s_j, \quad j \geq 0 \quad (11)$$

$$\varepsilon_{k+1}^{(j)} = \varepsilon_{k-1}^{(j+1)} + 1 / (\varepsilon_k^{(j+1)} - \varepsilon_k^{(j)}) \quad , \quad k > 0 \quad (12)$$

The calculation scheme is demonstrated in Fig. 1. As

	$k=-1$	$k=0$	$k=1$	$k=2$	$k=3$	$k=4$	$k=5$
$j=0$		$\varepsilon_0^{(0)}$					
$j=1$		$\varepsilon_0^{(1)}$	$\varepsilon_1^{(1)}$				
$j=2$	0	$\varepsilon_0^{(2)}$	$\varepsilon_1^{(2)}$	$\varepsilon_2^{(2)}$			
$j=3$	0	$\varepsilon_0^{(3)}$	$\varepsilon_1^{(3)}$	$\varepsilon_2^{(3)}$	$\varepsilon_3^{(3)}$		
$j=4$	0	$\varepsilon_0^{(4)}$	$\varepsilon_1^{(4)}$	$\varepsilon_2^{(4)}$	$\varepsilon_3^{(4)}$	$\varepsilon_4^{(4)}$	
$j=5$	0	$\varepsilon_0^{(5)}$	$\varepsilon_1^{(5)}$	$\varepsilon_2^{(5)}$	$\varepsilon_3^{(5)}$	$\varepsilon_4^{(5)}$	$\varepsilon_5^{(5)}$

Calculation element:

$$\begin{array}{cc} \varepsilon_k^{(j)} & \varepsilon_{k+1}^{(j)} \\ \varepsilon_{k-1}^{(j+1)} & \varepsilon_k^{(j+1)} \end{array}$$

Fig. 5. Scheme of epsilon algorithm for first five calculation steps. Calculation starts in the $j=2$ row, the calculation element is first shifted right and then down – in the next row it starts again from the left side

indicated by eq. (12) it uses the non-linear third order homogeneous recurrence relation. Partial sums of the series (10), which involve all terms up to index j , enter to the $k=0$ column. The first value calculated by recurrence is $\varepsilon_1^{(1)}$, which represents the partial sum of the transformed and converging sequence. Further partial sums of this new sequence are the last terms in each row. The algorithm may use several hundreds of rows in difficult cases.

Every transformation algorithm has some limitations and in the studied case it is given by too large exponent when the summation index j is large. Therefore a linear third order non-homogeneous recurrence relation was used for calculation of dimensionless currents I^* at large values

of potential E^* ; in this case the recurrence relation was used for extrapolation purposes. Extrapolation was performed using equation

$$I^*(E^* + \Delta E^*) = c_0 + c_1 I^*(E^*) + c_2 I^*(E^* - \Delta E^*) + c_3 I^*(E^* - 2\Delta E^*) \quad (13)$$

for $\Delta E^* = 0.1$ dimensionless potential units (1 unit corresponds to 25.69 mV). Extrapolation was made for currents in the potential region $E^* = 11.5-19.0$. Extracted results are summarized in Table I. Organization of columns in this spreadsheet table was made in such a way that the whole row (including the predicted current value) could be obtained by one vertical mouse movement, so that the whole table was prepared very quickly in two steps. In the first

Table I

Extrapolation values of dimensionless current I^* calculated by the linear non-homogeneous third order recurrence relation

E^*	$y_{n+1} \equiv I^*$	y_n	y_{n-1}	y_{n-2}	y_{n+1} predicted	y_{n+1} correct	error
8.5	0.197510812	0.198797398	0.200111250	0.201453365	0.197510786	0.1975108117	-2.5346E-08
8.6	0.196250538	0.197510812	0.198797398	0.200111250	0.196250525	0.1962505382	-1.3141E-08
8.7	0.195015670	0.196250538	0.197510812	0.198797398	0.195015666	0.1950156697	-3.5445E-09
8.8	0.193805340	0.195015670	0.196250538	0.197510812	0.193805343	0.1938053397	3.7080E-09
8.9	0.192618721	0.193805340	0.195015670	0.196250538	0.192618730	0.1926187210	8.8794E-09
9.0	0.191455024	0.192618721	0.193805340	0.195015670	0.191455036	0.1914550238	1.2226E-08
...
11.4	0.168847293	0.169627780	0.170419646	0.171223182	0.168847319	0.1688468274	2.5388E-08
11.5	0.168077938	0.168847293	0.169627780	0.170419646	0.168077938	0.1680779025	3.5469E-08
...
13.0	0.157713077	0.158342575	0.158980087	0.159625771	0.157713077	0.1577041514	8.9251E-06
...
19.0	0.130628391	0.130950113	0.131275230	0.131603781	0.130628391	0.1298896927	7.3870E-04

step, the predicted values $I^*(E^* + \Delta E^*)$ were calculated from three previous currents $I^*(E^*)$, $I^*(E^* - \Delta E^*)$ and $I^*(E^* - 2\Delta E^*)$ in the interval of $E^* = 8.5$ to 11.4 and the second and seventh column of the table were made equal (the correct y_{n+1} was set for y_{n+1}). Then, in the second step, to achieve a true extrapolation, the predicted y_{n+1} calculated in the sixth column was set for y_{n+1} in the second column, which in further row was used as y_n (column 3). The correct I^* values at very large E^* were obtained by means of Lerch transcendent function in Mathematica software¹⁷, which unfortunately cannot be used generally for solving further electrochemical infinite series. As a result of very accurate correct I^* values (calculated by epsilon transformation as well as Lerch function) the calculation error after few extrapolation steps was very small but gradually slowly increased. After 76 extrapolations from $E^* = 11.4$ to 19.0 the extrapolation error was only $7.4 \cdot 10^{-4}$, which is an excellent result, not achieved by any of the previously investigated ways of extrapolation.

The support of this work by grants VVCE-0004-07 and VEGA projects 1/1005/09 and 1/0066/0 is highly acknowledged. J.M cordially thanks to Professor Igor G. Zenkevich (St. Peterburg State University) for providing a collection of his articles on recurrences.

REFERENCES

1. Wimp J.: *Computation with recurrence relations*. Pitman Advanced Publishing Program, Boston 1984.
2. Cornell T. H., Leiserson C. E., Riverst R. L., Stein C.: in: *Introduction to Algorithm*, 2nd Ed., Chap. 4, p.62. MIT Press & McGraw-Hill, New York 1990.
3. Griswold R. E.: *Recurrence Relations*. http://www.cs.arizona.edu/patterns/weaving/webdocs/gre_recr.pdf, downloaded March 2010.
4. Wikipedia: *Recurrence Relation*. http://en.wikipedia.org/wiki/Recurrence_relation, downloaded March 2010.
5. Zenkevich I. G.: *Lect. Ser. Comput. Sci.* 48, 1574 (2005).
6. Zenkevich I. G.: *Russ. J. Phys. Chem.* 80, 1636 (2006).
7. Zenkevich I. G.: *Russ. J. Org. Chem.* 42, 1 (2006).
8. Zenkevich I. G.: *Russ. J. Gen. Chem.* 76, 1738 (2006).
9. Zenkevich I. G.: *Russ. J. Gen. Chem.* 76, 1742 (2006).
10. Zenkevich I. G.: *J. Struct. Chem.* 48, 1006 (2007).
11. Zenkevich I. G.: *Russ. J. Phys. Chem., A* 82, 695 (2008).
12. Zenkevich I. G.: *J. Math. Chem.* 46, 913 (2009).
13. Zenkevich I. G., Kostikov R. E.: *Russ. J. Gen. Chem.* 79, 778 (2009).
14. Zenkevich I. G.: *J. Chemometrics* 23, 179 (2009).
15. Nicholson R. S., Shain I.: *Anal. Chem.* 36, 706 (1964).
16. Mocak J.: *Electrochem. Comm.* 4, 803 (2002).
17. Mocak J., Bond A. M.: *J. Electroanal. Chem.* 561, 191 (2004).
18. Wimp J.: *Sequence Transformations and Their Applications*. Academic Press, New York 1981.
19. *Mathematica v. 5.0*. Wolfram Research Inc., Champaign, IL, 1997, <http://www.wolfram.com>.
20. Koyama Y.: *UBASIC v. 8.88f*. Kanazawa University, Japan, 1997, <ftp://rkmath.rikkyolac.jp/pub/ubibm>.
21. Zenkevich I. G.: in: *Encyclopedia of Chromatography*, 2nd Ed., p. 901. Taylor & Francis, New York 2002.

ANALYTIKA REZÍDUÍ PESTICÍDOV V DETSKEJ A DOJČENSKEJ VÝŽIVE METÓDAMI LC/MS/MS A GC/MS/MS

**MARTINA MONOŠÍKOVÁ,
MARIANNA VÍTKOVÁ, LUBOMÍR PÍŠ
a MÁRIA HORECKÁ**

Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (ÚVZ SR), Odbor objektivizácie faktorov životných podmienok, Trnavská 52, 826 45 Bratislava, Slovenská republika
maria.horecka@uvzsr.sk

Úrad verejného zdravotníctva SR používa na stanovenie rezíduí pesticídov v potravinách viaceré metódy, ktoré sa rozdeľujú do troch hlavných skupín – single, skupinové a multireziduálne metódy. Na spracovanie vzoriek detskej a dojčenskej výživy sa použila metóda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe – rýchla, jednoduchá, lacná, efektívna, robustná, bezpečná), ktorá je známa ako multireziduálna metóda na stanovenie rezíduí pesticídov v rastlinných produktoch. Postup zahŕňa extrakciu 10 g vzorky s 10 ml acetonitrilu (ACN) a následnú extrakciu prídavkom bezvodého $MgSO_4$ a $NaCl$. Po centrifugácii nasleduje tzv. disperzívna SPE extrakcia prídav-

kom sorbentov $MgSO_4$ (150 mg/1 ml ACN) a PSA (25 mg/1 ml ACN). Vzorky sa analyzujú na kvapalinovom chromatografe s MS detektorom a na plynovom chromatografe s využitím iónovej pasce a triplequadrupolu. Výťažnosti metód pre naše stanovenie jednotlivých pesticídov v detskej a dojčenskej výžive sa pohybujú v rozmedzí od 76–112 %.

V rámci viacročného národného kontrolného plánu potravín analyzuje ÚVZ SR ročne približne 60 druhov vzoriek. V rokoch 2006–2009 sa analyzovalo 308 vzoriek detskej a dojčenskej výživy (tabuľka I).

Ani jedna zo vzoriek nepresiahla maximálny reziduálny limit (MRL), ktorý je určený smernicami Európskej komisie 2006/125/EC a 2006/141/EC.

LITERATÚRA

1. STN EN 15662, *Potraviny rastlinného pôvodu*. Stanovenie rezíduí pesticídov metódou GC-MS a/alebo LC-MS/MS po predchádzajúcej extrakcií acetonitrilom, fázovom delení a prečistení metódou D-SPE-QuEChERS, Bratislava 2009.

Tabuľka I

Prehľad analyzovaných vzoriek detskej a dojčenskej výživy (MRL – maximálny reziduálny limit)

Rok	Typ vzorky	Počet vzoriek	Prekročený MRL [$mg\ kg^{-1}$]
2006	sušená	31	–
	ovocno/zeleninová	46	–
	tekutá	1	–
	spolu	78	–
2007	sušená	50	–
	ovocno/zeleninová	32	–
	tekutá	2	–
	spolu	84	–
2008	sušená	54	–
	ovocno/zeleninová	32	–
	tekutá	1	–
	spolu	87	–
2009	sušená	22	–
	ovocno/zeleninová	36	–
	tekutá	1	–
	spolu	59	–
Celkom		308	–

QSRR STUDY OF POTENTIAL ANTITUBERCULOTIC AGENTS

**PETER NEMEČEK^a, JÁN MOCÁK^a,
JOZEF LEHOTAY^a, and KAREL
WAISSER^b**

^a Department of Chemistry, University of Ss. Cyril and Methodius, J. Herdu 2, Trnava, 917 01 Slovak Republic,

^b Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
jan.mocak@ucm.sk

Key words: QSRR, HPLC, tuberculosis, 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diones, artificial neural networks, correlation analysis

Introduction

The study of compounds inhibiting the growth of mycobacteria is important with respect to their danger for human kind. With regard to the role of mycobacteria in human infection the threat of tuberculosis is constantly a serious problem in contemporary medicine. Worldwide, tuberculosis (TB) remains the most frequent and important infectious disease causing morbidity and death¹. One-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of TB. The World Health Organization estimates that about eight to ten million new TB cases occur annually worldwide; the incidence of TB is currently increasing and two million people die from tuberculosis every year². In addition to *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. kansasii* are the most widespread strains of nontuberculous mycobacteria among the HIV infected patients and these three strains are the main cause of their mortality. The search for new effective antimycobacterial compounds and design of their optimum molecular structure is therefore a challenging task for current chemistry.

For this purpose a wide group of potential antituberculous agents – derivatives of 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dione (PBOD) was synthesized and biologically tested. A successful QSAR (quantitative structure – activity relationships) study were performed on these compounds and is prepared to be published.

Quantitative structure – retention relationships (QSRR)^{3,4} represent potentially a powerful tool in chromatography. The principal aim of QSRR is to find relationships between chromatographic and molecular properties; QSRRs allow the prediction of retention data of novel, not yet synthesized compounds, only from their molecular and structural descriptors³. It has been observed during our

QSAR studies that some QSAR descriptors (e.g. log *P*) strongly correlate to chromatographic variables, which offers a possibility to investigate their effect upon chromatographic retention. In QSRR and QSAR a similar calculation approach can be used but the target (response) variable is a relevant retention characteristic instead of biological activity.

Artificial neural networks, ANN, represent a new powerful tool for modelling molecular properties in QSRR as well as in QSAR (drug design)^{5–7}, capable to solve effectively non-linear problems. Most utilized ANN architecture is multilayer perceptron (MLP). Such a neural network consists usually of three or four layers – one input layer, one or more hidden layers, and one output layer. Properties of the investigated compounds (QSRR variables) are used at the ANN input and the target retention variable (one or more) is calculated at the output. Before calculating the predicted activity a training process is unavoidable, in which the calculated and the known retention variable of the compound are compared and after a sufficient improvement of their bias the QSRR model is developed. ANN calculations consist of three phases: (1) Training an optimal network using the training set of investigated objects (investigated compounds in this case). (2) Validation of the developed network using again the set of objects with a known output value but not included in the training process (called validation set or selection set) – it enables selecting the network, most suitable for chromatographic prediction. (3) Final independent prediction of retention variable for the compounds belonging to the independent third set – the test set.

The chief goal of this work is investigation of relationships among HPLC retention factors of 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diones and their calculated properties (QSRR variables or descriptors) using ANN as the main calculation tool.

Experimental

Synthesis

The basic structure of the studied 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dione derivatives is depicted in Fig. 1 where the atom numbering follows organic chemistry nomenclature.

For all particular studies, 64 investigated PBOD compounds were prepared from substituted salicylanilides, which also exhibit a significant antimycobacterial activity⁸. Relevant syntheses, most of them performed the first time, are described in detail in our previous papers^{9–15}.

High performance liquid chromatography

An HP 1100 system (Hewlett-Packard, Germany), consisting of a pump with a degasser, a diode-array detector, a 50 μl injector and a HP ChemStation was used. Analyses were carried out on the analytical column Separon SGX C18 (125 \times 4 mm, 7 μm) (Watrex, Prague) at laboratory temperature. Retention time t_R and retention factor k of the compounds under study were determined for two mobile phases, which were optimally used: methanol (Merck, Germany) – water (60/40) and acetonitrile (Merck, Germany) – water (50/50) at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} . Isocratic elution was employed. Evaluations of the number of theoretical plates of the chromatographic column and the peak width at the base-line were made in a standard way. Diode-array detector worked in the range of 190–400 nm and the chromatograms were acquired at wavelength of 280 nm.

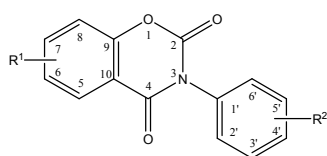


Fig. 1. Structure of 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diones. R^1 substituents: 6-Br; 6,8-Br₂; 6-Cl; 6,8-Cl₂; 7-CH₃; 8-CH₃. R^2 substituents: H; 3'-Cl; 4'-Cl; 3',4'-Cl₂; 4'-Br; 3'-F; 4'-F; 4'-CH₃; 4'-OCH₃; 3'-NO₂; 4'-NO₂; 4'-N(CH₃)₂

QSRR variables and their description

Altogether 66 variables were originally selected for this QSRR study. Their choice was determined by our effort to combine several experimentally measured properties with the calculated variables utilized in computational and theoretical chemistry and available in several software packages. In general, such an approach may lead to an optimum set of variables, which we have proved in our preceding studies¹⁶. The selected variables can be assigned into 6 groups:

- Eight experimental HPLC variables expressing retention characteristics: k_{MeOH} (retention factor) and n_{MeOH} (number of theoretical plates) for methanol / water mobile phase, k_{AcN} and n_{AcN} – for acetonitrile / water mobile phase, as well as their logarithmic forms $\log k_{Me}$, $\log n_{Me}$, $\log k_{AcN}$, $\log n_{AcN}$.
- Three variables expressing the compound solubility: $ALOGpS$, $AclogS$, and $AvlogS$, computed on the web site of Virtual computational chemistry laboratory, VCCL¹⁷.
- Thirteen lipophilicity variables expressing different ways of calculation of $\log P$ quantity (1-octanol / water partition coefficient) obtained by 4 software packages: $LogP$ (ACD/Labs¹⁸), $ClogP$ and $CCLogP$ (ChemDraw¹⁹), $HLogP$ (Hyperchem²⁰), $ALOGPs$, $AClogP$, $miLogP$, $ALOGP$, $MLOGP$, $KOWWIN$,

$XLOGP2$, $XLOGP3$, and $AvlogP$ (VCCL¹⁷).

- Eight molecular properties calculated in ACD/Labs¹⁸: M (molecular weight), MR (molar refraction), MV (molar volume), $Para$ (parachor), IR (index of refraction), ST (surface tension), Den (density), $Polar$ (polarizability).
- Ten quantum chemistry variables calculated in Hyperchem²⁰: $HOMO$, $LUMO$, dLH (difference LUMO – HOMO), DM (dipole moment), HE (hydration energy), $PolarH$ (polarizability), Ref (refractivity), SAA (surface area approximated) and SAG (surface area grid) and Vol (molecular volume); all variables were calculated after geometrical optimization.
- The last group of variables was also calculated in Hyperchem²⁰ and contains 18 single partial charges ($PCI-PCI0$ and $PCI2-PCI7$ for carbons and $PCO2$, $PCO4$ for oxygens of carbonyl groups) and four partial charge averages: $PCAr1$, $PCAr2$ and $PCAr3$ (representing the averaged partial charges of the given aromatic ring using notation in Fig. 2) and $PCBenzox$ (averaged partial charges of Ar1 and Ar2 rings – Fig. 2).

As the target variables four forms of retention factor, namely k and $\log k$ corresponding to two mobile phases were chosen: k_{MeOH} , $\log k_{MeOH}$, k_{AcN} , and $\log k_{AcN}$, where $MeOH$ and AcN denote methanol – water and acetonitrile – water, respectively.

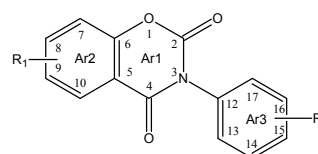


Fig. 2. Numbering of atoms and rings in ACD/Labs for the investigated derivatives of 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diones. R^1 = 9-Br; 7,9-Br₂; 9-Cl; 7,9-Cl₂; 7-CH₃; 8-CH₃. R^2 = H; 14-Cl; 15-Cl; 14,15-Cl₂; 15-Br; 14-F; 15-F; 15-CH₃; 15-OCH₃; 14-NO₂; 15-NO₂; 15-N(CH₃)₂. Note: carbonyl oxygens are numbered 11 and 18, resp

Artificial neural networks

As generally recommended to prevent over-fitting in the ANN modelling, the original data set containing compounds with the measured retention factor for each studied mobile phase was randomly divided into three parts: (1) the training set (about 60 % of compounds), (2) the selection set (about 17 % of compounds), and (3) the test set (about 23 % of compounds). Not all compounds were involved in these studies as a result of failures in HPLC measurements in some cases due to their bad solubility. The distribution of compounds into three sets was performed randomly by Intelligent Problem Solver, IPS, a module of Trajan software²¹. Its main task was to perform automatic performance evaluation of a large amount of possible neural networks. After calculating a preselected number and type of neural networks, IPS gives the

order of performance of the best possible networks for further work. The network performance is first evaluated from the results obtained using the training set, but then the selection set, containing a different series of compounds, is used for a final optimized choice of the best network. The chosen network and the test set were finally used for validation of the predicted ANN retention factor (the k predicted) for further independent series of compounds. Multilayer perceptron, MLP, was used as a chosen type of network. Back propagation (BP)^{6,22} and conjugated gradient (CG)^{23,24} methods were used for adjustment of the weights between the pairs of interconnected neurons. At the start 100–200 BP epochs were used followed by 20–30 CG epochs. ANN calculations using Trajan software and IPS were described in detail in our previous paper¹⁶ where they were successfully implemented.

Results and Discussion

Correlation analysis of QSRR variables

From the calculated correlation table a reduced list of variables was prepared containing the variables most correlated to all used forms of retention factor. In the reduced table (Table I) only the best correlated variables are shown.

Performed study revealed that many in QSAR important variables are highly correlated to retention characteristics. The most important are various forms of lipophilicity ($\log P$) and solubility ($\log S$) as well as the energy of the highest occupied molecular orbital ($HOMO$), hydration energy (HE), dipole moment (DM), molecular weight, molar refraction and polarizability (M , MR , $Polar$) and partial charges ($PC6$, $PC7$, $PC8$, $PC9$) as well as their averages ($PCBenzox$, $PCAr2$). Considering MeOH – water mobile phase, the following variables are highly correlated

to $kMeOH$: $HLogP$, $HOMO$, $AClogS$, $HOMO$, $PC6$, $PC9$ and $PC8$. Regarding AcN – water mobile phase the variables highly correlated to $kAcN$ are: $HOMO$, MV , SAG , $PCBenzox$, $RefH$, $PolH$, $Para$, IR , Vol , $PC7$, M , MR , Den , $Polar$, $LogP$, $ALOGpS$.

Many of these variables were previously used in QSRR studies, where especially easily available physical properties like molar refraction, molar volume, boiling point and molecular weight appeared^{25,26}, but also lipophilicity, polarizability, dipole moment and hydration energy were used^{3,27–29}.

It follows from Table I that the variables which may be important for prediction of retention characteristics are considerably different for two investigated mobile phase. Different is not only quality of the significantly correlated variables but also their amount – much smaller number of significant variables was found for methanol – water system. At the limit $P < 0.05$ for acetonitrile – water 27 significant variables were found but only 7 one for methanol – water mobile phase.

Two steps are characteristic in interaction drug – receptor: (1) transport (penetration) of the active compound to the reaction site, (2) its inherent interaction with the receptor. The transport process is modelled by C18 stationary phase and the selected mobile phase. Of the successfully used mobile phases methanol – water represents hydrogen bond donors and acetonitrile – water phase represents hydrogen bond acceptors. Among the above mentioned descriptors some of them should be important in the transport process, e.g. lipophilicity, solubility, hydration energy and polarizability, other descriptors may be important in the second step, e.g. $HOMO$, surface area and molecular volume. More detailed study of these problems is planned in our further research. After all, it is worth mentioning that two other investigated HPLC columns (NH2 and CN) we have found not suitable due to a poor separation of PBODs.

Table I

Reduced list of the selected variables best correlated to the retention factors with correlation coefficients and the corresponding two-tailed p - values

<i>kMeOH</i>											
Variable	<i>HLogP</i>	<i>HOMO</i>	<i>AClogS</i>	<i>PC6</i>	<i>PC9</i>	<i>PC8</i>	<i>HE</i>	<i>PCBenzox</i>	<i>DM</i>	<i>PCAr2</i>	<i>M</i>
<i>R</i>	0.4988	-0.3868	-0.3825	0.3635	0.2907	0.2829	0.2718	0.2691	-0.2578	0.2511	0.2511
<i>p</i>	0.0002	0.0055	0.0061	0.0095	0.0406	0.0466	0.0562	0.0588	0.0707	0.0786	0.0786
<i>kAcN</i>											
Variable	<i>M</i>	<i>MR</i>	<i>Den</i>	<i>Polar</i>	<i>LogP</i>	<i>ALOGpS</i>	<i>Ref</i>	<i>Para</i>	<i>IR</i>	<i>Vol</i>	<i>PC7</i>
<i>R</i>	0.7665	0.7126	0.6433	0.7100	0.8613	-0.6823	0.6538	0.5996	0.5863	0.5823	0.5791
<i>p</i>	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	2.09E-06	3.98E-06	4.80E-06	5.55E-06
Variable	<i>HOMO</i>	<i>MV</i>	<i>SAG</i>	<i>PCBenzox</i>	<i>HE</i>	<i>ST</i>	<i>DM</i>	<i>PC10</i>	<i>PCAr1</i>	<i>PC6</i>	<i>PC8</i>
<i>R</i>	-0.5642	0.5608	0.5607	0.5345	0.4863	0.4074	-0.4072	0.3563	0.3535	0.3324	0.3227
<i>p</i>	1.08E-05	1.25E-05	1.26E-05	3.75E-05	2.23E-04	2.47E-03	2.48E-03	8.82E-03	9.42E-03	1.50E-02	1.84E-02

Prediction of retention factor using ANN

A relatively large number of descriptors (variables) used at the inputs of neural networks compared to the number of studied compounds adversely influences the ANN performance. Therefore a very important step in ANN calculations is reduction of the number of the used variables. Ultimate variable reduction was made using the results of correlation analysis, where the variables were assessed by their influence upon the retention factor in non-logarithmic form k , which was proved most advantageous according to found correlations. For this purpose the correlation coefficients R and the corresponding significance coefficients p were used; the variables were selected if $P < 0.10$ for Spearman correlation coefficients. Consequently, less than one half of the original amount of 66 variables were selected in ANN for the final QSRR prediction of the PBOD retention factors at two selected chromatographic conditions. The variables were listed by their ranks in sensitivity analysis performed in Trajan software²¹ as a part of the ANN calculations.

After variable reduction step, among the finally selected variables for methanol mobile phase there were 9 quantum chemistry variables, 7 molecular properties, 7 partial charges variables, 2 lipophilicity variables and 1 solubility variable. For acetonitrile mobile phase 9 quantum chemistry variables, 7 partial charges variables, 6 molecular properties, 2 lipophilicity variables and 1 solubility variable were finally selected. Despite some similarity in the mentioned selections the sensitivity analysis performed by Trajan software after performed ANN calculations revealed a very different order of importance of the used variables for two employed mobile phases.

With regard to the ANN architecture three and four layer perceptrons were used, composed of the following number of the input – hidden (– hidden) – output neurons: 25 - 8 - 1 (AcN - water mobile phase) and 26 - 5 - 2 - 1 (MeOH - water mobile phase). Attempts to achieve reasonable ANN results with three-layer perceptron networks for MeOH - water mobile phase failed therefore a more complex network had to be used.

Using the distribution of the PBOD compounds into the training, selection and test sets, the ANN predictions were performed independently for the compounds in all three sets, nevertheless, the most important is the result of independent predictions in the test set. For predictions of the PBOD retention factor for both mobile phases very good results were obtained as demonstrated representative plots of the predicted vs. measured retention factor in Fig. 3 and Fig. 4. The slopes as well as intercepts of all calculated plots are reasonably close to the theoretical values 1.0 and 0.0, resp., which is expected for an optimal straight-line.

This work was supported by the Slovak grant agency VEGA (projects 1/1005/09 and 1/1066/09) and the Czech Ministry of Education (research project MSM0021620822). The help in HPLC measurements by

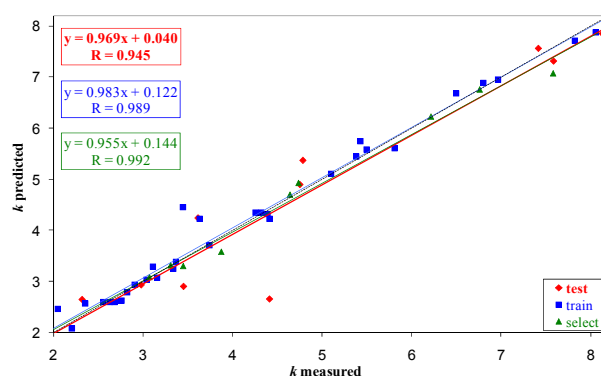


Fig. 3. Prediction of HPLC retention factors for three sets of PBOD derivatives by ANN for C18 stationary phase and acetonitrile - water mobile phase

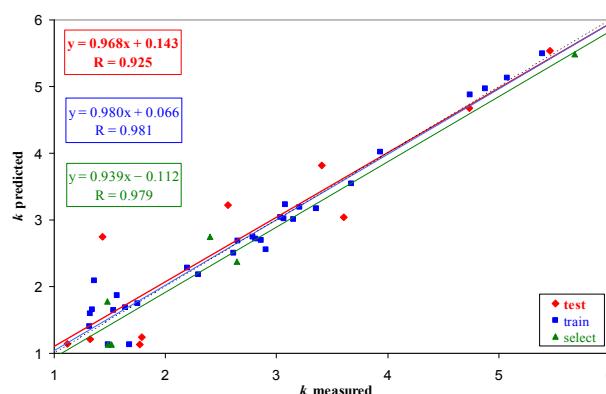


Fig. 4. Prediction of HPLC retention factors for three sets of PBOD derivatives by ANN for C18 stationary phase and methanol - water mobile phase

Dr. J. Škubák (Institute of Analytical Chemistry, Slovak University of Technology in Bratislava) is also highly acknowledged.

REFERENCES

1. Tomioka H, Namba K.: *Kekkaku* 81, 753 (2006).
2. Frieden T. R., Sterling T. R., Munsiff S. S., Watt C. J., Dye C.: *Lancet* 362, 887 (2003).
3. Kaliszan R.: *Structure and Retention in Chromatography. A Chemometric Approach*. Horwood Academic, Amsterdam 1997.
4. Heberger K.: *J. Chromatogr., A* 1158, 273 (2007).
5. Zupan J., Gasteiger J.: *Neural networks in chemistry and drug design*, 2nd ed. Wiley, Weinheim 1999.
6. Haykin S.: *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, 2nd Ed. Prentice-Hall of India, New Delhi 2007.
7. Niculescu S. P.: *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 622, 71 (2003).

8. Waisser K., Matyk J., Divisova H., Husakova P., Kunes J., Klimesova V., Kaustova J., Möllmann U., Dahse H. M., Miko M.: *Arch. Pharm.* 339, 616 (2006).
9. Waisser K., Kubicova L., Klimesova V., Odlerova Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 58, 2977 (1993).
10. Waisser K., Hladuvkova J., Gregor J., Rada T., Kubicova L., Klimesova V., Kaustova J.: *Arch. Pharm. Med. Chem.* 331, 3 (1998).
11. Waisser K., Machacek M., Dostal H., Gregor J., Kubicova L., Klimesova V., Kunes J., Palat K. Jr., Hladuvkova J., Kaustova J., Möllmann U.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1902 (1999).
12. Waisser K., Gregor J., Holy P., Kubicova L., Klimesova V., Kaustova J.: *Cesk. Slov. Farm.* 50, 148 (2001).
13. Waisser K., Hladuvkova J., Holy P., Machacek M., Karajannis P., Kubicova L., Klimesova V., Kunes J., Kaustova J.: *Chem. Pap.* 55, 323 (2001).
14. Waisser K., Bures O., Holy P., Kunes J., Oswald R., Jiraskova L., Pour M., Palat K. Jr., Kaustova J., Danse H. M., Dostal H., Gregor J., Kubicova L., Klimesova V., Kunes J., Hladuvkova J., Möllmann U.: *Pharmazie* 58, 83 (2003).
15. Waisser K., Perina M., Kunes J., Klimesova V., Kaustova J.: *Farmaco* 58, 1137 (2003).
16. Nemecek P., Durcekova T., Mocak J., Waisser K.: *Chem. Pap.* 63, 84 (2009).
17. Virtual Computational Chemistry Laboratory: <http://vcclab.org>, March 2010.
18. ACDLabs 7.0: <http://www.acdlabs.com>, March 2010.
19. ChemDraw 9.0: <http://www.cambridgesoft.com>, March 2010.
20. HyperChem Release 8.0.6.: <http://www.hyper.com>, March 2010.
21. Trajan 6.0 Profesional: <http://www.trajan-software.demon.co.uk>, March 2010.
22. Patterson D.: *Artificial Neural Networks*. Prentice Hall, Singapore 1996.
23. Bishop C.: *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford University Press, Oxford 1995.
24. Shepherd A. J.: *Second-Order Methods for Neural Networks*. Springer, New York 1997.
25. Heberger K.: *Anal. Chim. Acta* 223, 161 (1989).
26. Farkas O., Heberger K., Zenkevich I. G.: *Chemom. Intell. Lab. Systems* 72, 173 (2004).
27. Baczek T., Kaliszan R., Novotna K., Jandera P.: *J. Chromatogr.* 1075, 109 (2005).
28. Amiri A. A., Hemmateenejad B., Safavi A., Sharghi H., Beni A. R. S., Shamsipur M.: *Anal. Chim. Acta* 605, 11 (2007).
29. Perisic-Janjic N. U., Podunavac-Kuzmanovic: *JPC - J. Planar Chrom. – Modern TLC* 21, 1789 (2008).

AKREDITÁCIA SKÚŠOBNÝCH LABORATÓRIÍ V ZMYSLE ZÁKONA O AKREDITÁCII č. 505/2009 Z.z.

JOZEF OBERNAUER

*Slovenská národná akreditačná služba, Karloveská 63,
840 00 Bratislava, Slovenská republika
snas@snas.gov.sk*

Príspevok pojednáva o akreditácii skúšobných laboratórií v zmysle zákona o akreditácii č.505/2009 Z.z. účinného od 1.1.2010.

Poukazuje na nové skutočnosti z pohľadu procesu pri akreditácii, požiadavky a informuje tiež o prechodnom období. Stručne pojednáva aj o dôvodoch schválenia tohto zákona, jeho obsahu ako aj o význame v rámci štátov EÚ.

NEOBVYKLÉ ÚMRTIE AUTOMECHANIKA

**MIROSLAV PÁNIK^a, JOZEF HUBA^a,
PAVOL HRDÝ^b, OLGA ŠMÍDOVÁ^b
a RÓBERT VARGA^b**

^a Kriminálny ústav PZ OPSaKI, Priboj 560, 976 13 Slovenská Lupča, ^b Kriminálny ústav PZ, Sklabinská 1, 812 72 Bratislava, Slovenská republika
miroslav.panik@minv.sk

V poslednom období sa na dopravných komunikáciách zvýšil počet osobných motorových vozidiel s pohonom všetkých štyroch kolies, ktoré môžu majitelia využívať aj v terénnych podmienkach. Jazdné vlastnosti komerčne predávaných vozidiel však nie vždy spĺňajú náročné požiadavky posádky. Príspevok popisuje prípad, v ktorom sa motoristický nadšenec v amatérskych podmienkach snažil vylepšiť jazdné vlastnosti (stabilitu) vozidla zn. JEEP tým, že upravoval šírku rozchodu kolies. Táto činnosť sa mu za veľmi špecifických podmienok stala osudnou.

Na vozidle zn. JEEP (obr. 1) sa nachádzali kolesá s bezdušovými pneumatikami zn. Saverio M/T GT Radial (obr. 2), ktoré boli nahustené na 3,5 atm. Poškodený odmontoval jedno koleso z nápravy vozidla a bez toho,



Obr. 3. Detail posunu privarenej stredovej časti disku

aby vyzul pneumatiku z disku alebo z nej aspoň vypustil vzduchové médium, odbrúsil uhlovou brúskou z disku stredovú časť a spätne ju privaril elektrickým oblúkom na disk. Stredové časti diskov pritom posúval o 5 cm do vnútra disku (obr. 3). Tým chcel dosiahnuť zväčšenie rozchodu nápravy a zlepšenie stability vozidla. Takýmto pracovným postupom sa mu v krátkom čase podarilo upraviť tri disky kolies a kolesá upevniť späť na nápravy. A potom prišiel na rad disk zo štvrtého kolesa, pri úprave ktorého došlo k tragickej udalosti (obr. 4 a 5).

Na prvý pohľad nepochopiteľná tragédia evokovala k otázkam typu: „Prečo sa to stalo? Čo bolo príčinou ne-



Obr. 1. Upravované vozidlo zn. JEEP



Obr. 4. Pohľad na neho



Obr. 2. Koleso na vozidle s upravenou stredovou časťou disku



Obr. 5. Detailný pohľad na poškodenie hlavy neho

šťastia?“. A otázka na príčinu vzniku udalosti sa objavila aj v uznesení o znalecké skúmanie.

Pri policajnom operatívnom šetrení udalosti boli zistené nasledovné skutočnosti:

- nehodu sprevádzal pomerne silný zvukový efekt výbuchu, ktorý počul zamestnanec v susednej hale a ten našiel mŕtve telo „automechanika“,
- v motorovom priestore vozidla zn. JEEP sa našla tlaková nádoba s popisom „Gonfia & Ripara“, jednalo sa o aerosólové balenie (sprej) tesniacej peny na opravu netesností a defektov pneumatík,
- svedok (kolega poškodeného) vypovedal, že tri dni pred udalosťou poškodený použil uvedenú tesniacu penu na opravu jednej pneumatiky z vozidla zn. JEEP, z ktorej unikal stlačený vzduch.

Znaleckým skúmaním predmetov predložených na skúmanie boli zistené nasledovné skutočnosti:

1. Skúmanie poškodeného disku zo štvrtého kola:

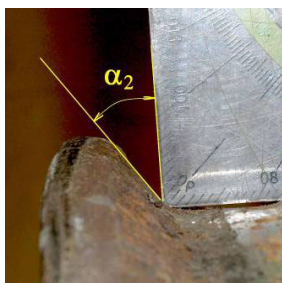
- zistené stopy po odbrúsení stredovej časti (obr. 6),
- na dvoch miestach deformácia jedného ramienka ráfika nárazom do tuhého hranatého predmetu (obr. 7),
- vyhnutie jedného ramienka ráfika do strany po celom obvode disku, silové preťaženie tlakom od pätky pneumatiky (obr. 8, 9),
- na ráfikovej a stredovej časti disku boli stotožnené stopy nátavov po zvaraní (obr. 10 a 11)



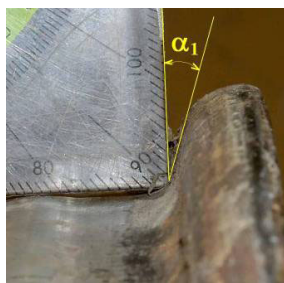
Obr. 6.



Obr. 7.



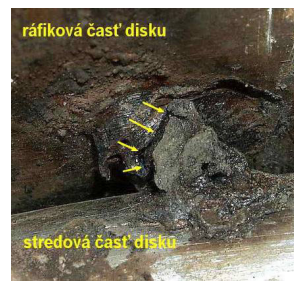
Obr. 8. Tlakové vyhnutie ráfika



Obr. 9. Správne vyhnutie ráfika



Obr. 10. Stopy nátavu na disku



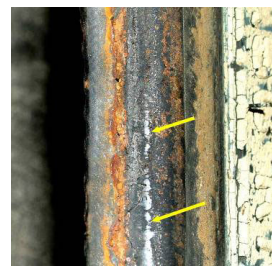
Obr. 11. Stotožnenie nátavov na ráfikovej a stredovej časti disku

2. Skúmanie pneumatiky štvrtého kola:

- jedna pätky vyhnutá smerom von, druhá – protiľahlá smerom dnu (obr. 12 a 13),
- deformácie (vyhnutie) spôsobilo násilné „vyzutie“ pneumatiky z ráfika,
- pneumatika nestihla prasknúť – rýchly dej.



Obr. 12.



Obr. 13.

3. Skúmanie pracovného stola a strešnej konštrukcie:



Obr. 14. Tlakové poškodenie pracovnej dosky stola



Obr. 15. Stopy po náraze tuhého predmetu do stropu

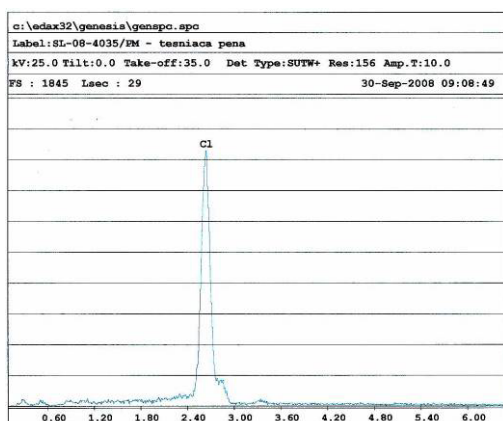
4. Chemická analýza náplne spreja na opravu netesností a defektov pneumatík:



Obr. 16. Použitie balenie spreja

Vzorka z použitého balenia spreja (obr. 16) bola vysušená a vzniknutá elastická hmota bielej farby bola analyzovaná metódou rastrovacej (skenovacia) elektrónovej mikroskopie s energiovo-disperzným röntgenovým fluorescenčným spektrometrom REM/EDX (SEM/EDX). Analýzou bol zistený obsah prvku chlór (obr. 17).

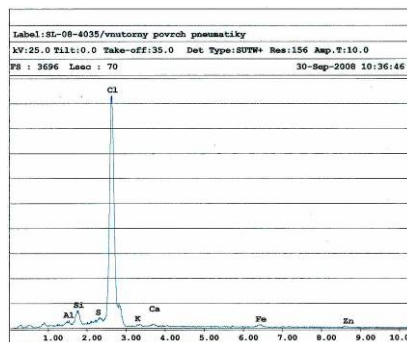
Hnací plyn tvorí cca 40–50 % objemu náplne spreja. Chemickou analýzou plynnej fázy spreja metódou GC/



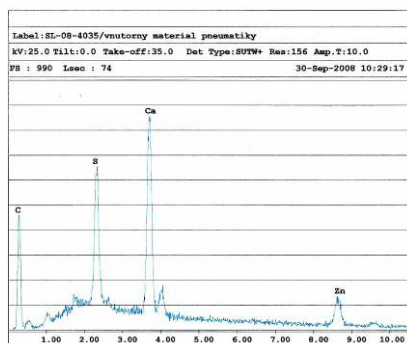
Obr. 17.

MSD bola zistená prítomnosť zmesi vysoko horľavých uhlíkových propán, izobután, bután. Uvedená zmes plynov sa používa ako náhrada freónových hnacích plynov vo väčšine sprejových výrobkov komerčne dostupných v obchodnej sieti.

5. Chemická analýza elastickej hmoty bielej farby nájdená na vnútornej strane opravovanej pneumatiky a analýza materiálu pneumatiky metódou REM/EDX (SEM/EDX)



Obr. 18. Elastická hmota bielej farby nájdená na vnútornej strane pneumatiky

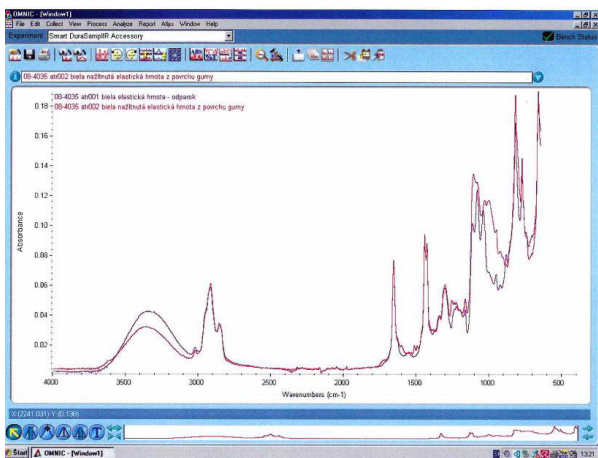


Obr. 19. Materiál pneumatiky

Analýzou elastickej hmoty bielej farby, ktorá bola nájdená na vnútornej strane pneumatiky bol zistený prvok chlór (obr. 18). Analýzou materiálu pneumatiky nebola prítomnosť prvku chlór identifikovaná (obr. 19).

Z porovnania výsledkov analýz (obr. 17, 18, 19) vyplýva, že elastická hmota bielej farby nájdená na vnútornej strane pneumatiky nepochádza z materiálu pneumatiky, ale môže pochádzať z náplne spreja.

6. Chemická analýza elastickej hmoty bielej farby z náplne spreja a elastickej hmoty nájdennej na vnútornej strane oparovanej pneumatiky metódou FT-IR spektroskopie.



Obr. 20. Porovnanie (prekrytie) FT-IR spektier elastickej hmoty bielej farby z náplne spreja (modrá farba spektra) a elastickej hmoty nájdennej na vnútornej strane pneumatiky (červená farba spektra)

Skúmaním FT-IR spektra elastickej hmoty z odparku náplne spreja a porovnaním s knižnicou FT-IR spektier bolo zistené, že sa jedná o materiál na báze chloroprénového kaučuku.

Vzájomným porovnaním FT-IR spektra elastickej hmoty bielej farby z odparku náplne spreja a elastickej hmoty bielej farby nájdennej na vnútornej strane pneumatiky bola zistená značná podobnosť spektier (obr. 20), čo potvrdzuje, že sa jedná o farebne a druhovo zhodný materiál na báze chloroprénového kaučuku.

Záver z znaleckého skúmania:

- v čase zvárania stredovej časti disku do ráfika štvrtého kolesa bola na ráfikovej časti namontovaná nahustená pneumatika s obsahom výbušnej plynnej zmesi propán-bután a vzduch (výbušné medze 1,5–9,5 obj.%), pričom propán-bután pochádzal z hnacieho plynu náplne spreja na opravu netesností a defektov pneumatík,
- pri zváraní došlo k tepelnému prehriatiu steny ráfika (obr. 21), k vznieteniu horľavej zmesi v pneumatike a značnému nárastu tlaku v pneumatike,



Obr. 21. Tepelná stopa po prehriati na vnútornej strane ráfika disku

- tlakové preťaženie v pneumatike viedlo k deformácii (vyhnutiu) jedného ramienka ráfika do strany po celom obvode disku, spôsobilo násilné „vyzutie“ pneumatiky z ráfika, ktoré bolo sprevádzané zvykovým efektom výbuchu,
- vzhľadom na rýchlosť výbušného deja pneumatika nestihla prasknúť,
- disk bol vymrštený z pneumatiky smerom k poškodenému a následne do strešnej konštrukcie haly,
- poškodený bol v čase výbuchu pri zváraní sklonený nad kolesom, disk vymrštený z pneumatiky a tlaková vlna mu spôsobili smrteľné poranenie čelovej časti hlavy,
- expandujúce výbuchové plyny a pneumatika zdeformovali provizórny pracovný stôl.

LITERATÚRA

1. The Philips XL-SEM Basic Course Manual.
2. Genesis Spectrum User's Manual, 9499.203.50000, Revision 3.5, January 2003.
3. ASTM E1421-99 Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Fourier Transform Mid-Infrared (FT-MIR) Spectrometers: Level Zero and Level One Tests.
4. ASTM E1610-95 Standard Guide for Forensic Paint Analysis and Comparison.
5. Bramley R., Brown A., Ellison S., Hardcastle W., Martin A.: Science and Justice 40, 163 (2000).
6. Win-IR Pro, FTS 6000, Microscope, Training Course, Digilab, LCC 2001.
7. ASTM E 1618-06 Standard Test Method for Ingitable Liquid Residues in Extracts from Fire Debris Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

CHARACTERISATION OF BENZO [A] PYRENE OXIDATION PRODUCTS

**MARTIN POLOVKA, PETER ŠIMKO,
EMIL KOLEK, ALENA BEDNÁRIKOVÁ,
and BOŽENA SKLÁRŠOVÁ**

*VUP Food Research Institute, Department of Chemistry
and Food Analysis, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava,
Slovak Republic
polovka@vup.sk*

Summary

Oxidised forms of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from which benzo[*a*]pyrene (BaP) was chosen as a reference to express their dangerousness for living organisms, reveal even stronger toxicity and carcinogenicity than the parental, non-oxidised molecules. It is well known, that these molecules undergo photodegradation processes in which the conjugated aromatic rings in their structure play an active role. However, in spite of their well-documented negative properties, the exact mechanism of BaP degradation, routes of oxidation forms formation and kinetic aspects of these processes have not been studied in a desired extent, up to now. The mechanism of BaP and its analogues oxidation is of crucial importance for food industry, as these compounds frequently appears in smoke and smoking formulations, or are formed during food processing.

In this contribution, the BaP UV-oxidation process under different conditions in solvent of various polarities was studied involving several modern analytical methods, e.g., GC-MS, HPLC-MS-MS and EPR spectroscopy.

Results obtained clearly demonstrated that as a result of photooxidation, plenty of oxidation products are formed, character and structure of which is strongly dependent on solvent used. In spite of the unavailability of relevant information in existing libraries of mass spectra as well as standards of BaP oxidation forms, GC-MS and HPLC-MS-MS methods represent valuable tools suitable for their characterisation and for BaP oxidation progress monitoring. The process of BaP oxidation was also effectively monitored by EPR spectroscopy, indicating possible radical character of BaP photodegradation.

Introduction

Recently the contamination of food chain by various chemical compounds has become an object of intensive research, mostly aimed to the compounds, which are capable to change genetic information. The importance of exact studies of reaction routes of their formation, transformation

or elimination from foods is stressed by the growing incidence of cancers and cancer-related diseases, from which, roughly 50 % represent the cancer of the digestive tract.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) also belong to this group. They are permanently generated not only in the environment but also directly in foods during their thermal processing e.g. by frying, grilling and smoking¹⁻⁶. The urgent need of their study underline also the fact, that this group comprises numerous carcinogenic compounds that can frequently act in organism as co-carcinogens or act synergically, respectively. Basic unit of PAHs is molecule of benzene, they usually contain two or more condensed aromatic rings, frequently substituted by various substituent groups. Great variability of molecular structure as well as the variability of substituents predetermines their potential involvement in processes affecting seriously living organisms⁷. Taking into account the variability of the PAHs group, benzo[*a*]pyrene (BaP) was chosen as the indicator of total PAHs concentration in foods, respecting also widely accepted fact that BaP belongs to the most dangerous carcinogenic chemical compounds⁸.

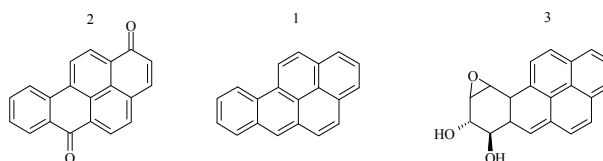


Fig 1. Chemical structure of benzo[*a*]pyrene (BaP, CAS number 50-32-8) (1) and some of its oxidation products - benzo[*a*]pyrene-1,6-dione (2) and benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydroxydiol-9,10-epoxide (3)

The occurrence of PAHs in various environmental components, e.g., water, soil, food or air plants was extensively studied in the past. However, results obtained proved, that only 19.8 % and 0.2 % of overall PAHs exposure comes from air and water, respectively, while their dominant intake/exposure (~ 80 %) comes from food products⁹.

In view of negative impact of PAHs on living organisms, their concentrations in food have been limited by national legislative in many countries. European Commission adopted the EC Regulation 208/2005, in which a group of the most dangerous PAH compounds have been defined, including benzo[*a*]anthracene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*j*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*g,h,i*]-perylene, chrysene, cyclopenta[*c,d*]pyrene, dibenzo[*a,h*]anthracene, dibenzo[*a,e*]pyrene, dibenzo[*a,h*]pyrene, dibenzo[*a,i*]pyrene, dibenzo[*a,l*]pyrene, indeno[*1,2,3-c,d*]pyrene and 5-methylchrysene; and accepted the

expression of their occurrence and toxicological effects via BaP, taking it as reference standard. In the same document, their maximum levels in different foods as well as criteria for sampling and analysis have been set. So the BaP concentration in smoked meats, smoked meat products, muscle meat of smoked fish and smoked fishery products has been limited to $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, whereas in oils and fats and infant diet, to $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ of wet weight¹⁰. Besides that, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) appended to them another compound, benzo[*c*]fluorene, as it has been also considered as genotoxic¹¹. The criteria for regular monitoring of several toxicants, including BaP, were issued also by US Environmental Protection Agency, EPA¹².

As PAHs contain two or more conjugated benzene rings (Fig. 1) that facilitate the absorption in UV (mostly UV-A and UV-B), and in some cases in VIS region, usually their photodegradation occurs in the presence of oxygen as the most frequent way of their transformation in the environment, leading to the generation of various oxidation products^{13–18}. The oxidation itself is possible not only on the surface, but also in liquids transparent to light^{19,20}. Oxidation products of PAHs, especially of BaP, are frequently even more toxic / carcinogenic for living organisms than their parental molecules. It was proved that oxidised BaP compounds (e.g. BaP-7,8 epoxide; BaP-7,8-dihydrodiol; BaP-7,8-dihydrodiol-9,10 epoxide; BaP-1,6 dione; BaP-3,6-dione) have considerably elevated toxic equivalency factors (eventhought 1000 manifold) in comparison to that of BaP²¹.

Thus, the attention of scientific community should focus more intensively on their monitoring in the environment and especially in foods. Recently some studies on the occurrence of oxidised BaP compounds in the environment were published^{19–23}.

However there is still a lack of information on the BaP photodegradation process, its mechanism and kinetic aspects in various environmental conditions. To the best of our knowledge, exact conditions and mechanisms of BaP oxidation processes enabling their regulation, i.e., retardation and/or minimization, or even direction to a desired route as well as the prediction of their reaction routes have not been studied in a desirable extent up to date.

In this contribution, some partial results of the research oriented on the factors affecting the rate of BaP oxidation process are presented. By the original combination of modern analytical methods, i.e., GC-MS, HPLC-MS-MS and EPR spectroscopy, compounds formed during BaP oxidation in various solvents and at various temperature and light conditions were analyzed.

Experimental

Chemicals and reagents

Benzo[*a*]pyrene of analytical grade purity (Supelco, Bellefonte, PA, USA), methanol and *n*-hexane of analyti-

cal grade purity (Merck, Darmstadt, Germany) rectified prior their utilization were used in experiments. As BaP oxidation standards, benzo[*a*]pyrene-6,12-dione (BaP-6,12-dione), benzo[*a*]pyrene-9,10-dihydrodiol (BaP-9,10-diol, National Cancer Institute's Chemical Carcinogen Repository, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, USA), 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene (3-OH-BaP, IRMM, Geel, Belgium) and 9,10-dihydrobenzo[*a*]pyrene-7(8H)-one (BaP-7-one, Chiron Ltd, Trondheim, Norway) were used. In EPR experiments, spin label 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-Oxyl (Tempo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), spin trap 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide (DMPO, Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI) as well as H_2O_2 , NaOH, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ and H_2SO_4 (96%) (Lachema Brno, Czech Republic) were utilized.

Photooxidation of BaP

The photolysis was carried out in a 75 ml glass reactor, equipped with a central inlet at its top to place a quartz immersion for 6 watt low pressure UV lamp ($\lambda = 254 \text{ nm}$) and xenone lamp ($\lambda = 365 \text{ nm}$), which was immersed in a thermostatic bath (Photochemical Reactors LTD, Berkshire RG4 9PA UK).

For the purposes of EPR and GC-MS analysis, the degradation of BaP in polar medium (methanol) and non-polar medium (*n*-hexane) was performed at two wavelengths, $\lambda = 254 \text{ nm}$ and $\lambda = 365 \text{ nm}$ using three BaP concentration levels – 50, 100 and $150 \mu\text{g l}^{-1}$. The oxidation process took maximum 60 min and 660 min and the sampling was performed in regular time intervals, 5 min and 60 min for photooxidation at $\lambda = 365 \text{ nm}$ and $\lambda = 254 \text{ nm}$, respectively. In the case of HPLC-MS-MS, the initial concentration of BaP in both solvents was $c_{0(\text{BaP})} = 20 \text{ mg l}^{-1}$, and the photooxidation was realized during 24 h at a single wavelength, $\lambda = 365 \text{ nm}$.

GC-MS analysis

The analysis of BaP oxidation products was carried out using a GC 6890N gas chromatograph connected to 5973 inert mass selective spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). J&W 123-5731 DB-5HT column ($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.1 \mu\text{m}$) was employed with helium as a carrier gas (flow rate, 1.9 ml min^{-1}). The column temperature was programmed from $60 \text{ }^\circ\text{C}$ to $350 \text{ }^\circ\text{C}$, with the gradient of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. The sample was inserted into the column in pulse split-less mode at $280 \text{ }^\circ\text{C}$. The range of monitored mass was set to 29–500 Daltons.

HPLC-MS-MS analysis

For the purposes of separation and characterisation of BaP oxidation products, HPLC-MS-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) was used. The separation was performed at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ on a Zorbax Eclipse XDB-C18 ($50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$) column using gradient

elution with methanol and water at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. The following gradient program was used: 0–3 min – 60 % methanol, 40 % water; 43–50 min – 100 % methanol; 52–58 min – 60 % methanol, 40 % water. The characterisation of BaP oxidation products was performed in the positive scan mode and in the positive product ion mode, respectively, under the following conditions: for the positive scan mode, Atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) was used as ion source; drying gas (N₂) flow rate, 6 l min⁻¹; gas temperature, 350 °C; vaporizer temperature, 250 °C; nebulizer pressure, 20 psi; capillary voltage, 2,5 kV; fragmentor energy, 140 V; scan time, 500 ms; scan range, 100–600 m/z were used, where as for the positive product ion mode (for the measurement of fragmentation pattern): APCI ionization as ion source; drying gas (N₂) flow, 6 l min⁻¹; gas temperature, 350 °C; vaporizer temperature, 250 °C; nebulizer pressure, 20 psi; capillary voltage, 2,5 kV; fragmentary energy, 140 V; collision energy, 40 eV; dwell time, 100 ms.

EPR experiments

All experiments were performed using a portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker BioSpin, GmbH, Karlsruhe, Germany) with accessory. Different sources of reactive radical species were used to monitor the degree (measure) of BaP oxidation. They were either generated immediately before EPR measurements by mixing the BaP solution (with proper volumes of Fenton reagents (Fe²⁺ (*c*₀=10 mmol l⁻¹) and H₂O₂ (*c*₀=0.1 mol l⁻¹)) or added directly into experimental system (semi-stable radical Tempo).

In the first case, the formation of short-lived radical species in the Fenton system was evidenced by the addition of DMPO spin trapping agent (*c*₀=0.2 mol l⁻¹). Measurements were performed at ambient temperature in quartz flat EPR cell. All measurements started precisely three minutes after the H₂O₂ addition into experimental system and 10 EPR spectra were recorded as accumulation of 30 individual scans, in time domain during 15 min.

In the second case, 0.6 mg of Tempo in solid state was added directly to 2 ml of BaP solution, mixed and exactly 10 min after the addition, EPR spectrum was recorded as an accumulation of 50 individual scans. Besides these, BaP solution in *n*-hexane (100 µg l⁻¹) was oxidised to its cation-radical directly in the EPR cavity by mixing it with conc. H₂SO₄, as described by Sullivan²⁴.

The entire experiments were performed in triplicate mode. The relative standard deviation among the individual measurements was less than 5 %. The response and settings of EPR spectrometer was checked by means of Strong pitch standards (Bruker) before the experiments.

Evaluation of experimental data

The identification of BaP and its oxidation products was performed by GC-MS and HPLC-MS-MS as de-

scribed above, using the appropriate standards. The evaluation of EPR experiments was performed using WinEPR and SimFonia software (Bruker, Karlsruhe, Germany) in a routine procedure as previously described elsewhere²⁵. For the purposes of radicals' concentration evaluation, double-integrated EPR spectrum recorded 10 min after mixing the Tempo radical with respective BaP solution sampled continuously at different time of photooxidation process was used.

Results and discussion

As follows from above-presented information, the photodegradation mechanism of BaP as well as the formation of its oxidation products is, up to now, not studied in the desired extent. Thus, we have encountered several problems during the experiments, not only with the estimation of the most proper experimental conditions, but also with setting the conditions for subsequent analysis of reaction mixture and the determination of products by both GC and HPLC methods involved. Due to these reasons, only four BaP oxidation standards were available, i.e., benzo[*a*]pyrene-6,12-dione, benzo[*a*]pyrene-9,10-dihydrodiol, 9,10-dihydrobenzo[*a*]pyrene-7(8H)-one and 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene and so they were used in experiments. Structures of individual standards are depicted on Fig. 2b.

Results of GC-MS analysis proved (data not presented) that all the standards used, with the exception of benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol, gives clearly resolved symmetric peaks even without any derivatisation. Further experiments were focussed on the monitoring of oxidation products that are formed in a model mixture during 24 h of BaP photooxidation in methanol and *n*-hexane. The subsequent analysis proved that in methanol medium, BaP oxidation products are present in form of corresponding methoxy derivatives. With respect to the unavailability of respective standards and information in existing libraries of mass spectra, their precise characterisation and interpretation of their fragmentation scheme is difficult and practically impossible in this moment. However, as the presence of methoxy derivatives and methanol medium itself in real food matrix is hardly expected in real food products, the further experiments were oriented on BaP oxidation in *n*-hexane, that is, as regard to its polarity, more lipophilic, in order to simulate the conditions in real meat products.

The obtained chromatogram (data not presented) demonstrated that as a result of photodegradation, a complex mixture of co-eluting oxidation products is formed. It should be noted here that the quality of chromatogram, i.e., the separation of individual peaks, is negatively influenced by several objective factors, from which high boiling points of analysed compounds, limiting the length of GC column as well as thickness of stationary phase, are the most important. In spite of this, the analysis of individual mass fragments clearly confirmed the presence of all three expected BaP oxidation products, i.e., hydroxy-BaP derivatives (*m/z* = 268) BaP-ones (*m/z* = 270) and BaP-

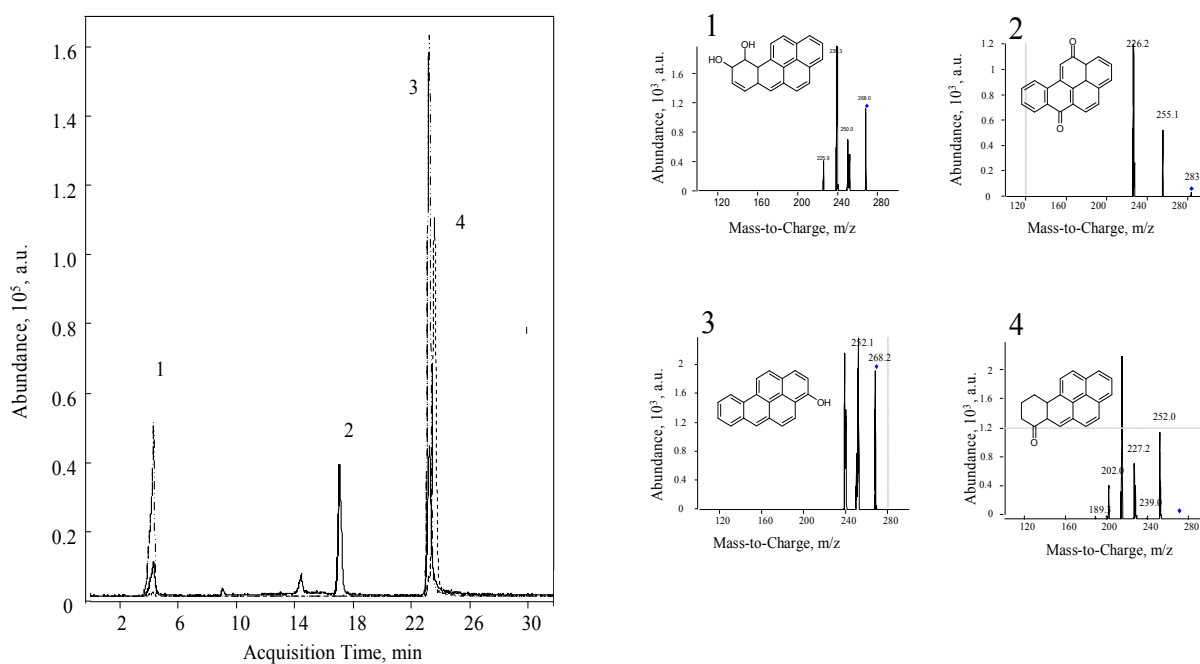


Fig. 2. Overlaid extracted ion chromatograms of standard solutions of oxidised BaP compounds in methanol ($c = 3\text{--}20 \text{ mg l}^{-1}$) (a) and their fragmentation scheme at collision energy 40 eV (b). Individual chromatographic peaks and fragments were attributed to: (1) BaP-9,10-diol, $m/z = 269$; (2) BaP-6,12-dione, $m/z = 283$; (3) 3-OH-BaP, $m/z = 269$; (4) BaP-7-one, $m/z = 271$. Molecular ion is marked with ◆

diones ($m/z = 282$). Due to the same reasons as mentioned in previous paragraphs, the exact assignment of individual peaks could not be performed.

Several problems were connected also with HPLC-MS-MS application on BaP oxidation process monitoring and for oxidation products characterisation.

Usually, the atmospheric pressure photoionisation (APPI) is a method of choice for BaP determination²⁶. However, during the photooxidation of BaP, the formation of new compounds with different polarity than the parental molecule was expected. In addition, as follows from already published data, due to the structural properties of these compounds, electron spray ionisation (ESI) or atmospheric pressure chemical ionisation techniques are more suitable for their determination^{26,27}. Thus, different ionisation techniques were tested. Experimental results clearly proved (data not presented), that ACPI in positive mode offers better fragmentation scheme than APPI or ESI, enabling the effective characterisation of products formed during BaP photooxidation.

In addition, some of the formed oxidation products were colourless, while the others exhibited yellow – to orange colour, having the absorption maxima shifted to 450–520 nm. Last but not least, some of the photoinduced compounds revealed fluorescence activity. Thus, the separation and detection conditions (e.g., mobile phase selection, ionization technique, detection conditions) were optimised to ensure their sufficient separation, as finally mentioned in the experimental section. Due to the same reasons as described above for GC-MS, the identical stan-

dards were also used in all HPLC-MS-MS experiments.

For the sake of illustration, extracted ion chromatograms of BaP oxidation standards obtained under the above-mentioned ionization conditions in positive mode are depicted on Fig. 2a. Benzo[*a*]pyrene-9,10-dihydrodiol (Molar weight, $M = 286 \text{ g mol}^{-1}$) is characterised by the elution time 4.1 min. However, mass fragmentation analysis of chromatographic peak recorded at this time showed only the presence of fragment with $m/z = 269$, probably coming from $[M+H-H_2O]^+$ ion. The elution time 23.0 min is characteristic for 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene ($M = 268 \text{ g mol}^{-1}$). Under the given detection conditions, the formation of pseudo-molecular ion $[M+H]^+$ ($m/z = 269$) was noticed. It should be noted, that as both these compounds contain hydroxyl group, their fragmentation in the negative mode could be possible to perform as well. Benzo[*a*]pyrene-6,12-dione ($M = 282 \text{ g mol}^{-1}$) elutes in $t = 16.7$ min. Similarly like in the previous case, $[M+H]^+$ ion ($m/z = 283$) was observed in mass spectrum. And finally, the elution time of 9,10-dihydrobenzo[*a*]pyrene-7(8H)-one ($M = 270 \text{ g mol}^{-1}$) is 23.3 min and again, the formation of $[M+H]^+$ ($m/z = 271$) was detected in positive mode. While considering the fragmentation schemes of BaP-9,10-diol and 3-OH-BaP (Fig. 2b – (1) and (3)), it is obvious that some of the formed fragments reveal identical mass-to-charge ratio (e.g., $m/z = 268, 252, 239, 226$), but their mutual ratio is different for both compounds. This fact could be effectively used as additional criterion for identification and verification purposes. On the other hand, the fragmen-

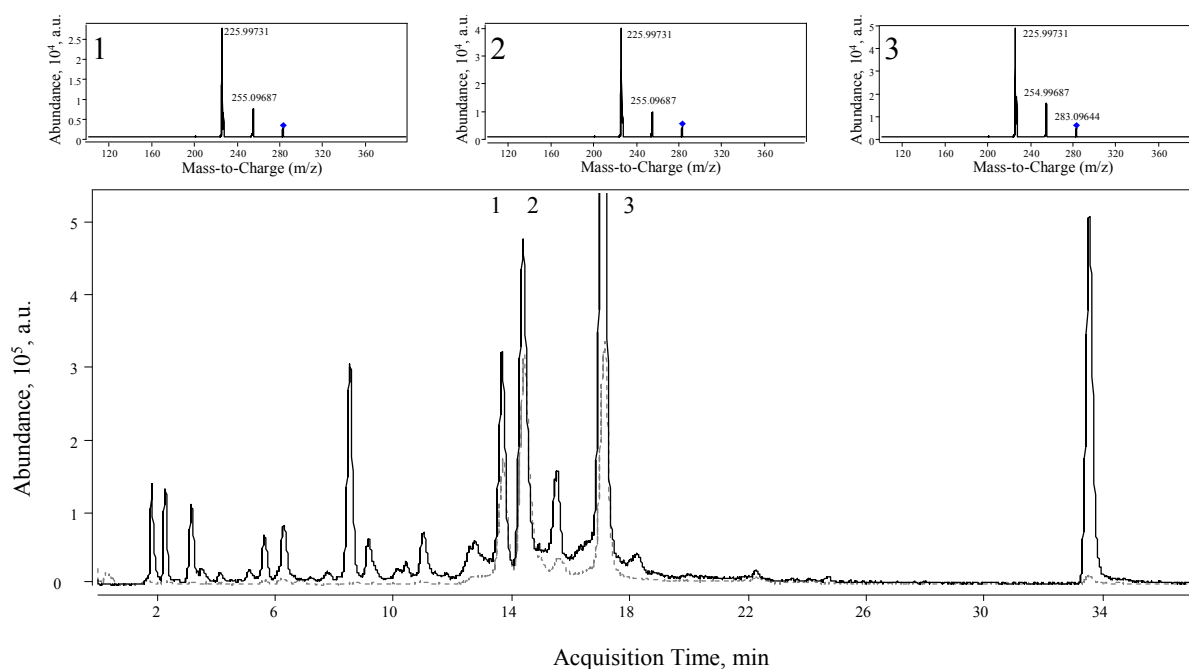


Fig. 3. Overlaid extracted ion chromatograms of BaP solution ($m/z = 283$, concentration, 20 mg l^{-1}) after its photooxidation in methanol (black line) and *n*-hexane (light-gray line) together with fragmentation scheme of selected peaks at collision energy 40 eV . Fragment (3) was unambiguously attributed to BaP-6,12-dione, $m/z = 283$; whereas fragments (1) and (2) corresponds to structures analogous to BaP-6,12-dione, $m/z = 283$ but revealed slightly different retention times. Molecular ion is marked with \blacklozenge

tations of BaP-6,12-dione and BaP-7-one differ significantly (Fig. 2b – (2) and (4)).

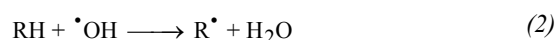
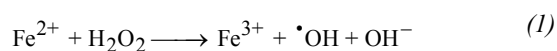
The photolysis of BaP in methanol and *n*-hexane resulted in a much more complex mixture of oxidation-induced products, as finally depicted on Fig. 3. In accord with previously published data, the degradation in methanol medium resulted in the formation of higher number of different compounds than in case of *n*-hexane²⁸. In view of fact, that the existing libraries of spectra do not contain sufficient information for the reliable interpretation of complex chromatographic peaks and their corresponding fragmentation schemes, the results are up to now interpreted only partially. As follows from fragmentation scheme of chromatographic peak marked as 3 (Fig. 3), it gives the molecular ion with $m/z = 283$ $[M+H]^+$ and two other dominant fragments with $m/z = 226$ and $m/z = 255$ $[M^-28]$. The fragmentation pattern as well as retention times correspond well with BaP-6,12-dione (Fig. 2 – (2)). Although peaks 1 and 2 on Fig. 3 possess both molecular ions with $m/z = 283$ $[M+H]^+$ and fragments with $m/z=226$ and $m/z = 255$ $[M^-28]$, they have the different elution times, 13.8 min and 14.8 min, respectively, indicating thus the formation of quinones or their isomers, but their structure must have been further studied.

BaP molecule has sufficiently low redox potential to be oxidised even by weak oxidants, e.g., I_2 or $FeCl_3$ into corresponding radicals²⁴. In addition, its structural properties, i.e. the presence of 12 hydrogens in the structures,

create the conditions for radical character of BaP oxidation process. However, in view of fact that experimental conditions of BaP photooxidation and construction of EPR spectrometer used do not allow their *on-line* arrangement and thus the monitoring of the BaP oxidation products *in situ*, the progress of oxidation was studied *ex post* involving spin trapping method and semi-stable free radicals.

By means of EPR spectroscopy, the effect of BaP photodegradation in methanol and *n*-hexane on its further chemically induced oxidation either in Fenton system (methanol solutions) or in the presence of semi-stable free radical Tempo (*n*-hexane solutions) was monitored.

As regards to experiments with Fenton system, the following reaction schema of radicals' formation is generally accepted:



As the radicals formed in reactions (1) and (2) are not stable enough to be detected directly by EPR, DMPO spin trap was employed to stabilize them in the form of respective spin adducts:



The time evolution of EPR spectra recorded in the

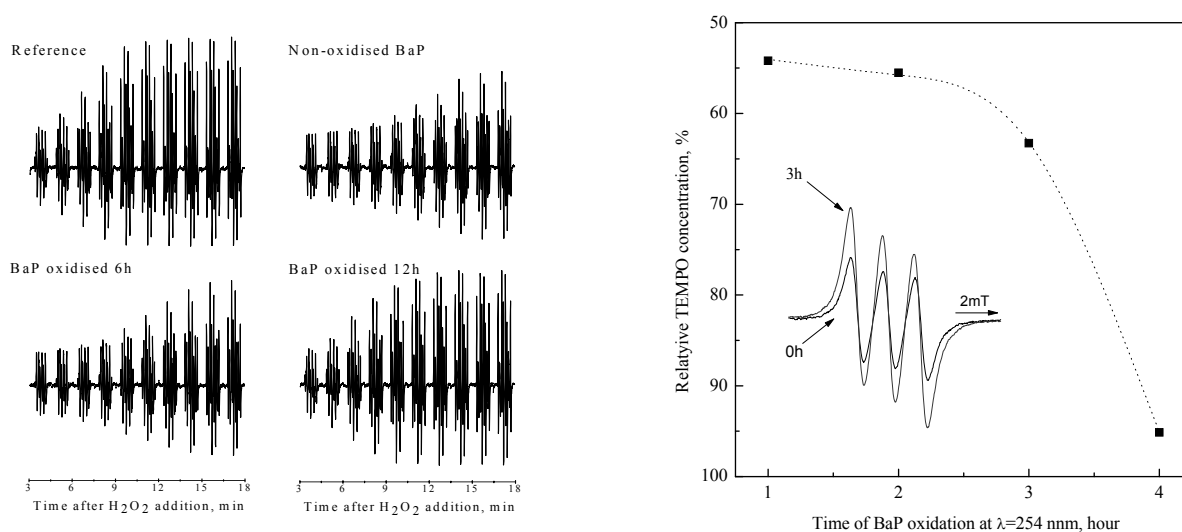


Fig. 4. a) Time evolution of EPR spectra in the system containing Fenton reagents (solutions of Fe²⁺ and H₂O₂ in deionised water) and pure methanol (Reference) or BaP solution in methanol ($c_{0(\text{BaP})}=150 \mu\text{g l}^{-1}$, non-oxidised and photooxidised for 6 and 12 hours at $\lambda=254 \text{ nm}$, respectively, measured in the presence of DMPO spin trapping agent. Measurements were performed at 298 K and started exactly 3 min after H₂O₂ addition; b) The dependence of semi-stable free radical TEMPO concentration on time of BaP UV-oxidation, evaluated from experimental EPR spectra recorded 10 min after the sampling of BaP, i.e. 10 min after TEMPO addition into BaP solution ($c_{0(\text{BaP})}=100 \mu\text{g l}^{-1}$, $c_{0(\text{TEMPO})}=0.3 \text{ mg ml}^{-1}$). Inset represents typical EPR spectra of TEMPO free radical, recorded in the presence of non-oxidised BaP sample and of sample oxidised for 3h at $\lambda=254 \text{ nm}$

system containing Fenton reagents, DMPO spin trap and BaP solution in methanol ($c_{0(\text{BaP})}=150 \mu\text{g l}^{-1}$) photo oxidised during 0–12 hours at $\lambda=254 \text{ nm}$ is depicted on Fig. 4a. In accord with expectations, in the reference sample (pure methanol) the formation of EPR spectra corresponding to the adducts [•]DMPO-C ($a_{\text{N}}=1.56 \text{ mT}$, $a_{\text{H}}=2.2 \text{ mT}$, $g=2.0052$) was observed²⁹. This signal probably comes from methanol by hydrogen abstraction by hydroxyl radicals generated in the Fenton system (Eq.1). As a result of non-oxidised BaP addition, competitive reactions between the generated OH[•] radicals, spin trapping agent and BaP occurs; BaP is partly oxidised by OH[•] radicals and thus the concentration of [•]DMPO-C spin adducts decreases, as finally obvious from Fig. 4a. Results obtained clearly showed that the decrease of spin adducts concentration is in inverse relationship to the time (i.e., degree) of BaP oxidation, as in case of addition of BaP sample oxidised for 12 hours, the spin adducts concentration is in fact, identical to that of reference. These results also indicate that at this time, the BaP is totally oxidised to some of its final oxidation products.

Results offering the identical conclusion were obtained also in experiments with BaP solution in *n*-hexane and semi-stable radical Tempo. As demonstrated on Fig. 4b, as a result of BaP oxidation, Tempo relative concentration increases, reaching in the presence of BaP oxidised for 1h approx. 55 % of its concentration in reference system (pure *n*-hexane). After 4 h of photooxidation at 254 nm, the decrease of Tempo concentration is only 5%. Re-

sults obtained fully support the hypothesis of (at least partially) radical character of BaP oxidation. Additional experiments are in progress aimed at the modification of the experimental setup of BaP oxidation, enabling the on-line characterization of BaP oxidation-induced structures.

Conclusion

BaP oxidation can be effectively monitored by unique combination of GC-MS and HPLC-MS-MS and *ex-post*, also by EPR spectroscopy. BaP photodegradation is a complex process, resulting in the formation of numerous oxidised products, in dependence on wavelength of photo-degradation, its duration as well as solvents used.

This publication 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, as well as this work is supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0602-07.

REFERENCES

1. Fretheim K.: Food Chem. 10, 129 (1983).
2. Garcia Falcon M.S., Gonzalez Amigo S., Lage Yusty M.A., Simal Lozano J.: Food Addit. Contam. 16, 9

- (1999).
- Howard J.W., Fazio T., in: *Handbook of Naturally Occurring Food Toxicants*, pp. 339. CRC Press, Boca Raton 1983.
 - Kruijf N., Schouten T., Stegen G.H.D.: *J. Agric. Food Chem.* 35, 545 (1987).
 - Reink M., Tamme T., Roasto M., Juhkam K., Tenno T., Kiis A.: *Food Addit. Contam.* 24, 429 (2007).
 - Varlet V., Serot T., Knockaert C.: *J. Sci. Food Agric.* 87, 847 (2007).
 - Guillén M.D.: *Food Addit. Contam.* 11, 669 (1994).
 - Bartle K.D., in: *Food Contaminants Sources and Surveillance*, pp. 205. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1991.
 - Tamakawa K., Kato T., Oba M., in: *Handbook of Food Analysis*, p. 1641-1663. Marcel Dekker, NY 1996.
 - Commission Regulation (EC) No 208/2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons (2005).
 - Summary and Conclusion of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-Fourth meeting, Rome, 8-17 February 2005, JCEFA/64/SC (2005).
 - Official documents of US Environmental Protection Agency, EPA. Available online: <http://www.epa.gov/iris/subst/0136.htm>. Cited 08.03.2010.
 - Arfsten D.P., Schaeffer D.J., Mulveny D.C.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 1 (1996).
 - Newsted J.L., Giesy J.P.: *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 445 (1987).
 - Huang X.D., Krylov S.N., Ren L., McConkey B.J., Dixon D.G., Greenberg B.M.: *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2296 (1997).
 - Yu H.: *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 20, 149 (2002).
 - Dong S., Hwang H. M., Harrison C., Holloway L., Shi X., Yu H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 467 (2000).
 - Larson R.A., Berenbaum M.R.: *Environ. Sci. Technol.* 22, 354 (1988).
 - Fioressi S., Arce R.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 3646 (2005).
 - Lee R.F.: *Spill Sci. Technol. Bull.* 8, 157 (2003).
 - Barron M.G.: *Human Ecol. Risk Asses.* 13, 317 (2007).
 - Diamond S.A., Mount D.R., Mattson V.R., Heinis L.J., Highland T.L., Adams A.D., Simcik M.F.: *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3015 (2006).
 - Lampi M.A., Gurska J., McDonald K.I.C., Xie F., Huang X.D., Dixon D.G., Greenberg B.M.: *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1079 (2006).
 - Sullivan P.D.: *Environ. Health Perspect.* 64, 283 (1985).
 - Polovka M., Suhaj M.: *Food Chem.* 119, 391 (2010).
 - Grosse S., Letzel T.: *J. Chromatogr.* 1139, 75 (2007).
 - Koerber R., Niessner R., Bayona J.M.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 359, 267 (1997).
 - Dabrowska D., Kot-Wasik A., Namiesnik J.: *Polish J. Environ. Stud.* 17, 17 (2008).
 - Li A.S.W., Cummings K.B., Roethling H.P., Buettner G.R., Chignell C.F.: *J. Magn. Reson.* 79, 140 (1988). Spin trap database available online at <http://mole.chm.bris.ac.uk/cgi-bin/stdb>.

ANALÝZA A CHARAKTERIZÁCIA HUMÍNOVÝCH LÁTOK RP-HPLC METÓDOU, KOMBINÁCIOU ELÚCIE SKOKOVÝM A LINEÁRNYM GRADIENTOM

**PAVOL ROHÁRIK, RÓBERT GÓRA
a MILAN HUTTA**

*Katedra Analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko
roharik@fns.uniba.sk*

Úvod

Humínové látky (HL) sú všadeprítomná prírodná hmota, vyskytujúca sa v veľkých množstvách v pôde, sedimentoch, rašelinách a v prírodných vodách ako produkt chemickej a biologickej premeny živočíšnych a rastlinných zvyškov. HL predstavujú značnú časť uhlík obsahujúcich látok v životnom prostredí. Podľa najnovších odhadov, HL tvoria okolo 50–90 % organických látok, tzv. rozpustenej organickej hmoty (Dissolved organic matter, DOM) prítomných v pitných vodách¹.

V súčasnom období zvýšenie produkcie HL spojené s rastúcim využitím v rozličných odvetviach priemyslu, medicíne, pôdohospodárstve atď, vyžaduje stále rozsiahlejšie vedomosti o štruktúre, charaktere a správaní sa humínových látok za rôznych, často extrémnych podmienok. Doterajšie štúdie venované výskumu okolo pravdepodobnej štruktúry HL poukazujú na prítomnosť veľkého množstva rozličných funkčných skupín, čo poukazuje na ich schopnosť interagovať s rôznymi zložkami životného prostredia^{2–4}. V dôsledku toho majú HL dôležitú úlohu pri niektorých chemických a fyzikálnych procesoch odohrávajúcich sa v pôdach a vo vodách⁵, čo má za následok zvyšujúcu sa pozornosť mnohých výskumníkov po celom svete.

Aj keď elementárne zloženie HL je dobre známe, informácií o ich štruktúre a funkcií v životnom prostredí stále pribúda, javí sa to stále ako nedostatočné vzhľadom na zložitú štruktúru a variabilné správanie sa týchto látok za meniacich sa podmienok. Z tohto dôvodu je možné predpokladať, že na zhromaždenie relevantných informácií o štruktúre a vlastnostiach HL je potreba aplikovať toľko nezávislých analytických metód ako je len možné⁶.

V problematike analýzy a charakterizácie HL našli využitie aj chromatografické separačné techniky (SEC, HPLC, IMAC) a to predovšetkým na frakcionáciu pred ďalšou analýzou, pri výskume interakcii s antropogénnymi chemikáliami a na charakterizáciu na základe distribúcie relatívnej molovej hmotnosti, ako je zrejme z ilustrácie v publikácii⁷. Vzhľadom na súčasné trendy v analýze HL sa čoraz častejšie dostáva do popredia myšlienka zvýšiť separačnú kapacitu na báze kombinácie dvoch alebo viacerých separačných (chromatografických) metód pracujúcich na odlišných princípoch. V literatúre sa objavili práce po-

pisujúce spojenia niekoľkých separačných metód, napr. online alebo off-line spojenie SEC-HPLC, SEC-SEC, IMAC-SEC, SEC-PAGE. Taktiež použitie netradičných chromatografických postupov (napr. atypické zloženie mobilnej fázy, technika viackrokovej gradientovej elúcie, využitie subkritických podmienok a pod.^{8–11}) môže rozšíriť aplikačné možnosti a zvýšiť rozsah dosiahnuteľných informácií o skúmaných analytoch.

Predložená práca sa zaoberá štúdiom možností využitia gradientovej RP-HPLC metódy s využitím kombinácie elúcie skokovým a lineárnym gradientom na charakterizáciu frakcií vzoriek vybraných humínových kyselín^{12,13}.

Experimentálna časť

Vzorky

V práci boli použité dva typy vzoriek humínových látok, komerčne dostupný štandard humínových kyselín (HK) od firmy Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA (Aldrich)) a humínové kyseliny izolované z pôdy (Hroboňovo, okres Dunajská Streda (DS J)) použitím modifikovanej IHSS frakcionačnej schémy^{14,15}. Roztoky vzoriek HL boli pripravené denne, rozpustením tuhých vzoriek HK vo fosforečnanovom tlmivom roztoku, o koncentrácii približne 3 mg ml⁻¹, miernym pridaním 0,05M NaOH bolo dosiahnuté takmer úplne rozpustenie naváženej vzorky. Takto pripravené roztoky boli pred chromatografickou analýzou centrifugované na centrifuge (JANETZKI T30, Lipsko, Nemecko) pri otáčkach 3000 min⁻¹ po dobu 5 min.

Chemikálie

Organickým modifikátorom mobilnej fázy bol *N,N*-dimetylformamid DMF (Merck, Darmstadt, Germany). Tlmivá zložka mobilnej fázy (5mM NaH₂PO₄) bola pripravená rozpustením príslušného množstva soli v deionizovanej vode (Labconco, Kansas City, USA), pH pripraveného roztoku bolo upravené pridaním 5mM roztoku kyseliny fosforečnej (Merck, Darmstadt, Germany) na požadovanú hodnotu (3.00).

RP-HPLC metóda

Na frakcionáciu a charakterizáciu vzoriek HL bol použitý HPLC systém LaChrom (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany), pozostávajúci zo štvorkanálovej pumpy L-7100 on-line spojenou s vákuovým odplyňovačom L-7612, automatického dávkovača L-7200, kolónového termostatu L-7300, v ktorom bola umiestnená chromatografická kolóna LiChrospher ODS WP 300 RP-

18 250 x 4 mm, veľkosť častíc 5 μm (priemerná veľkosť pórov 30 nm) s predkolónou LiChrospher ODS WP 300 RP-18 4 x 4 mm, spektrofotometrického detektora s radom diód (DAD) L-7450A, flourimetrického detektora (FLD) L-7480. Komunikácia medzi zariadením a riadiacim softvérom HSM verzia 4 bola zabezpečená fázovým rozhraním D-7000. Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 1.00 ml min⁻¹. Teplota kolónového termostatu bola nastavená na 35.0 \pm 0.1 °C.

Elúcia skokovým gradientom

Priebeh elúcie skokovým gradientom bol nastavený miešaním roztokov **A** (1% DMF / 99% fosforečnanový tlmivý roztok ($c = 5$ mM, pH = 3.00) (v/v)) a **B** (99% DMF / 1% fosforečnanový tlmivý roztok ($c = 5$ mM, pH = 3.00) (v/v)) nasledovne: od 0.0 po 3.6 minút izokratický úsek 0% (v/v) B v A, následne od 3.7 minút, bol nastavený každú 4 minútu skok pozostávajúci z 10% (v/v) zvýšenia množstva B v A až po posledný skok pozostávajúci zo zvýšenia o 9% (v/v) a končiaci na 99%, (v/v) B v A a do 55 minút izokratický úsek 99% (v/v) množstva B v A a od 55.1 minút do 60 minút pokračoval lineárny úbytok z 99% (v/v) B v A do 0% (v/v) B v A. Medzi meraniami bol zaradený 10 minútový časový úsek na re-ekvilibráciu^{12,13}.

Elúcia lineárnym gradientom

Priebeh elúcie lineárnym gradientom bol nastavený nasledovne: od 0.0 po 5.0 minút izokratický úsek 0% (v/v) B v A, následne od 5.1 do 35.0 minút lineárny nárast z 0% (v/v) B v A do 99% (v/v) B v A, od 35.1 do 40.0 minút izokratický úsek 99% (v/v) B v A, po čom nasledoval od 40.1 do 45.0 minút lineárny úbytok z 99% (v/v) B v A po 0% (v/v) B v A. Medzi meraniami bol zaradený 10 minútový časový úsek na re-ekvilibráciu¹².

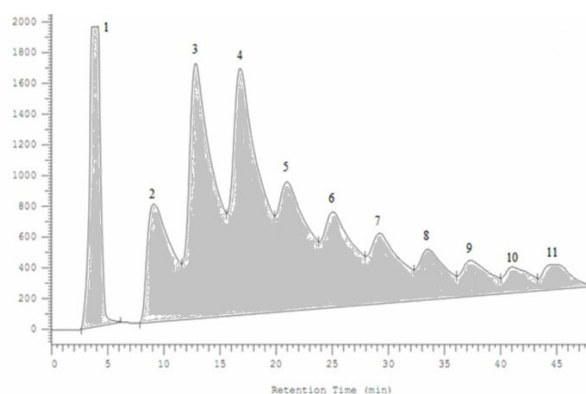
Objem vzoriek dávkaných do chromatografického systému automatickým dávkovačom boli 300 μl v prípade lineárnej gradientovej elúcie, respektíve 400 μl v prípade skokovej gradientovej elúcie. (podrobnosti vid' priložené záznamy). Rozsah snímaných vlnových dĺžok prostredníctvom DAD detektora bol nastavený na interval od 260 po 800 nm, keďže samotný DMF absorbuje žiarenie v UV oblasti do 260 nm (cit.¹²). Monitorovacia vlnová dĺžka bola nastavená na 280 nm. Parametre fluorometrického detektora boli nastavené nasledovne: excitačná vlnová dĺžka bola 470 nm a emisná vlnová dĺžka bola nastavená na 530 nm.

Výsledky a diskusia

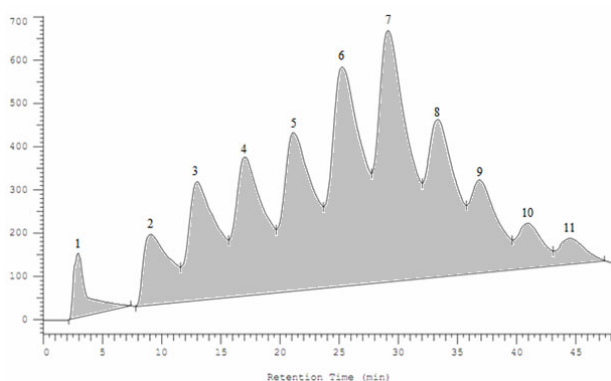
V prvom kroku bola použitá RP-HPLC^{12,13} metóda so skokovou gradientovou elúciou na frakcionáciu vzoriek humínových kyselín pre potreby následných experimentov a na charakterizáciu skúmaných vzoriek humínových kyselín na základe dosiahnutých elučných profilov (obr. 1 a 2). Zo záznamov je zrejme, že v dôsledku skokovej gra-

dientovej elúcie sa vzorky rozdelili do 11 dobre definovateľných zón (frakcií). Jednotlivé frakcie boli zozbierané v oblasti maxima píku a ich objem predstavoval 1,2 ml. Takto zozbierané frakcie boli následne analyzované v druhom kroku. Pri porovnaní získaných chromatogramov vzoriek HK DS J a HK Aldrich si môžeme všimnúť niekoľko odlišností, čo poukazuje na kvalitatívne rozdiely v štruktúre skúmaných humínových kyselín. Najvýraznejšie sa to prejavuje pri porovnaní píkov eluujúcich v oblasti mŕtveho objemu systému. V prípade HK DS J sa na zázname objavil výrazný pík v spomínanej oblasti, čo poukazuje na vylúčenie istého množstva vzorky, ktorá za daných podmienok poskytuje fluorescenčný signál s výraznou intenzitou, zatiaľ čo v prípade vzorky HK Aldrich môžeme pozorovať výrazne menší pík v danej oblasti, čo vypovedá o vylúčení menšieho množstva vzorky alebo vylúčená časť vzorky poskytuje fluorescenčný signál výrazne nižšej intenzity. Tento jav nadobúda miernejšie kontúry, keď sa do systému dávkuje menší objem vzorky, v prípade dávkovania 100 μl bol rozdiel v plochách píkov už iba 10 násobný. Podobný priebeh sme pozorovali pri vyhodnotení chromatogramov získaných DAD detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm. Tento jav poukazuje na pravdepodobne nedostatočnú kapacitu použitej kolóny pre dávkovanie príliš veľkých objemov relatívne koncentrovaných vzoriek HL, hoci ďalšie pokusy smerované k optimalizácii dávkovaného objemu vzorky preukázali, že dávkovaný objem neovplyvňuje tvar chromatografického záznamu konkrétnej vzorky okrem píku vylúčeného v oblasti mŕtveho objemu systému. Na druhej strane výsledky experimentov zamerané na analýzu zozbieraných frakcií opätovným dávkovaním do chromatografického systému poukazujú na to, že aj malá miera rozmerovej diskriminácie ako v prípade HK Aldrich prináša podobný vplyv na tvar chromatografického záznamu vylúčených frakcií ako zdanlivo vysoká miera diskriminácie v prípade HK DS J.

Taktiež sú badateľné rozdiely v rozložení jednotlivých frakcií oboch vzoriek. Na chromatografickom zázname



Obr. 1. RP-HPLC profil vzorky HK DS J (3.02 mg ml⁻¹) získaný elúciou skokovým gradientom, použitím detekcie FLD (ex. 470 nm, em. 530 nm), bez odčítania pozadia, dávkaný objem 400 μl . Arabské číslice 1–11 reprezentujú poradie a počet zozbieraných frakcií

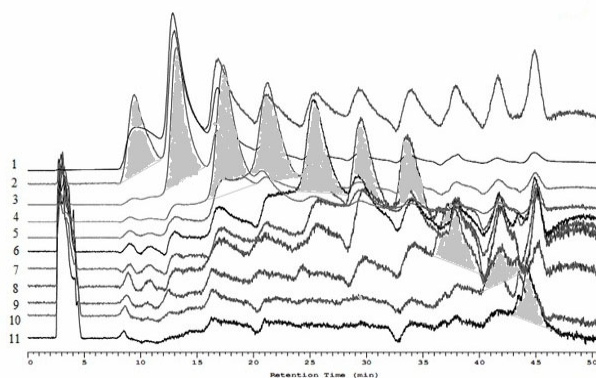


Obr. 2. RP-HPLC profil vzorky HK Aldrich (3 mg ml^{-1}) získaný elúciou skokovým gradientom, použitím detekcie FLD (ex. 470 nm, em. 530 nm), bez odčítania pozadia, dávkovaný objem 400 μl

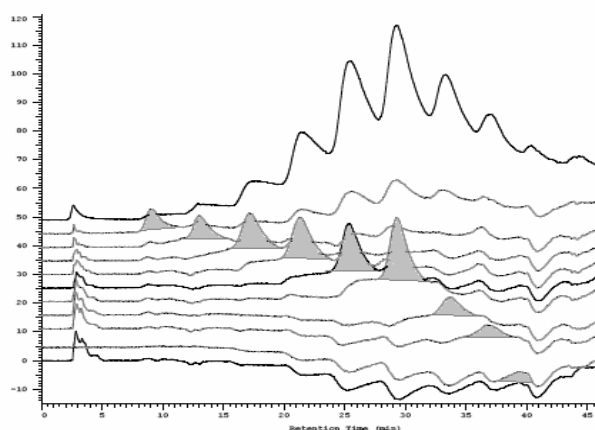
me HK DS J môžeme pozorovať, že HL elujúce v predných frakciách (2,3,4) poskytujú fluorescenčný signál s vyššou intenzitou ako HL prítomné vo frakciách elujúcich pri vyšších retenčných časoch. Oproti tomu v prípade vzorky HK Aldrich poskytujú fluorescenčný signál s najvyššou intenzitou HL elujúce vo frakciách 6,7.

Pre účely charakterizácie RP-HPLC frakcií skúmaných vzoriek sme použili frakcie zozbierané z pokusov, kde sme dávkovali 400 μl vzorky, nakoľko v prípade dávkovaní menších objemov boli výsledky RP-HPLC analýzy zozbieraných frakcií ťažko interpretovateľné v dôsledku prílišného zriedenia vzorky.

V druhom kroku bola RP-HPLC metóda so skokovou gradientovou elúciou použitá na charakterizáciu zozbieraných frakcií, ktoré boli reinjektované do toho istého separačného systému (obr. 3 a 4). Zo získaných chromatografických záznamov vyplýva, že reinjektované frakcie oboch vzoriek si zachovali svoj charakter aj po opätovnom nástreku do chromatografického systému. Výnimku tvorili



Obr. 3. RP-HPLC profily frakcií vzorky HK DS J, získané elúciou skokovým gradientom, po odčítaní pozadia, použitím FLD detekcie (ex. 470 nm, em. 530 nm), dávkovaný objem 400 μl

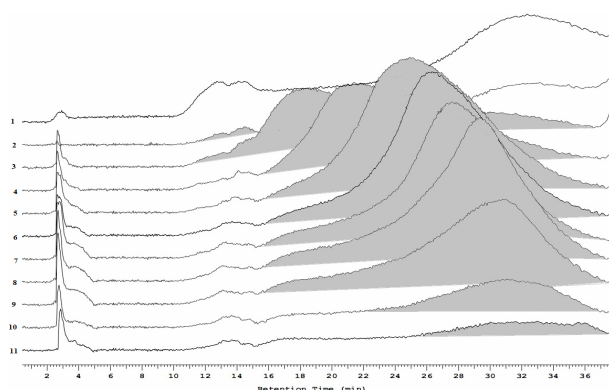


Obr. 4. RP-HPLC profily frakcií vzorky HK Aldrich, získané elúciou skokovým gradientom, po odčítaní pozadia, použitím FLD detekcie (ex. 470 nm, em. 530 nm), dávkovaný objem 400 μl

prvé frakcie oboch vzoriek, ktoré po opätovnom nástreku do separačného systému poskytli chromatografický záznam kopírujúci priebeh separácie pôvodných vzoriek HL analyzovaných v prvom kroku (obr. 1 a 2). Z tohoto dôvodu môžeme predpokladať, že táto frakcia pravdepodobne obsahuje HL prítomné vo všetkých ostatných frakciách. Na druhej strane sa pri opätovnom nástreku zozbieraných frakcií do chromatografického systému na všetkých záznamoch objavil pík v oblasti mŕtveho objemu, ktorého plocha narastala so zvyšujúcim sa poradím frakcií. Podobný trend môžeme pozorovať aj na záznamoch získaných DAD detekciou napr. pri vlnovej dĺžke 280 nm.

Ďalej bola vypracovaná RP-HPLC metóda s lineárnou gradientovou elúciou, ktorá bola použitá na charakterizáciu získaných frakcií vzoriek skúmaných HK v prvom kroku a takisto pôvodných vzoriek HK Aldrich a HK DS J. Použitím tejto metódy sme získali chromatografické záznamy typické pre HK pri použití techniky lineárnej gradientovej elúcie s charakteristickými širokými zónami. Zo získaných chromatografických záznamov vyplýva (obr. 5 a 6), že maximá píkov jednotlivých RP-HPLC frakcií sa posúvajú k vyšším retenčným časom v poradí frakcií od 2 do 11. Tento fakt nám umožňuje predpokladať, že skúmané frakcie HK aj po opätovnom dávkovaní nemia svoju charakter a ich retenčné charakteristiky zostávajú rovnaké bez ohľadu na spôsobe použitej elučnej techniky. Podobne, ako v prípade analýzy frakcií skokovou gradientovou elúciou, aj v tomto prípade objavili na záznamoch píky v oblasti mŕtveho objemu systému. V tomto prípade ale zvyšujúca tendencia plôch pík so zvyšujúcim sa poradím frakcií neplatí, ako v prípade skokového gradientu, ale má náhodný charakter.

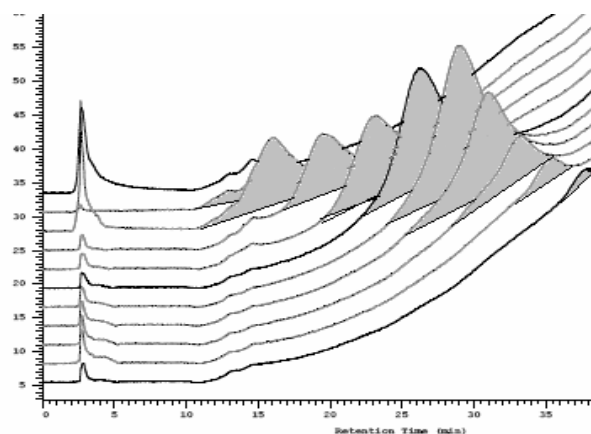
Výsledky naznačujú, že použitá 10 skoková gradientová elúcia môže indukovať zreteľné črty na chromatografickom zázname humínových kyselín a koncentruje ich do presne vymedzených zón. Kombinácia vhodných solvatačných vlastností DMF pre HL a použitie širokopórovej



Obr. 5. RP-HPLC profily frakcií vzorky HK DS J získané elúciou lineárnym gradientom po odčítaní pozadia, použitím FLD detekcie (ex. 470 nm, em. 530 nm), dávkovaný objem 300 μ l

(wide-pore) RP stacionárnej fázy zlepšuje povrchové interakcie analytov a potláča vplyv efektu rozmerovej diskriminácie. Taktiež poskytuje dobrú reprodukovateľnosť získaných chromatografických profilov a dáva predpoklad pre dosiahnutie robustnej analytickej metódy na charakterizáciu HL.

Použitá gradientová RP-HPLC metóda má potenciál v kombinácii s inými hlavne separačnými metódami, na účinnú charakterizáciu vzoriek HL. Individuálne frakcie, získané RP-HPLC metódou, môžu byť ďalej analyzované separačnými metódami, založenými na rozdielnych separačných princípoch a mechanizmoch, čím umožňujú dosiahnuť ortogonálne separačné systémy, ktoré poskytujú rozšírený súbor dát s vyššou dimenzionalitou o skúmaných vzorkách HL.



Obr. 6. RP-HPLC profily frakcií vzorky HK Aldrich získané elúciou lineárnym gradientom po odčítaní pozadia, použitím FLD detekcie (ex. 470 nm, em. 530 nm), dávkovaný objem 300 μ l

Záver

Získané údaje naznačujú, že takýto model aplikácie nami navrhnutého RP-HPLC systému môže byť vhodný ako separačný systém pre detailnejšiu charakterizáciu komplikovaných prírodných makromolekúl, medzi ktoré patria aj analyzované humínové kyseliny. Dosiagnuté výsledky poukazujú na fakt, že získané frakcie skúmaných vzoriek humínových kyselín zachovávajú svoj charakter aj po opätovnom vstupe do separačného systému.

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektov VEGA 1/0870/09, APVV-0595-07 a VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

1. Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., Switt R.S. (ed.): *Search of Structure, Humic Substances*, Vol. II, Wiley, New York 1989.
2. Reemtsma T., Thesea A., Springer A., Linscheid M.: *Water Res.* 42, 63 (2008).
3. Laborda F., Bolea E., Górriz M. P., Martín-Ruiz M. P., Ruiz-Beguería S., Castillo J. R.: *Anal. Chim. Acta* 606, 1 (2008).
4. Emmenegger Ch., Reinhardt A., Hueglin Ch., Zenobi R., Kalberer M.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 2473 (2007).
5. Jánoš P., *J. Chromatogr. A* 983, 1 (2003).
6. Abbt-Braun G., Lankes U., Frimmel F. H.: *Aquat. Sci.* 66, 151(2004).
7. Góra R.: *Symposium „Advances in Chromatography and Electrophoresis“ Chirnal 2010, 8.-11.2. Olomouc, (plenary lecture).*
8. Whelan T.J., Shalliker R.A., McIntyre C., Wilson M.A.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 3229 (2005).
9. Tatar E., Csintalan E., Mihucz V.G.: *J. Microchem.* 73, 11 (2002).
10. Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E.: *Eurasian Soil Sci.* 37, 1170 (2004).
11. Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E., Saiz-Jimenez C.: *Eurasian Soil Sci.* 38, 1183 (2005).
12. Hutta M., Góra R., *J. Chromatogr., A* 1012, 67 (2003).
13. Góra R., Hutta M., *J. Chromatogr., A* 1084, 39 (2005).
14. Kandráč J., Hutta M., Foltin M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles* 208, 577 (1996).
15. Prochácková T., Góra R., Kandráč J., Hutta M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 229, 61 (1998).

ANALYTICKÁ CHÉMIA VO VEREJNOM ZDRAVOTNÍCTVE

IVAN ROVNÝ a MÁRIA HORECKÁ

Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (ÚVZ SR), Trnavská 52, 826 45 Bratislava, Slovenská republika
maria.horecka@uvzsr.sk

Analytická chémia nachádza v rutinej praxi a v aplikovanom výskume verejného zdravotníctva vysoké uplatnenie. Chemická kontaminácia prostredia, ako jeden z hlavných determinantov zdravia, významne ovplyvňuje zdravie človeka, najmä svojim dlhodobým pôsobením v nízkych koncentráciách v životnom prostredí, ale často aj vo vysokých koncentráciách v pracovnom prostredí, ktoré v akútnych prípadoch môžu prerásť do chemických otráv. Včasná a spoľahlivá diagnostika chemických škodlív v životnom a pracovnom prostredí je preto nesmierne dôležitá. Rozvoj a podpora výskumov analytickej chémie na akademických pôdach a následne ich aplikácie v rutinej praxi môžu významne prispieť ku skvalitneniu spôsobu života a k zlepšeniu zdravia obyvateľstva.

Spoznanie zamerania činnosti a potrieb verejného zdravotníctva zo strany výskumu je jednou z podmienok úspešnej spolupráce medzi výskumom a praxou verejného zdravotníctva. Tieto činnosti a potreby verejného zdravotníctva vyplývajú zo zákona č. 355/2007 Z.z. o ochrane,

podpore a rozvoji verejného zdravia, v znení neskorších predpisov. Objektívizáciu faktorov životných podmienok zabezpečujú laboratória zriadené na 10 úradoch verejného zdravotníctva na Slovensku: Úrad verejného zdravotníctva SR a Regionálne úrady verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Bratislave, Košiciach, Nitre, Poprade, Prešove, Trenčíne, Trnave a Žiline.

Laboratória vykonávajú kvalitatívne a kvantitatívne zisťovanie faktorov životného prostredia a pracovného prostredia za účelom posudzovania ich možného vplyvu na zdravie. Tieto činnosti sú súčasťou štátneho zdravotného dozoru (ŠZD), štátneho potravinového dozoru (ŠPD) a rozhodovacej činnosti regionálnych úradov v prvom stupni a Úradu verejného zdravotníctva SR v druhom stupni pri zistení nedostatkov podľa zákona. Objektívizácia faktorov prostredia sa realizuje chemickými, mikrobiologickými a biologickými analýzami vzoriek vôd, ovzdušia, potravín, kozmetiky, predmetov bežného používania, pôdy, stavebného a biologického materiálu, ekotoxikologickými a genotoxikologickými testami a meraniami fyzikálnych faktorov v životnom a pracovnom prostredí. Všetky skúšobné laboratória objektívizácie faktorov životných podmienok sú akreditované Slovenskou národnou akreditačnou službou podľa ISO/IEC 17 025: 2005.

PRIETOKOVÝ SYSTÉM S DNA BIOSENZOROM PRE HODNOTENIE POŠKODENIA DNA CHEMICKÝMI LÁTKAMI A ÚČINKU ANTIOXIDANTOV

DARINA ŠIMKOVÁ a JÁN LABUDA

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
Simkovad@gmail.com*

Biosenzor je špecifický typ chemického senzora obsahujúci biologickú prípadne od biológie odvodenú rozlišujúcu zložku a fyzikálno-chemický prevodník. Biologický prvok je schopný rozpoznať prítomnosť, aktivitu alebo koncentráciu analytu. Pre štúdium interakcií DNA sa v súčasnosti využívajú rôzne moderné techniky vrátane elektrochemických metód. Boli navrhnuté elektrochemické DNA biosenzory čo sú voltampérometrické pracovné elektródy modifikované vrstvou DNA^{1,2}. Tieto tzv. DNA biosenzory sú špecifické k DNA na princípe bioafinity a umožňujú rýchle vyšetrenie a stanovenie látky interagujúcej s DNA *in vitro*⁴⁻⁶. Elektrochemický biosenzor predstavuje účinný nástroj pre chemické, biochemické, medicínske a environmentálne oblasti analýzy a to najmä pre jeho vlastnosti ako malá veľkosť, reálny čas analýzy, jednoduchá predúprava a použite.

V súčasnosti sa venuje pozornosť novým spôsobom efektívneho využívania biosenzorov ako je zaradenie biosenzora v systéme prietokovej injekčnej analýzy (FIA). Tento systém je dynamickým ekvivalentom statického systému, ktorý sa konvenčne používa. Technika FIA ponúka možnosť riadenia celého analytického postupu s ohľadom na poradie jednotlivých krokov ako aj optimalizáciu reakčných podmienok⁷. Skrátenie času analýzy dovoľuje vysokú priechodnosť vzoriek a zlepšenie opakovateľnosti pracovných krokov umožňuje použitie menších objemov činidiel a vzoriek. Atraktívnymi rysmi FIA sú miniaturizácia a automatizácia celého analytického systému.

V našej práci predstavujeme elektrochemické DNA biosenzory usporiadané v komerčnom prietokovom systéme. DNA biosenzor sa skladá z vrstvy dvojvláknovej DNA viazanej na povrchu sieťotlačených uhlíkových elektród bez a s rozhraním tvoreným uhlí-

kovými nanorúrkami. Získali sa voltampérometrické a impedimetrické charakteristiky biosenzorov a metódou cyklickej voltamperometrie s redoxným indikátorom, komplexom $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, vo fáze roztoku sa sledovali degradačné interakcie DNA. Pre verifikáciu výsledkov sa využila elektrochemická impedančná spektroskopia ako metóda hodnotenia povrchu elektród prostredníctvom ich elektrochemických parametrov. Nakoniec sa DNA biosenzor použil pre detekciu poškodenia DNA s použitím Fentonovej reakcie tvorby kyslíkových radikálov a sledovanie ochrany DNA pomocou štandardov antioxidantov a čajov.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied, Projektom č. 1/0852/08.

LITERATÚRA

1. Labuda J., Fojta M., Jelen F., Paleček E.: v knihe *Encyclopedia of Sensors* (C. A. Grimes, E. C. Dickey, M. V. Pishko, ed.), s. 201–228. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch 2006.
2. *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins. Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (E. Paleček, F. Scheller, J. Wang, ed.) Elsevier, Amsterdam 2005.
3. Ovádek R., Labuda J.: *Curr. Top. Electrochem.* 11, 21 (2006).
4. Brett A. M. O., Diclescu V. C., Chiorcea-Paquim A. M., Serrano S. H. P., v knihe: *Electrochemical Sensors Analysis* (S. Alegret, A. Merkoci, ed.), s. 413–438. Elsevier, Amsterdam 2007.
5. Ovádek R., Labuda J., v knihe: *Utilizing of Bio-Electrochemical and Mathematical Methods in Biological Research* (V. Adam, R. Kizek, ed.), s. 173–201. Research Signpost, Kerala, India, 2007.
6. Labuda J., Brett A. M. O., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: *Pure Appl. Chem.*, v tlači.
7. Chen X.-W., Chen M.-L., Chen S., Wang J.-H.: *Trends Anal. Chem.* 27, 762 (2008).

ŠTÚDIUM VZŤAHOV ŠTRUKTÚRA – BIOLOGICKÁ AKTIVITA DERIVÁTOV INDOLIZÍNU

**LUBOMÍR ŠVORC^a, PAVEL MÁJEK^a,
VIKTOR VRÁBEL^a, PETRA
OLEJNÍKOVÁ^b, EVA TÓTHOVÁ^c
a ŠTEFAN MARCHALÍN^c**

^a Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^c Ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
lubomir.svorc@stuba.sk

Indolizíny sú dôležité bioaktívne látky, ktoré majú široké využitie v medicíne, farmakológii a agrochémii. Toto ich široké spektrum užitočnej biologickej aktivity ich predurčuje ako objekt intenzívneho štruktúrneho výskumu vo farmácii, v oblasti organickej syntézy a pri hľadaní nových liečiv. Niektoré práce zaoberajúce sa biologicou

aktivitou a vzťahom štruktúry a biologickej aktivity (QSAR) vybraných indolizínových derivátov nás motivovali k štruktúrnym, biologickým a QSAR štúdiám 21 nosyntetizovaných derivátov. Aplikovali a porovnávali sme štatistické metódy (viacnásobná lineárna regresia a neurónové siete), pri ktorých sa využil reprezentatívny set vypočítaných molekulových deskriptorov schopných kvantitatívne a presne vyjadriť fyzikálno-chemické vlastnosti študovaných derivátov. Dominantný bol vplyv deskriptorov ako lipofilita, molárna refraktivita, polarizovateľnosť, E_{HOMO} , E_{LUMO} a Kierove indexy. Z QSAR analýzy vyplynulo, že biologickú aktivitu zvyšuje polarizovateľnosť a niektoré topologické indexy. Na základe zisteného QSAR modelu sme predpovedali biologickú aktivitu nesyntetizovaných látok v sérii štruktúrne podobných furánových analógov indolizínového typu. Výsledky naznačili, že aj tieto deriváty majú tendenciu byť biologicky aktívne. Nájdenie štatisticky významných QSAR modelov môže byť však často spojené so značnými, niekedy až neprekonateľnými ťažkosťami.

Táto práca bola podporená vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied, Projektmi č. 1/0161/08 a 1/0462/08 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-0210-07.

VYUŽITIE ICP/MS A LC-ICP/MS V SÚČASNEJ ANALYTICKEJ PRAXI

GIZELA TAKÁCSOVÁ

Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej Republiky (ÚVZ SR), Odbor objektivizácie faktorov životných podmienok, Špecializované laboratórium AAS, Trnavská 52, 826 45 Bratislava, Slovenská republika
gizela.takacsova@uvzsrs.sk

ICP-MS

ICP-MS je analytická spektrálna technika kombinujúca ICP, teda indukčne viazanú plazmu ako zdroj kladne nabitých častíc a MS hmotnostnú spektrometriu, ktorá tieto častice deteguje.

Táto metóda sa používa na stopovú elementárnu analýzu, najmä na analýzu kovov a polokovov v najrôznejších matriciach, ako voda, požívatinu, ovzdušie, predmety bežného použitia (PBP), kozmetika či biologický materiál, a tiež prvkov, ktoré nie je možné analyzovať inými spektrálnymi technikami, napr. prvky vzácnych zemín, platínové kovy, lantanoidy i aktinoidy.

Porovnanie príbuzných techník

Indukčne viazaná plazma

- detekcia hmotnostnou spektrometriou (ICP-MS),
- detekcia emisnou spektroskopiou (ICP-OES).

Tabuľka I

Porovnanie príbuzných techník

Parameter	ICP-MS	ICP-OES	ETA AAS	FAAS
Detekčný limit	VÝBORNÝ	Veľmi dobrý	Veľmi dobrý	Dobry
„Sample Throughput“	Najlepší	Najlepší	Najhorší	Dobry
Počet prvkov	> 75	> 73	> 50	> 68
Lineárny rozsah	9 poriadkov	5 poriadkov	2 poriadky	3 poriadky
Presnosť (Precision)	0.5–3 %	0.3–2 %	1–5 %	0.1–1 %
Obsah rozpustených látok	0.1–0.4 %	2–15 %	> 20 %	0.5–10 %
Spotreba vzorky	Nízka	Stredná	Veľmi nízka	Vysoká
Polokvantitatívna analýza	Áno	Áno	Nie	Nie
Analýza izotopov	Áno	Nie	Nie	Nie
Spektrálne interferencie	Niekoľko	Bežne	Málo	Skoro žiadne
Chemické interferencie	Mierne	Niekoľko	Veľa	Veľa
Hmotnosť (Mass Effects)	Áno	Nie	Nie	Nie
Operačné náklady	Vysoké	Vysoké	Stredné	Nízke
Hlavné náklady (Capital Costs)	Veľmi vysoké	Vysoké	Stredné	Nízke

Atómová absorpčná spektrometria

- elektrotermická atomizácia (ETA AAS),
- plameňová (FAAS).

Výhodou metódy ICP-MS sú nízke medze stanoviteľnosti pre veľký počet prvkov, relatívne malé interferencie a ľahká kalibrácia na modelové roztoky a tiež veľký rozsah linearity závislosti signálu od koncentrácie vzorky.

Hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) je v súčasnej dobe najvýkonnejšou technikou pre stanovenie ultrastopových prvkov s možnosťou stanovenia izotopového zloženia.

ÚVZ SR sa zaoberá stanovením stopových prvkov ako Be, Cr, Mn, Ni, As, Se Cd, Sb, Pb v matriciach vody, kozmetiky, požívatinu a PBP na prístroji ICP/MS. Táto skúška je akreditovaná a správnosť je potvrdená medzilaboratónymi porovnávacími testami.

LC-ICP/MS

LC-ICP/MS je technika, ktorá spája kvapalinovú chromatografiu a hmotnostný spektrometer s indukčne viazanou plazmou. Využíva výbornú separačnú schopnosť kvapalinovej chromatografie a špecifickosť a veľkú citlivosť ICP-MS.

Najčastejšie sa používa na identifikáciu alebo stanovenie prítomnej chemickej formy sledovaného prvku, tzv. špeciácie. V literatúre sa uvádza veľa definícií na špeciáciu.

ciu, avšak najlepšia ju definuje ako stanovenie rôznych fyzikálno-chemických foriem prvku, ktoré spolu tvoria jeho celkovú koncentráciu v danej vzorke¹. Presnejšie sa jedná o stanovenie toho istého prvku v rôznych oxidačných stupňoch, alebo vo väzbe s rôznymi skupinami. Oxidačný stupeň prvku a jeho prítomnosť v rôznych zlúčeninách sú veľmi dôležité pri posudzovaní ich transportu a toxicity. Napr. As(III) je významne toxickejší než As(V), ktorý je zase toxickejší než metylované arzenitany, ktoré vznikajú ako produkty detoxikačného procesu arzenu v organizme. Podobne stanovenie Cr(III) a Cr(VI) je dôležité pre životné prostredie a biologické štúdie vzhľadom na ich odlišnú toxicitu. Zatiaľ čo Cr(III) patrí k biogénnym prvkom a v stopových koncentráciách je potrebný pre ľudský organizmus (regulácia hladiny glukózy v krvi), Cr(VI) je svojim nepriaznivým účinkom na obličky, pečeň, pľúca, a karcinogénnymi vplyvmi na ľudský organizmus škodlivý aj v stopových koncentráciách.

Analýza jednotlivých špeciácií predstavuje veľmi komplexný problém, počnúc výrobou ultračistých chemikálií a diagnostík, ktoré na našom trhu zatiaľ nie sú samozrejmosťou, pokračujúc cez presné definovanie rovnovážnych stavov pre jednotlivé mocenstvá prvkov. Nezanedbateľné sú požiadavky kladené na priestory, v ktorých sa ultrastopová analýza vykonáva.

V laboratóriu analýzy kovov sa vyvíjajú metódy stanovenia špeciácií As, Se a Cr vo vodách a moči na prístroji LC-ICP/MS. Štandardné roztoky sa pripravujú rozpustením chemických zlúčenín jednotlivých mocenstiev prvkov. Úprava vzoriek je tiež obmedzená, pretože rovnováha medzi špeciáciami prvkov je veľmi labilná. Kvapalné

vzorky ako je voda, alebo moč sa uchovávajú v chladničke, alebo mrazničke bez okyslenia a analyzujú sa priamo, alebo po zriedení a filtrácii. Tuhé vzorky sa extrahujú v rôznych rozpúšťadlách a roztokoch, alebo sa aplikuje enzýmová hydrolýza. V budúcnosti ako tuhé vzorky plánujeme analyzovať morské živočíchy na obsah špeciácií As. Na separáciu sa využíva anexová kolóna Hamilton PRP-X100, ktorá umožňuje prácu s mobilnou fázou v širokom rozsahu pH (1–13). Ako mobilná fáza sa používajú rôzne amónne soli s pH od 4,5 do 9,5. Pri výbere najvhodnejšej mobilnej fázy sa riadim takými kritériami pre mobilnú fázu, aby:

- neprispievala k vzniku interferentov,
- čo najmenej znečisťovala časti ICP/MS,
- mala dobrú separačnú účinnosť pre dané analyty (za izokratických podmienok),
- mala dostatočne silnú iónovú silu na elúciu vyšších mocenstiev za relatívne krátky čas,
- pri vhodnom pH nespôsobovala zrážanie zložiek matrice,
- mala dobrú pufrovaciu schopnosť.

Odhliadnúc od všetkých náročných prekážok, ktoré nám technika LC-ICP/MS kladie, je to technika blízkej budúcnosti a „špeciácie“ sa stávajú dôležitou súčasťou analytických rozborov životného prostredia.

LITERATÚRA

1. Koplík R., Burdová E., Mestek O.: Chem. Listy 91, 38 (1997).

VYUŽITIE NANOŠTRUKTÚR V BIOANALYTICKEJ CHÉMII

**JÁN TKÁČ, JANA ŠEFČOVIČOVÁ,
JAROSLAV FILIP a PETER GEMEINER**

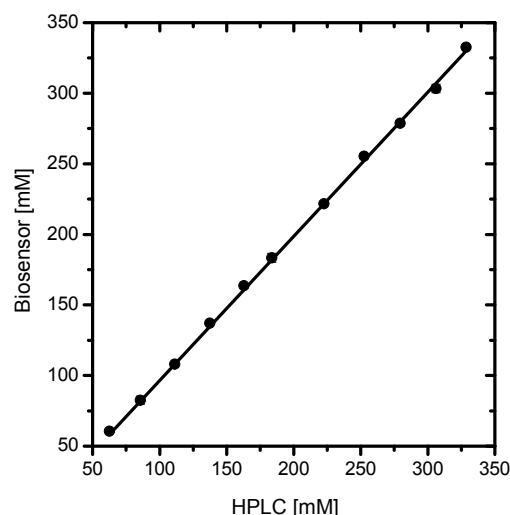
Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika
Jan.Tkac@savba.sk

Uhlíkové nanorúrky sú od ich objavenia v roku 1991 (cit.¹) využívané v rozličných aplikáciách a ovplyvňujú takmer každú vedeckú disciplínu²⁻⁴. Najmä príprava a využitie (bio)senzorov na báze uhlíkových nanorúrok je veľmi rýchle sa rozvíjajúcou vedeckou oblasťou, keď sú uhlíkové nanorúrky použité na amplifikáciu signálu, na „label-free“ stanovenie a najmä ako materiál s veľmi dobrými redoxnými vlastnosťami^{5,6}.

Všetky tieto aplikácie sú však možné ak sa pracuje s uhlíkovými nanorúrkami, ktoré sú vhodným disperzným činidlom dispergované a teda prevedené do kvapalnej fázy. Aj keď sú známe mnohé disperzné činidlá, preferenčným modifikačným činidlom by mali byť tie, ktoré sú schopné veľmi efektívne uhlíkové nanorúrky previesť do roztoku, mali by byť vysoko biokompatibilné a mali by mať funkčné skupiny, ktoré môžu byť využité na ich ďalšiu modifikáciu (napr. enzýmami). Biopolyméry (napr. chitozán) splňujú túto podmienku a aj preto sú veľmi často využívané na prípravu disperzií uhlíkových nanorúrok⁷.

V tejto práci je na prípravu elektrochemických (bio)senzorov využitá nová disperzia uhlíkových nanorúrok v kyseline hyalurónovej. Tento biopolymér je veľmi efektívnym disperzným činidlom uhlíkových nanorúrok s vysokou biokompatibilitou⁸. Okrem toho táto disperzia po nanosení na elektródu má lepšie redoxné vlastnosti ako chitozánová disperzia a bola efektívne použitá na prípravu elektrochemického senzora na stanovenie NADH (kofaktor viac ako 500 dehydrogenáz) a na prípravu biosenzora na stanovenie D-sorbitolu (využívaný na prípravu prekurzora v procese syntézy vitamínu C). Senzor na stanovenie NADH vykazoval oveľa vyššiu operačnú stabilitu (95 % počiatocnej odozvy po 22 h kontinuálneho používania) v porovnaní s publikovanými výsledkami (70–90 % počiatocnej odozvy po 1 h). D-Sorbitolový biosenzor vykazoval veľmi vysokú operačnú stabilitu (85 % počiatocnej hodnoty po 19 h kontinuálneho používania). Výsledky stanovenia D-sorbitolu biosenzorom boli vo veľmi dobrej zhode s výsledkami analýzy referenčnou analytickou metódou (smernica 1,02; korelačný koeficient 0,999) (obr. 1). Výhodou využitia biosenzora je veľmi krátky čas analýzy 55 s v prietokovom systéme v porovnaní s 22 min v prípade HPLC analýzy.

Podakovanie patrí projektu "Centrum pre materiály, vrstvy a systémy pre aplikácie a chemické procesy v extrémnych podmienkach" na základe podpory operačného



Obr. 1. Validácia analýzy D-sorbitolu vo vzorkách biosenzorom oproti HPLC metóde

programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a blokóvemu grantu, ktorý je financovaný finančným mechanizmom EHP, č. SAV-FM-EHP-2008-04-04.

LITERATÚRA

1. Iijima S.: *Nature* 354, 56 (1991).
2. Prato M., Kostarelos K., Bianco A.: *Acc. Chem. Res.* 41, 60 (2008).
3. Tkac J., Svitel J., Vostiar I., Navratil M., Gemeiner P.: *Bioelectrochem.* 76, 53 (2009).
4. Tkac J., Davis J.J., v: *Engineering the bioelectronic interface: Applications to analyte biosensing and protein detection*, (Davis J.J., ed.). Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009.
5. McCreery R.L.: *Chem. Rev.* 108, 2646 (2008).
6. Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M.: *Chem. Rev.* 106, 1105 (2006).
7. Tkac J., Whittaker J.W., Ruzgas T.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 1820 (2007).
8. Thompson B.C., Moulton S.E., Gilmore K.J., Higgins M.J., Whitten P.G., Wallace G.G.: *Carbon* 47, 1282 (2009).

VYUŽITIE TECHNIKY LC/M/MS PRI STANOVENÍ REZÍDUÍ MADURAMYCÍNU V TKANIVÁCH BROJLEROVÝCH KURČIAT

SOŇA TKÁČIKOVÁ^a, IVONA KOŽÁROVÁ^b a DIONÝZ MÁTÉ^b

^a Štátny veterinárny a potravinový ústav, Hlinkova 1, 043065 Košice, ^b Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
tkacikova@svu-ke.sk

Kľúčové slová: kokcidiostatiká, rezíduá, maduramycín, hmotnostný spektrometer

Abstrakt

Kokcidiostatiká predstavujú skupinu veterinárnych liekov, ktoré sa v chove hydiny a králikov používajú ako krmné doplnkové látky za účelom prevencie kokcidiózy. Vzhľadom na ochranu zdravia spotrebiteľa v súvislosti s prítomnosťou rezíduí v hydinovom mäse, cieľom práce bolo sledovať hladiny rezíduí maduramycínu v svalu, srdci, pečeni, obličkách, žalúdku a koži brojlerových kurčiat krmných komerčne vyrábanou kompletnou krmnou zmesou HYD-02-NORM-TYP s prídavkom maduramycínu v koncentrácii 5 mg účinnej dávky na 1 kg krmiva počas stanovenej 5-dňovej ochrannej lehoty (OL). Rezíduá maduramycínu boli detekované vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s tandemovým hmotnostným spektrometrom typu kvadrupól s ionizačnou technikou elektrosprej (ESI) s limitom detekcie (LOD) 0,47 $\mu\text{g kg}^{-1}$, limitom kvantifikácie (LOQ) 1,42 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a s priemernou výťažnosťou 90 %. Prítomnosť rezíduí maduramycínu bola zistená vo všetkých vyšetovaných vzorkách. Najvyššia koncentrácia rezíduí maduramycínu bola zaznamenaná v srdcovom svalu, nasledovaná nižšími hodnotami v koži, pečeni, žalúdku, obličkách a finálne v svalovine (prsnej a stehennej). Napriek klesajúcej tendencii obsahu rezíduí v jednotlivých tkanivách, na 5. deň OL hodnoty maduramycínu neklesli pod limit detekcie metódy. Tieto výsledky potvrdzujú potrebu stanovenia maximálneho limitu rezíduí (MRL) pre maduramycín.

Úvod

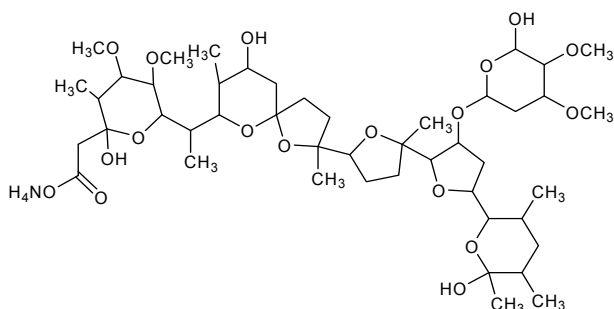
Za účelom prevencie kokcidiózy sa v moderných chovoch hydiny a králikov používajú ako krmné doplnkové látky kokcidiostatiká. Vo Vestníku Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky č. 15/2007 (cit.¹⁹) sú v zozname krmných doplnkových látok v súlade s európskou

skou legislatívou ako povolené kokcidiostatiká uvedené monenzín, salinomycín, lasalocid, narazín, maduramycín, semduramycín, nikarbazín, robenidín, diklazuril, halofuginón a dekokchinát. Vzhľadom na dlhodobé podávanie týchto látok zvieratám určeným na produkciu potravín je zrejme, že rezíduá kokcidiostatik budú prítomné v tkanivách, aj v živočíšnych produktoch týchto zvierat. V záujme ochrany zdravia ľudí je nutné kontrolovať hladinu ich rezíduí vrátane posúdenia ich vplyvu na zdravie človeka. V septembri 2009 vstúpilo do platnosti nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 (cit.⁸), ktoré spolu s nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 (cit.⁹) ruší nariadenie Rady (EHS) č. 2377/90 (cit.⁶) a legislatívne ustanovuje maximálne limity rezíduí (MRL) pre monenzín v svalu, obličkách hovädzieho dobytku a v mlieku a lasalocid v hydinovom svalu, pečeni a vajciach. Maduramycín je jedným z kokcidiostatik, pre ktoré v súčasne platnej legislatíve ešte nie je stanovený MRL.

Maduramycín (obr. 1) je polyéterové iónofórové kokcidiostatikum produkované pliesňou *Actinomadura ymaensis*, používané v prevencii kokcidiózy brojlerových kurčiat a moriek. Do krmných zmesí sa pridáva vo forme amónnej soli v množstve 5 mg kg^{-1} s ochrannou dobou 5 dní. Predáva sa pod obchodným označením Cygro. Jeho molárna hmotnosť je 934,17 g mol^{-1} .

Pri výbere vhodnej inštrumentálnej techniky na stanovenie rezíduí liečiv v rôznych biologických matriciach sa v súčasnosti najčastejšie stretávame s chromatografickými metódami. Vzhľadom na skutočnosť, že štruktúra maduramycínu neobsahuje chromofór, a teda nevykazuje absorbciu v UV oblasti, v minulosti bolo publikovaných len málo prác s touto problematikou. Jednou z použiteľných techník boli ELISA metódy. Kennedy a spol.⁴ použili ELISA techniku na stanovenie rezíduí maduramycínu s LOD 0,02 ng g^{-1} v tkanivách hydiny (ng ml^{-1} v sére) a LOQ 1,0 ng g^{-1} v tkanivách hydiny (ng ml^{-1} v sére). Autori však poukázali na skutočnosť, že použitá protilátka vykazovala skríženú reakciu s ostatnými iónofórmami. Shen a spol.¹⁵ použili ELISA metódu na detekciu maduramycínu v hydinovom mäse, založenú na čistení vzorky na imunoafinitnom princípe s LOD 1,0 ng g^{-1} v svalu, 2,8 ng g^{-1} v pečeni a 1,5 ng g^{-1} v tuku.

Ďalšou z možností na stanovovanie rezíduí maduramycínu je jeho reakcia s vhodným reakčným činidlom za vzniku produktu, ktorý absorbuje v UV oblasti, procesom nazývaným derivatizácia. De Long² využil Komarovského reakciu⁵ s vanilínom na stanovovanie obsahu maduramycínu v krmných zmesiach a premixoch. Tavcar-Kalcher¹⁸ na stanovenie maduramycínu v koncentrátoch, premixoch a krmivách využíva reakciu s dansylhydrazínom a následnú detekciu UV detektorom pri 224 nm, prípadne fluorescenčnú detekciu s excitačnou vlnovou dĺžkou 224 nm a emisnou vlnovou dĺžkou 515 nm s LOD 0,4 ng kg^{-1}



Obr. 1. Štruktúrny vzorec maduramycínu

a LOQ 1,0 mg kg⁻¹. S narastajúcou komerčnou dostupnosťou tandemových hmotnostných spektrometrov spriahnutých s kvapalinovou chromatografiou sa čoraz častejšie tieto inštrumentálne techniky objavujú pri stanovovaní reziduí veterinárnych liečiv ako multireziduálne techniky schopné stanoviť vedľa seba celú škálu liečiv rôznej chemickej podstaty^{3,11}. Stubbing a Bigwood¹⁷ publikovali metódu stanovujúcu 41 veterinárnych liečiv vrátane ionofórových kokcidiostatík.

V našej práci bol na stanovovanie reziduí maduramycínu v tkanivách brojlerov použitý tandemový hmotnostný spektrometer typu trojitý kvadrupól s ionizáciou pri atmosférickom tlaku ionizačnou technikou elektrospreja. Pri extrakcii maduramycínu zo vzoriek sme vychádzali z metodiky vyvinutej Komunitným referenčným pracoviskom pre detekciu veterinárnych liečiv BVL v Berlíne¹, ktorú sme upravili na naše podmienky.

Materiál a metódy

Všetky chemikálie použité na extrakciu a chromatografickú analýzu boli čistoty gradient grade (Merck, Nemecko). Voda bola čistená technikou reverznej osmózy a dočistená na iónomeniči Milli-Q plus (Millipore, Francúzsko). Štandard maduramycínu bol získaný od Chemosgroup (American Cyanamid Company, USA). Kolónky na extrakciu na tuhej fáze (solid phase extraction columns / SPE/, Strata-X, 200 mg, 6 ml) boli zakúpené od firmy Phenomenex (USA) a manifold na čistenie vzoriek bol od firmy Supelco (USA). Na odparovanie vzoriek pod prúdom dusíka bol použitý prístroj TurboVap od firmy Zymark (Švajčiarsko). Chromatografický systém pozostával zo separačného modulu Alliance (Waters, Írsko) a hmotnostného spektrometra Triple quadrupole Quattro Micro (MicroMass Ltd., Veľká Británia) s vyhodnocovacím softvérom MassLynx. Ako zdroj dusíka bol použitý generátor dusíka Domnick Hunter (Anglicko). Na samotnú HPLC separáciu bola použitá analytická kolóna Luna 150 × 2 mm, veľkosť častíc 3 μm (Phenomenex, USA).

Zásobný štandard maduramycínu bol pripravený s koncentráciou 0,5 mg maduramycínu v 1 ml metanolu.

Z neho boli pred každou sériou analýz nariadené pracovné roztoky maduramycínu s koncentráciou 2, 5, 10, 20, 30, 40 a 60 ng ml⁻¹ metanolu, ktoré sa použili na justáž hmotnostného spektrometra.

Na analýzu boli použité tkanivá brojlerových kurčiat (hybrid Ross, PD Nová Bodva /VH-KS-06/) s priemernou hmotnosťou 0,510 ± 0,032 kg. Brojlerové kurčatá boli umiestnené v koterci v schválenom pokusnom zariadení (I. interná klinika UVL v Košiciach /SK P 60005/) s voľným prístupom k vode a krmivu. Kurčatá boli kŕmené komerčne vyrábanou kompletnou kŕmnom zmesou na výkrm brojlerov (rastová) HYD-02-NORM-TYP s prídavkom maduramycínu v koncentrácii 5 mg kg⁻¹ od 18. až do 40. dňa veku. Tri kusy brojlerových kurčiat slúžili ako neliečená kontrolná skupina. V nultý deň ochrannej lehoty (40. deň) boli z experimentálnej skupiny náhodne vybrané a zabité dva kusy. Tkanivá (prsna a stehenná svalovina, srdce, pečeň, obličky, žalúdok a koža) boli oddelené, zabalené do vopred označených polyetylénových sáčkov, zamrazené a skladované pri teplote -18 °C do analýzy. Od 40. až do 45. dňa veku boli ostatné brojlerové kurčatá kŕmené nemedikovanou kŕmnom zmesou HYD-03-NORM-TYP. Počas piatich dní stanovenej OL boli kurčatá po dva kusy denne postupne zabíjané a testovací materiál bol spracovávaný pred analýzou vyššie uvedeným spôsobom. Hmotnosť brojlerových kurčiat sa počas ochrannej lehoty pohybovala v rozmedzí od 2200 do 3120 g.

Extrakcia maduramycínu zo vzorky

2 g zhomogenizovanej vzorky boli extrahované 10 ml acetonitrilu po dobu 15 min v ultrazvuku a následne 30 min na trepačke. Extrakt bol scentrifugovaný po dobu 10 min pri 4 °C a 3000 otáčkach/min. Následne bol extrakt odparený pod prúdom dusíka pri teplote 55 °C. Odparok bol rozpustený v 5 ml redistilovanej vody a umiestnený na 5 min do ultazvuku.

Čistenie na SPE kolónkach

SPE kolónka bola kondicionovaná 3 ml metanolu a potom 3 ml vody bez použitia vákua. Po kondicionovaní sa na kolónku aplikoval extrakt a nechal sa kolónkou prejsť. Kolónka bola premytá 3 ml vody a vysušená cca. 5 min za použitia vákua. Maduramycín bol z kolónky eluovaný 5 ml metanolu a eluát bol pod prúdom dusíka a teplote 40 °C zakonzentrován na objem 1 ml. Na samotnú HPLC analýzu sa injekovalo 10 μl eluátu.

Na určenie výťažnosti boli použité tkanivá brojlerov z kontrolnej skupiny, ktoré boli kŕmené nemedikovaným krmivom. Do zhomogenizovaného tkaniva bolo pridané presne vypočítané množstvo štandardného roztoku maduramycínu v metanole, ktorý sa nechal odpariť stáťim po dobu 30 min pri laboratórnej teplote. Následne bola takáto vzorka analyzovaná podľa vyššie uvedeného postupu ako vzorky medikovanej skupiny.

HPLC stanovenie

Ako mobilná fáza bola použitá zmes metanol/voda/kyselina octová v pomere 900/99/ 1 v/v/v pri prietoku

0,4 ml min⁻¹. Na stabilizáciu teploty pri separácii na analytickej kolóne bol použitý kolónový termostat s teplotou 40 °C. Vzorky boli pred analýzou chladené v automatickom dávkovači pri teplote 10 °C. Čas potrebný na analýzu jednej vzorky bol 8 min.

Parametre hmotnostného spektrometra

Na ionizáciu maduramycínu bola použitá technika elektrospreja v pozitívnom ionizačnom móde (ESI⁺). Teplota iónového zdroja bola 100 °C, teplota na desolvatačnej kapiláre 400 °C, prietok nebulizačného plynu – dusíka bol 600 l h⁻¹, prietok cone gas 50 l h⁻¹, napätia v ionizačnom zdroji – capillary voltage 3,5 kV, extractor voltage 1 V, RF lens voltage 0 V, cone voltage 41 V. Koližné napätie na tvorbu oboch dcérskych iónov bolo 55 eV a ako bombardovací plyn bol použitý argón čistoty 99,999 %.

Na identifikáciu maduramycínu bol použitý MRM mód (multiple reaction monitoring) s rodičovským iónom s hmotnosťou 939,48 Da a dcérskymi iónmi 877,48 Da a 895,5 Da (obr. 2).

Výsledky

Namerané hodnoty obsahov reziduí maduramycínu v tkanivách brojlerových kurčiat v µg kg⁻¹ v závislosti od dňa OL sú uvedené v tabuľkách I–VI (AP – aritmetický priemer nameraných údajov). LOD použitej techniky LC/MS/MS bol 0,474 µg kg⁻¹ a LOQ 1,422 µg kg⁻¹. Jednotlivé merania boli namerané s priemernou výťažnosťou 90 %. Údaje v tabuľkách I–VI nie sú korigované na výťažnosť. V kontrolnej nemedikovanej skupine nebola zistená prítomnosť reziduí maduramycínu.

Na obr. 3 je softwérové spracovanie chromatografického záznamu vzorky s pozitívnym nálezom maduramycínu v pečeni.

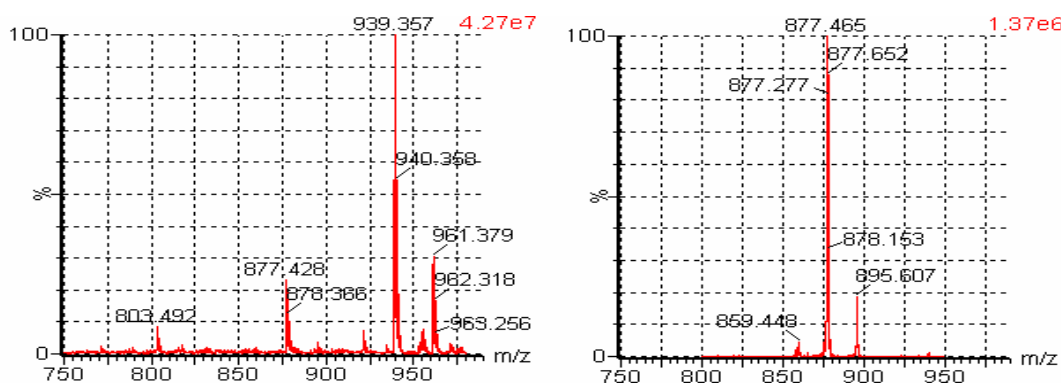
Diskusia

Z nameraných údajov v tabuľkách I–VI vyplýva, že maduramycín bol prítomný v každej z vyšetrovaných mat-

ric počas všetkých dní ochrannej lehoty. Najvyššie koncentrácie reziduí boli namerané v srdci brojlerových kurčiat, pohybujúce sa v rozsahu od 285,8 µg kg⁻¹ (0. deň OL) do 95,7 µg kg⁻¹ (4. deň OL). To zároveň potvrdzuje aj jeho prejavy pri štúdiách toxicity uvádzaných v literatúre, kde bolo pozorované atakovanie srdcového svalu¹⁶. Relatívne vysoké hodnoty reziduí maduramycínu boli zaznamenané v koži (200,7 µg kg⁻¹ – 55,4 µg kg⁻¹). Stredné hodnoty nálezov boli detekované v pečeni, ako detoxikačnom orgáne (146,8 µg kg⁻¹ – 38,7 µg kg⁻¹) a žalúdku (373,3 µg kg⁻¹ – 42,1 µg kg⁻¹). Najnižšie hodnoty reziduí maduramycínu boli namerané v obličkách (39,1 µg kg⁻¹ – 9,0 µg kg⁻¹) a prsnej a stehennej svalovine (15,5 µg kg⁻¹ – 7,1 µg kg⁻¹), čo je priaznivý údaj pre bežného spotrebiteľa. Zarážajúci je ale fakt, že sa nepotvrdila predpokladaná postupná klesajúca tendencia obsahu maduramycínu v tkanivách s narastajúcimi dňami ochrannej lehoty. V posledný deň OL nálezy reziduí maduramycínu zďaleka neboli na úrovni LOD metódy. Aj keď v EÚ nie je stanovené MRL pre maduramycín, v niektorých krajinách mimo EÚ (USA, Kanada, Japonsko) je stanovený MRL pre maduramycín v rozsahu 400–500 µg kg⁻¹. Z tohto vyplýva, že naše hodnoty reziduí na 5. deň OL sú v súlade s legislatívou krajín mimo EÚ. Je však na zamyslenie, či tak vysoké hodnoty sú bezpečné pre spotrebiteľa, keď v nariadení Komisie (ES) č. 124/2009 (cit.⁷) týkajúceho sa prítomnosti reziduí maduramycínu v dôsledku jeho prenosu do nečieľového krmiva (cross-contamination) je stanovený limit 2 µg kg⁻¹ pre všetky potraviny živočíšneho pôvodu zvierat iných ako kurčatá na výkrm a morky.

Záver

Kontrola hladín reziduí maduramycínu technikou LC/MS/MS poskytuje vysokú selektivitu a citlivosť. Prezentovaná metóda je schopná detekovať rezidúá v rôznych tkanivách brojlerových kurčiat na veľmi nízkej koncentračnej hladine (0,474 µg kg⁻¹) s priemernou výťažnosťou 90 %. Je založená na extrakcii acetonitrilom a jednoduchom čís-



Obr. 2. Hmotnostné spektrá rodičovského a dcérskych iónov maduramycínu

Tabuľka I

Reziduálne koncentrácie maduramycínu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) v srdci brojlerových kurčiat v závislosti odo dňa OL

Srdce	0. deň OL	1. deň OL	2. deň OL	3. deň OL	4. deň OL	5. deň OL
	270,0	100,0	127,0	208,0	101,8	225,9
	260,0	111,0	131,7	205,0	76,0	217,0
	312,0	115,0	133,5	193,0	102,8	221,0
	301,0	110,0	146,0	202,0	102,0	230,0
AP	285,8	109,0	134,6	202,0	95,7	223,5

Tabuľka II

Reziduálne koncentrácie maduramycínu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) v svalovine (prsnej a stehennej) brojlerov v závislosti odo dňa OL

Svalovina	0. deň OL	1. deň OL	2. deň OL	3. deň OL	4. deň OL	5. deň OL
	16,3	10,8	6,9	14,7	11,2	12,3
	15,2	11,6	7,1	16,7	12,9	10,0
	14,8	11,6	7,3	15,4	12,4	12,3
	14,8	15,0	7,1	15,0	11,1	12,0
AP	15,3	11,3	7,1	15,5	11,9	11,7

Tabuľka III

Reziduálne koncentrácie maduramycínu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) v obličkách brojlerov v závislosti odo dňa OL

Obličky	0. deň OL	1. deň OL	2. deň OL	3. deň OL	4. deň OL	5. deň OL
	11,2	35,0	40,0	11,9	7,5	20,6
	11,4	32,0	37,0	11,4	9,2	18,0
	12,9	30,9	34,7	6,6	12,2	29,1
	10,0	30,1	44,7	6,2	9,2	20,6
AP	11,4	32,0	39,1	9,0	9,5	22,1

Tabuľka IV

Reziduálne koncentrácie maduramycínu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) v pečeni brojlerov v závislosti odo dňa OL

Pečeň	0. deň OL	1. deň OL	2. deň OL	3. deň OL	4. deň OL	5. deň OL
	166,2	74,7	42,0	36,7	74,5	82,9
	168,2	69,0	39,3	34,5	84,6	81,2
	156,7	77,0	48,8	41,4	75,8	79,1
	96,0	73,0	44,7	42,0	90,0	74,7
AP	146,8	73,4	43,7	38,7	81,2	79,5

Tabuľka V

Reziduálne koncentrácie maduramycínu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) v žalúdku brojlerov v závislosti odo dňa OL

Žalúdok	0. deň OL	1. deň OL	2. deň OL	3. deň OL	4. deň OL	5. deň OL
	91,0	56,5	166,0	338,0	77,0	41,7
	96,0	57,4	133,0	374,0	47,5	38,0
	158,0	54,0	135,0	390,0	48,6	44,7
	63,0	55,1	201,0	391,0	49,3	44,0
AP	102,0	55,8	158,8	373,3	55,6	42,1

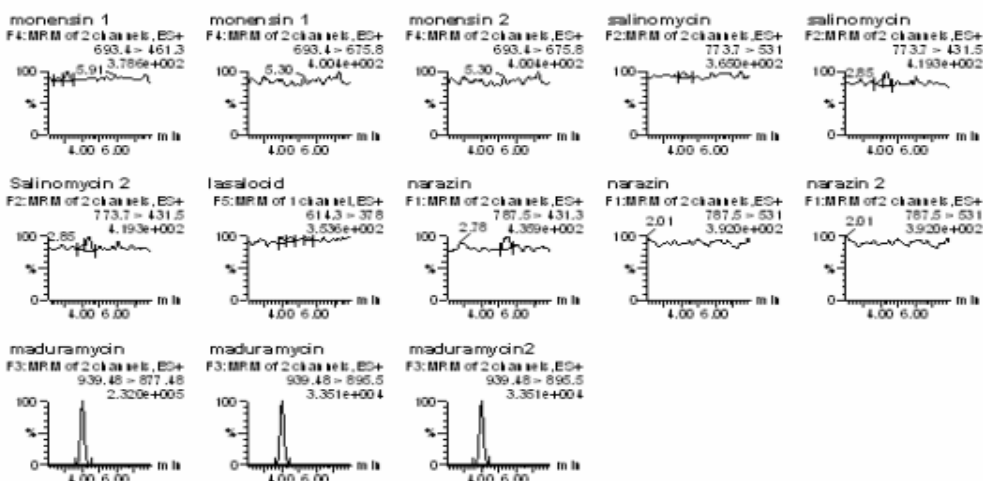
Tabuľka VI

Reziduálne koncentrácie maduramycínu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) v koži brojlerov v závislosti odo dňa OL

Koža	0. deň OL	1. deň OL	2. deň OL	3. deň OL	4. deň OL	5. deň OL
	52,6	61,3	124,8	125,7	195,0	174,7
	51,8	58,8	138,9	125,5	203,0	195,0
	52,5	60,0	142,0	123,7	204,9	200,0
	74,2	41,5	165,0	124,0	200,0	190,0
AP	57,7	55,4	142,7	124,7	200,7	189,7

Quantify Sample Report MassLynx 4.1 Page 21 of 80
 SVPU Kosice, analyst Dr. Tkackova
 Dataset: C:\MassLynx\ionophores.PROV0626\ionophores.qld
 Last Altered: Wednesday, June 27, 2007 13:05:18 Eastern Daylight Time
 Printed: Monday, March 15, 2010 11:39:33 Eastern Standard Time

Name: 0626 SRD CE-0b, Date: 26-Jun-2007, Vial: 10, Time: 14:50:29, ID: 0 den OL, Description:



Obr. 3. Chromatografický záznam pozitívneho nálezu maduramycínu v srdcovom svale brojlerov na 0. deň OL

tiacom procese na SPE kolónkach. Uvedeným postupom je možné počas jedného dňa stanoviť až 22 vzoriek a je vhodný ako na skrining, tak aj na konfirmačné účely. Táto metóda je plne validovaná v zmysle Rozhodnutia Komisie 2002/657/ES (cit.¹³) a je používaná na kontrolu reziduí ionofórových kokcidostatík v tkanivách hydiny, zajacov, hovädzieho dobytku a vo vajciach v Slovenskej republike od roku 2007.

Práca bola podporená vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied č. 1/0658/09.

LITERATÚRA

1. Bohm D., Hahn K., Gowik P.: List of the screening and confirmatory methods used in NRLs of the Euro-

pean Union for substances groups A5, B2a, B2b, B2e and in the German routine field laboratories for all substance groups of Annex I. Council Directive 96/23/EC. BVL, Berlin 2005.

- De Long J., Stoisser B., Wagner K., Tomassen M., Driessen J., Hofmann P., Putzka H. A.: J. AOAC Int. 87, 1033 (2004).
- Dubois M., Pierret G., Delahaut Ph.: J. Chromatogr., B 813,181 (2004).
- Kennedy D. G., Blanchflower W. J., O'Dornan B. C.: Food Addit. Contam. 14, 27 (1997).
- Komarowski A.: Chem. Ztg. 27, 807 (1903).
- Nariadenie Rady (EHS) č. 2377/90 z 26. júna 1990, ktorým sa stanovuje postup Spoločenstva na určenie maximálnych limitov reziduí veterinárnych liečiv v potravinách živočíšneho pôvodu.: Ú. v. EÚ L 224, 1-9 Brusel 1990.

7. Nariadenie Komisie (ES) č. 124/2009 z 10. februára 2009, ktorým sa stanovujú najvyššie obsahy prítomnosti kokcidiostatík a histomonostatík v potravinách spôsobenej nevyhnutným prenosom týchto látok do necieľového krmiva.: Ú. v. EÚ L 40, 7-11 (2009).
8. Nariadenie Európskeho Parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 zo 6. mája 2009 o stanovení postupov Spoločenstva na určenie limitov reziduí farmakologicky účinných látok v potravinách živočíšneho pôvodu, o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 2377/90 a o zmene a doplnení smernice Európskeho parlamentu a Rady 2001/82/ES a nariadenia Európskeho Parlamentu a Rady (ES) č. 726/2004.: Ú. v. EÚ L 152, 11-22 (2009).
9. Nariadenie Komisie (EÚ) č. 37/2010 z 22. Decembra 2009 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii, pokiaľ ide o maximálne limity reziduí v potravinách živočíšneho pôvodu.: Ú. v. EÚ L15, 1-72 (2009).
10. Novilla M. N.: Vet. Human Toxicol. 34, 66 (1992).
11. Olejnik M., Szprengier-Juszkiewicz T., Jedziniak P.: J. Chromatogr., A 1216, 8141 (2009).
12. Pressman B. C., Fahim M.: Adv. Exp. Med. Biol. 161, 543 (1983).
13. Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES z 12. augusta 2002, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/EHS, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov.: Ú. v. EÚ L 221, 8-36 (2002).
14. Shao B., Wu X., Zhang J., Duan H., Chu X., Wu Y.: Chromatographia 69, 1083 (2009).
15. Shen J., Qian C., Jiang H., Yang H.: J. Agric. Food. Chem. 49, 2697 (2001).
16. Shier W. T., Dubourdieu D. J.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 116, 38 (1992).
17. Stubbings G., Bibwood T.: Anal. Chim. Acta 637, 68 (2009).
18. Tavčar-Kalcher G., Pavšič-Vrtač K., Vengušt A.: Food Addit. Contam., Part A 26, 63 (2009).
19. Zoznam kŕmnych doplnkových látok. Vestník MP SR, XXXIX, čiastka 15, 34-192 (2007).

„SPICE“ – NOVÝ FENOMÉN NA DROGOVEJ SCÉNE

PAVOL ULBRICH
and KATARÍNA JANKOVIČOVÁ

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

Na svetovej drogovej scéne sa v poslednom čase objavila nová droga zvaná „Spice“. Kvôli jej legálnosti a dostupnosti v internetových obchodoch sa stala populárnou medzi mladistvými. „Spice“ je zmes aromatických extraktov a rastlín, ktoré pri zahrievaní uvoľňujú bohatú arómu. Rastliny obsiahnuté v tejto zmesi (*Canavalia maritima*, *Leonotis leonorus*, *Leonorus sibiricus*, *Pedicularis densiflora*, *Vanilla planifolia*, *Zornia latifolia*) boli dlhé roky užívané pri rituáloch starodávnych kultúr po celom svete. Zmes Spice navodzuje povznášajúce pocity, má euforizujúce, uvoľňujúce a stimulačné účinky.

Z medzinárodných organizácií zaoberajúcich sa typovaním a sledovaním látok, ktoré môžu byť zneužitie ako drogy, sme však mali informácie, že zmesi predávané pod názvom „Spice“ neobsahujú iba vyššie uvedené rastliny ale aj iné látky, ktoré sú k nej dodatočne pridávané. Malo by sa jednať o látky nazývané syntetické kanabinoidy, ktoré sú umelo pripravené a viaceré z nich sú už komerčne dostupné.

Operatívnu cestou bola zabezpečená vzorka materiálu „Spice diamond“, ktorú sme skúmali „štandardnou“ metódou kapilárnej plynovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickým detektorom (GC-Agilent 6890+, MSD-Agilent 5973, kolóna-Ultra1 25 m × 0,2 mm × 0,33 μm). V tejto vzorke bola zistená prítomnosť syntetického C8 homológu CP-47,497 a syntetického kanabinoidu JWH-018. V materiáli bola zistená aj prítomnosť veľkého množstva vitamínu E, ktorý komplikoval identifikáciu syntetických kanabinoidov.

APLIKACE EXTRAČNÍCH TECHNIK PRO ANALÝZU ORGANICKÝCH LÁTEK

KAREL VENTURA a MARTIN ADAM

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Česká republika
Karel.Ventura@upce.cz

Souhrn

Práce je zaměřena především na metody izolace organických sloučenin z tuhých a kapalných vzorků, jakými jsou např. vzorky životního prostředí, potravin, bylin, aj. Vývoj nových vysoce účinných a citlivých detekčních technik zapříčinil i modernizaci extrakčních technik. Jejich vývoj se ubíral dvěma směry, a to buď s ohledem na maximální zvýšení účinnosti extrakce při zkrácení extrakčního času – techniky kvantitativní extrakce, nebo s ohledem na minimalizaci spotřeby organických rozpouštědel spojenou s miniaturizací celého extrakčního systému – mikroextrakční techniky. Tato práce se zabývá oběma uvedenými skupinami extrakcí, a to nejprve technikami kvantitativní extrakce, a poté i moderními technikami mikroextrakčními.

1. Úvod

Oblast analytické chemie a příbuzných disciplín lze v současnosti charakterizovat celou řadou trendů, z nichž většina se začala prosazovat zejména v posledních několika dekádách. Mezi nejvýznamnější z nich patří i potřeba stanovení nejrůznějších látek na stále nižších koncentračních úrovních a ve stále složitějších maticích. S tímto požadavkem se úměrně zvyšují nároky na provedení odběru vzorků, jejich úpravu, zvolenou analytickou metodu a měřicí techniku a v neposlední řadě i na způsob provedení vlastního stanovení a vyhodnocení analytického signálu. Nezbytnou podmínkou úspěšné analýzy je proto vysoce výkonný analytický systém o dostatečné citlivosti a selektivitě, čemuž se podřizuje i neustálé zdokonalování používané instrumentace spolu s dalšími úpravami detekčních jednotek, čtené nově navrhované koncepce nevyjímaje. Se zdokonalující se instrumentací analytických systémů jdou ruku v ruce i modernizace systémů pro izolaci a zakonzentrování sledovaných látek z reálných matic. Pro tento účel jsou hojně využívány především moderní extrakční techniky, jako jsou např. vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, mikroextrakce tuhou fází, a další.

Vývoj moderních extrakčních technik ve skutečnosti směřoval dvěma různými cestami. První z nich se týkal vývoje metod kvantitativní extrakce, jejichž hlavním cílem je izolovat, pokud možno kvantitativně, stanovované sloučeniny ze vzorků, a to s co největší účinností, v krátkém

časovém intervalu a s nižší spotřebou organických rozpouštědel ve srovnání s klasickými technikami, jakými jsou např. extrakce v Soxhletově extraktoru. Tyto techniky jsou charakteristické tím, že sice částečně snižují provozní náklady související právě s redukcí spotřeby organických rozpouštědel a zkrácením času potřebného pro extrakci, avšak pořizovací náklady příslušných extraktorů jsou vyšší – často přesahují i půl milionu korun.

Druhým směrem byl vývoj technik mikroextrakčních. Pro tyto techniky je charakteristické výrazné snížení spotřeby veškerých rozpouštědel a snížily se jak pořizovací, tak i provozní náklady. Je třeba si ale uvědomit, že se nejedná o techniky kvantitativní, což znamená, že často bývá izolováno jen velmi malé množství sledovaného analytu, ale vhodně zvolenou kvantifikační metodou lze získat relativně přesné výsledky týkající se obsahu sledovaných sloučenin v analyzovaných vzorcích.

2. Techniky kvantitativní extrakce

Extrakce, stejně jako každý chemický děj, dospívá do rovnovážného stavu. Pokud se mezi dvě nemísitelné fáze rozděluje jedna složka při konstantní teplotě a tlaku, pak má systém pouze jeden stupeň volnosti a tudíž z hodnoty aktivity dané složky ve fázi 1 lze určit její aktivitu ve fázi 2. V rovnovážném stavu platí rovnost chemických potenciálů extrahované složky v obou fázích, což lze popsat následující rovnicí (1):

$$\mu_1^0 + RT \ln a_1 = \mu_2^0 + RT \ln a_2 \quad (1)$$

kde a jsou aktivity extrahované složky a μ^0 jsou standardní chemické potenciály. Jednoduchou úpravou rovnice (1) lze získat základní formulaci Nernstova rozdělovacího zákona (2):

$$\frac{a_2}{a_1} = e^{\left(\frac{\mu_1^0 - \mu_2^0}{RT}\right)} = K_D \quad (2)$$

kde K_D je termodynamická distribuční konstanta. Pokud se extrahovaná složka vyskytuje v obou fázích pouze v jediné formě (např. molekulární), lze použít vyjádření pomocí rovnovážných koncentrací extrahované látky.

Účinnost extrakce je podmíněna selektivní rozpustností látek v jednotlivých rozpouštědlech. Volba rozpouštědla se řídí charakterem látek, které mají být extrahovány. Obecně platí Liebigovo pravidlo „Podobné se rozpouští v podobném“ (*Similia Similibus Solventur*), které říká, že pro extrakci nepolárních látek je třeba používat nepolární nebo málo polární rozpouštědla a naopak. Přejít z tuhé fáze do roztoku nebo z jedné kapalně fáze do druhé je způsoben interakcí molekul rozpouštědla s molekulami

extrahované látky. Selektivita pôsobení rozpoušťača na extrahovanou látku závisí na povahe sil, ktoré sa uplatňujú pri rozpoušťaní.

2.1. Extrakce v Soxhletově extraktoru

Extrakce v Soxhletově extraktoru je metoda, která patří mezi nejstarší extrakční techniky, je součástí normovaných postupů a často bývá používána jako standard pro nově vyvíjené extrakční techniky. Poprvé byla popsána již v roce 1879 jako metoda použitelná pro izolaci mléčného tuku¹. Při této metodě je tuhý vzorek navážen do patrony, která je umístěna v Soxhletově aparatuře. Do patrony neustále kondenzuje rozpoušťače a vymývá rozpustné komponenty z tuhé matrice vzorku. Rozpoušťače obsahující rozpouštěné analyty je potom vráceno do varné baňky a tento proces je opakován, dokud nejsou požadované komponenty ze vzorku vyextrahovány v dostatečném množství. Vzorek je vždy extrahován čistým rozpoušťačem, zatímco ve varné baňce jsou koncentrovány netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Izolované látky tedy musí být stabilní při teplotě varu použitého extrakčního rozpoušťača.

2.1.1. Výhody a nevýhody extrakce v Soxhletově extraktoru

Mezi výhody extrakce v Soxhletově extraktoru bezesporu patří již zmíněný fakt, že tato metoda bývá často používána jako metoda normovaná a její aplikace tudíž často není spojená s nutností optimalizace extrakčních podmínek. Z dalších výhod lze jmenovat např. relativně nízké pořizovací náklady pohybující se řádově v jednotkách tisíc Kč a minimální nároky na obsluhu celého zařízení.

Mezi hlavní nevýhody extrakce v Soxhletově extraktoru patří značná časová náročnost metody, která v některých případech přesahuje 20 h, což může kromě jiného být způsobeno i faktem, že extrakce probíhá do zkoncentrovaného rozpoušťača, tedy při teplotě nižší, než je příslušný bod varu. Vzhledem k tomu, že ve varné baňce dochází během extrakce k destilaci rozpoušťača, je při této metodě značené omezena i možnost používání směsných rozpoušťačů.

Značnou nevýhodou této extrakční metody jsou vysoké provozní náklady spojené jednak s relativně velkou spotřebou organických rozpoušťačů, která v závislosti na velikosti extraktoru může být i 500 ml na vzorek, což obvykle vyžaduje zařazení prekoncentračního kroku po extrakci. A právě kvůli tomuto kroku je nutné používat velmi čistá a tedy i drahá rozpoušťača, protože je třeba si uvědomit, že při odpařování rozpoušťača dochází nejen k nikoncentrování sledovaných sloučenin, ale i k nežádoucímu zakoncentrování případných nečistot potenciálně obsažených v použitém rozpoušťači.

2.1.2. Modifikace extrakce v Soxhletově extraktoru

Modernější extrakční techniky založené na principu extrakce v Soxhletově extraktoru jsou obvykle založeny na tom, že vzorek je v určité fázi procesu ponořen přímo do

extrakčního rozpoušťača, čímž dojde k dočasnému zvýšení teploty extrakce, ale obvykle na úkor vyššího rizika degradace tepelně méně stabilních sloučenin. Mezi takovéto modifikace patří např. systémy Soxtec, Soxtherm nebo Büchi.

S pomocí výše uvedených modifikací metody extrakce v Soxhletově extraktoru bylo možné zkrátit čas potřebný pro izolaci stanovených látek ze vzorků na přibližně jednu pětinu času odpovídajícímu aplikaci klasické extrakci v Soxhletově extraktoru². Přesto však doba potřebná pro izolaci sledovaných látek velmi často přesahovala jednu hodinu. Proto byly postupně vyvíjeny modernější postupy založené na odlišných principech, jako je např. extrakce při vyšších tlacích či s využitím jiné než tepelné energie.

2.2. Ultrazvukové extrakce

I když je metoda ultrazvukové extrakce (USE – Ultrasonic Extraction) obvykle řazena mezi moderní extrakční postupy, jedna z prvních prací zabývajících se touto metodou byla publikována již začátkem 50. let minulého století jako metoda pro extrakci složek chmele³. Avšak tato metoda je kvůli vysoké extrakční účinnosti společně s kratším extrakčním časem ve srovnání s klasickými extrakčními technikami stále velmi atraktivní.

2.2.1. Princip ultrazvukových extrakcí

Při metodě USE jsou využívány zvukové vlny při frekvencích nad slyšitelnost lidského ucha, což je hranice odpovídající 20 kHz. Účinky ultrazvuku při šíření ve sledovaném prostředí závisí na intenzitě (amplitudě), frekvenci kmitů a na vlastnostech prostředí. Vlivem ultrazvuku dochází k rozpadu tuhého vzorku, v případě rostlinného materiálu dochází k narušení buněčných stěn, což umožňuje lepší penetraci rozpoušťača do vzorku a snadnější uvolnění extrahovaných složek.

Při této metodě je tuhý vzorek ponořen do rozpoušťača, po určitou dobu (15–30 min) je aplikována ultrazvuková energie a po skončení extrakce je pomocí extrakt od zbytků tuhého vzorku oddělen filtrací nebo centrifugací a případně zakoncentrován odpařením rozpoušťača. Potenciální komplikace při extrakčním procesu mohou souviset především se resorpcí extrahovaných sloučenin na povrch tuhého vzorku, zahřívání vzorku (popř. rozpoušťača) a tedy odpaření části extrakčního rozpoušťača a možný rozklad sledovaných sloučenin vyskytujících se v místech s velkou energií⁴.

Většina efektů v kapalném a plynném prostředí závisí na kavitaci a mikroproudění nebo na povrchové nestabilitě vznikající na rozhraní kapalina-kapalina nebo kapalina-plyn. Kavitace je množina jevů spojená se vznikem, růstem nebo oscilacemi a zánikem dutin v kapalině. V důsledku působení ultrazvukových vln dochází lokálně k periodickému zhušťování a zředování kapaliny. Při poklesu tlaku dochází v určitých místech kapaliny ke vzniku parních bublinek. Při následném nárůstu tlaku dochází k jejich kolapsu doprovázenému prudkým zvýšením tlaku a teploty, což má za následek zvýšení účinnosti extrakčního pro-

cesu. Mezi významné parametry ovlivňující extrakční proces při USE patří zejména intenzita ultrazvukových vln, typ extrakčního rozpouštědla a externí teplota a tlak, protože tyto podmínky ovlivňují nejen kavitaci, ale i vlastní extrakci požadovaných sloučenin.

2.2.2. Vybrané aplikace ultrazvukových extrakcí

Jako důkaz tvrzení, že ultrazvukové extrakce jsou stále atraktivní extrakční metodou, mohou sloužit příklady aplikací publikovaných v posledních několika letech. Publikovány byly např. práce zabývající se izolací lykopenu z rajčat, reziduí pesticidů z listové zeleniny, reziduí pesticidů a těkavých sloučenin z medu, hemicelulosových polysacharidů z pohanky, nikotinu z farmaceutických preparátů, oleje ze semen tabáku, extraktivních látek ze šalvěže, flavonoidů a isoflavonů z bylin, polycyklických aromatických uhlovodíků z jehličí a kůry borovice, ze vzorků sedimentů a zemin, veterinárních antibiotik, organochlorovaných pesticidů, polybromovaných difenyletherů ze vzorků zeminy, nonylfenolů a parabenů ze vzorků životního prostředí, a mnoho dalších.

2.3. Extrakce nadkritickými tekutinami

Jednou z moderních a často využívaných technik pro izolaci látek z tuhých vzorků je extrakce nadkritickými tekutinami (SFE – Supercritical Fluid Extraction), která využívá některých výhodných vlastností látek v nadkritickém stavu, tzv. nadkritických tekutin. Jako první popsal nadkritický stav Baron Charles Cagniard de la Tour již v roce 1822, který pozoroval mizící fázové rozhraní mezi kapalnou a plynnou fází při zvyšování teploty uvnitř uzavřené skleněné nádoby. Průkopnickou prací byla studie A.W. Francise, který v roce 1954 publikoval seznam rozpustností 261 sloučenin v oxidu uhličitým v blízkosti kritických podmínek, avšak hlavní rozvoj SFE je spojován s vydáním patentů týkajících se dekofeinace kávy. SFE v analytickém měřítku se začala komerčně využívat v polovině 80. let minulého století⁷.

2.3.1. Nadkritické tekutiny

Nadkritické tekutiny se vyskytují při teplotě a tlaku vyšším, než je jejich kritická hodnota. Z fyzikálně-chemického hlediska tvoří nadkritická tekutina přechod mezi plynem a kapalinou. Kritický bod je zde charakterizován kritickou teplotou T_k a kritickým tlakem p_k . Nad tímto bodem se látka nachází v nadkritickém stavu.

Nadkritická tekutina je zvláštní skupenský stav, který spojuje vlastnosti kapalin a plynů. Vlastnosti nadkritických tekutin se tedy mění s tlakem a teplotou od vlastností podobných kapalině k vlastnostem podobných plynu. Ze strany plynů jde o vyšší difuzní koeficient a nízkou viskozitu a ze strany kapalin o dobré rozpouštěcí schopnosti a vysokou hustotu⁸. Srovnání vlastností plynů, kapalin a nadkritických tekutin je uvedeno v tab. I.

Při volbě vhodné nadkritické tekutiny hrají významnou roli především praktické aspekty, jako jsou přijatelné hodnoty kritických podmínek (T_k a p_k), vysoká čistota,

Tabulka I
Srovnání vlastností plynů, kapalin a nadkritických tekutin

Skupenství	Hustota [g cm ⁻³]	Viskozita [g cm ⁻¹ s ⁻¹]	Difuzní koeficient [cm ² s ⁻¹]
Plyn	0,6–2,0.10 ⁻³	1,0–3,0.10 ⁻⁴	0,1–1,0
Nadkritická tekutina	0,2–0,9	1,0–3,0.10 ⁻³	0,1–5,0.10 ⁻⁴
Kapalina	0,6–1,6	0,2–3,0.10 ⁻²	0,2–3,0.10 ⁻⁵

chemická stabilita, inertnost (rozpouštědlo nesmí reagovat s extrahovanou látkou), nízká toxicita a v neposlední řadě i cenová dostupnost. Příklady kritických parametrů rozpouštědel používaných pro SFE jsou uvedeny v tab. II.

Nejčastěji používaným rozpouštědlem při SFE je oxid uhličitý. Mezi jeho hlavní výhody patří relativně snadné dosažení kritické teploty a kritického tlaku, je netoxický a nehořlavý, snadno dostupný v přijatelné ceně i čistotě. Největší nevýhodou oxidu uhličitého je jeho nízká polarita, která není dostatečná pro extrakci polárních látek. Proto oxid uhličitý rozpouští pouze nepolární nebo málo polární sloučeniny⁷. Protože se stoupající polaritou analytů klesá jejich rozpustnost v nadkritickém CO₂, řeší se tento problém přidávkem vhodné polárnější látky (tzv. modifikátoru) přímo do nadkritické tekutiny. Nejběžněji používanými modifikátory jsou methanol, ethanol, acetonitril, chloroform, toluen, aceton, sirouhlík a voda. Potřeba použití modifikátoru však nemusí souviset pouze s polaritou extrahovaných látek. V případě polymerních vzorků může modifikátor způsobit nabobtnání polymeru a usnadnit tak difuzi sledovaných sloučenin k povrchu polymeru. V případě analytů nerozpustných v CO₂ může modifikátor sloužit buď přímo jako rozpouštědlo nebo jako derivatizační činidlo. V případě iontových sloučenin lze použít i iont-párové, popř. komplexační modifikátory. Přidáním modifikátoru k nadkritické tekutině se však mění její che-

Tabulka II
Kritické podmínky pro vybraná rozpouštědla používaná při SFE

Sloučenina	Kritická teplota [°C]	Kritický tlak [MPa]	Kritická hustota [g cm ⁻³]
Oxid uhličitý	31,1	7,38	0,448
Oxid dusný	36,6	7,26	0,457
Ethan	32,4	4,88	0,203
<i>n</i> -Pentan	196,8	3,37	0,232
Dichlordifluormethan	111,8	4,02	0,558
Chlorthifluormethan	28,8	3,77	0,580
Amoniak	132,4	11,35	0,240
Voda	374,4	22,12	0,322

mické a fyzikální vlastnosti a tím i kritický bod, což je třeba vzít do úvahy při volbě extrakčních podmínek.

Dalším používaným nadkritickým rozpouštědlem je oxid dusný. Ten je výhodný hlavně pro své nízké kritické hodnoty a polárnější charakter, což umožňuje jeho použití pro extrakci polárních látek. Oxid dusný však vytváří nebezpečné výbušné směsi, proto bylo od jeho používání upuštěno.

2.3.2. Způsoby záchytu extraktu

Jak již bylo popsáno výše, je nejčastěji používaným extrakčním rozpouštědlem při SFE oxid uhličitý. Protože CO₂ je za normálních podmínek plyn, dojde po skončení extrakce k jeho vytékání do atmosféry. Je tedy třeba vyextrahované složky kvantitativně zachytit, a to způsobem vhodným především pro následnou analýzu extraktu. Existuje několik metod používaných pro záchyt extrahovaných sloučenin.

Při záchytu *do organického rozpouštědla* prakticky stačí konec restriktoru (omezovač průtoku nadkritické tekutiny) ponořit pod hladinu vhodného rozpouštědla. Účinnost tohoto provedení závisí především na zvoleném rozpouštědle, jeho objemu, teplotě a na velikosti restriktoru, resp. průtoku CO₂. Tento způsob je méně účinný pro těkavější sloučeniny, avšak je možné kvantitativně zachytit větší koncentrace sledovaných sloučenin. Další nevýhodou tohoto způsobu je nižší citlivost spojená s nařazením sledovaných sloučenin.

Při záchytu *na tuhý sorbent* prochází extrakční tekutina s rozpuštěnými analyty skrz vrstvu vhodně zvoleného sorbentu, jako je např. oktadecylsilikagel (ODS), silikagel nebo florisil. Po skončení extrakce jsou zachycené sloučeniny ze sorbentu vymyty vhodným elučním rozpouštědlem. Ve srovnání se záchytem do rozpouštědla je tento způsob účinnější pro těkavé sloučeniny.

Při *on-line záchytu* jde o přímé spojení extrakční a analytické jednotky, jakými jsou např. plynová nebo kapalinová chromatografie a především chromatografie nadkritickými tekutinami. Záchytné zařízení musí v tomto případě splňovat dvě podmínky, a to kvantitativní záchyt extrahovaných látek a kvantitativní převod těchto látek v úzké zóně do příslušného analytického systému. To lze provést např. záchytem na kryogenicky chlazený povrch (sorbent nebo inertní materiál) s následnou tepelnou nebo chemickou desorpčí. Ve srovnání s předchozími typy záchytu je on-line metoda citlivější především proto, že může být naráz analyzován celý extrakt. Odpadají i případné chyby spojené se zpracováním extraktů. Mezi hlavní nevýhody patří snadné zahlcení systému, což znamená, že prakticky lze extrahovat pouze malé vzorky či nízké koncentrace sledovaných sloučenin.

Při záchytu *na inertní materiál* dochází k zachycení extrahovaných látek na materiál vykazující větší povrch (např. skleněné kuličky nebo křemenná vata). V tomto případě je třeba záchyt provádět při nízké teplotě, avšak je třeba počítat s nižší účinností tohoto způsobu ve srovnání s výše uvedenými metodami, a to zvláště v případě delších extrakčních časů. Problematický může být tento způsob

záchytu i v případě látek citlivých k oxidaci.

Záchyt *do přehřátých par rozpouštědla* je způsob, při kterém je v záchytné kapiláře expandující tekutina smíchána s přehřátými parami rozpouštědla, čímž dochází k intenzivní kondenzaci par za vzniku mikrokapek a k vytvoření pohyblivého kapalného filmu na vnitřním povrchu kapiláry. Při této metodě je významně snížena spotřeba organických rozpouštědel, přičemž účinnost není závislá na charakteru rozpouštědla. Získané extrakty jsou tak koncentrovanější než při použití ostatních metod⁸.

2.3.3. Vybrané aplikace extrakce nadkritickými tekutinami

Přestože je SFE relativně instrumentálně náročnější technika, což souvisí především s používáním vyšších pracovních tlaků, jedná se o poměrně hojně používanou extrakční techniku, o čemž svědčí i mnohé aplikace publikované v poslední době, kdy byla technika SFE použita např. pro extrakci bioaktivních sloučenin ze slunečnice, isoflavonů ze sóji a sójových výrobků, silic z bylin, vonných sloučenin z levandule lékařské, významných sloučenin z listů tabáku, kofeinu se zeleného čaje, fenolických sloučenin z bezinek, lykopenu z melounu nebo rajčat, reziduí pesticidů z rajčat, β-karotenu ze surového palmového oleje, oleje z vlašských ořechů, aminokyselin z geneticky modifikované kukuřice a sóji, ceramidů z vlněných vláken, polyaromatických uhlovodíků ze vzorků zeminy nebo alifatických uhlovodíků z říčních sedimentů a mnoho dalších.

2.4. Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE – Pressurized Fluid Extraction) je extrakční technika, která v podstatě spadá do oblasti mezi extrakcí v Soxhletově extraktoru a SFE. Principiálně se jedná o techniku využívající pro extrakci látek z tuhých vzorků rozpouštědla při teplotách nad atmosférickým bodem varu, která jsou vlivem vyššího pracovního tlaku udržována v kapalném stavu. Používané teploty a tlaky jsou však vždy pod příslušnými kritickými hodnotami⁹.

Technika PFE byla poprvé představena v roce 1995 jako nová extrakční technika pro izolaci organických látek ze vzorků životního prostředí, a to jako technika s původním názvem ASE (Accelerated Solvent Extraction). Avšak tento název byl zaregistrován jako ochranná známka ASE®, což způsobilo, že lze tuto extrakční techniku v literatuře najít pod různými názvy. Mezi nejběžnější patří kromě ASE a PFE ještě PLE (Pressurized Liquid Extraction), PSE (Pressurized Solvent Extraction), ESE (Enhanced Solvent Extraction), a další. Zjednodušeně lze tento problém shrnout tak, že pokud se jedná o techniku využívající organická rozpouštědla pouze při vyšších teplotách a tlacích, tak se bez ohledu na prezentovaný název jedná o vysokotlakou extrakci rozpouštědlem.

Pro extrakci jsou využívána rozpouštědla běžná pro klasické extrakce kapalinami (methanol, acetonitril, aceton, *n*-hexan, apod.). Extrakce jsou prováděny při teplotách v rozmezí 50 až 200 °C a tlacích do 20,7 MPa

(odpovídá 3000 psi), čímž se významně zvyšuje extrakční účinnost. Potřebné množství rozpouštědla se pohybuje od 15 do 45 ml na extrakci vzorku o velikosti 1–30 g, běžné extrakční časy se pohybují od 5 do 15 min.

2.4.1. Faktory ovlivňující vysokotlakou extrakci rozpouštědlem

Existují dva hlavní důvody pro zvýšenou extrakční účinnost organických rozpouštědel při vyšších teplotách a tlacích. Jsou jimi vlivy rozpustnosti a přenosu hmoty a narušení povrchové rovnováhy¹⁰.

Vliv rozpustnosti a přenosu hmoty – při vyšších teplotách se zvyšuje rozpouštěcí kapacita rozpouštědla vůči extrahovaným složkám. Při vyšších teplotách vzrůstá i rozpustnost vody v organických rozpouštědlech, což významně zvyšuje účinnost extrakce pro analyty, které jsou vodou blokovány v pórech tuhé matrice. Se vzrůstající teplotou se zvyšuje rychlost difuze vlivem vyšší hodnoty difuzního koeficientu. V důsledku toho se zvyšuje i rychlost extrakce, kterou lze ještě zvýšit přivedením čistého rozpouštědla. Tím se zvýší i hodnota koncentračního gradientu, tj. hnací síly extrakčního procesu.

Narušení povrchové rovnováhy – významnou roli v tomto případě hrají teplota a tlak. Při vyšších teplotách dochází k rozrušení silných interakcí mezi vzorkem a analytem založených na van der Waalových silách, vodíkových vazbách nebo dipólových přitažlivých silách mezi molekulami extrahované složky a aktivními centry tuhé matrice. Tepelná energie může překonat kohezni (analyt–analyt) i adhezní (analyt–vzorek) interakce vlivem snižování aktivní energie potřebné pro desorpční proces. Snižuje se také viskozita rozpouštědla, což společně se snižováním povrchového napětí analytu, rozpouštědla i matrice usnadňuje jeho penetraci do vzorku. Zvýšený tlak tedy usnadňuje extrakci analytů z porů tuhé matrice. Hlavní úloha zvýšeného tlaku však spočívá v udržování kapalného stavu použitého rozpouštědla při vyšších extrakčních teplotách.

2.4.2. Vybrané aplikace vysokotlaké extrakce rozpouštědlem

Použitelnost metody vysokotlaké extrakce rozpouštědlem lze demonstrovat na celé řadě prací publikovaných v poslední době. Jedná se např. o aplikaci pro extrakci isoflavonů ze sóji a sójových výrobků, reziduí sulfonamidů z masa, antibiotik z masa a ryb, fenolických sloučenin z petržele, anthokyaninů z červeného zelí, přírodních sladidel z kořenů lékořice, tokoferolů a tokotrienolů z cereálií, pistáciového oleje, aflatoxinů z pistácií, reziduí pesticidů z tabáku, organochlorovaných pesticidů ze zeleniny, polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů, dibenzofuranů a bifenyly z potravin, fumonisinů z kukuřičné dětské výživy, polychlorovaných bifenyly a jejich metabolitů z jaterní tkáně, chlorfenolů z kůže, sterolů z mořských sedimentů, přírodních a syntetických estrogenů a jejich metabolitů, sulfonamidů a dalších léčiv z odpadních kalů, přírodních estrogenů ze zeminy, polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů ze vzorků životního prostředí, a mnoho dalších.

3. Mikroextrakční techniky

V současné době nacházejí při úpravě vzorků stále větší uplatnění nové extrakční techniky, u nichž je snaha o úsporu času, snížení pořizovacích nákladů a nákladů na provoz, o zjednodušení a zautomatizování celého procesu a v neposlední řadě o minimalizaci používání organických rozpouštědel. Dalším cílem pro vývoj nových technik byla snaha o zjednodušení celého analytického, a tedy i extrakčního, procesu. Šlo především o integraci několika analytických kroků, jako např. izolace a následné přečištění extraktu, do jednoho kroku. V neposlední řadě měla vliv na vývoj mikroextrakčních technik i snaha o možnost provedení izolace sledovaných sloučenin přímo v terénu a do laboratoře k analýze přenášet tedy pouze získané extrakty¹¹.

Uvedené parametry bezesbýtku splňují mikroextrakční techniky, mezi které patří především mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid-Phase Microextraction) a mikroextrakce kapalnou fází (LPME – Liquid-Phase Microextraction). Společným jmenovatelem pro obě uvedené techniky je fakt, že se nejedná o kvantitativní, ale pouze o rovnovážné metody. Ve výsledku to znamená, že při jejich praktickém použití je třeba pro získání dostatečně přesných výsledků co nejvíce dodržovat dané experimentální podmínky. Lze tak dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro relativně velmi nízké koncentrace sledovaných sloučenin.

3.1. Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází je jednoduchá a účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analytů, která nevyžaduje rozpouštědla nebo komplikované aparatury. Metoda SPME byla vyvinuta týmem kolem profesora Janusze Pawliszyna na Univerzitě ve Waterloo (Ontario, Kanada) na počátku 90. let minulého století¹².

3.1.1. Princip mikroextrakce tuhou fází

Metoda je založena na rovnovážné extrakci sledovaných látek ze vzorku malým množstvím stacionární fáze umístěné na povrchu tenkého křemenného vlákna. Principiálně lze SPME provést ve dvou základních módech, a to buď jako přímou sorpci z roztoku (Direct Immersion, DI-SPME) nebo sorpci z plynné fáze nad vzorkem (Headspace, HS-SPME) na vlákno s chemicky modifikovaným povrchem. V případě DI SPME jde o dvoufázový systém, který je tvořen pouze vzorkem a povrchem SPME vlákna. V případě HS-SPME se do systému ještě zapojuje plynná fáze nad vzorkem. Protože celkové množství analytu by v systému během extrakce mělo být konstantní, lze rovnovážný stav popsat následující rovnicí (3):

$$C_0 V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad (3)$$

kde C_0 je počáteční koncentrace ve vzorku, V_f , V_h a V_s jsou objemy stacionární fáze, headspace a vzorku a C_f^∞ , C_h^∞ a C_s^∞ jsou rovnovážné koncentrace ve stacionární fázi,

v priestore nad vzorkom a vo vzorku. V prípade priameho vzorkovania pak z rovnice vypadáva prostredni člen na pravé strane.

Celkové množství analytu sorbovaného na vlákno v trifázovom systéme lze popsat nasledující rovnicí (4):

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (4)$$

kde je K_{fs} je distribuční konstanta dané sloučeniny mezi stacionární fází a vzorkem a K_{hs} distribuční konstanta mezi plynnou fází a vzorkem. Tato rovnice ve skutečnosti vyjadřuje fakt, že extrahované množství je nezávislé na pozici vlákna v systému, pokud však jsou konstantní objemy stacionární fáze, plynné fáze i vzorku. Pro vzorkování lze tedy použít jak přímou, tak i headspace metodu.

SPME vlákna lze podle povahy stacionární fáze a mechanismu sorpce rozdělit do dvou skupin, a to na *absorbenty* a *adsorbenty*. V prvním případě se jedná o homogenní čisté polymery, a to buď kapalně (PDMS – polydimethylsiloxan) nebo tuhé (PA – polyakrylát). Tato vlákna mají obecně větší extrakční kapacitu, neboť zde nedochází k soutěžení (kompetici) analytů o sorpční místa. V případě adsorbentů jde o porézní částice suspendované v polymeru. Těmito porézními částicemi mohou být např. divinylbenzen (DVB) nebo Carboxen (CARTM, částice na bázi grafitizovaného uhlíku). Vlákna mají nižší mechanickou odolnost, ale větší selektivitu. Adsorbenty zachycují analyty na základě fyzikálně-chemických interakcí na aktivních místech, jejichž počet je omezen. Je tedy omezena i sorpční kapacita vlákna a dochází tak ke kompetici o tato aktivní místa.

SPME může být kombinována s různými separačními metodami. Velmi snadné, relativně bezproblémové a vhodné pro stanovení stabilních složek s vysokou či střední těkavostí je spojení s plynovou chromatografií. Pro desorpci je SPME vlákno zavedeno přímo do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde dojde k tepelné desorpci, která je v tomto případě závislá na bodu varu analytu, tloušťce sorpční fáze vlákna, teplotě a době desorpce. Spojení SPME s kapalinovou chromatografií je umožněno prostřednictvím speciálního adaptéru, který se skládá z šesticestného dávkovacího ventilu a desorpční komory, která nahrazuje dávkovací smyčku HPLC systému. Na rozdíl od GC je v tomto případě desorpce provedena kapalnou fází, která je následně dávkována na chromatografickou kolonu. Podle síly sorpce analytu lze zvolit desorpci v proudu mobilní fáze (dynamická desorpce) nebo lze nechat vlákno v kontaktu s mobilní fází po určitý čas (statická desorpce) a teprve pak desorbované sloučeniny zavést na chromatografickou kolonu¹³.

3.1.2. Faktory ovlivňující mikroextrakci tuhou fází

Ustavování rovnováhy a tedy i citlivost, opakovatelnost a rychlost SPME je ovlivněno celou řadou faktorů. Avšak při aplikaci SPME je třeba vzít v úvahu i to, že není třeba docílit rovnovážného stavu, ale mnohem důležitější je pokud možno co nejpřesněji dodržet jednotlivé extrakční

podmínky.

V případě výběru *sorpční fáze SPME vlákna* je třeba dbát na to, aby její polarita byla blízká polaritě extrahovaných sloučenin. V tomto případě je hodnota distribuční konstanty K_{fs} větší, přičemž je větší i citlivost metody, ale k ustavování rovnovážného stavu dochází pomaleji. Stejný vliv má i silnější vrstva sorpční fáze, která se obvykle volí pro těkavější sloučeniny.

Množství vzorku je třeba volit s ohledem na to, že s rostoucí velikostí vzorku roste množství analytů sorbovaných na vlákno, tedy i citlivost metody. V případě HS-SPME je třeba volit vhodný poměr mezi objemem vzorku a velikostí vzorkovací nádoby tak, aby byl plynný prostor nad vzorkem dostatečně nasycen parami zkoumaných sloučenin a současně byl tento prostor dostatečně velký pro aplikaci SPME vlákna.

Teplota při extrakci má na účinnost extrakce zásadní vliv. Při vyšších teplotách dochází k rychlejšímu ustavení rovnovážného stavu vlivem zvýšených hodnot difuzních koeficientů, avšak dochází ke snižování hodnot K_{fs} . V případě HS-SPME dochází při vyšších teplotách k nárůstu koncentrace těkavějších složek vzorku v plynné fázi, ale současně se zvyšuje riziko tepelné desorpce. Je tedy třeba volit vhodný kompromis.

Doba sorpce, resp. doba potřebná k ustálení rovnováhy, je ovlivněna především hodnotou distribuční konstanty, přičemž při vyšších hodnotách se na vlákno sorbuje více analytu, avšak prodlužuje se doba pro ustavení rovnovážného stavu.

Vliv míchání je významný především s ohledem na rychlost ustavení rovnovážného stavu díky rychlejšímu transportu sledovaných sloučenin z roztoku směrem k vláknu. Proměnlivé míchání je ale nežádoucí, protože dochází k podstatnému zhoršování reprodukovatelnosti celé metody.

Mezi další faktory ovlivňující proces SPME patří *vliv pH a iontové síly*. Změna pH ovlivňuje sorpci především látek s funkčními skupinami, jejichž charakter se s hodnotou pH mění (-COOH, -OH, -NH₂). Kyselé a bazické složky jsou mnohem účinněji extrahovány v kyselém, resp. bazickém prostředí. Vliv iontové síly obecně roste s rostoucí polaritou sloučeniny. S rostoucím obsahem soli (např. NaCl) vzrůstá extrakční výtěžek pouze do určitého maxima, s dalším přidáním se výtěžek naopak snižuje. Při větších koncentracích soli také dochází k výraznějšímu zkracování životnosti vláken.

Desorpční podmínky je třeba volit tak, aby bylo zajištěno rychlé a kvantitativní uvolnění sorbovaných látek z vlákna. Je tedy třeba zvolit vhodnou teplotu a dostatečně dlouhou dobu v případě tepelné desorpce a vhodné rozpouštědlo, jeho množství a dobu statického, popř. dynamického kroku v případě desorpce rozpouštědlem.

3.1.3. Modifikace mikroextrakce tuhou fází

Obdobně jako metodu extrakce v Soxhletově extraktoru, lze i metodu mikroextrakce tuhou fází různými způsoby modifikovat. Mezi nejvýznamnější modifikace patří především mikroextrakce využívající extrakce na magne-

tické míchadlo s vrstvou stacionární fáze (Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE) nebo na sorbent umístěný ve speciálně upravené jehle mikrostříkačky (Microextraction by Packed Sorbent – MEPS).

Metoda mikroextrakce na magnetickém míchadle byla vyvinuta a poprvé publikována na konci minulého století. Hlavním cílem bylo eliminovat některé nedostatky techniky SPME, a to především omezenou kapacitu vláken. Při této metodě je magnetické míchadlo pokryté vrstvou sorbentu (např. polydimethylsiloxan) vloženo přímo do kapalného vzorku, kde dochází k sorpci sledovaných sloučenin¹⁴. Doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu při SBSE závisí především na objemu vzorku a rychlosti míchání, avšak obvykle se pohybuje do 60 min. Sloučeniny zachycené na sorpční vrstvě míchadla lze, stejně jako u SPME, uvolnit buď tepelnou desorpci v případě GC analýzy nebo rozpouštědlem v případě HPLC analýzy. Mezi hlavní výhody SBSE techniky patří dosahování vysokých stupňů zakoncentrování (velké hodnoty obohacovacího faktoru) sledovaných sloučenin. Lze konstatovat, že metoda mikroextrakce na magnetickém míchadle je citlivější než SPME.

Metoda MEPS je mikroextrakční metoda, která byla v roce 2004 představena jako nová extrakční metoda použitelná při stanovení lokálních anestetik v lidské plazmě. V podstatě je to miniaturizovaná extrakce tuhou fází (SPE – Solid Phase Extraction), přičemž vlastní extrakční proces je se SPE shodný¹⁵. V literatuře se lze setkat se dvěma ekvivalentními názvy, a to Microextraction by Packed Sorbent nebo Microextraction in Packed Syringe. Zkratka MEPS se tedy hodí pro obě zmíněné varianty.

Při metodě MEPS je malé množství sorbentu (cca 1 až 2 mg) vloženo a utěsněno přímo do stříkačky (100–250 μ l), do které je následně nasát vzorek, nebo mezi stříkačku a jehlu. Ke kontaktu vzorku se sorbentem dochází ve skutečnosti hned dvakrát, a to poprvé při nasátí vzorku do stříkačky a podruhé při jeho vytlačení ze stříkačky ven. Zachycené sloučeniny jsou následně vymyty vhodným rozpouštědlem. Pro desorpci tedy není třeba použít žádný další adaptér, jako při SPME. Principiálně shodná je i varianta, při které je malé množství stacionární fáze umístěno ve špičkách pro mikropipety (Pipette Tips for Microextraction).

3.1.4. Moderní aplikace mikroextrakce tuhou fází

O stále rostoucí popularitě mikroextrakčních technik, a tedy i SPME, svědčí především nárůst počtu prací publikovaných v posledních letech. Jako příklady jednotlivých aplikací lze uvést např. využití SPME při stanovení polycyklických uhlovodíků a reziduí pesticidů v mléce, specifických vůní v enzymaticky modifikovaném a přírodním sýru, těkavých látek v mléčných výrobcích, v olivovém oleji, v alkoholických nápojích, kandovaných švestkách nebo kouřem uzené slanině, acetaldehydu a těkavých organických sloučenin v cigaretovém kouři, vonných látek v rajčatech, těkavých fenolů v panenském olivovém oleji, profilu těkavých látek v pivu, myricetinu, kvercetin, resveratrolu nebo reziduí pesticidů v červeném víně, látek

potvrzujících geografický původ kávy nebo botanický původ medu, antiestrogenů v biologických vzorcích, klenbuterolu v lidské moči a séru, specifických těkavých sloučenin vylučovaných rakovinnými buňkami a bakteriálními kulturami, chlorfenolů ve vzorcích vod, těkavých organických sloučenin a vedlejších produktů dezinfekce pitné vody, methanolu v bionaftě, složek leteckých paliv ve vzorcích zemin a mnoha dalších studiích.

3.2. Mikroextrakce kapalnou fází

Mikroextrakce kapalnou fází je relativně nová extrakční technika minimalizující spotřebu organických rozpouštědel, která je současně rychlá a levná. Vzhledem k velmi malým objemům rozpouštědel potřebných pro extrakci je minimalizována i expozice toxickým organickým látkám.

Technika byla poprvé představena v roce 1996 jako mikroextrakce jednou kapkou (SDME), přičemž nejprve byla jako extrakční fáze použita kapka (8 μ l) *n*-oktanu zavěšená na teflonové tyčince ponořené do míchaného vodného vzorku. Po extrakci byla teflonová tyčinka vyjmuta z roztoku a extrakční organická fáze byla mikrostříkačkou nadávkována do plynového chromatografu. Později byla tato technika zjednodušena tak, že teflonová trubička byla nahrazena přímo hrotem mikrostříkačky¹⁶.

Při SDME je malý objem (obvykle 1–5 μ l) většinou organického rozpouštědla ve formě kapky zavěšen na hrotu mikrostříkačky. Sledované sloučeniny jsou při dané teplotě po určité době extrahovány do kapky, která je po skončení extrakce vtažena zpět do mikrostříkačky. Získaný extrakt je následně analyzován vhodnou analytickou metodou, a to bez potřeby zařazení desorpčního kroku. Značnou výhodou SDME je fakt, že pro každou extrakci je vždy používána nová extrakční fáze, takže nedochází k přenosům analytů do následných analýz¹⁷.

3.2.1. Princip mikroextrakce jednou kapkou

Technika SDME je v podstatě miniaturizovaná varianta klasické extrakce z kapaliny do kapaliny, která při miniaturizaci využívá poznatků z techniky SPME. Při této technice jde o dvoufázový systém, při kterém jsou sledované sloučeniny extrahovány z vodného vzorku (donorová fáze) do kapky organického rozpouštědla (akceptorová fáze). SDME je tedy rovnovážný proces, který však může být pro zakoncentrování cílových sloučenin velmi účinný. Tuto účinnost lze vyjádřit jako obohacovací faktor EF (Enrichment Factor), který je definován jako poměr rovnovážné koncentrace sledované složky v akceptorové fázi k počáteční koncentraci dané složky ve vzorku.

Uvedený dvoufázový systém však lze realizovat pouze v případě nemísitelnosti extrakčního rozpouštědla a vodného vzorku, přičemž je vhodnější pro sloučeniny s nižší polaritou. Pro těkavější sloučeniny lze techniku stejně jako v případě SPME realizovat i v headspace uspořádání, kde je však třeba vzít v úvahu i možnost odpařování extrakčního rozpouštědla během extrakce.

Značnou výhodou mikroextrakce jednou kapkou je,

že pro její realizaci není třeba používat žádné speciální zařízení. Pro extrakce jsou obvykle využívány mikrostríkačky běžně používané v plynové chromatografii. Dvě základní uspořádání SDME, tj. přímé a headspace vzorkování, lze bez větších obtíží realizovat manuálně s velmi dobrou reprodukovatelností. A protože po skončení extrakce je vždy analyzován celý extrakt, není třeba používat žádné speciální desorpční zařízení.

Alternativou k výše uvedeným základním uspořádáním SDME je dynamická mikroextrakce, což lze realizovat jak na hrotu, tak i přímo uvnitř mikrostríkačky. V prvním případě je postupným doplňováním čistého rozpouštědla eliminován vliv odpařování extrakční fáze při headspace uspořádání. V případě varianty uvnitř mikrostríkačky je extrakční fáze tvořena tenkým filmem organického rozpouštědla na vnitřních stěnách mikrostríkačky. Metoda je realizována tak, že do mikrostríkačky je nejprve nataženo malé množství organického rozpouštědla a poté příslušné množství vzorku, přičemž organické rozpouštědlo vytvoří na stěnách tenký film extrakční fáze. Rovnovážného stavu mezi vzorkem a filmem organického rozpouštědla je dosaženo během několika sekund. Nakonec je z mikrostríkačky vzorek vytlačen a cílený analyt je velmi rychle převeden z filmu do celého objemu organického rozpouštědla. Celý proces je následně několikrát opakován.

Dynamické uspořádání umožňuje dosahovat vyšších hodnot obohacovacího faktoru během kratšího extrakčního času, avšak s horší reprodukovatelností, a to zvláště při realizaci uvnitř mikrostríkačky. Tato skutečnost je u manuálního provedení způsobena nepravidelnou tvorbou filmu na stěnách mikrostríkačky, což ale může být významně zlepšeno automatizací celého procesu. Jednou z možností automatizace celého procesu tak je adaptace konvenčních autosamplerů tak, aby je bylo možné kromě dávkování použít i pro realizaci dynamické mikroextrakce kapalinou.

3.2.2. Faktory ovlivňující mikroextrakci jednou kapkou

Při aplikaci mikroextrakce kapalnou fází na konkrétní typ sloučenin je třeba nejprve optimalizovat jednotlivé parametry ovlivňující extrakční proces. Ačkoliv maximální citlivosti metody je dosaženo po ustavení rovnovážného stavu, pro dostatečně přesné a správné výsledky není jeho dosažení nutné. Důležité však je opět pokud možno co nejpřesněji dodržet jednotlivé experimentální podmínky.

Volba *extrakčního rozpouštědla* je velmi důležitá pro dosažení dostatečné selektivity extrakce cílových sloučenin. Extrakční rozpouštědlo by mělo vyhovovat několika požadavkům, jakými jsou nemísitelnost s vodným vzorkem, popř. nízká těkavost v případě headspace aplikace, vysokou distribuční konstantu pro dané sloučeniny a při chromatografické analýze by jeho pík měl být dostatečně separován od píků sledovaných látek. Volba rozpouštědla by měla být založena na porovnání selektivity a účinnosti extrakce, možnosti ztráty organické fáze částečným rozpouštěním nebo odpařením a v neposlední řadě na čistotě a toxicitě rozpouštědla.

Velikost kapky extrakčního rozpouštědla při SDME

není během extrakce konstantní, a to vlivem částečného rozpouštění ve vzorku, popř. odpařování v plynném prostoru nad vzorkem. Obecně platí, že větší objem kapky vede ke zvýšení analytického signálu, avšak větší kapky jsou méně stabilní a obtížněji se s nimi manipuluje.

Extrakční teplota, resp. její optimalizace, je obecně významnější pro headspace uspořádání. Při vyšších teplotách sice dochází k zakoncentrování těkavějších analytů v plynném prostoru nad vzorkem, avšak současně dochází k rychlejšímu odpařování kapky. U přímého vzorkování je při vyšších teplotách rychleji ustavován rovnovážný stav, ale zvyšuje se rozpustnost organické kapky ve vodném vzorku. Extrakční teplota by tedy měla být volena jako kompromis s ohledem na dosažení dostatečné citlivosti v přijatelném čase.

Při volbě vhodné *doby extrakce* je třeba nalézt vhodný kompromis mezi dobou extrakce, stabilitou kapky a koncentrací sledovaných sloučenin v extrakční fázi. Nadměrné prodloužení doby extrakce může vést ke zvýšenému riziku ztráty kapky rozpouštěním extrakčního rozpouštědla ve vzorku, popř. jejím odpařováním v plynném prostoru nad vzorkem. Naopak příliš krátký extrakční čas může způsobit zhoršení reprodukovatelnosti metody.

Vlivem míchání vzorku obvykle dochází ke zkrácení času potřebného pro dosažení termodynamické rovnováhy. Avšak pokud je mikrokapka přímo umístěna v kapalném vzorku, je rychlost míchání limitována faktem, že při příliš vysoké rychlosti míchání by mohlo dojít k odtržení kapky od hrotu mikrostríkačky. Pro dostatečnou přesnost jsou vhodnější spíše malá míchadla a především konstantní rychlost míchání.

Vlivy pH a iontové sily lze popsat obdobným způsobem jako v případě SPME. Vhodnou úpravou pH vodného vzorku lze ovlivnit extrakci kyselých a bazických sloučenin. V případě výskytu neutrálních (neionizovaných) forem analytů dochází k jejich snadnějšímu přestupu do mikrokapky. Použitím odpovídajícího pufru tak lze dosáhnout vysoké reprodukovatelnosti. Přídavek soli způsobí vlivem vysolovacího efektu snížení rozpustnosti analytů ve vodném vzorku a zlepšení jejich přestupu do organické fáze. Avšak v případě kapalinových mikroextrakcí iontová síla u některých sloučenin nemá na účinnost extrakce vliv buď žádný, nebo ji naopak zhoršuje. Tento efekt je pravděpodobně způsoben tím, že při vyšších koncentracích soli dochází k pomalejšímu ustavování rovnovážného stavu.

3.2.3. Modifikace mikroextrakce jednou kapkou

Stejně jako v případě SPME lze i mikroextrakci kapalnou fází modifikovat několika různými způsoby. Za nejvýznamnější modifikace lze považovat především disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – DLLME) nebo mikroextrakce využívající duté vlákno naplněné vhodnou sorpční vrstvou (Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction – HF LPME).

Metoda HF LPME byla vyvinuta a poprvé publikována na přelomu 20. a 21. století, a to nejprve jako extrakční technika vhodná pro kapilární elektroforézu, poté modifi-

kována i pro chromatografické metody. Při této metodě jsou sledované sloučeniny ze vzorku (donorová fáze) extrahovány do organické fáze s vodou nemísitelného rozpouštědla imobilizovaného v pórech dutého vlákna. Při extrakci je pH vzorku voleno tak, aby byla co nejvíce potlačena ionizace extrahovaných látek, čímž se snižuje jejich rozpustnost ve vodě. Na konci procesu jsou sledované sloučeniny reextrahovány do vhodného rozpouštědla uvnitř dutého vlákna (akceptorová fáze). Mezi hlavní výhody HF LPME patří především to, že extrakční kapalina je mechanicky chráněna a je tak zabráněno jejímu pronikání do vzorku během extrakčního procesu¹⁸.

Metodu lze realizovat buď ve dvoufázovém nebo třífázovém uspořádání. Při dvoufázovém uspořádání je akceptorovou fází stejné organické rozpouštědlo, kterým bylo impregnováno vlákno. Toto uspořádání je vhodné pro lipofilní sloučeniny, jejichž rozpustnost v organickém rozpouštědle je výrazně větší než ve vodě. V třífázovém systému je akceptorovou fází kyselý nebo alkalický vodný roztok. Tento systém je vhodný pouze pro ionizovatelné kyselé nebo bazické sloučeniny, přičemž pH akceptorové fáze je na rozdíl od vzorku voleno tak, aby ionizace analytů byla co nejvíce podpořena a rozpustnost ve vodě byla co největší.

Technika DLLME byla vyvinuta a poprvé publikována v roce 2006 jako nová metoda pro stanovení organických sloučenin ve vodě. Metoda je založená na ternárním systému rozpouštědel. Při její realizaci je směs extrakčního (např. tetrachlorethylenu) a dispergujícího rozpouštědla (např. aceton) prudce vstříknuta do vodného vzorku umístěného v kónické vzorkovací nádobce za tvorby velmi jemných kapiček extrakčního rozpouštědla, které jsou rozptýleny v roztoku vzorku.

Při extrakci dochází k interakci analytů s extrakčním rozpouštědlem, přičemž plocha fázového rozhraní mezi vzorkem a rozpouštědlem je díky tvorbě velmi jemných kapiček extrémně velká. Po extrakci je směs odstředěna a dochází k sedimentaci extraktu na dno vzorkovací nádoby. Sledované sloučeniny v extrakční fázi jsou pak analyzovány vhodnou instrumentální technikou. Mezi hlavní výhody metody DLLME patří především její jednoduchost, rychlost, nízké náklady, vysoká výtěžnost a velké hodnoty obohacovacího faktoru¹⁹.

3.2.4. Vybrané aplikace mikroextrakce kapalnou fází

Přestože kapalinové mikroextrakce dosud nejsou tak rozšířeny jako technika SPME, jde o vývoj i v této oblasti neustále kupředu. Svědčí o tom neustálý nárůst počtu publikovaných prací zabývajících se nejrůznějšími aplikacemi kapalinových mikroextrakcí. Jako příklady těchto aplikací lze uvést využití kapalinových mikroextrakcí např. při analýze těkavých frakcí v čínských bylinách, složek silic z nejrůznějších bylin, ve vodě rozpustných složek růžové silice, těkavých složek silic jako potenciálních antimikrobiálních činidel, kofeinu v nápojích, reziduí pesticidů v alkoholických nápojích, derivátů anisolu ve víně, organochlorovaných pesticidů ve vodě a zelenině, chlorbenzenů, chlorfenolů, herbicidů nebo esterů kyseliny ftalové

ve vodách, mononitrotoluenů v odpadních vodách, karbo-nylových sloučenin v biologických vzorcích, nikotinu ve slinách, amfetaminu a metamfetaminu v moči, progesteronu v lidském séru, diuretik v moči, stopových množství polyaromatických uhlovlíků ve vzorcích životního prostředí a při mnoha dalších aplikacích.

4. Závěr

Závěrem lze konstatovat, že v průběhu posledních desetiletí zaznamenaly značný rozvoj nejen metody analytické, ale i metody přípravy vzorků pro vlastní analýzu. V této oblasti hrají extrakční techniky významnou roli. Zvláště pak v oblasti mikroextrakčních technik dochází k vývoji stále nových metod založených na nejrůznějších principech. Jedním ze směrů vývoje v této oblasti je i studování možnosti uplatnění mikroextrakčních metod v dynamickém uspořádání, a to v manuálním i automatickém provedení, případně kombinací mikroextrakčních metod s jinými instrumentálními metodami (např. destilace, ultrazvuk, elektrochemické metody, atd). Jednoznačným cílem tohoto vývoje je zefektivnit a zpřesnit celý extrakční postup.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantových projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502).

LITERATURA

1. Soxhlet F.: *Dingler's Polytechnisches J.* 232, 461 (1879).
2. Sithole B.B., Nyarku S., Allen L.H.: *Analyst* 120, 1163 (1995).
3. Specht W.: *Z. Lebensm. Unters. For.* 94, 157 (1952).
4. Rezić I.: *Ultrason. Sonochem.* 16, 63 (2009).
5. Dean J.R., in: *Extraction Methods for Environmental Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester 1998.
6. Jansen H.-G., Lou X., in: *Extraction methods in organic analysis* (Handley A.J., Ed.), Chap. 5. Sheffield Academic Press, Sheffield 1999.
7. Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E.: *J. Chromatogr., A* 1152, 234 (2007).
8. Vejrosta J., Karásek P., Planeta J.: *Anal. Chem.* 71, 905 (1999).
9. Zdráhal Z., Karásek P., Lojková L., Bucková M., Večeřa Z., Vejrosta J.: *J. Chromatogr., A* 893, 201 (2000).
10. Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl Ch.: *Anal. Chem.* 68, 1033 (1996).
11. Luo Y., Pawliszyn J., in: *Extraction methods in organic analysis* (Handley A.J., Ed.), Chap. 4. Sheffield Academic Press, Sheffield 1999.
12. Arthur C.L., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 62, 2145 (1990).
13. Chen J., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 67, 2530 (1995).

14. Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C.: *J. Microcol. Sep.* 11, 737 (1999).
15. Altuna Z., Abdel-Rehim M.: *Anal. Chim. Acta* 630, 116 (2008).
16. Jeannot M.A., Cantwell F.F.: *Anal. Chem.* 69, 235 (1997).
17. Batlle R., López P., Nerín C., Crescenzi C.: *J. Chromatogr., A* 1185, 155 (2008).
18. Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E.: *J. Chromatogr., A* 1184, 132 (2008).
19. Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M.R.M., Aghae E., Ahmadi F., Berijani S.: *J. Chromatogr., A* 1116, 1 (2006).

SKÚSENOSTI Z MERANIA A MONITOROVANIE PRODUKTIVITY SKÚŠOBNÝCH LABORATÓRIÍ

ŠTEFAN VODNÝ a SEBASTIÁN BEREK

*BEL/NOVAMANN International, s.r.o., Továrenská 14,
811 09 Bratislava, Slovenská republika
stefan.vodny@ba.bel.sk*

Skúšobné (testovacie) laboratória predstavujú špecifické produkčné (výrobné) jednotky (organizácie) so špecifickým výrobným programom, ktorý sa dlhší čas považoval za podstatne odlišný v porovnaní s klasickými výrobnými jednotkami. Bez ohľadu na charakter činnosti, vysoká a optimalizovaná produktivita práce je spoločným zásadným znakom úspešnosti oboch typov organizácií. Výber správnych indikátorov pre monitorovanie a hodnotenie produktivity práce laboratórií sa realizuje z pohľadu dosiahnutia základných požiadaviek úspešnosti. Tento výber vychádza zo špecifčnosti ich činností, ktorú predstavuje vysoká variabilnosť práce (veľké množstvo rôznorodých pracovných operácií), časová premenlivosť množstva vzoriek (tak v priebehu dňa ako i sezónnosť práce), rozhodujúci podiel ceny práce na celkových nákladoch. Tieto a ďalšie dôležité faktory (čas analýz, požiadavky na dodržiavanie normatívo- v činností – akreditačné kritéria, sledovateľnosť a preukázateľnosť všetkých operácií) predstavujú veľmi zložitý komplex, ktorého monitorovanie, hodnotenie a optimalizácia vyžadujú sofistikované prístupy.

Vychádzajúc z definície produktivity činnosti ako pomeru množstva realizovanej práce k množstvu vykonanej práce za optimalizovaných podmienok, posudzované

indikátory produktivity sú pomer počtu vzoriek na pracovnú hodinu, cena za jednu vzorku a TAT (turnaround time – čas od prijatia vzorky po odoslania výsledkov zákazníkovi).

Monitorovanie indikátorov produktivity práce je efektívne len v prípade, že laboratória majú zavedené laboratórne informačné a riadiace systémy (LIMS), sú prepojené na ekonomické výsledky s kalkulovanými nákladmi na jednotlivé analýzy. Na konkrétnych príkladoch sa prezentujú postupy výberu indikátorov produktivity, analýza procesov na základe ich hodnotenia, postupy optimalizácie činnosti s dôrazom na efektívne využívanie pracovnej doby (vyjadrenej ako FET), optimalizácie počtu pracovníkov a využitia fondu pracovnej doby v priebehu dňa ako i počas pracovného týždňa podľa premenlivosti počtu vzoriek a rozsahov analýz.

Využitie monitorovania produktivity je prezentované na príkladoch operatívneho denného riadenia činností laboratórií, pri hodnotení systémových zásahov do organizačných činností laboratórií ako aj jeho využitia ako benchmarku pre laboratória s podobnou činnosťou.

Optimalizácia času analýz, počtu pracovníkov a vhodnej organizácie činností a využitia pracovného času za použitia vhodných faktorov produktivity práce a primeraných optimalizačných nástrojov vedie k zvýšeniu produktivity práce o 30 až 50 %. Predstavuje rozhodujúci príspevok k operatívnej meraniu činností, k meraniu efektívnosti reengineeringu práce laboratórií a je výrazným nástrojom merania pokroku a efektívnosti práce testovacích laboratórií.

METÓDY ŠTÚDIA POVRCHOV A TENKÝCH VRSTIEV

VIKTOR VRÁBEL

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
viktor.vrabel@stuba.sk*

Abstrakt

Röntgenová fluorescenčná spektroskopia (XRF) – je jednou z najpoužívanejších aplikácií atómovej spektroskopie subvalenčných elektrónov v bežnej analytickej praxi. Metóda je nedeštruktívna a vhodná aj pre malé množstvo vzoriek a nízke koncentrácie ($1 \cdot 10^{-4}$ %) pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu.

Princíp: Primárne vysokoenergetické rtg žiarenie uvoľní elektróny zo spodných energetických hladín v atómoch. Miesto je zaplnené elektrónmi z vyšších hladín, pričom sa rozdiel energií medzi hladinami vyžiarí vo forme charakteristického (*sekundárneho*) rtg žiarenia. Toto fluorescenčné (*sekundárne*) žiarenie sa meria kolmo na primárny lúč.

Elektrónová spektroskopia pre chemickú analýzu (ESCA). Röntgenová fotoelektronová spektroskopia (XPS) – je veľmi presná kvantitatívna metóda (intenzita čiar spektier je lineárna funkciou atómovej koncentrácie). Využitím chemického posunu poskytuje informácie o chemickom stave atómov (štruktúre molekúl), možnosť stanovenia funkčných skupín (využitie najmä v analýze organických látok). Danou metódou možno sledovať všetky prvky (okrem H a He). Ako nedeštruktívna metóda nevyžaduje náročnú prípravu vzorky (umožňuje meranie in situ). Vzorka môže byť tuhá (kompaktná alebo prášková), kvapalná (prevedie sa do tuhého alebo plynného stavu) alebo plyná.

Princíp: Účinkom monochromatického röntgenového žiarenia na atómy študovanej látky nastáva fotoionizácia, výsledkom ktorej je emisia elektrónu s diskretnou energiou. Je založená na meraní kinetickej (E_{kin}) alebo väzbovej (E_v) energie emitovaných elektrónov.

Augerova spektrometria (AES) – patrí medzi najcitlivejšie metódy analýzy povrchov tuhých látok. Metóda umožňuje analýzu povrchov s hrúbkou 0.5 až 2 nm. Elektrónový lúč možno sfokusovať na ploche 2 až 5 mm². Profilovú analýzu umožňuje použitie iónového dela, ktorým sa odparí vrstva za vrstvou po jej analýze elektrónovým lúčom.

rým sa odparí vrstva za vrstvou po jej analýze elektrónovým lúčom.

Princíp: Pri dodaní dostatočne vysokéj energie (prúdom elektrónov) atómu dôjde k uvoľneniu elektrónu z niektorej vnútornej hladiny a k okamžitému zaplneniu vzniknutej vakancie elektrónom z vyššej hladiny. Prebytočná energia je uvoľnená emisiou RTG žiarenia alebo je odovzdaná ďalšiemu elektrónu, pokiaľ je uvoľnená energia väčšia ako je jeho energia, je tento elektrón tiež emitovaný (dôjde teda k dvojnásobnej ionizácii atómu). Emitované elektróny sa nazývajú Augerove elektróny

Röntgenová mikroanalýza (elektrónová mikrosonda) – je nedeštruktívna metóda a umožňuje bodovú, čiarovú alebo plošnú kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu. Pružnými zrážkami elektrónov vznikajú odrazené elektróny, ktoré poskytujú informácie o fázovom zložení tuhých vzoriek, pretože počet odrazených elektrónov závisí od protónového čísla prvku. Nepružnými zrážkami elektrónov vznikajú sekundárne elektróny, ktoré poskytujú informácie o topografii povrchu vzorky. Obraz sekundárnych elektrónov má typickú vysokú ostrosť a veľkú rozlišovaciu schopnosť nerovností (5 nm).

Princíp: Urýchlený a fokusovaný zväzok elektrónov o dostatočne vysokéj energii (50 kV) naráža na vzorku, pričom dôjde k uvoľneniu elektrónu z niektorej vnútornej hladiny a k okamžitému zaplneniu vzniknutej vakancie elektrónom z vyššej hladiny. Prebytočná energia je uvoľnená emisiou charakteristického röntgenové žiarenie, (ktoré sa analyzuje v spektrometroch). Pružnými alebo nepružnými elektrónovými zrážkami vznikajú odrazené a sekundárne elektróny, (ktoré sa detegujú scintilátorom).

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie, Projektmi č. 1/0161/08 a 1/0462/08 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-0210-07.

LITERATÚRA

1. Kellner R., Mermet J.M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H.M. (Eds): *Analytical Chemistry*. WILEY-VCH, Weinheim 2004.
2. Garaj J., Bustín D., Hladký Z.: *Analytická chémie*. Alfa, Bratislava 1987.

POŽIADAVKY NA ANALYTICKÉ METÓDY VO VZŤAHU K NOVÉMU HODNOTENIU POVRCHOVÝCH VÔD

BRANISLAV VRANA, KATARÍNA SILHÁROVÁ a JARMILA MAKOVINSKÁ

*Výskumný ústav vodného hospodárstva, Národné referenčné laboratórium pre oblasť vôd na Slovensku, Nábr. arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, Slovensko
vrana@yuvh.sk*

Príspevok predstavuje súčasný stav problematiky monitorovania a analytických metód stanovenia znečisťujúcich látok vo vzťahu k hodnoteniu stavu povrchových vôd podľa Rámcovej smernice o vode (RSV) a súvisiace problémy. Znečistenie povrchových vôd chemickými látkami môže narúšať vodné ekosystémy a spôsobovať úbytok biotopov a zníženie biodiverzity. Znečisťujúce látky sa môžu hromadiť v potravnom reťazci a škodiť dravcom, ktoré konzumujú kontaminované ryby. Ľudia sú vystavení znečisťujúcim látkam konzumáciou rýb, pitnej vody a prípadne aj rekreačnými aktivitami. Znečisťujúce látky sa môžu nachádzať v prostredí mnoho rokov potom, ako boli zakázané. Niektoré sa môžu transportovať na veľké vzdialenosti a možno ich nájsť i v odľahlých oblastiach. Znečisťujúce látky môžu prenikať do životného prostredia z rôznych zdrojov, napríklad z poľnohospodárstva, priemyslu, spaľovaním, ako produkty alebo ako neúmyselne vypúšťané vedľajšie produkty. Mohli byť vypúšťané v minulosti, alebo sa aj naďalej uvoľňujú z výrobkov používaných v každodennom živote.

Stratégia boja proti znečisťovaniu vôd chemickými látkami je vytýčená v článku 16 Rámcovej smernice o vode 2000/60/ES (RSV)¹.

Ako prvý krok tejto stratégie bol prijatý zoznam prioritných látok (Rozhodnutie 2455/2001/ES)², ktorý identifikoval 33 látok alebo skupín látok prioritného záujmu v povrchových vodách v celej Európskej únii kvôli ich rozšírenému používaniu a ich vysokým koncentráciám v riekach, jazerá, brakických a pobrežných vodách. Tento zoznam bude revidovaný každé štyri roky a podľa potreby aktualizovaný. Aktuálny zoznam zahŕňa hlavne organické zlúčeniny vrátane rôznych pesticídov, niektoré polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), benzén, halogénované rozpúšťadlá, spomaľovače horenia, zmäkčovadlá, povrchovo aktívne látky, antivegetatívne prípravky a aj niektoré ťažké kovy. Európska komisia prijala následne Smernicu 2008/105/ES o environmentálnych normách kvality v oblasti vodnej politiky³. Táto smernica stanovuje limity na koncentrácie v povrchových vodách pre 41 nebezpečných chemických látok vrátane 33 prioritných látok a 8 ďalších znečisťujúcich látok, ktoré predstavujú významné riziko pre zdravie zvierat a rastlín vo vodnom prostredí a pre ľudské zdravie. Má za cieľ zabezpečiť vysokú úroveň ochrany proti rizikám pochádzajúcim z týchto 41 látok a stanovuje pre ne environmentálne normy kvality

(ENK) na európskej úrovni. Okrem toho boli na Slovensku stanovené ENK pre ďalších 26 syntetických a nesyntetických špecifických znečisťujúcich látok relevantných pre Slovensko, ktoré môžu mať škodlivý účinok na biologickú kvalitu, a ktoré sú vypúšťané do povrchových vôd vo významných množstvách⁴. Podľa RSV dodržiavanie ENKs pre prioritné látky je súčasťou hodnotenia chemického stavu útvarov povrchových vôd. Dodržiavanie ENK pre špecifické znečisťujúce látky je súčasťou hodnotenia ekologického stavu. Pre dodržiavanie predpisov na hodnotenie stavu vôd boli prijaté ENK pre vnútrozemské povrchové vody (rieky a jazerá) a ďalšie povrchové vody (prechodné, pobrežné a teritoriálne vody). Boli stanovené dva druhy ENK: ročná priemerná koncentrácia (RP-ENK) pre ochranu proti dlhodobým a chronickým účinkom, a maximálne prípustná koncentrácia (NPK-ENK), aby sa predišlo nezvratným vážnym dôsledkom pre ekosystémy v dôsledku akútnej krátkodobej expozície. Vzhľadom na nedostatočný rozsah spoľahlivých informácií o koncentráciách prioritných látok v živých organizmoch a v sedimentoch na úrovni Spoločenstva, ako aj na skutočnosť, že informácie o povrchových vodách poskytujú dostatočný základ pre zabezpečenie komplexnej ochrany a účinnej kontroly znečistenia, hodnoty ENK boli v tomto štádiu pre väčšinu látok odvodené len pre povrchové vody. V prípade troch prioritných látok (ortuť, hexachlórbenzén a hexachlórbutadién) boli ENK odvodené pre koncentrácie v organizmoch (biote). S výnimkou kadmia, olova, ortuti a niklu ENK sú vyjadrené ako celková koncentrácia stanovená vo vzorke vody. V prípade kovov ENK odkazujú na koncentráciu rozpuštených látok, t.j. koncentráciu v kvapalnej fáze vzorky vody získanej filtráciou cez 0.45 µm filter.

Sediment a vodné organizmy (biota) sú tiež dôležitými matricami pre monitorovanie niektorých prioritných látok a iných znečisťujúcich látok, ktoré majú tendenciu hromadiť sa, s cieľom posúdiť dlhodobé vplyvy ľudskej činnosti a časové trendy. Cieľom monitorovania je zabezpečiť, aby sa existujúce úrovne kontaminácie v živých organizmoch a v sedimentoch nezvyšovali. V tejto súvislosti je relevantné monitorovať v sedimente a biote látky s akumulárnym potenciálom, ako sú polybrómované difenylétery (PBDE), C10-C13 chlóralkány, bis(2-etylhexyl) ftalát, hexachlórbenzén, hexachlórbutadién, hexachlór-cyklohexán, pentachlórbenzén, polycyklické aromatické uhľovodíky, tributylcínicitý kation a kovy kadmium, olovo a ortuť.

Všetky analytické metódy, ktoré sa použijú na účely programov chemického monitorovania stavu vôd, musia spĺňať určité minimálne pracovné kritériá vrátane pravidiel neistoty meraní a limitov kvantifikácie metód⁵. Všetky metódy analýzy vrátane laboratórnych, terénnych a on-line testov používaných na účely programov sledovania chemických látok, uskutočňovaných v súlade s RSV, majú

Tabuľka I

Environmentálne normy kvality pre prioritné látky a niektoré ďalšie znečisťujúce látky³

P.Č.	Názov látky	Číslo CAS	RP-ENK ^I Vnútrozemské povrchové vody ^{II} [μg l ⁻¹]	NPK-ENK ^{II} [μg l ⁻¹]
(1)	Alachlór	15972-60-8	0,3	0,7
(2)	Antracén	120-12-7	0,1	0,4
(3)	Atrazín	1912-24-9	0,6	2,0
(4)	Benzén	71-43-2	10	50
(5)	Brómované difenylétery BDE 28, 47, 99, 100, 153 a 154	32534-81-9	0,0005	<i>neuplatňuje sa</i>
(6)	Kadmium a jeho zlúčeniny (v závislosti od tried tvrdosti vody) ^a	7440-43-9	≤ 0,08 (trieda 1) 0,08 (trieda 2) 0,09 (trieda 3) 0,15 (trieda 4) 0,25 (trieda 5)	≤ 0,45 (trieda 1) 0,45 (trieda 2) 0,6 (trieda 3) 0,9 (trieda 4) 1,5 (trieda 5)
(6a)	Tetrachlórmetán	56-23-5	12	<i>neuplatňuje sa</i>
(7)	C10-13 Chlóralkány	85535-84-8	0,4	1,4
(8)	Chlórfevinfos	470-90-6	0,1	0,3
(9)	Chlórpyrifos (chlórpyrifos-etyl)	2921-88-2	0,03	0,1
(9a)	Cyklodiénové pesticídy: Aldrín Dieldrín Endrín Izodrín	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ=0,01	<i>neuplatňuje sa</i>
(9b)	DDT spolu	<i>neuplatňuje sa</i>	0,025	<i>neuplatňuje sa</i>
	para-para-DDT	50-29-3	0,01	<i>neuplatňuje sa</i>
(10)	1,2-dichlórétán	107-06-2	10	<i>neuplatňuje sa</i>
(11)	Dichlórmetán	75-09-2	20	<i>neuplatňuje sa</i>
(12)	Bis(2-etylhexyl)-ftalát (DEHP)	117-81-7	1,3	<i>neuplatňuje sa</i>
(13)	Diurón	330-54-1	0,2	1,8
(14)	Endosulfán	115-29-7	0,005	0,01
(15)	Fluorantén	206-44-0	0,1	1
(16)	Hexachlórbenzén	118-74-1	0,01 ^b	0,05
(17)	Hexachlórbutadién	87-68-3	0,1 ^b	0,6
(18)	Hexachlórcyklohexán	608-73-1	0,02	0,04
(19)	Izoproturón	34123-59-6	0,3	1,0
(20)	Olovo a jeho zlúčeniny	7439-92-1	7,2	<i>neuplatňuje sa</i>
(21)	Ortuť a jej zlúčeniny	7439-97-6	0,05 ^b	0,07
(22)	Naftalén	91-20-3	2,4	<i>neuplatňuje sa</i>
(23)	Nikel a jeho zlúčeniny	7440-02-0	20	<i>neuplatňuje sa</i>
(24)	Nonylfenol (4-nonylfenol)	104-40-5	0,3	2,0
(25)	Oktylfenol (4-(1,1',3,3'tetrametylbutyl)fenol))	140-66-9	0,1	<i>neuplatňuje sa</i>
(26)	Pentachlórbenzén	608-93-5	0,007	<i>neuplatňuje sa</i>

Tabuľka I
Pokračovanie

P.Č.	Názov látky	Číslo CAS	RP-ENK ^I Vnútrozemské povrchové vody ^{II} [μg l ⁻¹]	NPK-ENK ^{II} [μg l ⁻¹]
(27)	Pentachlórfenol	87-86-5	0,4	1
(28)	Polyaromatické uhľovodíky (PAH)	<i>neuplatňuje sa</i>	<i>neuplatňuje sa</i>	<i>neuplatňuje sa</i>
(28)	Benzo(a)pyrén	50-32-8	0,05	0,1
(28)	Benzo(b)fluorantén	205-99-2	Σ=0,03	<i>neuplatňuje sa</i>
(28)	Benzo(k)fluorantén	207-08-9	Σ=0,03	<i>neuplatňuje sa</i>
(28)	Benzo(g,h,i)perylén	191-24-2	Σ=0,002	<i>neuplatňuje sa</i>
(28)	Indeno(1,2,3-cd)pyrén	193-39-5	Σ=0,002	<i>neuplatňuje sa</i>
(29)	Simazín	122-34-9	1	4
(29a)	Tetrachlóretén	127-18-4	10	<i>neuplatňuje sa</i>
(29b)	Trichlóretén	79-01-6	10	<i>neuplatňuje sa</i>
(30)	Tributylciničité zlúčeniny (Tributylciničitý kation)	36643-28-4	0,0002	0.0015
(31)	Trichlórbenzény	12002-48-1	0,4	<i>neuplatňuje sa</i>
(32)	Trichlórmétán	67-66-3	2,5	<i>neuplatňuje sa</i>
(33)	Trifluralín	1582-09-8	0,03	<i>neuplatňuje sa</i>

^a Pokiaľ ide o kadmium a jeho zlúčeniny (č. 6), hodnoty ENK (EQS) závisia od tvrdosti vody a sú kategorizované do piatich tried (trieda 1: <40 mg CaCO₃/l, trieda 2: 40 až <50 mg CaCO₃/l, trieda 3: 50 až <100 mg CaCO₃/l, trieda 4: 100 až <200 mg CaCO₃/l a trieda 5: ≥200 mg CaCO₃/l). ^b Ak členské štáty neuplatňujú ENK (EQS) pre živé organizmy, zavedú prísnejšie ENK (EQS) pre vodu, aby dosiahli rovnakú úroveň ochrany ako ukladajú ENK (EQS) pre živé organizmy.

byť validované a dokumentované v súlade s normou EN ISO/IEC-17025 alebo inými zodpovedajúcimi normami uznanými na medzinárodnej úrovni. Všetky používané analytické metódy stanovenia sa musia opierať o hodnotu neistoty merania 50 % alebo nižšiu ($k = 2$) odhadnutú na koncentračnej úrovni príslušnej ENK a limit kvantifikácie rovný alebo nižší ako 30 % príslušnej ENK. Ak v prípade niektorého parametra neexistuje príslušná ENK alebo ak neexistuje analytická metóda spĺňajúca vyššie uvedené minimálne pracovné kritériá, príslušná smernica vyžaduje, aby sa monitorovanie uskutočňovalo s použitím najlepších dostupných techník, ktoré nespôsobujú prílišné zvyšovanie nákladov.

Laboratóriá musia preukázať svoju spôsobilosť na analyzovanie príslušných látok účasťou na programoch testovania odbornosti, ktoré zahŕňajú analytické metódy na úrovni koncentrácií, ktoré sú reprezentatívne pre programy monitorovania chemických látok uskutočňované podľa RSV a analýzou dostupných referenčných materiálov, ktoré reprezentujú odoberané vzorky obsahujúce primerané koncentrácie vzhľadom na príslušné ENK.

Približne 75 % z 41 prioritných a ďalších znečisťujúcich látok, pre ktoré sú určené hodnoty ENK na Európskej

úrovni, je možné spoľahlivo sledovať vo vode s prijateľnou neistotou pri použití štandardizovaných metód podľa existujúcich európskych (EN) a medzinárodných (ISO) noriem. Monitorovanie niektorých látok vo vode je problematické nielen na Slovensku, ale i na celoeurópskej úrovni. Je to hlavne kvôli nedostatku validovaných, dostatočne citlivých metód, ktoré by boli použiteľné v bežných laboratórnych podmienkach. Ide o analýzu chlórovaných alkánov s krátkym reťazcom, polybromovaných difenyléterov (PBDE), tributylciničitého kationu, niektorých chlórovaných pesticídov a polycyklických aromatických uhľovodíkov so šiestimi kruhmi. Pretože RSV vyžaduje monitorovanie nefiltrovaných vzoriek pre organické kontaminanty, veľkú pozornosť je potrebné venovať distribúcii chemických látok medzi suspendované častice a kvapalnú fázu. Je povinné používať metódy umožňujúce úplnú extrakciu organických kontaminantov z celej vzorky vody. Z hľadiska zaistenia kvality je potrebné organizovať medzilaboratórne porovnávacie skúšky špecificky navrhnuté podľa požiadaviek RSV (koncentrácie v blízkosti ENK, reprezentatívne vzorky vody), ako aj terénne pokusy zamerané na porovnanie metodík odberu vzoriek.

LITERATÚRA

1. *Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2000/60/ES z 23. októbra 2000, ktorou sa stanovuje rámec pôsobnosti pre opatrenia Spoločenstva v oblasti vodného hospodárstva.* Úradný vestník Európskej únie L 327, 22.12.2000.
2. *Rozhodnutie 2455/2001/EC z 20. novembra 2001, ustanovujúce zoznam prioritných látok v oblasti vodnej politiky.* Off. J. Eur. Comm. L 331, 15.12.2001.
3. *Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2008/105/ES zo 16. decembra 2008 o environmentálnych normách kvality v oblasti vodnej politiky.* Úradný vestník Európskej únie L 348/84, 24.12.2008.
4. *Phare TWINNING SK 05/IB/EN/01. Stanovenie hodnôt environmentálnych noriem kvality pre vodu a posilnenie krajských a obvodných úradov životného prostredia pri implementácii kontroly a monitorovania vôd.*
5. *Smernica komisie 2009/90/ES z 31. júla 2009, ktorou sa v súlade so smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2000/60/ES ustanovujú technické špecifikácie pre chemickú analýzu a sledovanie stavu vôd.* Úradný vestník Európskej únie L 201/36, 1.8.2009.

SPRÁVANIE SA POLYMÉROV VO VODE

STANISLAVA HLÚBIKOVÁ a MIRIAM VRBOVÁ

*SLOVNAFT VÚRUP, a.s., Odbor skúšobných laboratórií,
Vlčie hrdlo, P.O.BOX 50, 820 03 Bratislava
stanilava.hlubikova@vurup.sk
miriam.vrbova@vurup.sk*

Polyméry sú látky, ktoré pozostávajú z veľkého počtu opakujúcich sa identických skupín atómov (štruktúrnych jednotiek) nazývaných monoméry. Monoméry sú obvykle malé molekuly s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou. V makromolekulách sú monoméry navzájom spojené kovalentnými chemickými väzbami do tzv. polymérneho reťazca. Chemickú reakciu tvorby makromolekúl z monomérov nazývame polymerizácia resp. polymerizačná reakcia.

Vzhľadom na podmienky a spôsob ako polyméry vznikajú rozoznávame polyméry prírodné (bielkoviny, celulóza, škrob, chitín...) a polyméry syntetické (polyetylén, polypropylén, polyvinylchlorid, polystyrén, polyamid, polybutadién, polychloroprén...). Všestrannosť použitia polymérov vyplýva z možnosti prispôsobenia ich fyzikálno-chemických vlastností podľa potreby upravením zloženia a distribúciou hmotností molekúl tvoriacich polymér.

Vodorozpustný polymér je polymér, ktorý vo vodnej fáze pri 25 °C a hmotnostnej koncentrácii do 1 % vytvorí makroskopicky homogénny roztok. Rozpustnosť, teplota rozpustnosti a rýchlosť rozpúšťania materiálu nesmie znefunkčňovať materiál a spôsob jeho aplikácie. Skúšky rozpustnosti vo vode a extraktívnych vlastností vo vode sa vykonávali v súlade s nariadením komisie (ES) č. 440/2008 zo dňa 30.5.2008. Tieto skúšky vyjadrujú potenciál látky, alebo zložiek prípravku prenikat' po úniku do životného prostredia do podzemných vôd alebo sa transportovať do väčších vzdialeností od miesta úniku.

Rozpustnosť vo vode je určená koncentráciou polyméru, pri ktorej tvorí vo vode pri danej teplote nasýtený roztok. Rozpustnosť vo vode sa skúmala bankovou metódou, ktorá sa vzťahuje na absolútne čisté látky s vyššou rozpustnosťou ($>10^{-2}$ g l⁻¹), ktoré sú stabilné vo vode. Extraktívne vlastnosti sa stanovujú taktiež pomocou bankovej metódy ako obsah polyméru vo vodnej fáze pri teplote 37 °C a pH 2, pH 9. Spracované vodné extrakty sa analyzovali metódou TOC (stanovením celkového množstva organicky viazaného uhlíka vo vodnom extrakte) systémom oxidácie roztokom peroxodisíranu sodného a následným stanovením pomocou IR detekcie.

SOME PRACTICAL APPLICATIONS OF SILVER SOLID AMALGAM ELECTRODES FOR VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF MODERN PHARMACEUTICALS

VLASTIMIL VYSKOČIL^a, ALEŠ DAŇHEL^a, JAN FISCHER^a, MARCELA KOTASOVÁ^b, ADAM MÁLEK^b, JITKA RADOVÁ^a, KAROLINA PECKOVÁ^a, and JIŘÍ BAREK^a

^a Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague 2, ^b Masaryk Secondary School of Chemistry, Křemencova 179/12, 116 28 Prague 1, Czech Republic
vyskoci1@natur.cuni.cz

Introduction

There is no doubt that mercury is the best electrode material because of easily renewable and atomically smooth surface and large cathodic window¹. However, there is a tendency to avoid the use of mercury because of unsubstantiated fears of its toxicity and because of its low mechanical stability complicating the use of mercury electrodes in flowing systems and in portable devices². It was clearly shown that amalgam electrodes can, in many cases, successfully substitute mercury electrodes³. Amalgam can be liquid, paste, or solid depending on mercury-metal ratio.

Solid amalgam electrodes represent a suitable alternative to mercury electrodes due to their similar electrochemical properties and non-toxicity of the amalgam material⁴. A mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) (see Fig. 1) represents suitable non-toxic replacement for traditional mercury electrodes; it should be stressed that mercury meniscus prepared at the surface of solid amalgam is rapidly converted into saturated amalgam of the metal contained in electrode mate-

rial. Good mechanical stability, simple handling and regeneration including an electrochemical pretreatment of electrode surface are among the main advantages of m-AgSAE. In absence of specific interactions between the analyte and silver from silver solid amalgam, the differential pulse voltammetric peak potentials on m-AgSAE and hanging mercury drop electrode (HMDE) are nearly the same⁵.

By immersing a polished silver solid amalgam electrode (p-AgSAE) into liquid mercury, a mercury meniscus is formed at its surface which is not visually changed for several months. However, it is recommended to repeat the amalgamation once per week to prevent deterioration of sensitivity or reproducibility. Then, the electrode is rinsed with water and checked by means of a lens to determine whether a meniscus of mercury has been formed. The m-AgSAE is the most reliable and most similar to the HMDE so that most analytical applications published are using this electrode³. The above-described procedure for meniscus forming is simple and fast. However, it does not guarantee that the new meniscus will give the same response as the previous one, which is partially connected with possible passivation of old meniscus and partially with a different area of the new meniscus. The problem of electrode reproducibility is addressed (as with many other solid electrodes) by standard addition technique.

The m-AgSAE was used as an electroanalytical sensor for voltammetric determination of antineoplastic drugs carmustine and lomustine containing reducible *N*-nitroso groups⁶, of reducible nitro groups containing metronidazole (nitroimidazole antibiotic and antiprotozoal), ornidazole (nitroimidazole antiprotozoal) and flutamide⁷ (nonsteroidal antiandrogen drug), and of azidothymidine⁸ (reducible azido group containing antiretroviral drug) (for structural formulas see Fig. 2). Optimum conditions have been found for voltammetric determination of above men-

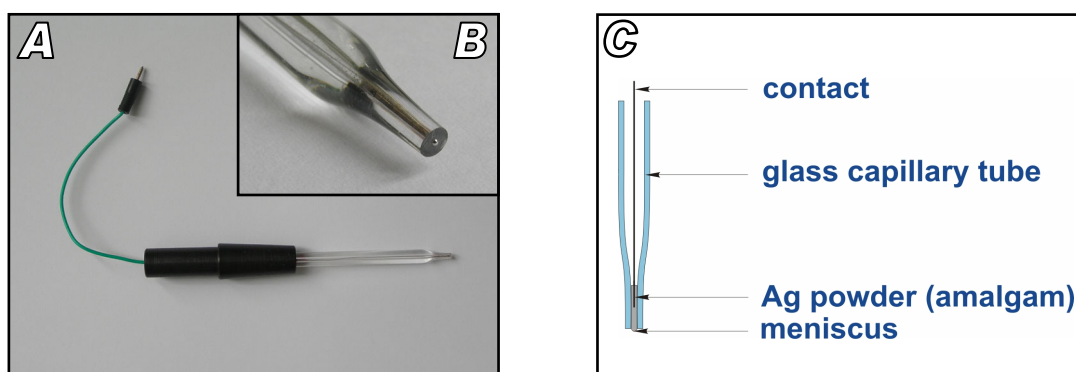


Fig. 1. Mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) (A), detailed picture of meniscus (B) and scheme of electrode (C)

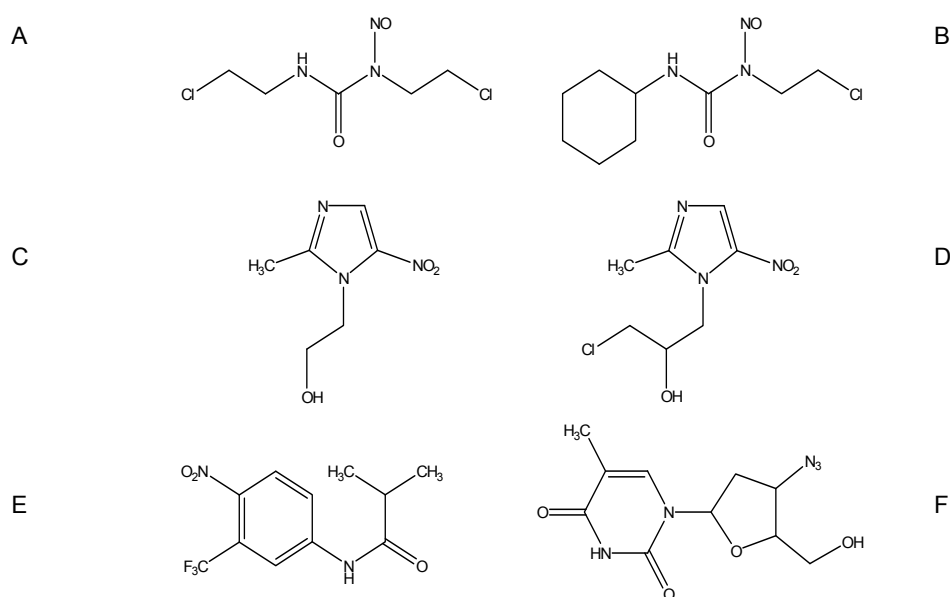


Fig. 2. Structural formulas of carmustine (A), lomustine (B), metronidazole (C), ornidazole (D), flutamide (E), and azidothymidine (F)

tioned drugs by direct current voltammetry (DCV) (for carmustine, lomustine, and flutamide) and differential pulse voltammetry (DPV) (for all pharmaceuticals tested) at m-AgSAE. Obtained results have been compared with previous determinations of studied drugs at mercury electrodes^{6,9–12}.

The newly developed methods were successfully applied to the determination of the drug in pharmaceutical formulations CeeNU[®] Lomustine 40 mg (containing lomustine), Apo-Flutamide 250 mg (Eulexin[®] tablets) (containing flutamide), and Zidovudina 100 mg (containing azidothymidine).

Experimental

Chemicals and Reagents

The stock solutions of carmustine (CAS Number: 154-93-8, CAS Name: Urea, *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N*-nitroso-; > 98 %; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), metronidazole (CAS Number: 443-48-1, CAS Name: 1H-Imidazole-1-ethanol, 2-methyl-5-nitro-; purity not given; Sigma-Aldrich), ornidazole (CAS Number: 16773-42-5, CAS Name: 1H-Imidazole-1-ethanol, α -(chloromethyl)-2-methyl-5-nitro-; purity not given; Sigma-Aldrich), and azidothymidine (CAS Number: 30516-87-1, CAS Name: Thymidine, 3'-azido-3'-deoxy-; 99.9 %; Merck, Darmstadt, Germany), all of concentration $1 \cdot 10^{-3}$

mol l^{-1} , were prepared by dissolving the appropriate pure substance in 100.0 ml of deionized water. The stock solutions of lomustine (CAS Number: 13010-47-4, CAS Name: Urea, *N*-(2-chloroethyl)-*N'*-cyclohexyl-*N*-nitroso-; 99 %; Sigma-Aldrich) and flutamide (CAS Number: 13311-84-7, CAS Name: Propanamide, 2-methyl-*N*-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]-; purity not given; Sigma-Aldrich), both of concentration $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, were prepared by dissolving the appropriate pure substance in 100.0 ml of methanol (99 %, p.a. purity; Lachema, Brno, Czech Republic). More dilute solutions were prepared by diluting the stock solutions with deionized water or methanol.

The analyzed pharmaceutical preparations were capsules CeeNU[®] Lomustine with the declared lomustine content 40 mg (Bristol–Myers Squibb, Sermoneta, Italy), Apo-Flutamide with the declared flutamide content 250 mg (Chanelle Medical, Loughrea, Ireland), and Zidovudina with the declared azidothymidine content 100 mg (Laboratorio Farmaceutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), Recife, Brazil).

The Britton-Robinson (BR) buffers were prepared in a usual way, i.e., by mixing a solution of 0.04 mol l^{-1} in phosphoric acid, 0.04 mol l^{-1} in acetic acid and 0.04 mol l^{-1} in boric acid with the appropriate amount of 0.2 mol l^{-1} sodium hydroxide solution (all p.a. purity; Lachema, Brno, Czech Republic). The other chemicals (potassium chloride, sodium acetate, sodium borate, all of p.a. purity grade) were supplied by Lachema. Deionized water was

produced by Milli-Q_{plus} system (Millipore, Billerica, USA). All the chemicals were used without further purification and all the solutions were maintained in glass vessels (because the studied drugs can adsorb at plastic materials¹³) in dark at laboratory temperature.

Apparatus

The voltammetric measurements were performed using an Eco-Tribo Polarograph driven by PolarPro 5.1 software (both Polaro-Sensors, Prague, Czech Republic). The software worked under the operational system Microsoft Windows XP Professional (Microsoft Corporation, Redmond, USA). The voltammetric measurements were carried out in a three-electrode system – a platinum auxiliary electrode PPE, a RAE 113 (1 mol l⁻¹ KCl) Ag/AgCl reference electrode (both Monokrystaly, Turnov, Czech Republic) and a m-AgSAE (the disc diameter, 0.52 mm, and the disc area, 0.21 mm²; EcoTrend Plus, Prague, Czech Republic) as working electrode.

The scan rate, 20 mV s⁻¹, the pulse amplitude, -50 mV, and pulse width, 100 ms, were used in DPV, with current sampling for last 20 ms. The m-AgSAE consisted of a drawn-out glass tube, whose tip was packed with a fine silver powder, amalgamated by liquid mercury and connected to an electric contact⁴. Afterwards, it was immersed into a small volume of liquid mercury and agitated for 15 s. The m-AgSAE could be used for several weeks, only its regeneration with mercury was repeated every week.

The solution pH was measured by Conductivity & pH meter 4330 (Jenway, Chelmsford, UK) with a combined glass electrode (type 924 005).

Procedures

Before starting the work, as well as after electrode passivation or every break in the voltammetric measurements longer than 1 hour, the electrochemical activation of m-AgSAE was carried out in 0.2 mol l⁻¹ KCl at -2200 mV under stirring for 300 s followed by rinsing with deionized water. Unless stated otherwise, the general voltammetric procedure was as follows: An appropriate amount of the stock solution of the tested substance in deionized water or methanol was placed in a 10.0 ml volumetric flask, the system was diluted to volume with a buffer of the required pH and transferred into the voltammetric cell. Oxygen was removed by bubbling with nitrogen (purity class 4.0; Linde, Prague, Czech Republic) for 5 min and the voltammogram at m-AgSAE was recorded.

Regeneration of m-AgSAE lasting about 30 s preceded each measurement (except for the investigation of m-AgSAE passivation during measurements without regeneration). It was based on application of 300 polarizing cycles (switching the electrode potential from $E_{1,reg}$ to $E_{2,reg}$ for 50 ms). $E_{1,reg}$ was about 50 to 100 mV more negative than the potential of the anodic dissolution of the electrode, $E_{2,reg}$ was about 50 to 100 mV more positive than

the potential of the hydrogen evolution in the given supporting electrolyte. Under these conditions, eventual oxides of mercury or silver are reduced and adsorbed molecules are desorbed⁴. The appropriate values of the potential and the time of regeneration were inset in the software of the computer-controlled instrument used and the regeneration of m-AgSAE was thus carried out automatically.

For quantitation of lomustine in capsules CeeNU[®] Lomustine 40 mg by DCV and DPV at m-AgSAE, the content of the capsule was dissolved in 100 ml of methanol. After 3 min of sonication, 100 µl of this solution was transferred into 10.0 ml volumetric flask, 900 µl of methanol was added and the flask was made up to the mark with 0.05 mol l⁻¹ acetate buffer (pH 4.0). The solution was transferred into the voltammetric cell and deoxygenated with nitrogen for 5 min. DC and DP voltammograms were recorded for this sample using regeneration potentials $E_{1,reg} = -250$ mV and $E_{2,reg} = -1400$ mV prior to every scan. The exact concentration of lomustine was determined using one standard addition of 171 µl of the lomustine standard stock solution ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) in methanol, and plotting the resulting analytical curve. Four parallel determinations were performed for analysis of both pharmaceutical formulations.

The quantitation of flutamide in tablets Apo-Flutamide 250 mg by DCV and DPV at m-AgSAE was performed as follows: The tablet was finely grinded and dissolved in 250 ml of methanol. 4.0 ml of thus prepared solution were diluted with methanol to 100 ml; 1.0 ml of resulting solution was diluted with BR buffer pH 7.0 to 10.0 ml and transferred into voltammetric cell. DCV and DPV using standard addition methods (one standard addition of 1.0 ml of flutamide of $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) were used for the determination.

For quantitation of azidothymidine in capsules Zidovudina 100 mg by DPV at m-AgSAE, the content of ten capsules was weighed and homogenized in an agate mortar. The average weight of one capsule content was 189.0 ± 3.2 mg. An aliquot of the powder mass from capsule content corresponding to 10 mg of azidothymidine (ca. 19 mg) was accurately weighed ($n = 10$), transferred to 50 ml volumetric flask and made up to the mark with 0.05 mol l⁻¹ borate buffer (pH 9.3). After 3 min of sonication followed by centrifugation, 1.00 ml of the supernatant was diluted to 10.0 ml in volumetric flask by the same buffer, achieving theoretical concentration $7.48 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ for azidothymidine. The solution was transferred in the voltammetric cell and deoxygenated by nitrogen for 5 min. DP voltammogram was recorded for this sample. Exact concentration of azidothymidine was determined applying two standard additions of 200 µl from the azidothymidine standard stock solution ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) prepared for this unique case, and plotting resulting analytical curve ($E_{1,reg} = -1800$ mV and $E_{2,reg} = -200$ mV).

All the curves were measured 3 times and all the measurements were carried out at laboratory temperature. The DCV peak height (I_p) was evaluated from the extrapo-

lated linear portion of the voltammogram before the onset of the peak. DPV peaks were evaluated from the straight line connecting the minima before and after the peak. The calibration curves parameters (e.g., slope, intercept) were calculated using the OriginPro 8.0 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA)¹⁴. The limit of quantification (L_Q) was calculated as the analyte concentration of corresponding to tenfold the standard deviation of the ten parallel measurements of the lowest measurable concentration^{14,15}.

Results and Discussion

Spectrophotometric Studies on Stability of Studied Substances

N-nitroso compounds are not stable in aqueous solutions^{13,16}. The stabilities of the stock solutions of carmustine ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) and lomustine ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) in water were monitored for 30 days by measuring the absorbance at $\lambda = 230 \text{ nm}$, where the absorption maximum of the *N*-nitroso chromophore appears¹⁷. While lomustine degrades very fast, for carmustine the absorbance decreases by ca. 20 % during 3 days. The instability of aqueous solutions was confirmed earlier by spectrophotometric and polarographic measurements, with a reported maximum stability of the solutions at pH 2.6–5.0 for lomustine¹⁸. The stock solution of lomustine in methanol was used instead of that in deionized water. Its stability is characterized by a 10 % decrease of absorbance at $\lambda = 230 \text{ nm}$ within 4 days. The reports on stability of carmustine in aqueous solution slightly differ; a highest stability was reported in citrate buffer of pH 3.3–4.8 (ref.¹³). A fresh stock solution of carmustine (pH 5.3) in water was prepared at the beginning of every working day.

Our UV-VIS spectrophotometric studies of other studied drugs (metronidazole, ornidazole, flutamide and azidothymidine) have demonstrated that these stock solutions are stable for at least one year^{7,8,12}.

Voltammetric Determination of Studied Drugs

The choice of proper pH for analysis of *N*-nitroso drugs is of high importance due to their instability in aqueous media. The influence of pH on the DC and DP voltammograms of carmustine and lomustine was investigated at m-AgSAE in BR buffer in the pH range 2.0–12.0. The pH dependence of the signal of carmustine revealed one-step reduction exhibiting decreasing peak heights with increasing pH of the supporting electrolyte similarly to HMDE⁶. The main peak presumably corresponds to the two-electron reduction of *N*-nitroso group to corresponding hydroxylamine. Lomustine features similar reduction potentials as carmustine at m-AgSAE and peak current maxima at pH 6.0. Calibration curves were measured in BR buffer pH 7.0 (regeneration potentials $E_{1,\text{reg}} = -200 \text{ mV}$ and $E_{2,\text{reg}} = -1550 \text{ mV}$ for both DCV and DPV at

m-AgSAE) for carmustine and in the mixture of 0.05 mol l⁻¹ acetate buffer pH 4.0 – methanol (9:1) ($E_{1,\text{reg}} = -250 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1400 \text{ mV}$ for DCV at m-AgSAE and $E_{1,\text{reg}} = -150 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1100 \text{ mV}$ for DPV at m-AgSAE) for lomustine. This decision was based on regular shape and easy evaluation of the voltammograms due to a sufficient difference between the peak potential and the onset of the base electrolyte decomposition. The obtained parameters and L_Q s mostly in the $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ concentration range are summarized in Table I. A lower sensitivity by an order of magnitude and higher L_Q s were obtained for carmustine using DPV at m-AgSAE in comparison with HMDE⁶; this was frequently reported also for other organic compounds^{8,19,20}. An excellent repeatability of 1.37 % (s_r) was obtained for the lowest attainable concentration of carmustine ($4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$), which resulted in L_Q in the $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ concentration range.

The influence of pH on DC and/or DP voltammetric behavior of metronidazole, ornidazole and flutamide was investigated in BR buffer of appropriate pH (2.0–12.0) or in the mixture of the BR buffer and methanol (9:1) in the case of flutamide. Selected voltammograms of metronidazole and ornidazole are depicted in Fig. 3 for the sake of illustration. Metronidazole, ornidazole and flutamide yielded one DP voltammetric peak (and one DC voltammetric peak in the case of flutamide) over the whole pH region, similar to their behavior at mercury electrodes^{9,21,22}. This voltammetric peak corresponds probably to irreversible four-electron reduction of the nitro group to the hydroxylamino group¹⁹. The peak potential (E_p) values of all thus observed peaks shifted toward more negative potentials with increasing pH. This shift can be explained by preliminary protonation of the test substances leading to a decrease in the electron density at the nitrogen atom and resulting in easier electron acceptance at low pH values. Optimum conditions for voltammetric determination were found to be BR buffer pH 10.0 (for DPV of metronidazole and ornidazole) and BR buffer pH 7.0 – methanol (9:1) (for DCV and DPV of flutamide). Under these optimum conditions (see Table I), the DCV and/or DPV calibration curves were measured over concentration ranges from zero to $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. While metronidazole was measured without using an electrochemical regeneration, regeneration potential pairs $E_{1,\text{reg}} = 0 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1800 \text{ mV}$ and $E_{1,\text{reg}} = +150 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$ were used prior to every voltammetric determination of ornidazole and flutamide, respectively. The parameters the calibration curves obtained are summarized in Table I.

The variability of DP voltammograms of azidothymidine at m-AgSAE in the pH range of 2.0–12.0 in BR buffer have shown that no clear reduction peaks were obtained for pH 2.0–4.0, at moderate acidic to neutral media (pH 4.5–7.0) significant increase of current between –800 mV and –1100 mV with no clear maximum was observable. The appearance of the reduction signal at pH 4.5 may be related to the pK_a value 4.8 of azido group protonation reported in ref.²³. In that study, below pH value 4.8 the single polarographic wave at –1020 mV (vs. Ag/AgCl)

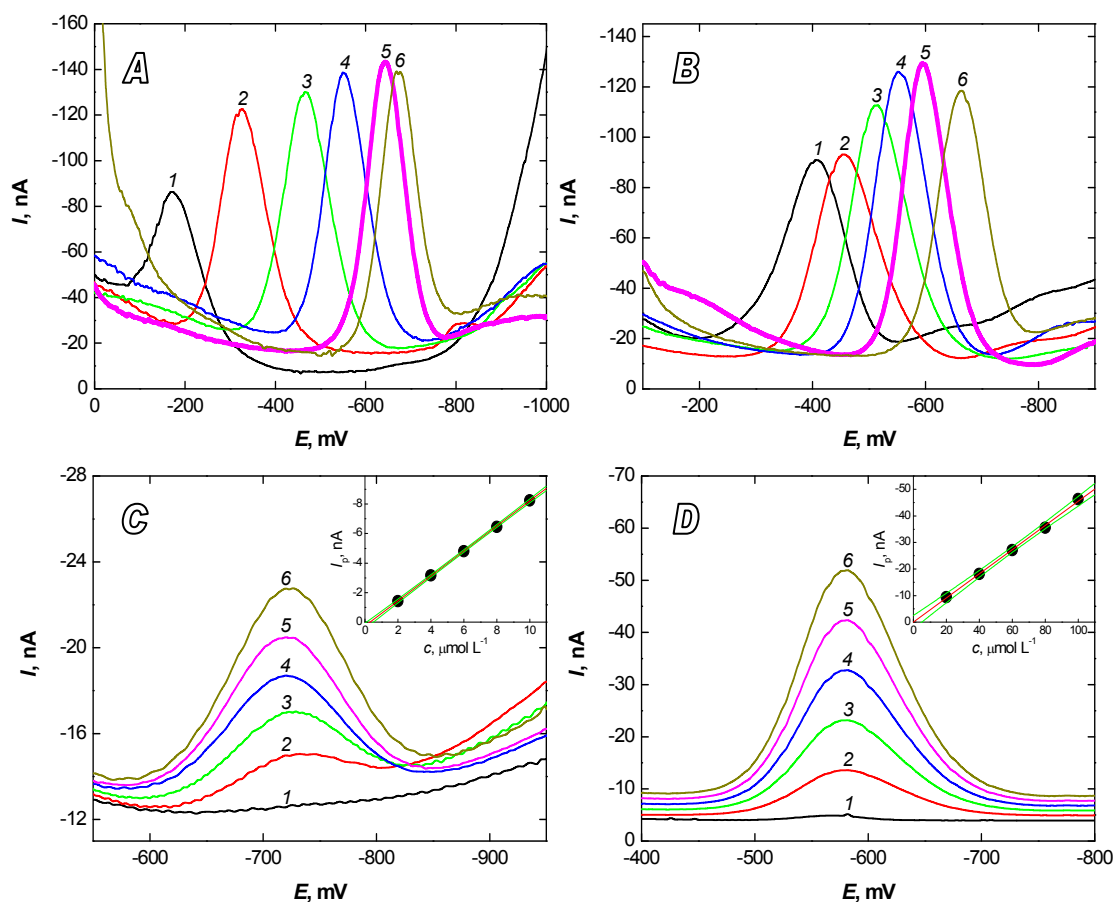


Fig. 3. DP voltammograms of metronidazole (A) and ornidazole (B) (both $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) at m-AgSAE in the BR buffer medium; the BR buffer pH: 2.0 (1), 4.0 (2), 6.0 (3), 8.0 (4), 10.0 (5), and 12.0 (6); polarization rate, 20 mV s^{-1} ; bold violet line represents selected optimum pH value for DPV determination of studied drugs. DP voltammograms of metronidazole (C) and ornidazole (D) at m-AgSAE in BR buffer pH 10.0; $c(\text{metronidazole})$: 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), and 10 (6) $\mu\text{mol l}^{-1}$; $c(\text{metronidazole})$: 0 (1), 20 (2), 40 (3), 60 (4), 80 (5), and 100 (6) $\mu\text{mol l}^{-1}$. The corresponding calibration straight lines (red) are in the insets. The confidence bands (green) are constructed for $\alpha = 0.05$

was reported. This relatively negative reduction potential is already at the onset of hydrogen evolution at m-AgSAE and thus the reduction signals are only insinuated. The well-defined and regular reduction peaks were obtained in basic solutions. For our further experiments, the universal BR buffer pH 9.0 was replaced by 0.05 mol l^{-1} borate buffer (pH 9.3) with regeneration potentials $E_{1,\text{reg}} = -1800 \text{ mV}$ and $E_{2,\text{reg}} = -200 \text{ mV}$ (ref.⁸). In Table I, the parameters of calibration dependencies in this optimum medium are further listed. The selected concentration range illustrates that the sensitivity of the electrode meets the requirements on the determination of higher concentrations common in pharmaceutical analysis.

Analysis of Pharmaceutical Formulations Containing Lomustine, Flutamide and Azidothymidine

The developed electroanalytical methodologies were modified for quantitation of lomustine, flutamide and azidothymidine in pharmaceutical preparations. Standard addition methods described in paragraph Procedures were developed for these purposes. The obtained mean values of lomustine, flutamide and azidothymidine contents in the analyzed dosage forms and the statistical evaluation are summarized in Table II. The mean value (m_A) for the percentage content referred to the value declared by manufacturer is in all cases higher than 96 %. The accuracy of the DPV methods is higher than that of DCV as follows from relative standard deviations (s_r). It can be concluded that

Table I
Optimum conditions and parameters of the calibration straight lines for the voltammetric determination of studied drugs at m-AgSAE

Analyte	Method	Optimum conditions	Linear dynamic range [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Slope [$\text{mA mol}^{-1} \text{l}$]	Intercept [nA]	R^a	L_Q^b [$\mu\text{mol l}^{-1}$]
Carmustine	DCV	BR buffer pH 7.0	2 – 100	–0.39	–1.7	–0.985	0.83
	DPV		2 – 100	–0.28	–1.5	–0.981	0.71
Lomustine	DCV	0.05 mol l^{-1} acetate buffer pH 4.0 – methanol (9:1)	2 – 100	–0.24	+0.27	–0.988	3.1
	DPV		2 – 100	–0.30	+0.47	–0.985	2.2
Metronidazole	DPV	BR buffer pH 10.0	0.2 – 100	–0.78	–0.20	–0.998	0.33
Ornidazole	DPV	BR buffer pH 10.0	0.2 – 100	–0.46	+0.01	–0.999	0.40
Flutamide	DCV	BR buffer pH 7.0 – methanol (9:1)	2 – 100	–1.67	–13.2	–0.982	4.7
	DPV		2 – 100	–1.68	+1.8	–0.977	3.0
Azido-thymidine	DPV	0.05 mol l^{-1} borate buffer pH 9.3	0.4 – 1500	–1.76	–8.5	–0.998	0.41

^a Correlation coefficient; ^b Limit of quantification

Table II
Mean values m_A , standard deviations s , relative standard deviations s_r , limits of confidence $L_{1,2}$ ($\alpha = 0.05$) of percentage content of studied drugs in their pharmaceutical preparation, analyzed by DCV and DPV at m-AgSAE

Analyte	Pharmaceutical	Method	m_A [%]	s [%]	s_r [%]	$L_{1,2}$ [%]
Lomustine	CeeNU [®] Lomustine 40 mg	DCV	97	10	10	16
		DPV	97.2	3.2	3.3	5.4
Flutamide	Apo-Flutamide 250 mg	DCV	145	20	14	29
		DPV	96	8.0	8.4	18
Azidothymidine	Zidovudina 100 mg	DPV	101.4	1.8	1.8	1.2

the developed voltammetric methods offer a suitable alternative to the methods prescribed in the Czech²⁴ or United States Pharmacopoeia²⁵: Time-consuming argentometric titration after alkaline hydrolysis for lomustine, UV spectrophotometry at $\lambda = 295$ nm prescribed for flutamide and HPLC-UV method prescribed for azidothymidine.

Conclusions

In this contribution, mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) has been tested as an electroanalytical sensor for voltammetric determination of modern pharmaceuticals. Optimum conditions for voltammetric determination – using direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) – of active component standards were found to be Britton-Robinson buffer pH 7.0 (for DCV and DPV of carmustine), 0.05 mol l^{-1} acetate buffer pH 4.0 – methanol (9:1) (for DCV and DPV of lomustine), Britton-Robinson

buffer pH 10.0 (for DPV of metronidazole and ornidazole), Britton-Robinson buffer pH 7.0 – methanol (9:1) (for DCV and DPV of flutamide), and 0.05 mol l^{-1} borate buffer pH 9.3 (for DPV of azidothymidine). Under these conditions, limits of quantification were found to be $8 \cdot 10^{-7}$ and $7 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} (for DCV and DPV, respectively, of carmustine at m-AgSAE), $3 \cdot 10^{-6}$ and $2 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} (for DCV and DPV of lomustine), $3 \cdot 10^{-7}$ and $4 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} (for DPV of metronidazole and ornidazole, respectively), $5 \cdot 10^{-6}$ and $2 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} (for DCV and DPV of flutamide), and $3 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} (for DPV of azidothymidine at m-AgSAE).

The newly developed methods were successfully applied to the determination of the drug in pharmaceutical formulations CeeNU[®] Lomustine 40 mg (containing lomustine), Apo-Flutamide 250 mg (Eulexin[®] tablets) (containing flutamide), and Zidovudina 100 mg (containing azidothymidine). According to the procedure based on the standard addition technique, the recoveries of known amounts of lomustine contained in pharmaceutical

preparations available in capsules were $97 \pm 16\%$ (for DCV at m-AgSAE) and $97.2 \pm 5.4\%$ (for DPV at m-AgSAE), of flutamide $145 \pm 29\%$ (for DCV at m-AgSAE) and $96 \pm 18\%$ (for DPV at m-AgSAE), and of azidothymidine $101.4 \pm 1.2\%$ (for DPV at m-AgSAE). There was no significant difference between the values gained by proposed voltammetric methods and the determinations recommended by the Czech or United States Pharmacopoeia regarding the mean values and standard deviations.

Financial support of this work, provided by The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Projects LC 06035, MSM 0021620857 and RP 14/63), by the Grant Agency of Charles University in Prague (Projects 89710/2010/B-Ch/PrF and SVV 261204), and by the Grant Agency of the Czech Republic (Project P206/10/P087), is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 173 (2009).
2. Daňhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 21, 303 (2009).
3. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
4. Yosypchuk B., Novotný L.: *Electroanalysis* 14, 1733 (2002).
5. Fischer J., Vaňourková L., Daňhel A., Vyskočil V., Čížek K., Barek J., Pecková K., Yosypchuk B., Navrátil T.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 2, 226 (2007).
6. Pecková K., Vrzalová L., Bencko V., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1697 (2009).
7. Radová J.: *BSc Thesis*. Charles University in Prague, Prague 2008.
8. Pecková K., Navrátil T., Yosypchuk B., Moreira J. C., Leandro K. C., Barek J.: *Electroanalysis* 21, 1750 (2009).
9. Snycerski A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7, 1513 (1989).
10. Alvarez-Lueje A., Pena C., Nunez-Vergara L. J., Squella J. A.: *Electroanalysis* 10, 1043 (1998).
11. Hammam E., El-Desoky H. S., El-Baradie K. Y., Beltagi A. M.: *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* 82, 1386 (2004).
12. Průchová M.: *Diploma Thesis*. Charles University in Prague, Prague 2009.
13. Fredriksson K., Lundgren P., Landersjo L.: *Acta Pharm. Suec.* 23, 115 (1986).
14. Miller J. N., Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education, 2nd ed., Harlow 2005.
15. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, p. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.
16. Bartošek I., Daniel S., Sýkora S.: *J. Pharm. Sci.* 67, 1160 (1978).
17. Supko J. G., Phillips L. R., Malspeis L.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 677, 351 (1996).
18. Loftsson T., Fridriksdottir H.: *Int. J. Pharm.* 62, 243 (1990).
19. Pecková K., Barek J., Navrátil T., Yosypchuk B., Zima J.: *Anal. Lett.* 42, 2339 (2009).
20. Jiránek I., Pecková K., Králová Z., Moreira J. C., Barek J.: *Electrochim. Acta* 54, 1939 (2009).
21. El-Sayed G. O.: *Microchem. J.* 55, 110 (1997).
22. Fonseca J. M. L., Rivera M. C. G., Monteagudo J. C. G.: *Anal. Lett.* 26, 109 (1993).
23. Kawczynski W., Czocharlska B., Shugar D.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 26, 441 (1991).
24. *Pharmacopoeia 2005*. Supplement 2006. Grada Publishing, Prague 2006.
25. *The United States Pharmacopoeia XXIV (USP 24)*. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville 1999.

PRAKTICKÉ APLIKACE UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD

**JIRÍ ZIMA, HANA DEJMKOVÁ
a LENKA NĚMCOVÁ**

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Česká republika

*zima@natur.cuni.cz, dejmkova@natur.cuni.cz,
nemcova.len@seznam.cz*

Klíčová slova: uhlíkové pastové elektrody, elektrochemie, voltmetrie, HPLC s elektrochemickou detekcí

Obsah

1. Úvod
2. Současné trendy
3. Uhlíkové pasty v analýze organických sloučenin
4. Závěr

1. Úvod

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) se v analytické praxi používají již více než 50 let, jež uplynuly od pionýrské práce R. N. Adamse¹, kterou byla započata nová kapitola elektroanalytické chemie využívající jednoduchou směs uhlíkového prášku a pastovací kapaliny pro řešení jak praktických analytických problémů, tak pro účely teoretické elektrochemie. Do roku 2010 bylo podle Web of Science opublikováno již více než 2000 původních prací věnovaných analytickému využití uhlíkových past pro stanovení široké palety anorganických i organických analytů. Uhlíková pasta ve svém původním originálním provedení je binární směsí uhlíkového (grafitového) prášku a vhodné organické pastovací kapaliny, která tomuto elektrodovému materiálu propůjčuje vhodné mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti a přispívá k příznivým elektrochemickým vlastnostem výsledné směsi. Z mechanických vlastností je to především dostatečná pevnost a inertnost pasty, avšak přitom snadná obnovitelnost povrchu, např. prostým mechanickým ořením vnější vrstvy, zpasivované produkty proběhlé elektrodové reakce. Z elektrochemických vlastností je nutno zmínit především nízký zbytkový proud a malý šum, který běžně umožňuje stanovovat různé analyty v submikromolárních koncentracích, ve speciálních případech i v subnanomolárních koncentracích.

Použití uhlíkových past ve formě prostých binárních směsí uhlíkového prášku a pastovací kapaliny jako elektro-

dového materiálu tvoří jistě více než 50 % z celkového počtu zveřejněných prací, ovšem současný trend preferuje využití nejrůznějším způsobem cíleně modifikovaných uhlíkových past. Za cílenou modifikaci uhlíkové pasty je možno považovat rozpuštění organické látky v pastovací kapalině nebo vmíchání modifikátoru do pasty^{2,3}. Za první shrnutí a vymezení možností chemicky modifikovaných uhlíkových pastových elektrod (CM CPE) je možno považovat práci⁴, která jasně poukázala na výhody chemické modifikace pasty vedoucí ke snížení mezí detekce stanovovaných analytů využitím chemického způsobu jejich nahromadění na povrchu pasty či extrakce do nitra pasty. Koncem 80. let minulého století nastal rozvoj biologicky modifikovaných uhlíkových pastových elektrod (BM CPE)⁵, kdy imobilizace enzymů v uhlíkové pastě umožnila konstrukci a rozvoj nového typu biosenzoru použitelného v analýze biologicky významných organických sloučenin i různých anorganických iontů či molekul. Využití enzymaticky katalyzovaných reakcí vedlo především k větší selektivitě stanovení, pozdější sprážením několika enzymových reakcí v jedné pastě selektivitu jednotlivých stanovení dále zvýšilo, stejně jako využití různých typů mediátorů přenosu elektronu⁶. Za příbuzné a od uhlíkových pastových elektrod odvozené typy dalších elektrodových materiálů lze považovat i kompozitní uhlíkové elektrody⁷ a sítotiskové elektrody⁸, jež se však již většinou charakteristik spíše blíží elektrodám pevným a tudíž nejsou předmětem této prezentace.

Shrnutím využití uhlíkových pastových elektrod v analýze organických a anorganických sloučenin se v průběhu minulých let zabývala řada přehledných článků^{9–16}, ve kterých lze obvykle nalézt tabulky s přehledy stanovovaných analytů, a to společně s údaji o složení použitých uhlíkových past, složení elektrolytů, pracovních postupech a použitých elektroanalytických metodách. Užitečné podrobnosti o konstrukci těl pro uhlíkové pasty lze nalézt např. v pracích^{12,14}.

2. Současné trendy

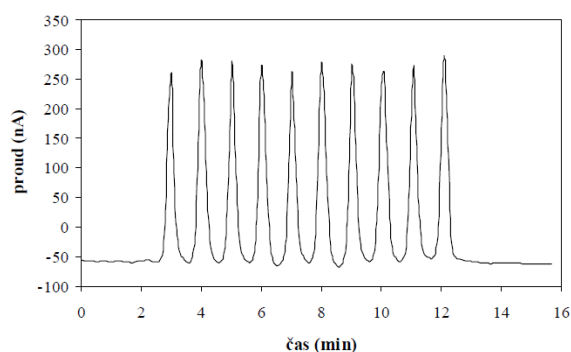
I když by se mohlo zdát, že nemodifikované uhlíkové pasty mají svůj rozvoj za sebou, objevují se i práce, které s úspěchem používají nemodifikované uhlíkové pasty^{17–18}. Jedná se většinou o aplikace zaměřené na stanovení různých organických látek zajímavých z farmaceutického hlediska a o matrice nejrůznějších lékových přípravků, které často kromě vlastní elektrochemicky aktivní stanovené látky neobsahují žádné další analyty, které by mohly rušit vlastní stanovení analytu, a tudíž není potřeba složení pasty nijak modifikovat, aby se eliminoval vliv příměsí. Na druhé straně se objevují práce využívající chemicky nebo biologicky modifikované CPE^{19–22}, které se snaží

buď ďalej snižovať prepätí redoxných reakcií alebo zlepšovať selektivitu a zvyšovať citlivosť, napr. prostredníctvom využívání katalytických proudů. Každým rokom se však objavujú nové a nové práce využívajúce modifikované uhlikové pasty ke stanoveniu glukózy, peroxidu vodíku alebo NAD-H^{23–25}, i pro odborníka v oboru je však veľmi ťažké zhodnotiť, čo zásadne nového prinášajú. Inherentným problémom amperometrických a voltametrických metod je pasivácia pracovných elektrod produkty proběhlých elektrochemických reakcií alebo ovlivnění směrnice kalibračních závislostí složkami matrice, což obojí negativně ovlivňuje jejich využitelnost a částečně je diskvalifikuje v očích odborné neelektrochemické veřejnosti. Řešení pasivace povrchu uhlikových past je možné buď mechanickým obnovováním pracovního povrchu elektrody nebo využíváním různých čistících potenciálových programů a střídáním polarizace pracovní elektrody, nicméně je to vždy krok komplikující a zdržující, který se může projevit i horší opakovatelností měření. To je pravda napr. ve srovnání s výsledky měření využívajícími rtuťové elektrody, ovšem opakovatelnost či reprodukovatelnost měření s pastovými elektrodami je ve srovnání s měřeními na pevných elektrodách minimálně srovnatelná. Problém s pasivací pracovních elektrod na bázi uhlikových past je menší u průtokových metod, jako napr. u průtokové injekční analýzy či HPLC²⁶, kde se uhliková pasta v konfiguraci „wall-jet“ nebo „thin-layer“ používá jako elektrochemický detektor. Zde je totiž elektrochemicky aktivní povrch uhlikové pasty po většinu času omýván proudem mobilní fáze, kterou se z povrchu elektrody rychle odstraní všechny produkty proběhlých elektrochemických reakcií, takže tyto detektory dávají stabilní a opakovatelné signály a elektrodu není nutné mechanicky či elektrochemicky čistit. Použití uhlikových pastových elektrod bylo dlouhá léta omezeno na vodná prostředí nebo prostředí s nízkým obsahem organického modifikátoru, jako je napr. methanol nebo acetonitril, které se často používají jako základní složky mobilních fází v HPLC. Klasické pasty na bázi spektrografických uhlíků totiž ve směsném vodně-organickém prostředí velmi rychle podléhaly degradaci, což se projevovalo růstem šumu až ztrátami kontaktu, kdy měření bylo v řádu minut znemožněno. Tento nedostatek byl odstraněn zavedením mikrokuliček skelného uhlíku. Uhlikové pastové elektrody z mikrokuliček skelného uhlíku²⁷ a napr. nujolu totiž degradaci nepodléhají a lze s nimi s úspěchem měřit i ve směsných prostředích obsahujících až 80 % organického modifikátoru. Tato skutečnost otvírá dveře využití uhlikových past jako elektrochemického detektoru v HPLC a tím jejich využití i pro komplikovanější matrice, kde vlastnímu stanovení analytu musí předcházet jeho separace od dalších, za daných podmínek podobně elektrochemicky aktivních složek. Velmi zajímavý trend v oblasti využití uhlikových past představují práce využívající iontových kapalin coby pastovacích kapalin²⁸, modifikace uhlikových past nejrůznějšími typy nanomateriálů od „single-wall“ či „multi-wall“ uhlikových nanotrubiček až napr. po nanodrátky různých lanthanoidů²⁹, dále se objevují práce zabývající se stanovením DNA nebo analýzou genových

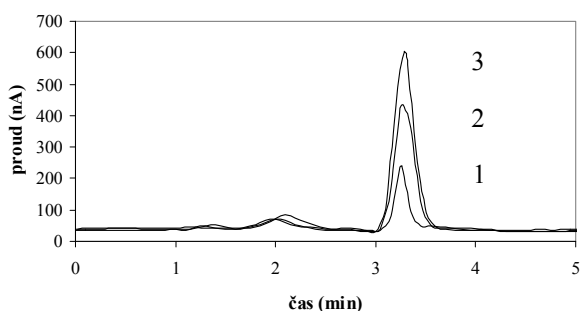
sekvencí využíváním polymerázových řetězových reakcií u DNA hybridizací a konstrukcí DNA modifikovaných senzorů³⁰. Tyto nové metody jsou často extrémně citlivé a představují jistě zajímavý směr v rozvoji metod využívajících uhlikové pasty.

3. Uhlikové pasty v analýze organických sloučenin

Nemodifikované uhlikové pasty ve spojení se vsádkovými analytickými metodami nalézají uplatnění především v analýze léčiv v různých lékových formách a případně v analýze elektrochemicky aktivních metabolitů léčiv v tělních tekutinách, převážně moči. Pro stanovení analytů voltametrickými metodami v lékových formách není mnohdy potřeba využívat vysoké citlivosti těchto metod, ani zvyšovat selektivitu modifikacemi složení past a obvykle nekomplikované a přesně definované matrice léků umožňují jednoduše stanovit hlavní účinnou složku bez separace od složek doplňkových. Pro analýzy léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách je naopak často žádoucí využít vysokou citlivost elektrochemických metod, a to spolu se separací stanovované látky napr. metodou HPLC. Jedním z příkladů využití HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE je stanovení thymolu (2-isopropyl-5-methylfenol)²⁶ vyvinuté v naší laboratoři. Práci v prostředí mobilní fáze obsahující 90 % methanolu umožnily mikrokuličky skelného uhlíku a stabilita z nich vyrobené CPE. Na obr. 1 je uveden chromatogram s deseti bezprostředně po sobě jdoucími nástříky 20 μl $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} thymolu. Obrázek ilustruje typickou opakovatelnost měření bez obnovování povrchu CPE. Po nalezení optimálních podmínek pro stanovení thymolu metodou HPLC-ED (C18 kolona, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr pH 7 – methanol (1:9), $E = +1.1$ V vs. Ag/AgCl/3 M KCl)) byla tato metoda úspěšně použita ke stanovení thymolu v pastilkách Septolete (obr. 2) a mateřídouškovém sirupu.



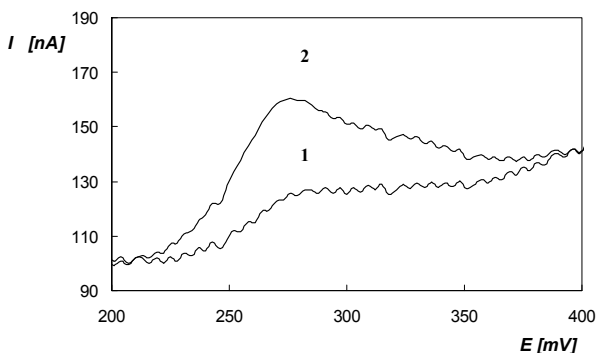
Obr. 1. HPLC chromatogram ilustrující opakovatelnost ED thymolu na CPE (dávkováno 20 μl $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} thymolu v methanolu, $E = +1,1$ V, mobilní fáze zředěný Brittonův-Robinsonův pufr pH 7 : methanol (1 : 9), 0,5 ml min^{-1} , kolona Lichrospher® RP-18, 100-5 μm , 125 \times 4 mm)



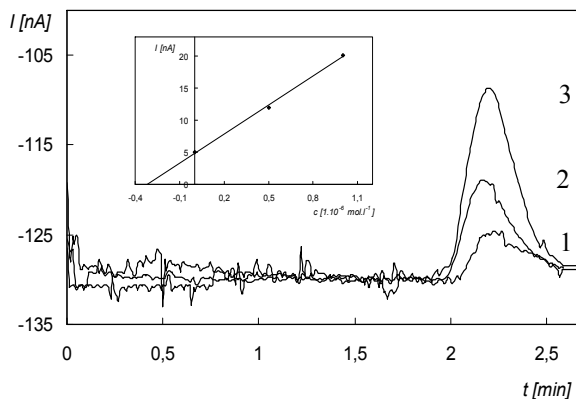
Obr. 2. HPLC chromatogramy thymolu s ED na CPE. Kolona Lichrospher® RP-18, 100-5 μm , 125 \times 4 mm, $E = +1,1$ V, mobilní fáze zředěný Brittonův-Robinsonův pufr pH 7 : methanol = 1 : 9, 0,5 ml min^{-1} , dávkováno 20 μl , 1 vzorek po extrakci thymolu z tabletky Septolete® D, 2 přidáno 32 μl 0,01238 mol l^{-1} thymolu v methanolu, 3 přidáno 64 μl 0,01238 mol l^{-1} thymolu v methanolu)

Jiným příkladem z naší laboratoře je stanovení propylgalátu³¹. Propylgalát (propyl-3,4,5-trihydroxybenzoát, E 310) je známý antioxidant a stabilizační látka, která se používá jako aditivum do mnoha druhů potravin. Kromě potravin (převážně tukových výrobků) bývá často obsažen i ve farmaceutických a kosmetických přípravcích. K jeho stanovení lze v některých případech využít voltametrické vsádkové metody, jindy je nutné použít metody separační, jako např. HPLC s elektrochemickou detekcí. Obr. 3 znázorňuje DP voltamogram propylgalátu na CPE při jeho stanovení ve vzorku jedlého oleje po extrakci propylgalátu methanolem, přidání Brittonova-Robinsonova pufru a standardním přidavku $1 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} propylgalátu.

Na obr. 4 jsou uvedeny HPLC chromatogramy s elektrochemickou detekcí propylgalátu na CPE z mikrokuliček skelného uhlíku, a to po nástřiku 20 μl methanolickeho extraktu propylgalátu ze vzorku jedlého



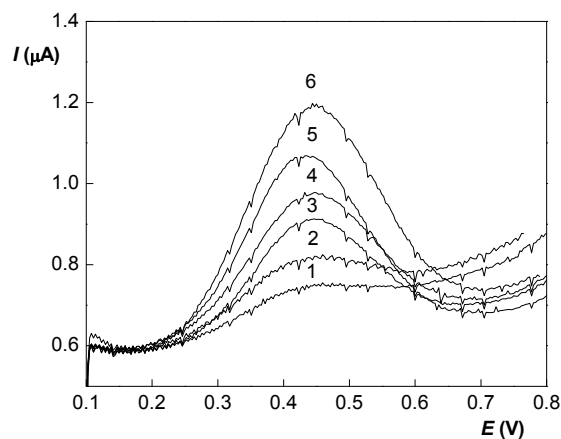
Obr. 3. DP voltamogramy propylgalátu po jeho extrakci ze vzorku jedlého oleje methanolem (1) a téhož roztoku se standardním přidavkem $1 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} propylgalátu (2). Měřeno v prostředí Brittonův-Robinsonův pufr o pH 5 – methanol (8:2)



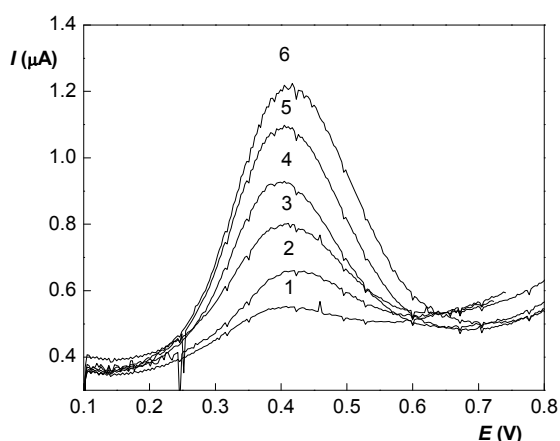
Obr. 4. HPLC chromatogramy s ED propylgalátu (PG) na CPE. Kolona Superspher® 100 RP18, 125 \times 4 mm, mobilní fáze 0,01 mol l^{-1} fosfátový pufr pH 4 – MeOH (50:50), 1,0 ml min^{-1} , $E = +0,8$ V, dávkováno 20 μl , 1 PG po extrakci ze vzorku jedlého oleje, 2 vzorek se standardním přidavkem $5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} PG, 3 vzorek se standardním přidavkem $1 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} PG

oleje a chromatogramů po dvou standardních přidávcích propylgalátu. Methanolicke mobilní fáze uhlíkovou pastu v žádném případě nedegradovala, stanovení bylo spolehlivé a reprodukovatelné a bylo ověřeno, že výsledky stanovení propylgalátu ve vzorku jedlého oleje získané pomocí HPLC-ED se statisticky významně neliší od výsledků získaných metodou HPLC s UV detekcí propylgalátu při 280 nm.

Další příklad praktického využití chemicky modifikovaných CPE k analýze organických sloučenin je uveden na obr. 5 a 6. Na obr. 5 jsou znázorněny diferenční pulzní voltamogramy prokázaného karcinogenu 4-amino-



Obr. 5. DP voltamogramy 4-aminobifenylu (4-ABP) na CPE modifikované 10 % montmorillonitem v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru pH 11, 1 $1 \cdot 10^{-6}$, 2 $2 \cdot 10^{-6}$, 3 $4 \cdot 10^{-6}$, 4 $6 \cdot 10^{-6}$, 5 $8 \cdot 10^{-6}$ a 6 $10 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} 4-ABP v pitné vodě



Obr. 6. DP voltamogramy 4-aminobifenylu (4-ABP) na CPE modifikované 10 % montmorillonitem v prostredí Brittonova-Robinsonova pufru pH 11, $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 4 \cdot 10^{-6}$, $4 \cdot 6 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 8 \cdot 10^{-6}$ a $6 \cdot 10 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} 4-ABP v říční vodě

bifenylu³² v modelových vzorcích pitné vody a na obr. 6 téhož analytu v modelových vzorcích vody říční. Jednoduchá matrice pitné, resp. říční vody umožnila provést přímé vsádkové voltametrické stanovení bez nutnosti extrakčního či jiného oddělení stanovovaného analytu z originální matrice.

4. Závěr

Uhlíkové pastové elektrody jsou stále velmi atraktivním tématem mnoha elektrochemických prací a jsou s úspěchem využívány ke stanovení řady anorganických i organických analytů. V posledním desetiletí převažuje jejich využití v nejrůznějších modifikovaných formách, které se snaží využít zvýšení citlivosti metod po inkorporaci nanomateriálů s velkým povrchem či katalytickými vlastnostmi pro studované reakce, dále využít selektivních reakcí s chemickými modifikátory složení past, enzymatických reakcí po inkorporaci enzymu/enzymů do uhlíkových past nebo imobilizaci enzymu/enzymů na povrchu past. Objevují se mnohé práce s membránovým chráněním povrchu past před negativním vlivem reálných maticí, ve kterých vlastní stanovení probíhají. Oblast využití uhlíkových pastových elektrod v analytické praxi je jistě mnohem širší, než jak ukazuje tento příspěvek a zahrnuje od CPE odvozené sítotiskové elektrody, uhlíkové pasty modifikované různými filmy, např. v poslední době velmi populárními bizmutovými filmy, nicméně tato témata již značně překračují rámec tohoto příspěvku a jsou dobře zpracována v přehledných příspěvcích z poslední doby^{11–16}.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem

školsství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt SVV 261204).

LITERATURA

- Adams R. N.: *Anal. Chem.* 30, 1576 (1958).
- Kuwana T., French W. G.: *Anal. Chem.* 36, 241 (1964).
- Marcoux L. S., Prater K. G., Prater B. G., Adams R. N.: *Anal. Chem.* 37, 1446 (1965).
- Ravichandran K., Baldwin R. P.: *J. Electroanal. Chem.* 126, 293 (1981).
- Matuszewski W., Trojanowicz M.: *Analyst* 113, 735 (1988).
- Gorton L.: *Electroanalysis* 7, 23 (1995).
- Wang C. L., Creasy K. E., Shaw B. R.: *J. Electroanal. Chem.* 300, 365 (1991).
- Wang J., Baomin T., Setiadji R.: *Electroanalysis* 6, 317 (1994).
- Kalcher K.: *Electroanalysis* 2, 419 (1990).
- Kalcher K., Wang J., Kauffmann J.-M., Svancara I., Vytras K., Neuhold C., Zhongping Y.: *Electroanalysis* 7, 5 (1995).
- Švancara I., Vytras K., Barek J., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 311 (2001).
- Kalcher K., Švancara I., Metelka R., Vytřas K., Walcarius A., v: *Encyclopedia of Sensors*, Vol. 4 (Grimes C. A., Dickey E. C., Pishko M. V., ed.), str. 283. ASP, Stevenson Ranch (Florida, USA), 2006.
- Svancara I., Vytras K., Kalcher K., Walcarius A., Wang J.: *Electroanalysis* 21, 7 (2009).
- Svancara I., Walcarius A., Kalcher K., Vytras K.: *Central. Eur. J. Chem.* 7, 598 (2009).
- Zima J., Švancara I., Barek J., Vytřas K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 204 (2009).
- Zima J., Švancara I., Barek J., Pecková K., v: *Progress On Drinking Water Research*, Chap. 5, str. 1 (LeFebvre M. H., Roux M. M., ed.), Nova Science Publishers, NY 2009.
- Rievaj M., Tomcik P., Janosikova Z., Bustin D., Compton R. G.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 53, 153 (2008).
- Radi A. E., Abd-Elghany N., Wahdan T.: *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1379 (2007).
- Tu X. M., Yan L. S., Luo X.B., Luo S. L., Xie Q. J.: *Electroanalysis* 21, 2491 (2009).
- Khalilzadeh M. A., Gholami F., Karimi-Maleh H.: *Anal. Lett.* 42, 584 (2009).
- Alpat S., Telefoncu A.: *Sensors* 10, 748 (2010).
- Jiang X. Y., Zhu L. D., Yang D. X., Mao X. Y., Wu Y. H.: *Electroanalysis* 21, 1617 (2009).
- Lozano M. L., Rodriguez M. C., Herrasti P., Galicia L., Rivas G. A.: *Electroanalysis* 22, 128 (2010).
- Wooten M., Gorski W.: *Anal. Chem.* 82, 1299 (2010).
- Li Y. H., Liu X. Y., Zeng X. D., Liu Y., Liu X. S., Wei W. Z., Luo S. L.: *Microchim. Acta* 165, 393 (2009).

26. Zima J., Cienciala M., Barek J., Moreira J. C.: Chem. Anal. (Warsaw) 52, 1049 (2007).
27. Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: Sensors 4, 47 (2004).
28. Sun W., Jiang Q., Xi M. Y., Jiao K.: Microchim. Acta 166, 343 (2009).
29. Daneshgar P., Norouzi P., Ganjali M. R., Dinarvand R., Moosavi-Movahedi A. A.: Sensors 9, 7903 (2009).
30. Šnevajsová P., Tison L., Brožková I., Vytřasová J., Metelka R., Vytřas K.: Electrochem. Commun. 12, 106 (2010).
31. Vysoká M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2010.
32. Kalusová M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2010.

VOLTAMMETRY OF NATURAL LIPOPHILIC ANTIOXIDANTS IN SURFACTANT MEDIA

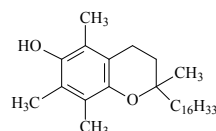
**GUZEL ZIYATDINOVA, ENDZHE
GINIYATOVA, and HERMAN
BUDNIKOV**

*Analytical Chemistry Department, A.M. Butlerov Institute
of Chemistry, Kazan State University, Kremlyevskaya 18,
420008, Kazan, Russia
Ziyatdinovag@mail.ru*

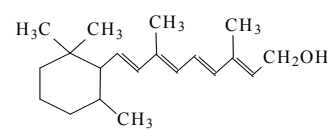
At present time, antioxidants are one of the main objects of investigations and analysis in life sciences. Lipophilic antioxidants (α -tocopherol, retinol, ubiquinol, calciferols) play important role in protection of cell membrane lipids from reactive oxygen species and prevention of lipids peroxidation. They are widely used in medicine as pharmaceuticals. From other side, lipophilic antioxidants containing in foodstuff are part of human daily diet. Therefore, development of new techniques for the determination of lipophilic antioxidants in different objects is very important.

Several analytical methodologies such as spectrophotometry¹, spectrophotofluorimetry² and different types of chromatography^{3–5} have been developed for determination of these substances in food, pharmaceutical supplements and biological fluids. As known, electrochemical methods particularly voltammetry are characterized by simplicity, sensitivity, cost-efficiency, precision, accuracy and speed and may be useful for analysis of lipophilic antioxidants. More so as reactions of them with free radicals are accompanied by electron transfer. Surfactant media can be used as less hazardous and versatile substitute for organic solvents in applications in HPLC separations⁶ and in electrochemical synthesis and catalysis. The amphiphilic structure of surfactants and their assembly in aqueous solution provide a multifunctional environment for the solubilisation and partitioning of aqueous soluble and insoluble compounds. Surfactants have ability to dissolve significant amounts of different types of water insoluble redox active compounds that can be electrochemically studied at suitable electrodes⁷.

Voltammetric behavior of α -tocopherol and retinol as main lipophilic antioxidants has been investigated in present work. Working conditions of α -tocopherol and retinol oxidation on glassy carbon electrode have been found. α -Tocopherol gives irreversible step on cyclic voltammograms at 0.42 V (vs. saturated Ag/AgCl electrode) in 0.1 M LiClO₄ in mixture acetonitrile/H₂O (6:4). Retinol is oxidized in 0.1 M LiClO₄ water solution at +0.72 V. However, linearity of the calibration graphs is very narrow.



α -Tocopherol



Retinol

Different types of surfactants have been chosen for solubilization of analyte. These are cationic (*N*-dodecylpyridinium bromide, cetylpyridinium bromide), anionic (sodium dodecylsulfate (SDS)) and nonionic (Triton X100, Brij-35) surfactants. All of them are electrochemically inactive at anodic potentials under investigation. The effect of surfactant presence has been investigated in dependence of its type and concentration. The high content of surfactants in electrochemical cell leads to decrease of oxidation currents while lower surfactant concentration enhances the oxidation currents. The best characteristics have been found for *N*-dodecylpyridinium bromide and Triton X100 for the determination of α -tocopherol and SDS for retinol. The application of surfactants leads to enlargement of linear working range for α -tocopherol and retinol determination. The decrease of low detection limits have been observed for all surfactants under investigation. Model solutions of α -tocopherol and retinol have been investigated. The RSD doesn't exceed 5%. The accuracy of determination have been tested by „added“ – „found“ method.

Different objects (pharmaceuticals, cosmetics and food) have been studied using voltammetric methods proposed. The results obtained show a good agreement with data on coulometric determination. So, the application of surfactant media in voltammetry leads to increase of oxidation currents for the antioxidants under investigation and permits to analyze lipophilic substances in water media. Decrease in the low determination limit and enlargement of the analytical range for α -tocopherol and retinol determination have been obtained using surfactant media. Simple, express and reliable procedures for the voltammetric determination of lipophilic antioxidants in different objects have been developed. The methods proposed is characterized by good reproducibility, speed and can be recommended for quality control.

REFERENCES

1. Abdollahi H., Bagheri L.: *Anal. Chim. Acta* 514, 211 (2004).
2. Alonso A., Almendral M. J., Porras M. J., Curto Y.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 171 (2006).

3. Chatzimichalakis P. F., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N.: *J. Chromatogr., B* 805, 289 (2004).
4. Jedlicka A., Klimes J.: *Chem. Pap.* 59, 202 (2005).
5. Kienen V., Costa W. F., Visentainer J. V., Souza N. E., Oliveira C. C.: *Talanta* 75, 141 (2008).
6. Hadjmohammadi M. R., Momenbeik F., Khorasani J. H.: *Ann. Chim.* 94, 857 (2004).
7. Ghanem M. A., Compton R. G., Coles B. A., Canals A., Marken F.: *Analyst* 130, 1425 (2005).

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FRUIT MATRICES BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

MÁRIA ANDRAŠČÍKOVÁ, SVETLANA HROUZKOVÁ, and MÁRIA KRŠÁKOVÁ

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

Pesticide is a general term that includes a variety of chemical and biological products used to kill or control pests such as rodents, insects, fungi and weeds¹. Unfortunately, only small amount of all applied pesticides meets their purpose and most of the applied pesticides find their way as “residue” in the environment into the terrestrial and aquatic food chain. Adverse effects on human health of pesticide residues remaining in food after they are applied to food crops are generally known: acute neurologic toxicity, chronic neurodevelopment impairment, possibly dysfunction of the immune, reproductive and endocrine systems or cancer and many other. In the European Union (EU) approximately 320 000 tones of active substances are sold every year, which accounts for one quarter of the world market². Some pesticides behave as endocrine disrupting chemicals (EDCs) therefore they were selected as EDCs of our interest. To ensure a good agricultural practice and the health of people, many countries and international organizations have established the maximum residue limits (MRL) for pesticides in foodstuff. In the last decade, a great deal of concern has been expressed worldwide over the increasing levels of EDCs found in the environment. This anxiety is caused by the adverse effects of these pollutants on the hormone systems of humans and wildlife, even when present at levels as low as 1 ng l⁻¹ (ref.³). The environmental occurrence of EDCs has been implicated in the feminization of fish, sex transposition of wildlife, and hormone-related cancers in humans. 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.

The aim of this work was the determination of pesticide residues in fruit matrices, particularly matrices with high acid content, using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) in selected ion monitoring mode (SIM). The extraction was carried out using QUECHERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) method employing liquid extraction with acetonitrile and cleaned-up by dispersive SPE using PSA (primary-secondary amine) sorbent. Spiked experiments were carried out to determine the recovery at four concentration levels (1, 5, 10 and 250 µg kg⁻¹). Recoveries for majority of studied pesticides were higher than 70% with relative standard deviation lower than 20 %.

A combination of fast GC with narrow-bore column and bench top quadrupole mass spectrometer (MS) detector in negative chemical ionization (NCI) mode (with methane as reagent gas) was set up and utilized for the ultratrace determination of pesticide residues. Linearity in the concentration range of 0.001–0.5 ng µl⁻¹ was evaluated. The programmed temperature vaporizer (PTV) injector in solvent vent mode and narrow-bore column (15 m × 0.15 mm I.D. × 0.15 µm film of 5 % diphenyl 95 % dimethylsiloxane stationary phase) were used for effective and fast separation.

This method enables achieving low detection and quantification limits and also helps in determining pesticide residues at the low concentration levels in which they are present in real samples.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA (project No. 1/0390/09).

REFERENCES

1. Dömötörövá M., Matisová E.: *J. Chromatogr.*, A 1207, 1 (2008).
2. Proposed PAHO/WHO Plan of Action for Technical Cooperation in Food Safety, 2006–2007, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/010/af272e.pdf>.
3. Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner A. P., Tyler C.R.: *Aquat. Toxicol.* 66, 207 (2004).

ZASTOUPENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ V MASNÝCH VÝROBCÍCH

PETRA BATELKOVÁ, IVANA BORKOVCOVÁ a LENKA VORLOVÁ

*Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika
pbatelkova@vfu.cz*

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou pro svoje negativní vlastnosti (karcinogenita, mutagenita) sledovanými exogenními kontaminanty v potravinách. Vznikají nedokonalým spalováním organické hmoty. Do živočišných potravin se dostávají hlavně kulinární úpravou, uzením, grilováním, smažením.

Cílem práce bylo optimalizovat extrakci PAHs a následně stanovit obsah 15-ti PAHs v salámech typu Poličan. K extrakci PAHs ze vzorků bylo použito metody vysokotlaké extrakce rozpouštědlem ve směsi acetonu a petrol-

etheru v poměru 1:2 pomocí přístroje *one* PSE. Následovalo přečištění extraktu gelovou permeační chromatografií. Finální stanovení bylo provedeno pomocí HPLC s FLD detekcí. Pro porovnání byla použita metoda Soxhletovy extrakce stejnou směsí rozpouštědel. Postup přečištění a finálního stanovení se nelišil.

Z prvních výsledků experimentu vyplývá, že dle výtežnosti a opakovatelnosti jednotlivých PAHs jsou metody srovnatelné. Velkou výhodou metody PSE je však úspora chemikálií a času.

Obsahy benzo(a)pyrenu v salámech nepřekročily maximální limitní hodnoty $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ uváděné v evropské legislativě.

Práce byla financována z prostředků Výzkumného záměru „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“ MSM6215712402.

PHOTOLYSIS OF BENZO[*a*]PYRENE IN MODEL SYSTEMS AND QUEST TO IDENTIFY SOME OF OXIDIZED PRODUCTS BY HPLC-MS-MS

ALENA BEDNÁRIKOVÁ, BOŽENA SKLÁRŠOVÁ, EMIL KOLEK, and PETER ŠIMKO

*VUP Food Research Institute Department of Chemistry and Food Analysis, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovak Republic
bednarikova@vup.sk*

Keywords: photolysis, benzo[*a*]pyrene, HPLC-MS-MS

Introduction

It is generally accepted, that the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food is a result of their deposition from air on the surface of plants, and the pollutions resulting from manufacture processes such as drying, roasting, or smoking¹. Due to their toxicity and carcinogenicity, benzo[*a*]pyrene (BaP), a model PAH compound, and its major oxidised metabolites, e.g., phenols, diones and dihydrodiols have been extensively studied². Photodegradation is an important transformation pathway of most PAHs in the environment, as in this process, the same tertiary carbon atoms are attacked preferentially, blocking thus their biodegradation^{3,4}.

The detailed and exact knowledge of PAHs degradation processes in environment and real food matrices is essential from both, analytical and health protection points of view. However, to the best of our knowledge, the photodegradation of PAHs in real conditions is only poorly studied up to now. In this context, the reliable routine method for their determination is still missing, as well.

In view of fact that thermally labile compounds have low vapour pressure and/or highly polar functional groups (e.g. oxidised compounds of PAHs), they can be effectively analyzed with high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) without any derivatization. For their determination, HPLC-MS with atmospheric pressure ionization (APCI) has been applied successfully^{5–7}. Compared to single MS, tandem MS (MS/MS) offers the advantage to produce selective fragmentation patterns for every substance containing valuable structural information. In this contribution the progress of benzo[*a*]pyrene photolysis in ethanol as model polar solvent and the formation of its oxidised compounds were studied. The oxidation products were identified by means of available standards of BaP oxidized forms.

Experimental

Chemicals and reagents

Benzo[*a*]pyrene of analytical purity grade (Supelco, Bellefonte, PA, USA) as well as methanol and ethanol of HPLC purity grade (Merck, Darmstadt, Germany) were used in all experiments. Four BaP oxidation standards, benzo[*a*]pyrene-6,12-dione (BaP-6,12-dione) and benzo[*a*]pyrene-9,10-dihydrodiol (BaP-9,10-diol) purchased from National Cancer Institute's Chemical Carcinogen Repository (Midwest Research Institute, Kansas City, MO, USA), 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene (3-OH-BaP, IRMM, Geel, Belgium) and 9,10-dihydrobenzo[*a*]pyrene-7(8H)-one (BaP-7-one, Chiron Ltd, Trondheim, Norway) were used for BaP oxidation products identification.

Photooxidation of BaP

The photolysis was carried out in a 75 ml glass reactor, equipped with a central inlet at its top possibility to place a quartz immersion for 6 watt low pressure UV lamp ($\lambda = 254$ nm). The glass reactor was immersed in a thermostatic bath (Photochemical Reactors LTD, Berkshire RG4 9PA UK). The degradation of BaP ($c = 20$ mg l⁻¹) was performed in polar medium (ethanol) and the oxidation process took 12 h.

HPLC analysis

HPLC apparatus with fluorescence, diode-array and triple quad MS-MS detectors was used for detection of products generated during controlled photolysis. The used equipment was from Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). The separation was performed at 35 °C on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm) column using gradient elution with methanol and water at a flow rate of 0.5 ml/min. Parameters for using the fluorescence detector ($E_x = 300$ nm, $E_m = 410$ nm) were set for benzo[*a*]pyrene detection and the UV/VIS chromatographic data were collected within the range from 220 nm to 550 nm by diode-array detector. The following instrumental parameters were used for LC-MS analysis of degradation products of benzo[*a*]pyrene: ion source APCI in the positive scan mode: drying gas (N₂) flow of 6 l min⁻¹, gas temperature of 350 °C, vaporizer temperature of 250 °C, nebulizer pressure of 20 psi, capillary voltage of 2.5 kV, fragmentor energy of 140 V, scan time 500 ms, scan range ($m/z \sim 100$ –600); in the positive product ion mode (for measurement of fragmentation pattern): the same as previous and collision energy of 40 eV, dwell time 100 ms. It is optimal set up for standard materials used in analysis.

Results and discussion

With respect to the limited information on BaP photodegradation mechanisms, as well as unavailability of corresponding standards of its oxidized forms (oxy-BaPs), four compounds i.e.: benzo[*a*]pyrene-9,10-dihydrodiol (BaP-9,10-diol), 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene (3-OH-BaP), benzo[*a*]pyrene-6,12-dione (BaP-6,12-dione) and 9,10-dihydrobenzo[*a*]pyrene-7(8H)-one (BaP-7-one) were chosen as standards.

It was supposed that their isomers could elute in different time but they could deliver the same fragment ions. In order to find the most proper chromatographic conditions, mixed standards solution of the above-mentioned oxy-BaPs was prepared and the separation conditions were suggested. The obtained results (retention times, mass-to-charge ratios for precursors and product ions) are summarized in Table I.

Data obtained clearly demonstrated that in the case of BaP-9,10-diol, the pseudo-molecular ion is absent and only the fragment $m/z \sim 269$ is present, probably coming from $[M+H-H_2O]^+$ ion. In addition, the identical mass-to-charge ($m/z \sim 269$) was noticed also for 3-OH-BaP, assigned to its pseudo-molecular ion $[M+H]^+$. However, while considering the fragmentation schemes of both these hydroxyderivatives, it is evident that some fragments are identical (e.g. $m/z \sim 268, 252, 239, 226$), but their mutual ratio is different. On the other hand, the fragmentation patterns of BaP-6,12-D (mass-to-charge of product ions: 255 and 226) and BaP-7-one (mass-to-charge of product ions: 252, 227, 216 and 202) differs significantly. This observation could find effective application as a marker for their mutual differentiation and their presence confirmation.

As an illustration, the photolysis of BaP has also been studied in methanol involving GC-MS. Results obtained proved that under these conditions, BaP oxidation products are present in the form of corresponding methoxyderivatives (data not presented). As only negligible formation of eth-

oxyderivatives was expected, ethanol was selected as an appropriate polar solvent for further experiment.

The obtained chromatogram of HPLC analysis with diode-array detection revealed the formation of a number of BaP degradation products, frequently co-eluting (data not presented). Some of them had the absorption maxima shifted to 450–520 nm, resulting in visual changes of colour of model mixture solution from colourless to yellow-orange. More over, some of the photoinduced compounds exhibited the fluorescence activity, as well.

In order to identify some of the BaP oxidized products formed in the model system, HPLC with mass spectrometry detection was effectively employed. An example of overlaid extracted ion chromatograms of photolysed ethanolic solution of BaP together with fragmentation pattern for most abundant peaks (at collision energy 40eV) are presented in Fig. 1.

Peak A gives the precursor ion with $m/z \sim 285 [M+H]^+$ and fragment ions with $m/z \sim 268, 255, 239, 228$ and 215, but there is lack of supporting information to suggest (at least) hypothetical formula of this compound. Peak B gives the precursor ion with $m/z \sim 299 [M+H]^+$ and fragment ions with $m/z \sim 255 [M^+ - 44]$, $m/z \sim 267 [M^+ - 32]$ and $m/z \sim 239 [M^+ - 32-28]$, associated probably with losses of CO₂, CO or oxygen. In accord with previously published data, this fragmentation pattern correspond to hydroxydione derivate of BaP, however, the closer assignment of individual functional groups' position/structure is inadequate⁸. Peak C gives the precursor ion with $m/z \sim 253 [M+H]^+$ and poor fragment ions at $m/z \sim 226$. Without any doubts, this fragmentation pattern belongs to BaP which is over-abundant in the model mixture. Peak F gives the precursor ion with $m/z \sim 283 [M+H]^+$ and fragment ions $m/z \sim 255 [M^+ - 28]$ and $m/z \sim 226$, representing most probably a pseudo-molecular ion, and corresponding to losses of CO, respectively. Fragmentation pattern and retention time, RT = 17 min are in good agreement with results obtained in previous experiments with standard solution of BaP-6,12-dione. Peaks D and E give both an identical

Table I
Relative molecular mass, retention times and mass-to-charge ratios for precursors and products ions of oxy-BaPs standards

Compound	Relative molecular mass, M_r	Retention time [min]	Mass-to-charge ratio for precursor ion m/z	Mass-to-charge ratio for products ions m/z
3-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyrene (3-OH-BaP)	268.3	23.0	269	268, 252, 239, 226
Benzo[<i>a</i>]pyrene-9,10-dihydrodiol (BaP-9,10-diol)	286.3	4.1	269	268, 252, 239, 226
9,10-Dihydrobenzo[<i>a</i>]pyrene-7(8H)-one (BaP-7-one)	270.3	23.3	271	252, 227, 216, 202
Benzo[<i>a</i>]pyrene-6,12-dione (BaP-6,12-dione)	282.3	17.0	282	255, 226

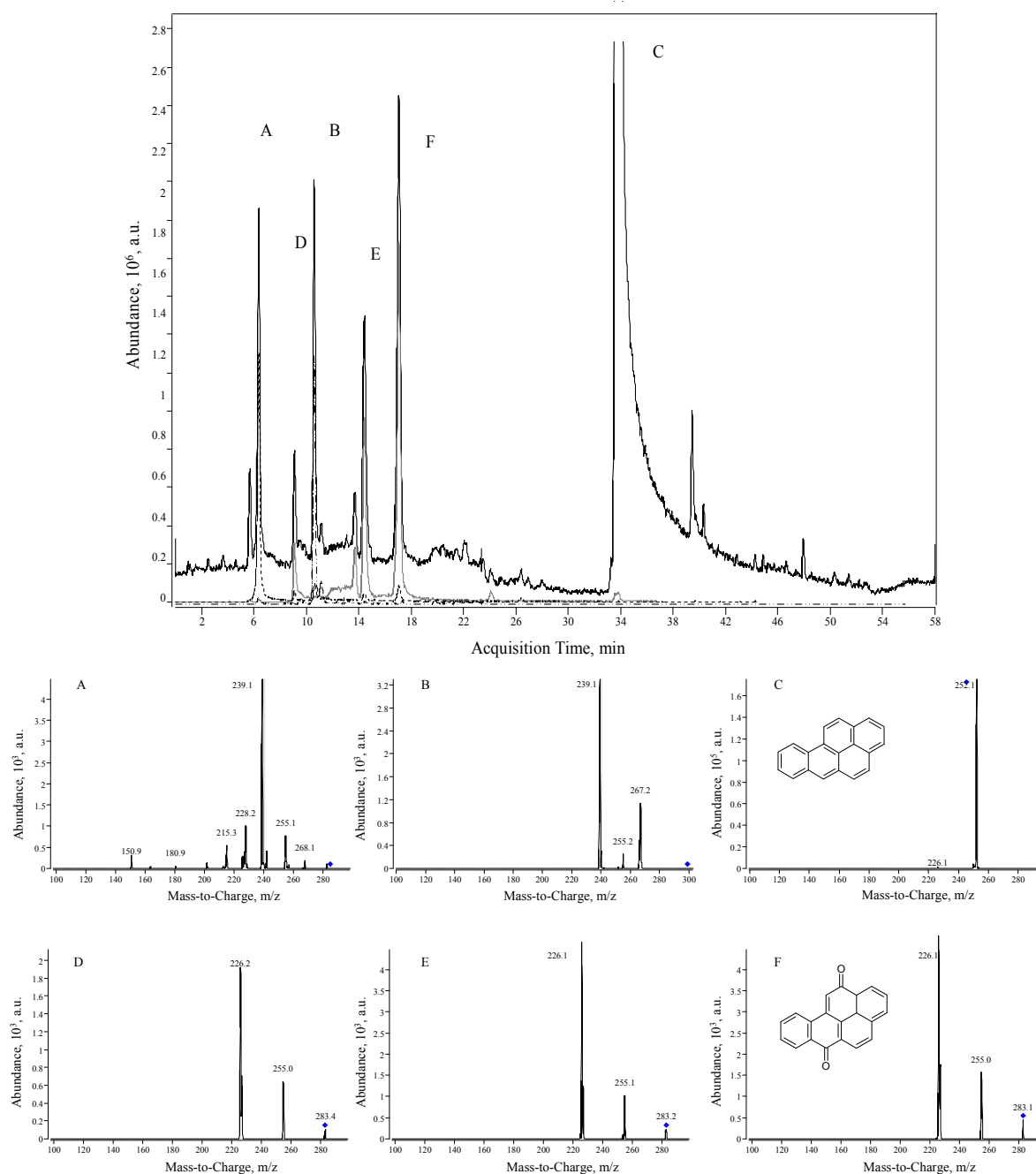


Fig. 1. Overlaid extracted ion chromatograms (m/z : 253, 283, 285, 299) of photolysed ethanolic solution of BaP ($c = 20 \text{ mg l}^{-1}$) with fragmentation pattern for most abundant peaks at collision energy 40 eV; (A) RT= 6.3 min, unknown, $m/z \sim 285$; (B) RT= 10.5 min, unknown, $m/z \sim 299$; (C) RT= 33.7 min, BaP, $m/z \sim 253$; (D) RT= 9.0 min, BaP-?,?-D, $m/z \sim 283$; (E) RT= 14.4 min, BaP-?,?-D, $m/z \sim 283$; (F) RT= 17.0 min, BaP-6,12-D, $m/z \sim 283$. Molecular ion is marked with \blacklozenge

precursor ion ($m/z \sim 283$) and fragment ions $m/z \sim 255$ [$M^+ - 28$] and $m/z \sim 226$. As these compounds have the different retention times, RT = 9 min and 14 min, respectively, the formation of different isomers of diones derivatives of BaP is presupposed.

Conclusion

The obtained results demonstrate that a complex mixture of co-eluting oxidation products is formed during photodegradation of BaP. Due to lack of reliable supporting data and standards of BaP oxidized forms, only BaP-

6,12-dione has been positively identified up to now. Additional experiments are in progress in order to precisely analyze and confirm the still unknown compound formed during BaP UV-photodegradation.

This publication is the result of the project implementation "Establishment of a HiTech Centre for Research on Formation, Elimination and Assessment of Contaminants in Food" supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF, as well as this work is supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0602-07.

REFERENCES

1. Tamakawa K., Kato T., Oba M., in: *Handbook of Food Analysis*, p. 1641–1663. Marcel Dekker, New York 1996.
2. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA J.* 724, 1 (2008).
3. Meyer S., Steinhart H.: *Water Air Soil Pollut.* 132, 215 (2001).
4. Zang S., Li P., Li W., Zhang D., Hamilton A.: *Chemosphere* 67, 1368 (2007).
5. Koeber R., Niessner R., Bayona J.M.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 359, 267 (1997).
6. Grosse S., Letzel T.: *J. Chromatogr., A* 1139, 75 (2007).
7. Lintelmann J., Fischer K., Matuschek G.: *J. Chromatogr., A* 1133, 241 (2006).
8. Kot-Wasik, A., Dabrowska, D., Namiesnik, J.: *J. Photochem. Photobiol., A* 168, 109 (2004).

A. Bednáriková, B. Skláršová, E. Kolek, and P. Šimko (*VUP Food Research Institute Department of Chemistry and Food Analysis, Bratislava, Slovak Republic*): **Photolysis of benzo[a]pyrene in Model Systems and Quest to Identify Some of Oxidized Products by HPLC-MS-MS**

Photolysis plays an important role in benzo[a]pyrene (BaP) degradation in both, environment and food industry. Usually, it results in the decreased formation of non-polar compounds and, on the other hand, significantly increased formation of polar ones, especially of oxidized intermediate compounds. The last mentioned are more susceptible to biodegradation than the parental, non-oxidized molecules. In addition, the oxidized compounds revealed even more toxic effects on living organisms than the original BaP molecule itself. Thus, the progress and mechanism of benzo[a]pyrene photolysis are of crucial importance. In this contribution the photolysis of benzo[a]pyrene in chosen liquid media (ethanol) and the formation of its oxidized compounds were studied. The set of model representatives of potential oxidized forms of BaP served as standards for subsequent confirmation of the so-formed BaP oxidation products presence. Obtained results showed that photodegradation of BaP even under model conditions represents a complex problem, leading to the formation of many oxidation products. However, due to the lack of relevant information, in the current stage, only benzo[a]pyrene-6,12-dione was proved unambiguously.

COMPARISON OF DIFFERENT IONISATION TECHNIQUES FOR HPLC/MS ASSAY OF BENZO(a)PYRENE AND SOME OXIDISED PRODUCTS

ALENA BEDNÁRIKOVÁ, BOŽENA SKLÁRŠOVÁ, EMIL KOLEK, and PETER ŠIMKO

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

The high-performance liquid chromatography (LC) with mass spectrometric detection (MS) was applied to detect partially oxidized benzo[a]pyrenes (oxy-BaPs). Selected reference standards (e.g. hydroxy-BaP, diones, dihydrodiols) could be detected using either atmospheric pressure chemical ionization (APCI), electrospray ionization (ESI) and/or atmospheric pressure photoionization (APPI) and the ionization efficiency was compared using

all three ionization sources for chosen oxy-BaPs. The connected mass spectrometer was a triple quadrupol analyzer realizing registration of positive and negative ionisation modes in scan range. For selected ions additional MS/MS ionisation was performed. According to the mass spectra, the analytes behave differently in ionization properties. Finally, the hyphenated system was applied to a photolysed BaP solution and thus highlighting the expedient utilization of this method for real samples.

This publication is the result of the project implementation "Establishment of a HiTech Centre for Research on Formation, Elimination and Assessment of Contaminants in Food" supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF, as well as this work is supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0602-07.

THE USE OF POLYMERS IN CONSTRUCTION OF ELECTROCHEMICAL NUCLEIC ACIDS BIOSENSORS

KATARÍNA BENÍKOVÁ, ADRIANA FERANCOVÁ, and JÁN LABUDA

*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
katarina.benikova@stuba.sk*

The use of polymers as an interface material for chemical modification of transducers at biosensors increased rapidly in recent years. New types of material are used according to approach used at polymer synthesis and decreasing size of transducers. Properties of the polymer-modified electrodes differ from those of the unmodified ones. By using polymeric layers, fairly thick films containing more active sites than a monolayer can be formed on the electrode. Polymeric modification helps to achieve unique programmable or adjustable properties like electrical conductivity, thermal stability, mechanical properties, etc., thus allowing the use of polymer-modified electrodes in a sensing device¹. The aim of this work is to describe the possibilities of using polymers in the preparation and application of electrochemical nucleic acid (NA) biosensors and to report their advantages and disadvantages. The chapter deals mostly with the state-of-art within the last years.

Polymers in NA biosensors can provide many different functions, e.g. they can act as biorecognition element immobilization matrices, matrices for selective analyte binding and preconcentration, separation agents for analytes and interfering species, agents for reducing background adsorption of proteins or simply as electron transfer media. A large group of polymers used as biosensors represent electroactive polymers (EAPs) which are characterized by a response to external potential stimuli. They are used as sensors, actuators, highly sensitive membranes and energy storage. Besides synthetic polymers, this group of materials includes also natural polymers which offer a certain degree of functionality not available in most synthetic polymers. On the other hand, some applications are limited because of their special mechanical properties and doping feasibility. EAPs can be further divided in to electroconductive polymers (ECP) such as poly-*p*-phenylene (PPP), polyphenylene sulphide (PPS), polythiophene (PT), polyaniline (PANI), and polypyrrole (PPY). Recently, the characterization of various conducting polymer-based biosensors was precisely reviewed by Malhotra et al². The second class of EAPs are non-conductive polymers (polyethyleneimine (PEI) and chitosan (CHIT)) doped with electrochemically active ions. The third class consist of polymeric redox mediators of the electron transfer like poly(vinylferrocene) or coordinating polymers like poly(4-vinylpyridine) which contain groups that can coordinate to

metal ions and integrate them into the polymer matrix. Polymers may also be utilized or further modified as copolymer composites, polymer composites with nanomaterials such as polymer nanotube composite films or polymer nanofibers, functionalized polymers or polymer-oligonucleotide probes.

Most of the polymeric film properties and functions depend on its preparation. The preparation of conducting polymers at the surface of carbon surfaces employed in biosensors has been already reviewed³. The mostly used methods are solvent casting, spin coating and electropolymerization. In solvent casting method an already prepared polymer is first dissolved in the appropriate solvent and then simply cast onto the surface of the electrode. After solvent evaporation, the film of polymer is formed. It is a very simple method approach, unfortunately two disadvantages have to be considered, uniformity of the polymeric film and reproducibility of its preparation⁴. This method is usually used for the preparation of redox active or non-conducting polymers⁵. Coatings of composites of nanomaterials with polymers are also often prepared by this method⁶. Problems with uniformity and reproducibility can be avoided using spin coating method. In this case dissolved polymer is put onto the electrode surface which is then rotated at high speed. Centrifugal force causes the spread of the solution leading to more uniform coating than in the case of solvent casting. During the rotation solvent is evaporated. Problems were reported with control of the structure and thickness of polymer coatings⁷. However, this method was successfully used for the preparation of the film of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) doped with poly(styrene sulfonic acid) (PSS) at the surface of indium tin oxide electrodes⁸ or and for the preparation of immunosensor based on conjugated poly(phenylene vinylene) derivative of defined thickness⁹. Another method often used for the preparation of conducting polymers, such as PPY, PANI, polythiophene, and their derivatives is deposition by electropolymerization in the electrolyte contained monomers. This method can be used for the polymerization of compounds which possess a relatively low anodic oxidation potential and are susceptible to electrophilic substitution reaction. The electropolymerization is reported as simple as well as reproducible method, where the monomer is first oxidized to a cation radical. Next, the molecule of monomer is attached to form a dication. Repeated process lengthens out the polymeric chain and the final polymer is formed. The advantage of this method is that the rate of film deposition can be controlled by varying the potential of the working electrode in the system. It is simple and reproducible method¹⁰. Electropolymerization can be provided potentiostatically, galvanostatically or by potential cycling method. In general, potentiostatic method is used to prepare thin films while galvanostatic

method enables to prepare thick films¹¹. Functionalization of polymers to modify properties of the polymeric film can be easily performed by two methods. First, the functional groups are attached to the monomers through covalent bonds and then electropolymerization is provided. Disadvantage of this method is loosing of polymer conductivity, steric hindrance and cross-linking effects. Another often used method is an incorporation of dopand into the polymeric network electrostatically during the process of electropolymerization¹².

Another problem to be solved in NA biosensors is the immobilization of NA according to polymers. For this, few methods were reported. Polymer assisted immobilization of biomolecules, including NAs, has been reviewed¹³. NA can be either immobilized at the surface of polymer modified electrode or can be incorporated in the polymer layer. In the second case, the method of electropolymerization is mostly used. Immobilization of DNA onto polymer modified electrode surface where NA can be attached to the polymer modified electrode surface using several methods: simple adsorption^{1,14}, covalent bonds¹⁵ (first appropriate functional groups are introduced to the polymer, then DNA is covalently attached) or via affinity binding (avidin-biotin). Immobilization of DNA within a polymeric matrix by electropolymerization is another, widely used method of the DNA immobilization by incorporation of DNA into the polymer matrix during electropolymerization. Negatively charged biomolecules, such as DNA and oligonucleotides, can be advantageously employed as dopands of positively charged polymeric structure⁷. The control of the current density at galvanostatic method or potential at potentiostatic method during the electropolymerization process is very important to avoid the loosing of bioactivity or decomposition of entrapped biomolecules.

To describe the state of art of using polymers in construction of electrochemical NA biosensors, the latest papers were chosen. Polypyrroles and their derivatives are one of the most extensively used polymers for the preparation of biosensors. This group of polymers has excellent properties which can be advantageously used in enzyme (transducing the analytical signal generated by redox enzyme reactions) as well as affinity biosensors (DNA biosensors, immunosensors)². PPY are used as an electrostatic adsorption matrix for immobilization of DNA onto porous silicon substrate without using covalent bonds¹⁶. Polypyrroles are reported as convenient matrix for the immobilization of nanomaterials at the surface of electrode¹⁷. In this case the combination of unique properties of conducting polymers in combination with those of nanomaterials exhibits the synergic effect which positively affects the stability, electron transfer and improved performance of final biosensors. PPY film possessed the uniform surface for the immobilization of Au-Pt hybrid nanoparticles¹⁸. Among latest application polypyrrole nanofibers were used to prepare electrochemical DNA biosensor for the determination of spermidine¹⁹.

Polyaniline is widely used for the preparation of the electrochemical enzyme biosensors and immunosensors²⁰.

However, several applications in DNA biosensors can also be found. PANI can be prepared by electropolymerization using galvanostatic method, potentiostatic method leading to a polymer adhered weakly at the electrode surface or potential cycling which produces polymer well adhered at the electrode surface²¹. Further modifications of PANI were used successfully for various analytes. Nucleic acid functionalized nanostructured polyaniline was used to prepare sensor for sexually transmitted disease²². Two polymers were used to prepare chitosan-co-polyaniline electrode for electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene¹⁸. Acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA was used to prepare electrochemical biosensor for pesticides²³. A sensitive electrochemical DNA biosensor was successfully realized on polyaniline nanofibers, multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) and chitosan modified carbon paste electrode²⁴. The immobilization of the probe DNA on the surface of electrode was largely improved due to the unique synergistic effect of PANI and MWCNT.

Polythiophenes and their derivatives are also widely used for the preparation of DNA biosensors. The disadvantage of this polymers is in difficult electropolymerization of polymers with functional groups suitable for the immobilization of biomolecules (amino- or carboxylic groups)²⁵. However, few well defined works are presented. It was shown that the ODN immobilized at the surface of quartz crystal caused the blocking of the surface. After hybridization with long target oligonucleotide (ODN) a Warburg behaviour was restored. DNA was employed as dopand of PEDOT²⁶. Electropolymerized poly(4-hydroxyphenyl thiophene-3-carboxylate) as cationic polymer was advantageously used for the electrostatic binding of polyanionic ODN²⁷. Moreover, interaction between PEDOT and specific ODN was studied using electrophoresis and spectroscopic methods²⁸. It was shown that together with non-specific electrostatic interactions specific hydrogen binding interactions between polymer and methylated ODN appeared and stable complexes were formed. PEDOT was first prepared by electropolymerization at the surface of glassy carbon electrode (GCE) and then DNA solution was spread over the polymer modified electrode²⁹. DNA was available for the electrostatic binding of Nile blue as redox indicator. The composite electrode showed electrocatalytic properties towards the reduction of hydrogen peroxide. A novel DNA sensor based on organic thin film transistors (OTFT) with semiconducting polymer poly(3-hexylthiophene) has been fabricated by solution process to create label-free DNA sensor³⁰. Based on this technique the OTFT can be developed to be a low-cost, label-free and disposable DNA sensor.

Quinone containing polymers, namely poly(5-hydroxy-1,4-naphtoquinone-co-5-hydroxy-3-thioacetic acid-1,4-naphtoquinone), known as poly(JUG-co-JUGA), are also popular for the preparation of DNA biosensors. In contrast to classical conducting polymers, such as PPY or PANI where signal transduction is performed via redox process

of the polymer exchanging anion, in the case of poly(JUG-co-JUGA) the signal is transduced by quinone group in the polymer³¹. Electropolymerized polyquinone film was successfully derivatized with glutathione³². Glutathione was used as a precursor for subsequent biomolecule linkage via carboxylic groups. Free carboxylic groups were first transformed into ester groups using 1,2-dichloroethane and then amino terminated DNA was immobilized. Because the polymeric film is cation exchanger, the negative charged DNA can not be non-specifically adsorbed at the surface. Solution of poly(1,4-benzoquinone) prepared by enzymatic synthesis was cast at the surface of carbon fiber electrodes, then DNA was immobilized³³. The polymer film allowed the hybridization detection by scanning electrochemical microscopy in positive-feedback-mode.

Poly(vinylferrocene) is soluble polymer which can be easily deposited at the surface of Pt³⁴ or graphite working electrode³⁵ by its electrooxidation resulting in a less soluble polymer poly(vinylferrocenium). Such an electrode can be then advantageously used for the immobilization of negatively charged DNA. Low non-specific immobilization of DNA on this polymer was reported³⁵. Electrochemical signal of such polymer can be used for the detection of hybridization event³⁴.

Polyethyleneimine and chitosan are cationic polymers with good biocompatibility and high positive charge density which allows an easy electrostatic DNA immobilization. Study of interaction between DNA molecule and PEI – copper(II) complexes showed that together with electrostatic interaction, van der Waals interactions and hydrogen binding is also employed probably due to the presence of multiple copper(II) complex molecular units and free amine groups of the polyme³⁶. Electron transfer kinetics at PEI-DNA modified electrode was studied³⁷. It was shown that the surface of modified electrodes was homogeneous and electron transfer was slower when PEI formed an external layer. Moreover, further modification with PEI-gold nanoparticles enhanced the electron transfer. PEI was used to disperse the MWCNT and screen-printed electrode (SPCE) was modified with resulting composite³⁸. MWCNT-PEI formed a layer suitable for the electrostatic adsorption of negatively charged DNA. DNA/MWCNT-PEI/SPCE was used for the detection of DNA damage by quinazolines. Interaction of PEI and CHIT with plasmid DNA (pDNA) on a hanging mercury drop electrode was compared³⁹. Voltammetric studies showed that each polymer interacts with pDNA by different mechanism and higher amount of PEI interacts with pDNA than it was observed in the case of CHIT. However, DNA and CHIT can form stable complexes of specific size which is influenced by molecular weight and pH of CHIT⁴⁰. Assembled film composed of DNA and CHIT was prepared using layer-by-layer technique at the surface of pyrolytic graphite electrode⁴¹. CHIT enabled the effective intercalation of 9,10-anthraquinone-2,6-disulfonate into the double helix of DNA. Biosensor was successfully applied for the detection of DNA damage caused by Fenton reagent. Cu(II) ions were successfully immobilized in the DNA/

CHIT layer due to the formation of Cu(II)-DNA complexes⁴². This amperometric biosensor showed excellent electroactivity towards hydrogen peroxide with the detection limit 3 $\mu\text{mol l}^{-1}$. CHIT was also used to disperse MWCNT⁴³.

As can be seen in this report, variety of polymers and modification techniques is chosen to prepare functional NA biosensor, according to desired properties and function of the transducer. The range of conducting, non-conducting, doped or modified polymers that can be used to prepare NA biosensor is widening markedly. New composites, co-polymers are reported and further expected in order to present their synergic effects.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA (Project No. 1/0852/08).

REFERENCES

1. Galandová J., Labuda J.: Chem. Pap. 63, 1 (2009).
2. Malhotra B. D., Chaubey A, Singh S. P.: Anal. Chim. Acta 578, 59 (2006).
3. Ates M., Sarac M. A.: Prog. Org. Coat. 66, 337 (2009).
4. Tess M. E., Cox J. A.: J. Pharm. Biomed. Anal. 19, 55 (1999).
5. Chang Z., Fan H., Zhao K., Chen M., He P., Fang Y.: Electroanal. 20, 131 (2008).
6. Rivas G. A., Rubianes M. D., Rodríguez M. C., Ferreyra N. F., Luque G. L., Pedano M. L., Miscoria S. A., Parrado C.: Talanta 74, 291 (2007).
7. Xu H., Wu H., Fan C., Li W., Zhang Z., He L.: Chin. Sci. Bull. 49, 2227 (2004).
8. Manesh K. M., Santhosh P., Gopalan A., Lee K. P.: Talanta 75, 1307 (2008).
9. Cooreman P., Thoelen R., Manca J., Vande Ven M., Vermeeren V., Michiels L., Ameloot M., Wagner P.: Biosens. Bioelectronics 20, 2151 (2005).
10. Vidal J. C., Garcia-Ruiz E., Castillo J. R.: Biosens. Microchim. Acta 143, 93 (2003).
11. Ahuja R., Mir I. A., Kumar D., Kumar R.: Biomat. 28, 791 (2007).
12. Raoof J. B., Ojani R., Rashid-Nadimi S.: Electrochim. Acta 49, 271 (2004).
13. Teles F. R. R., Fonseca L. P.: Mater Sci. Eng. C. 28, 1530 (2008).
14. Zhang Y., Zhang K., Ma H.: Anal. Biochem. 387, 13 (2009).
15. Prabhakar N., Dingh H., Malhotra B. D.: Electrochem. Commun. 10, 821 (2008).
16. Jin J. H., Alocilja E. C., Grooms D. L.: J. Porous Mater. 17, 169 (2010).
17. Tiwari I., Singh K. P., Singh M.: Russ. J. Gen. Chem. 79, 2685 (2009).
18. Che X., Yuan R., Chai Y., Ma L., Li W., Li J.: Microchim. Acta 167, 159 (2009).
19. Ghanbari Kh., Bathaie S. Z., Mousavi M. F.: Biosens. Bioelectronics 23, 1825 (2008).

20. Di Wei, Ivaska A.: *Chem. Anal.* 51, 839 (2006).
21. Bhadra S., Khastgir D., Singha N. K., Lee J. H.: *Progress Polymer. Sci.* 34, 783 (2009).
22. Singh R., Prasad R., Sumana G., Arora K., Sood S., Gupta R. K., Malhotra B. D.: *Biosens. Bioelectronics* 24, 2232 (2009).
23. Viswanathan S., Radecka H., Radecki J.: *Biosens. Bioelectronics* 24, 2772 (2009).
24. Yang T., Zhou N., Zhang Y., Zhang W., Jiao K., Li G.: *Biosens. Bioelectronics* 24, 2165 (2009).
25. Peng H., Zhang L., Soeller C., Travas-Sejdic J.: *Biomaterials* 30, 2132 (2009).
26. Ner Y., Invernale M. A., Grote J. G., Stuart J. A., Sotzing G. A.: *Synt. Met.*, in press (2009).
27. Uygun A.: *Talanta* 79, 194 (2009).
28. Aleman C., Teixeira-Dias B., Zanuy D., Estrany F., Armelin E., del Valle L. J.: *Polymer* 50, 1965 (2009).
29. Chen Z. W., Balamurugan A., Chen S. M.: *Bioelectrochem.* 75, 13 (2009).
30. Yan F., Moka S. M., Yu J., Chan H. L. W., Yang M.: *Biosens. Bioelectronics* 24, 1241 (2009).
31. Reisberg S., Piro B., Noel V., Nguyen T. D., Nielsen P. E., Pham M. C.: *Electrochim. Acta* 54, 346 (2008).
32. Reisberg S., Acevedo D. C., Korovitch A., Piro B., Noel V., Buchet I., Tran L. D., Barbero C. A., Pham M. C.: *Talanta* 80, 1318 (2010).
33. Nakano K., Nakamura K., Iwamoto K., Soh N., Imato T.: *J. Electroanal. Chem.* 628, 113 (2009).
34. Kuralay F., Erdem A., Abaci S., Özyörük H., Yildiz A.: *Anal. Chim. Acta* 643, 83 (2009).
35. Kuralay F., Erdem A., Abaci S., Özyörük H., Yildiz A.: *Electrochem. Commun.* 11, 1242 (2009).
36. Kumar R. S., Sasikala K., Arunachalam S.: *J. Inorg. Biochem.* 102, 234 (2008).
37. Ferreyra N. F., Bollo S., Rivas G. A.: *J. Electroanal. Chem.* 638, 262 (2009).
38. Galandová J., Ovádeková R., Ferancová A., Labuda J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 855 (2009).
39. Gherghi I. Ch., Girousi S. Th., Thanou M., Voulgaropoulos A. N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 177 (2005).
40. Alatorre-Meda M., Taboada P., Sabin J., Krajewska B., Valera L. M., Rodrigues J. R.: *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 339, 145 (2009).
41. Liu Y., Hu N.: *Biosens. Bioelectronics* 23, 661 (2007).
42. Gu T., Liu Y., Zhang J., Hasebe Y.: *J. Environ. Sci. Suppl.* 56 (2009).
43. Galandová J., Trnková L., Mikelová R., Labuda J.: *Electroanal.* 21, 563 (2009).

ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN EXHALED BRATH USING NEEDLE TRAP DEVICE

JAROSLAV BLAŠKO^a, RÓBERT KUBINEC^a, ALEXANDRA SZABÓOVÁ^a, PETER PODOLEC^a, IVAN OSTROVSKÝ^a, LADISLAV SOJÁK^a, VICTOR G. BEREZKIN^b, and ANTON AMANN^c

^a*Institute of Chemistry, Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic,* ^b*A.V.Topchiev Institute of Perochemical Synthesis, Russian Academy of Science, Leninsky Prosp. 29, 119991 Moscow, Russia,* ^c*Innsbruck Medical University, Department of Anesthesia and General Intensive Care, Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck, Austria*
blasko@fns.uniba.sk

Volatile organic compounds have been proposed to be contained in exhaled breath. Their concentration in breath represent endogenous marker compounds for identification of illness like lung carcinoma, breast carcinoma and rejection of foreign tissue after heart transplant rejection or other human diseases. Exhaled breath analysis is a non-invasive clinical test, but analysis as a clinical tool requires reliable identification and quantification of the ppb – ppt concentrations present and proper understanding of the basic biochemical mechanisms that generate these trace components.

An important step for analysis of different samples is sample preparation step. The main effort is to reduce amount of liquid solvents, or their complete elimination, and minimize number of operations and processes involved in the sample preparation stage. There are a lot of solventless preparation techniques for analysis of volatile organic compounds. Suitable technique for analysis of these compounds, in trace concentration and from different samples, is needle capillary adsorption trap (INCAT). The main advantage of the needle trap device lies in the simple methodology, low price, easiness and rapidity of the analysis. Needle trap device is suitable for sampling in field.

A newly designed three-layered needle capillary adsorption trap device packed with Chromosorb W coated with 20 % methyl silicone OV-1, Carbopack X and Carboxen 1000, as sorbent materials inside the full volume of stainless steel needle was used for sampling, preconcentration and injection of volatile analytes from breath samples into the gas chromatograph. An injection port with a modified metal liner was used to desorb analytes trapped in the needle trap device.

This work was supported by the Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU under project ITMS 26240220007.

VYUŽITIE SPE POČAS ANALÝZY PRÍTOMNOSTI LÁTKO ZO ZOZNAMOV OPCW VO VODNEJ VZORKE, ZA PRÍTOMNOSTI RÁDIOAKTÍVNEJ KONTAMINÁCIE VO VZORKE V MOBILNOM IDENTIFIKAČNOM CHEMICKOM LABORATÓRIU POČAS 2ND NATO MIXED SAMPLE LABORATORY EXERCISE

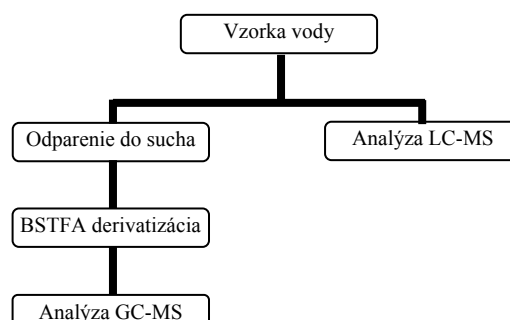
**MILAN BOŽOK, ŠTEFAN BOVA
a PAVEL PULIŠ**

Mobilné identifikačné chemické laboratórium, VÚ 7945,
Šafarikova, 048 01Rožňava, Slovensko
bozok@orangemail.sk, stefan.bova@post.sk,
pavel.pulis@tuke.sk

Úvod

V mesiaci november 2009 až február 2010 prebiehalo cvičenie NATO s názvom 2nd NATO Mixed Sample Laboratory Exercise do ktorého sa zapojilo aj Referenčné chemické laboratórium (RCHL), ktoré ponúklo nášmu pracovníkovi možnosť podieľať sa na analýzach vzoriek. Analýze bola podrobená doručená vzorka vody s označením W08. Podľa scenára cvičenia, vzorka vody bola odobratá z jazera vedľa farmy, blízko ktorej došlo k výbuchu. Neďaleko výbuchu sa nachádzalo mesto s 5000 obyvateľmi a závod na výrobu pesticídov. Niekoľko hodín po výbuchu boli u obetí v blízkosti tohto miesta zistené príznaky expozície toxickou látkou, prejavujúce sa poškodením pokožky, dráždením očí, ťažkým dýchaním, dávením, hnačkami a celkovou nevoľnosťou. Vzorka vody mohla podľa scenára obsahovať rádioaktívnu, biologickú alebo chemickú kontamináciu. Na základe predbežnej analýzy vzorka neobsahovala biologickú kontamináciu, ale obsahovala rádioaktívnu kontamináciu, konkrétne bola zistená prítomnosť ²³⁵U v neznámej forme. Na základe týchto informácií bolo nutné vyvinúť postup na zistenie prípadných reziduí chemických látok podľa zoznamov OPCW vo vzorke. Predpokladali sme prítomnosť veľmi nízkych koncentrácií toxických chemických látok a hlavne prítomnosť ich hydrolytických produktov. Štandardne používaný postup (obr. 1) nebolo možné použiť pre riziko rádioaktívnej kontaminácie prístrojového vybavenia. Po dôkladnom zvážení možnosti nášho pracoviska a požiadavky na dobu trvania analýz podľa STANAG 4632 do 6 hodín¹, bolo rozhodnuté modifikovať štandardnú metódu a použiť na preparáciu LLE v kombinácii s SPE s tým, že každý extrakt určený pre chemickú analýzu sa najskôr podrobil bezpečnostnej analýze na neprítomnosť uránu, metódou röntgenovej fluorescenčnej spektrometrie. Pre stanovenie bol použitý prístroj Twin-X (Oxford).

Na separáciu jednotlivých prípadných reziduí, je pre každú skupinu látok vhodný iný typ sorbentu použitého v kolónke SPE. Výber vhodných SPE sorbentov sme zamerali na rozdielne skupiny reziduí, ktoré sa mohli nachádzať vo vzorke. Jednalo sa o skupinu aminoalkoholov, ako



Obr. 1. Štandardná schéma analýzy vodnej vzorky

degradačných produktov a prekursorov dusíkových yperitov, prípadne látky VX, alkyfosfonových kyselín, ako degradačných produktov organofosforových nervovoparalytických látok a thiodiglykolu, ako degradačného produktu sulfidického yperitu. Zverejnené práce v oblasti analýzy degradačných produktov^{2,3} toxických chemických látok (TCHL) odporúčajú použitie SCX a HLB sorbentov. V experimente sme aplikovali SCX kolónky pre separáciu aminoalkoholov a odstránenie uránu ktorý prechádza kolónkou s ukončením metódami GC/MS(EI) v organickej fáze po derivatizácii a LC/MS(ESI) priamo. Pre LC/MS (ESI) bolo nevyhnutné len odstránenie uránu s minimalizovaním rizika straty analytu. Pre identifikáciu alkyfosfonových kyselín metódou GC/MS(EI) boli použité Oasis HLB kolónky. Na separáciu thiodiglykolu sme použili vlastnú metódu, za využitia SPE kolónky C-18 s reverznou fázou. V oboch prípadoch bola vykonávaná identifikácia hľadaných látok metódou GC/MS(EI) po ich derivatizácii.

Experimentálna časť

Použitie chemikálie

Dichlórmetán čistoty Enviroscan Capillary GC Grade výrobcu LAB-SCAN, acetonitril čistoty LC/MS výrobcu MERCK, trifluoroacetic acid (TFA) čistoty HPLC grade výrobcu Fischer Scientific, kyselina mravčia čistoty p.a. výrobcu Fluka, metanol čistota SupraSolv pre plynovú chromatografiu výrobcu Merck, derivatizačné činidlo BSTFA výrobcu Supelco. Ultračistá voda bola pripravená na zariadení EASYpure RoDi firmy Werner. SPE kolónky HLB 3 cc/60 mg firmy Waters a SPE kolónky Discovery

DSC-18 3 ml/500 mg výrobcu Supelco boli zakúpené u firmy Lambda-life, SPE kolónky HyperSep SCX 200 mg/3 ml výrobcu Thermo zakúpené u firmy Pragolab.

Chromatografické podmienky

Pre plynový chromatograf s hmotnostným detektorom EM-640 Bruker bol ako zdroj nosného plynu použitý dusík, teplota injektora bola nastavená na 230 °C, trvanie nástreku 60 s, bola použitá kolóna DB-5MS 25 m. Teplotný program začínal na 40 °C trvanie 5 min, následne nárast teploty 10 °C min⁻¹ na finálnu teplotu 260 °C, ktorá bola podržaná 8 min. Hmotnostný detektor pracoval v rozsahu 45-400 AMU.

Tabuľka I

Podmienky gradientovej elúcie

Solvent A	Acetonitril			
Solvent B	Voda – 0,1 % kys. Mravčia, 0,01 % TFO			
LC program	čas	% A	% B	prietok ml min ⁻¹
	0:00	5	95	0.15
	0:01	5	95	0.15
	3:00	35	65	0.15
	10:00	42	58	0.15
	12:00	65	35	0.15
	25:00	70	30	0.15
	25:01	100	0	0.15
	27:00	100	0	0.15
	27:01	5	95	0.15
	40:00	5	95	0.15

Kvapalinový chromatograf s hmotnostným detektorom 500-MS Varian bol vybavený Solvent delivery modulom ProStar 240. Na separáciu bola využitá kolóna Polaris C-18-A reverzná fáza, dĺžka 15 cm, interný diameter 2 mm, veľkosť častíc 5 µm. Ako mobilná fáza bol použitý acetonitril čistoty LC/MS a ultračistá voda s obsahom 0,01% TFA a 0,1% kyseliny mravčej v gradientovej elúcii podľa tab. I. Hmotnostný detektor mal nastavené parametre podľa tab. II. Dôvodom na použitie kyseliny mravčej aj TFO je fakt, že ak sa použije samotné TFO, dosiahneme síce výborné rozlíšenie a kvalitu pík, ale TFO neumožňuje dokonalú ionizáciu v MS, preto je citlivosť nižšia. Ak použijeme len samotnú kyselinu mravčiu, citlivosť v MS sa síce zvýši, ale dosiahneme nižšie rozlíšenie. Z toho dôvodu bola použitá kyselina mravčia s prídavkom TFO a tým sa využili pozitívne vlastnosti oboch látok⁴.

Tabuľka II

Zvolené hodnoty hmotnostného detektora ESI

Nebulizer gas	dusík
Nebulizer pressure	30.0 psi
Drying gas pressure	30.0 psi
Drying gas temperature	300 °C
Scan mas	90-400 m/z
RF loading	70 %
Polarity	positive
Capillary voltage	35.0 V
Needle	5000 V
Shield	600 V

Postup separácie

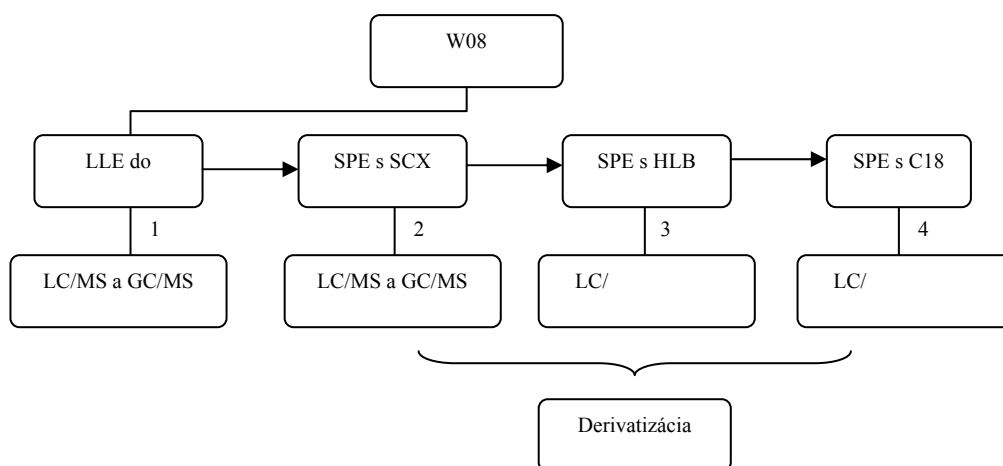
Na analýzu bolo použité 10 ml vzorky vody. V prvom poradí sa využila extrakcia do kvapaliny, LLE. Do 20 ml vialky bolo vložené 10 ml vzorky a 5 ml dichlórmetanu. Vialka po uzatvorení bola sonifikovaná po dobu 15 min, následne sa nechala 5 min odstáť. Príprava pokračovala vytrepávaním po dobu 15 min. Dichlórmetánová vrstva bola prenesená do čistej 10ml vialky a pridala sa približne 1 g bezvodého síranu sodného. Vialka sa ponechala stáť 15 min. Po odstredení sa roztok preniesol do čistej 4ml vialky ktorá bola označená ako číslo 1. Vodná frakcia po extrakcii bola podrobená sérii postupných SPE extrakcii podľa schémy na obr. 2. Postup aktivácie jednotlivých SPE kolóniek, premývanie a extrakčné činidlo je uvedené v tab. III. Každý extrakt bol preverený na neprítomnosť uránu metódou XRF.

Postupy merania a derivatizácia

Jednotlivé extrakty č.1 až č.4 sa podrobili súčasnej analýze na zariadeniach GC/MS a LC/MS. Pre GC/MS sa použil nástrek 1 µl a pre LC/MS 10 µl. Paralelná analýza nám umožnila po skončení merania zhodnotiť, či je nutná derivatizácia pre GC/MS alebo či je nutné vzorku prekoncentrovať odparovaním dusíkom. Pri extrakte č. 2 sme zistili pozitívny výsledok na prítomnosť trietanolamínu s použitím metódy LC/MS. Z merania vyplývala nutnosť vykonať derivatizáciu pomocou činidla BSTFA, pre identifikáciu metódou GC/MS. Derivatizácia bola vykonaná po opatrnom odparení extraktu do sucha za použitia slabého prúdu dusíka, následne bolo pridané 250 µl acetonitrilu a 50 µl činidla BSTFA. Reakcia prebiehala v termoreaktore pri stabilnej teplote 70 °C po dobu 30 min. Po skončení reakcie zmes voľne vychladla a bola analyzovaná metódou GC/MS.

Tabuľka III
Postup aktivácie, premývania a extrakcie jednotlivých SPE kolóniek

Kolónka	Aktivácia	Nadávkovanie vzorky	Premývanie	Extrakcia
SPE SCX	3 ml metanol 3 ml voda	vzorka vody po LLE	3 ml voda	2 ml 10% amoniaku v metanole +1 ml metanolu
SPE HLB	2 ml metanol 2 ml voda	vzorka vody po SCX	2 ml voda	2 ml metanolu
SPE C18	2 ml acetonitril 2 ml voda	vzorka vody po HLB	2 ml voda	2 ml acetonitril

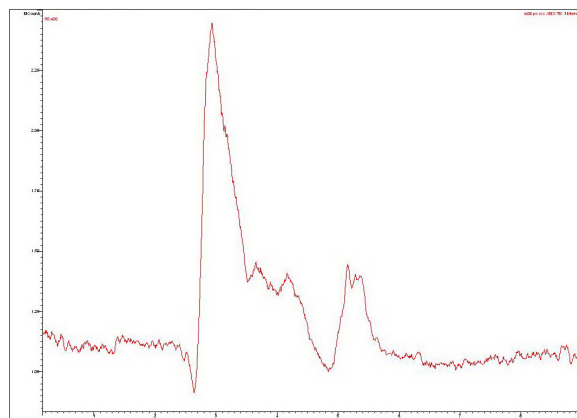


Obr. 2. Schéma analýzy vodnej vzorky pri kombinovanej kontaminácii

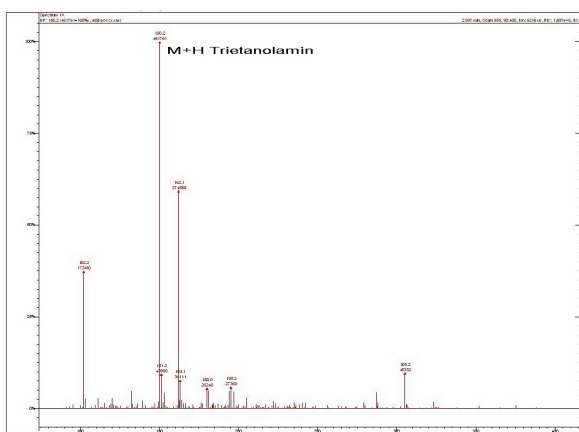
Výsledky a diskusia

Výsledky jednotlivých meraní okrem extraktu č.2 nepreukázali prítomnosť látok zo zoznamu OPCW. V extrakte č.2 bola metódou LC/MS-ESI zistená prítomnosť látky trietanolamín, ktorá patrí do zoznamu OPCW 3B 17. Záznam MS-ESI spektra potvrdil prítomnosť látky s molekulovou hmotnosťou 149 m/z (150 M+H), prislúchajúcej hľadanému analytu. Následná MS-MS analýza bola vykonaná za účelom verifikácie štruktúry trietanolamínu oproti referenčnému štandardu. Okrem toho obsahuje spektrum aj neidentifikovanú látku s hmotnosťou 102 a 162 m/z , ktorá bola prítomná aj v slepej vzorke, bezpečne neobsahujúcej kontamináciu. Trietanolamín je prekursor a zároveň degradačný produkt dusíkového yperitu HN3. Jeho prítomnosť bola potvrdená metódou GC/MS vo forme derivátu, porovnaného s referenčným spektrom knižnice OPCW e-vgwd_2008. Pre vykonanie potvrdzujúcej identifikácie boli porovnané výsledky LC/MS a GC/MS analýz, oproti výsledkom analýzy s referenčným štandardom trietanolamínu. Referenčný štandard bol analyzovaný metódou LC/MS-ESI s následnou MS-MS analýzou priamo a metódou GC/MS po jeho derivatizácii BSTFA

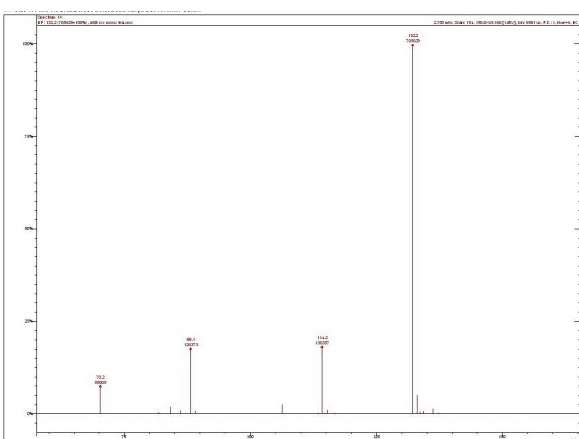
a porovnaním s knižnicou OPCW e-vgwd_2008. V oboch prípadoch bola prítomnosť analytu potvrdená s úplnou zhodou spektrálnych záznamov.



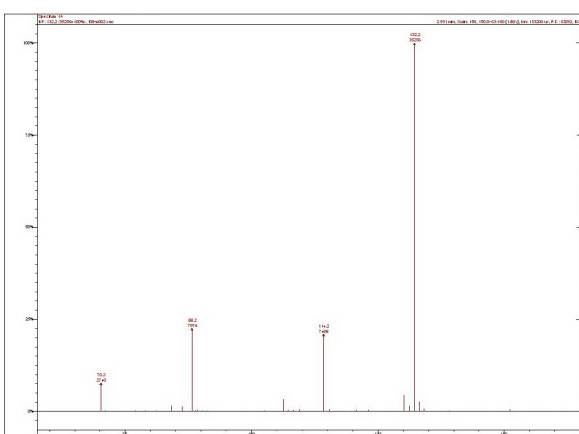
Obr. 3. LC-MS-ESI chromatogram extraktu z SCX



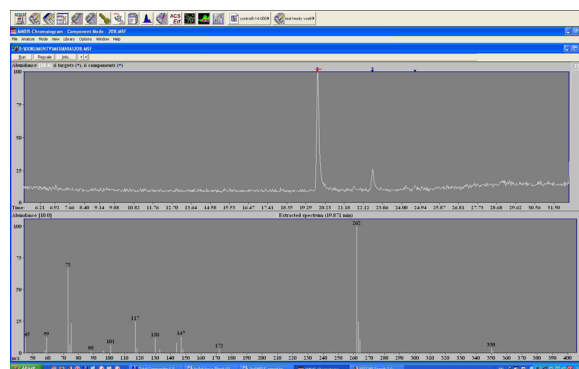
Obr. 4. Spektrum extraktu z SCX meraného pomocou LS-MS-ESI



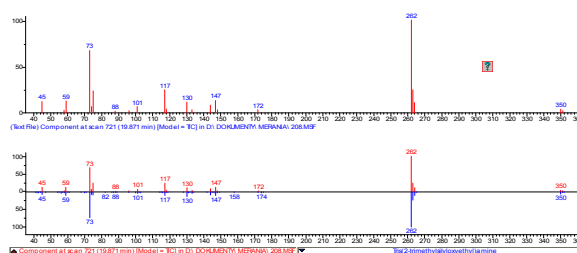
Obr. 5. MS-MS spektrum hmoty 150 vzorky po SCX meraného pomocou LS-MS-ESI



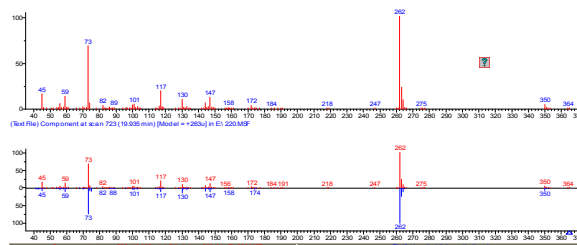
Obr. 6. MS-MS spektrum hmoty 150 štandardu trietanolamínu meraného pomocou LS-MS-ESI



Obr. 7. Chromatogram a MS-EI spektrum extraktu z SCX po derivatizácii pomocou BSTFA



Obr. 8. MS-EI spektrum extraktu z SCX po derivatizácii pomocou BSTFA a porovnanie s knižnicou



Obr. 9. MS-EI spektrum štandardu trietanolamínu po derivatizácii pomocou BSTFA a porovnanie s knižnicou

Záver

Analýza vzorky obsahujúcej kombinovanú chemickú a rádioaktívnu kontamináciu prináša množstvo praktických otázok, ktorých riešenie nie je dostupné v štandardných postupoch ani v zverejnených prácach. Takýto druh vzoriek možno v praxi očakávať, rovnako ako aj vzorky s kombinovanou chemickou a biologickou kontamináciou. Výsledky analýzy poukazujú na úspešné vyriešenie časti tohto problému, v rozsahu analyzovanej vzorky. Metóda plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS-EI) sa javí ako veľmi vhodná na identifikáciu

a stanovenie prchavých a termostabilných klasických toxických chemických látok. Podstatne menej je účinná pri analýze ich hydrolytických produktov. Takáto analýza vyžaduje použitie separačných postupov, prekoncentrovanie a cieleňú derivatizáciu, teda použitie časovo náročných metód. Z tohto pohľadu sa javí ako vhodná pre potvrdenie identifikácie zistených produktov hydrolyzy presne vymedzeného okruhu TCHL. Výhoda použitia metódy GC/MS-EI spočíva v dostupnosti referenčných spektier prakticky pre všetky klasické TCHL a ich degradačné produkty, vrátane derivátov. Na analýzu hydrolytických produktov TCHL sa javí ako veľmi progresívna, metóda LC/MS-ESI. Umožňuje vzhľadom na detekčné limity aj ich priamu analýzu vo vzorke vody a nie je problematické v nej aplikovať separačné metódy SPE/ SPME, ako aj prekoncentračné techniky. Je vhodná aj na analýzu termolabilných a málo prchavých TCHL, ale aj proteínových toxínov. Spolu s GC/MS vytvára účelnú zostavu, uplatňujúcu sa pri analýze celého spektra chemických rizík. Jej nevýhodou je nízka dostupnosť referenčných spektier, vynucujúca tvorbu vlastných databáz. Použitie techník SPE sa javí ako veľmi účinné na extrahovanie záujmových chemických reziduí pri kombinovanej kontaminácii, obzvlášť pri kontaminácii rádioaktívnymi izotopmi. Počas experimentu s referenčným štandardom neboli pozorované prakticky žiadne merateľné straty analytu. V ďalšom období je potrebné overiť vhodnosť uvedeného postupu na rôznych rádionuklidoch a celkovo sa pokúsiť o zníženie času potrebného na analýzu, ako aj čo najviac optimalizovať a zjednodušiť celý postup.

LITERATÚRA

1. STANAG 4632: Deployable NBC Analytical Laboratory, Edition 1 (NATO), (2005) Electronic document.
2. Kanaujia P. K., Tak V., Pardasani D., Gupta A.K., Dubey D.K.: *J. Chromatogr., A* 1185, 167 (2008).
3. Le Moullec S., Truong L., Montauban C, Begos A., Pichon V., Bellier B.: *J. Chromatogr., A* 1139 171 (2007).
4. LC-MS Mobile Phase Additives – Tips&Tricks: Sigma-Aldrich (2008).

Abstrakt

Cvičenie bolo zamerané na analýzu kombinovanej vzorky obsahujúcej rádioizotop ^{235}U a neznáme reziduá chemickej kontaminácie, obsahujúcej pravdepodobne látky podľa zoznamov OPCW. Bolo nutné vyvinúť metódu na bezpečnú analýzu vzorky obsahujúcej rádioaktívnu a pravdepodobne aj chemickú kontamináciu, aplikovateľnú v podmienkach mobilného chemického laboratória. Požadovaná bola kvalitatívna analýza prítomnosti neznámych chemických látok, v súlade s podmienkami na potvrdzujúcu identifikáciu podľa normy AEP-66 (NATO). Predpokladala sa prítomnosť veľmi nízkych koncentrácií toxických chemických látok, alebo produktov ich degradácie. Štandardný postup analýzy vzorky nebolo možné využiť bez rizika kontaminácie prístrojového vybavenia uránom. Modifikovanie metódy a postupu analýzy bolo cieľné na minimalizovanie strát predpokladaných skupín analytov a zabránenie ich kontaminácii látkami sťažujúcimi analýzu. Odstránenie ^{235}U zo vzorky sa javilo ako časovo a technicky zložité, preto bola zvolená cesta selektívnej extrakcie predpokladaných reziduí chemickej kontaminácie. Použitie LLE (Liquid – Liquid Extraction) v kombinácii s SPE (Solid Phase Extraction) sa javilo ako efektívne riešenie úlohy, vzhľadom na minimálne riziko znečistenia vzorky a vysokú výťažnosť predpokladaných analytov. Počas predbežnej analýzy metódou plynovej chromatografie s použitím ručnej sondy GC/MS(EI) nebola zistená prítomnosť prchavých chemických látok v parách nad vzorkou, čo vylúčilo prítomnosť toxických a nebezpečných chemických látok vo vyšších koncentráciách. Analýza metódou röntgenovej fluorescenčnej spektrometrie vylúčila prítomnosť toxických kovov, vrátane arzenu. Rádiologické laboratórium potvrdilo v rámci predbežnej analýzy prítomnosť rádioizotopu ^{235}U . Pre identifikáciu chemických látok vo vzorke boli aplikované metódy plynovej (GC/MS-EI) a kvapalinovej (LC/MS-ESI) chromatografie s hmotnostnou spektrometriou.

STANOVENÍ RTUTI VE VZORCÍCH VODY Z PŘÍSTAVU V HAMBURKU S POUŽITÍM ELEKTROCHEMICKÉHO GENEROVÁNÍ STUDENÉ PÁRY RTUTI SPOJENÉHO S MINIATURNÍM PROUŽKOVÝM MIKROVLNĚ INDUKOVANÝM HELIOVÝM PLASMATEM A OES DETEKČÍ

VÁCLAV ČERVENÝ^{a,b}, MARK HORVÁTH^{a,c}, MARTIN AMBERGER^a a JOSÉ A. C. BROEKAERT^a

^a Ústav anorganické a užité chemie, Univerzita Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D 201 46 Hamburg, Německo, ^b na stáži z Univerzity Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 2030, CZ 128 43 Praha 2, Česká republika, ^c na stáži z Katedry chemie a biochemie, Szent István University, Péter K. u. 1, HU 2103 Gödöllő, Maďarsko
cerveny2@natur.cuni.cz

Klíčová slova: stanovení rtuti, elektrochemické generování studené páry rtuti, microstrip plasma, OES

Úvod

Oba anorganické ionty rtuti (Hg^+ i Hg^{2+}), jakož i organické sloučeniny rtuti a elementární rtuť jsou toxické. Nové poznatky z posledních desetiletí nutí společnost minimalizovat přítomnost Hg ve vodě a v pracovním prostředí. Proto byly pro vzduch a vodu vydány nové předpisy a Hg musí být v uvedených složkách životního prostředí sledována. Povolený limit obsahu Hg ve vzduchu na pracovišti (expozice 7–8 hodin denně; 40hodinový pracovní týden) je podle American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) $0,02 \text{ mg m}^{-3}$.

Generování těkavých sloučenin se používá pro stanovení jednotlivých prvků jako rutinní spektrochemická stopová analytická metoda již několik desetiletí¹. Existují dvě výhody zavádění vzorku v plynné fázi. První z nich je snadné oddělení analytu od kapalné matrice a druhou výhodou je možnost zakoncentrování analytu (zvyšuje citlivost metody). Nejdůležitějším důvodem pro výběr této metody je potlačení vlivu nečistot a jejich interferencí². Prvky, které tvoří těkavé formy, lze rozdělit do dvou skupin. Hydridotvorné prvky (As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te) představují první větší skupinu, a těkavé prvky (Hg) a prvky, u kterých struktura jejich těkavé sloučeniny není známa (přechodné a ušlechtilé kovy jako Cd, Cu, Ag, Au, ...) ^{3,4} představují druhou skupinu těchto prvků. Je totiž již dlouho známo, že Hg má při pokojové teplotě značnou tenzi páry ($0,2460458 \text{ Pa} \sim 0,0018455 \text{ mm Hg sloupce}$)⁵. Tato skutečnost je využívána pro stanovení Hg již mnoho let¹.

Technika studených par Hg našla široké využití pro stanovení Hg. Nejčastěji používanou metodou,

pro uvolnění plynné Hg z roztoku, je chemické generování studené páry Hg (CMCVG). Jako redukční činidlo se obvykle přidává NaBH_4 nebo SnCl_2 . Tyto reakce běží za normálních podmínek a vygenerovaná elementární těkavá Hg je unášena nosným plynem do detektoru^{1,6}.

Elektrochemické generování studené páry Hg (EcMCVG) je, podobně jako elektrochemické generování hydridů (EchG), vedle chemického generování vhodnou alternativní technikou^{7–10}. Největší výhodou EcMCVG je použití elektrického proudu namísto drahého a nestabilního redukčního činidla. Přídavek redukčního činidla také může být zdrojem kontaminace^{11–14}. Mezi další výhody elektrochemického generování těkavých sloučenin patří nižší vliv oxidačního stavu analytu na tvorbu těkavých forem v porovnání s chemickým generováním par¹⁵.

Existuje mnoho článků o zakoncentrování Hg, zejména pro atomovou absorpční spektrometrii (AAS) s použitím *in-situ* záchytu na různých materiálech, viz např. cit. ^{1,16–32}.

Spektrochemická plasmová analýza je jedním z nejlepších přístupů k multiprvkové analýze různých typů vzorků různých koncentrací³³.

V 50. letech 20. století začali Mavrodineanu a Hughes zkoumat mikrovlnné výboje v analytické atomové spektrometrii³⁴. K většímu rozmachu využívání mikrovlnně indukovaných plasm (MIP) došlo pak v 70. letech. Bylo zjištěno, že mikrovlnné plasma je velmi silný excitační a ionizační zdroj s širokou oblastí použití.

V průběhu mnoha let byla jako rezonátor používána bez významných úprav kavita TM 010 popsána Beenakkerem a spol.³⁵.

Mikrovlnné plasma je levnější a také jednodušší než indukčně vázané plasma (ICP). MIP lze provozovat nejen s Ar, ale také s He, a tak může účinně excitovat nekovy. Nicméně, jeho nízká tepelná kapacita způsobuje problémy se zaváděním vzorku. Proto je toto plasma velmi citlivé na složení matrice. V dnešní době jsou MIP zdroje používány k prvkově-selektivní detekci v plynové chromatografii. Pro tento účel jsou vhodným plasmovým zdrojem, ale zvláštní přívod vzorku bývá vždy nezbytný^{36–38}.

V MIP neexistuje žádná lokální termodynamická rovnováha (LTE) a hustota částic a teplota jsou prostorově velmi nehomogenní³³.

Přestože v posledních desetiletích došlo k velkému rozvoji indukčně vázaných plasmových zdrojů, nebyla technika MIP zapomenuta díky mnoha výhodám, jako je nižší cena, nižší provozní náklady díky nízké spotřebě energie a plynu a malý objem (velikost). Na druhou stranu jsou při použití MIP účinky matrice obvykle vyšší než při použití ICP.

Běžně se pro generování mikrovln používá magnetron

na frekvenci 2,45 GHz, energie 20 až 250 W je pak vedena do dutiny rezonátoru^{39,40}. V rozsahu nízkého výkonu plasmatu se používají rovněž generátory na bázi tranzistoru.

MIP mohou být provozovány pouze v plynu, který má dostatečné množství elektronů. Proto je k zapálení plasmatu nutná jiskra nebo uvolnění elektronů jiným způsobem⁴¹.

Cílem této studie bylo spojit elektrochemické generování studené páry rtuti (EcMCVG) s excitací v miniaturním „microstrip“ plasmatu (popsaném již dříve^{6,42–44}) pro potřeby optické emisní spektrometrie (MSP-OES). Nově navrhovaná metoda využívá on-line spojení obou technik a ukázala se být vhodnou pro stanovení Hg ve vodných vzorcích.

Experimentální část

Miniaturní mikrovlnně indukované plasma bylo použito jako zdroj záření pro optický emisní spektrometr. Celá instrumentální sestava je zobrazena na obr. 1.

Elektrochemické generování studené páry Hg (EcMCVG)

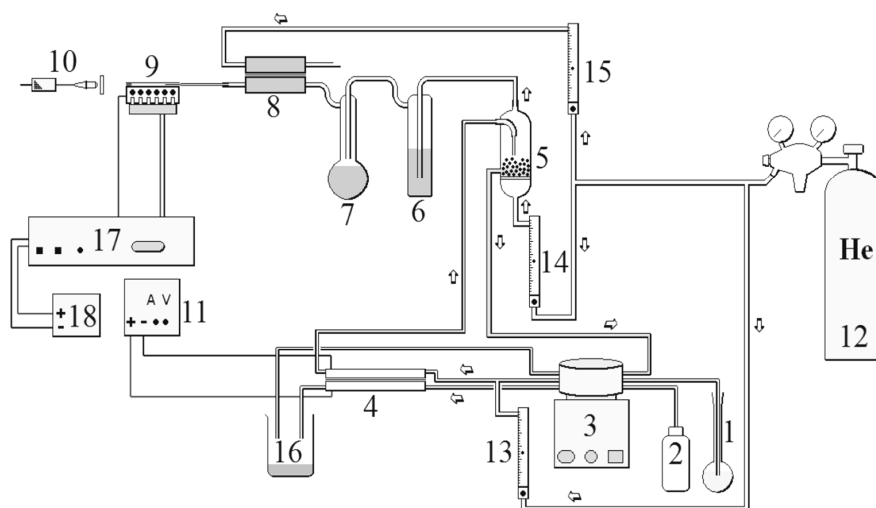
EcMCVG bylo realizováno v elektrochemickém generátoru popsaném v článku¹⁰. Tento generátor je vyroben z plexiskla (Řempe Net, Česká republika) a má dva elektrodové prostory o rozměrech $3 \times 3 \times 100$ mm. Ty byly navzájem odděleny iontově výměnnou membránou Nafion®117 (Aldrich, USA). Pt (99,999%, Goodfellow, Velká

Británie), byla vybrána jako katodový i anodový materiál z důvodu tvorby amalgámů Hg s jinými kovy. Celková aktivní plocha katody a anody byla 1200, resp. 300 mm² (cit.¹⁰). Všechny elektrody byly připojeny pomocí měděných kontaktů k laboratornímu zdroji konstantního proudu DIGI 40 (Votcraft Labornetzgerät, Německo).

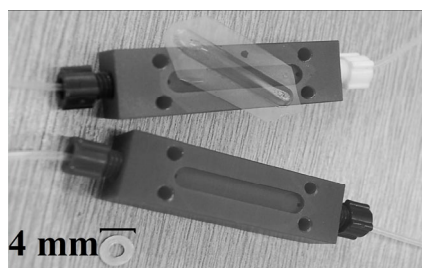
Jako anodový materiál sloužil roztok kyseliny H₂SO₄ o koncentraci 2 mol l⁻¹. Peristaltické čerpadlo Perimax 12/4 (Spetec, Německo) bylo použito pro čerpání všech roztoků tygonovými nebo teflonovými hadičkami (vnitřní průměr 0,25 mm) aparaturou.

Přívod He a odstraňovač vodíku

Nosný plyn byl zaváděn do aparatury na třech různých místech, jak je znázorněno na obr. 1. Nejvyšší průtok He (130 ml min⁻¹) byl zaváděn před generátor studené páry Hg, druhý přívod (14 ml min⁻¹) byl realizován prostřednictvím frity v dolní části separátoru plynné a kapalné fáze s nuceným odtahem (vnitřní objem 5 ml). Dvě sušící baňky s celkovým mrtvým objemem cca 10 ml naplněné koncentrovanou H₂SO₄ byly použity pro sušení plynných reakčních produktů prošlých separátorem fází. Třetí přívod He byl realizován přes odstraňovač vodíku uvedený na obr. 2. Vnitřní objem každého z obou oddílů (3×15 mm) byl přibližně 45 μl. Membrána Nafion®117 použitá v tomto zařízení je propustná pro He a H₂ (cit.^{45,46}). Přibližně polovina H₂ (vyprodukovaného jako vedlejší produkt v generátoru studené páry Hg) mohla být nahrazena v plasmovém kanálu heliem. Pára Hg touto membránou



Obr. 1. Použitá aparatura pro EcMCVG-MSP-OES; 1 – katodový roztok / roztok vzorku; 2 – anodový roztok; 3 – peristaltické čerpadlo; 4 – elektrochemický generátor studené páry rtuti; 5 – separátor plynné a kapalné fáze s nuceným odtahem a s fritou pro zavádění Hg; 6 – sušící baňka s koncentrovanou H₂SO₄; 7 – pojistná sušící baňka s koncentrovanou H₂SO₄; 8 – odstraňovač vodíku s Nafion 117-membránou a třetím přívodem He; 9 – Micro-Strip Plasma (MSP); 10 – optický emisní spektrometr; 11 – stabilizovaný zdroj elektrického proudu pro generátor studené páry rtuti; 12 – tlaková láhev s He; 13 – digitální průtokoměr pro první přívod nosného plynu; 14 – průtokoměr pro druhý přívod nosného plynu; 15 – průtokoměr pro třetí přívod He; 16 – kádinka pro kapalné odpady; 17 – mikrovlnný generátor – 2,45 GHz; 18 – zdroj energie pro mikrovlnný generátor

Obr. 2. Odstraňovač H₂

neprocházela; to bylo prokázáno připojením druhého výstupu tohoto odstraňovače H₂ do MSP, přičemž žádný signál pro Hg nebyl pozorován. Tento odstraňovač H₂ byl velmi důležitý kvůli vysokému vlivu H₂ na účinnost excitace Hg v MSP. Celkový průtok plynů zavedený do MSP byl přibližně 160 ml min⁻¹.

Micro-Strip plasma

Nízkoenergetický mikropáskový mikrovlnně indukovaný plasmový zdroj byl použit pro atomovou emisní spektrometrii v této práci^{42,43}. Mikropásky tvoří zážehový proužek a proužek kompenzačního okraje. Tento strukturální detail je důležitý pro udržení nízké hodnoty odražené energie v mikropáscích⁴⁷. MSP bylo produkováno v tenké destičce taveného křemene a bylo již použito v kombinaci s OES jako prvkově-selektivní detektor pro několik analytických aplikací^{42,48}.

MSP bylo realizováno za atmosférického tlaku v tenké čtvercové destičce taveného křemene o délce 30 mm a výšce 1,5 mm. V této destičce byl přímý kanál o průměru 0,64 mm. Analyt byl do tohoto kanálu zaváděn v toku He prostřednictvím nemodifikované křemenné kapiláry (plynová chromatografie). Cu-elektroda byla napájena na zadní straně destičky a připojena k uzemněnému Cu-bloku chlazenému ventilátorem. Mikrovlnná energie o frekvenci 2,45 GHz, byla produkována v oscilátoru provozovaném při 2450 MHz/60 W (Dirk Fischer Elektronik, Německo) s napájecím zdrojem typu 2231.1 (vstup 230 V AC 50 Hz, výstup 13,4 V DC/20, Statron, Německo) a přivedena na mikropásky MSP-zdroje koaxiálním kabelem s miniaturním konektorem. Tato energie byla dále od této „antény“ šířena po vnitřní straně plasmového kanálu mezi měděnými pásky a uzemněnou elektrodou⁴³. MSP bylo obvykle v provozu při maximální energii 40 W, délka plasmatu umístěného uvnitř plasmového kanálu pak byla cca 3 mm.

Optická emisní spektrometrie

Zařízení produkované MSP bylo zfokusováno pomocí vstupní čočky COL UV/VIS (6 mm v průměru) a procházelo optickým vláknem FC-UV600-2SR (Avantes, USA) do miniaturního spektrometru USB2000 (Ocean Optics, USA). Tento spektrometr má ohniskovou vzdálenost

23 mm a f/4. Byl vybaven difrakční mřížkou a lineárním detektorem s diodovým polem (Sony ILX511 high performance 2048-element). Pomocí tohoto spektrometru byla zaznamenávána spektra od 200 do 500 nm, přičemž šířka jednoho pixelu odpovídá vlnové délce 0,14 nm. Vzdálenost mezi plasmatem a vstupní čočkou byla optimalizována na přibližně 25 mm pro dosažení maximálního signálu Hg. Mezi plasmovým zdrojem a vstupní čočkou bylo umístěno křemenné sklíčko z důvodu ochrany optiky před horkými plyny z plasmatu. Byly vyhodnocovány jak výšky, tak i plochy pro čáry Hg o vlnových délkách 253,65 nm a 435,81 nm a byly provedeny korekce na pozadí při 251,57 nm, resp. 440,84 nm. Doba integrace signálu byla volena mezi 100 a 300 ms.

Chemikálie

Zásobní roztok Hg₂Cl₂ (Merck, Německo) byl používán v celém průběhu studie a byl ředěn na požadovanou koncentraci Hg roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,05 mol l⁻¹. Tento roztok HCl čistoty suprapure (Merck, Německo) sloužil rovněž jako katodový roztok. Anodový roztok a sušící náplň sušících baněk byly připraveny z kyseliny sírové čistoty pro analýzu (Merck, Německo). Dvakrát destilovaná voda byla použita pro přípravu všech roztoků.

Standardní roztoky od firmy Merck obsahující 1000 µg ml⁻¹ As, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Sb, Se a Te byly použity pro interferenční studii při koncentraci analytu 50 ng ml⁻¹.

Helium o 99,9999% čistotě bylo používáno jako pracovní plyn.

Koncentrovaná HNO₃ a H₂SO₄ čistoty suprapure (Merck) byly použity pro rozklady referenčního materiálu NIST SRM 2781 (domácí kal) v mikrovlnné troubě MARS 5 (CEM Corporation, USA). Stanovení Hg v tomto materiálu sloužilo k validaci vyvinuté metody. Tyto výsledky stejně jako výsledky analýz reálných vzorků (spikované vzorky povrchových vod a spikovaný referenční materiál SRM NIST 1640 (stopové prvky v přírodní vodě)) byly porovnány s výsledky získanými pomocí ICP-OES Spectro CIROS CCD (Spectro Analytical GMBH, Německo).

Postup přípravy vzorku

Navrhovaným postupem byla analyzována přírodní voda SRM NIST 1640. Její roztok byl před stanovením Hg desetkrát zředěn.

Dále byl analyzován SRM NIST 2781 po mikrovlnném rozkladu tohoto domácího kalu. 5 ml koncentrované H₂SO₄ a 5 ml HNO₃ bylo přidáno k naváženému vzorku vysušeného domácího kalu. Potom byl použit dvoustupňový program mikrovlnného rozkladu vzorku. Působení mikrovlnné energie 1200 W po dobu 5 min mělo za následek tlak přibližně 35 bar a teplotu 140 °C. Po 40 min druhého kroku bylo za stejného tlaku dosaženo 190 °C. Po dokončení tohoto programu a po ochlazení byla reakční

směs převedena do čisté skleněné kádinky. Zahříváním došlo k odstranění plynných NO_x , jak doporučuje cit.⁴⁹. Po zředění katodovým roztokem ($0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$), byla tato směs přefiltrována přes papírový filtr (Filtrak 390, Německo) a v odměrné baňce doplněna na finální objem 50 ml. Tento postup byl již popsán v cit.⁶ a byl v této práci modifikován krokem filtrace.

Pro analýzu všech roztoků vzorků byla použita metoda standardního přídatku v lineárním rozsahu kalibrační křivky. Přidávaná koncentrace Hg ve výsledných roztocích byla 50 ng ml^{-1} . Pro každý vzorek byla provedena tři opakovaná stanovení zahrnující kompletní analytický postup.

Výsledky a diskuse

Optimalizace

Všechny parametry navrhované metody stanovení Hg byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo maximálního signálu nebo maximálního poměru signál/šum. Optimální podmínky jsou uvedeny v tab. I.

Příprava katody

Před každým měřením byl povrch katody čištěn a aktivován elektrochemickým generováním studené páry Hg z roztoku s vysokým obsahem Hg (50 ng ml^{-1}) pro cca 10–15 min, dokud signál nevystoupal na konstantní hodnotu. Pak byl elektrolyzován čistý katodový roztok ($0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$) až Hg-signal klesl na nulu. Po této aktivaci byly získávány reprodukovatelné výsledky. Bylo zjištěno, že příprava elektrod má významný vliv na přesnost stanovení Hg stejně jako bylo již dříve popsáno pro elektrochemické generování hydridů⁵⁰.

Složení katodového a anodového roztoku

Jako elektrolyty byly použity zředěné roztoky HCl a H_2SO_4 . Na základě předchozí zkušenosti byla

Tabulka I

Optimální pracovní podmínky pro EeMCVG-MSP-OES

Parametr	Hodnota
Průtok elektrolytu (vzorku)	1 ml min^{-1}
Katodový roztok	$0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$
Anodový roztok	$2 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$
Průtok He 1. přívodem	130 ml min^{-1}
Průtok He 2. přívodem	14 ml min^{-1}
Průtok He 3. přívodem	20 ml min^{-1}
Elektrický generační proud	$0,03 \text{ A}$
Energie MSP	40 W
Sušící roztok	$97\% \text{ H}_2\text{SO}_4$
Integrační čas	300 ms

do anodového roztoku vybrána H_2SO_4 o koncentraci $2,0 \text{ mol l}^{-1}$. Optimální koncentrace HCl v katodovém roztoku pro tuto metodu je velmi vzdálena od optimálního složení katodového roztoku pro maximální účinnost generování studené páry Hg, protože bylo nezbytné snížit negativní vliv H_2 na plasma. Kromě použití odstraňovače H_2 byla ještě snížena koncentrace HCl v katodovém roztoku (poměr Hg/ H_2 je vyšší), jak je uvedeno na obr. 3a. Průtok katodového roztoku byl testován v rozsahu $0,5$ až $2,5 \text{ ml min}^{-1}$ a jako optimální byl zvolen $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

Vliv elektrického proudu

Pokud jde o tvar závislosti signálu na vloženém elektrickém proudu, existuje velký rozdíl mezi MSP-OES a AAS. Tvorba H_2 (vedlejší produkt elektrochemického generování studené páry Hg) má v AAS pozitivní vliv. Při použití OES však produkovaný H_2 snižuje excitační účinnost plasmatu a přebytek H_2 dokonce MSP uhasí. Proto byl vyvinut a také používán odstraňovač H_2 s Nafionovou membránou. Emisní Hg signál se zvýšením generačního proudu klesal, jak je znázorněno na obr. 3b. Tato závislost má ostré maximum mezi $0,03$ a $0,04 \text{ A}$. Zakřivení v této části křivky ukazuje, že se jedná o kompromis mezi podmínkami vhodnějšími pro generování studené páry Hg a podmínkami vhodnými pro nízkou produkci H_2 . Elektrochemický generátor studené páry Hg byl nakonec provozován při $0,03 \text{ A}$ a koncentraci $0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$ v katodovém roztoku. Tyto hodnoty se z výše uvedených důvodů hodně liší od dříve publikovaných údajů¹⁰.

Vliv průtokové rychlosti nosného plynu

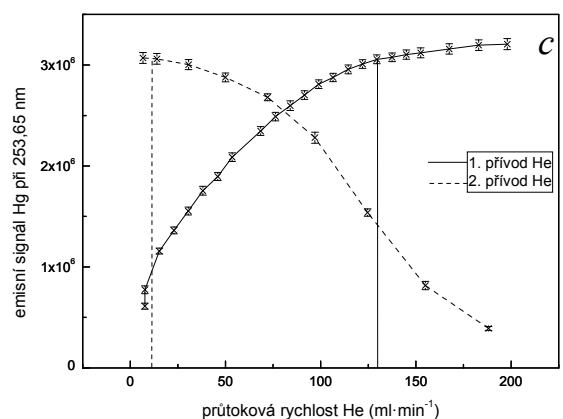
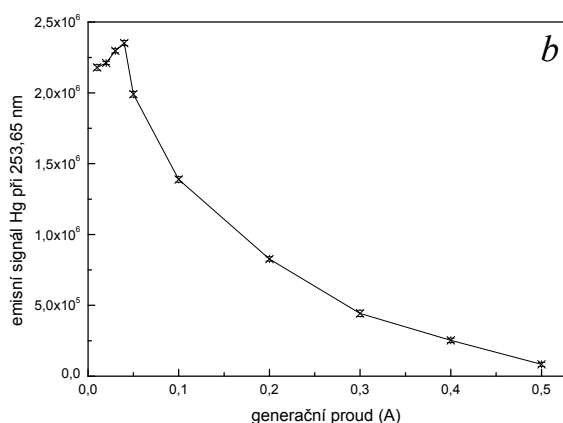
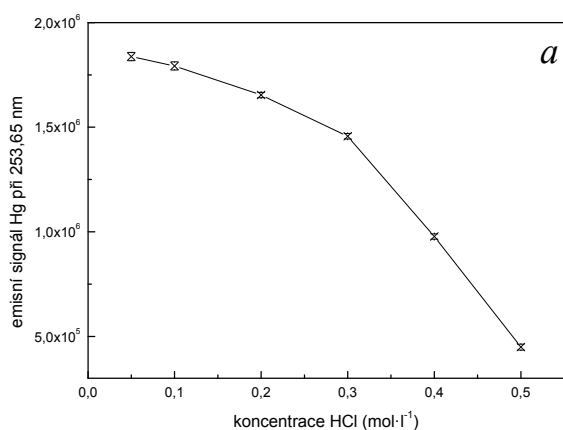
Tři přívody He na různých místech aparatury (obr. 1) mají různé funkce. Nejdůležitější z nich byl ten první, který ústí před generátor studené páry rtuti. He zde nemělo jen funkci nosného plynu, ale sloužilo také k desorpci Hg z povrchu katody. Jak je znázorněno na obr. 3c, byl optimální průtok 130 ml min^{-1} .

Druhý přívod He byl realizován prostřednictvím frity na spodní straně separátoru plynné a kapalné fáze s nuceným odtahem. Průtok He přes tento kanál byl optimalizován pro získání co nejlepšího poměru signál/šum a jako optimální byla zvolena hodnota 13 ml min^{-1} .

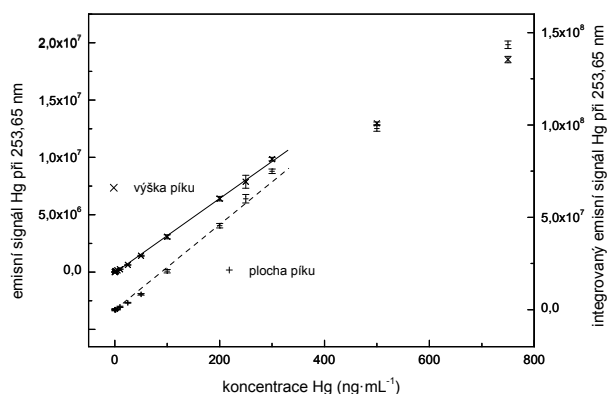
Závislost signálu na průtoku He třetím přívodem nebyla tak strmá. Bylo nutné zachovat v přívodní trubici malý přetlak, který ale musel být nižší než v plasmovém kanálu. Jako optimální byl zvolen průtok 20 ml min^{-1} , ale ne všechno He z tohoto kanálu procházelo membránou do plasmového kanálu.

Základní charakteristiky

Kalibrační křivka za optimálních experimentálních podmínek (tab. I) byla naměřena v koncentračním rozsahu 0 až 750 ng ml^{-1} . Nejvyšší citlivost a nejnižší mez detekce byly získány pro nejcitlivější čáru Hg $253,65 \text{ nm}$. Získané



Obr. 3. Výsledky optimalizační studie EcMCVG-MSP-OES; 0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Hg; 1 ml min^{-1} katodového a 2 mol l^{-1} H_2SO_4 jako anodového roztoku; výkon MSP 40 W; vyhodnocována výška píku pro čáru Hg 253,65 nm; a) Vliv koncentrace HCl v katodovém roztoku; průtok He: 1. kanál: 130 ml min^{-1} , 2. kanál: 14 ml min^{-1} , 3. kanál: 20 ml min^{-1} ; generační proud 0,03 A, integrační čas 200 ms; b) Vliv vloženého generačního proudu; průtok He: 1. kanál: 130 ml min^{-1} , 2. kanál: 14 ml min^{-1} , 3. kanál: 20 ml min^{-1} ; 0,05 mol l^{-1} HCl v katodovém roztoku; integrační čas 200 ms; c) Vliv průtoku He; 0,05 mol l^{-1} HCl v katodovém roztoku; 20 ml min^{-1} He ve 3. kanálu; generační proud 0,03 A, integrační čas 300 ms



Obr. 4. Kalibrační křivky pro stanovení Hg pomocí EcMCVG-MSP-OES; 1 ml min^{-1} 0,05 mol l^{-1} HCl jako katodového a 2 mol l^{-1} H_2SO_4 jako anodového roztoku; průtoky He: 1. kanál: 130 ml min^{-1} , 2. kanál: 14 ml min^{-1} , 3. kanál: 20 ml min^{-1} ; generační proud 0,03 A; výkon MSP 40 W, integrační čas 300 ms na čáře Hg 253,65 nm

závislosti při této vlnové délce jak pro výšky píků tak pro plochy píků jsou uvedeny na obr. 4. Dosažené základní charakteristiky jsou shrnuty v tab. II. Meze detekce byly zjištěny metodou trojnásobku směrodatné odchylky. Opakovatelnost byla stanovena jako relativní směrodatná odchylka 10 po sobě jdoucích měření roztoku o koncentraci Hg 50 ng ml^{-1} .

Mez detekce metody je srovnatelná s jednou z dalších metod pro stanovení Hg bez záchytu pomocí optické emisní detekce. Mez detekce navrhovaného stanovení (1,1 ng ml^{-1}) je devětkrát lepší, ale lineární část kalibrační křivky (3,7–300 ng ml^{-1}) je kratší než je uvedeno v článku se stejným buďícím zdrojem a detekční technikou MSP-OES⁶. Pohl a spol. dosáhli s chemickým generováním studených par Hg pomocí NaBH_4 meze detekce 9 ng ml^{-1} a lineárního rozsahu až 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Interference

Stejně jako u dříve popsáných stanovení Hg s MSP-OES, i zde způsobuje řada prvků interference⁶. Potenciálními interferenty jsou hydridotvorné prvky (As, Sb, Se, Te), přechodné kovy (Cd, Cu, Fe, Ni) a soli (NaCl).

Vlivy potenciálních interferentů byly studovány za optimálních podmínek uvedených v tab. I pro roztoky o koncentraci Hg 50 ng ml^{-1} . Vliv výše uvedených prvků v reálných vzorcích byl obecně nízký vzhledem k jejich nízké nalezené koncentraci.

Na základě provedených experimentů byly uvedené prvky rozděleny do tří skupin. První skupina obsahuje Se a Te, které způsobují již v nízkých koncentracích silné potlačení signálu analytu. Přídavek As, Cu, Cd a Sb zvýšil pozorované signály na obou vlnových délkách. Fe, Ni a Co tvoří třetí skupinu prvků. Bylo zjištěno, že jejich vliv na signál Hg není tak silný.

V biologických a environmentálních vzorcích je ob-

Tabulka II
Základní charakteristiky stanovení Hg pomocí EcMCVG-MSP-OES

Parametr	Výška píku		Plocha píku	
	Hg 253,65 nm	Hg 435,81 nm	Hg 253,65 nm	Hg 435,81 nm
Mez detekce, ng ml ⁻¹	1,1	8,0	13	8,6
Korelační koeficient	0,999	0,985	0,997	0,993
Lineární dynamický rozsah, ng ml ⁻¹	3,7–300	200–500	44,2–300	200–500
Opakovatelnost, %	2,7	1,0	1,4	0,9

vykly vysoký obsah soli. Nejinak je tomu i u vzorků vod. Proto byl zkoumán vliv přítomnosti NaCl na stanovení Hg. Při měření výšky píků pro čáru Hg 253,65 nm začíná být vliv přídavku NaCl významný od 0,5 % Na v roztoku vzorku.

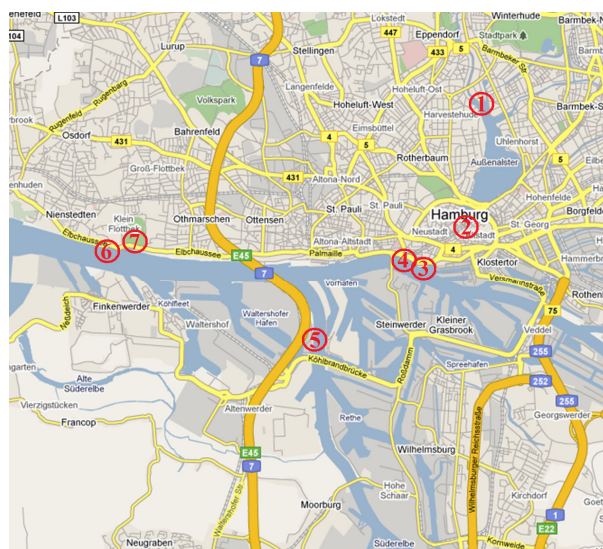
Studie ukazuje, že EcMCVG je více náchylná na interference než CMCVG při stejné použité detekční technice (MSP-OES).

Analytické aplikace

Potenciál EcMCVG-MSP-OES pro stanovení Hg byl zkoumán také při analýze standardních referenčních materiálů.

ICP-OES s pneumatickým zmlžovačem pak bylo použito jako srovnávací metoda pro stanovení Hg v týchž vzorcích. SRM NIST 1640 (stopové prvky v přírodní minerální vodě) byl použit pro tento účel, stejně jako tři vzorky SRM NIST 2781 (domácí kal), které byly nejprve podrobeny mikrovlnnému rozkladu. Poté byly tyto roztoky naředěny na finální koncentraci Hg přibližně 10 ng ml⁻¹. Každý z těchto vzorků byl dále rozdělen na dvě poloviny. V první frakci byla stanovena koncentrace Hg bez přídavků, v druhé frakci s přídavkem Hg. Koncentrace těchto přídavků byla 50 ng ml⁻¹. V metodě ICP-OES byla vyhodnocována plocha píků čáry Hg 184,95 nm.

Obsah Hg v SRM NIST 2781 byl pomocí EcMCVG-MSP-OES zjištěn $2,72 \pm 0,37 \mu\text{g g}^{-1}$, při použití ICP-OES byl nalezen výsledek $2,80 \pm 0,59 \mu\text{g g}^{-1}$. Nejistota koncentrace Hg byla vyjádřena jako směrodatná odchylka. Výsledky obou metod jsou v dobré shodě, ale jsou oba nižší než certifikovaná hodnota $3,64 \pm 0,25 \mu\text{g g}^{-1}$. To může být



Obr. 5. Mapa odběrů reálných vzorků povrchové vody (viz též tabulka III)

způsobeno nízkou účinností mikrovlnného rozkladu⁶ nebo ztrátami během filtrace. Obsah Hg nebyl v SRM NIST 1640 certifikován a také žádná Hg v tomto roztoku nebyla nalezena. Nicméně, po přídavku Hg o výsledné koncentraci 50 ng ml⁻¹ k tomuto roztoku obsahujícímu běžné interferenty při stanovení Hg byla zjištěna výtěžnost 101,2 %.

Pomocí navržené metody byla také stanovena koncentrace Hg v reálných vzorků vod. Bylo provedeno sedm

Tabulka III

Odebrané vzorky povrchové vody provedené 1. 7. 2009 v okolí Hamburgu, Německo a nalezený obsah Hg

Č.	Místo odběru	Popis	Čas	c _{Hg} [ng ml ⁻¹]
1	Krugkoppelbrücke	vtok Alsteru do jezera (zastávka lodní dopravy)	13:40	17,70285
2	Townhall	odtok Alsteru z jezera (zastávka lodní dopravy)	14:40	16,83679
3	Baumwall	přístaviště majákové lodi (Severní Labe)	15:00	10,77686
4	Landungsbrücken	zastávka říční dopravy (Severní Labe)	15:30	12,03798
5	Waltershof	zastávka říční dopravy (Severní Labe)	16:05	8,270991
6	Teufelbrück	zastávka říční dopravy (Severní Labe)	17:20	5,45394
7	Klein Flottbeck	malé jezírko v parku	18:20	3,947146

odberů vzorků podél řek Alster a Labe, jak je znázorněno na obr. 5. Pomocí metody standardního přídatku byly získány velice nízké hodnoty koncentrace Hg. Na základě provedených analýz byl ověřen trend ředění Hg obrovským množstvím vody přitékající v Labi. Dosažené výsledky pro tyto vzorky jsou shrnuty v tab. III.

Závěr

Nově vyvinutá kombinovaná metoda elektrochemického generování studených par Hg spojená s technikou „microstrip“ plasmatu a optickou emisní spektrometrií je citlivou a vhodnou metodou pro stanovení stopových množství Hg ve vodných roztocích. Popsané pokusy prokázaly, že elektrochemické generování studených par Hg může nahradit běžně používané chemické generování používající NaBH₄ nebo SnCl₂. Nižší dosaženou mez detekce lze vysvětlit pomocí lepší stability systému a absence možných kontaminantů z redukčního činidla.

Václav Červený děkuje nadaci Hermann und Else Schnabel Stiftung za poskytnutí výzkumného stipendia na Univerzitě Hamburg, Grantové agentuře Akademie věd České republiky (projekt č.: A400310507/2005) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty č.: MSM0021620857 a RP MŠMT 14/63) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt SVV 261204). Mark Horváth děkuje programu ERASMUS za udělení výzkumného stipendia.

LITERATURA

- Dědina J., Tsalev D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. John Wiley, Chichester 1995.
- Welz B., Sperling M.: *Atomic Absorption Spectrometry*, 3. vyd. WILEY-VCH, Weinheim 1999.
- Matoušek T.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 763 (2007).
- Matoušek T., Sturgeon R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 1014 (2004).
- Speight J. G.: *Lange's Handbook of Chemistry*, 16. vyd., str. 1220. McGraw-Hill 2005.
- Pohl P., Jimenez Z. I., Voges E., Bings N. H., Broekaert J. A. C.: *Microchim. Acta* 161, 175 (2008).
- Šíma J., Rychlovský P., Dědina J., v: *Proceedings of 4th European furnace symposium. Technical University Kosice*, str. 39. Kosice 2000.
- Arbab-Zavar M. H., Rounaghi G. H., Chamsaz M. M.: *Anal. Sci.* 19, 743 (2003).
- Arbab-Zavar M. H., Rounaghi G. H., Chamsaz M., Masrournia M.: *Chem. Anal.* 50, 517 (2005).
- Červený V., Rychlovský P., Netolická J., Šíma J.: *Spectrochim. Acta, B* 62, 317 (2007).
- Lin Y., Wang X., Yuan D., Yang P., Huang B., Zhuang Z.: *J. Anal. At. Spectrom.* 7, 287 (1992).
- Brockmann A., Nonn C., Golloch A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 397 (1993).
- Schaumlöffel D., Neidhart B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354, 866 (1996).
- Hueber D. M., Winefordner J. D.: *Anal. Chim. Acta* 316, 129 (1995).
- Denkhaus E., Golloch A., Guo X. M., Huang B.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 870 (2001).
- Temmerman E., Vandecasteele C., Vermeir G., Leyman R., Dams R.: *Anal. Chim. Acta* 236, 371 (1990).
- McIntosh S.: *At. Spectrosc.* 14, 47 (1993).
- Brandão G. P., Campos R. C., Luna A. S.: *Spectrochim. Acta, B* 60, 625 (2005).
- Krishna M. V. B., Karunasagar D., Rao S. V., Arunachalam J.: *Talanta* 68, 329 (2005).
- Lee S. H., Jung K. H., Lee D. S.: *Talanta* 36, 999 (1989).
- Siemer D. D., Hageman L.: *Anal. Chem.* 52, 105 (1980).
- Hladký Z., Risova J., Fisera M.: *J. Anal. At. Spectrom.* 5, 691 (1990).
- Flores E. M. M., Welz B., Curtius A. J.: *Spectrochim. Acta, B* 56, 1605 (2001).
- Matousek J. P., Iavetz R., Powell K. J., Louie H.: *Spectrochim. Acta, B* 57, 147 (2002).
- Torres D. P., Vieira M. A., Ribeiro A. S., Curtius A. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 20, 289 (2005).
- Yan X. P., Ni Z. M., Guo Q. L.: *Anal. Chim. Acta* 272, 105 (1993).
- Moreno R. G. M., Oliveira E., Pedrotti J. J., Oliveira P. V.: *Spectrochim. Acta, B* 57, 769 (2002).
- Zhang D. Q., Yang L. L., Sun J. M., Sun H. W.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363, 359 (1999).
- Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro J., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 317 (1997).
- Moreda-Piñeiro J., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D.: *Anal. Chim. Acta* 460, 111 (2002).
- Baxter D. C., Frech W.: *Anal. Chim. Acta* 225, 175 (1989).
- Vil'pan Y. A., Grinshtein I. L., Akatov A. A., Gucer S.: *J. Anal. Chem.* 60, 38 (2005).
- Broekaert J. A. C.: *Atomic Spectroscopy*. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. vyd., str. 559. Wiley-VCH 1994.
- Mavrodineanu R., Hughes R. C.: *Spectrochim. Acta, B* 19, 1309 (1963).
- Beenakker C. I. M.: *Spectrochim. Acta, B* 31, 483 (1976).
- Cobine J. D., Wilbur D. A.: *J. Appl. Phys.* 22, 835 (1951).
- Broida H. P., Chapman M. W.: *Anal. Chem.* 30, 2049 (1958).
- Ham N. S., Walsh A.: *Spectrochim. Acta* 12, 88 (1958).
- Matousek J. P., Orr B. J., Selby M.: *Progress in Anal. At. Spectrosc.* 7, 275 (1984).
- Hubert J., Moisan M., Ricard A.: *Spectrochim. Acta, B* 34, 1 (1979).

41. Thomas H. E.: *Handbook of Microwave Techniques and Equipment*, Prentice-Hall, Engle Wood Cliffs, N. J. 1972.
42. Engel U., Bilgic A. M., Haase O., Voges E., Broekaert J. A. C.: *Anal. Chem.* 72, 193 (2000).
43. Bilgic A. M., Engel U., Voges E., Kuckelheim M., Broekaert J. A. C.: *Plasma Sources Sci. Technol.* 9, 1 (2000).
44. Bilgic A. M., Voges E., Engel U., Broekaert J. A. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 579 (2000).
45. Broka K., Ekdunge P.: *J. Appl. Electrochem.* 27, 117 (1997).
46. Hietala S., Skoub E., Sundholma F.: *Polymer* 40, 5567 (1999).
47. Jimenez Z. I., Pohl P., Bings N. H., Broekaert J. A. C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1615 (2007).
48. Schermer S., Bings H. N., Bilgic M. A., Stonies R., Voges E., Broekaert J. A. C.: *Spectrochim. Acta, B* 58, 1585 (2003).
49. Saraswati R., Vetter T. W., Watters R. L.: *Analyst* 120, 95 (1995).
50. Denkhaus E., Beck F., Bueschler P., Gerhard R., Golloch A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370, 735 (2001).

V. Červený^{a,b}, M. Horváth^{a,c}, M. Amberger^a, and J. A. C. Broekaert^a (^a *Institute for Inorganic and Applied Chemistry, University of Hamburg, Hamburg, Germany,* ^b *on leave from Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic,* ^c *on leave from Department of Chemistry and Biochemistry, Szent István University, Gödöllő, Hungary*): **Mercury Determination in Water Samples from the Harbor of Hamburg Using Coupled Technique of Electrochemical Mercury Cold Vapor Generation and Microstrip Microwave Induced Helium Plasma Optical Emission Spectrometry**

A new combination of flow-through electrochemical mercury cold vapor generation with microstrip microwave plasma optical emission spectrometry (EcMCMVG – MSP – OES) has been realized and optimized to attain maximum sensitivity for the Hg-253.65 nm line intensities in the case of aqueous solutions. A laboratory constructed thin-layer flow-through hydrogen remover (inner volume of 2×150 µL) was used in this work. Then a limit of detection of 1.1 ng mL⁻¹ was obtained for Hg with the 40W helium plasma. Further, the results obtained for analyses of SRM NIST 2781 (domestic sludge) were compared with those of ICP-OES. The recovery was tested by spiking of SRM NIST 1640 (trace elements in water) and its value was 101.2 % at the 50 ng mL⁻¹ level. Consequently, water samples from the harbor of Hamburg were also analyzed using proposed method.

COMPLEX METHOD FOR CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ENVIRONMENTAL SAMPLES

**MIROSLAV CIGANEK, JIŘÍ NEČA,
KATEŘINA PĚNČÍKOVÁ, LENKA
VYKOPALOVÁ, and MIROSLAV
MACHALA**

*Department of Toxicology, Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic
ciganek@vri.cz*

Introduction

Complex chemical and toxicological analysis of environmental samples (e.g. air aerosols, waters, sediments, waste slurries) can be used to isolate and identify substances in real complex mixtures that are toxicologically significant to environmental compartments and human. This is achieved using bio-tests for determination of toxicity, and fractionation steps for reducing sample complexity to allow detailed chemical analysis with chromatographic technique connected to mass spectrometer^{1,2}.

Our proposed method incorporated open column fractionation step on activated silikagel and clean-up on silikagel impregnated with 40 % (w/w) of concentrated sulphuric acid to the sample process procedure. Fractionation step allows separation of all extractable compounds to fractions with compounds of four different polarity (non-polar – F0, aromatic and persistent organic pollutants (POPs) – F1, slightly-polar – F2 and polar – F3) and clean-up step provides sub-samples containing only POPs – fraction with persistent organic compounds (e.g. PCDD/Fs, PCBs). These procedures significantly decrease chemical noise of chromatographic analysis, caused by decreasing of amount of co-extracted matrix substances. The DR-CALUX assay was used for toxicological analysis and HPLC/DAD, LC/MS-MS, GC/MS and GC/ECD for chemical analysis of crude extract and their fractions described above.

Experimental procedures

Extraction and fractionation

Solid samples were automated Soxhlet extracted (Soxtec System HT, 1043 Extraction unit, FOSS Tecator, Sweden) with 70 ml of dichloromethane for 3 hours. A silica gel column low-pressure chromatography was used for consequent cleaning and fractionation of this crude extract (CE). Aliquot of the sample in dichloromethane was evaporated just to dryness; the residue was

redissolved in 0.5 ml of hexane and applied to the top of the open silica gel column. Silica gel (Silica gel 60, particle size 0.063–0.2 mm, Merck, Darmstadt, Germany) was activated 1 hour at 200 °C prior to its use. Column with dimensions 250 × 10 mm was dry packed with 10 g of silica gel and washed with 20 ml of hexane prior to application of extract. Sample was eluted with 20 ml of hexane to obtain an aliphatic fraction (non-polar compounds – F0), followed by 20 ml of hexane/dichloromethane (1:1, v/v) (F1 – fraction including aromatic and POPs compounds), 20 ml of dichloromethane (F2 – fraction with slightly-polar compounds) and 30 ml of methanol (F3 – polar compounds). POPs fraction was prepared with aliquot of crude extract eluted through column packed with Silica gel, as mentioned above, impregnated with 40 % (w/w) of concentrated sulphuric acid.

HPLC/DAD, LC/MS-MS, GC/MS and GC/ECD analysis

HPLC/DAD method was used for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with molar mass from 128 to 302 g mol⁻¹. This system consisted of Waters 717plus autosampler, Waters 600E solvent delivery system and Waters 996 photodiode array detector (Waters, Milford, MA, USA). 150 × 3 mm Supelcosil LC-PAH column with particle diameter 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used. A gradient with water, methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran was applied for separation of the analytes: 0–55 min. 40–0 % water, 30 % acetonitrile and 30–70 % methanol; 55–72 min. 30–100 % acetonitrile and 70–0 % methanol; 72–100 min. 100–72 % acetonitrile and 0–28 % tetrahydrofuran. The flow rate of the mobile phase was 0.6 ml min⁻¹, the column temperature was set at 35 °C.

The LC/MS-MS analysis of nitrated, di-nitrated and oxygenated derivatives of PAHs; estrogens and their metabolites were performed on a triple-quadrupole mass spectrometer TripleQuad 6410 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with an electrospray ion source (ESI), Agilent 1200 Binary Pump System with an autosampler and MassHunter software system. The ionization of analytes was operated in the positive ion mode. The analyte classes were separated in a reverse-phase mode using HPLC column Supelcosil LC-PAH (150 mm x 3 mm, 5 µm – Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Twelve classes of contaminants (linear and branched alkanes, PAHs (128-278 MW), alkylated derivatives of PAHs, oxygenated PAHs, nitro-derivatives of PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons with one heterocyclic atom in the cycles (N – PANHs and S – PASHs), esters of phthalic acid (PAEs), steranes, terpanes, sterols and musk

compounds) were determined by GC/MS. GC separation was done in the fused silica capillary column (SLB-5ms: 30 m × 0.20 mm × 0.20 μm – Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) with helium as carrier gas. An ion trap mass spectrometer Saturn 2100T (Varian, Walnut Creek, CA, USA), which operated in electron ionization and selected ion storage modes at an electron ionization energy of 70 eV, was used for the identification and quantification of the analytes under study.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organic chlorinated pesticides (OCPs), which were separated in the two capillary columns (one with slightly polar phase – 007-5 ms and second with polar phase – 007-1701, both 60 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm phase film thickness – QUADREX, Woodbridge, CT, USA) and two electron capture detectors (ECD), were used to identification and quantification of analytes.

DR-CALUX® assay

The AhR-mediated activity was determined using the rat hepatoma H4IIEGud.Luc1.1 cell line, stably transfected with a luciferase reporter gene under control of dioxin responsive elements as described previously³. For the DR-CALUX assay, cells were plated in 96-well plates for 24 h. Cells were treated for 24 h with tested or reference (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD) compounds dissolved in fresh medium. The maximum DMSO concentrations did not exceed 0.5 %. After exposure, the medium was removed, cells were washed and lysed with a lysis buffer. The plates were frozen at –80 °C. The luciferase activity was then measured on the Luminoscan luminometer (Labsystems, Turku, Finland), using the Luciferase Assay Kit (BioThema, Handen, Sweden). Induction equivalency factors of dioxin-like PAHs and their alkylated derivatives (total 75 tested compounds) were published previously^{4–8}.

Results and discussion

Diesel exhaust particles (DEP) in form of SRM 1650b (NIST, USA) was used as an example here described methodology for chemical and toxicological characterization of environmental samples. Analyte concentrations were in good agreement with certificated values of SRM 1650b. Sum of 16 US EPA PAHs was 203.3 μg g⁻¹ and sum of other PAHs (29 compounds) was 51 μg g⁻¹. Phenanthrene (63.3 μg g⁻¹), fluoranthene (48.9 μg g⁻¹) and Pyrene (45.4 μg g⁻¹) were the more abundant parent PAHs. 3-Methylphenanthrene (48.9 μg g⁻¹) was compound with higher concentration among alkylated derivatives of PAHs (55 substances with total concentration 347 μg g⁻¹). The most abundant nitrated derivative of PAHs was 1-Nitropyrene (13.0 μg g⁻¹). The results of the overall chemical characterization of the sample are summarised in Table I.

Table I
Chemical characterizations of diesel exhaust particles (SRM 1650b)

Compounds Names	1650b [μg/g]
Sum of 16 US EPA PAHs	203
Sum of other PAHs	51
Sum of Alkylated PAHs	347
Sum of Oxygenated PAHs	327
Sum of PASHs	0.81
Sum of Nitrated PAHs	13.4
Sum of Dinitrated PAHs	0.12
Sum of PAEs	2048
Sum of n-Alkanes	187
Sum of Branched-Alkanes	1050
Sum of Terpanes	229
Sum of Steranes	103
Sum of all compounds	4559

The results of ability of SRM 1650b to activate AhR using rat hepatoma H4IIE cells stably transfected with luciferase reporter gene under control of dioxin responsive elements for determination of AhR activation (DR-CALUX® assay) are summarized in Fig. 1. Crude extract (CE), F1, F2 and F3 induced high levels of luciferase activity (387 ± 7, 90 ± 21, 39 ± 6, 102 ± 11 ng IEQ/g dw, respectively), but POPs showed very low activities (7 ± 2 ng IEQ/g dw). Because fraction F1 contained POPs and PAHs, it means that AhR-mediated activity of F1 was caused by PAHs. Taken together, polar compounds and PAHs induced the majority of AhR-mediated activity of SRM 1650b.

Activity of dioxin-like PAHs, eluted in the first fraction, can be calculated from their induction equivalent factors and corresponding concentrations, IEQ = IEF × conc. of PAHs (induction equivalent quotient). IEQ calculated from chemical data (29.9 ng TCDD/g dw) was one third of value calculated from DR-CALUX assay. Lower value of IEQ calculated from chemical data can be done synergetic actions between POPs and PAHs in this tested

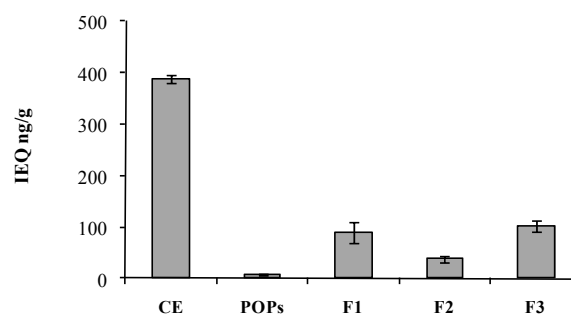


Fig. 1. Dioxin like toxicity of SRM 1650b expressed as their AhR activity

fraction, which was revealed by DR-CALUX test, or rather existency of other substances, which were not yet tested on dioxin-like activity (or AhR activity).

We developed a complex method for chemical and toxicological characterization of environmental samples. This method was used for characterization of air aerosols, air particulate matter, diesel exhaust particles, river sediments and samples from the waste water treatment plant. This method design can be used not only for environmental samples.

This work was supported in part by the grants from Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE 0002716202) and Grant Agency of the Czech Republic (525/08/1590).

REFERENCES

1. Brack W., Klamer H.J.C, López de Alda M., Barceló D.: *Env. Sci. Pollut. Res.* 14, 30 (2007).
2. Schymanski E.L., Bataineh M., Goss K.-U., Brack W.: *Trends in Anal. Chem.* 28, 550 (2009).
3. Machala M., Ciganek M., Blaha L., Minksova K., Vondrack J.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2736 (2001).
4. Machala M., Vondráček J, Bláha L., Ciganek M., Neča J.: *Mutat. Res.* 497, 49 (2001).
5. L. Šviháľková-Šindlerová L., Machala M., Pěňčíková K., Marvanová S., Neča J., Topinka J., Sevastyanova O., Kozubík A., Vondráček J.: *Toxicology* 232, 147 (2007).
6. Vondráček J., Šviháľková-Šindlerová L., Pěňčíková K., Marvanová S., Krčmář P., Ciganek M., Neča J., Troško J.E., Upham B., Kozubík A., Machala M.: *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2308 (2007).
7. Marvanová S., Vondráček J., Pěňčíková K., Trilecová L., Krčmář P., Topinka J., Nováková Z., Milcová A., Machala M.: *Chem. Res. Toxicol.* 21, 503 (2008).
8. Machala M., Čviháľková-Šindlerová L., Pěňčíková K., Krčmář P., Topinka J., Milcová A., Nováková Z., Kozubík a., Vondráček J.: *Toxicology* 247, 93 (2008).

VOLTAMETRIC DETERMINATION OF NITROPHENOLS USING CLAY-MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODES

**HANA DEJMKOVÁ^a,
ZUZANA HRANICKÁ^a, ZUZANA
NAVRÁTILOVÁ^b, and JIŘÍ BAREK^a**

^a Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, ^b University of Ostrava, Faculty of Science, Department of Chemistry, 30.dubna 22, 701 03 Ostrava, Czech Republic
dejmkova@natur.cuni.cz

Introduction

Many nitro derivatives of aromatic hydrocarbons belong to the group of environmental pollutants, proved or suspected carcinogens and/or mutagens¹. The test compounds, 2-nitrophenol (2-NP) and 4-nitrophenol (4-NP), are named in the List of Priority Pollutants of the U.S.A. Environmental Protection Agency (EPA)². They spread to the environment from anthropogenic sources, mainly from chemical industry and agriculture, but also from combustion process, and contaminate particularly water and air. Their high impact is caused by their toxicity and persistence^{3,4}. Therefore, there is an ever increasing demand for very sensitive methods for their determination. One of the possible ways how to increase the sensitivity is the pre-concentration of the analyte prior the proper determination. An interesting possibility is offered by the adsorptive properties of clay minerals.

Clay minerals used as modifiers are usually phyllosilicates, structures that belong to the class of layered hydrous aluminosilicates. In general, they consist of planar sheets of tetrahedral silicates and octahedral aluminates. The sheets alternate regularly or two silicate sheets surround one aluminate, forming a layer. In between the layers, ions are often accumulated to compensate the charge of the layers. Due to their presence, clays might act as an ionic exchanger and it can intercalate water or other molecules^{5,6}.

In this work, we tested two clays of different properties. Montmorillonite is one of the extensively used modifiers. It represents the group of smectites, expansible clays with sandwich-layer structure. Its popularity is caused by its advantageous properties, such as high chemical and mechanical stability, high cationic exchange capacity, and high conductance^{5,7}. Sepiolite, another commonly used clay, might be named as a representative of fibrous clays. In this case, chain-like structure of the layers is the reason for high porosity and surface area, which account for its adsorptive properties⁷.

There are several ways of modification of the electrode. Stratal composition of the clays and the interlayer binding enables the surface modification of solid electrodes by a process based on a clay suspension application and drying. Spin coating might also be employed. Such a treatment results in a coordinated layer, with character depending on the conditions of the process⁸. Another possibility, which was used in our work, is to admix the clay as a modifier in the carbon paste electrode. This approach brings the advantage in the simple renewal of the electrode surface. Careful preparation of the electrode is necessary, including wetting in an atmosphere saturated with water vapor at room temperature and thorough mixing⁹.

Using clay-modified electrodes, inorganic ions are the most frequent analytes. However, the electrochemical behavior of organic compounds on clay modified electrodes has been reported, including phenol derivatives^{10–12}. The modification improved the electrode response and enhanced the signal to noise ratio. Application of the modified electrodes for the nitrophenol determination in flow analysis is also described^{13,14}.

This study deals with possible advantages and application of montmorillonite-modified and sepiolite-modified carbon paste electrodes for the voltammetric determination of 2-NP and 4-NP with and without accumulation of the analytes.

Experimental

Apparatus

Differential pulse voltammetry (DPV) and adsorptive stripping voltammetry (AdSV) measurements were carried out using Eco-Tribo-Polarograph, controlled by software Polar Pro 5.1 (both PolaroSensors, Prague, Czech Republic). Three-electrode arrangement was used with platinum auxiliary electrode and Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode RAE 113 (Monokrystal Turnov, Czech Republic), to which all the potential values are referred.

Working carbon paste electrode (CPE) was prepared by mixing 250 mg of glassy carbon microparticles (Alfa Aesar, Germany) and 100 μ L of mineral oil (Fluka). For obtaining montmorillonite-modified paste electrode (MMT-CPE) and sepiolite-modified paste electrode (SEP-CPE), 10% (w/w) of montmorillonite (Na-montmorillonite, SWy-2, The Clay Mineral Society, USA) or sepiolite (Sepiolite, ~13% Mg, Aldrich) were admixed to the paste. The paste mixtures were packed in piston-driven holders with inner diameter of 2 mm (ref.¹⁵).

Reagents

The stock solutions ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) of 2-nitrophenol (2-NP, Aldrich) and 4-nitrophenol (4-NP, Aldrich) were prepared by dissolving the exact amount of each substance in deionized water (Millipore). They were kept at a laboratory temperature. Britton-Robinson (B-R) buffers served as supporting electrolyte for DPV. All chemicals used for buffer preparation were of analytical grade purity and obtained from Lachema Brno, Czech Republic. Deionized water (Millipore) was used throughout.

Procedures

Measured solutions were prepared by exact dilution of stock solutions by B-R buffers. Differential pulse voltammograms were measured using the following parameters: scan rate 20 mV s^{-1} , pulse amplitude 50 mV and pulse duration 100 ms . Adsorptive stripping voltammetry was based on an open-circuit accumulation step and DPV scan. Solution of the analyte was stirred during the accumulation. Electrode surface was renewed for each DPV measurement by wiping with filtration paper.

Calibration dependences were evaluated by least squares linear regression method. The detection limits were calculated as the concentration of an analyte which gave a signal three times the standard deviation of the lowest evaluable concentration.

Results and discussion

The structure of nitrophenols enables to use both oxidation and reduction for their electrochemical determination. Nevertheless, operating in anodic region is preferable when working with carbon paste electrodes, because it eliminates the necessity to remove the oxygen from the measuring system including the electrode material itself¹⁶.

Table I

Parameters of concentration dependences for DPV and AdSV determination of 2-NP and 4-NP using unmodified CPE, MMT-CPE and SEP-CPE

Analyte, method	Electrode	Concentration range [mol L^{-1}]	Slope [mA L mol^{-1}]	Intercept [nA]	Correlation coefficient	Limit of detection [mol L^{-1}]
2-NP, DPV	CPE	$6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	146	-56	0.9989	$5 \cdot 10^{-6}$
	MMT-CPE	$6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	179	-23	0.9967	$2.5 \cdot 10^{-6}$
	SEP-CPE	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	179	-85	0.9996	$5.5 \cdot 10^{-6}$
2-NP, AdSV	CPE	$2 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$	387	-99	0.9981	$2 \cdot 10^{-6}$
	MMT-CPE	$1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$	627	+54	0.9997	$7.1 \cdot 10^{-7}$
	SEP-CPE	$1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$	562	-94	0.9989	$1 \cdot 10^{-6}$
4-NP, DPV	CPE	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	137	-92	0.9983	$8.2 \cdot 10^{-6}$
	MMT-CPE	$4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	224	-36	0.9970	$2 \cdot 10^{-6}$
	SEP-CPE	$8 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	214	-118	0.9977	$5.8 \cdot 10^{-6}$

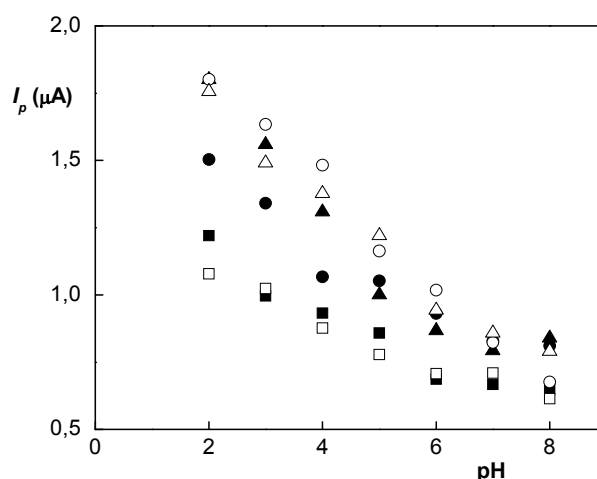


Fig. 1. Dependence of peak current on pH of the supporting electrolyte; ■ 2-NP, unmodified electrode; ▲ 2-NP, MMT-CPE; ● 2-NP, SEP-CPE; □ 4-NP, unmodified electrode; △ 4-NP, MMT-CPE; ○ 4-NP, SEP-CPE. DPV, supporting electrolyte B-R buffer, analyte concentration $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, scan rate 20 mV s^{-1} , pulse amplitude 50 mV and pulse duration 100 ms

For that reason, the measurements were performed using anodic mode only.

As a first step, differential pulse voltammograms in dependence on pH were measured to optimize the conditions of analysis and to compare the behaviour of the 2-nitrophenol and 4-nitrophenol at the used electrode. The test analytes give one oxidative peak within pH range from 2 to 8. In more alkaline media, the baseline noise increases and the peak height decreases rapidly, making the evaluation impossible. The peak potential follows the equation $E_p(\text{mV}) = -0,058 \text{ pH} + 1240$ and $E_p(\text{mV}) = -0,066 \text{ pH} + 1275$ for 2-NP and 4-NP, respectively, regardless of the electrode used.

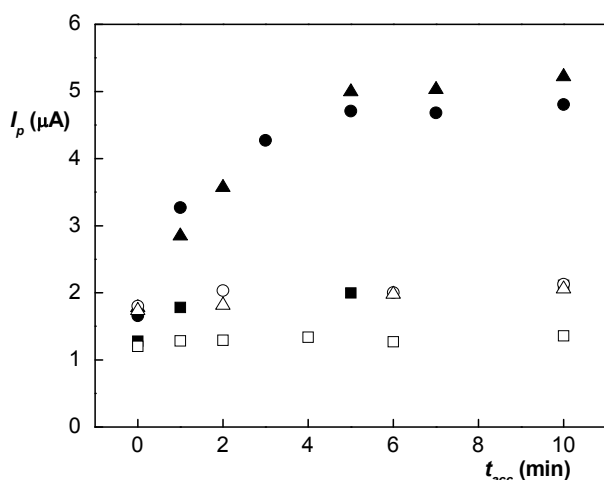


Fig. 2. Dependence of the peak current of 2-NP and 4-NP on the accumulation time; ■ 2-NP, unmodified electrode; ▲ 2-NP, MMT-CPE; ● 2-NP, SEP-CPE; □ 4-NP, unmodified electrode; △ 4-NP, MMT-CPE; ○ 4-NP, SEP-CPE. AdSV, supporting electrolyte B-R buffer pH 2, scan rate 20 mV s^{-1} , pulse amplitude 50 mV and pulse duration 100 ms

The optimum pH value for the determination is 2, where the peaks are highest and best developed. The peak height increase is apparent in the case of both modified electrodes. Particularly in the case of 4-NP, the peak height increased for over 50 % in comparison with unmodified electrode (Fig. 1). In this case, the growth cannot be ascribed to the accumulation of the analyte on the working electrode, because electrode was not in contact with the analyte for sufficient time period. We can assume

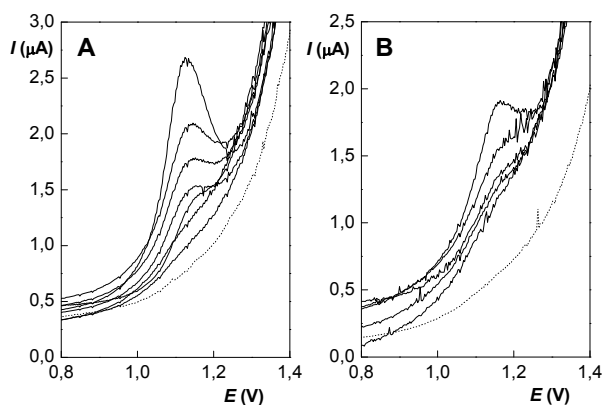


Fig. 3. Voltammograms of the lowest detectable concentrations of 2-NP (A) (AdSV, MMT-CPE, concentration $1; 2; 4; 6; 8; 10$ and $20 \mu\text{mol L}^{-1}$) and 4-NP (B) (DPV, MMT-CPE, concentration $4; 6; 8; 10$ and $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), dotted line corresponding to blank. Supporting electrolyte B-R buffer pH 2, scan rate 20 mV s^{-1} , pulse amplitude 50 mV , pulse duration 100 ms

that the response rise is caused by the improved interaction of the analyte with the electrode.

Further measurements investigated the possibility of the nitrophenols preconcentration during the open-circuit accumulation step. The most important parameter of this method is the time of accumulation. It was found, that the saturation of the electrode surface occurs after five minutes (Fig. 2). Therefore, this value was selected for the following measurements. However, 2-NP and 4-NP exhibit very diverse behavior with respect to the adsorption on the electrode. While the peak height of 2-NP multiplied, the peak height of 4-NP remained almost constant during accumulation. This difference suggests the possibility of selective determination of both analytes.

In order to find the limits of detection and compare the electrodes from the sensitivity point of view, calibration dependences were measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ to the detection limit (Tab. I). All the DPV dependences are linear within the whole studied range, AdSV dependences are linear up to the concentration of $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. The obtained values of the detection limit mirror the enhanced peak heights of the clay-modified electrodes; the highest values are reached on unmodified electrode, while modification or accumulation reduce them and the best results are obtained on the modified electrode after accumulation. The electrode modified with montmorillonite shows more favorable results than that modified with sepiolite. Voltammograms obtained by the most sensitive methods for both analytes are shown in Fig. 3.

Conclusion

The voltammetric behavior of 2-nitrophenol and 4-nitrophenol using clay-modified carbon paste electrodes was explored, with montmorillonite and sepiolite as modifiers. The response of the electrode to both analytes is increased after the modification when employing differential pulse voltammetry. Accumulation of the analyte occurred only for 2-NP, offering further increase of the sensitivity. The lowest detection limit was obtained for 2-NP using AdSV on MMT-CPE with LOD $7.1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, while for 4-NP the detection limit was $2.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ using DPV on MMT-CPE.

Financial support of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (projects No. MSM 0021620857, RPI4/63 and LC06035) and of Grant Agency of Charles University (project SVV 261204) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007).
2. Fed. Reg., EPA Method 604, Phenols, Part VIII, 40

- CFR Part 136, Environmental Protection Agency.
- Agency of toxic substances and disease registry (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp50.html>). Accessed 3.3.2010.
 - Wollin K.-M., Dieter H. H.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 49, 18 (2005).
 - Macha S. M., Fitch A.: Mikrochim. Acta 128, 1 (1998).
 - Mousty C.: App. Clay Sci. 27, 159 (2004).
 - Sanchez-Martin M. J., Dorado M. C., del Hoyo C., Rodriguez-Cruz M. S.: J. Hazard. Mater. 150, 115 (2008).
 - Bard A., Mallouk T., in: *Techniques of Chemistry: Molecular Design of Electrode Surfaces*, (R. W. Murray, ed.) Chap. VI, p. 271. John Wiley, New York 1992.
 - Navrátilová Z., Kula P.: Electroanalysis 15, 837 (2003).
 - El Mhammedi M. A., Achak M., Bakasse M., Chtaini A.: J. Hazard. Mater. 163, 323 (2009).
 - Gomez Y., Fernandez L., Borrás C., Mostany J., Scharifker B.: Electroanalysis 21, 1354 (2009).
 - Hu S., Xu C., Wang G., Cui D.: Talanta 54, 115 (2001).
 - Rodriguez I. N., Leyva J. A. M., de Cisneros J. L. H. H.: Anal. Chim., A 344, 167 (1997).
 - Rodriguez I. N., Zamora M. B., Salvador J. M. B., Leyva J. A. M., Hernandez Artiga M. P., de Cisneros J. L. H. H.: Mikrochim. Acta 126, 87 (1997).
 - Švancara I., Metelka R., Vytřas K.: *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 1, (K. Vytřas, K. Kalcher, ed.) p. 7, University of Pardubice, Pardubice 2005.
 - Švancara I., Vytřas K.: Anal.Chim.Acta 273, 195 (1993).

USING OF IMPRINTED POLYMERS IN ANALYTICAL CHEMISTRY

NATÁLIA DENDERZ^a, JAROSLAV ŠKUBÁK^a, JOZEF ČIŽMÁRIK^b, and JOZEF LEHOTAY^{a*}

^a Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, ^b Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovak Republic
jozef.lehotay@stuba.sk

Introduction

In present the commonly used methods for sample pretreatment are liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). Recently, the attention is paid to molecularly imprinted polymers (MIPs) due to their outstanding advantages, such as predetermined recognition ability, stability, simplicity of preparation, low cost and potential application to a wide range of target molecules¹. MIPs have been developed in many fields, such as chromatography, catalyst, drug delivery, artificial antibody, and sensing devices². MIP particles were used as the stationary phase of liquid chromatography systems, and the main goal was to improve the separation efficiency, for the enantiomers especially³.

MIPs are synthetic polymers with highly specific recognition ability for target molecules. In the most common preparation process, monomers form a complex with a template through covalent or non-covalent interactions then they are joined by using a cross-linking agent⁴. By the use of the molecular imprinting technique, highly enantioselective and substrate-selective polymers were prepared by utilizing non-covalent interactions between the template molecule and methacrylic acid monomers at lower temperature. Previous results showed that imprinted polymers could distinguish between enantiomers of the imprinting molecule and even discriminate within a wide range of enantiomers of structurally related molecules that have not been imprinted, but they have the same interaction sites with functional monomers⁵.

The most widely used technique for preparing MIPs is non-covalent imprinting. In this process, the complex of template and functional monomer is formed *in situ* by non-covalent interactions, such as hydrogen bonding, electrostatic forces, van der Waals forces, or hydrophobic interactions. Moreover, the rebinding of template molecules with MIPs is also carried out by the same non-covalent interactions. There are several advantages of this technique including easy preparation of the template/monomer com-

plex, easy removal of the templates from the polymers, fast binding of templates to MIPs, and its potential application to a wide palette of target molecules. However, to maximize the formation of the labile complex of template and monomer, the conditions of polymerization must be carefully chosen to minimize non-specific binding sites.

Another technique for preparing MIPs is covalent imprinting. The complex is formed by covalent-linkage of a functional monomer and template prior to polymerization. After the removal of the template by chemical reaction, the MIPs contain rebind template molecules via the same covalent interactions. The main advantages of this technique are that the monomer/template complexes are stable and stoichiometric, and that a wide variety of polymerization conditions can be employed. Unfortunately, the troublesome and less economical synthesis of monomer/template complexes, and the slow release and binding of templates limit its application.

The third technique is the hybridization of covalent and non-covalent imprinting, also called semi-covalent imprinting. In this process, the polymers are prepared like in the same way as in the case of covalent imprinting, but the guest binding employs non-covalent interactions. Thus, semi-covalent imprinting combines the main advantages of the above two techniques⁶.

Polymer synthesis

The corresponding functional monomer (acrylamid 1.8 mmol), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, 9 mmol) as a cross linker, methanol, NIP-1, or acetonitrile, NIP-2, as a porogen (3 ml) and azobis(isobutyronitrile) (AIBN, 20 mg) as an initiator were mixed together and the polymerization of MIPs and NIPs was allowed to proceed in a water bath at 60 °C for 24 h. In the next, prepared polymer was passed through a 0.08 mesh sieve, the smallest particles were remove by flotation in acetone, filtered and washed with acetone and dried under vacuum (60 °C, 1 h). The Soxhlet extraction (24 h, 100 ml MeOH) was used in order to purify MIPs from the template, and then methanol solvent was removed by rotary evaporator at 60 °C for 1h again. Because the keeping of the same conditions of polymerization, the identical steps in the preparation of control polymers (NIPs) were used⁷.

Two other MIPs were prepared in the same way, but only difference was that into basic mixture were added 2-methoxy-1-(pyrrolidin-1-ylmethyl)ethyl-(2-butoxyphenyl)-carbamate and 3-pyrrolidin-1-ylpropyl-(2-pethoxyphenyl)-carbamate as templates (0.3 mmol) for MIP-1 and MIP-2, respectively.

Evaluation of polymers

Selectivity of prepared polymers was tested. Two columns of MIPs and NIPs were filled. Capacities of suitable templates were measured: in methanol, acetonitrile, methanol/water (50/50, v/v), acetonitrile/water (50/50, v/v) and water on HPLC system. Tested anesthetics were: 1-propoxy-3-(pyrrolidin-1-yl)propan-2-yl-(2-butoxyphenyl)-carbamate (2-BPC), 1-ethoxy-3-(piperidin-1-yl)propan-2-yl-(3-hexyloxyphenyl)-carbamate (3-HPC), 1-ethoxy-3-(piperidin-1-yl)propan-2-yl-(3-butoxyphenyl)-carbamate (3-BPC), 2-methoxy-1-(pyrrolidin-1-ylmethyl)ethyl-(2-butoxyphenyl)-carbamate (2-BPC') and 3-(pyrrolidin-1-yl)propyl-(2-pentoxypheyl)-carbamate (2PPC). The flow rate of 0.1 ml/min was used and the diode-array detector (DAD) worked in range 190–400 nm. The chromatograms were acquired at wavelength of 254 and 280 nm.

Results

It was estimated that the kind of porogen influenced the imprinted polymer capacity. Two porogens were studied – methanol and acetonitrile. This indicates the shape of template molecules depending on solvents – association complexes could be formed. The selectivity of imprinted polymers under study depends on the molecular structure of template and also the selectivity for similar compounds was investigated.

The highest values of binding capacities of NIP-1 were for 3-HPC (1.49 µg/100 mg in water as a solvent), for 2-BPC (1.69 µg/100 mg in ACN/H₂O, 50/50 (v/v) as a solvent) and of MIP-2 for 2-PPC, template, (3.50 µg/100 mg in MeOH/H₂O, 50/50% (v/v) as a solvent). In the case of NIP-1 the higher capacity obtained for 2-BPC and 2-PPC in comparison with MIP-1 indicates that the steric hindrances have not significant role in sorption process.

This work was supported by the VEGA grants No. 1/0058/08 and No. 1/4291/07 and the APVV project No. 20/035205.

REFERENCES

1. Valtchev M., Palm B. S., Schiller M., Steinfeld U.: *J. Hazard. Mater.* 170, 722 (2009).
2. Chen P. Y., Nien P. C., Wu C. T., Wu T. H., Lin C. W., Ho K. C.: *Anal. Chim. Acta* 643, 38 (2009).
3. Silva M. S., Vão E. R., Temtem M., Mafra L., Caldeira J., Aguiar-Ricardo A., Casimiro T.: *Biosens. Bioelectron.* 643, 1742 (2010).
4. Lu Y., Li C., Liu X., Huang W. J.: *Chromatogr., A* 950, 89 (2002).
5. Gadzała-Kopciuch R., Ričanyová J., Buszewski B.: *J. Chromatogr., B* 877, 1177 (2009).
6. He C., Long Y., Pan J., Li K., Liu F.: *J. Biochem. Bioph. Methods* 2, 133 (2007).
7. Lachová M., Lehotay J., Skačáni I., Čižmárik J.: *J. Liquid. Chromatog. Rel. Techn.* 32, 167 (2009).

VLIV POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK NA VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROBENZIMIDAZOLU

DANA DEÝLOVÁ a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Česká republika

barek@natur.cuni.cz

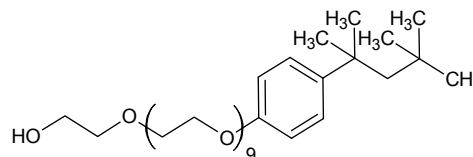
Úvod

5-Nitrobenzimidazol (5-NBIA) je genotoxická látka patřící mezi nitrované heterocyklické sloučeniny a vznikající mimo jiné při spalování fosilních paliv¹. 5-NBIA byl v minulosti užíván a polarograficky stanovován jako součást roztoku ustalovače pro barevné fotografie². 5-NBIA je prokázáný karcinogen a mutagen³.

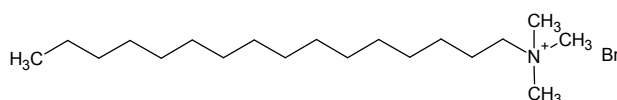
Cílem této práce bylo ověřit, jak ovlivňují povrchově aktivní látky elektroanalytickou odezvu 5-NBIA na pevně leštěné stříbrné amalgamové elektrodě (p-AgSAE) a merniskem modifikované pevně leštěné stříbrné amalgamové elektrodě (m-AgSAE). Tyto elektrody jsou na rozdíl od rtuťové kapkové elektrody, užívané při dřívějších polarografických stanoveních, prakticky netoxické a odpovídají konceptu tzv. zelené analytické chemie.

Povrchově aktivní látky jsou bipolární chemické struktury, které se dělí z hlediska iontového charakteru hydrofilní skupiny na ionogenní a neionogenní. Dle iontového charakteru molekul, který se projeví až po rozpuštění látek ve vodě, se ionogenní povrchově aktivní látky dále dělí na anionaktivní, kationaktivní a amfolitické. Anionaktivní mají ve vodném prostředí záporný náboj, kationaktivní kladný náboj a u amfolitických náboj závisí na pH příslušného vodného prostředí. Neionogenní povrchově aktivní látky nemají v molekule náboj a jejich rozpustnost ve vodě je dána přítomností hydrofilních skupin.

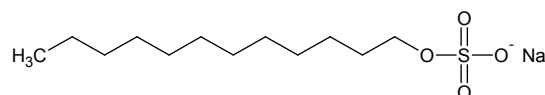
Dobrá rozpustnost, vysoká konduktivita, stálost, nízká toxicita a dobrá elektroanalytická stabilita činí tyto látky výhodnou variantou pro mnoho aplikací. V analytické chemii přítomnost povrchově aktivních látek ovlivňuje měřené parametry, což mnohdy vede k vypracování nových postupů a metod stanovení. Tradiční aplikací povrchově aktivních látek v elektrochemii je potlačování maxim na polarografických křivkách⁴. Solubilizačních schopností micelárních prostředí se s výhodou využívá také při polarografických studiích ve vodě nerozpustných organických sloučenin. Povrchově aktivní látky mohou také měnit tvar polarografické vlny a reverzibilitu elektrodové reakce či ovlivňovat hodnoty půlvlnových potenciálů, limitních difúzních proudů, difúzních koeficientů nebo koeficientů přenosu náboje. Druh a velikost změn závisí na struktuře a koncentraci použité povrchově aktivní látky. Při vhodné volbě může docházet ke zvýšení limitního difúzního prou-



Obr. 1. Strukturální vzorec tritonu X-100



Obr. 2. Strukturální vzorec cetyl trimethyl amonium bromidu



Obr. 3. Strukturální vzorec sodium dodecyl sulfátu

du, v některých případech však i k jeho poklesu.

Pro tuto práci byly zvoleny tři povrchově aktivní látky, kationaktivní cetyl trimethyl amonium bromid (CTMAB) (obr. 1), neionogenní triton X-100 (obr. 2) a anionaktivní sodium dodecyl sulfát (SDS) (obr. 3).

Tyto povrchově aktivní látky by posléze mohly být použity jako modifikátory pro různé pastové elektrody⁵ a elektroanalytické senzory⁶.

Experimentální část

Reagencie

Studovaná látka: zásobní roztok 5-nitrobenzimidazolu (čistota 98%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR, CAS Name: 5-NBIA, CAS Register number: 94-52-0) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,0226 g látky ve 100 ml deionizované vody za pomoci ultrazvuku. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku. Standardní roztok byl uchovávan ve tmě v lednici.

Další použité chemikálie: Triton X-100 (čistota p.a., Lach-Ner, ČR), cetyltrimethylamonium bromid (čistota p.a., >97%, Merk-Schuchardt, München, D), sodium dodecyl sulfát (čistota p.a., Lach-Ner, ČR), kyselina boritá (čistota p.a., Lachema, Brno), kyselina orthofosforečná

(čistota p.a., 85%, Lach-Ner, ČR), octová kyselina (čistota p.a., 99,8%, Lach-Ner, ČR), hydroxid sodný (čistota p.a., Lach-Ner, ČR), deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA) Brittonův-Robinsonův pufr (ďalej BR-pufr) o pH 2–12 byl připraven obvyklým způsobem, tj. smísením kyselých složek obsahujících kyselinu boritou, octovou a fosforečnou o koncentracii $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ a zásadité složky obsahující $0,2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$.

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí Eco-Tribo Polarografu PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha) se softwarem Polar Pro verze 2. Bylo pracováno v tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referentní použita argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$, Monokrystaly, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda platinový plíšek (Monokrystaly, Turnov, ČR). Jako pracovní elektrody byly použity pevná leštěná stříbrná amalgamová elektroda (p-AgSAE) a meniskem modifikovaná pevná leštěná stříbrná amalgamová elektroda (m-AgSAE). Dále byl použit digitální pH-metr Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou a ultrazvuková lázeň PSO 200A Ultrasonic Compact Cleaner.

Pracovní postup

Byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) s následujícími parametry: polarizační rychlost 20 mV/s , pulzy o šířce 100 ms , modulační amplituda -50 mV . Na začátku měření byla elektroda nejprve vyleštěna na alumině o velikosti částic $1,1 \mu\text{m}$. Tak vznikla p-AgSAE, která se dala dále modifikovat ponořením na 15 s do rtuti, aby se

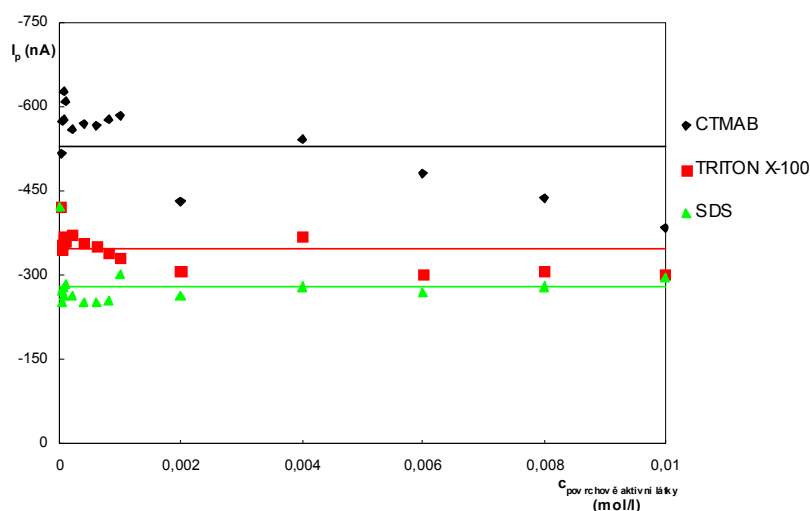
vytvořil meniskus (m-AgSAE). Před měřením byly elektrody elektrochemicky aktivovány v míchaném roztoku $0,2 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ při potenciálu -2200 mV po dobu 300 s . Před každým měřením byl povrch elektrody regenerován a to přepínáním potenciálu vždy po $0,1 \text{ s}$ mezi 0 mV a -1200 mV pro p-AgSAE a -100 mV a -900 mV pro m-AgSAE po dobu 30 s . Regenerace vždy končila při negativnějším potenciálu. Po ukončení měření byla pracovní elektroda uchovávaná v deionizované vodě.

Kyslík byl z roztoku odstraňován pětiminutovým probubláním dusíku. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Výška píku při DPV byla vyhodnocována jako spojnice minim před a za píkem. Mez detekce (LOQ) byla počítána pomocí trojnásobku směrodatné odchylky stanovení odpovídající nejnižšímu bodu proměřené koncentrační závislosti.

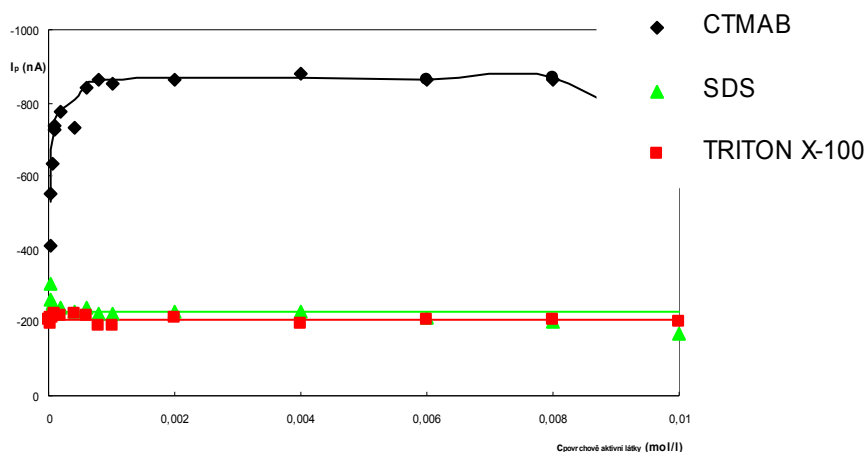
Výsledky a diskuse

Nejprve byl sledován vliv pH na chování 5-NBIA v prostředí BR-pufu. Pro obě elektrody bylo zvoleno jako optimální pro další měření pH 8, při němž je na DPV voltogramu pozorovatelný jen jeden nejvyšší, dobře vyvinutý pík 5-NBIA.

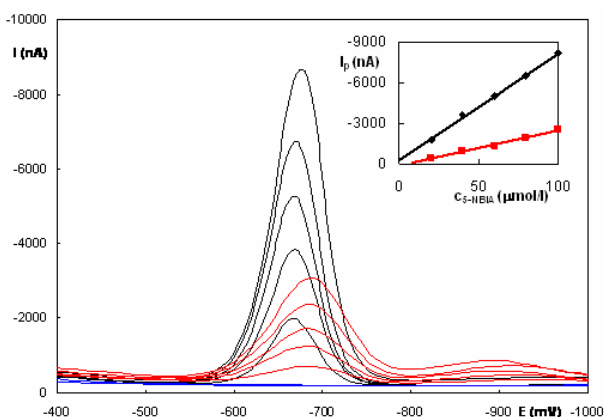
Dále bylo třeba zjistit, jestli má na výšku píku 5-NBIA vliv přidávek povrchově aktivních látek (obr. 4 a 5). U obou elektrod můžeme pozorovat pokles signálu při přidávku SDS a Tritonu X-100. Tento pokles není výrazný a s měnící se koncentrací povrchově aktivní látky se příliš nemění. Odlišně se chová CTMAB. Na m-AgSAE můžeme pozorovat vzrůst signálu 5-NBIA při nejnižších koncentracích a pak jeho následného pokles při vyšších kon-



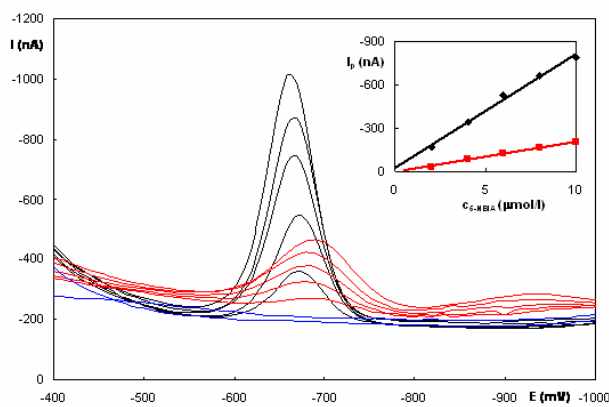
Obr. 4. Závislost výšky DPV píku 5-NBIA ($c=1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) na m-AgSAE v BR-pufu o pH 8 na koncentracii povrchově aktivní látky



Obr. 5. Závislost výšky DPV píku 5-NBIA ($c=1\cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}) na p-AgSAE v BR-pufre o pH 8 na koncentraci povrchové aktivní látky



Obr. 6. Kalibrační křivky 5-NBIA ($(2-10)\cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}) v přítomnosti CTMAB ($1\cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) (černě) a v nepřítomnosti CTMAB (červeně) na p-AgSAE v prostředí BR-pufre o pH 8; modře je křivka základního elektrolytu



Obr. 7. Kalibrační křivky 5-NBIA ($(2-10)\cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}) v přítomnosti CTMAB ($1\cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) (černě) a nepřítomnosti CTMAB (červeně) na p-AgSAE v prostředí BR-pufre o pH 8; modře je křivka základního elektrolytu

centracích.. Na m-AgSAE tento vzrůst není příliš výrazný a nelze ho prakticky využít. Při měření na p-AgSAE je však nárůst signálu při různých koncentracích 5-NBIA více jak dvojnásobný a proto lze CTMAB použít ke zvýšení citlivosti stanovení. Jako optimální byla vybrána koncentrace CTMAB $1\cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . V okolí této koncentrace se s přidavkem CTMAB výška píku mění jen zanedbatelně a dále nevrůstá.

Dále byly proměřeny kalibrační závislosti 5-NBIA v rozmezí $c = 1\cdot 10^{-4} - 2\cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} a to s přidavkem CTMAB o $c = 1\cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} a bez přidavku povrchové aktivní látky (obr. 6, 7, 8). Na těchto obrázcích můžeme vidět, že nejméně dvojnásobná výška píku (měření s přidavkem CTMAB oproti měření bez přidavku) je za-

chována po celou koncentrační oblast. Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce I. Hodnoty korelačního koeficientu ukazují vysokou linearitu v celém koncentračním rozsahu. Z tabulky I také vyplývá snížení meze detekce a vyšší směrnice kalibračních závislostí 5-NBIA v přítomnosti CTMAB.

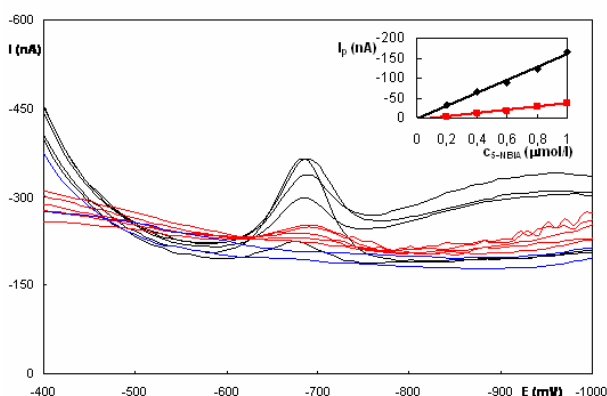
Závěr

Na základě provedeného výzkumu elektrochemického chování roztoků 5-NBIA ve vodném prostředí s přidavkem povrchové aktivních látek a bez nich na p-AgSAE a m-AgSAE metodou diferenční pulzní voltamet-

Tabulka I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-NBIA metodou DPV na p-AgSAE ovlivněné přidavkem CTMAB v prostředí BR-puftru o pH 8

Elektroda	$c_{5\text{-NBIA}}$ [mol l ⁻¹]	c_{CTMAB} [mol l ⁻¹]	Směrnice [nA mol l ⁻¹]	Úsek [nA]	R	L _Q [mol l ⁻¹]
p-AgSAE	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$-7,87 \cdot 10^8$	-280,5	0,9992	–
		0	$-2,60 \cdot 10^8$	132,6	0,9971	–
	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$-7,91 \cdot 10^8$	-22,6	0,9964	–
		0	$-2,09 \cdot 10^8$	3,1	0,9981	–
	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$-1,62 \cdot 10^8$	2,9	0,9953	$2,5 \cdot 10^{-7}$
		0	$-4,18 \cdot 10^7$	5,9	0,9969	$4,3 \cdot 10^{-7}$



Obr. 8. Kalibrační křivky 5-NBIA ($(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹) v přítomnosti CTMAB ($1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) (černě) a nepřítomnosti CTMAB (červeně) na p-AgSAE v prostředí BR-puftru o pH 8; modře je křivka základního elektrolytu

rie bylo zjištěno, že optimální pH BR-puftru pro DPV stanovení studované látky na p-AgSAE a m-AgSAE bylo pH 8 pro všechna měření.

Přidavek povrchově aktivních látek na měření na p-AgSAE a m-AgSAE nemá významný vliv, s výjimkou CTMAB na p-AgSAE, kde se po přidavku látky zvýší signál nejméně dvakrát v celém koncentračním rozsahu.

Koncentrační závislosti 5-NBIA v přítomnosti i nepřítomnosti CTMAB proměřené v rozmezí $c=1 \cdot 10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-7}$

mol l⁻¹ jsou lineární v celém rozsahu. Dosažená mez detekce 5-NBIA je $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹ v přítomnosti CTMAB a $4,3 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹ v jeho nepřítomnosti.

Z provedené studie plyne, že za stanovených podmínek přidavkem CTMAB k 5-NBIA na p-AgSAE snížíme mez detekce oproti měření bez CTMAB při zachování dostatečné přesností.

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekty MSM0021620857, LC 0603 a RP14/63) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt SVV 261204).

LITERATURA

1. Barek J., Cvačka J., Muck A., Quaiserová V., Zima J.: *Electroanalysis* 13, 779 (2001).
2. Canterford D. R.: *J. Photogr. Sci.* 26, 65 (1978).
3. Rosenkranz H. S., Karol M. H.: *Mutat. Res.* 431, 81 (1999).
4. Zýka J.: *Nové směry v analytické chemii*, svazek III. SNTL, Praha 1988.
5. Manjunatha J.G., Kumara Swamy B.E., Deepa R., Krishna V., Mamatha G.P., Chandra U., Shankat S.S., Sherigara B.S.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 4, 662 (2009).
6. Wei D., Ivaska A.: *Anal. Chim. Acta* 607, 126 (2008).

ODHAD EXPOZÍCIE POLYCYKlickÝM AROMATICKÝM UHLĽOVODÍKOM V ŽIVOTNOM PROSTREDÍ A PRACOVNOM OVZDUŠÍ VYBRANÉHO ZÁVODU V MESTE NITRA

**JARMILA DUBAJOVÁ^{a,c},
ZUZANA KLÖSLOVÁ^b,
ALŽBETA HEGEDŮSOVÁ^d, ZUZANA
VASSÁNYI^b a EVA KRČMOVÁ^b**

^a Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Nitre, Štefánikova 58, 949 63 Nitra, ^b Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Cesta k nemocnici, Banská Bystrica, ^c Katedra ekológie a environmentalistiky, Fakulta prírodných vied Univerzity Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, ^d Katedra chémie, Fakulta prírodných vied Univerzity Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, Slovenská republika
nr.olc@ruvzsr.sk

1. Úvod

Masívnosť produkcie polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU), ich vlastnosti a predovšetkým preukázateľný negatívny vplyv niektorých PAU na živý organizmus sú zdrojom rozsiahlej pozornosti, ktorá je problematike PAU v životnom a pracovnom prostredí venovaná zo strany ekonomickej a spoločensky vyspelých štátov. Taktiež v podmienkach Slovenskej republiky, pre ktorú je typická vysoká koncentrácia zdrojov emisií PAU, predstavujú tieto látky z hľadiska ochrany ľudského zdravia mimoriadne aktuálny problém¹. V dôsledku toho sú PAU sledované v pitných, povrchových a podzemných vodách, v poľnohospodárskej pôde, vo voľnom a pracovnom ovzduší, potravinách i odpadoch.

Pri hodnotení ich výskytu v prostredí sa najčastejšie hovorí o 16 základných polyaromatických uhľovodíkoch, ktoré Environmental Protection Agency (EPA) zaradila do zoznamu 130 najzávažnejších kontaminantov životného prostredia^{2,3}. Sú to: naftalén, acenaftylén, acenaftén, fluorén, fenantrén, antracén, fluorantén, pyrén, benzo(*a*) antracén, chryzén, benzo(*b*)fluorantén, benzo(*k*)fluorantén, benzo(*a*)pyrén, dibenzo(*a,h*)antracén, benzo(*g,h,i*)perylén, indeno-pyrén.

Profesionálnej expozícii PAU v pracovnom prostredí sú vystavení najmä pracovníci pri výrobe grafitového uhlíka a grafitových elektród, pri výrobe a kladení asfaltov, pri výrobe hliníka a liatiny, v autoservisoch pri oprave a manipulácii s dieselovými motormi. Ďalej sú to kominári, hasiči, kuriči, robotníci v udiarňach, pri ropných cisternách, pri miešaní gumárenských zmesí, atď.^{4,5}. Z niekoľko stoviek doposiaľ opísaných PAU je najviac preštudovaný benzo(*a*)pyrén, ktorý je klasifikovaný ako pravdepodobný chemický karcinogén. Jeho karcinogenita pre človeka bola preukázaná vo viacerých epidemiologických štúdiách,

predovšetkým u osôb profesionálne exponovaných. Riziko vzniku rakoviny u ľudí celoživotne exponovaných tejto látke o koncentracii 1 ng m^{-3} , resp. $1 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ je odhadované na $9 \cdot 10^{-5}$ resp. $9 \cdot 10^{-2}$, čo znamená vývoj nádorového ochorenia u 9 ľudí zo 100 000 resp. zo 100 exponovaných⁶.

Cieľovými orgánmi sú predovšetkým pľúca a koža. Zvýšený výskyt karcinómov pľúc a prostaty u robotníkov v koksoviaroch, u zlievačov hliníka a u pokrývačov striech sa dáva do súvislosti práve s expozíciou sadziar. Popri malígnych ochoreniach môžu vzniknúť aj iné formy poškodenia zdravia, ako sú kontaktné dermatitídy, kožné erytémy, či astmatické ochorenia^{7,8}.

Súčasná platná národná legislatíva udáva technickú smernú hodnotu (TSH) $2 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ pre benzo(*a*)pyrén⁹. Americký národný inštitút pre bezpečnosť a zdravie v pracovnom prostredí (NIOSH) odporučil limit REL-TWA $100 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ pre sumu PAU v produktoch dechtu v pracovnom ovzduší pre 40hodinový pracovný týždeň. Európska agentúra pre bezpečnosť a ochranu zdravia pri práci (OSHA) stanovila limit $200 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ pre sumu PAU v pracovnom ovzduší¹⁰.

V podmienkach SR však absentuje systematická analýza expozície PAU. Údaje o koncentráciách PAU v pracovnom ovzduší priemyselne a dopravné zaťažovaných lokalít SR sú limitované. Zároveň ťažiskom väčšiny už vykonaných štúdií bolo stanovenie koncentrácií PAU v zložkách životného a pracovného prostredia bez posúdenia celkovej záťaže ľudí exponovaných PAU a možných dopadov na verejné zdravie. Škodlivé účinky znečisteného ovzdušia na ľudské zdravie boli potvrdené vo viacerých epidemiologických štúdiách spojených s expozíciou mestskému ovzdušiu^{11,12}.

Nebezpečenstvo karcinogénnych PAU spočíva najmä v ich bezprahovom účinku. Preto je potrebné ich sledovanie nielen v ovzduší, ale aj formou biologického monitorovania u subpopulácií exponovaných jednak profesionálne ako aj v dôsledku environmentálnej expozície znečistenému ovzdušiu. Súčasne vedecké poznatky indikujú, že práve monitorovanie relevantných biomarkerov v biologickom materiáli ľudí exponovaných PAU, v porovnaní s monitorovaním prostredia, dáva kompletnejšiu informáciu pre posúdenie expozície PAU, pretože odraža celkovú záťaž organizmu.

Navrhovaný biologický limit 1-hydroxypyreínu v moči je $3,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ kreatinínu alebo $1,95 \text{ } \mu\text{mol mol}^{-1}$ kreatinínu^{13,14}.

Podľa Smernice Rady 2004/107/ES (cit.¹⁵) a podľa Vyhlášky MŽP SR č. 351 z 12. júla 2007, ktorou sa mení a dopĺňa vyhláška MŽP SR č. 705/2002 Z. z. o kvalite ovzdušia, sa stanovuje pre ročnú priemernú koncentráciu benzo(*a*)pyreínu cieľový imisný limit 1 ng m^{-3} , s termínom účinnosti od 1.1.2013.

2. Ciele práce

Vzhľadom na potrebu doplniť vedecké poznanie v tejto oblasti, hlavným cieľom práce bolo zhodnotenie aktuálnej profesionálnej expozície PAU z hľadiska verejného zdravia.

Špecifické ciele boli sledovanie PAU (16 podľa US EPA) v pracovnom ovzduší závodu v meste Nitra a vo vonkajšom ovzduší mesta Nitra na odberových lokalitách umiestnených v blízkosti frekventovaných ciest i v relatívne „čistej zóne“.

Pretože nebezpečenstvo karcinogénnych PAU spočíva v ich bezprahovom účinku, je potrebné ich sledovanie nielen v ovzduší, ale aj v ich metabolitoch formou biologických expozičných testov u exponovaných i neexponovaných pracovníkov.

3. Materiál a metódy

3.1. Stanovenie PAU

V ovzduší sa PAU vyskytujú v dvoch formách a to sorbované na prachových časticiach i v plynenej forme ako pary. Sorbované PAU obsahujú zložky s vyššou molekulovou hmotnosťou, v plynenej fáze sa nachádzajú najmä zložky s 2 až 3 aromatickými jadrami. Komplexná analýza PAU v ovzduší vyžaduje odber, izoláciu a detekciu zložiek oboch frakcií.

Odber: V ovzduší boli realizované 2 druhy odberov: stacionárne a personálne. V oboch prípadoch bol použitý kombinovaný odber so sériovým zapojením hlavice s PTFE filtrom a odberovou trubičkou naplnenou sorbentom amberlit XAD-2. Odber ovzdušia bol vykonaný v súlade s príslušným štandardným pracovným postupom, ktorý bol vypracovaný na základe medzinárodných noriem^{16–18}.

Izolácia PAU z filtra a XAD-2 trubičky: PTFE filter (resp. sorbent trubičky) bol extrahovaný s 5,0 ml acetonitrilu po dobu 45 min v ultrazvukovom kúpeli. Extrakt bol filtrovaný cez PTFE mikrofilter (0,45 µm) a dávkovaný do HPLC systému.

Podmienky HPLC analýzy PAU vo vzorkách pracovného a voľného ovzdušia:

Prístroj: Agilent 1100 s detektorom DAD a FLD,
Kolóna: Vydac PAH (250 × 4,6 mm, 5 µm) s predkolónou RP C18 (5 µm),

Teplota kolóny: 35 °C,
Mobilná fáza: acetonitril-voda, programovaný gradient,

Prietok: mobilnej fázy 1,5 ml min⁻¹.

Detekcia: fluorescenčná so špecifickým nastavením excitácie a emisie pre jednotlivé kongenéry PAU, pre acenaftylén detekcia UV pri 230 nm.

Validačné charakteristiky metódy pre benzo(a)pyrén:

Medza detekcie: 0,01 µg m⁻³

Medza stanovenia: 0,04 µg m⁻³

Rozšírená štandardná kombinovaná neistota: 35 % (k=2)

3.2. Odber vzoriek biologického materiálu

Súčasne s odberom ovzdušia boli odoberané vzorky moča osôb profesionálne exponovaných PAU ako aj kontrolnej skupiny. Vzorky boli odobraté po ukončení päťdňového pracovného týždňa, resp. po pracovnej zmene. Vzorky sa skladovali v plastových fľašiach pri teplote –18 °C.

Po skončení odberu odberové hlavice zabalené do alobalu a vzorky močov boli v autochladničke dopravené na analýzu do laboratórií RÚVZ Banská Bystrica. Vzorky vzdušia a moče sa do doby analýzy uchovávali v mrazničke pri teplote –18°C. Použité metódy stanovenia boli podrobené validácii, pričom sa stanovili nasledovné vybrané validačné charakteristiky metódy:

- zhodnosť – v podmienkach opakovateľnosti,
- kalibračná krivka a linearita,
- medza detekcie a medza stanoviteľnosti,
- štandardná kombinovaná neistota¹⁹.

3.3. Stanovenie 1-hydroxypyrenu v moči

Pyrén sa v organizme metabolizuje prevažne na 1-hydroxypyrén, ktorý sa vylučuje močom vo forme konjugátov. Konjugáty 1-OHP sa pred extrakciou rušia enzymatickou hydrolýzou (Helix pomatia, 37 °C, 16–24 h). Potom sa moč extrahuje na kolónke SPE C18 metanolom. Extrakt sa zakonzentrováva odparením na rotačnej vákuovej odparke (RVO).

Odparok rozpustený v metanole sa aplikuje na HPLC kolónu s reverznou fázou C18 a eluuje za podmienok izokratickej elúcie v zmesi acetonitril-voda. 1-OHP sa detekuje fluorescenčným detektorom.

Podmienky HPLC analýzy 1-OHP:

Prístroj: Agilent 1100 s detektorom DAD a FLD,

Kolóna: Purospher RP-18e (125 × 4 mm, 5 µm),

Teplota kolóny: 35 °C,

Mobilná fáza: acetonitril-voda (60:40),

Prietok: 1 ml min⁻¹,

Detekcia: fluorescenčná, excitácia 240 nm a emisia 388 nm,

Validačné charakteristiky metódy:

Medza stanovenia: 0,06 µg l⁻¹ moču,

Výťažnosť: 82,1 %,

Opakovateľnosť: 5,4 %,

Reprodukovateľnosť: 8,3 %.

Pri každej sérii vzoriek bol na vnútrolaboratórnu kontrolu kvality použitý referenčný materiál ClinCheck I a II od firmy Recipe, Nemecko.

4. Výsledky

4.1. Sledovanie PAU v pracovnom ovzduší

PAU ako skupina látok s nebezpečnými účinkami na zdravie človeka boli sledované v rokoch 2007 a 2008 na

Tabuľka I
Koncentrácia kongenérovaných PAU v dýchacej zóne pracovníkov

Škodlivina	Koncentrácia kongenérovaných PAU [ng m ⁻³]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Naftalén	209,1	111,6	234,7	207,5	468,2	793,1	1441,5	975,8
koronen	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acenaftén	ND	25,4	235,4	0,9	0,0	0,7	848,1	1947,3
Fluorén	88,8	0,0	81,2	73,5	208,3	893,2	2,9	1003,0
Fenantrén	2,6	11,9	125,2	114,6	0,0	1017,8	0,0	616,0
Antracén	6,9	0,0	3,7	4,6	0,0	62,3	13,4	101,3
Fluorantén	3,9	0,7	0,0	3,3	7,8	19,2	41,8	46,3
Pyrén	30,6	3,3	34,7	30,6	51,7	206,0	128,3	598,3
Benzo/a/antracén	29,6	2,4	21,9	27,0	37,2	101,1	72,5	252,9
Chryzén	9,0	0,5	7,8	7,9	12,0	14,1	34,9	55,1
Benzo/b/fluorantén	2,6	0,0	3,2	1,4	5,9	14,0	10,1	37,0
Benzo/k/fluorantén	0,7	0,0	0,4	0,3	0,8	1,6	1,0	3,0
Benzo/a/pyrén	0,5	0,0	0,4	0,2	1,0	2,1	0,7	4,2
Indeno/123-cd/pyren	ND	0,0	0,4	0,2	1,1	0,0	0,7	0,0
Dibenzo/ah/antracén	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
Benzo/ghi/perylen	ND	0,0	1,3	0,0	0,0	1,5	2,0	0,0
Suma PAU	384,3	155,8	750,1	471,9	793,9	3126,8	2598,2	5640,6

Tabuľka II
Hodnoty koncentrácie 1-hydroxypyrenu v moči exponovaných pracovníkov

Metabolit	Koncentrácia 1-hydroxypyrenu v moči [μg g ⁻¹ kreatinínu]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1-Hydroxypyren	0,99	0,87	0,48	0,5	1,46	0,64	0,45	0,33

pracovisku, vyznačujúcom sa s významnými emisiami vyplývajúcimi z pracovnej činnosti. Posudzovanie vplyvu týchto látok na ľudské zdravie je náplňou pracovnej činnosti RÚVZ so sídlom v Nitre a RÚVZ so sídlom v Banskej Bystrici, ktorých zariadeniami boli odobrané a namerané aj výsledky tejto práce. PAU vznikajúce pri výrobe asfaltovej zmesi a asfaltérskych prácach v a pri kladení cestného asfaltu boli v dýchacej zóne exponovaných pracovníkov odobrané formou osobných odberov. Odber ovzdušia v dýchacej zóne pracovníkov sa realizoval formou kombinovaného odberu so sériovým zapojením hlavice s filtrom a následne odberovou trubičkou. Vzorky sa analyzovali metódou HPLC. Do vyšetrovaného súboru bolo zaradených 8 zamestnancov, z toho 3 zamestnanci boli priamo pri výrobe asfaltovej zmesi a 5 pracovníci kobercovej čaty vykonávali kladenie cestného asfaltu. Výsledky meraní uvádza tab. I.

Pri výrobe asfaltovej zmesi a pri kladení asfaltových kobercov v dýchacej zóne exponovaných pracovníkov koncentrácie sumy PAU sa pohybovali v relatívne širokom intervale 0,2–5,6 μg m⁻³. Súčasne s odberom vzoriek ovzdušia bol pracovníkom po piatom dni expozície PAU odobraný moč. Hodnoty 1-hydroxypyrenu v moči týchto exponovaných pracovníkov boli stanovené v rozsahu 0,5 až 1,5 μg g⁻¹ kreatinínu. Výsledky analýz uvádza tab. II.

Na základe stanovených výsledkov je možné konštatovať, že navrhované limity pre sumu PAU a ani pre benzo(a)pyrén pre pracovné ovzdušie v závode na výrobu a kladenie asfaltov neboli prekročené. Podobne tomu aj v prípade 1-hydroxypyrenu koncentrácie stanovené v moči exponovaných pracovníkov neprekračovali navrhovaný limit.

Z nameraných hodnôt vyplýva, že zvýšené hodnoty 1-hydroxypyrenu v moči exponovaných pracovníkov preu-

kázateľne súvisia so zvýšenými koncentraciami PAU zistenými v pracovnom prostredí. Riešením na zníženie týchto koncentrácií sú technické opatrenia na jednotlivých prevádzkach a zníženie produkcie, používanie osobných ochranných pomôcok, častá výmena pracovných odevov, zvýšená hygiena. Veľmi dôležité je obmedzenie fajčenia a periodické lekárske prehliadky zamerané na dôkladné vyšetrenie kože, očí a horných dýchacích ciest.

4.2. Sledovanie PAU vo voľnom ovzduší

Merania polycyklických aromatických uhľovodíkov vo voľnom ovzduší mesta Nitra boli realizované na štyroch odberových lokalitách v časových obdobiach september 2006, február 2007, marec 2007, máj 2007, október 2007 a október 2008.

Odberové miesta v centre mesta na Štefánikovej ulici a na Damborského ulici bolo vybrané vzhľadom na nadmerné dopravné zaťaženie.

Odberové miesto na Misionárskej ulici bolo vybrané vzhľadom na blízkosť spaľovne zdravotníckeho odpadu patriacej fakultnej nemocnici a prítomnosť individuálnych kotolní na hnedé uhlie, prípadne domáce kúreniská.

Odberové miesto v blízkosti garáží vo dvore RÚVZ so sídlom v Nitre bolo vybrané vzhľadom na prítomnosť vŕfukových plynov zo služobných a súkromných áut.

Porovnanie celkových koncentrácií PAU stanovených na všetkých odberových miestach počas monitorovacieho obdobia je znázornené v tab. III až VI.

Zvýšený obsah PAU bol nameraný v lokalite mimo centra mesta Nitry vo vykurovacom období. Mimo vykurovacieho obdobia sú hodnoty PAU nízke a ich zdrojom je hlavne doprava.

Najvyššie koncentrácie PAU vo voľnom ovzduší boli namerané v zimných mesiacoch. Je to dôsledok toho, že okrem dopravy a iných, v priebehu roka nemenných zdrojov PAU, k tvorbe PAU v ovzduší prispieva aj vykurovanie budov. Vysoká koncentrácia PAU v zimnom období súvisí aj s poveternostnými podmienkami a teplotou vzduchu, ktorá je v priebehu sledovaného obdobia najnižšia, čo spôsobuje zvýšenú koncentráciu prchavých zlúčenín v nižších vrstvách atmosféry. Vo všeobecnosti možno usúdiť, že v období so zvýšenou dennou teplotou ovzdušia koncentrácia PAU bola nižšia, v období poklesu teplôt ich koncentrácia vzrástla.

Z hľadiska hodnotenia toxikologicky najvýznamnejšieho predstaviteľa skupiny PAU – benzo(*a*)pyrénu, jeho hodnota v centre mesta (na Štefánikovej ulici) bola 0,10 ng m⁻³ až 0,69 ng m⁻³. Na Misionárskej ulici (mimo centra mesta) koncentrácia benzo(*a*)pyrénu sa pohybovala v intervale od 0,10 ng m⁻³ do 0,20 ng m⁻³.

Súčasne s odberom vzoriek ovzdušia boli odobraté a analyzované vzorky biologického materiálu kontrolnej

Tabuľka III

Koncentrácia jednotlivých kongenéro PAU i celkovej sumy PAU vonkajšieho ovzdušia na odberovom mieste na Misionárskej ulici

Škodlivina	Koncentrácia kongenéro PAU [ng m ⁻³]					
	IX.06	II.2007	III.2007	V.2007	X.2007	X.2008
Naftalén	77,2	342,2	1397,4	80,0	50,7	39,1
Acenaftylén	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaftén	ND	71,1	132,2	ND	40,4	50,2
Fluorén	ND	ND	ND	ND	4,8	1,7
Fenantrén	47,8	47,8	89,7	15,9	10,8	42,7
Antracén	ND	0,6	1,2	ND	ND	ND
Fluorantén	ND	4,1	0,7	3,5	1,0	0,3
Pyrén	ND	5,0	7,4	1,5	0,4	0,1
Benzo/ <i>a</i> /antracén	4,4	6,6	11,9	17,0	1,5	0,1
Chryzén	1,0	2,1	4,8	1,9	0,3	0,1
Benzo/ <i>b</i> /fluorantén	ND	0,4	0,2	ND	0,2	0,2
Benzo/ <i>k</i> /fluorantén	ND	0,2	0,2	ND	0,1	0,1
Benzo/ <i>a</i> /pyrén	ND	0,2	0,3	ND	0,1	0,1
Indeno/ <i>123-cd</i> /pyren	ND	0,2	0,2	ND	0,1	0,2
Dibenzo/ <i>ah</i> /antracén	ND	0,1	ND	ND	ND	ND
Benzo/ <i>ghi</i> /perylene	ND	0,2	0,3	ND	0,1	0,1
Suma PAU	130,3	480,7	164,7	119,8	110,6	134,9

Tabuľka IV

Koncentrácia jednotlivých kongenérovaných PAU i celkovej sumy PAU vonkajšieho ovzdušia na odberovom mieste na Damborského ulici

Škodlivina	Koncentrácia kongenérovaných PAU [ng m ⁻³]					
	IX.06	II.07	III.07	V.07	X.2007	X.2008
Naftalén	63,5	157,4	123,1	29,8	36,0	53,5
Acenaftylén	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acenaftén	7,2	114,6	3,5	31,7	0,0	17,1
Fluorén	0,0	2,8	2,6	2,5	0,0	0,0
Fenantrén	12,3	8,8	12,8	5,4	4,3	15,5
Antracén	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0
Fluorantén	0,7	1,6	0,4	0,9	0,5	0,5
Pyrén	0,8	1,0	0,1	0,4	0,2	2,3
Benzo/a/antracén	14,0	2,4	1,9	1,7	1,7	2,7
Chryzén	2,1	0,3	0,6	0,4	0,3	1,5
Benzo/b/fluorantén	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,0
Benzo/k/fluorantén	0,9	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0
<i>Benzo/a/pyrén</i>	<i>0,2</i>	<i>0,3</i>	<i>0,1</i>	<i>0,2</i>	<i>0,2</i>	<i>0,0</i>
Indeno/123-cd/pyren	0,1	0,2	0,1	0,0	0,4	0,0
Dibenzo/ah/antracén	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo/ghi/perylene	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,0
<i>Suma PAU</i>	<i>102,0</i>	<i>290,6</i>	<i>145,6</i>	<i>73,4</i>	<i>44,4</i>	<i>93,2</i>

Tabuľka V

Koncentrácia jednotlivých kongenérovaných PAU i celkovej sumy PAU vonkajšieho ovzdušia na odberovom mieste vo dvore RÚVZ so sídlom v Nitre

Škodlivina	Koncentrácia kongenérovaných PAU [ng m ⁻³]					
	IX.06	II.07	III.07	V.07	X.2007	X.2008
Naftalén	115,1	35,5	38,4	24,9	30,2	25,0
Acenaftylén	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acenaftén	12,1	92,6	72,1	2,0	3,7	10,5
Fluorén	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0
Fenantrén	18,4	2,7	11,4	6,5	4,2	8,5
Antracén	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Fluorantén	0,8	0,4	2,7	0,3	0,5	0,4
Pyrén	1,3	0,3	1,1	0,1	0,1	1,6
Benzo/a/antracén	17,0	0,1	2,8	0,8	1,2	2,2
Chryzén	2,5	0,1	1,1	0,5	0,1	1,0
Benzo/b/fluorantén	0,0	0,2	0,3	0,0	0,1	0,0
Benzo/k/fluorantén	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
<i>Benzo/a/pyrén</i>	<i>0,0</i>	<i>0,2</i>	<i>0,1</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>
Indeno/123-cd/pyren	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0
Dibenzo/ah/antracén	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo/ghi/perylene	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Suma PAU</i>	<i>167,3</i>	<i>132,7</i>	<i>133,7</i>	<i>35,2</i>	<i>40,2</i>	<i>49,2</i>

Tabuľka VI

Koncentrácia jednotlivých kongenérovaných PAU i celkovej sumy PAU vonkajšieho ovzdušia na odberovom mieste na Štefánikovej ulici

Škodlivina	Koncentrácia kongenérovaných PAU [ng m ⁻³]					
	IX.06	II.2007	III.2007	V.2007	X.2007	X.2008
Naftalén	80,3	170,5	116,7	86,3	50,4	46,3
Acenaftylén	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acenaftén	6,8	0,0	63,1	0,0	0,0	0,0
Fluorén	4,1	0,0	4,7	7,1	2,2	3,1
Fenantrén	5,5	4,8	9,6	7,5	6,3	5,5
Antracén	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0
Fluorantén	1,7	0,2	2,7	1,7	0,8	1,7
Pyrén	1,9	0,1	2,3	1,9	0,2	1,9
Benzo(a)antracén	1,3	3,4	1,1	1,3	1,0	1,4
Chryzén	0,3	0,4	0,8	0,5	0,2	0,5
Benzo(b)fluorantén	0,5	0,1	0,8	0,5	0,2	0,5
Benzo(k)fluorantén	0,3	0,0	0,4	0,3	0,1	0,3
Benzo(a)pyrén	0,1	0,1	0,7	0,6	0,1	0,6
Indeno(1,2,3-cd)pyrén	0,4	0,1	0,7	0,4	0,1	0,4
Dibenzo(ah)antracén	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
Benzo(ghi)perylene	0,1	0,1	0,7	0,2	0,2	0,2
Suma PAU	103,5	179,7	206,1	108,5	61,7	62,6

skupiny neexponovaných pracovníkov PAU. Do vyšetreného súboru v časovom horizonte október 2006 až október 2008 bolo zahrnutých 43 respondentov, u ktorých hodnoty 1-hydroxypyrenu v moči boli stanovené v rozsahu 0,06–0,37 $\mu\text{g g}^{-1}$ kreatinínu.

Na základe uvedených skutočností je možné konštatovať, že koncentrácie benzo(a)pyrenu zistené vo voľnom ovzduší mesta Nitra sú na úrovni iných miest bez významných zdrojov PAU akými sú výroba a kladenie asfaltu²⁰. Zdrojom benzo(a)pyrenu v meste sú okrem automobilovej dopravy i viaceré kotelne na pevné palivo, ktoré dosiaľ neboli plynofikované resp. elektrifikované a domáce kúreniská.

Tieto výsledky umožňujú poznať aktuálny stav znečistenia ovzdušia PAU za rôznych poveternostných podmienok a odhadnúť expozíciu obyvateľstva mesta Nitra týmto látkam z ovzdušia, prípadne odhadnúť karcinogénne riziko vyplývajúce z prítomnosti uvedených zlučenín v ovzduší.

5. Záver

Výsledky tejto práce budú použité pri realizácii zdravotno-hygienických a preventívnych opatrení v pracovnom prostredí závodu s profesionálnou expozíciou PAU.

Získané údaje z pracovného prostredia sú podkladom pri výkone štátneho zdravotného dozoru z dôvodu vyhlásovania rizikových prác z titulu chemickej karcinogenity. Stanovenie PAU v pracovnom ovzduší a súčasné monitorovanie 1-hydroxypyrenu v moči profesionálne exponovanej populácie PAU výraznou mierou prispievajú k úrovni hodnotenia rizika poškodenia zdravia a umožnia včasné vyradenie osôb exponovaných týmito látkami, čím sa predíde vzniku potenciálnych nádorových ochorení súvisiacich s touto expozíciou.

Naše aktivity realizujeme s dôrazom na znižovanie zaťaženia životného prostredia PAU. Opatrenia k zlepšeniu kvality voľného ovzdušia mesta Nitra by mali byť zamerané predovšetkým na tieto oblasti:

- zníženie množstva vypúšťaných emisií zo zdrojov,
- zníženie dopravného zaťaženia mesta Nitra,
- riešenie problematiky malých spaľovacích zdrojov.

Keďže väčšina emisií pochádza z domácností, kde na vykurovanie používajú uhlie, je potrebné zabezpečiť „ekologický“ spôsob vykurovania domácností (plyn, solárne vykurovanie, zakúpenie nízkoemisných kotlov).

Sledovanie kontaminácie životného prostredia zároveň môže slúžiť ako vstupné údaje do procesu hodnotenia zdravotných rizík vyplývajúcich z inhalačnej expozície populácie.

LITERATÚRA

- Ronchetti L.: *Enviromagazin* 11, 24 (2006).
- International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 32.: Polynuclear aromatic compounds: Part 1. Chemical, environmental and experimental data.* str. 155. IARC, Lyon 1974.
- International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Vol. 35.: Polynuclear aromatic compounds: Part 4. Bitumens, coal-tars and derived products, shale oils and soots.* str. 104. IARC, Lyon 1985.
- Buchancová J. (ed): *Pracovné lekárstvo a toxikológia.* str. 402. Osveta, Martin 2003.
- Angerer J., Mannschreck C., Gündel J.: *Arch. Occup. Environ. Health* 69, 323 (1997).
- Proušek J. *Rizikové vlastnosti látok.* Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Bratislava 2005.
- Tejral J., Fiala Z., Bencko V., Šmejkalová J., Srb V., Tmejová M., Borská L., Andrýs C., Kučera J.: *Acta Med. (Hradec Králové)* 42, 65 (1999).
- Buchancová J. (ed): *Pracovné lekárstvo a toxikológia.* str. 90. Osveta, Martin 2003.
- Nariadenie vlády Slovenskej republiky 356/2006 Z.z. o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi s expozíciou karcinogénnym a mutagénnym faktorom pri práci v znení neskorších predpisov.
- Tuček M., Bencko V., Volný J., Petanová J.: *Čes. Prac. Lék.* 7, 72 (2006).
- Holoubek K., Bláha P., Čupr J., Klánová K.: *Ovzduší 2007.* Brno, 23.–25.4.2007, Program a sborník konference, str. 14. Botanický ústav AVČR, v.v.i., Průhonice.
- Hon J., Frélich Z.: *Ovzduší 2007.* Brno, 23.–25.4.2007, Program a sborník konference, str. 78. Botanický ústav AVČR, v.v.i., Průhonice.
- Jongeneelen F. J.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 63, 511 (1992).
- Jongeneelen F. J.: *Ann. Occup. Hyg.* 45, 3 (2001).
- Directive 2004/107/ES of the European Parliament and of the Council, relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air.*
- Boos K. S., Lintelmann J., Kettrup A.: *J. Chromatogr.* 600, 189 (1992).
- STN ISO 12884:2000: *Ochrana ovzdušia. Vonkajšie ovzdušie. Stanovenie celkových polycyklických aromatických uhl'ovodíkov (prítomných v plynnej fáze a sorbovaných na časticiach). Odber na filtre plnené sorbentom a analýza plynovochromatografickou/ hmotnostno-spektrometrickou metódou.* SÚTN Bratislava 2005.
- STN ISO 11338:2005: *Ochrana ovzdušia. Stacionárne zdroje znečisťovania. Stanovenie polycyklických aromatických uhl'ovodíkov v plynnej fáze a sorbovaných na tuhých časticiach. Časť 1: Odber vzorky.* SÚTN Bratislava 2005.
- Hegedűs O., Hegedűsová A., Gašparík J., Ivičičová A.: *Chem. Listy* 99, 518 (2005).
- Miturová H., Hanák M.: *Ovzduší 2007.* Brno, 23.–25.4.2007, Program a sborník konference, str. 118. Botanický ústav AVČR, v.v.i., Průhonice.

J. Dubajová^{a,c}, Z. Klöslová^b, A. Hegedűsová^d, Z. Vassányi^b, and E. Krčmová^b (^a Regional Public Health Authority in Nitra, ^bRegional Public Health Authority in Banská Bystrica, ^cDepartment of Ecology and Environmentalistics Constantine the Philosopher University in Nitra, ^dDepartment of Chemistry Constantine the Philosopher University in Nitra, Slovak Republic): **Estimation of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment and Workplace Air of Selected Factory in City Nitra**

Based on the measured data of PAHs it can be concluded that the concentration of benzo(a)pyrene found in ambient air of Nitra are comparable to other places in Slovakia. The sources of benzo(a)pyrene in Nitra are also several car transport and solid fuel boilers, home furnaces and factory to the asphalt production. These results allow to know the current status of air pollution PAHs under different weather conditions and to estimate population exposure to pollutants of Nitra in the air, or to estimate carcinogenic risk arising from the presence of those compounds in the air.

REVIEW OF THE HPLC METHODS USED IN THE DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN BEER

**GANBAATAR CHUNSRIIMYATAV,
PAVEL VALASEK, VLASTIMIL
KUBAN, and IGNAS HOZA**

*Department of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, 762 72 Zlin, Czech Republic
chunsrii82@yahoo.com*

1. Introduction

Polyphenols are one of the most important natural antioxidants in many foods such as fruits, vegetables and beverages, to which they contribute to flavor, color, and sensory properties such as bitterness and astringency. Their presence in alcoholic beverages such as beer arises from the use of barley and hops in the brewing process. The majority of polyphenols of beer are derived from malt (70–80 %), whereas about 20–30 % are derived from hops. Phenolic 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^{1,2}.

Rapid analytical methods are necessary for the quality control department of beer producers to evaluate polyphenols that may adversely affect beer flavor and stability, what is of practical interest. There is an attention for using high performance liquid chromatography (HPLC) method which has been developed and applied to the analysis of polyphenols in beer³.

Several researchers have studied polyphenols in worts and beer by using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet (UV), photodiode-array, fluorometric, electrochemical (EC) or mass spectrometric (MS) detection^{1–28}. However, the number of reports on the composition of and the analytical procedures for determining polyphenols in beer are limited. The aim of this review is to provide a summary of HPLC methods with different detection systems used for the analysis of polyphenols in beer.

2. HPLC of polyphenols

Considering the importance of polyphenols in ascribing flavour and quality to beer, monitoring of these compounds during brewing is necessary. The analytical methods most commonly used for qualitative and quantitative purposes are those based on modern chromatographic separation techniques. In the last twenty years, HPLC has

been the analytical technique that has dominated the separation and characterization of polyphenols. HPLC techniques offer a unique chance to separate simultaneously all analyzed components together with their possible derivatives or degradation products. In many cases, they enable the determination of low concentrations of analytes in the presence of many other interfering and coeluting components. There are many advantages dictating the widespread use of HPLC in the analysis of polyphenols in plant-derived and biological matrices, such as (i) the wide range of commercially available columns, including those using new generation sorbents with fit-for-purpose properties and (ii) the possibility of combining two or more columns in a switching mode. A variety of HPLC methods are available for the determination of the individual polyphenols contributing to the antioxidant activity of beer. Successful separation of the individual polyphenols is requires appropriate selection of columns, mobile phases and optimization of the operation conditions.

2.1. Chromatographic conditions

The introduction of reversed-phase (RP) columns has considerably enhanced HPLC separation of different classes of polyphenols. Columns for the determination of polyphenols are almost exclusively composed of a reversed-phase RP C₁₈ stationary phases ranging from 100 to 300 mm in length with an internal diameter ranging from 3.9 to 4.6 mm. The reversed-phase columns (RP C₁₈) are widely used both with isocratic and gradient elution.

Elution systems are usually binary, an aqueous acidified polar solvent such as aqueous acetic, formic, perchloric or phosphoric acid (solvent A) and a less polar organic solvent such as methanol or acetonitrile, possible acidified (solvent B). Both isocratic and gradient elution are applied for analysis of polyphenols.

Flow rates range from 0.15 to 1.8 ml min⁻¹, the most common being 1 ml min⁻¹. Thermostatically controlled columns are normally held at ambient or slightly above ambient temperatures. Injections generally range from 1 to 100 µl.

2.2. HPLC detection

Many different detection methods are available in HPLC analysis. Phenolics are commonly detected using ultraviolet/visible (UV/VIS), photodiode array (PDA), and UV-fluorescence detectors. Other methods used for the detection of phenolics include electrochemical coulometric array detection, on-line connected PDA and electroarray detection, chemical reaction detection techniques, mass spectrometric and NMR detection^{4–9}.

3. Summary of HPLC methodologies used for the analysis of polyphenols in beer

Many researchers have reported a wide range of polyphenols in beer by different HPLC methods. The separation of polyphenols in beer was performed commonly by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) followed by ultraviolet detection (UV) described by Hayes et al.¹⁰, photodiode-array detection (PDA) described by a number of authors (Sanchez et al.¹¹, Es-Safi et al.¹², Montanari et al.¹³), fluorimetric detection described by Dvorakova and Dostalek¹⁴, electrochemical detection (ECD) described by Skerikova et al.¹⁵ or mass spectrometric detection (MS) described by Whittle and Eldridge¹⁶.

3.1. HPLC/UV/PDA detection analysis of beer

Polyphenols absorb in the UV region and the most commonly used detector for HPLC is a variable-wavelength UV or UV-vis detector. The different subclasses of polyphenols show characteristic UV-vis spectra that can be used for primary classification. Hayes et al.¹⁰, using HPLC with UV detection, determined the polyphenols commonly found in Irish-brewed beers: as benzoic acid derivatives, protocatechuic and gallic acids as cinnamic acid derivatives, caffeic acid, *p*-coumaric and ferulic, finally (+)-catechin, (–)-epicatechin. Problems caused by differences in the wavelengths for maximum UV absorption by individual polyphenols can be dealt with using diode array detection (DAD).

HPLC with UV-DAD detection is the method of choice since it is equally suited to the quantitative measurement of polyphenols and requires minimal sample preparation⁸. Solid-phase extraction of beer has been applied to polyphenols analysis followed by HPLC-UV-DAD detection. Garcia et al.³ proposed an analytical method based on solid-phase extraction and followed by HPLC with UV detection for the determination of 10 polyphenols which participate on beer stability and sensory properties in alcohol-free beers. Dvorakova et al.¹⁴ also proposed an analytical method based on solid-phase extraction and followed by HPLC with DAD detection for the determination of free gallic, protocatechuic, caffeic, *p*-coumaric, ferulic and salicylic acids, of (+)-catechin, (–)-epicatechin, and quercetin. These polyphenols participate in colloidal and sensory stability of beer. Even though the UV-vis spectrum is a valuable analytical tool, its use is limited.

3.2. HPLC/ECD detection analysis of beer

HPLC coupled to electrochemical detection (HPLC-ECD) has become a widely accepted and valuable technique because of its high sensitivity as well as its superior selectivity to UV absorption for analytes that are electrochemically oxidizable¹⁷. Electrochemical detection is a particularly useful method for determination of electroactive compounds, such as polyphenols, with better sensi-

tivity than UV detection for HPLC applications⁸. Both amperometric and coulometric detection were used for reversed-phase HPLC, usually with an octadecyl silica column and an aqueous-organic mobile phase with an acid or acidic buffer additive to suppress the dissociation of weakly acidic polyphenols. Amperometric detection was used in isocratic HPLC of polyphenols in beer with mobile phases containing ammonium phosphate, or acetate buffer and citric acid in aqueous acetonitrile, or in mixed solvents methanol-1-propanol-water. Coulometric detection usually provides improved sensitivity and signal stability in comparison to amperometric detection. The Coulchem II electrochemical detector with two coulometric detection cells in series was used for the HPLC analysis of polyphenols in beer with mobile phases containing formic acid or acetic acid in aqueous methanol or acetonitrile as the mobile phases^{18,19}.

Nardini et al.²⁰ described a gradient HPLC system with Coulchem II electrochemical detector for determining the total concentrations (free or bound) of phenolic acids in beer after alkaline hydrolysis. Vanbeneden et al.¹⁷ described a simple and rapid isocratic RP-HPLC method with amperometric electrochemical detection for the simultaneous detection and quantification of hydroxycinnamic acids and their corresponding aroma-active volatile phenols in wort and beer. The method is also well suited for the analysis of bound phenolic compounds present in wort and beer after alkaline hydrolysis as described by Nardini et al.²⁰. Casella et al.²¹ proposed HPLC coupled with amperometric electrochemical detection at Au electrode for the quantitative determination of phenolic acids in beer. The electrochemical and amperometric behavior of a gold electrode was investigated towards the oxidation of several common phenolic acids in neutral phosphate solutions. Au electrodes show an appreciable stability and reproducibility of the amperometric signals by using a constant applied potential of 1.0 V vs. Ag/Ag/Cl. This method has advantage that without the use of derivatization and/ or clean-up procedures with a good level of sensitivity and recovery¹⁶.

However, amperometric and conventional coulometric electrochemical detection are generally not compatible with the gradient elution mode. This problem has been solved by the development of a multi-channel CoulArray detector with arrays of 4, 8, 12, or 16 three-electrode electrochemical cells connected in series, controlled by the software compensating for the baseline drift during gradient runs.

3.3. HPLC/ Coulometric array detection analysis of beer

The multichannel coulometric detection system serves as a highly sensitive tool for the characterization of antioxidants because of their electroactivity. The coulometric efficiency of each element of the array allows a complete voltammetric resolution of analytes as a function of their oxidation potential. Some of the peaks may be

resolved by the detector even if they coelute. Eight-channel and twelve-channel CoulArray detectors and gradient elution with increasing concentrations of methanol or acetonitrile in aqueous mobile phases buffered with sodium dihydrogenphosphate and phosphoric acid were used for the analysis of polyphenols in wort and beer^{18,19}.

Buffer-based HPLC is often used to maintain consistent retention and selectivity. Moreover, a buffered mobile phase resists changes in pH, providing reproducible chromatography. Buffer-based HPLC coupled with ECD allows for the identification of many phenolic acids. Montanari et al.¹³ determined 16 phenolic acids in beer by coulometric array detection using a binary gradient of 0.1 M phosphate buffer. Floridi et al.¹, using HPLC with eight channel coulometric array detection, determined 19 free phenolic acids in worts and beer. Chromatographic separation was achieved with an appropriate gradient of flow and a binary solvent based on phosphate buffer, methanol, and acetonitrile in a 45-min run. The advantage of this procedure is a reproducible result obtained by direct injection of wort and beer without sample preparation.

Achilli et al.²² used a 16-channel Coul-Array detector for the analysis of phenolic acids in one of the beer samples using gradient elution with increasing concentrations of methanol or acetonitrile in aqueous-organic mobile phases with sodium dodecylsulphate, sodium phosphate, and phosphoric or nitrioloacetic acid additives. They demonstrated that by combining RP-HPLC with a highly selective array electrochemical detector it is possible to determine simultaneously large number of polyphenols in very different beverages and extracts. In a single injection (10 μ l) it was possible to identify and determine 10 different molecules (phenolic acids and flavonoids) in beer, without sample extraction, purification or concentration. Rehova et al.¹⁸ developed a method for simultaneous analysis of natural antioxidants in beer using electrochemical eight-channel CoulArray detector, which enables selective and sensitive antioxidant detection in gradient HPLC and facilitates the identification of analytes based on the ratios of signals recorded at different potentials applied to the detection cells arranged in series. The separation conditions were optimized for 27 polyphenols including derivatives of benzoic and cinnamic acids, flavones, and a few related glycosides identified in beer samples. Jandera et al.¹⁹ also described a gradient RP-HPLC system with electrochemical eight-channel CoulArray detection for the analysis of polyphenols in beverages including beer and plant extracts. In this work, more compounds are detected in comparison to previous reports. In total, 32 polyphenols including derivatives of benzoic and cinnamic acids, flavones, and few related glycosides were identified and determined in beer by using coulometric detection with gradient elution of water, acetonitrile and ammonium acetate. No special sample pretreatment is necessary and, because of the compatibility of the CoulArray detector with gradient elution, phenolic antioxidants can be determined in a single run.

HPLC in combination with electrochemical cou-

lometric array detection has gained prominence as sensitive analytical procedures for the direct detection of electroactive molecules without the use of any derivatizing procedure²¹. However, these methods have a limited ability to discriminate between polyphenols and therefore cannot be used to predict polyphenol structure. Mass spectrometry can provide additional structural information and solve coeluting compounds in complex mixtures. Electrospray ionization (ESI) mass spectrometry provides the molecular masses as a soft ionization technique after chromatographic separation, while tandem mass spectrometry (MS/MS) provides extra information on the distribution of the substituents on the phenolic rings, useful for tentative identification but only rarely providing sufficient data for full structural analysis.

3.4. HPLC/MS detection analysis of beer

Mass spectrometric (MS) detectors coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-MS tandem) have been commonly employed for structural characterization of phenolics. It is only in the last few years that HPLC/mass spectrometric techniques (HPLC/MS) have been applied to the identification of polyphenols in beer. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has been employed for structural confirmation of phenolics in malt, wort and beer²³. Whittle et al.¹⁶ described HPLC in combination with electrospray ionization mass spectrometric detection for analysis of proanthocyanidin dimmers, trimers, tetramers, and pentamers in beer. Callemien et al.²⁴ optimized an extraction procedure by using the solid phase extraction with Sephadex LH-20 resin for recovering beer proanthocyanidins. The resulting extracts were then concentrated and analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. The optimized method also is presented as an analytical tool for the determination of proanthocyanidins in beer. Callemien et al.²⁵, using normal-phase (NP) or reversed-phase (RP)-HPLC combined with ESI-MS/MS, directly determined proanthocyanidins from monomers to trimers in lager beers.

Hyphenated techniques employing coupling of HPLC with mass spectrometry is valuable tools for identification and structure elucidation of phenolic and related compounds in beer, hops and malt extracts. Callemien et al.²⁶ reported a method that thiolysis followed by RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS for the analysis of flavanoids in fresh lager beers. For the first time in the brewing field, thiolysis was hyphenated to RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS to investigate beer flavanoids which are well known for their involvement in haze and colour development during beer ageing. Callemien et al.²⁷ described both normal-phase (NP)- and reversed-phase (RP) HPLC in combination with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection for analysis of differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. In a previous work, NP-HPLC-ESI (-)-MS/MS and thioacidolysis analyses have revealed the presence of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin dimmers, and prodelphinidin trimers in ace-

tone/water (70/30, vol/vol) LH-20 extracts of lager beers. In this study, detailed structures were determined by (RP) HPLC-ESI (–)-MS/MS. Four dimmers were identified: three procyanidins (B1, B3, and B4) and one prodelpinidin (B3). Monomers to trimers can be directly quantified by NP or RP-HPLC combined with ESI-MS/MS.

Based on the careful optimization of column type, column packing, mobile phase composition and gradient steepness, Ceslova et al.²⁸ described two HPLC/MS methods that have been developed with the goal of superior separation of relatively low polar polyphenolic compounds found in hops and beer and highly polar polyphenolics in beer. The first method using Purospher Star RP-8e column and the gradient of aqueous acetonitrile containing 0.3 % formic acid is optimized for the separation of low polar polyphenolic compounds, while the second one with Zorbax SB-CN column is used for more polar hops and beer components. In this work, more compounds are detected in comparison to previous reports. In total, 49 low polar and 37 polar compounds are detected in studied samples and their molecular weights are determined based on atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectra.

4. Conclusions

This review provides a summary of HPLC methods with different detection systems used for the analysis of polyphenols in beer. Many different detection methods are available in HPLC analysis. In general, ultraviolet (UV) detectors are most popular and have been extensively used in the detection of polyphenols. However, electrochemical (EC), coulometric array, and mass spectrometric detectors are being used increasingly in HPLC analysis as they exhibit high sensitivity and selectivity. A similar sensitivity can be achieved with HPLC in combination with electrochemical detectors although this method has a limited ability to discriminate between polyphenols and therefore cannot be used to predict polyphenols structure. Mass spectrometric (MS) detectors coupled to HPLC have been commonly employed for structural characterization of polyphenols. It is only in the last few years that HPLC/mass spectrometric techniques (HPLC/MS) have been applied to the identification of polyphenols in beer

This work was kindly supported of Czech Ministry of Education, Youth and Sports (Grant No. MSM 7088352101).

REFERENCES

1. Floridi A., Montanari L., Marconi O., Fantozzi P.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1548 (2003).
2. Preedy R V., in the book: *Phenolic Compounds in Beer* (Gerhauser C. ed.). Elsevier Inc, Amsterdam 2009.
3. Garcia A., Grande C., Gandara S.: *J. Chromatogr.* 1054, 175 (2004).
4. Stalikas D.: *J. Sep. Sci.* 30, 3268 (2007).
5. Leo M.L. Nollet., in the book: *HPLC Analysis of Phenolic Compounds* (Hyoung S. Lee, ed.), 2nd ed., Marcel Dekker, New York 2000.
6. Robbins R.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866 (2003).
7. Merken M., Beecher G.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 577 (2000).
8. Wang C., Prasain J., Barnes S.: *J. Chromatogr.* 777, 3 (2002).
9. Nacz M., Shahidi F.: *J. Chromatogr.* 1054, 95 (2004).
10. Hayes J.P., Smyth R.M.: *Analyst* 112, 1197 (1987)
11. Sanchez F.G., Carnero C., Heredia A.: *Anal. Lett.* 21, 1243 (1988).
12. Es-Safi N., Fulcrand H.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 2088 (1999).
13. Montanari L., Perretti G., Natella F.: *Lebensm.-Technol.* 32, 535 (1999).
14. Dvorakova M., Hulin P., Karabin M., Dostalek P.: *Czech J. Food Sci.* 25, 182 (2007).
15. Skerikova V., Grynova L.: *Chem. Listy* 98, 343 (2004).
16. Whittle N., Eldridge H., Bartley J.: *J. Inst. Brew.* 105, 89 (1999).
17. Vanbeneden N., Delvaux F.: *J. Chromatogr.* 1136, 237 (2006).
18. Rehova L., Skerikova V., Jandera P.: *J. Sep. Sci.* 27, 1345 (2004).
19. Jandera P., Skerikova V., Rehova L.: *J. Sep. Sci.* 28, 1005 (2005).
20. Nardini M., Ghiselli.: *Food Chem.* 84, 137 (2004).
21. Casella G., Colonna C., Contursi M.: *Electroanalysis* 19, 1503 (2007).
22. Achilli G., Cellerino G., Gamache H.: *J Chromatogr.* 632, 111 (1993).
23. Nacz M., Shahidi F.: *J Chromatogr.* 41, 1523 (2006).
24. Callemien D., Bennani M., Counet C.: *Proc. 30th Eur Brew Convention* 90, 1 (2005).
25. Callemien D., Collin S.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 9066 (2007).
26. Callemien D., Guyot S., Collin S.: *Food Chem.* 110, 1012 (2008).
27. Callemien D., Collin S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1094, 01 (2008).
28. Ceslova L., Holcapek M., Fidler M.: *J. Chromatogr., A.* 1216, 7249 (2009).

G. Chunsriimyatav, P. Valasek, V. Kuban, and I. Hoza (Department of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, Czech Republic): **Review of the HPLC Methods Used in the Determination of Polyphenols in Beer**

Interest in high-performance liquid chromatography (HPLC) method for beer polyphenols has risen sharply in the past 20 years. A variety of HPLC methods are available for the determination of the individual polyphenols in beer. Successful separation of the individual compounds

requires appropriate selection of columns, mobile phases and optimization of the operation conditions. Further, many different detection methods are available in HPLC analysis. In general, ultraviolet (UV) detectors are most popular and have been extensively used in the detection of polyphenols. However, electrochemical (EC), coulometric array, and mass spectrometric detectors are being used increasingly in HPLC analysis as they exhibit high sensitivity and selectivity. The advantages and disadvantages of each of these methods are highlighted. This review provides a summary of HPLC methods with different detection systems used for the analysis of polyphenols in beer.

HPLC ANALYSES USED IN THE DETERMINATION OF PHENOLIC ACIDS IN BEER: REVIEW

**GANBAATAR CHUNSRIIMYATAV,
PAVEL VALASEK, VLASTIMIL
KUBAN, and IGNAS HOZA**

*Department of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, 762 72 Zlin, Czech Republic
chunsrii82@yahoo.com*

1. Introduction

Recently, a renewal interest has been focused on beer, a common beverage rich in polyphenols with a moderate antioxidant activity coupled with a low ethanol content. Mild to moderate beer consumption is associated with potential for prevention of cardiovascular and carcinogenesis diseases. This is attributed to the presence of beer polyphenols¹. The beer contains a complex mixture of polyphenols, the greater part of which comes from the malt, the remaining portion from the hops². Many of the existing papers in this subject area prove undoubtedly that phenolic acids among all classes of polyphenols in foodstuffs (including barley and beer), are the most easily absorbed from the intestinal tract. The distribution of phenolic acids in foods and raw materials is wide, and the concentrations are considerable. For example, ferulic acid, the main phenolic acid in barley and beer, is present in the esterified form, but an esterase activity of bacterial organ is present in the human gastrointestinal tract³.

Various chromatographic techniques have been used for the determination of polyphenols, including paper chromatography (PC), thin layer chromatography (TLC), capillary electrophoresis (CE), nuclear magnetic resonance spectrometry, gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical, HPLC/MS, UV spectrophotometric, or fluorimetric detection. Several researchers have studied phenolic acids in wort and beer by using HPLC coupled with ultraviolet, diode array, coulometric array or fluorimetric detection^{1–3,8,9,19–23}. However, the number of reports on the composition of and the analytical procedures for determining phenolic acids in beer are limited. The aim of this review is to provide a summary of the various HPLC and sample preparation methods that have been employed to quantify individual phenolic acids in beer.

2. Sample preparation techniques for HPLC

Over the years many sample pre-treatment methods have been developed to determine phenolic acids in various sample types. There are three main types of phenolic-containing matrices: plants, food and liquid samples such

as biological fluids and beverages including beer, wine and clear juice samples. Liquid samples have minimal manipulation requirements. For beer, it is necessary first to remove the alcohol by degassing or evaporation. Beer sample is usually filtered and/ or centrifuged, after which the sample is either directly injected onto reversed phase HPLC column or, more often, the analytes are first isolated using liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE). Some sample preparation methods of phenolic extracts include acid, alkaline or enzymatic hydrolysis to remove acyl and glycosyl moieties from the phenolic acids^{4,5}.

2.1. Liquid-liquid extraction (LLE)

Extraction of phenolic acids in beer is performed by liquid-liquid extraction (LLE) with organic solvents like *n*-hexane, isooctane, ethyl acetate and acetone/water⁸. Nardini et al.¹¹ applied a sequence extraction procedure for extraction of free and bound phenolic acids from beer, as previously described by Nardini¹¹. Ethyl acetate extraction has frequently been used to isolate beer phenolic acids⁶. For HPLC analysis, degassed beer sample was acidified (~ pH 3) and saturated with NaCl prior to extraction with ethyl acetate. The extraction solvent was then evaporated and the sample taken up in the chosen chromatographic solvents.

2.2. Solid-phase extraction (SPE)

Solid-phase extraction is a good choice to fractionate as well as to remove unwanted components from the sample. By eluting with solvents of varying pH, larger phenolics and sugars are separated from the smaller phenolic components⁷. Meanwhile the solid-phase extraction (SPE) is the common technique used for pre-concentration and purification prior to HPLC separation of phenolic compounds in wine, this extraction technique has been not applied in beer. Thus, Garcia, et al.⁸ successfully tested waters 500 mg Sep-Pak C₁₈ Plus cartridges as solid-phase extraction minicolumns for purification and concentration prior to HPLC separation of phenolic compounds in alcohol free beer. The use of 500 mg C18 SPE cartridges and acetonitrile as elution solvent is allowed for the determination of polyphenols in beer without interferences. Dvorakova et al.⁹ also reported that the most convenient SPE cartridges for the pre-concentration and elimination of interfering substances prior to HPLC separation of phenolic compounds in beer are Oasis-MAX anion-exchange cartridge and polyamide cartridge DPA-6S.

2.3. Hydrolysis

Phenolic acids occur naturally in a wide range of

bound forms. They usually occur in the form of esters rather than glycosides. They may be conjugated with organic acids, sugars, amino compounds, lipids, terpenoids, or other phenolics. Chemical and enzymatic hydrolysis is commonly used to break these bonds. There are two main chemical procedures to cleave the ester bond reported in the literature, acidic and alkaline hydrolyses. Enzymatic hydrolysis cannot be used when a wide range of conjugates are studied because their action is specific to certain compounds⁷.

The determination of the free phenolic acids in beer requires hydrolysis, because the phenolics are usually found in the conjugated form and rarely in the free state. For this reason, several hydrolytic procedures have been described to quantify total phenolics. Most of these procedures are based on alkaline hydrolysis with NaOH (ranging from 2 to 4 M) using incubation times up to 6 h, sometimes under nitrogen. However, the experimental conditions commonly reported in the literature to detect bound phenolic acids by alkaline hydrolysis result in loss of several phenolic acids, particularly dihydroxyderivatives. Recently, Nardini et al.¹¹ reported that the addition of ascorbic acid, a strong antioxidant, and ethylenediaminetetraacetic acid, a metal chelator, totally prevented the loss of phenolic acids during alkaline hydrolysis. Following this, degassed beer was subjected to alkaline hydrolysis with 2M NaOH containing 10mM EDTA and 1% ascorbic acid at 30 °C for 30 min, in the presence of 1 µg isoferulic acid as internal standard. The alkaline extract was acidified with HCl to pH < 3 and saturated with NaCl, and then extracted three times with ethyl acetate to recover free phenolics. On this basis, this procedure has been successfully applied to determine total phenolic acids in beer¹⁰.

3. HPLC of phenolic acids

In the last twenty years, the analytical technique that has dominated the separation and characterization of phenolic acids is HPLC with reverse phase (RP) column technology⁵. A variety of HPLC methods are available for the determination of the individual phenolic acids contributing to the antioxidant activity of beer. Successful separation of the individual phenolic acids requires appropriate selection of columns, mobile phases and optimization of the operation conditions.

3.1. Chromatographic conditions

Columns for the determination of phenolic acids are almost exclusively composed of a reversed-phase RP C₁₈ stationary phase with an internal diameter ranging from 2.1 to 5 mm (the most common being 4.6 mm). Column lengths range from 100 to 300 mm. Reversed-phase columns (RP C₁₈) are widely used both isocratic and gradient elution.

Elution systems are usually binary, an aqueous acidified polar solvent such as aqueous acetic, formic, perchlo-

ric or phosphoric acid (solvent A) and a less polar organic solvent such as methanol or acetonitrile, possible acidified (solvent B).

Flow rates range from 0.15 to 1.8 ml min⁻¹, the most common being 1 ml min⁻¹. Thermostatically controlled columns are normally held at ambient or slightly above ambient temperatures. Injections generally range from 1 to 100 µl^{5,7,12}.

3.2. Detection

Phenolic compounds in beer are commonly detected using ultraviolet detection (UV) described by Hayes et al.¹³, photodiode-array detection (PDA) described by a number of authors (Sanchez et al.¹⁴ Es-Safi et al.¹⁵ Montanari et al.¹⁶), fluorimetric detection described by Dvorakova and Dostalek⁹, electrochemical detection (ECD) described by Skerikova et al.¹⁷ or mass spectrometric detection (MS) described by Whittle and Eldridge¹⁸.

4. Summary of HPLC methodologies used for the analysis of phenolic acids in beer

Many researchers have reported a wide range of phenolic acids in worts and beers by different HPLC methods. Separation of phenolic acids in beer was performed commonly by reversed-liquid chromatography followed by ultraviolet, photodiode array, fluorimetric or electrochemical detection.

4.1. Solid-phase extraction/HPLC-UV/DAD methods

Solid-phase extraction of beer has been applied to phenolic acids followed by HPLC-UV/DAD detection. Garcia, et al.⁸ reported that a method based on solid-phase extraction and followed by liquid chromatographic separation with ultraviolet detection (HPLC-UV) is presented as an analytical tool useful in quality control in the brewing industry for the determination of phenolic acids such as caffeic acid, *p*-coumaric acid, gallic acid, gentistic acid, ferulic acid and salicylic acid. It was also successfully tested with standard beers after removing the ethanol by rotary evaporation. The use of 500 mg C₁₈ SPE cartridges and acetonitrile as elution solvent allows their determination without interferences. Dvorakova et al.⁹ also reported that an analytical method based on solid-phase extraction (SPE) and followed by HPLC separation with DAD can be used for the determination of free gallic, protocatechuic, caffeic, *p*-coumaric, ferulic and salicylic acids. The optimized method also is presented as an analytical tool for the determination of phenolic acids in beer.

4.2. Alkaline hydrolysis/HPLC methods

Nardini et al.¹¹ developed a method for determination of the total concentrations (free or bound) of phenolic acids

in beer, which is based on alkaline hydrolysis with 2 M NaOH containing ascorbic acid (1% w/v) and EDTA (10 mM) and followed by HPLC separation with ECD. In the present study they took advantage of this hydrolytic procedure to quantitatively measure free and total (free plus bound) phenolic acids in beer. After alkaline hydrolysis, which released bound phenolic acids, a remarkable increase in the content of 4-hydroxyphenylacetic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and sinnapic acid was observed in beer. Their results show that the most of phenolic acids in beer are present as bound forms and only small portion can be detected as free compounds. Vanbeneden et al.¹⁹ described a method for determination of hydroxycinnamic acids and their corresponding aroma-active volatile phenols in wort and beer, which is isocratic RP-HPLC method with amperometric electrochemical detection. The method is also well suited for the analysis of bound phenolic acids present in wort and beer after alkaline hydrolysis as described by Nardini et al.¹¹.

4.3. HPLC/Electrochemical detection (ECD) methods

Electrochemical detection is a particularly useful method for determination of electroactive compounds, such as phenolic acids, with better sensitivity than UV detection for HPLC applications. Both amperometric and coulometric detection were used for reversed-phase HPLC, usually with an octadecyl silica column and an aqueous-organic mobile phase with an acid or acidic buffer additive to suppress the dissociation of weakly acidic phenolic acids.

Amperometric detection was used in isocratic HPLC of phenolic acids in beer with mobile phases containing ammonium phosphate, or acetate buffer and citric acid² in aqueous acetonitrile, or in mixed solvents methanol-1-propanol-water. Coulometric detection usually provides improved sensitivity and signal stability in comparison to amperometric detection. The Coulchem II electrochemical detector with two coulometric detection cells in series was used for the HPLC analysis of phenolic acids in beer with mobile phases containing formic acid or acetic acid in aqueous methanol or acetonitrile as the mobile phases.

However, amperometric and conventional coulometric electrochemical detection are generally not compatible with the gradient elution mode. This problem has been solved by the development of a multi-channel CoulArray detector with arrays of 4, 8, 12, or 16 three-electrode electrochemical cells connected in series, controlled by the software compensating for the baseline drift during gradient runs. The multichannel coulometric detection system serves as a highly sensitive tool for the characterization of antioxidants because of their electroactivity. The coulometric efficiency of each element of the array allows a complete voltammetric resolution of analytes as a function of their oxidation potential. Some of the peaks may be resolved by the detector even if they coelute². Eight-channel and twelve-channel CoulArray detectors and gra-

dient elution with increasing concentrations of methanol or acetonitrile in aqueous mobile phases buffered with sodium dihydrogenphosphate and phosphoric acid were used for the analysis of phenolic acids in wort and beer^{20,21}.

Buffer-based HPLC is often used to maintain consistent retention and selectivity. Moreover, a buffered mobile phase resists changes in pH, providing reproducible chromatography. Buffer-based HPLC coupled with ECD allows for the identification of many phenolic acids. Montanari et al.¹⁶ determined 16 phenolic acids in beer by coulometric array detection using a binary gradient of 0.1 M phosphate buffer. Floridi et al.², using HPLC with eight channel coulometric array detection, determined 19 free phenolic acids in worts and beer. Chromatographic separation was achieved with an appropriate gradient of flow and a binary solvent based on phosphate buffer, methanol, and acetonitrile in a 45 min run. The advantage of this procedure is a reproducible result obtained by direct injection of wort and beer without sample preparation. Casella et al.²² proposed HPLC coupled with amperometric electrochemical detection at Au electrode for the quantitative determination of phenolic acids in beer. The electrochemical and amperometric behavior of a gold electrode was investigated towards the oxidation of several common phenolic acids in neutral phosphate solutions. Au electrodes show an appreciable stability and reproducibility of the amperometric signals by using a constant applied potential of 1.0 V vs. Ag/Ag/Cl. This method has advantage that without the use of derivatization and/or clean-up procedures with a good level of sensitivity and recovery.

Achilli et al.²³ used a 16-channel Coul-Array detector for the analysis of phenolic acids in one of the beer samples using gradient elution with increasing concentrations of methanol or acetonitrile in aqueous-organic mobile phases with sodium dodecylsulphate, sodium phosphate, and phosphoric or nitroacetic acid additives. They demonstrated that by combining RP-HPLC with a highly selective array electrochemical detector it is possible to determine simultaneously large number of phenolic compounds in very different beverages and extracts. In a single injection (10 μ l) it was possible to identify and determine six phenolic acids as 4-hydroxy-phenylacetic acid, ferulic acid, *o*-vanillin, syringaldehyde, syringic acid and vanillic acid, without sample extraction, purification or concentration, in several kinds of beers. Rehova et al.²⁰ developed a method for simultaneous analysis of natural antioxidants in beer using electrochemical eight-channel CoulArray detector, which enables selective and sensitive antioxidant detection in gradient HPLC and facilitates the identification of analytes based on the ratios of signals recorded at different potentials applied to the detection cells arranged in series. In this study, they identified 12 different hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids in various beer samples by using gradient elution with ammonium acetate, acetonitrile and a few drops of formic acid. Jandera et al.²¹ described a gradient RP-HPLC system with electrochemical eight-channel CoulArray detection for the analysis of phenolic acids in beverages including beer and plant ex-

tracts. 13 phenolic acids, including derivatives of benzoic and cinnamic acids were identified and determined in beer by using coulometric detection with gradient elution of water, acetonitrile and ammonium acetate. No special sample pretreatment is necessary and, because of the compatibility of the CoulArray detector with gradient elution, phenolic antioxidants can be determined in a single run.

5. Conclusions

This review provides a summary of the various HPLC and sample preparation methods that have been employed to quantify individual phenolic acids in beer. First, sample pre-treatments for HPLC analysis of phenolic acids in beer are presented. Extractions from beer and cleavage reactions through alkaline hydrolysis are discussed in the sample pre-treatment for HPLC analysis.

A variety of HPLC methods are available for the determination of the individual phenolic acids contributing to the antioxidant activity of beer. Successful separation of the individual phenolic acids requires appropriate selection of columns, mobile phases and optimization of the operation conditions. The most often used columns are packed with reversed-phase C₁₈ column material. Reversed-phase columns (RP C₁₈) are widely used with isocratic or gradient elution using solvents of aqueous acetic, formic or phosphoric acids with methanol or acetonitrile as an organic modifier. Phenolic acids in beer are commonly detected using ultraviolet detection, photodiode-array detection (PDA), fluorimetric detection and electrochemical detection (ECD). Solid-phase extraction and alkaline hydrolysis followed by HPLC analysis are presented, as described by a number of authors.

Some authors determined phenolic acids in beer matrices by direct injection in HPLC, after filtration, since fermentable sugars, dextrans and organic acids do not interfere with their chromatographic response. HPLC coupled to electrochemical detection (HPLC-ECD) has become a widely accepted and valuable technique because of its high sensitivity as well as its superior selectivity to UV absorption for analytes that are electrochemically oxidizable. The electrochemical detection technique for HPLC determination of phenolic acids is compared with special attention to the highly sensitive and selective coulometric array detectors.

This work was kindly supported of Czech Ministry of Education, Youth and Sports (Grant No. MSM 7088352101).

REFERENCES

1. Nardini M., Natella F., Scaccini C.: *J. Nut. Bio.* 17, 14 (2006).
2. Floridi A., Montanari L., Marconi O., Fantozzi P.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1548 (2003).
3. Sz wajgier D.: *J. Inst. Brew.* 115, 243 (2009).
4. Rijke A., Out P., Niessen W., Ariese F., Gooijer C.: *J.*

5. Stalikas D.: *J. Sep. Sci.* 30, 3268 (2007).
6. Whittle N., Eldridge H., Bartley J.: *J. Inst. Brew.* 105, 89 (1999).
7. Robbins R.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866 (2003).
8. Garcia A., Grande C., Gandara S.: *J. Chromatogr.* 1054, 175 (2004).
9. Dvorakova M., Hulin P., Karabin M., Dostalek P.: *Czech J. Food Sci* 25, 182 (2007).
10. Naczka M., Shahidi F.: *J. Chromatogr.* 1054, 95 (2004).
11. Nardini M., Ghiselli.: *Food Chem.* 84, 137 (2004).
12. Merken M., Beecher G.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 577 (2000).
13. Hayes J.P., Smyth R.M.: *Analyst.* 112, 1197 (1987).
14. Sanchez F.G., Carnero C., Heredia A.: *Anal. Lett.* 21, 1243 (1988).
15. Es-Safi N., Fulcrand H.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 2088 (1999).
16. Montanari L., Perretti G., Natella F.: *Lebensm.-Technol.* 32, 535 (1999).
17. Skerikova V., Grynova L.: *Chem. Listy.* 98, 343 (2004).
18. Whittle N., Eldridge H., Bartley J.: *J. Inst. Brew.* 105, 89 (1999).
19. Vanbeneden N., Delvaux F.: *J. Chromatogr.* 1136, 237 (2006).
20. Rehova L., Skerikova V., Jandera P.: *J. Sep. Sci.* 27, 1345 (2004).
21. Jandera P., Skerikova V., Rehova L.: *J. Sep. Sci.* 28, 1005 (2005).
22. Casella G., Colonna C., Contursi M.: *Electroanalysis* 19, 1503 (2007).
23. Achilli G., Cellerino G., Gamache H.: *J Chromatogr.* 632, 111 (1993).

G. Chunsriimyatav, P. Valasek, V. Kuban, and I. Hoza (Department of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, Czech Republic) HPLC Analyses Used in the Determination of Phenolic Acids in Beer: Review

This review provides a summary of the various HPLC and sample preparation methods that have been employed to quantify individual phenolic acids in beer. First, sample pre-treatments for HPLC analysis of phenolic acids in beer are discussed. A variety of HPLC methods are available for the determination of the individual phenolic acids contributing to the antioxidant activity of beer. Successful separation of the individual phenolic acids requires appropriate selection of columns, mobile phases and optimization of the operation conditions. This review is a compilation of the different HPLC methods and sample preparation techniques used in the analysis of phenolic acids in beer. The literature articles are grouped in three groups depends on the sample preparation techniques and detection systems.

SIMPLE METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOTAL PHTHALATES IN FATTY FOOD SAMPLES

IVAN OSTROVSKÝ^a, RADOMÍR ČABALA^b, RENÁTA GÓROVÁ^a, ZUZANA VETRÍKOVÁ^a, JANKA KUBINCOVÁ^c, BEÁTA MELUCHOVÁ^a, JOZEF VIŠŇOVSKÝ^a, and WILHELM LORENZ^d

^a Chemical Institute, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská Dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic, ^b Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, ^c Technological Department Biocentre, Food Research Institute, Kostolná 5, 900 01 Modra, Slovak Republic, ^d Martin-Luther University, Halle – Wittenberg, Department of Chemistry, Institute of Analytical and Environmental Chemistry, Kurt-Mothes-Strasse 2, 06120 Halle, Saale, Germany
gorova@fns.uniba.sk

Phthalates (PHTs) are due to their extensive production an ordinary part of environment and human food chain. Industry uses mixtures of many PHT isomers in order to provide a wide range of different properties for different uses¹. However, the legislative requirements are often limited to only several mostly used PHTs such as di-2-ethylhexyl phthalate, di-*n*-butyl phthalate, di-*n*-octyl phthalate and butylbenzyl phthalate²⁻⁵, what could underestimate the real content of PHTs if their industrial mixtures are applied. Risk assessments of only several PHTs have been completed where those for diisononyl phthalate (DINP) and diisodecyl phthalate (DIDP) show no risks to human health or environment for any current use. Risk assessments for other PHTs remain open as scientific data are still being considered⁶ and there is still a need for their monitoring in the environment and especially in human food chain.

GC method which would determine all or at least several tenths of major PHTs individually would be instrumentally very complicated, laborious and expensive. Majority of publications deals with phthalate determination in water⁷ or biological fluids⁸, articles about PHTs in samples with fatty matrices^{9,10} are less frequent, because the fat components can interfere with phthalates.

The presented method for determination of sum of phthalates is based on the their alkaline hydrolysis to phthalic acid at 80 °C for 20 hours, followed by the selective extraction of lipophilic interferents from acidified hydrolysate at pH 1 with *n*-hexane. Idea to convert all PHTs to PA is not new, but published methods^{8,11} dealt with the determination of total phthalates in urine and they are not applicable to samples with high fat content. Inno-

vation in presented method is selective removal of fatty matrix from phthalic acid. Phthalic acid is subsequently derivatized to dimethyl phthalate (DMP) with diazomethane in aqueous-chloroform two-phase system and content of DMP in chloroform is determined by GC-FID. Determined LOD and LOQ of the method were 0.4 and 1.2 µg g⁻¹ DMP, respectively. Real samples of butter, pork, goose and duck fats, and sunflower, olive, rapeseed and linseed oils were analyzed. The total phthalate contents were found in the range from not detected level in duck fat to 12.5 µg g⁻¹ in butter.

Presented method allows the determination of all phthalate forms in one run. It could be applied as preliminary step of quality control for assessing total contamination with PHTs before a more detailed and targeted PHTs analysis.

This work was supported by the Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU under project ITMS: 26240220007.

REFERENCES

1. Staples Ch.A., Peterson D.R., Parkerton T.F., Adams, W.J.: *Chemosphere* 35, 667 (1997).
2. *Council Directive 88/378/EEC of 3May 1988 on the Approximation of The Laws of the Member State Concerning The Safety of Toys. European Union, Brussels 1988.*
3. *Council Regulation (EEC) No. 793/93 of 23 March 1993 on the evaluation and control of the Risks of Existing Substances (OJ L 84, 5 April 1993). European Union, Brussels 1993.*
4. *Directive 2005/84/EC of the European Parliament* <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32005L0084>: EN:NOT and Phthalate restrictions in toys - 5. *Phthalates Information Centre Europe* – <http://www.phthalates.com> and *Phthalate Information Centre USA* – <http://www.phthalates.org>.
6. *Official Journal of the European Union C 90/4, (2006),*
7. Ballesteros O., Zafra A., Navaloon A., Vilchez J.L.: *J. Chromatogr., A* 1121, 154 (2006).
8. Kato K., Silva M.J., Needham L.L., Calafat A.M.: *J. Chromatogr., B* 814, 355(2005).
9. Feng Y.-L., Zhu J., Sensenstein, R.: *Anal. Chim. Acta* 538, 41(2005).
10. Cortazar E., Bartolome L., Delgado A., Etxebarria N., Fernandez L.A., Usobiaga A., Zuloaga O.: *Anal. Chim. Acta* 534, 247 (2005).
11. Albro P.W., Jordan S., Corbett J.T., Schroeder J.L.: *Anal. Chem.* 56, 247 (1984).

PRÍPRAVA VZORIEK A ANALÝZA NEZNÁMYCH LÁTOK POČAS DRUHÉHO NATO LABORATÓRNEHO CVIČENIA S KOMBINOVANÝMI VZORKAMI (2nd NATO MIXED SAMPLES LABORATORY EXERCISE)

KATARÍNA GROLMUSOVÁ
a MILAN TKÁČ

Stacionárne identifikačné laboratórium, VÚ 1042, objekt Zemianske Kostolany, 972 46 Čereňany, Slovenská republika
grolmusovak@gmail.com, mitkac@gmail.com

1. Úvod

Napriek klesajúcemu trendu chemického, biologického, rádiologického a nukleárneho ohrozenia (chemical, biological, radiological and nuclear – CBRN) organizuje NATO laboratórne cvičenie s kombinovanými vzorkami (NATO mixed samples laboratory exercise). Cieľom tohto cvičenia je zistiť, ktoré laboratória sú schopné analyzovať takýto druh vzoriek. No tiež je snaha, na základe výsledkov tohto cvičenia, vypracovať štandardnú operačnú procedúru pre nakladanie s kombinovanými vzorkami (obsahujúcimi chemickú, biologickú, rádiologickú a/alebo nukleárnu kontamináciu), ktorá by sa neskôr začlenila do príručky pre vzorkovanie pre CBRN tímy. Toto cvičenie možno považovať za druh interlaboratórnych testov a skúmanie odbornej zdatnosti analytických laboratórií².

Vo všeobecnosti zatiaľ neexistuje jednotný a normalizovaný postup pre prácu s kombinovanými vzorkami. Cieľom je takýto postup vytvoriť. Je potrebné minimalizovať riziká pri rozbaľovaní a otváraní vzoriek, ako aj eliminovať a/alebo redukovať riziká pred samostatnou analýzou tak, aby nedošlo k strate analytu a kontaminácii okolia².

Účastnícke laboratória mali preukázať schopnosť pracovať s kombinovanou vzorkou, vyvinúť vhodné postupy pre úpravu jednotlivých vzoriek a správne identifikovať kontaminanty rôzneho druhu ohrozenia tak, ako to vyžaduje AEP-66 (NATO Handbook for Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents)¹.

Každé laboratórium obdržalo základné informácie o type vzoriek, ich množstve, ako aj popis situácie, ktorá predchádzala odberu vzoriek (tzv. scenár). Následne boli vzorky doručené do laboratórií. Išlo o dve vzorky: textilná vzorka označená ako T08 a vodná vzorka označená ako W08. Zároveň boli s nimi dodané aj ich referenčné vzorky, označené ako TB08 a WB08 (kde T je textil, W je water, B je blank a 08 je kód laboratória).

Textilná vzorka bola tvorená dvoma kruhmi uniformy o priemere 5 cm, pričom vzorka bola odobratá z uniform chorých vojakov po ukončení misie. Textilná referenčná vzorka bola odobratá z novej, nikdy nepoužitej uniformy. Predbežné informácie poukazovali na biologickú a/alebo

chemickú kontamináciu. Avšak nebolo možné jednoznačne vylúčiť ani rádiologickú kontamináciu.

Vodná vzorka o objeme 150 ml bola odobratá z jazera. Vedľa jazera sa nachádzala farma, mesto s 5 000 obyvateľmi a priemyselná továreň na výrobu pesticídov. Vzorka bola odobratá CBRN tímom po explózii na farme sprevádzanej následným zhoršením zdravotného stavu civilného obyvateľstva v blízkom meste. Vodná referenčná vzorka bola odobratá z horného toku rieky pritekajúcej do jazera. Predbežné informácie poukazovali na rádiologickú a/alebo chemickú kontamináciu.

1.1. Preskrining

Po prijatí balíka boli vykonané preskriningové procedúry pomocou prenosných prístrojov E-CAM a RP-2000, na prítomnosť chemickej a rádiologickej kontaminácie. Prístroj E-CAM využíva techniku iónovej mobilnej spektrometrie na rýchlu detekciu vybraných vojenských chemických látok. Prístroj RP-2000 je určený na meranie dávkového príkonu od úrovne prírodného pozadia až do 1 Gy h⁻¹, k meraniu príkonu dávkového ekvivalentu od úrovne prírodného pozadia až do 1 Sv h⁻¹, k meraniu povrchovej beta kontaminácie materiálov až do plošnej aktivity 30 000 Bq cm⁻² a k vyhľadávaniu zdrojov ionizujúceho žiarenia. Výsledok bol negatívny. Vizualná kontrola potvrdila neporušiteľnosť ochranných obalov a pečatí.

1.2. Textilná vzorka

Vzhľadom na vysokú pravdepodobnosť biologickej kontaminácie sa ďalšie nakladanie a testovanie textilných vzoriek odložilo do príchodu expertov biologického laboratória z VÚ 7945 Rožňava, ktorí boli požiadaní o spoluprácu v oblasti identifikácie biologickej kontaminácie. Pred ich príchodom bola vykonaná len neinvazívna rádiologická skriningová procedúra textilnej a jej referenčnej vzorky pomocou prenosného prístroja RP-2000 a gamma-spektrometra, pričom bola potvrdená neprítomnosť kontaminácie α , β a γ rádionuklidmi.

Po príchode expertov biologického laboratória VÚ 7945 Rožňava bol vykonaný chemický a biologický skrining textilnej vzorky a jej referenčnej vzorky. Biologický skrining sa vykonal pomocou imunochromatografickej analýzy. Výsledok skriningu poukázal na prítomnosť biologickej kontaminácie spôsobenej *Francisella Tularensis*, ktorá bola následne potvrdená PCR (polymerase chain reaction) analýzou textilnej vzorky.

Chemický skrining na prítomnosť prchavých vojenských chemických látok a iných nebezpečných chemických látok sa vykonal pomocou prenosného prístroja E-CAM a prenosného plynového chromatografu HAPSITE. Chemický skrining nepotvrdil prítomnosť prchavých vo-

jenských chemických látok (chemical warfare agents – CWA) alebo iných nebezpečných chemických látok. Tento výsledok však nevyučoval prítomnosť neprechavých rozkladných produktov CWA, ako aj prítomnosť prekursorov CWA (látok zoznamu 1,2,3 OPCW – Organization for the Prohibition of Chemical Weapons).

1.3. Vodná vzorka

Na vodnej vzorke a jej referenčnej vzorke boli vykonané skrínigové procedúry na prítomnosť rádiologickej kontaminácie pomocou prenosného prístroja RP-2000, chemickej kontaminácie pomocou prenosného prístroja E-CAM a prítomnosti prechavých chemických látok pomocou prenosného plynového chromatografu HAPSITE.

Následne sa vykonala skrínig vodnej vzorky a jej referenčnej vzorky v gama-spektrometrii, ktorý dokázal prítomnosť ^{235}U vo vodnej vzorke. Analýza na prítomnosť biologickej kontaminácie bola negatívna.

Výsledky skrínigových procedúr vykonaných na vzorkách nepotvrdili prítomnosť prechavých CWA. Na druhej strane však nevyvrátili prítomnosť ich prekursorov a rozkladných produktov. Avšak vzhľadom na kontamináciu vodnej vzorky ^{235}U a textilnej vzorky Francisella Tulariensis, bolo potrebné pri úprave vzoriek eliminovať alebo redukovať nežiaduce druhy kontaminácií tak, aby nedošlo k strate chemickej kontaminácie pred jej analýzou a súčasne neboli ohrození pracovníci nežiadúcou kontamináciou.

Na identifikáciu CWA, ich rozkladných produktov a prekursorov (podľa zoznamu 1,2,3 OPCW) boli použité metódy plynovej (GC-MS-EI) a kvapalinovej (LC-MS-ESI) chromatografie s hmotnostnou spektrometriou, ako aj plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID).

2. Experimentálna časť

2.1. Chemikálie, štandardy a materiál

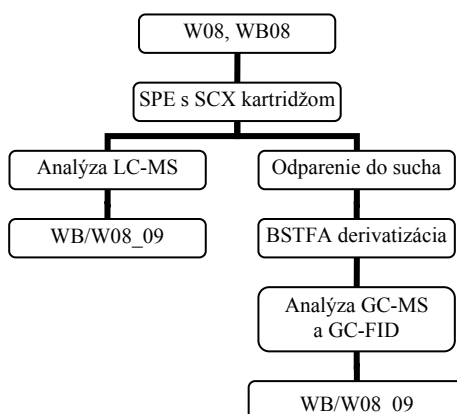
Acetonitril čistoty LC-MS, výrobca Merck, dichlórmetán čistoty LC-MS, výrobca Merck, kyselina trifluórotová (TFA), čistoty HPLC grade, výrobca Fischer Scientific, metanol čistoty LC-MS, výrobca Merck, derivatizačné činidlo N,O-Bis(trimetylsilyl)trifluoacetamid – BSTFA, čistoty na derivatizáciu, výrobca Merck, *n*-hexán, čistoty GC, výrobca Merck, amoniak, čistoty p.a., výrobca Syntchem, HCl, čistoty p.a. výrobca Syntchem, Na_2SO_4 bezvodý, čistoty p.a., výrobca Syntchem, trietanolamín 95%, čistoty p.a., výrobca Syntchem, kyselina propylfosforitá 95%, čistoty p.a., výrobca Sigma-Aldrich.

Všetky chemikálie boli získané komerčným nákupom. Ultračistá voda $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ bola pripravená na zariadení MilliQ Synthesis firmy Millipore. Kolónky SPE HyperSep SCX 3 ml/200 mg, výrobca Thermo, koncové nylonové membránové striekačkové filtre SLGN 013 NL, veľkosť pórov $0,2 \mu\text{m}$, výrobca Millipore, sterilné striekačky Luer-lock 10 ml, výrobca Sigma-Aldrich, fiber pre SPME assembly polyacrylate (white, $85 \mu\text{m}$ coating needle 24 ga), výrobca Supelco.

2.2. Úprava vzoriek

2.2.1. Vodná vzorka

Vzhľadom na kontamináciu vodnej vzorky ^{235}U bolo nutné použiť úpravu vzoriek, pri ktorej bude ^{235}U odstránený zo vzorky alebo cieľová chemická kontaminácia extrahovaná zo vzorky. Na úpravu tejto vzorky bola použitá cieľená extrakcia chemických kontaminantov na tuhej fáze (solid-phase extraction – SPE), ktorá zároveň zabezpečila odseparovanie ^{235}U . Vzhľadom na skutočnosť, že je



Obr.1. Schéma úpravy vodnej vzorky

vo svete bežnou praxou používanie SPE kartridžov typu SCX (strong cation exchanger) na odseparovanie rozkladných produktov CWA a ich prekursorov z rôznych matric (aminoalkoholy sa zachytia na SCX a alkyl alkylfosfonové kyseliny prejdú cez kartridž), bol tento typ kartridžov použitý aj v tomto prípade^{3–5, 8}.

Extrakcia na tuhej fáze bola vykonaná nasledovným postupom: SCX kartridž bol kondicionovaný 3 ml metanolu a 3 ml ultračistej vody (ponechala sa 1 cm vrstva vody). Na kartridž bolo potom vpravených 10 ml vodnej vzorky. Po elúcii vzorky boli na vymývanie použité 2 ml ultračistej vody, ktoré boli zbierané spolu s eluovanou vzorkou ako odpad. Týmto vymývaním bolo zabezpečené odseparovanie ²³⁵U do odpadu, ktorý bol likvidovaný ako nebezpečný odpad. Kartridž bol následne vysušený pomocou vákuu do sucha. Elúcia chemickej kontaminácie bola vykonaná 2 ml 10% roztoku amoniaku v metanole a 2 ml metanolu. Eluovaný roztok bol rozdelený na dve časti. Jedna bola priamo analyzovaná pomocou LC-MS-ESI. Druhá časť bola odparená do sucha stredným prúdom dusíka a derivatizovaná pomocou BSTFA (250 µl acetonitrilu + 50 µl BSTFA → derivatizácia 30 min pri 60 °C). Derivatizovaná vzorka bola následne analyzovaná pomocou GC-MS-EI a GC-FID (obr. 1)⁸.

Tento postup bol aplikovaný na vodnú referenčnú vzorku ako aj na vodnú vzorku.

2.2.2. Textilná vzorka

Vzhľadom k prítomnosti *Francisella Tularensis* v textilnej vzorke bol nutné použiť úpravu, pri ktorej by sa biologická kontaminácia eliminovala. Vzorka bola z bezpečnostných dôvodov tepelne inaktivovaná ešte pred odoslaním účastníckym laboratóriám. Napriek tomu bola ešte textilná vzorka vystavená pôsobeniu UV-žiarenia (16 h) pomocou UV-germicídnej lampy za účelom inaktívácie.

Po vykonaní inaktívácie biologickej kontaminácie textilnej vzorky bolo rozhodnuté zaradiť použitie nylónových striekačkových koncových filtrov o veľkosti pórov 0,2 µm ihneď po extrakcii textílie. Striekačkové koncové filtre zabezpečili filtráciu extraktu a čiastočné odseparovanie inaktivovanej *Francisella Tularensis* (veľkosť 0,2–0,75 µm).

Na štvrtkruhu textilnej vzorky a jej referenčnej vzorky bola vykonaná najprv organická extrakcia dichlórmetánom a následne po odstránení zvyškov organického rozpúšťadla stredným prúdom dusíka aj vodná extrakcia (obr. 2)⁸.

Organická extrakcia dichlórmetánom bola vykonaná raz 3 ml a následne 2 ml rozpúšťadla. Extrakt bol ďalej vysušený síranom sodným bezvodým, prefiltrovaný cez nylónový striekačkový filter a prekoncentrovaný na 300 µl. Následne bol pridaný *n*-hexán (1,2 ml) a acetonitril (1,5 ml). Zmes sa dôkladne zamiešala a nechala stáť pri –17 °C po dobu 16 h. Týmto spôsobom sa odstránilo uhľovodíkové pozadie, ktoré prešlo do *n*-hexánovej vrstvy. Acetonitrilová vrstva sa po oddelení rozdelila na dve časti. Jedna časť sa použila na priamu

analýzu pomocou LC-MS-ESI a GC-MS-EI (vetva 01) a druhá sa derivatizovala BSTFA a následne sa analyzovala pomocou GC-MS-EI (vetva 02)⁸.

Po odstránení zvyškov organického rozpúšťadla sa vykonala vodná extrakcia (1 × 3 ml, 1 × 2 ml) ultračistou vodou. Následne sa extrakt prefiltroval cez nylónový striekačkový filter a rozdelil na dve časti. Jedna časť sa priamo analyzovala pomocou LC-MS-ESI (vetva 03) a druhá sa upravila na mikroextrakciu na tuhej fáze (solid-phase microextraction – SPME) s derivatizáciou pomocou BSTFA (vetva 04)⁶.

Na SPME bol použitý polyakrylový biely fiber. Pre derivatizáciu pomocou fibra bol upravený vodný extrakt nasledovným spôsobom: do 1 ml vodného extraktu sa pridali 2 µl 1 M kyseliny chlorovodíkovej a malé množstvo chloridu sodného. Čistý fiber sa vystavil parám BSTFA na 5 min, následne bol ponorený do upraveného roztoku vzorky. Po 15 min sa fiber vysušil v jemnom prúde teplého vzduchu a opäť sa vystavil parám BSTFA na 30 min pri 60 °C. Po ukončení derivatizácie bol fiber vložený do inletu GC-MS-EI na 2 min pri 250 °C (vetva 04)⁹ a spustená GC-MS analýza.

2.3. LC-MS analýzy

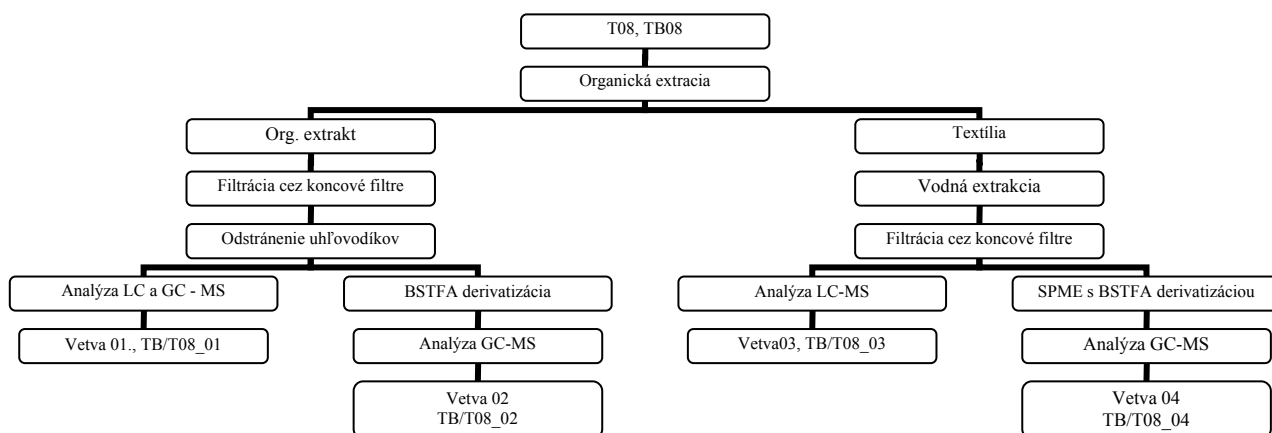
LC-MS-ESI údaje boli namerané na prístroji Varian 1200L Quadrupol MS. Vzorka bola injektovaná o objeme 20 µl. Mobilná fáza bola zložená z roztoku A – 0,01% roztok kyseliny trifluóroctovej v acetonitrile a roztoku B – 0,01% roztok kyseliny trifluóroctovej v ultračistej vode. Používala sa gradientová elúcia: z 99 % po 30% roztoku B od 0,01 min do 25 min a následne návrat na 95% roztoku B od 25 do 27 min a držanie tohto zloženia do 40 min. Prietok mobilnej fázy bol 200 µl min⁻¹. Na separáciu bola použitá chromatografická kolóna HyPurity C18, 250 mm × 4,6 mm × 5 µm. Napätie na elektrospreji bolo 5 kV, ionizačná polarita bola pozitívna, skenovací rozsah bol 90–400 *m/z* a sken bol vykonávaný každých 0,5 sek, ako neboli-začný plyn bol použitý dusík o tlaku 30 psi, ako sušiaci plyn bol použitý dusík o tlaku 30 psi.

2.4. GC-MS analýzy

GC-MS-EI analýzy boli vykonávané na prístroji Trace GC Polaris Q. Na separáciu bola použitá kolóna DB5 (5% fenylnyl 95% polysilfenylén-siloxán) 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. Vzorka bola injektovaná o objeme 1 µl. Teplota nástreku bola 250 °C, a bol použitý nasledovný teplotný program: 40 °C (2 min), 10 °C min⁻¹, 280 °C (5 min). Ionizačná energia bola 70 eV, meranie sa uskutočnilo v pozitívnom móde, skenovací rozsah bol 40–450 *m/z*, čas spustenia merania na hmotnostnom spektrometri bol po 8,5 min.

2.5. GC-FID analýzy

GC-FID analýzy boli vykonané na prístroji Trace GC. Na separáciu bola použitá kolóna DB5 (5% fenylnyl 95%



Obr. 2. Schéma úpravy textilnej vzorky

polysilfenylén-siloxán) 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Vzorka bola injektovaná o objeme 1 μl. Teplota nástreku bola 250 °C, bol použitý nasledovný teplotný program: 40 °C (2 min), 10 °C min⁻¹, 280 °C (5 min).

3. Výsledky a diskusia

Vzorky boli analyzované v poradí referenčná vzorka, skúmaná vzorka a štandard, čím bola dodržaná požadovaná reťaz dôkazu.

3.1. Vodná vzorka

Vodná referenčná vzorka označená ako WB08_09 a vodná vzorka označená ako W08_09 boli po extrakcii na tuhej fáze analyzované pomocou LC-MS-ESI a po úprave derivatizáciou boli analyzované pomocou GC-MS-EI a GC-FID.

Analýzou derivatizovanej vzorky pomocou GC-MS-EI (obr. 4 a 7) a GC-FID (obr. 12) bola nájdená neznáma látka označená ako Chemical A v derivatizovanej forme. Analýza vodnej referenčnej vzorky WB08_09 potvrdila neprítomnosť neznámej látky v tejto vzorke (obr. 3, 6, 11). Derivatizovaná forma Chemical A bola identifikovaná na základe retenčného indexu (RI) a zhody s knižničným spektrom ako trimethylsilyl – TMS trietanolamínu (trietanolamín – rozkladný produkt dusíkového yperitu – HN₃, uvedený v zozname OPCW ako 3B17)⁷. Následne bola jeho prítomnosť potvrdená analýzou štandardu trietanolamínu derivatizovaného pomocou BSTFA (obr. 5, 8, 13).

LC-MS-ESI analýzy tejto série vzoriek potvrdili prí-

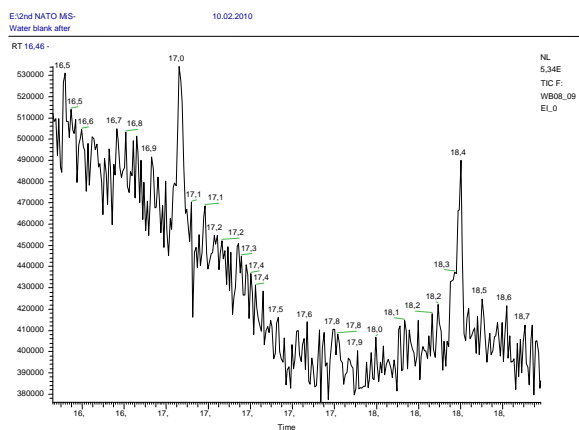
tomnosť neznámej látky označenej ako Chemical A (obr. 15) vo vodnej vzorke. Táto látka sa nenachádzala vo vodnej referenčnej vzorke (viď obr. 14). Molekulová hmotnosť Chemical A bola 149. MS spektrum neznámej látky Chemical A obsahuje jednoznačne dominantný MH⁺ ión *m/z* 150 a MNa⁺ ión *m/z* 172, ako aj izotop *m/z* 151 (obr. 17). Následne bola vykonaná analýza štandardu trietanolamínu – TEA (5 ppm TEA v roztoku 10% anomiaku v metanole) (obr. 16). MS spektrum štandardu trietanolamínu obsahuje dominantný MH⁺ ión *m/z* 150, MNa⁺ ión *m/z* 172 a izotopový ión *m/z* 151. Na základe zhody retenčných časov (RT), kde RT Chemical A bol 19,376 min a RT štandardu TEA bol 19,078 min, a MS spektrier Chemical A a štandardu trietanolamínu (viď obr. 17, 18), bola potvrdená prítomnosť trietanolamínu vo vzorke vody W08.

Vzhľadom na nájdenie Chemical A pomocou GC-MS-EI a jej potvrdením inou nezávislou metódou LC-MS-ESI (podľa požiadaviek AEP-66), ako aj jej potvrdením analýzou štandardu, je táto identifikácia považovaná za nespochybniteľnú podľa podmienok AEP-66 (cit.¹).

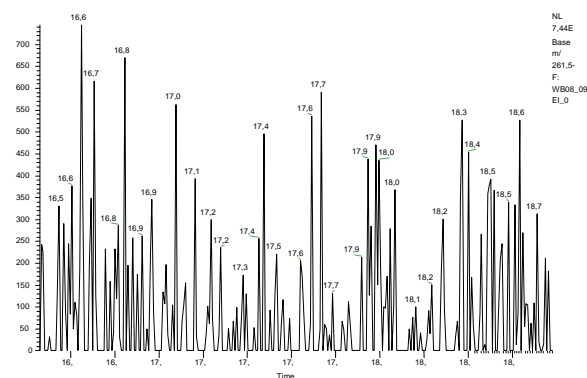
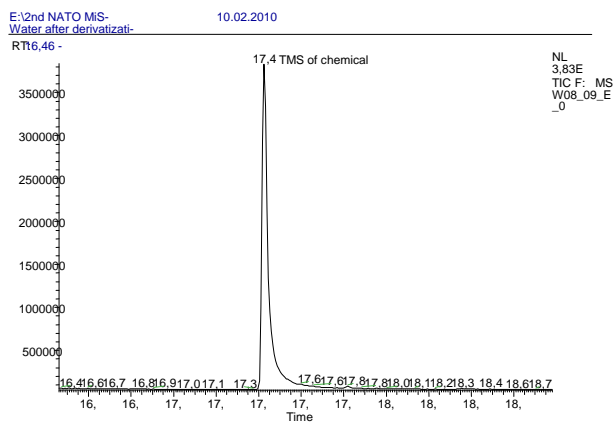
3.2. Textilná vzorka

Textilné referenčné vzorky TB08_01-04 (01 až 04 označuje vetvu úpravy vzoriek) a textilné vzorky T08_01-04 boli analyzované pomocou GC-MS-EI a LC-MS-ESI. Vo vzorkách T08_01,02,03 pri porovnaní voči ich textilným referenčným vzorkám TB08_01,02,03 neboli nájdené látky zoznamu 1,2,3 OPCW.

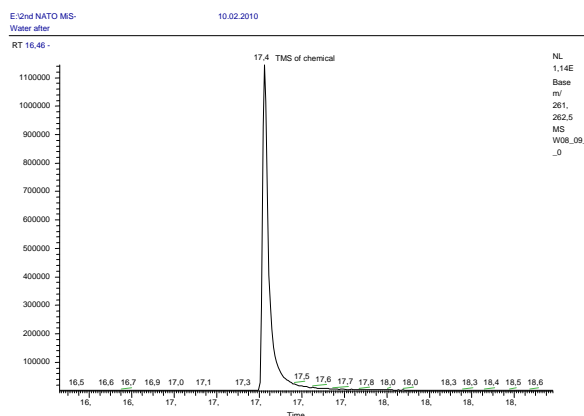
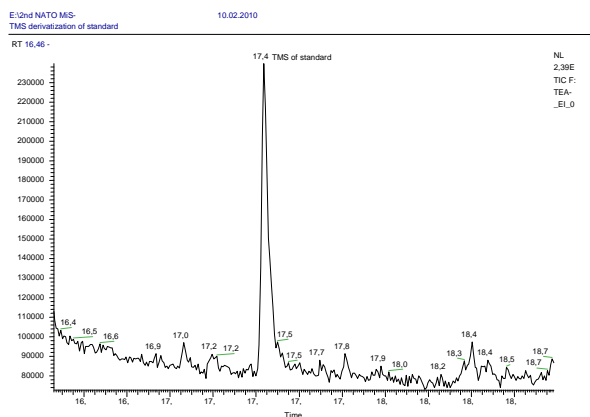
Až pri GC-MS-EI analýze vodného extraktu T08_04 pomocou polyakrylového bieleho fibra (SPME) a vykonaní derivatizácie bola nájdená neznáma látka označená ako Chemical B (obr. 20, 23) v derivatizovanej forme.



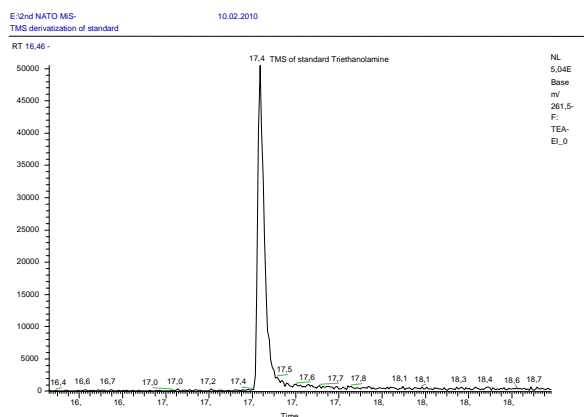
Obr. 3. TIC chromatogram vodnej referenčnej vzorky WB08_09 po BSTFA derivatizácii

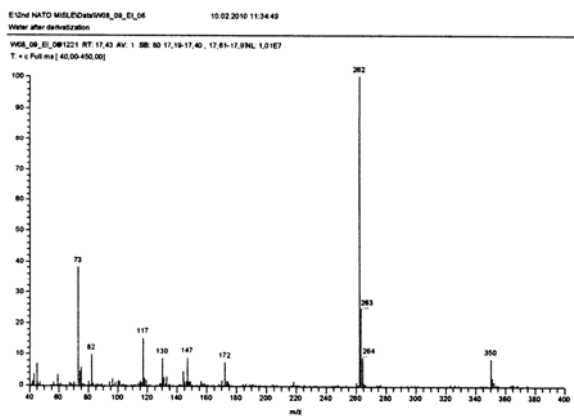
Obr. 6. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 262) vodnej referenčnej vzorky WB08_09 po BSTFA derivatizácii

Obr. 4. TIC chromatogram vodnej vzorky W08_09 po BSTFA derivatizácii

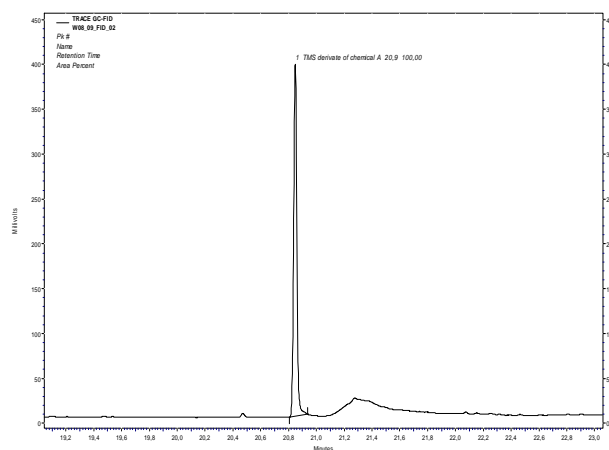
Obr. 7. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 262) vodnej vzorky W08_09 po BSTFA derivatizácii

Obr. 5. TIC chromatogram štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii

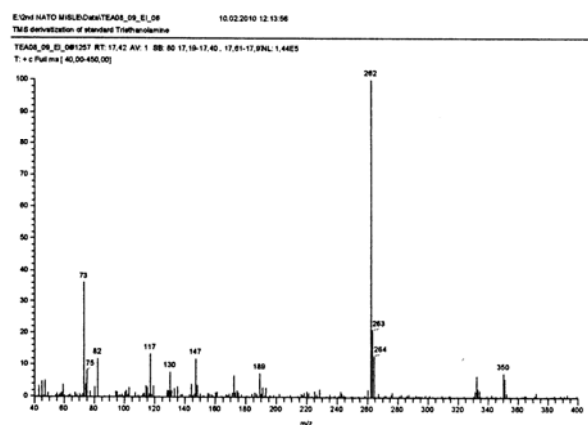
Obr. 8. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 262) štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii



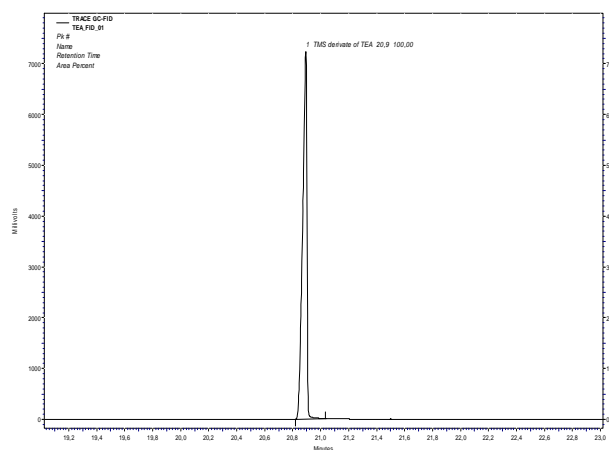
Obr. 9. EI hmotnostné spektrum Chemical A po BSTFA derivatizácii



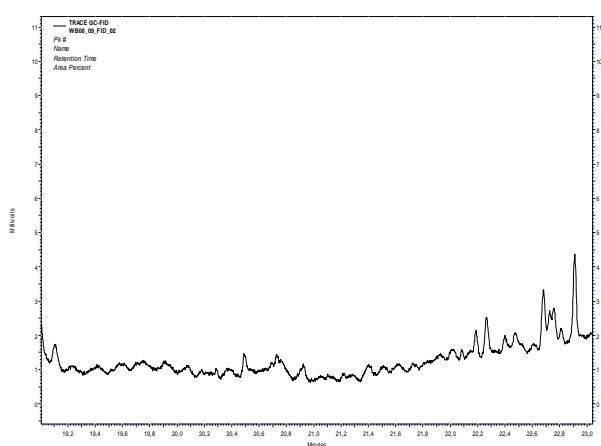
Obr. 12. GC-FID chromatogram vodnej vzorky W08_09 po BSTFA derivatizácii



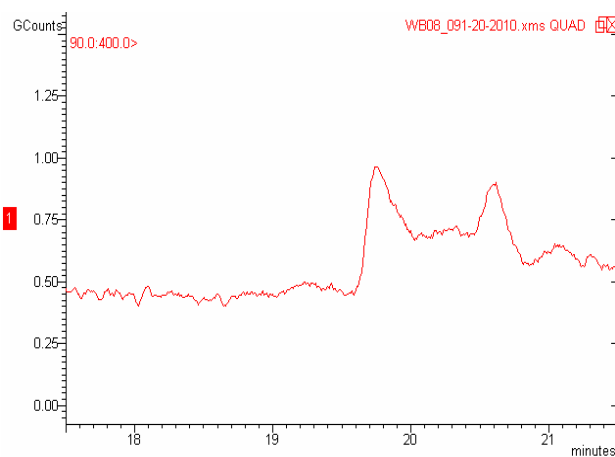
Obr. 10. EI hmotnostné spektrum štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii



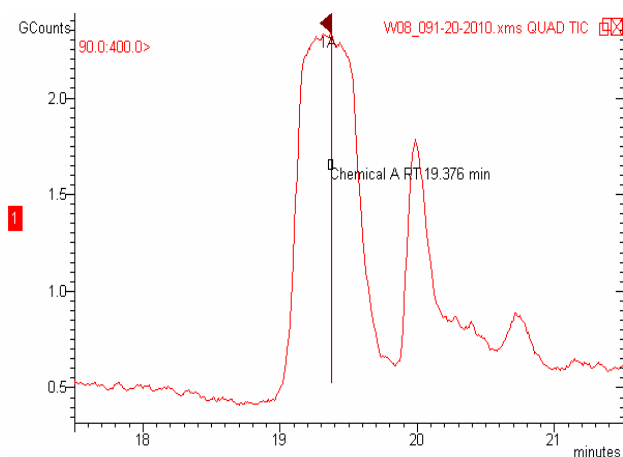
Obr. 13. GC-FID chromatogram štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii



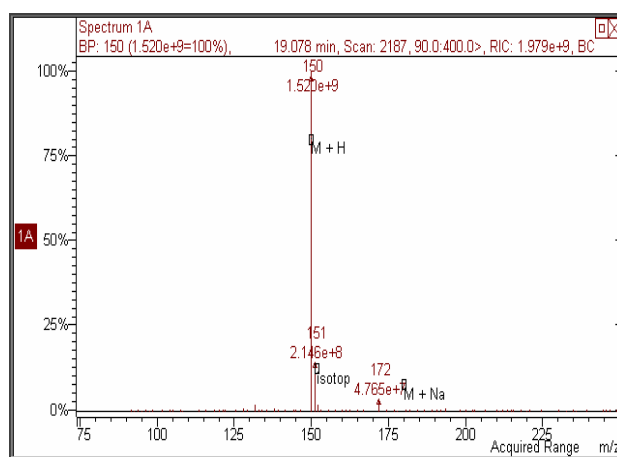
Obr. 11. GC-FID chromatogram vodnej referenčnej vzorky WB08_09 po BSTFA derivatizácii



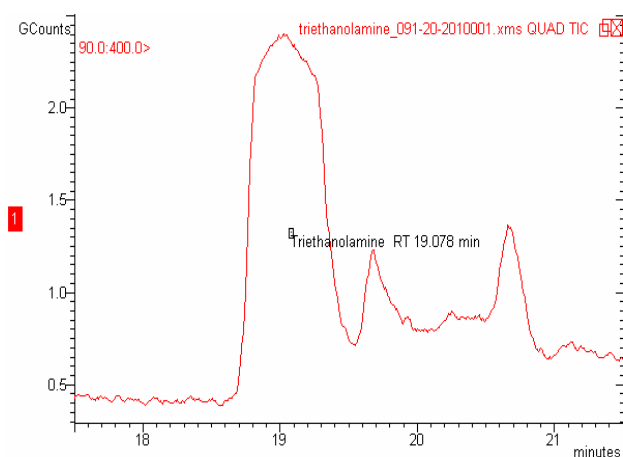
Obr. 14. LC-MS-ESI chromatogram vodnej referenčnej vzorky WB08_09



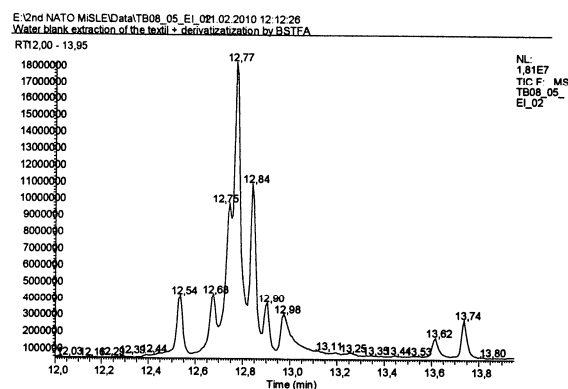
Obr. 15. LC-MS-ESI chromatogram vodnej vzorky W08_09 Chemical A



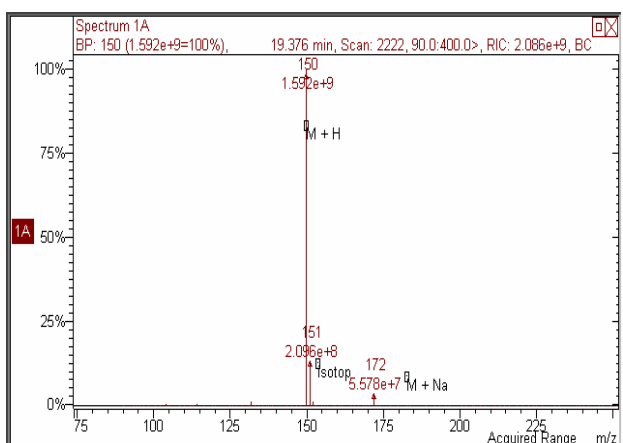
Obr. 18. Spektrum štandardu trietanolamínu meraného pomocou LS-MS-ESI



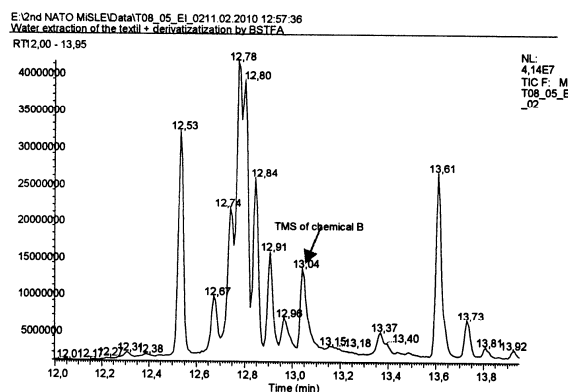
Obr. 16. LC-MS-ESI chromatogram štandardu trietanolamínu



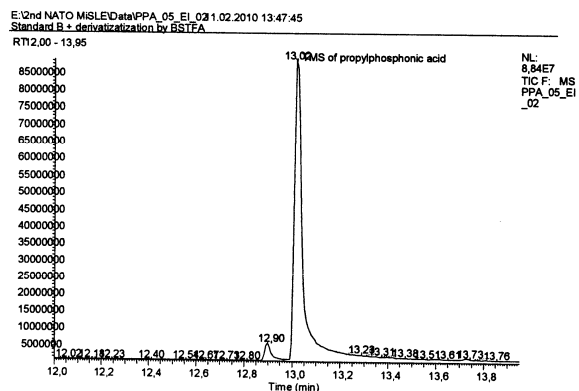
Obr. 19. TIC chromatogram textilnej referenčnej vzorky TB08_04 po BSTFA derivatizácii



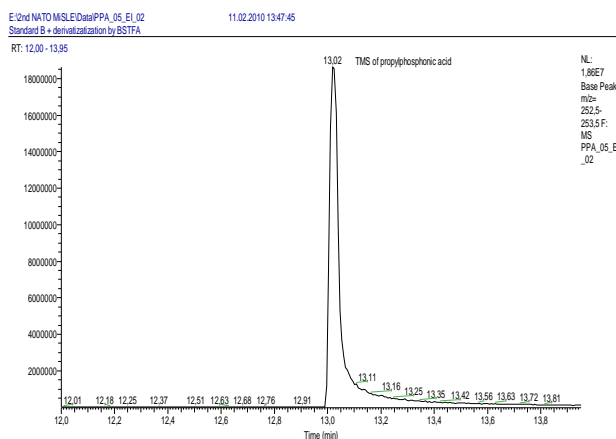
Obr. 17. Spektrum Chemical A nájdenej pomocou LS-MS-ESI vo vodnej vzorke



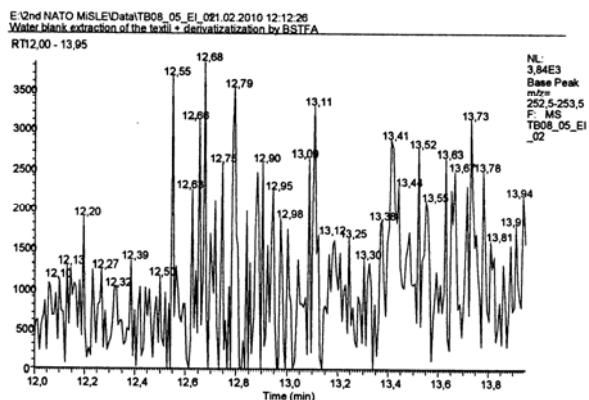
Obr. 20. TIC chromatogram textilnej vzorky T08_04 po BSTFA derivatizácii



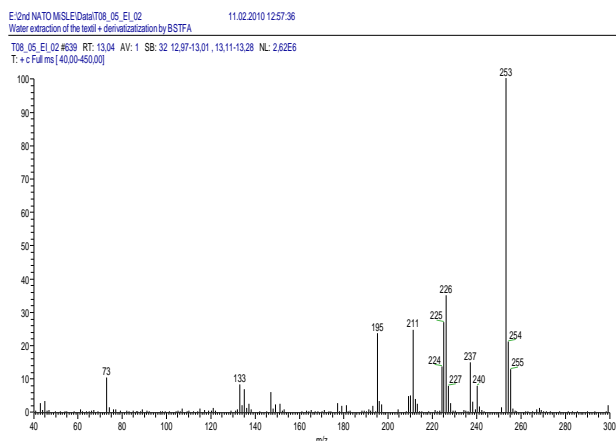
Obr. 21. TIC chromatogram štandardu kyseliny propylfosforitej po BSTFA derivatizácii



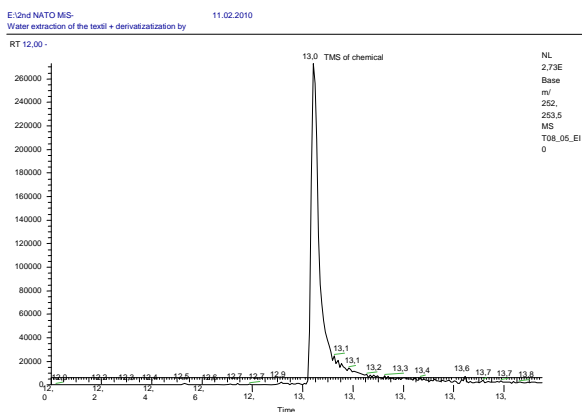
Obr. 24. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 253) štandardu kyseliny propylfosforitej po BSTFA derivatizácii



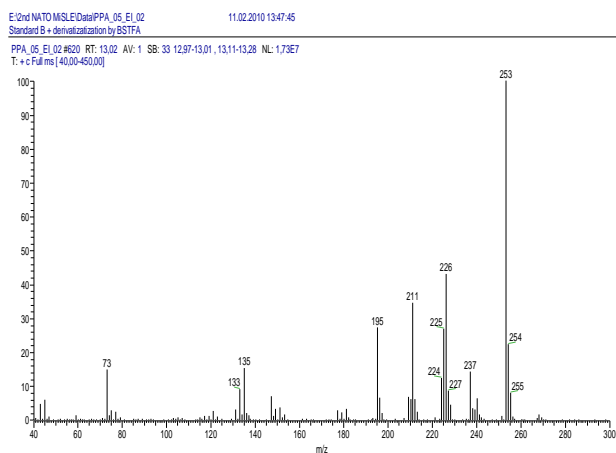
Obr. 22. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 253) textilnej referenčnej vzorky TB08_04 po BSTFA derivatizácii



Obr. 25. EI hmotnostné spektrum Chemical B po BSTFA derivatizácii



Obr. 23. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 253) textilnej vzorky T08_04 po BSTFA derivatizácii



Obr. 26. EI hmotnostné spektrum štandardu kyseliny propylfosforitej po BSTFA derivatizácii

Táto látka nebola prítomná v textilnej referenčnej vzorke TB08_04 (obr. 19, 22). Analýza textilnej referenčnej vzorky TB08_04 bola vykonaná tesne pred analýzou textilnej vzorky T08_04, kvôli zachovaniu reťazca dôkazu. Neznáma látka bola identifikovaná na základe porovnania retenčných indexov a zhody jej MS-spektra (obr. 25) s knižničným spektrom ako trimetylsilyl kyseliny propylfosforitej (PPA je rozkladný produkt organofosforových zlúčenín s propylou skupinou naviazanou na atóm fosforu). Jej prítomnosť bola potvrdená analýzou štandardu kyseliny propylfosforitej pomocou fibra a derivatizáciou pomocou BSTFA (obr. 21, 24, 26).

Táto identifikácia je podľa podmienok AEP-66 považovaná za potvrdzujúcu identifikáciu, vzhľadom na to, že sa Chemical B nepodarilo potvrdiť inou nezávislou metódou¹.

Prítomnosť Chemical B (kyseliny propylfosforitej) v textilnej vzorke nebola potvrdená analýzou LC-MS-ESI. Dôvodom mohla byť nízka výťažnosť organickej a vodnej extrakcie. Použitie selektívnej extrakcie s vyššou výťažnosťou pre túto látku pomocou SPME fibra nebolo možné, z dôvodu absencie nadstavca na manuálnu injekciu pre SPME fiber k prístroju LC-MS-ESI.

4. Záver

Počas druhého NATO laboratórneho cvičenia s kombinovanými vzorkami bola na selektívnu extrakciu chemickej kontaminácie a tým aj vylúčenie prítomnosti rádioaktívnej kontaminácie vo forme ²³⁵U použitá metóda SPE. Jej použitie sa ukázalo ako správne. Zabezpečilo vyššiu výťažnosť analytu, prečistenie vzorky a v neposlednom rade aj veľkou mierou prispelo k nespochybniteľnej identifikácii druhu chemickej kontaminácie.

Na odstránenie biologickej kontaminácie vo forme Francisella Tularensis, bola použitá metóda inaktivácie pomocou UV-žiarenia a filtrácie cez striekačkové koncové filtre, ktorá sa ukázala úspešnou. Na zvýšenie výťažnosti analytu bola v príprave GC-MS použitá cieľná extrakcia analytu metódou SPME, ktorá výrazne prispela k identifikácii druhu chemickej kontaminácie na úrovni potvrdzujúcej analýzy.

LITERATÚRA

1. AEP-66: NATO Handbook for sampling and identification of biological, chemical and radiological agents (SIBCRA), (2009).
2. Valencia J., Instituto Tecnológico „La Maranosa“, Ctra. San Martina de la Vega M-301 km 10,4, La Maranosa – Madrid, 18. november 2009, 2nd NATO MiSLE Instruction, rukopis.
3. Zi-Hui M., Qin L.: Anal. Chim. Acta 435, 121 (2001).
4. Riches J., Morton I., Read R.W., Black R. M.: J. Chromatogr., B 816, 251 (2005).
5. Kanaujia P. K., Pardasani D., Gupta A.K., Dubey D.K.: J. Chromatogr., A 1139, 185 (2007).
6. Rearden P., Harrington P.B.: Anal. Chim. Acta 545, 13 (2005).
7. Munro N. B., Talmage S.S.: Environ. Health Perspec. 107, 933 (1999).
8. Organization for prohibition chemical weapons: Preparation of samples on-site for GC/MS analysis, QDOC/LAB/WI/SP2 (2006).
9. Lee H. S. N., Sng M.T., Basheer Ch., Lee H. K.: J. Chromatogr., A 1196-1197, 125 (2008).

Abstrakt

Druhé NATO laboratórne cvičenie s kombinovanými vzorkami (biologická, chemická, rádiologická a nukleárna kontaminácia) bolo zamerané na vytvorenie štandardného operačného postupu (ŠOP) pri nakladaní s týmito vzorkami a preukázanie schopnosti správne identifikovať jednotlivé kontaminanty. Do laboratórií boli doručené dve vzorky: textilná a vodná vzorka. Na základe výsledkov rádiologického a biologického skríningu, ktoré potvrdili prítomnosť ²³⁵U vo vodnej vzorke a Francisella Tularensis v textilnej vzorke, bolo prijaté rozhodnutie čiastočne upraviť interný postup na úpravu vzoriek obsahujúcich vojenské chemické látky, ich rozkladné produkty a prekurzory. V prípade vodných vzoriek nebolo možné použiť celý postup, ale len jednu jeho vetvu využívajúcu extrakciu na tuhej fáze SPE (solid-phase extraction) na cieľnú extrakciu rozkladných produktov a prekurzorov vojenských chemických látok. V prípade textilnej vzorky bolo možné využiť celý interný postup po jeho miernej úprave doplnením o filtráciu extraktov cez koncové striekačkové filtre s veľkosťou pórov 0,2 μm a využitie mikroextrakcie na tuhej fáze SPME (solid-phase microextraction). Na identifikáciu chemickej kontaminácie boli použité metódy plynovej (GC-MS-EI) a kvapalinovej (LC-MS-ESI) chromatografie s hmotnostnou spektrometriou, plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID), pričom bola požadovaná minimálne úroveň potvrdzujúcej identifikácie podľa požiadaviek AEP-66 (NATO príručka pre vzorkovanie a identifikáciu biologických, chemických a rádiologických látok)¹.

A RAPID METHOD OF CELL WALL POLYSACCHARIDES' DETERMINATION AND ITS APPLICATION IN CEREAL BREEDING

MICHAELA HAVRLETOVÁ, ANDREA HLINKOVÁ, MAGDALÉNA BIELIKOVÁ, and ŠTEFAN MASÁR

Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic
havrlentova@vurv.sk

Keywords: cell wall polysaccharides, dietary fibre, β -D-glucan, evaluation, variability, factors, cereals

Introduction

Cereals present a valuable source of dietary fiber in everyday diet of human being. (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan (hereafter as β -D-glucan) is major polysaccharide constituent of cell walls in the *Poaceae* and is found only in *Poales*, an order that includes cereals¹. Its highest content was observed in barley and oat grains, where it presents 3–11 % of the dry matter². It is a linear and partially water-soluble polysaccharide that consists only of glucose linked through both β -(1 \rightarrow 3)- and β -(1 \rightarrow 4)-glycosidic linkages in various ratios³. β -D-glucan content is affected by environmental factors. Genotype and the environment are significant sources of variation for its content; the ranking of genotypes is generally consistent over the environments. This polysaccharide plays an important role in cell wall architecture and plant development⁴. It has a positive impact on human health in terms of lowering cholesterol and blood glucose levels⁵, increasing immunity against infection and positive influencing of bowel function⁶. On the other hand, the viscous nature of barley β -D-glucan may cause problems in the brewing process. It contributes considerable viscosity to the mash and may cause slow wort filtration and haze formation in the beer⁷. Primarily, the function of β -D-glucan is related to its structure, molecular weight, and interaction with other components.

Cereals are also characterized by high dietary fibre content. Besides good health-beneficial effects, dietary fibre shows high technological value. Its addition to food increases not only nutritional parameters but also reological characteristics of dough⁸. Today there are two reasons to add fibre to food products: to increase the dietary fibre intake and to decrease the caloric density of foods what is coupled with the preparing of functional foods. For this trend, it is important to know good natural sources of total dietary fibre (hereafter as TDF) and its individual compounds, which are good tool for biotechnology.

The aim of our work was to rapidly and exactly char-

acterize a set of cereal cultivars, with the objective to identify suitable sources to be used in a series of crosses in our breeding programs. The results will also be the starting point for further studies which will consider cereals as raw materials for food industry. The development of cultivars with greater β -D-glucan amount should increase the nutritional and economic value of the cereal crop.

Material and Methods

For a rapid screening, mature grains of 112 spring barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.), 99 genotypes of oat (*Avena sativa* L.), and 87 genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) were evaluated for the content of cell wall polysaccharides' β -D-glucan and TDF. After maturation on the experimental fields on the Plant Production Research Center (in Piešťany for barley and wheat and Viglaš-Pstruša for oat), grains were dried and milled to pass a 0.5 mm screen using Ultracentrifugal Mill (ZM 100, Retsch GmbH&Co.KG, Haan/Germany). They were stored in hermetic boxes in temperature of 5 °C. The effect of genotype and environment (e.g. locality and year) on the variability of TDF and its compound β -D-glucan content was studied among selected 10 oat genotypes (5 naked and 5 hulled) of European provenance. The study was carried out on the samples from two localities (Borovce and Viglaš-Pstruša) in two consecutive years (2006 and 2007) and each variety was grown in three different plots of 1.25 m² in a fully randomised block design.

The β -D-glucan level was determined using Mixed-linkage Beta-glucan assay procedure (Megazyme, Ireland). This method is based on the method published by McCleary and Codd⁹ and accepted by the AOAC (Method 995.16) and the AACC (Method 32-23). Samples were suspended and dissolved in a 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6.5), incubated with purified lichenase enzyme, and an aliquot of filtrate was reacted with purified β -glucosidase enzyme. The glucose product was assayed using an oxidase/peroxidase reagent.

The TDF content of cereal grains was determined using Total dietary fibre assay procedure (Megazyme, Ireland). The procedure is based on the methods of Lee et al.¹⁰ and Prosky et al.^{11,12} (AOAC 991.43, AOAC 985.29, AACC 32-07, and AACC 32-05). However, the enzymes in the Megazyme Total dietary fibre kit can also be used in other dietary fibre analytical methods such as AACC Method 32-21 and AACC method 32-06. TDF was determined on duplicate samples of dried and defatted (if fat content is >10 %) material. Samples were cooked at ~100 °C with heat stable α -amylase to give gelatinization, hydrolysis, and depolymerisation of starch; than incubated at 60 °C with protease (to solubilise and depolymerise

proteins) and amyloglucosidase (to hydrolyze starch fragments to glucose); and treated with four volumes of ethanol to precipitate soluble fibre and remove depolymerised protein and glucose (from starch). The residue was filtered; washed with 78 % ethanol, 95 % ethanol, and acetone; dried; and weighed. One duplicate was analyzed for protein and the other was incubated at 525 °C to determine ash. The TDF was the weight of the filtered and dried residue less the weight of the protein and ash. Nitrogen level was determined using Dumas method (CNS-2000 Elemental Analyzer, LECO Corp., USA) and the content of crude protein by next calculation ($N \times 6.25$ for barley and oat, $N \times 5.7$ for wheat).

The polysaccharide's evaluations were calculated on a dry-weight basis using Sartorius MA 45 (Sartorius AG, Goettingen/Germany). With every group of 11 and 7 flours for β -D-glucan and TDF, respectively control flours of known β -D-glucan and TDF contents were used.

Results were given as mean \pm standard deviation of two independent determinations using SPSS for Windows Release 11.5.1. program. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare means and Tukey HSD (Honestly Significantly Different) post hoc test to analyse the influence of genotype and environment, respectively.

Results and discussion

Several methods for the measurement of β -D-glucan and TDF have been developed and reported. Especially in the case of barley for brewing industry, the enzymic method applied to barley was evaluated by an analytical subcommittee of the Cereal Chemistry Division of the Royal Australian Chemical Institute and is now the recommended Australian standard method. Next accurate and reliable is the Carlsberg calcofluor method, which was also evaluated on barley, malt, wort, and beer samples by an analytical subcommittee of the European Brewing Convention. A modification of the original enzymic procedure of McCleary and Codd⁹ commercially available as Mixed-linkage Beta-glucan assay procedure (Megazyme, Ireland) is nowadays the recommended AACC Method (Method 32-22) for measurement of β -D-glucan in cereal grains and unsweetened oat food products⁹.

In our research institute, we have good experiences with streamlined enzymic procedure from Megazyme. This method for the determination of β -D-glucan in grain samples is reliable and robust. Its application in the laboratory increases the simplicity of analysis and number of flour samples (e.g. barley and oats). It is successfully used for the determination of monitored polysaccharide in cereal genotypes preserved in Gene Bank or, on the other hand, in new breeding lines.

A high variability was detected in the β -D-glucan content among cereal species. The mean value was 4.2 % for spring barley, 3.4 % for oat, and 0.7 % for wheat genotypes. Barley and oats are good natural sources of β -D-

glucan, on the other hand wheat doesn't contain high levels of monitored polysaccharide¹³. In barley cultivars, the β -D-glucan values were between 1.9 (Nitran) and 5.4 % (Merkur). Generally, in the literature, the mean content is 3.0–4.5 %. In our evaluations, the highest levels (5.0 % and more) were in genotypes Merkur (5.4 %), Orbit (5.3 %), Heda (5.3 %), Zlatan (5.2 %), Karát (5.2 %), Atlas (5.0 %), and Artibut (5.0 %). The lowest levels (up to 3.0 %) were in genotypes Nitran (1.9 %), Stabil (2.8 %), and Stupický Hanácký (3.0 %) detected. Genotypes with high levels of monitored health-beneficial polysaccharide create the possibility as functional food ingredient. On the other hand, barley genotypes with low amounts are needed in brewing industry.

In oat, the β -D-glucan content ranged between 1.7 and 5.7 %. Our results are corresponding to the determined β -D-glucan values of European oat genotypes (3.9 % and 3.6 %, respectively) published in the literature^{14,15}. Our results show that naked genotypes dispose of higher levels of this metabolite (4.4 % on average) in comparison with the hulled oat, where the mean content was 3.3 % (Table I). The majority (90 %) of naked genotypes contain higher β -D-glucan level than is the average of analysed oat set. The increased β -D-glucan content is connected with the presence of gene *nud* for a hullless type of grain. The future of naked oats is in the feed that provide the largest welfare benefits and their demand as a food crop is on a world-wide scale increasing. Genotypes Terra (5.7 %), Neon (5.4 %), Arnold (5.2 %), Šampionka (4.8 %), Unisignum (4.6 %), Atego (4.6 %), Pendek 4.5 %), Saul (4.5 %), Avenuda (4.3 %), Adam (4.3 %), Izak (4.2 %), Ardo (4.1 %), and Salomon (4.1 %) with the highest level (>4.0 %) observed can be used in breeding and industry as convenient sources of health beneficial polysaccharide.

A relation between the oat glume colour (yellow, white, black) and the β -D-glucan content was also observed. Our results indicate that the black genotypes show the lowest standard deviations in the content of evaluated metabolite. The degree variance of β -D-glucan level expressed as a coefficient of variation displayed the highest value in white hulled oat, next in yellow, and the lowest values were calculated for the genotypes with black glume colour (Table I). Because higher value of variation coefficient directly correlates with lower variance of metabolite biosynthesis within a set, we could state, that black hulled oat with low variation coefficient are characterized by markedly stable biosynthesis of β -D-glucan in the comparison with yellow and white types. Similarly, biosynthesis of other biochemical parameters (proteins, fatty acids, and lipids) also shows to be more stable in black hulled oat¹⁶.

The β -D-glucan content was in our research influenced by year, locality, and genotype, and the interactions of year and genotype as well as interaction of year, locality and genotype (table II). Higher β -D-glucan amounts were showed in drier and warmer year 2007. In naked oat it was at an average from 4.1 up to 4.2 % for the year 2006 and

Table I
Mean values of the β -D-glucan content of naked and hulled oat and of individual groups according to the glume colour

Group of oat	Mean value [%]	Standard deviation	Variation coefficient
Naked	4.4***	0.96	22.03
Hulled	3.3	0.60	18.34
Yellow	3.3	0.62	18.97
White	3.5	0.71	20.55
Black	3.3	0.46	13.89***

*** Significant at $P \leq 0.001$

4.3–4.4 % for the year 2007. In hulled oat, in the year 2006 was the content in range 2.7–3.0 % and 3.0–3.3 % for the next year, respectively. The β -D-glucan content was higher (4.4 % and 3.0 % for naked and hulled oat, respectively) in the locality Vígľaš-Pstruša. In Borovce the amounts were in the range 4.1–4.2 % for naked oat and 2.8–3.1 % for hulled. Generally, colder conditions of cultivation are better for oat cultivation. The knowledge of factors affecting the content and variability of TDF and its compounds can facilitate more effective oat cultivation and its further utilization in the industry.

For the TDF content seed samples of common cereals were detected. Among our samples, oats are best sources of TDF with the mean value of 23.8 % and the range between 10.6 (Adam) and 34.9 % (Zvolen). Barley contains 18.4 % of TDF at the average, the amounts were between 15.7 (CI15) and 21.3 % (CI5). Wheat is not so rich in TDF content, grains contain from 8.3 (Local) up to 14.8 %

(Landrace) TDF with the mean value of 11.7 %.

The TDF content of naked oat ranged between 11.9 % (PS-90) and 13.0 % (Detvan), 12.4 % being the mean value. In hulled genotypes, the mean value of monitored parameter was 33.8 %. From the results obtained it can be stated, that the TDF content was significantly influenced by the presence of glumes (table III). The influence of genotype – as a source of variability – was significant in hulled oat set, where a large range from 30.1 % (Edmund) to 36.2 % (Expander) was observed. Also the effect of locality was observed. The TDF content of naked oat was higher in Vígľaš-Pstruša (13.3 %) compared to 11.5 % in Borovce. In hulled genotypes, the mean TDF content was in Borovce higher (36.4 %) than in Vígľaš-Pstruša (31.3 %). In both groups, the interaction of growing year \times locality was high significant. Mostly the effect of the year 2007 in Vígľaš-Pstruša was observed. The mean TDF value of hulled oat (29.0 %) was sharp decreased compared to the year 2006 (33.6 %). On the other hand, in naked oat grown in Vígľaš-Pstruša in the year 2006 was the mean TDF value strongly increased in comparison with 2007. It was due to differences in magnitude changes in both analysed environments. In the year 2006 it was 13.7 % and 10.7 % in Vígľaš-Pstruša and Borovce, respectively. In 2007, the average TDF content was 12.8 % and 12.2 % in Borovce and Vígľaš-Pstruša, respectively.

Conclusions

A commercially available analytical methods for the measurement of TDF and β -D-glucan content have been used in cereal samples. Barley and oats are good sources of health-promoting β -D-glucan with the average amounts of 4.2 % and 3.4 %, respectively. Naked oats dispose of

Table II
Means squares (MS) from analysis of variance in the β -D-glucan content of analysed oat

Source of variability	All		Naked oats		Hulled oats	
	df	MS	df	MS	df	MS
Model	40	82.15**	20	109.43**	20	54.86**
Year	1	3.38**	1	1.10**	1	2.40**
Locality	1	1.02**	1	1.08**	1	0.15**
Genotype	9	12.32**	4	1.13**	4	2.57**
Year * Locality	1	0.00	1	0.02	1	0.03
Year * Genotype	9	0.57**	4	0.14**	4	1.11**
Locality * Genotype	9	0.16**	4	0.03	4	0.27**
Year * Locality * Genotype	9	0.13**	4	0.14**	4	0.14**
Error	200	0.02	100	0.02	100	0.01
Total	240		120		120	

** Significant at $P \leq 0,01$ (effect significant at the level $\alpha = 0.01$)

Table III
Means squares (MS) from analysis of variance for TDF content of analysed oat set

Source of variability	df	MS	
		Naked oats	Hulled oats
Model	20	462.211**	3484.475**
Genotype	4	2.015	76.745**
Year	1	1.104	0.007
Locality	1	47.313**	386.436**
Genotype x year	4	1.297	6.813
Genotype x locality	4	2.229	6.967
Year x locality	1	20.862**	316.159**
Genotype x year x locality	4	3.812	2.187
Error	40	2.319	6.596
Total	60		

** $P < 0.01$ (effect significant at the level $\alpha = 0.01$)

higher β -D-glucan content in comparison with the hulled. Genotypes with black colour of the glumes account significantly lower standard deviation and variation coefficients in the content of β -D-glucan, what indicates markedly stable biosynthetic mechanism of the studied metabolite. Genotype and environment (year and locality) and their interactions influence the content of both, β -D-glucan and TDF. Higher yields were detected in both analysed parameters in the drier and warmer year 2007 and on the cooler locality Víglaš-Pstruša. Naked oats Izak and Avenuda and hulled Zvolen, listed in the State Varietal Book of the Slovak republic, are good natural sources of β -D-glucan and TDF, respectively.

The work was supported by National Project of Research and Development No. 2003 SP 27/028 0E 02/028 0E 02 from Ministry of Agriculture, Slovak Republic and by Slovak Research and Development Agency under the contract No. VMSP-P-0047-09. The authors are grateful to Ivana Skripčáková for technical participation during TDF analysis and to Michaela Benková, Daniela Dvončová, Peter Hozlár, Pavol Hauptvogel, and Klára Križanová for providing the plant material.

REFERENCES

- Salovaara H.: Cereal Foods World 51, 150 (2006).
- Havrlentová M., Kraic J.: J. Food Nutr. Res. 45, 97 (2006).
- Johansson L., Tuomainen P., Ylinen M., Ekholm P., Virkki L.: Carbohydrate Polymers 58, 267 (2004).
- Buckeridge M.S., Rayon C., Urbanowicz B., Tiné M.A.S., Carpita N.C.: Cereal Chem. 81, 115 (2004).
- Kerckhoffs D.A.J.M., Hornstra G., Mensink R. P.: Am. J. Clin. Nutr. 78, 221 (2003).
- Mälkki Y., Virtanen E.: Lebensmittel-Wissenschaft Technol. 34, 337 (2001).
- Kuusela P., Hämäläinen J.J., Reinikainen P., Olkku J.: J. Inst. Brew. 110, 309 (2004).
- Gómez M., Ronda F., Blanco C.A., Caballero P.A., Apesteguía A.: Europ. Food Res. Technol. 216, 51 (2003).
- McCleary B.V., Cood R.: J. Sci. Food Agric. 55, 303 (1991).
- Lee S.C., Prosky L., DeVries J.W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 75, 395 (1992).
- Prosky L., Asp N.-G., Schweizer T.F., DeVries J.W., Furda, I.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1017 (1988).
- Prosky L., Asp N.-G., Schweizer T.F., DeVries J.W., Furda I.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 75, 360 (1992).
- Havrlentová M., Kraic J.: J. Food Res. Nutr. 45, 97 (2006).
- Redaelli R., Sgrulletta D., DeStefanis E.: Cereal Res. Comm. 31, 185 (2003).
- Grausgruber H., Scheiblauber J., Schönlechner R., Ruckebauer P., Berghofer E.: Genetic variation for plant breeding. Proc. 17th EUCARPIA General Congress, Tulln, 8 – 11 Sept. 2004, (Vollmann J., Grausgruber H., Ruckebauer P., ed.), p. 23.
- Čertík M., Havrlentová M., Ješko D., Bieliková M., Hozlár P., Kraic J.: Agriculture 54, 2 (2008).

M. Havrlentová, A. Hlinková, M. Bieliková, and Š. Masár (Plant Production Research Center Piešťany, Piešťany, Slovak Republic): **A Rapid Method of Cell Wall Polysaccharides' Determination and Its Application in Cereal Breeding**

A commercially available enzymic methods (Megazyme, Ireland) for the quantitative evaluation of

(1→3)(1→4)- β -D-glucan and total dietary fibre, respectively, have been used for rapid screening among cereal cultivars. Their application is possible in identification of cell wall polysaccharides' β -D-glucan and total dietary fibre suitable sources and also in studying factors affecting their content in a series of crosses in breeding programs as well as in biotechnology trends for the purpose of functional foods or nutraceuticals development. We monitored 112 genotypes of spring barley, 99 oat genotypes, and 87 genotypes of spring wheat with the aim to look for good natural sources of health beneficial compounds. The effect of genotype and environment (e.g. locality and year) was also studied and both, genetic and environmental factors had significant effect on the variability in contents of studied parameters.

SPE BASED SAMPLE PREPARATION IN COMBINATION WITH FAST GAS CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF PESTICIDES IN WATER

**ANDREA HERCEGOVÁ, MÁRIA
ANDRAŠČÍKOVÁ, and SVETLANA
HROUZKOVÁ**

Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, Bratislava 81237, Slovak Republic

andrea.hercegova@stuba.sk

Keywords: Sample preparation, Fast GC-MS; Pesticides; Water

Introduction

Pesticides are often detected contaminants in the aquatic environment. This is mainly due to their use in agriculture and their physico-chemical properties that enable transportation and a persistent or pseudo-persistent existence in the water. Several directives and guidelines establish maximum levels of pesticides in water in order to protect the human and environmental health. EEC Directive 98/83/EC has established a maximum allowed concentration of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ for individual pesticides and related products, and of $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for total pesticides in drinking water and $1\text{--}3 \mu\text{g l}^{-1}$ in surface water (EEC Drinking Water Guidelines 1998)¹.

Analytical methods based on gas chromatography²⁻⁵ or liquid chromatography^{2,6} followed by mass spectrometry or tandem mass spectrometry are the most commonly used techniques for the quantification of organic micro-contaminants in water. However, in spite of the recent technical progress, the instrumental quantification limits of the micro-contaminants are still high, around $\mu\text{g l}^{-1}$. Therefore sample preparation step is often the critical step of the whole analysis. The most common technique is the solid-phase extraction (SPE)^{2,6}, which can be used to isolate and preconcentrate a broad range of contaminants in one analysis. While liquid–liquid extractions (LLE techniques) are called as time-consuming, expensive and hazardous to health due to the high volume of potentially toxic solvents used, SPE methods are rapid, present good recoveries and low detection limits^{7,8}. Modern trends in sample preparation are towards the simplification of the process and minimising the organic solvent used with the development and application to environmental samples of liquid-phase microextraction (LPME)⁹⁻¹⁰, the microextraction in solid phase (SPME)¹¹⁻¹³ and stir bar sorptive extraction (SBSE)^{14,15}.

Fast GC techniques satisfy the present-day demands on faster and cost-effective analysis^{16,17}. There are obvious advantages of faster GC compared to conventional capillary GC, mainly shorter analysis time (in minutes range), increased 90 laboratory throughput, reduced costs per sample and improved precision and sensitivity. Nowadays fast GC can be performed on commercial gas chromatographs with standard equipment for high-speed injection, electronic gas pressure control, rapid oven heating/cooling and fast detection. Despite the great efforts in the research of GC amenable pesticide residues analysis

In this study, a fast GC-MS method with narrow-bore column separation for determination of 30 pesticides belonging to different chemical groups as it is shown in Table I (triazoles, triazines, pyrethroids, organophosphates, anilino-pyrimidines, oximinoacetates, chloracetamides) with 2 internal standards (I.S.) – heptachlor and triphenyl-phosphate in water samples at the ultra-trace concentration levels was developed. Fast GC equipped with a PTV injector and a bench-top quadrupole MS detector in combination with SPE sample preparation method was used for the analysis of selected pesticides. The goal was to obtain the validation parameters, such as linearity of calibration curves, limits of quantitation (LOQs), as well as recovery of the used method.

Experimental

Reagents and Materials

Standards of pesticides and internal standards (I.S.) were obtained from various sources (Bayer, Leverkusen, Germany; Dr. Ehrensdoerfer, Augsburg, Germany; Cheminova, Harboore, Denmark; Ciba-Geigy, Basel, Switzerland; Shering, Kenilworth, NJ, USA; Dow AgroScience, Indianapolis, IN, USA; Agrovita, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic) and were of purity > 96 %. There is the list of pesticides in the Table I. Individual solution of each pesticide was prepared in toluene (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at an approximate concentration of 1 mg ml^{-1} . Stock solution of 0.02 mg/mL of all pesticides was prepared in toluene. For calibration seven concentration levels of pesticides were used: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$, what corresponds to 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ of pesticides in water sample; number of analysis replicates for all concentrations levels was 6. Acetonitrile standard solutions were prepared according to the following scheme: $925 \mu\text{l}$ blank sample extract + $25 \mu\text{l}$ TPP ($6 \mu\text{g ml}^{-1}$) + $25 \mu\text{l}$ HEPT ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) + $25 \mu\text{l}$ pesticide standards (various concentrations of dilute solutions which correspond to the above-mentioned concentration levels).

All stock solutions were stored at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ and diluted

solutions at +4 °C. Standards were weighed on Sartorius Analytic MC1 scales (Sartorius, Göttingen, Germany). Magnesium sulfate (MgSO₄) from Lachema (Lachema a. s., Brno, Czech Republic) was annealed at 500 °C (5 h). Filters of 0.45 µm HVLP (Millipore Bedford, MA, USA) were used.

Sample Preparation Method

Sample, obtained from Slovak river, was sampled to the pre-cleaned amber glass bottles and transported to the laboratory under cooling conditions. Upon arrival to the laboratory, the samples were filtered through 0.45 µm, 47 mm nitrocellulose filter (Whatman, Germany) to eliminate particulate matter and other suspended solid matter, and then stored at 4°C in the dark. Preconcentration of the samples was performed using an automated solid-phase extraction (SPE) sample processor PROSPEKT (automated sample preparation with extraction columns) (Spark Holland, Netherland). Pre-filtered water samples (100 ml) were preconcentrated on SPE microcartridges with PLRP-S sorbent (Spark Holland). The cartridges were first conditioned with 10 ml of methanol and 10 ml Milli Q of water at a flow rate of 5 ml min⁻¹. After loading of the sample at a rate of 5 ml min⁻¹, the pesticides were eluted by passing a total volume of 1 ml of acetonitrile at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The extract was dried using anhydrous magnesium sulphate.

GC-MS

GC-MS measurements were performed on an Agilent 6890N GC system coupled to an Agilent 5973 mass-selective detector equipped with a programmed temperature vaporizer (PTV) and an Agilent 7683 autoinjector. MS with electron impact ionization (EI) mode (70 eV) was operated in a selective ion monitoring (SIM) mode. For each pesticide 2 or 3 specific ions were selected and sorted into groups; the used dwell time was 10 ms. PTV was operated in solvent vent mode. Chromatographic separation was performed under a temperature program for column: 60 °C (1.75 min), 60 °C min⁻¹ to 150 °C, 23.8 °C min⁻¹ to 300 °C (1.90 min). The injection volume was 2 µl and after each injection. Helium of 5.0 purity (Linde Technoplyn, Bratislava, Slovak Republic) was used as a carrier gas in constant flow mode. Microbore chromatographic column CP-Sil 8 CB (Varian, Middelburg, The Netherlands) with 5 % diphenyl 95 % dimethylsiloxane stationary phase 15 m × 0.15 mm I.D. × 0.15 µm was utilized and it was connected to a nonpolar deactivated precolumn (1 m × 0.32 mm I.D.) for focousation purposes.

Results and Discussion

The list of pesticides, their belonging to the chemical group and retention times of pesticides are given in the Table I.

Table I
List of the used pesticides, chemical groups and their retention times

Pesticide	Chemical group	t _r [min]
Acetochlor	chloracetamide	5.86
Alachlor	chloracetamide	5.93
Atrazine	triazine	5.35
Azoxystrobin	methoxyacrylates	9.94
Cypermethrin	pyrethroids	9.10
Cyproconazol	triazoles	7.24
Deltamethrin	pyrethroids	9.84
Diazinon	organophosphates	5.49
Dimetachlor	chloroacetamide	5.83
Etofenprox	pyrethroids	9.27
Fluazifop- <i>p</i> -butyl	propionate	7.21
Fluquinconazole	triazoles	7.21
Flusilazol	triazoles	7.12
Chlorpyrifos	organophosphate	6.24
Chlorpyrifos-methyl	organophosphate	5.88
Iprodion	dicarboximides	7.96
Kresoxim-methyl	oximinoacetates	7.10
Lambda-cyhalotrin	pyrethroid	8.42
Metazachlor	chloroacetamide	6.54
Myclobutanil	triazoles	7.09
Penconazole	triazoles	6.58
Pirimifos-methyl	organophosphates	6.09
Prometryn	triazine	6.02
Propargit	sulphite ester	6.07
Pyrimethanil	anilinopyrimidines	5.55
Quizalofop- <i>p</i> -ethyl	aryloxyphenoxy-propionate	9.22
Tebuconazole	triazoles	7.80
Terbuthylazine	triazine	5.46
Triadimenol	triazoles	6.69
Trifloxystrobin	oximinoacetate	7.59

Linearity

The linearity of response of GC-MS in SIM mode was checked in the range of concentrations from 0.001 to 0.25 ng µl⁻¹. One milliliter of a final solution injected into the GC injector system corresponds to 100 ml of a water sample. For calibration the following concentration levels were used: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 ng µl⁻¹, what corresponds to 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 µg l⁻¹ of pesticides in water sample; number of replicates for all concentrations levels was 6. Regression analysis was performed

Table II
Instrumental LODs (S/N=3) [ng µl⁻¹] and LOQs (S/N=10) [ng µl⁻¹]

Pesticide	10 ³ .LOD [ng µl ⁻¹]	10 ³ .LOQ [ng µl ⁻¹]
Cyproconazole	1.1	3.7
Atrazine	0.3	1.1
Terbuthylazine	0.3	0.9
Pyrimethanil	0.3	1.2
Dimetachlor	0.8	2.8
Acetochlor	0.2	0.6
Chlorpyrifos-methyl	0.2	0.9
Alachlor	0.7	2.5
Prometryn	0.1	0.1
Pyrimiphos-methyl	0.7	2.4
Chlorpyrifos	0.8	2.6
Metazachlor	1.2	4.2
Penconazole	0.2	0.7
Diazinon	0.4	1.6
Kresoxim-methyl	0.9	3.1
Myclobutanil	0.4	1.6
Flusilazole	0.6	2.1
Fluazifop- <i>p</i> -butyl	0.8	2.9
Trifloxystrobin	1.2	4.2
Tebuconazole	1.7	5.8
Iprodione	0.8	2.8
Fluquinconazole	0.8	2.7
Etofenprox	0.8	2.7
Azoxystrobin	1.5	5.0

to generate the linear equation of the calibration curve and the coefficients of determination R². For all tested pesticides calculated R² were in the range 0.9867–1.000. Repeatability of peak areas for all pesticides expressed as relative standard deviation (RSDs) ($n = 6$) did not exceed 10 % and met the EU criterion of RSD ≤ 20 % (ref.¹⁸). Instrumental LODs and LOQs calculated from calibration measurements at the lowest calibration levels are presented in Table II. LODs were calculated from signal to noise (S/N) ratios (1:3), LOQs (1:10).

Recovery

Recovery data were evaluated. In the realized experiments, purified extracts of tested water were spiked by representative pesticides at concentration levels 0.005 ng µl⁻¹, 0.01 ng µl⁻¹, 0.1 ng µl⁻¹ and were analysed by fast GC-MS to evaluate the recoveries of the method. To assess the

performance of an analytical method, several criteria have to be considered. At the concentration five-times the limit of determination, pesticides recoveries should be 70–110 % range with relative standard deviations < 20 % (ref.¹⁸). Satisfactory recoveries (> 70 %) using fast GC-MS were obtained from spiked water at the given concentration levels, as shown by data in Table III. Recoveries were acceptable except of atrazine (45.6 %). Problems with the determination can be caused by decomposition or interaction with active sites in the injector liner.

Analysis of real sample

The following five pesticides were found in a real sample: chlorpyrifos-methyl, pyrimiphos-methyl, chlorpyrifos, fluazifop-*p*-butyl and etofenprox. Average concentration (average calculated from triplicate analysis of two parallel samples) and relative standard deviations of parallel samples and of GC-MS analyses are given in Table IV. The determined concentrations of pesticides were in the range of 0.003–0.019 µg l⁻¹. For detected residues in real sample, RSDs values for parallel samples and for GC-MS determinations are lower than 14 %.

Conclusions

These results illustrate the possibility of using fast GC-MS for pesticide multiresidue analysis of water samples. Thirty pesticides can be separated in 11 min. The developed and validated method with the utilization of a PTV injector, a narrow-bore column and a bench top quadrupole MS detector (with EI ionization in SIM mode) combined with SPE sample preparation technique was shown to be sensitive for the determination of selected pesticides at the trace concentration levels in water (0.01–2.5 µg l⁻¹ of pesticides in water sample). A wide range of pesticides with different physico-chemical properties were investigated. With respect to required concentration level for pesticides in water (0.1 µg l⁻¹), acceptable recoveries and repeatabilities were obtained.

This work was supported by the Slovak grant agency VEGA under the Project No. 1/0390/09.

REFERENCES

1. EEC Drinking Water Guidelines 98/83/EC DWD. Brussel 1998.
2. Richardson S.D.: *Water Analysis*: 79, 4295 (2007).
3. Pitarch E., Medina C., Portoles T., Lopez F.J., Hernandez F.: *Anal. Chim. Acta* 583, 246 (2007).
4. Huertas C., Morillo J., Usero J., Gracia-Manarillo I.: *Talanta* 72, 1149 (2007).
5. Barrek S., Cren-Olivé C., Wiest L., Baudot R., Arnaudguilhem C., Grenier-Loustalot M.F.: *Talanta* 79, 712 (2009).

Table III

Results of recovery R (%) experiments of selected pesticides from water at spiking levels 0.005; 0.01 a 0.1 ng μl^{-1} (0.05; 0.1; 1 $\mu\text{g l}^{-1}$)

Pesticide	Spiking level 0.005 ng μl^{-1}		Spiking level 0.01 ng μl^{-1}		Spiking level 0.1 ng μl^{-1}	
	R [%]	RSD [%]	R [%]	RSD [%]	R [%]	RSD [%]
Cyproconazole	68.7	5.8	66.0	6.6	94.3	1.5
Atrazine	48.4	6.1	45.6	4.7	48.4	9.9
Terbuthylazine	91.9	3.5	96.6	2.0	100.3	2.3
Pyrimetanil	81.9	2.9	80.3	2.9	99.4	0.8
Dimetachlor	86.7	4.5	89.1	3.7	93.8	3.3
Acetochlor	80.1	8.2	87.3	4.4	89.8	3.4
Chlorpyrifos-methyl	84.5	5.5	85.8	5.9	91.9	3.3
Alachlor	79.6	5.8	82.1	3.5	92.2	4.9
Promethryn	82.4	7.8	80.4	2.8	81.9	2.0
Pyrimiphos-methyl	73.7	8.5	76.0	4.4	89.1	1.7
Chlorpyrifos	70.4	7.0	78.6	5.2	80.7	8.1
Metazachlor	79.3	12	75.6	7.3	89.2	1.5
Penconazole	85.0	4.3	81.2	5.1	84.0	0.6
Diazinon	83.9	8.1	85.5	5.0	99.7	2.2
Kresoxim-methyl	80.8	3.7	80.0	2.5	87.1	2.3
Myclobutanil	77.1	6.9	96.0	3.1	91.5	1.6
Flusilazole	82.5	2.6	67.2	3.5	85.7	1.8
Fluazifop- <i>p</i> -buthyl	75.7	6.8	77.7	4.4	82.8	4.4
Trifloxystrobin	73.4	7.0	73.3	4.5	85.4	2.2
Tebuconazole	67.6	15	69.5	15	80.8	1.9
Iprodione	78.7	5.5	70.9	8.4	78.3	2.7
Fluquinconazole	84.9	4.8	88.5	1.0	72.6	1.2
Etofenprox	75.1	12	78.5	7.9	79.4	6.1
Azoxystrobin	80.9	19	80.1	9.2	84.2	1.2

Two parallel sample extractions were performed with three repeated GC measurements.

Table IV

Concentration c ($\mu\text{g l}^{-1}$) of pesticides determined in real sample (river Dunaj, Bratislava, Slovakia) and repeatability of measurements expressed as RSD (%)

Pesticide	$10^3 \cdot c$ [$\mu\text{g l}^{-1}$]	RSD _{GC} [%]	RSD _{PA} [%]
Chlorpyrifos-methyl	3	13	10
Pyrimiphos-methyl	4	15	11
Chlorpyrifos	9	8.8	7.0
Fluazifop- <i>p</i> -buthyl	6	16	10
Etofenprox	13	4.6	4.8

Notes: RSD_{PA} – is the RSD for parallel extraction and analysis of two real samples (parallel analysis).
RSD_{GC} – is the RSD for triplicate GC-MS analysis of one extract of a real sample

6. Vanderford B.J., Pearson R.A., Rexing D.J., Snyder S.A.: *Anal. Chem.* 75, 6265 (2003).
7. Ferrer I., Barceló D.: *J. Chromatogr., A* 854, 197 (1999).
8. Rodríguez-Mozaz S, López de Alda M. J., Barceló D.: *J. Chromatogr., A* 1045, 85 (2004).
9. Lambropoulou D.A., Albanis T. A.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 195 (2007).
10. Khalili-Zanjani M. R., Yamini Y., Yazdanfar N., Shariati S.: *Anal. Chim. Acta*, 606, 202 (2008).
11. Goncalves C., Alpendurada M.F.: *J. Chromatogr., A* 963, 19 (2002).
12. Beceiro-González E., Concha-Grana E., Guimaraes A., Goncalves C., Muniategui-Lorenzo S., Alpendurada M.F.: *J. Chromatogr., A* 1141, 165 (2007).
13. Reyzer M. L., Brodbelt J. S.: *Anal. Chim. Acta* 436, 11 (2001).
14. Ochiai N., Sasamoto K., Kanda H., Nakanuta S.: *J. Chromatogr., A* 1130, 83 (2006).
15. Ochiai N., Sasamoto K., Kanda H., Pfannkoch E.: *J. Chromatogr., A* 1200, 72 (2008).
16. Matisova E., Domotorova M.: *J. Chromatogr., A* 1000, 199 (2003).
17. Kirchner M., Matisová E., Hrouzková S., de Zeeuw J.: *J. Chromatogr., A* 1090, 126 (2005).
18. Council Directives 94/43/EC: *Off. J. Eur. Com. L* 227, 231(1994).

SIMPLE METHOD FOR LEATHER EMISSION MEASUREMENTS

EVA KRÁĽOVIČOVÁ^a, JANA LAKATOŠOVÁ^b, and JÁN HRIVŇÁK^b

^a Regional Authority of Public Health Service, Bratislava Capital of the Slovak Republic, Ružinovská 8, 820 09 Bratislava, ^b The Research Institute of Viticulture and Enology, Matúšková 25, 831 01 Bratislava, Slovak Republic hrivnak@yuvr.sk

Key words: Headspace, all-glass syringe, Tenax TA.

Introduction

In the manufacturing process of footwear, leather and artificial leather, volatile organic compounds (VOCs) are used as cleaners, primers, adhesives and paints. VOCs can be released continuously from products while you are using them and can also accumulate up to a large amount while they are in storage. In automotive industry the control of VOCs emission from interiors began 20 years ago. Many cars interior VOCs are evolved from leather or synthetic leather.

In the meantime a lot of various emission test methods have been developed. The most important methods are VDA 270, VDA 275, VDA 277 and VDA 278. Other methods are based on these methods. Furthermore there are many emission chamber tests (e.g. VDA 276)¹.

Each of these methods is suitable for analysis of a different group of substances. The method VDA 277 (static headspace) is used for determination of common volatile organic compounds (C₄–C₁₂). A small leather piece is heated in a small vial (microchamber) and afterwards the air above the test specimen is analyzed by GC-FID. The result is a sum of content of VOCs in $\mu\text{g g}^{-1}$. Acetone is used as a calibration substance. Automated microchamber/thermal extractors provide industry and researchers with a versatile and automated tool for materials testing^{2,3}.

The test method based on testing a small test piece in a microchamber has a drawback: small source means low absolute amounts of emissions, and this may give problems with sensitivity and reproducibility of the analytical technique. Moreover, flashing air dilutes the sample transporting the evolved VOCs into adsorption column.

The present work outlines the analysis of VOCs emission from leather using an all-glass syringe aiming at reducing costs and time for emission testing as compared to conventional emission test microchamber.

Chromatographic conditions and instrumentation

Analyses were carried out on a GC Top Series, CE Instruments (Rodano-Milano, Italy) and a computer program (Shimadzu, Class-VP.2, SP1) was used for data acquisition. The chromatograph was equipped with FID and a fused silica VF-5ms capillary column of 25 m length \times 0.25 mm I.D. and 0.25 μm film thickness (Varian, Lake Forest, CA, USA). The chromatographic elution was temperature programmed as follows: isothermal at 30 °C (1 min), then increased from 30 to 175 °C at a rate of 10 °C min⁻¹. The temperature of the inlet chamber was 230 °C and helium was used as a carrier gas.

The 30-ml all-glass syringe (Poulsen & Graff, Wertheim, Germany) was used for the static headspace analysis. A piece of a planar leather sample with a diameter corresponding to the I.D. + 2 mm of the syringe was weighed, placed on the piston, the headspace adjusted and the neck of the syringe stopped ($t=0$). After equilibration at 23 \pm 1 °C the microcolumn filled with 15 mg of 60–80 mesh Tenax TA (Poulsen & Graf, Wertheim, Germany) was directly connected to the syringe and the headspace aspirated at a rate of 10 ml/min. The loaded microcolumn was thermally desorbed (at 230 °C of 1 min at 10 kPa) in a modified GC inlet⁴. After desorption the carrier gas pressure was increased to 60 kPa and the temperature program started.

Results and discussion

Gas tight contact of the leather margin to the inner syringe wall prevents the diffusion of VOCs from the bottom surface of the planar sample into headspace, the VOCs only from the upper leather surface are emitted. A chromatogram of a planar leather sample (OD of 24 mm, thickness of 1 mm and weight of 251 mg) is shown in Fig. 1. Acetone, methylisopropyl-ketone and isopropylbenzene were chromatographically identified as the main components of a sample. The repeatability of the method was investigated by subsequent ($n=7$) analysis of 10 ml headspace of the same sample piece of leather after 20 min equilibration. The obtained relative standard deviation expressed as a sum of the peaks area ($s_r=7.28\%$) in Table I indicates good repeatability of the method. Using the calibration substance acetone (VDA 277), we have found the total amount of VOCs in a leather sample (Fig. 1) to be 71.4 ng g⁻¹ (expressed as a sum of the peaks area).

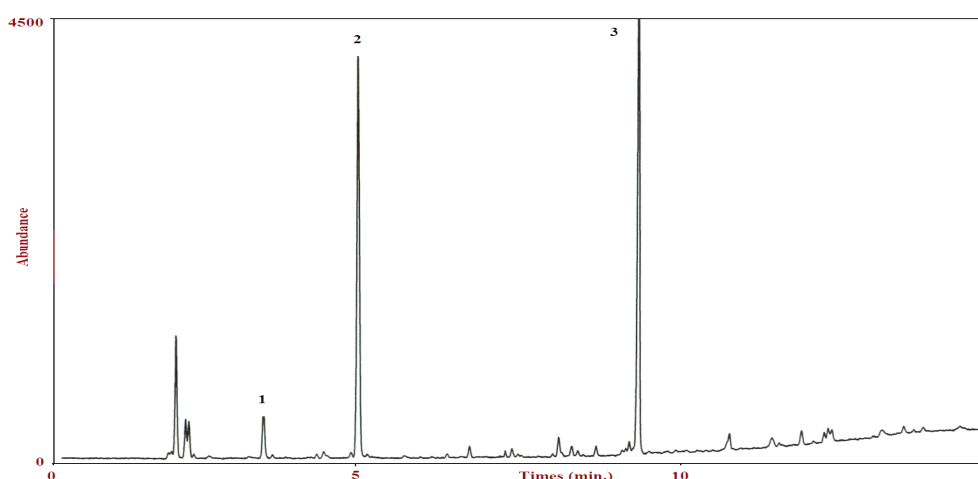


Fig. 1. Chromatogram of a planar leather sample. Peaks: (1) acetone, (2) methylisopropylketone, (3) isopropylbenzene

Table I
Method repeatability

Peaks area · 10 ² (counts)						Mean	s (n=7)	s _r [%]	
280	265	246	244	233	232	236	248	18	7.28

s – standard deviation, s_r – relative standard deviation

Table II
Area vs. equilibration time

Time, min	5	10	20	30	60
Peaks area × 10 ² , counts	388	384	419	402	418

The equilibration time was estimated analysing the leather sample at various time intervals (from 5 up to 60 min). The results in Table II shows the equilibration time of 20 min sufficient for the sample analysis.

The proposed method is simple, there is not flashing air dilution of the sample transporting the evolved VOCs into adsorption column as in the case of conventional microchamber extractors, is sufficiently sensitive and suitable for the leather emission measurements, moreover, may be useful in laboratories with a lack of appropriate apparatus.

REFERENCES

- Schultz H., Matthes B., Schröpfer M.: *IULTCS II. Eurocongress Istanbul, Istanbul, 24-27 May, 2006.*
- Markes International Ltd.: Unit D3 Llantrisant Business Park, Pontyclun, RCT, YW United Kingdom.
- Eurofins Environment A/S: DK-8464, Galten, Denmark.

- Hrivňák J., Kráľovičová E., Tölgyessy P., Ilavský J.: *J. Occup Health 51*, 173 (2009).

E. Kráľovičová^a, J. Lakatošová^b, and J. Hrivňák^b
^aRegional Authority of Public Health Service, Bratislava,
^bResearch Institut of Viticulture and Enology, Bratislava,
 Slovak Republic): **Simple Method for Leather Emission Measurements**

All-glass syringe with a sample to create the headspace and a microcolumn, filled with 15 mg of Tenax TA, for collection the emitted compounds, were used. An example of the method analysis is presented.

ANALYSIS OF WINE AROMA COMPOUNDS BY SOLID-PHASE MICROCOLUMN EXTRACTION

**JÁN HRIVŇÁK, JANA LAKATOŠOVÁ,
VLADIMÍR ŘEPKA, and JAROSLAVA
KAŇUCHOVÁ-PÁTKOVÁ**

*Institute of Viticulture and Enology, Plant Production
Research Centre (PPRC), Matúškova 25, 831 01 Bratislava,
Slovakia
hrivnak@vurv.sk*

Keywords: GC, wine, static headspace, microcolumn

Introduction

Sample preparation is one of the most critical steps in chromatographic analysis. Solvent-free extraction methods based on the partitioning of analytes between a gaseous and a stationary phase has become increasingly important and widely applied in research during the last decade. Solid-phase microextraction (SPME) is a solvent-free extraction method introduced by Pawliszyn and co-workers¹. However, conventional SPME has some drawbacks such as fibre fragility, and low sorption capacity². Some alternative extraction techniques derived from SPME, such as microextraction in a packed syringe³ and stir bar sorptive extraction⁴ address these limitations.

The main objective of presented work was to develop a rapid, simple and inexpensive method for analysis of a broad spectrum of wine aroma compounds (from acetaldehyde up to 2-phenylethanol) in one sample run.

Materials and Methods

Analysis were carried out on a GC 8000 Top Series, CE Instruments (Rodano-Milan, Italy) equipped with a modified inlet^{5,6}. The microcolumn of 1mm I.D. was packed with 60–80 mesh Tenax TA (Alltech, Deerfield, IL, USA). VF-WAXsm silica capillary column of 30 m length \times 0.25 mm I.D. and 0.25 μ m film thickness (Varian, Lake Forest, CA, USA) was used. The chromatographic elution was temperature programmed as follows: isothermal at 30 °C (5 min), then increased to 220 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ and hold 5 min. The inlet chamber temperature was 230 °C and the temperature of FID detector 250 °C. Helium was used as a carrier gas.

A 100 ml of the wine sample containing 20 % NaCl was transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask and vigorously shaken for 1 min at the temperature of 22 \pm 1 °C.

After equilibration the microcolumn was inserted into the flask and from the distance of 1–2 cm from the level the headspace of 10 ml was aspirated through the microcolumn at a flow rate of 2–3 ml min⁻¹ using an all-glass syringe (Poulten & Graf, Wertheim, Germany). The loaded microcolumn was transferred into the modified GC inlet and the trapped analytes desorbed for 1 min at 230 °C and carrier gas pressure of 10 kPa. After desorption, the pressure was increased to 60 kPa and the chromatographic program was started.

Results and Discussion

Fig. 1 shows a chromatogram of wine aroma compounds ('GrüneVeltliner', Slovak origin) analysed under the above conditions. The identification of peaks was performed by analysing model mixtures containing 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 adsorbent in the microcolumn is the breakthrough volume of analytes and the aspirated volume of headspace. On Tenax TA at 20 °C, among the compounds listed in Fig. 1, ethanol exhibit the lowest breakthrough volume of 1,80 l g⁻¹ (ref.⁷). On this basis, all the compounds in Fig. 1 are selectively adsorbed on 10–15 mg of Tenax TA, when 10 ml of the headspace is used. Due to low water affinity and low desorption temperature, Tenax TA was selected to trap the volatiles.

During the adsorption studies we have found that full adsorption of all the sample volatiles is not preferable, because the broad peak of ethanol on chromatograms interferes with a near eluting peaks. Therefore we have decided to use only 2,5 mg of Tenax TA in the microcolumn and work 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 analysis.

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 (\times 0.25 mm I.D.). This means that the microcolumn is practically a part of the capillary column, which results in obtaining of non-dispersed peaks even at the beginning of a chromatogram (without cryofocussation or subambient temperatures). The method is useful for analysis of both very volatile and high boiling aroma compounds in one sample run and can be used to compare volatile profile from different types of wines⁸.

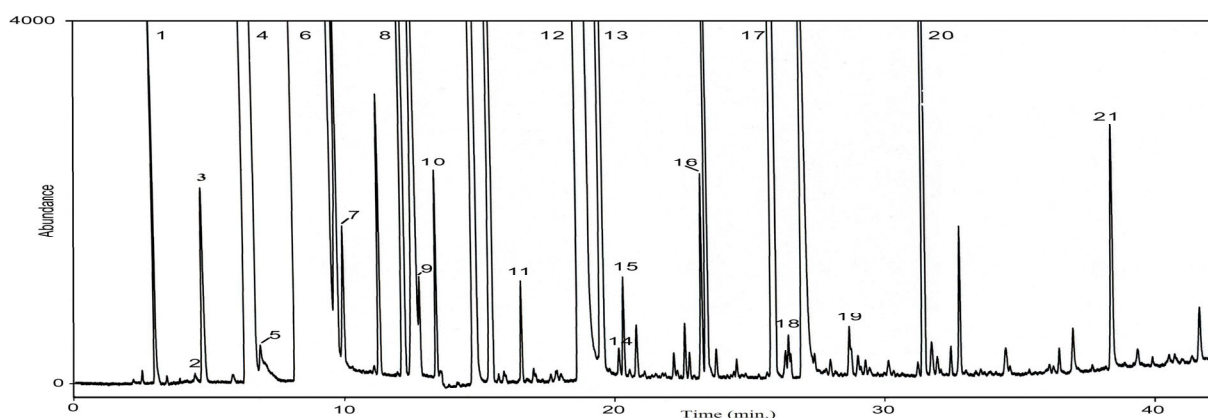


Fig. 1. **Chromatogram of wine aroma compounds** ('GrünerVeltliner', Slovak origin); Peaks: (1) acetaldehyde; (2) acetone; (3) methylacetate; (4) ethylacetate; (5) 2-butanon; (6) ethanol; (7) propylacetate; (8) i-butylacetate; (9) propanol; (10) butylacetate; (11) butanol; (12) i-amylalkohol; (13) ethylhexanoate; (14) pentanol; (15) hexanol; (16) hexylacetate; (17) ethyloktanoate; (18) heptanol; (19) linalool; (20) ethyloktanoate; (21) 2-phenylethanol

Conclusion

A simple and inexpensive headspace method for analysis of broad spectrum wine aroma compounds (from acetaldehyde up to 2-phenylethanol) using microcolumn filled with 2,5 mg of Tenax TA is presented. The microcolumn was thermally desorbed in the inlet of gas chromatograph.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency APVV - 0550-07.

REFERENCES

1. Arthur C. L., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 62, 2145 (1990).
2. Bigham J., Medlar J., Kabir A., Shende C., Alli A., Malik A.: *Anal. Chem.* 74, 752 (2002).
3. Lou D-W., Lee X., Pawliszyn J.: *J. Chromatogr., A* 1201, 228 (2008).
4. Baltussene E., Sandra P. J. F., David F., Cramers C. A.: *J. Microcol. Sep.* 11, 737 (1999).
5. Hrivňák J., Kráľovičová E., Tölgyessy P., Ilavský J.: *J. Occup. Health* 51, 173 (2009).
6. Hrivňák J., Tölgyessy P., Fígedyová S., Katuščák S.: *Talanta* 80, 400 (2009).
7. Scientific Instrument Services: Tenax TA Breakthrough Volume Data, Ringoes, New York, USA 1996–2004 <http://www.sisweb.com/index/referenc/tenaxta.htm>, stored data 10. 5. 2004.
8. Kružlicová D., Mocák J., Hrivňák J.: *J. Food Nutr. Res.* 47, 37 (2008).

URČENIE PÔVODU SLOVENSKÝCH DESTILÁTOV POMOCOU SNIF-NMR

ANTÓNIA JANÁČOVÁ^a, ANDREA ŠTECOVÁ^b, SYLVIA CIFROVÁ^b, PAVEL MÁJEK^a, ĽUBOŠ ČIRKA^c a IVAN ŠPÁNIK^a

^a Ústav analytickej chémie FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Colné laboratórium SR, Bajkalská 24, 821 09 Bratislava, ^c Ústav informatizácie, automatizácie a matematiky chémie FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
ivan.spanik@stuba.sk

Autentické regionálne potravinové výrobky sú často vnímané ako „výrobky s pridanou hodnotou“, pričom zákazník často predpokladá, že pochádzajú z prírodných surovín a preto sú bezpečnejšie. Avšak tieto predpoklady sú veľmi zriedkavo podporené aj spoľahlivými analytickými údajmi, preto sa zákazníci a kontrolné orgány musia spoľahnúť výhradne na údaje poskytnuté výrobcom. Jed-

nou z mála analytických metód oficiálne prijatou EU na určenie pôvodu, geografického regiónu a technologického postupu použitého pri výrobe sú metódy využívajúce izotopové pomery prvkov. Nevýhodou týchto metód je nákladná inštrumentálna technika a potreba špecifických databáz pre jednotlivé potravinové komodity. Navyše správna interpretácia nameraných údajov vyžaduje široké znalosti geologických a klimatických podmienok uplatňujúcich sa počas pestovania a výroby danej potraviny. Cieľom práce bolo klasifikovať vínné destiláty a destiláty ochutené borievkami vyrábané na Slovensku pomocou stanovenia pomerov $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v CH_3 (D/H)I a CH_2 (D/H)II skupinách etanolu pomocou SNIF-NMR. Získané údaje sa spracovali štatistickými postupmi, ktoré umožnili identifikovať pôvod jednotlivých destilátov ako aj určiť vstupné suroviny použité pri výrobe destilátov

Táto práca bola podporená finančným mechanizmom EHP na základe zmluvy číslo SAV-EHP-2008-02-05.

IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN DISTILLATE OBTAINED FROM SORBUS DOMESTICA (SERVICE TREE)

SOLOMIYA PYSAREVSKA^{a,b}, ANTÓNIA JANÁČOVÁ^a, and IVAN ŠPÁNIK^a

^a Institute of Analytical Chemistry FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, ^b Department of Analytical Chemistry, Ivan Franko National University, Kyryla and Mephodiya 6/8, 79005 Lviv, Ukraine
ivan.spanik@stuba.sk

Alcoholic beverages made from fruit, mainly slivovica, hruškovica, čerešnovica, marhuľovica, are very popular in Slovakia. But as a queen of the distilleries is signed Oskorušovica. This type of alcoholic beverage is made from fruit of Service Tree (*Sorbus Domestica*). The small fruit is crossbred of pear and service and has an apple or pear shape. The Service Tree is rather rare species in

Slovak and Czech republics because it grows only in some parts of these countries, mostly in Záhorie, Morava and České stredohoří. Service trees start to produce the fruit after 40 years. Except of specific taste and aroma this is a reason why Service tree distillate (Oskorušovica) is very valued and sought by experts. In our work we focused on investigation of volatile organic compounds (VOC) present in this alcoholic beverage by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Volatiles from sample were extracted either by headspace solid phase microextraction using (DVB/CAR/PDMS) or liquid liquid extraction into pentane.

This work was supported by EHP financial mechanisms under contract number SAV-EHP-2008-02-05 and State Program SP06KOA02 part 2003SP200280203.

POROVNANIE VYBRANÝCH EXTRAKČNÝCH TECHNÍK V GC-MS ANALÝZE PRCHAVÝCH ZLÚČENÍN VO VZORKÁCH MEDOV

**ANTÓNIA JANÁČOVÁ, IVAN ŠPÁNIK
a ZUZANA ŠUSTEROVÁ**

Ústav analytickej chémie FCHPT STU, Radlinského 9,
812 37 Bratislava, Slovenská republika
ivan.spanik@stuba.sk

Úvod

Med predstavuje dôležitú súčasť nášho jedálneho lístka, nielen pre jeho sladkú chuť ale aj nutričné hodnoty, ktoré obsahuje. Zákazník je však často zavádzaný, či už výrobcami alebo predajcami a miesto kvalitného prírodného produktu si kupuje len imitáciu, ktorá je vlastne zmesou rôznych cukrov a aditív. Pôvod medu môže byť kontrolovaný buď analýzou peľu (melissopalynology) alebo viacerými analytickými parametrami, napríklad sledovaním typu a pomeru cukrov kvapalinovou chromatografiou, pomerom izotopov stabilných prvkov IRMS alebo v posledných rokoch aj zložením prchavých zlúčenín (VOC) pomocou plynovej chromatografie. Nakoľko je med veľmi viskózna matrica, pokiaľ sa chce analyzovať VOC, je potrebné vybrať najvhodnejšiu prekoncentračnú metódu. Podľa literatúry sa najčastejšie na extrakciu používa mikroextrakcia tuhou fázou (SPME), extrakcia rozpúšťadlom (SE), extrakcia parami rozpúšťadla (SDE), dynamický headspace (DHS) a extrakcia pomocou ultrazvukového kúpeľa (USE).

Cieľom tejto práce bolo otestovať viaceré rozpúšťadlové ako aj bezrozpúšťadlové prekoncentračné techniky, ktoré sa používajú pri extrakcii prchavých zlúčenín zo vzoriek medu. Sledoval sa vplyv jednotlivých techník na výťažnosť ako aj rôzna polarita použitého rozpúšťadla, či sorbentu.

Experimentálna časť

Vzorka

Na analýzu sa použila vzorka jednokvetového agátového medu pochádzajúceho zo Slovenska.

Prekoncentračné techniky

Mikroextrakcia na tuhej fáze (SPME)

Na testovanie najvhodnejšieho SPME sorbentu sa vybrali štyri typy vlákna 75 μm CAR/PDMS, 100 μm PDMS, 65 μm PDMS/DVB StableFlex, 85 μm PA od firmy Supelco. Každé vlákno bolo pred meraním kondicionované podľa postupu výrobcu. Vodný roztok medu sa pri-

pravil do 15ml sklenenej vialky navážením 4 g medu, 0,5 g NaCl, pridaním 1 ml deionizovanej vody a magnetického miešadla. Ekvilibrácia vzorky a extrakcia prchavých zlúčenín z medu prebiehala vo vodnom kúpeli pri teplote 60 °C, každý krok trval 30 min. Desorpcia extrahovaných látok z vlákna prebiehala priamo v GC injektore GC-MS prístroja.

Kvapalinová extrakcia (LLE)

Pri kvapalinovej extrakcii sa sledovala extrakčná lisa troch rôzne polárnych rozpúšťadiel, pentánu, dietyléteri a ich zmesi v objemovom pomere 1:2. 40 g medu sa rozpustilo v 10ml deionizovanej vody. Na zlepšenie prestupu organických látok sa do roztoku pridalo 4 g NaCl. Takto pripravená vzorka sa extrahovala v oddeľovacom lieviku 4× 15 ml rozpúšťadla. Po ustálení rovnováhy sa odoberali organické časti, ktoré boli nakoniec spojené a zakoncentrované.

Ultrazvuková extrakcia (USE)

Extrakcia zlúčenín ultrazvukom prebiehala v okrúhlej 200ml banke, kde sa navážilo 40 g medu, 4 g NaCl a pridalo sa 10 ml deionizovanej vody na zníženie viskozity vzorky. Doba extrakcie bola 15 min. Po extrakcii sa roztok preliel do separačného lieviku, pretrepal s MgSO₄. Odobraná organická vrstva bola zakoncentrovaná. Pri ultrazvukovej extrakcii sa sledoval vplyv 4 rozpúšťadiel o objeme 60 ml, popri pentáne, dietyléteri a ich zmesi sa testoval aj dichlórmetán.

Kvapalinová extrakcia s miešaním (MSE)

Extrakcia magnetickým miešadlom prebiehala v okrúhlej banke s objemom 200 ml. Vzorka bola pripravená rovnako ako pri USE, navyše sa pridalo magnetické miešadlo. Vzorka sa pretrepávala pri vysokých otáčkach 15 min. Ďalší postup úpravy ako aj použité rozpúšťadlá sú totožné s predchádzajúcou technikou (USE).

Všetky extrakty získané extrakciou rozpúšťadlom boli zakoncentrované do finálneho objemu 2 ml Kuderna-Danishovou destiláciou.

Každá prekoncentračná metóda sa vykonala v dvoch navzájom nezávislých paralelných vzorkách.

Plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou

Na plynovochromatografickú separáciu sa použil plynový chromatograf Agilent 6890N so split/splitless injektorom vybavený automatickým dávkovačom a hmotnostným detektorom Agilent 5975B. Merania prebiehali na nepolárnej kolóne HP-5MS s dĺžkou 30 m, vnútorným priemerom 0,25 mm a hrúbkou stacionárnej fázy 0,25 μm . Ako nosný plyn sa použilo hélium s konštantným

prietokom 1 ml. Teplotný program bol zvolený nasledovne: 40 °C na 15 min, prvá teplotná rampa 2 °C min⁻¹ až do teploty 200 °C, druhá teplotná rampa 10 °C min⁻¹ až do 240 °C, ktorá sa ponechala 10 min. Celkový čas analýzy bol 109 min. Z kvapalných extraktov sa dávkoval objem 1 µl v splitless móde pri teplote injektora 220 °C. Desorpcia SPME pri rovnakom nastavení injektora trvala 10 min. Teplota GC-MS prevodníka bola udržiavaná na teplote 280 °C. Hmotnostný spektrometer pracoval v EI móde s energiou elektrónov 70 eV. Teplota kvadrupólu a iónového zdroja boli zvolené na 150 °C a 230 °C. Na analýzu sa použil skenovací mód v rozsahu 29–300 *m/z*. Skenovacia rýchlosť bola 2 skeny za sekundu. Dáta z GC-MS sa zbierali a spracovávali pomocou softvéru Agilent MSD ChemStation. Pri identifikácii sa využívali hmotnostné knižnice Wiley7n a NIST5.

Zlúčenina bola považovaná za identifikovanú, ak zhoda pri porovnaní s knižnicou bola väčšia ako 90 % a zároveň sa jej identita potvrdila aj porovnaním retenčných indexov z literatúry alebo dostupnými štandardmi. Každé meranie bolo uskutočnené 2×.

Výsledky a zhrnutie

Cieľom práce bolo porovnať rôzne prekoncentračné metódy, posúdiť ich vhodnosť pri úprave vzorky medu s ohľadom na extrakciu prchavých zlúčenín. V tabuľke sú uvedené všetky identifikované zlúčeniny extrahované rôznymi metódami a rôznymi sledovanými rozpúšťadlami/sorbentmi.

Prvou sledovanou metódou predúpravy vzorky bola klasická opakovaná kvapalinová extrakcia, kde sa sledoval vplyv troch rôznych polárnych rozpúšťadiel na výťažnosť extrakcie zlúčenín. Spomedzi všetkých testovaných metód úpravy vzorky sa kvapalinová extrakcia ukázala ako najúčinnnejšia čo sa týka počtu extrahovaných zlúčenín. Pri nami zvolených integračných parametroch sa na chromatogramoch detegovalo 300 až 500 zlúčenín v závislosti od polarít rozpúšťadla. Tieto patrili hlavne medzi uhľovodíky, či už lineárne (napríklad alkány C9-C19) alebo vetvené (napríklad 2,4-dimetylpentán, 4,6-dimetyldodekán). Aj keď počet extrahovaných zlúčenín je najvyšší, ich identifikácia bola veľmi ťažká vzhľadom na veľmi podobné hmotnostné spektrá a nedostupnosť štandardov. Z tohto dôvodu je počet pozitívne identifikovaných zlúčenín pri LLE veľmi nízky. Z práce vyplynulo, že všetky sledované rozpúšťadlá extrahovali rovnaké zlúčeniny, avšak s rôznou výťažnosťou. Najlepšiu extrakčnú silu preukázal polárny dietyléter a nepolárny pentán avšak použitie ich zmesi nie je vhodné.

Druhou testovanou metódou bola ultrazvuková extrakcia pri laboratórnej teplote podľa Alissandrakisa a spolupracovníkov¹. Podstatou tejto metódy je previesť analyty z vodnej fázy vzorky do organického rozpúšťadla ultrazvukovými vlnami. Na základe výsledkov LLE, sa pri

extrakcii použili tie isté rozpúšťadlá. Okrem nich sa testoval aj dichlórmetán. Zistilo sa, že ultrazvuková extrakcia extrahuje podobné zlúčeniny ako LLE. Opäť sa identifikovali prevažne uhľovodíky (alkány, alkény) ale aj deriváty benzénu (xylény, etylbenzén). Avšak počet zlúčenín je v porovnaní s LLE nižší (160–450 zlúčenín). Najlepšiu extrakčnú silu preukázal dietyléter, tak pri extrakcii polárnych ako aj nepolárnych zložiek medu.

Nakoľko kvapalinová extrakcia je účinná v počte extrahovaných zlúčenín a miešanie vzorky pri ultrazvukovej extrakcii umožňuje zachytiť aj iné chemické typy zlúčenín, rozhodli sme sa skombinovať tieto dve techniky a vyskúšať extrakciu rozpúšťadlom miešaním magnetickým miešadlom pri vysokých otáčkach po dobu 15 min. Počet nájdených zlúčenín závisí od polarít rozpúšťadla, najmenej (350) sa detegovalo v zmesi pentánu a éteru, najviac (500) v dietyléteri. To je v súlade s výsledkami pozorovanými pre LLE. Z hľadiska účinnosti extrakcie sa dietyléter ukázal opäť ako najlepší.

V porovnaní s predchádzajúcimi metódami, nastal výrazný posun v type extrahovaných zlúčenín. Okrem uhľovodíkov, derivátov benzénu, či alkoholov sa podarilo extrahovať aj terpény, napríklad linalool, lilac aldehydy, hotrienol, epoxylinool alebo β-damascenón. Tieto zlúčeniny sa dostávajú do medu priamo z rastliny a teda sú charakteristické pre jeho botanický pôvod.

Poslednou študovanou metódou bola mikroextrakcia tuhou fázou, kde sa porovnávali rôzne typy sorbentov, polydimetylsiloxán (PDMS), polyakrylát (PA), zmes karboxénu s polydimetylsiloxánom (CAR/PDMS) a polydimetylsiloxán s divinylbenzénom (PDMS/DVB). Počet detegovaných píkov sa pohybuje v rozsahu 150 až 250 zlúčenín v závislosti od použitého SPME vlákna. Toto číslo je spomedzi sledovaných metód najnižšie. Treba však poznamenať, že počet identifikovaných zlúčenín je jednoznačne najvyšší v porovnaní s rozpúšťadlovými technikami a niekedy je pomer identifikovaných k detegovaným až 1:3. V tomto prípade bola totiž identifikácia jednoduchšia hlavne kvôli dostupnosti štandardov a čistejším hmotnostným spektrám detegovaných zlúčenín. Navyše pomocou tejto prekoncentračnej techniky sa podarilo extrahovať širokú škálu zlúčenín, napríklad terpény, aldehydy a ketóny, mastné kyseliny a ich estery.

PDMS/DVB preukázal najlepšie vlastnosti pri extrakcii prchavých zlúčenín zo vzorky medu. CAR/PDMS je vhodné, pokiaľ by boli analýzy zamerané na najprchavejšie zložky, zatiaľ čo nepolárny PDMS a polárny PA nie sú vôbec vhodné stacionárne fázy na tento typ matrice.

Záver

Ako vyplýva zo získaných výsledkov, vzorka medu predstavuje veľmi komplexnú zmes rôznych organických zlúčenín, ktoré reprezentujú prakticky všetky chemické skupiny. Extrakčné techniky LLE, USE a MSE sa ukázali byť efektívne pri extrakcii lineárnych a rozvetvených uh-

ľovodíkov, hlavne alkánov a alkénov, alkoholov alebo derivátov benzénu. Avšak väčšinu z týchto zlúčenín nebolo možné identifikovať kvôli nízkej zhode hmotnostných spektier ako aj nedostupnosti potrebných štandardov. Hlavnou nevýhodou týchto metód je slabá extrakčná sila v prípade mastných kyselín a terpénov. Jedine zlúčeniny prítomné vo vyšších koncentračných úrovniach sa podarilo úspešne extrahovať. Ďalšou nevýhodou týchto metód je použitie Kuderna-Danishovej destilácie ako prekoncentračného kroku, kde kvôli práci pri vyšších teplotách môže dochádzať k rozkladu termolabilných zlúčenín. Vo všetkých troch prípadoch sa ako najvhodnejšie extrakčné činidlo ukázal polárny dietyléter vzhľadom na počet extrahovaných zlúčenín ako aj účinnosti extrakcie. Na druhej strane SPME ponúka komplexnú informáciu o zložení

VOC prítomných vo vzorke. Pomocou tejto techniky sa extrahujú zlúčeniny so širokej škály chemického spektra, nielen vybrané typy. V prípade charakterizácie zloženia vzoriek medov je výhodné použiť kombináciu SPME a MSE.

Táto práca bola finančne podporená projektom VEGA na základe zmluvy číslo 1/0710/10.

LITERATÚRA

1. Alissandrakis E., Kibaris A.C., Tarantilis P.A., Harizanis P.C., Polissiou M.: J. Sci. Food Agric. 85, 1444 (2005).

POROVNANIE EXTRAKCIE VOC ZO SLIVOVICE POMOCOU ROZDIELNYCH SORPČNÝCH TECHNÍK S PDMS SORBENTOM**HANA VASARÁBOVÁ, IVAN ŠPÁNIK,
ANTÓNIA JANÁČOVÁ a TIBOR
JAKUBÍK**

*Ústav analytickej chémie FCHPT STU, Radlinského 9,
812 37 Bratislava, Slovenská republika
ivan.spanik@stuba.sk*

Slivovica je obľúbený slovenský destilát. Vyznačuje sa svojou charakteristickou vôňou a chuťou. Cieľom našej práce bolo zistiť zloženie prchavých organických zlúčenín vo vzorkách slivovice komplexnou dvojrzmernou plynovou chromatografiou v spojení s TOF hmotnostnou detekciou. Na extrakciu zlúčenín sa využili dve rôzne

sorpčné techniky – mikroextrakcia tuhú fázou (SPME) a sorpčná extrakcia na miešadielko (SBSE), používajúce rovnaký typ sorbentu, nepolárny polydimetylsiloxán (PDMS). Pri headspace SPME sa extrahujú analyty z parnej fázy vzorky, zatiaľ čo pri SBSE sa látky sorbujú priamo z kvapalnej fázy na miešadielko potiahnuté sorbentom. V práci bude prezentované porovnanie týchto dvoch techník, ich extrakčná účinnosť ako aj identifikované zlúčeniny nachádzajúce sa vo vzorke slovenskej slivovice.

Táto práca bola podporená finančným mechanizmom EHP na základe zmluvy číslo SAV-EHP-2008-02-05 a Štátnym programom SP06KOA02 časť 2003SP200280203.

ŠTÚDIUM INTERAKCIE LEKTÍN - GLYKOKOPROTEÍN NA LEKTÍNOVÝCH BIOČIPOCH METÓDOU POVRCHOVEJ PLAZMÓNOVEJ REZONANCIE (SPR)

JAROSLAV KATRLÍK^a, ROSTISLAV ŠKRABANA^b, DANICA MISLOVIČOVÁ^a a PETER GEMEINER^a

^a Chemický ústav SAV, Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava,

^b Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava, Slovensko
katrlík@yahoo.com

Kľúčové slová: povrchová plazmónová rezonancia, SPR, lektinika, glykomika, lektín, glykoproteín, biočip, biomarker

Odhaliť významu glykozylácie proteínov súvisí s pokrokom v glykobiológii a v posledných rokoch napreduje veľmi rýchlo. Glykozylácia patrí medzi posttranslačné modifikácie proteínov a v súčasnosti sa vie, že glykoproteíny majú kľúčovú úlohu vo väčšine biologických procesov založených na bunkovom rozpoznávaní ako regulácia vývoja, bunková diferenciácia, imunitná odpoveď, zápaly, oplodnenie, interakcie patogén – hostiteľ a ďalšie¹. Zmeny glykozylácie proteínov súvisia tiež s vývojom mnohých ochorení vrátane rakoviny. V súčasnosti je zreteľný veľký záujem o vhodné analytické metódy pre určovanie glykozylácie proteínov. Z techník umožňujúcich stanovenie cukrových jednotiek na glykoproteínoch je z hľadiska citlivosti, reprodukovateľnosti aj spoľahlivosti najlepšia hmotnostná spektroskopia (MS) v tandemovom usporiadaní, MS s ionizáciou elektrosprejom (ESI-MS) a MALDI-TOF MS. Metódy MS sú však drahé a náročné ako na čas tak kvalifikáciu obsluhy. Navyše, zväčša je potrebné glykány najprv uvoľniť a rozdeliť niektorou zo separačných techník (HPLC, HPAEC – vysoko výkonná aniónová výmenná chromatografia, CAE – kapilárna afinitná elektroforéza)^{2,3}. Alternatívou je použitie lektínov v kombinácii s niektorou z biorozpoznávacích techník. Lektíny sú proteíny špecificky viažúce molekuly obsahujúce cukry. Ich použitím pri analýze glykoproteínov odpadá potreba glykány uvoľňovať a separovať. Modifikáciou klasickej ELISA techniky je ELLA (enzyme-linked lectin assay), taktiež sa používa lektínová afinitná chromatografia. V kombinácii s lektínami sa však začínajú využívať najmä moderné bioanalytické metódy ako povrchová plazmónová rezonancia (SPR), microarray a prietoková cytometria^{4,5}.

SPR ako "label-free" metóda, teda metóda nevyžadujúca značenie, je veľmi populárna pre sledovanie interakcií biomolekúl. Keďže je plne automatizovateľná a v porov-

naní s inými technikami merania interakcií vyžaduje veľmi malé množstvá často ťažko dostupných materiálov, je čoraz častejšie využívaná pri štúdiu najrôznejších biologických systémov, vrátane nízkomolekulových zlúčenín, glykoproteínov, oligonukleotidov, receptorov, protilátok, ako aj vírusov a intaktných buniek⁶.

α -D-Manóza je jednou z často zabudovaných sacharidových jednotiek v glykoproteínoch. Na proteín môže naviazaná na proteín cez N- aj O- väzbu v rôznych štruktúrach (oligomanóza, v komplexnej forme, v hybridnej forme). Zistené boli napríklad rozdiely v glykozylácií včítane manozylácie sérového α -fetoproteínu (AFP) medzi vzorkami od pacientov s nezhubným ochorením pečene a s rakovinovým nádorom na pečeni, ako aj medzi nádorom na pečeni a nádorom zo zárodočných buniek. Tieto rozdiely sa dajú zistiť pomocou dvoch α -D-manózu viažúcich lektínov, ConA a LCA⁷.

Pre štúdium sme vybrali 3 komerčne dostupné lektíny so známou glykošpecifitou na α -D-manózové štruktúry, ktoré perspektívne môžu slúžiť na bioanalytické stanovenie manozovaných glykoproteínov, konkanavalín A (ConA, Sigma-Aldrich), šošovicový lektín (*Lens culinaris* agglutinin, LCA, Biogema Košice) a hrachový lektín (*Pisum sativum* agglutinin, PSA, Biogema Košice). Z glykoproteínov obsahujúcich α -D-manózové štruktúry sme použili invertázu, glukooamylázu (GA) a transferín (Sigma-Aldrich). Merania sa prevádzali na prístroji Biacore 3000 (GE Healthcare).

Pre zhodnotenie použiteľnosti SPR metódy na kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie prítomnosti glykoproteínov vo vzorke sa okrem prípravy samotného lektínového biočipu a optimalizácie podmienok merania určili disociačné konštanty K_D interakcie lektínov s príslušnými glykoproteínmi. Aby interakcie boli čo najmenej ovplyvnené zosieťovaním susedných lektínov na povrchu čipu glykoproteínmi (klastrovanie, "clustering")⁸, boli pripravené lektínové biočipy s relatívne nízkou hustotou lektínov na povrchu. Ako substrát pre prípravu biočipov bol zvolený Sensor Chip C1 (GE Healthcare). Je to čip s karboxymetylovým povrchom s nízkou väzobnou kapacitou a vďaka tomu, že interakcia prebieha v blízkosti povrchu, s relatívne vysokou citlivosťou. Neobsahuje dextránovú maticu, čím sa odstraňuje prípadná možná interakcia s použitými lektínmi, ktoré vykazujú afinitu aj k D-glukózevej štruktúre. Modifikácia čipu lektínmi bola prevedená metódou naväzovania proteínov cez primárne aminoskupiny postranných reťazcov lyzínu a N-terminálnej časti molekuly. Voľné karboxylové skupiny na povrchu čipu boli modifikované čerstvo pripraveným vodným roztokom 0,2 M EDC (1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl]karbodiimid hydrochlorid) a 0,05 M NHS (*N*-hydroxysulfoimid kyseliny jantárovej) (GE Healthcare), ktorý bol nastrekovaný 7 min s prietokom 5 μ l min⁻¹. Zásobné roztoky lektínov [1 μ g ml⁻¹

v 10 mM pufrí MES (Sigma) pH 6,1; 150 mM NaCl (Sigma), 1 mM CaCl₂ a MnCl₂ (Merck)] boli 10krát nariadené do 10 mM octanového pufru pH 4,5 (GE Healthcare) s 1 mM iónmi Ca²⁺ a Mn²⁺. Nariadený roztok lektínov bol nastrekovaný na aktivovaný povrch biočipu pri prietoku 5 $\mu\text{l min}^{-1}$. Nezreagované skupiny boli následne blokované nástrekom 1 M etanolamínu pH 8,0 po dobu 7 min. Referenčná dráha biočipu bola modifikovaná podobne ako analytické dráhy okrem nástreku roztoku lektínu. Výsledné imobilizačné hodnoty lektínov boli 148.5 RU pre ConA, 347.1 RU pre LCA a 191.7 RU pre PSA. Vychádzajúc z údajov výrobcu čipu, že imobilizačná hodnota 1000 RU zodpovedá imobilizácii približne 1 ng proteínu na mm², dosiahnuté povrchové koncentrácie lektínov boli pre ConA 0.1485 ng mm⁻², pre LCA 0.3471 ng mm⁻² a pre PSA 0.1917 ng mm⁻². Vzdialenosti medzi jednotlivými molekulami lektínov na povrchu zodpovedajúce týmto koncentráciám, za predpokladu rovnomernej plošnej distribúcie proteínu, boli zhruba 38,8 nm pre ConA, 15,3 nm pre LCA a 20,6 nm pre PSA. Vzhľadom na odhadnutú veľkosť molekúl lektínov, ktorá by ani v prípade najväčšieho z nich (ConA) nemala v žiadnom smere presahovať 9 nm (cit.⁹), sa zdá byť dosiahnutá hustota lektínov na povrchu dostatočne nízka na zamedzenie vplyvu vzájomného sterického blokovania väzby medzi susednými molekulami lektínov.

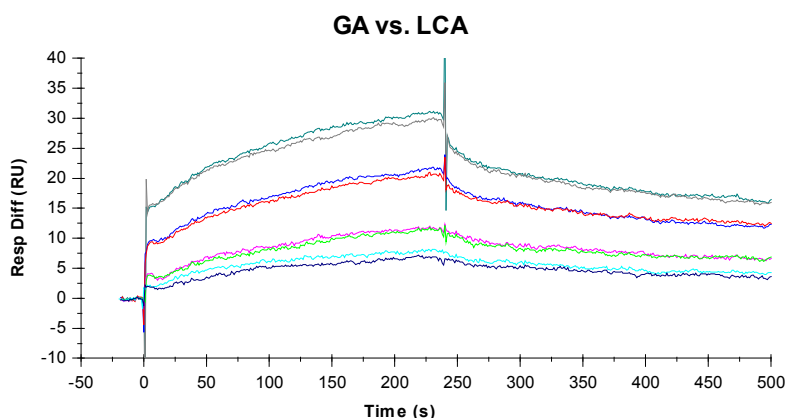
Samotné interakcie boli sledované pri prietokovej rýchlosti 50 $\mu\text{l min}^{-1}$, ako interakčný pufr bol použitý 10 mM HEPES (Sigma) pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,005 % detergent P-20 (GE Healthcare). Sériové riedenia glykoproteínov v interakčnom pufrí v rozsahu koncentrácií 22 až 1800 $\mu\text{g ml}^{-1}$ boli nastrekované po dobu 4 min, disociácia glykoproteínov bola sledovaná ďalších 6 min.

Pri regenerácii biočipu sa ukázal problém s vymývaním naviazaných glykoproteínov z biočipu a obnovením jeho pôvodnej väzobnej kapacity. Po optimalizácii regeneračných podmienok bola na vytesnenie naviazaných glykoproteínov použitá metyl- α -D-manopyranóza¹⁰, a to, z dôvodu efektívneho odstránenia týchto glykoproteínov, vo vy-

sokých koncentráciách (až 0,8 M). Použité lektíny obsahujú vo svojej štruktúre kationy Ca²⁺ a Mn²⁺, čo bolo potrebné pri optimalizácii procesu regenerácie zohľadniť¹¹. Výsledný postup regenerácie bol nasledovný: dva po sebe nasledujúce nástreky 0,8 M metyl- α -D-manopyranózy vo vode (156 s a 120 s) slúžili na vytesnenie glykoproteínov, po nich nasledoval 60 s nástrek 1 mM iónov Ca²⁺ a Mn²⁺ v MES pufrí pH 6,1 (pozri vyššie) na regeneráciu aktívnej štruktúry imobilizovaných lektínov.

Na obr. 1 je ukázaný senzogram interakcie GA na LCA biočipe. Na vyhodnotenie nameraných senzogramov a určenie hodnoty disociačných konštánt sledovaných interakcií boli použité 2 modely metódy ustáleného stavu. Prvým bol Langmuirov model 1:1 (označený ako steady state), druhým model zohľadňujúci vzájomnú pozitívnu alebo negatívnu kooperativitu medzi receptorom a ligandom s viacerými väzobnými miestami (steady state, Hillova metóda). V tabuľke I sú uvedené namerané disociačné konštanty K_D týchto študovaných interakcií. Na ďalších obrázkoch sú znázornené väzobné krivky pre určenie disociačných konštánt K_D steady state metódou s Langmuirovým modelom 1:1 (obr. 2) a Hillovým modelom (obr. 3) pre interakciu GA s LCA. Disociačné konštanty interakcií glykoproteínov s lektínmi by mali klesať v rade Con A > PSA > LCA¹². Z nami nameraných údajov sa zdá byť najsilnejšia interakcia invertázy a čiastočne aj GA naopak s lektínom LCA. Dôvodom je zrejme relatívne vysoká povrchová hustota LCA na biočipe v porovnaní s hustotou ConA aj PSA, ktorá mohla spôsobiť vyššiu úroveň klastrovania, najmä pre pomerne veľkú molekulu invertázy obsahujúcej navyše > 50 % manózy.

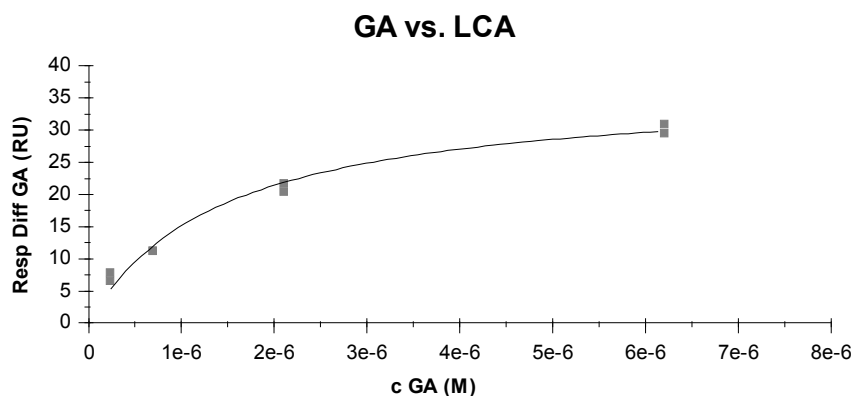
Podarilo sa pripraviť lektínové biočipy, najst' optimálne pracovné podmienky pre interakciu s glykoproteínmi a regeneráciu, a namerať disociačné konštanty K_D interakcií lektín – glykoproteín, ktoré boli v rozmedzí 10⁻⁵–10⁻⁷ M. Tieto hodnoty sú v súlade s už publikovanými hodnotami K_D pre interakciu invertázy a GA s ConA nameranými pomocou SPR na dextránovom čipe¹¹, a navyše sú rozšírené o K_D pre glykoproteín transferín využívaný aj ako bio-



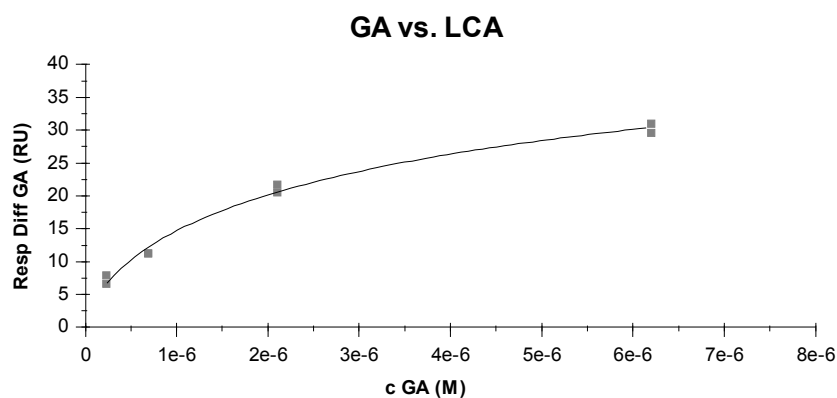
Obr. 1. Senzogram interakcie GA na LCA biočipe. Koncentrácie GA boli 6,2 μM , 2,1 μM , 0,69 μM a 0,23 μM , každá bola nastreknutá dvakrát. Najvyššej koncentrácii zodpovedá najvyššia odozva

Tabuľka I
Disociačné konštanty K_D študovaných interakcií

	ConA		LCA		PSA	
	K_D [μM]	K_D [μM]	K_D [μM]	K_D [μM]	K_D [μM]	K_D [μM]
	(steady state)	(steady state, Hillova metóda)	(steady state)	(steady state, Hillova metóda)	(steady state)	(steady state, Hillova metóda)
invertáza	0.31	0.78	0.09	0.26	0.41	0.47
GA	2.61	3.05	1.43	4.85	5.56	3.27
transferín	1.15	13.50	6.52	24.20	14.10	3.40



Obr. 2. Fitovanie interakcie GA s LCA steady state metódou s Langmuirovým modelom 1:1



Obr. 3. Fitovanie interakcie GA s LCA steady state metódou s Hillovým modelom

matker, a o interakcie s ďalšími dvoma lektínmi špecifickými na α -D-manózu, všetko na čipe s karboxymetylovým povrchom s nízkou väzobnou kapacitou pre potlačenie efektu klastrovania. Získané výsledky sú dobrým základom pre bioanalytické využitie lektínových biočipov na stanovenie koncentrácie glykozylovaných proteínov vo vzorkách.

Táto práca bola podporená grantom agentúry VEGA číslo 2/0127/10. Biotechnologické centrum excelentnosti SR BITCET umožnilo využívanie prístroja BIACORE 3000 pre potreby tejto práce. Tento príspevok bol vytvorený realizáciou projektu "CEntrum pre Materiály, vrstvy a systémy pre Aplikácie a CHEmIcké procesy v extrémnych podmienkach", na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Yue T., Haab B. B.: *Clin. Lab. Med.* 29, 15 (2009).
2. Nakano M., Kondo A., Kakehi K., Taniguchi N.: *Drug Discov. Today Tech.* 3, 39 (2006).
3. Gemeiner P., Mislovicova D., Tkac J., Svitel J., Pato-prsty V., Hrabarova E., Kogan G., Kozar T.: *Biotechnol. Adv.* 27, 1 (2009).
4. Mislovicova D., Gemeiner P., Kozarova A., Kozar T.: *Biologia* 64, 1 (2009).
5. Katrlík J., Svitel J., Gemeiner P., Kozar T., Tkac J.: *Med. Res. Rev.* 30, 394 (2010).
6. Rich R. L., Myszká D. G.: *Anal. Biochem.* 361, 1 (2007).
7. Durand G., Seta N.: *Clin. Chem.* 46, 795 (2000).
8. Munoz E. M., Correa J., Fernandez-Megia E., Riguera R.: *J. Am. Chem. Soc.* 131, 17765 (2009).
9. Quijcho F. A., Reeke, G.N. Jr., Becker J.W., Lipscomb W.N., Edelman G.M.: *PNAS* 68, 1853 (1971).
10. Mislovicova D., Masarova J., Hostinova E., Gasperik J., Gemeiner P.: *Int. J. Biol. Macromol.* 39, 286 (2006).
11. Mislovicova D., Masarova J., Svitel J., Gemeiner P.: *Int. J. Biol. Macromol.* 30, 251 (2002).
12. Schwarz, F. P., Puri K. D., Bhat R. G., Surolia A.: *J. Biol. Chem.* 268, 7668 (1993).

Abstrakt

Metóda povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR) bola použitá na štúdium interakcie vybraných glykoproteínov (invertáza, glukoamyláza a transferín) so strukovino-vým lektínami konkanavalín A (ConA), šošovicovým (Lens culinaris agglutinin, LCA) a hrachovým (Pisum sativum agglutinin, PSA). Lektínové biočipy boli vytvorené kovalentnou imobilizáciou lektínov na karboxymetylovom zlatom substráte s výslednou povrchovou koncentráciou lektínov 0,15–0,35 ng mm⁻². Optimalizované boli podmienky merania ako zloženie nosného pufra, zloženie regeneračného pufra a spôsob regenerácie biočipu. Name- rané hodnoty disociačných konštánt interakcií medzi glykoproteínmi a lektínmi boli v rozmedzí 10⁻⁵–10⁻⁷ M. Lektínové biočipy budú využité na bioanalytické stanovenie glykoproteínov vo vzorkách.

STANOVENIE CHEMICKEJ SPOTREBY KYSLÍKA (ChSK_{Cr}) – SKÚMAVKOVÁ METÓDA PRE MALÉ OBJEMY VZORIEK

MONIKA KLINCOVÁ

INGEO-ENVILAB, s.r.o., Bytčická 16, 010 01 Žilina, Slovenská republika
monika.klincova@ingeo-envilab.sk

Úvod

Na stanovenie chemickej spotreby kyslíka (ChSK_{Cr}) sa najčastejšie používajú normy: STN ISO 6060 Stanovenie chemickej spotreby kyslíka (pod spätným chladičom, odmerná metóda). STN ISO 15 705 Stanovenie chemickej spotreby kyslíka (ChSK). Skúmavková metóda pre malé objemy vzoriek. Cieľom práce bolo dokázať schopnosť laboratória vykonávať skúšku podľa špecifikácii uvedených v STN ISO 15 705 a zavedenie normy do praxe.

Princíp

Oxidovateľné látky sa v malom skúšobnom objeme vzorky oxidujú s kyselinou sírovou a dichrómanom didraselným v prítomnosti síranu strieborného a síranu ortuťnatého v mineralizačnom zariadení. Množstvo dichrómanu použitého na oxidáciu vzorky sa stanoví meraním absorbancie vzniknutých iónov Cr(III).

Experimentálna časť

Overované parametre metódy:

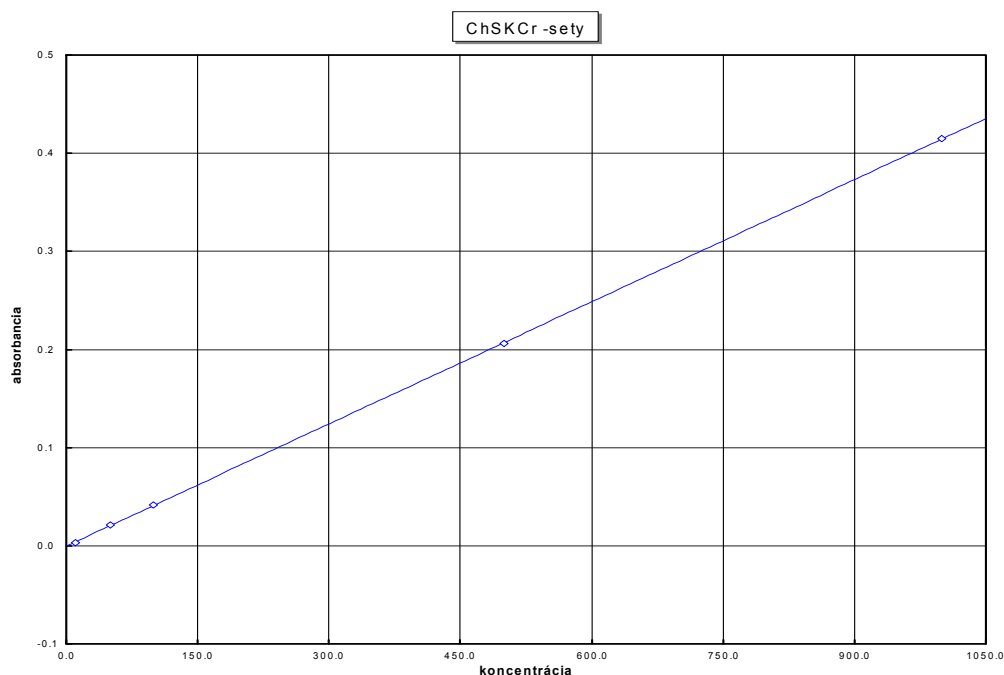
- rozsah a linearita,
- neistota merania,
- správnosť,



Obr. 1. Termostat HT 200S (vysokoteplotné zariadenie na mineralizáciu vzorky)



Obr. 2. Spektrofotometer DR 2800



- d) presnosť (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť)
(presnosť nie v zmysle STN ISO 5725 - 1),
e) limit detekcie (LOD),
f) limit stanovenia (LOQ),

Prístroje a zariadenie

a) Rozsah a linearita

Graficky s vhodným software (ADSTAT) sa zobrazila závislosť signálu (absorbancia) na koncentrácii roztokov štandardov (10–1000 mg l⁻¹). Na základe subjektívnej úvahy sa určila horná a dolná hodnota pracovného rozsahu a vybrala predpokladaná lineárna oblasť. Vizualne sa posúdila prítomnosť odľahlých hodnôt, ktoré sa zahrnuli do regresie. Vypočítal sa regresný koeficient (0,99998).

b) Neistota stanovenia

Kombinovaná štandardná neistota stanovenia sa určila pomocou čiastkových neistôt a to typu A, ktorá sa vypočítala z opakovateľnosti stanovenia a typu B, ktorá sa nedala experimentálne určiť, ale viaže sa na známe identifikovateľné zdroje zobrazené v diagrame príčin a následkov.

c) Správnosť

Správnosť sa vyhodnotila z rozdielu priemeru výsledkov stanovenia ChSK a referenčnou hodnotou prípravných roztokov.

Ako akceptačné kritérium sa použil nasledovný vzťah:

$$-a_2 - \sigma_D \leq x - \mu \leq a_1 + \sigma_D$$

a₁, a₂ – chyba hodnoty CRM, σ_D – smerodajná odchýlka výsledkov merania.

Pri všetkých 3 koncentračných úrovniach (20, 100, 500 mg l⁻¹) rozdiel x – μ vyhovoval.

- d) Presnosť
(presnosť nie v zmysle STN ISO 5725 - 1)

Opakovateľnosť

Podmienky opakovateľnosti:

- rovnaký analytik,
- rovnaký prístroj,
- krátky časový úsek.

Zo smerodajnej odchýlky sa vypočítal limit opakovateľnosti (r), ktorým sa posúdilo, že rozdiely medzi paralelnými vzorkami za podmienok opakovateľnosti nie sú významné.

Reprodukovateľnosť

Podmienky reprodukovateľnosti:

- rozliční analytici,
- rozličné prístroje,
- rôzne laboratória,
- dlhší časový úsek.

Zo smerodajnej odchýlky sa vypočítal limit reprodukovateľnosti (R), ktorým sa posúdilo, že rozdiely medzi paralelnými vzorkami za podmienok reprodukovateľnosti nie sú významné.

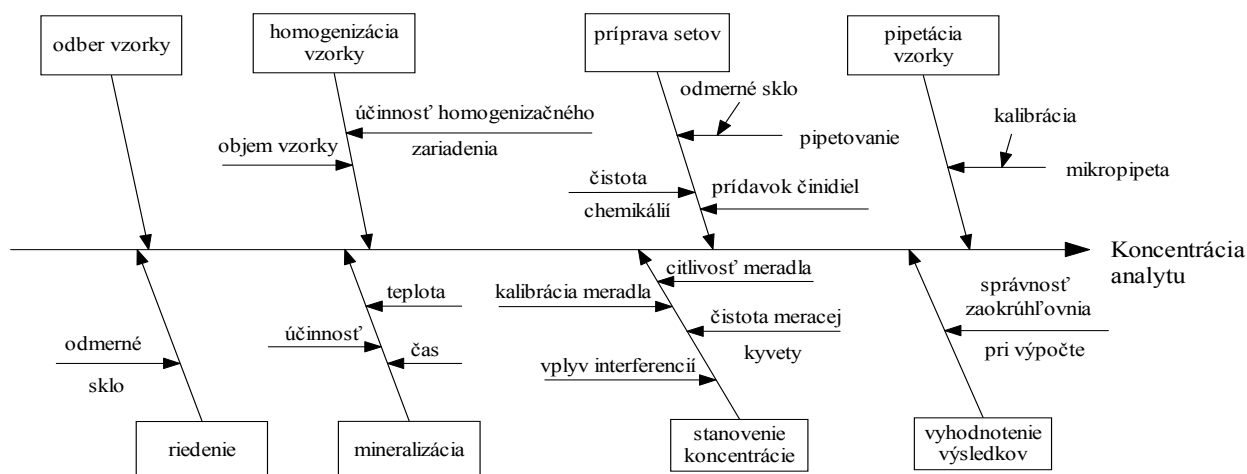
d) Limit detekcie (LOD)

Vzťah pre LOD:

$$y_{LOD} = y_0 + 3\sigma$$

y_{LOD} – signál zodpovedajúci limitu detekcie, y₀ – priemerná hodnota signálu slepého pokusu, σ – smerodajná odchýlka odozvy slepej vzorky.

Vypočítaná hodnota LOD = 1,22 mg l⁻¹ ChSK.



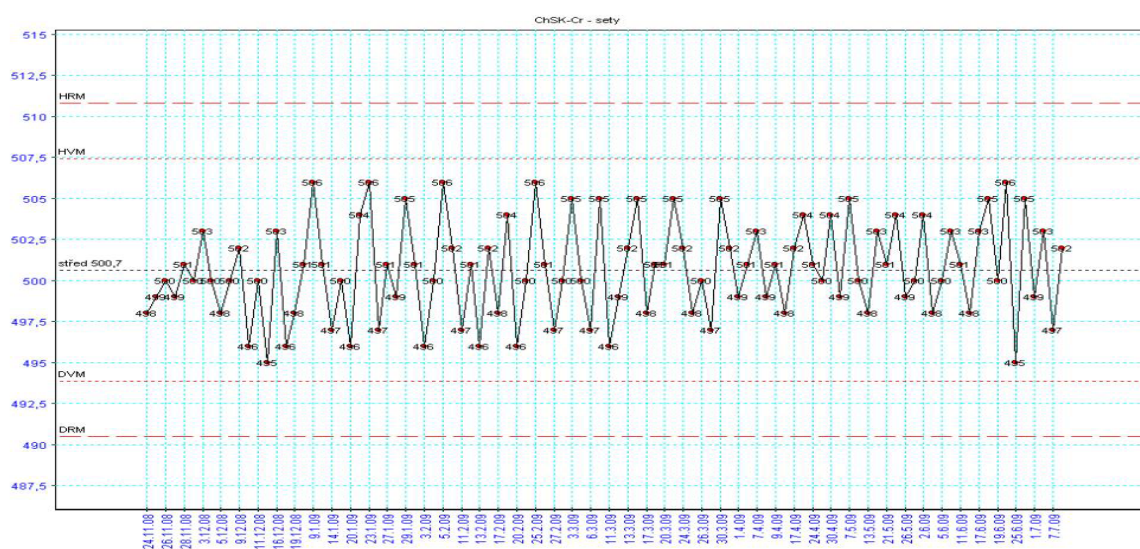
Obr. 3. Diagram príčin a následkov

Tabuľka I

Priemerná hodnota ChSK, mg l ⁻¹	50	102	503	1012
Smerodajná odchýlka opakovateľnosti (SD _r)	1,9	3,5	7,6	8,3
Relatívna smerodajná odchýlka opakovateľnosti (RSD _r), %	3,7	3,5	1,5	0,9
Limit opakovateľnosti (r), mg l ⁻¹	5,1	9,8	21	23

Tabuľka II

Stredná hodnota ChSK, mg l ⁻¹	20	31	98	143
Smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti (SD _R)	2,3	1,6	6,0	8,0
Relatívna smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD _R), %	11	5,2	6,1	5,6
Limit reprodukovateľnosti (R), mg l ⁻¹	6,4	4,4	17	22



Obr. 4. Regulačný diagram

Tabuľka III

ChSK [mg l ⁻¹]	
STN ISO 6060	STN ISO 15 705
25,8	26,9
36,7	37,6
40,4	38,7
43,6	45,7
139	134
374	381
714	696

e) Limit stanovenia (LOQ)

Vzťah pre LOQ:

$$y_{LOQ} = y_0 + 10\sigma$$

y_{LOQ} – signál zodpovedajúci limitu stanovenia, y_0 – priemerná hodnota signálu slepého pokusu, σ – smerodajná odchýlka odozvy slepej vzorky.

Stanovená hodnota LOQ je 3,68 mg l⁻¹ ChSK.

Porovnanie výsledkov

Porovnanie výsledkov ChSK v reálnej odpadovej vode spracovanej podľa:

- STN ISO 6060 Stanovenie chemickej spotreby kyslíka (pod spätným chladičom, odmerná metóda).
- STN ISO 15 705 Stanovenie chemickej spotreby kyslíka (ChSK). Skúmovková metóda pre malé objemy vzoriek.

Tabuľka IV
Zhodnotenie MPS

MPS	Vzťažná hodnota [mg l ⁻¹]	Laboratórna hodnota [mg l ⁻¹]	Relatívna chyba ξ – skóre z – skóre	Úspešnosť Druh vody
ChSK – sety				
OR-CH-5/07	22,0	24,0	+9,1 +1,98 +0,73	A – pitná voda
OR-CH-8/07	98,0	99,0	+1,0 +0,18 +0,20	A – odpadová voda
OR-CH-5/08	31,0	30,0	-3,2 -0,66 -0,26	A – pitná voda
OR-CH-8/08	143	145	+1,4 +0,60 +0,28	A – odpadová voda
OR-CH-5/09	20,0	20,0	0,0 0,0 0,0	A – pitná voda

A – získané osvedčenie o úspešnosti v MPS

Zabezpečenie kontroly kvality výsledkov skúšok

Externá kontrola

Medzi externú kontrolu sa zaraďujú medzilaboratórne porovnávacie skúšky (MPS), ktoré patria medzi preventívnu činnosť.

Cieľom MPS je zistiť:

- spôsobilosť laboratória vykonávať skúšky,
- monitorovať a zvyšovať spôsobilosť práce laboratória,
- identifikovať metodické problémy,
- zvyšovať spoľahlivosť práce laboratória na princípe spätnej väzby.

Interná kontrola

K internej kontrole laboratórnych výsledkov ChSK sa zaraďujú regulačné diagramy.

Kontrolná vzorka so známym obsahom analyzovanej zložky sa analyzovala v priebehu niekoľkých týždňov minimálne 50krát. Z nameranej hodnoty sa vypočítal:

- priemer,
- smerodajná odchýlka (σ),
- horná a dolná varovná medza (2σ),
- horná a dolná regulačná medza (3σ).

Z regulačného diagramu je vidieť, že hodnoty sa nenachádzajú mimo regulačnej medze a sú v štatisticky zvládnutom stave, tzn. že nedochádza k neobvyklým zoskupeniam bodov alebo ich trendom.

Záver

Na základe získaných výsledkov sa potvrdila schopnosť laboratória vykonávať skúšku ChSK podľa špecifikácii uvedených v STN ISO 15 705.

LITERATÚRA

1. STN ISO 15 705. Kvalita vody. Stanovenie chemickej spotreby kyslíka (ChSK). Skúmovková metóda pre malé objemy vzoriek. (2005).
2. König R.: Validácia kyvetových testov pre analýzu pitnej vody. Aplikačná správa. HACH LANGE, Praha (2007).
3. STN ISO 5725-1. Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 1: Všeobecné zásady a definície. Bratislava 2000.

STANOVENIE PODIELU OVČEJ A KRAVSKEJ HRUDKY V BRYNDZI IZOELEKTRICKOU FOKUSÁCIOU

MILAN SUHAJ, MONIKA STANKOVSKÁ a EMIL KOLEK

Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika
suhaj@vup.sk

Úvod

Pri výrobe mliečnych výrobkov existujú rôzne možnosti kombinácie mliečnych surovín z rôznych zdrojov, ktoré môžu byť zneužitú najčastejšie nedeklarovanou zámenou mliečnych bielkovín rôzneho živočíšneho druhu lacnejšími surovinami. V praxi sa jedná najčastejšie o nedeklarované použitie kravského mlieka v mliečnych výrobkoch z iných živočíšnych druhov (ovčie, kozie, atď.). Kravské mlieko je v porovnaní s inými druhmi mliek najlacnejšie, pretože sa získava vo veľkých objemoch, často i v nadprodukcii a je dostupné počas celého roka^{1,2}.

Podľa Výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 14. augusta 2006 č. 2143/2006-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka je bryndza „prírodný syr, vyrábaný zo zrejúceho ovčieho hrudkového syra alebo zo zmesi zrejúceho ovčieho hrudkového syra a vykysnutého kravského hrudkového syra, alebo zo zmesi skladovaného ovčieho syra a vykysnutého kravského hrudkového syra“ a musí obsahovať najmenej 50,0 hmotnostného percenta ovčieho syra zo sušiny výrobku³. Táto požiadavka sa premietla aj do parametrov „Slovenskej“ bryndze s chráneným označením pôvodu⁴.

Detekcia nedovoleného použitia mliečnych bielkovín je analyticky pomerne náročná a vyžaduje použitie špeciálnych separačných techník^{5,6}. Zakladajú sa obyčajne elektroforéze na polyakrylamidových géloch s močovinou (Urea-PAGE)⁷⁻¹¹ alebo dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE)^{12, 13}. Izoelektrická fokusácia (IEF)¹⁴⁻¹⁷ a kapilárna elektroforéza^{2,6,18-22} bola úspešne použitá na analýzu mliečnych bielkovín. Metóda HPLC v rôznych modifikáciách^{11,23-25} a imunologické metódy²⁶⁻²⁸ boli podobne použité pre uvedené účely. Kvantifikácia bielkovinových frakcií podľa živočíšneho druhu v syroch bola predmetom prác autorov^{2,14,16,17,20,22}. Prehľadové práce k tejto téme sú uvedené v publikáciách Recio a spol.²⁹ a Borková and Snášelová³⁰. Metódy multivariačnej predikčnej štatistiky na identifikáciu rôznych živočíšnych bielkovín v syroch boli použité v práci³¹.

Kvantifikácia individuálnych proteínov v syroch vyrábaných z viacerých živočíšnych druhov mlieka je komplikovaná v dôsledku rozmanitosti zloženia mliek spôsobenej genetickým polymorfizmom, zmenami pri denaturácii

bielkovín a ich proteolýzou spôsobenou procesmi spracovania mlieka a výroby syra. V súčasnosti sa na stanovenie prítomnosti kravského mlieka a kazeinátov v syroch vyrobených z ovčieho, kozieho alebo byvolieho mlieka alebo ich zmesi používa referenčná izoelektrofokusačná metóda EU a je uvedená v prílohe IX Nariadenia Komisie (ES) č. 273/2008, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov³². Túto metódu sme modifikovali a použili na kvantitatívne stanovenie obsahu ovčej a kravskej hrudky v bryndzi, pričom na izoelektrickú fokusáciu sme použili stripy s imobilizovaným pH gradientom.

Materiál a metódy

Princíp metódy

1. Izolácia kazeínov z bryndze a referenčných sekundárnych a štandardných vzoriek
2. Rozpustenie izolovaných kazeínov a vystavenie bovinnej plazminovej proteolýze za účelom zintenzívnenia kvantifikácie gama-kazeínov z bovinného beta-kazeínu
3. Izoelektrické fokusovanie plazminolyzovaných kazeínov na akrylamidových gélových stripoch s imobilizovaným pH gradientom (IPG) 3-10
4. Identifikácia zafarbených γ_3 - a γ_2 -kazeínových frakcií, denzitometrické vyhodnotenie.

Vzorky bryndze

Certifikovaný referenčný materiál: BCR-599 (IRMM, Geel, Belgia) – lyofilizovaný prášok zmesi ovčieho a kozieho (50/50) tvarohu s 0 a 1% obsahom kravského mlieka³³. Sekundárny referenčný materiál: letná a zimná bryndza ako modelová zmes s definovaným pomerom kravskej a ovčej hrudky pripravená v bryndziarni Zvolenská Slatina (% hm. pomer ovčej a kravskej hrudky v bryndzi: 0:100; 20:80; 30:70; 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 70:30; 80:20 a 100:0) a komerčné vzorky letnej a zimnej bryndze nasledovných výrobcov: Beskydská bryndza – Milk Trade (Český Těšín, ČR), Clever – Zvolenská Slatina, Agrofarma – Červený Kameň, Liptov – Liptovská mliekareň a.s., Tatranská – Tatranská mliekareň, a.s., Brysyrť – Tisovec, Bryndziareň s.r.o. – Turčianske Teplice, Poľnohosp. Družstvo – Kľuknava

Izolácia a plazminolýza kazeínov

Postup izolácie kazeínov, ich rozpúšťania a plazminolýzy bol prevzatý z EU referenčnej metódy³².

Izoelektrická fokusácia

Izoelektrická fokusácia bola realizovaná na akrylamidových gélových stripoch s imobilizovaným pH gradientom pH 3–10 (ReadyStrip™ IPG, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Stripy boli rehydratované podľa návodu [34] v tlmivom roztoku v ktorom bola rozpustená vzorka. Izoelektrická fokusácia bola realizovaná na IEF aparátúre IF-SYS (Consort, GB) s max. výkonom pri 1500 V so zdrojom Consort E 833 a trvala v 1. kroku 20 min pri 700 V a v 2. kroku 7 h pri 1500 V. Stripy boli ďalej farbené v roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 a ustalované podľa referenčnej metódy³². Po vysušení boli skenované na denzitometri.

Denzitometrické skenovanie IPG stripov

Optická hustota jednotlivých pásov kazeínových frakcií na IPG stripoch bola meraná na skenovačom zariadení Gel-Scanner pomocou spektrofotometra Specord M 40 (Carl Zeiss Jena, Germany) pri 634 nm (λ_{\max} Coomassie Brilliant Blue) s rýchlosťou posuvu stripu v Gel-Scanneri 30 mm min⁻¹. Absorbancia stripov bola snímaná spektrofotometricky pri spektrálnej šírke štrbiny 15 cm⁻¹, integračnom čase 1 s, zosilnení 0 a rýchlosti zápisu 2 mm s⁻¹.

Štatistické spracovanie výsledkov

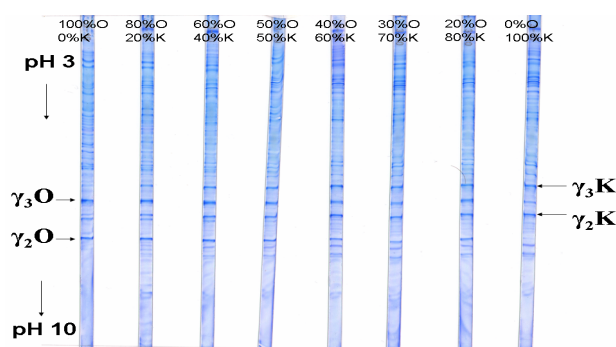
Kalibračné závislosti a regresná analýza boli urobené programom Microsoft® Office Excel 2003 (11.6355.6360). Program Q.C. Expert (Trilobyte-Q.C. Expert, v. 2.5) bol použitý na stanovenie detekčného a kvantifikačného limitu ovčej (kravskej) hrudky v bryndzi. Na vizualizáciu a štatistickú analýzu nameraných výsledkov boli použité štatistické metódy pomocou programu Unistat® v. 5.6 (Unistat Ltd., 4 Shirland Mews, London W9 3DY, England).

Výsledky a diskusia

Modifikácia EU referenčnej metódy izoelektrickej fokusácie bola založená na stanovení štyroch (dvoch ovčích a dvoch kravských) frakcií gama-2 a gama-3 kazeínových markerov. Na obr. 1 je izoelektroforeogram delenia plazminolyzovaných proteínových frakcií modelovej letnej bryndze s definovaným obsahom ovčej a kravskej hrudky na stripoch s imobilizovaným pH gradientom pH 3–11.

Na obr. 2 vidíme ukážky denzitometrického záznamu po skenovaní stripov štandardnej vzorky letnej bryndze s obsahom 50 % ovčej a 50 % kravskej hrudky, ako aj komerčnej vzorky bryndze.

Po vyhodnotení linearity kalibračných závislostí jednotlivých markerov sa ukázalo, že pre kvantifikáciu podielu ovčej a kravskej hrudky v bryndzi je najvhodnejšie použiť pomery uvedených markerov vo vzťahu k obsahu ovčej a kravskej hrudky v bryndzi, obr. 3, pričom pomery

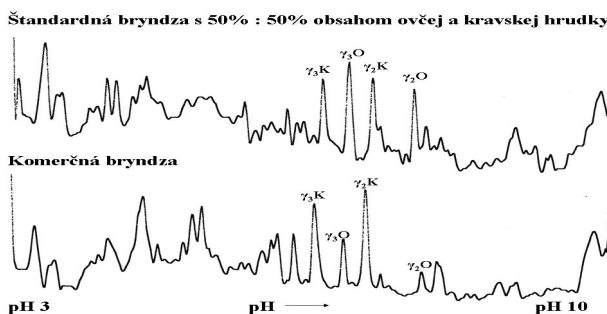


Obr. 1. Izoelektroforeogramy štandardných vzoriek letnej bryndze s rôznym pomerom ovčej (O) a kravskej hrudky (K) po plazminolyze

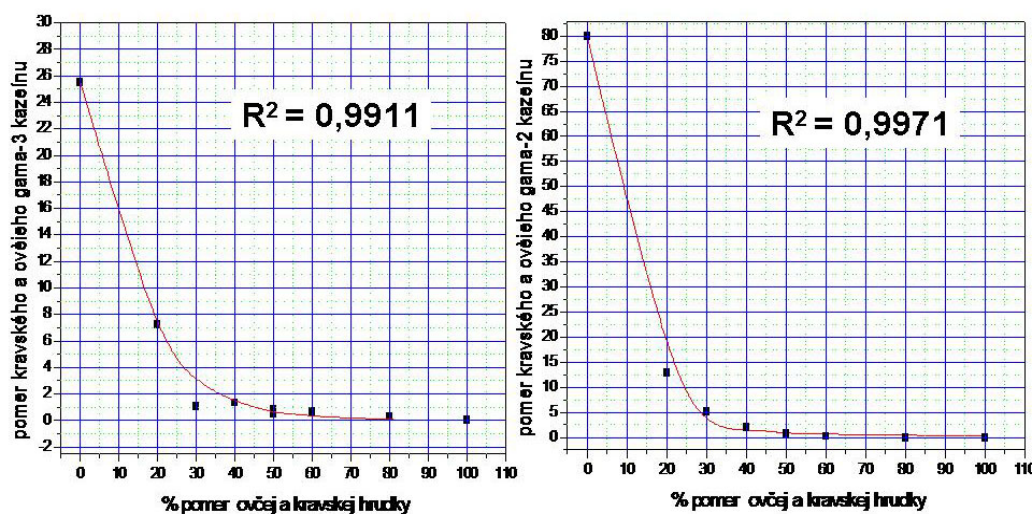
kazeínových frakcií boli využité aj v prácach iných autorov^{16,35}.

Z kalibračných závislostí pre gama-3 a gama-2 pomery kazeínov opísaných kvadratickým modelom boli programom QC Expert vypočítané medze detekcie 5,4 % a 6,9 % a medze stanovenia 8,6 % a 11,2 % dostatočné na analýzu aktuálneho obsahu ovčej a kravskej hrudky v bryndze. Porovnaním kalibračných závislostí (viacvzorkový mediánový test a testovanie regresných čiar) sa zistilo, že nie sú rozdiely medzi kalibráciami letnej a zimnej bryndze. Naproti tomu multivariačná štatistika preukázala veľmi výrazné rozdiely technik využívajúcich plazmínované, resp. neplazmínované kazeíny (údaje nie sú zobrazené).

Výsledky stanovenia obsahu ovčej a kravskej hrudky v komerčných vzorkách bryndze technikami s využitím plazmínovania vzoriek a bez plazmínovej úpravy, ako aj vo vzorkách letnej a zimnej bryndze sú uvedené v tab. I. Výsledky ukazujú, že technika s plazmínovou úpravou rezultuje s nižšou výťažnosťou stanovenia ovčích kazeínov, pretože hovádzí plazmín intenzifikuje kreovanie najmä kravských gama kazeínov z beta-kazeínu. Keďže tento plazmín posilňuje aj tvorbu ovčích gama-kazeínov, odporúča sa použiť plazmínovanie v každom prípade.



Obr. 2. Denzitometrický záznam stripov štandardnej vzorky letnej bryndze s obsahom 50 % ovčej a 50 % kravskej hrudky a komerčnej vzorky bryndze



Obr. 3. Kalibračné závislosti pomerných gama-3 a gama-2 kazeínov od obsahu ovčej a kravskej hrudky v bryndzi

Tabuľka I

Výsledky určenia obsahu ovčej hrudky v komerčných bryndziach prostredníctvom stanovenia ovčích a kravských γ -3 a γ -2 kazeinových frakcií

Bryndziareň	% ovčej hrudky v bryndzi ^a						
	plazmínová úprava			bez plazmínovej úpravy			
	bryndza (letná)		bryndza (zimná)	bryndza (letná)		bryndza (zimná)	
	γ 3 B/O (s_x)	γ 2 B/O (s_x)	γ 3 B/O (s_x)	γ 3 B/O (s_x)	γ 2 B/O (s_x)	γ 3 B/O (s_x)	γ 2 B/O (s_x)
Výrobca 1	51.8 (0.71)	48.7 (1.13)		79.2 (9.05)	78.5 (3.67)		
Výrobca 2	44.3 (1.48)	43.0 (1.27)		55.6 (2.12)	51.1 (6.72)		
Výrobca 3	42.9 (1.48)	42.8 (1.91)	42.4 (5.30)	47.8 (3.74)	38.6 (4.10)	45.5 (1.62)	50.3 (0.63)
Výrobca 4	48.7 (0.11)	49.4 (1.27)	45.7 (2.23)	58.4 (3.25)	64.7 (0.14)	48.8 (7.52)	51.7 (10.8)
Výrobca 5	67.2 (2.96)	59.2 (1.69)	54.9 (3.59)	75.7 (1.82)	79.0 (1.13)	79.2 (2.68)	79.1 (5.09)
Výrobca 6	33.0 (5.65)	13.9 (5.16)	35.2 (6.98)	31.6 (0.97)	48.1 (1.41)	26.5 (1.97)	33.2 (4.81)
Výrobca 7	40.1 (2.76)	42.6 (1.91)		53.3 (3.37)	47.8 (5.93)		
Výrobca 8			41.7 (1.62)			49.2 (9.19)	49.3 (4.81)
Výrobca 9			29.7 (7.72)			50.8 (4.66)	44.8 (3.75)

^a Obsah kravskej hrudky je komplementárny k obsahu ovčej hrudky v bryndzi (ovčia hrudka + kravská hrudka = 100 %)

Z výsledkov stanovenia obsahu ovčej hrudky v komerčných vzorkách bryndze ďalej vyplýva, že väčšina výrobcov sa vyhýba výrobe tradičnej letnej 100 % ovčej bryndze, ale konštituuje obsah ovčej hrudky v letnej i zimnej bryndzi na úrovni kódexového limitu 50 %. Iba v dvoch prípadoch dosiahol obsah ovčej bielkoviny vo vzorkách bryndze hodnoty do 80 % a v jednom prípade bol hlboko pod kódexovým limitom.

Táto úloha bola riešená v rámci projektu APVV 0319-07 podporovaného Agentúrou na podporu výskumu a vývoja.

LITERATÚRA

1. De La Fuente M. A, Juárez M.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 563, 45 (2005).
2. Herrero-Martínez J. M., Simo-Alfonso E. F., Ramis-

- Ramos G., Gel W. C., Righetti P. G.: *J. Chromatogr. A*, 261, 878 (2000).
3. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 14. augusta 2006 č. 2143/2006-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, 1, 36 (2006).
 4. Commission Regulation (EC) No 676/2008 of 16 July 2008 registering certain names in the Register of protected designations of origin and protected geographical indications (Ail de la Drôme (PGI), Všetarská cibule (PDO), Slovenská bryndza (PGI), Ajo Morado de Las Pedroñeras (PGI), Gamoneu or Gamonedo (PDO), Alheira de Vinhais (PGI), Presunto de Vinhais or Presunto Bísaro de Vinhais (PGI)). *OJ*, 19, 189 (2008).
 5. Colak H, Aydin A., Nazli B., Ergun O.: *Food Control*. 905, 17 (2006).
 6. Recio I., García-Risco M. R., Amigo L., Molina E., Ramos M., Martín –Álvarez P. J.: *J. Dairy Sci.* 1595, 87 (2004).
 7. Carretero C., Trujillo A. J., Mor-Mur M., Pla R., Guamis, B.: *J. Agric. Food. Chem* 1546, 42 (1994).
 8. Dziuba J., Nalecz D., Minkiewicz P., Dziuba B.: *Anal. Chim. Acta* 17, 521 (2004).
 9. Farkye N. Y., Kiely L. J., Allshouse R. D., Kindstedt, P. S.: *J. Dairy Sci.* 1433, 74 (1991).
 10. Gobetti M., Morea M., Baruzzi F., Corbo M. R., Matarante A., Considine T.: *Int. Dairy Jour.* 511, 12 (2002).
 11. Mayer, H. K.: *Int. Dairy Jour.* 595, 15 (2005).
 12. Basch J. J., Douglas F. W., Procino L. G., Holsinger, V. H., Farrell, H. J.: *Dairy Sci.* 23, 68 (1985).
 13. Jin Y. K., Park Y. W.: *J. Food Sci.* 490, 61 (1996).
 14. Amigo L., Ramos M., Calhau L., Barbosa M.: *Lait* 95, 72 (1992).
 15. Kim H. H. Y., Jimenez-Flores R.: *Dairy Sci.* 2177, 77 (1994).
 16. Mayer, H. K., Heidler, D., Rockenbauer, C.: *Int. Dairy Jour.* 619, 7 (1997).
 17. Miralles B., Krause I., Ramos M., Amigo L.: *Int. Dairy Jour.* 1488, 16 (2006).
 18. Recio I., Amigo L., Lopez-Fandino R.: *J. Chromatogr., B* 231, 697 (1997).
 19. Kennedy R. T., German I., Thompson J. E., Witowski S. R.: *Chem. Rev.* 3081, 99 (1999).
 20. Cartoni G., Coccioli F., Jasonowska R., Masci M. D.: *J. Chromatogr., A* 135, 846 (1999).
 21. Miralles B., Ramos M., Amigo L.: *J. Dairy Res.* 91, 67 (2000).
 22. Strickland M., Johnson M. E., Broadbent J. R.: *Electrophoresis* 1510, 22 (2001).
 23. Ferreira I. M., Mendes E., Marques J., Ferreira M. A.: *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2057, 23 (2000).
 24. Ferreira I. M., Mendes E., Ferreira M. A.: *Anal. Sci.* 499, 17 (2001).
 25. Veloso A. C. A., Teixeira N., Ferreira I. M.: *J. Chromatogr., A* 209, 967 (2002).
 26. Bramanti E., Sortino C., Onor M., Beni F., Raspi G.: *J. Chromatogr., A* 59, 994 (2003).
 27. Haza A. I., Morales P., Martín R., García T., Anguita G., González I.: *J. Agric. Food. Chem.* 1756, 44 (1996).
 28. Rodriguez E., Martín R., García T., Hernandez P. E., Sanz B.: *J. Dairy Sci. Res.* 197, 57 (1990).
 29. Recio I., Ramos M., López-Fandiño R.: *Electrophoresis*, 22, 1489 (2001).
 30. Borková M., Snášelová J.: *Czech J. Food Sci.* 41, 23 (2005).
 31. Rodriguez-Nogales J. M., Vázquez, F.: *Food Control* 580, 18 (2007).
 32. Commission Regulation (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Union*, L 88, 2008, pp. 1–115.
 33. Lamberty A., Krause I., Kramer G. N., Pauwels J., Glaeser H.: The certification of two reference materials to be used for the detection of cows' milk casein in cheeses from ewes' milk, goats' milk and mixtures of ewes' and goats' milk CRM 599. Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 1996. 36 pp. ISBN 92-827-8980-2.
 34. Ready Strip™ IPG Strip Instruction Manual. Catalog No. 163-2099. Hercules : Bio-Rad Laboratories, 2008. 35 pp.
 35. Chen F. A., Zang, J.: *J. AOAC Int.* 905, 75 (1992).
 36. Commission Publication 2007/C 232/10 of an application pursuant to Article 6(2) of Council Regulation (EC) No 510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. "Slovenská bryndza" EC No: SK/PGI/005/0427/13.10.2004. *OJEC*, 17, 232 (2007).

Abstrakt

Stanovenie obsahu ovčej a kravskej hrudky v bryndzi bolo realizované cestou izolácie kazeínu bryndze, plazminovým štiepením β -kazeínu na γ_2 - a γ_3 -kazeíny boviným plazminom, izoelektrickým delením ovčích a kravských bielkovinových frakcií na akrylamidových gélových stripoch s imobilizovaným gradientom pH 3–10 a denzitometrickým vyhodnotením. Najlepšie analytické parametre metódy boli dosiahnuté použitím pomerov ovčích a kravských γ_3 - a γ_2 -kazeínov ($R^2 = 0,9911$ a $R^2 = 0,9971$). Z výsledkov štatistického porovnávania vyplynulo, že nemusia byť použité extra kalibračné závislosti pre letnú a zimnú bryndzu, avšak proces plazminolýzy významne zintenzívnil separačný proces kazeínov izoelektrickou fokusáciou. Z výsledkov stanovenia obsahu ovčej hrudky v komerčných vzorkách bryndze vyplýva, že väčšina výrobcov sa vyhýba výrobe tradičnej letnej 100 % ovčej bryndze, ale konštituuje obsah ovčej hrudky v letnej i zimnej bryndzi na úrovni kódexového limitu 50 % .

DIRECT HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF LYOPHILISED LIPOSOMAL ENTRAPPED ALPHA-TOCOPHERYL SUCCINATE

ŠTĚPÁN KOUDELKA^{a,*}, JOSEF MAŠEK^a, PAVLÍNA TURÁNEK-KNÖTIGOVÁ^a, JIRI NEUZIL^{b,c}, and JAROSLAV TURÁNEK^a

^a Department of Toxicology, Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic, ^b Apoptosis Research Group, School of Medical Science, Griffith Institute of Health and Medical Research, Griffith University, Southport, 4222 Queensland, Australia, ^c Molecular Therapy Group, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic
koudelka@vri.cz

Introduction

It was reported that pro-apoptotic VE analogues including α -tocopheryl succinate (α -TOS), a semi-synthetic analogue of α -tocopherol, exert selective toxicity to the cancer cells with low toxicity towards the normal cells¹. Recent studies documented anti-cancer effects of α -TOS in various experimental models against a broad spectrum of cancer². Suitable formulations of the pro-apoptotic α -TOS were not invented yet. Major disadvantage of α -TOS is its low solubility in the aqueous environment. The hydrophobic character of α -TOS predetermines liposomes as suitable formulations. Liposomes, lipid membranous vesicles, represent versatile and advanced nanodelivery systems for a wide range of biologically active compounds³. These vesicular systems have considerable potential for the entrapment of hydrophobic as well as hydrophilic drugs. α -TOS can be easily entrapped into the membrane bilayers of liposomes. For the purposes of long-term storage, the liposome formulations are preserved and stabilised by lyophilisation in the presence of suitable cryoprotectant.

The analysis of α -TOS and related analogues of VE is generally performed by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), although other techniques have been reported⁴. Isocratically methanol or acetonitrile together with a low amount of water or buffer are the most frequently employed mixtures used as the mobile phase. The available HPLC methods have ordinarily utilised mass spectrometric, fluorimetric and ultraviolet (UV) detection. Generally, the α -TOS analysis is carried out for the purposes of separation and identification of VE analogues⁵, quantification in biological samples⁶ especially pharmacokinetic monitoring and biodistribution studies and determination of cellular accumulation of the drug⁷.

Now, we report chromatographic analysis of α -TOS for determination of the drug content entrapped in the lipo-

somes and monitoring the drug stability in the lyophilised liposomal formulation during 6-month storage period.

Experimental procedures

Preparation of α -TOS liposomes

Liposomes composed of the mixture of soy phosphatidylcholine (SPC) and α -TOS (molar ratio, 85:15) were prepared by the lipid film hydration method followed by extrusion through 0.2 μ m polycarbonate filters as previously described⁸. The extruded liposomes were mixed with sucrose (molar ratio lipid:sucrose, 1:5) and sterilised by filtration through 0.22 μ m filters (Millex-MP Filter Unit, Millipore). Aliquots of the liposomes (10 mg ml⁻¹ of total lipid content) were filled into 20 ml sterile vials. These vials with 1.5 ml of liposomes were frozen at -80 °C in a freezer and then lyophilised using the Lyovac GT2 instrument (Finn-Aqua, Finland). The lyophilised samples were stored during 6-month period at $2-8$ °C for further characterisation.

Entrapment efficiency of α -TOS

Lyophilised liposomal samples were rehydrated in 1-month intervals with 20 mM HEPES buffer. Aliquots of 100 μ l of α -TOS liposomes (1 mg ml⁻¹ α -TOS) were diluted with 20 mM HEPES to the final volume of 2 ml and stirred gently. For the chromatographic analysis, the samples were prepared by ultracentrifugation at 30,000 rpm (108,000 \times g, rotor JA-30.50 Ti, Beckman) for 50 min at 4 °C (Beckman-Coulter, Avanti J-30I, USA). The supernatant containing the free drug was separated from the sediment. The liposomal sediment was then re-dispersed in the same volume of 20 mM HEPES buffer. The re-dispersed sediment and the liposomes that were not centrifuged were frozen at -80 °C and then lyophilised for 24 h. Both these parts of the sample were re-dissolved in the same volume of methanol (2 ml) and vortexed. Aliquots of 10 μ l were injected into the HPLC system. The entrapment efficiency of α -TOS (EE_{TOS}) trapping into liposomes was calculated according to the following equation:

$$EE_{TOS} (\%) = A_{LIP-TOS} / A_{TOTAL-TOS} \times 100 \quad (1)$$

where $A_{LIP-TOS}$ represents the amount of α -TOS that liposomal entrapped and $A_{TOTAL-TOS}$ is the total amount of α -TOS.

Analysis of α -TOS and α -tocopherol

The chromatography was carried out using a Beckmann Gold *Noveau* system (Fullerton, USA) composed of

a 507 autosampler, a 127 binary gradient pump and a 168 diode array detector. The Agilent Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 mm I.D., 4 µm particle size) stainless-steel analytical column was attached. The acidified mobile phase (0.03% acetic acid) consisting of methanol and water (97:3 v/v) was degassed by sonication prior to use. The separation was carried out isocratically at the flow rate of 1.3 ml min⁻¹ and ambient temperature. The detector wavelength was set at 206 nm. The Gold *Noveau* software was used for the data collection and analysis. The calibration graphs were calculated by linear regression analysis of the peak area ratio of the standard and the internal standard versus the drug concentration of the standard. α -Tocopheryl acetate (α -TOA) was used as the internal standard.

Results and discussion

The primary goal of this study was the development of HPLC assay for quantification of α -TOS entrapped in the liposomes as well as monitoring of α -TOS chemical stability in the lyophilisates during 6-month storage period. The composition of mobile phase was optimised in order to prevent interfering peaks co-eluted with the compounds of interest. Using this mobile phase, the separation of α -TOS, α -TOH as α -TOS degradation product and α -TOA used as internal standard was successfully achieved per one chromatographic run. The retention times of these compounds were as follows: 9.23 min for α -TOS, 10.82 min for α -TOH and 16.54 min for α -TOA. This assay was found to be linear over the concentration range of 1–100 µg ml⁻¹ for both α -TOS and α -TOH agents with regression correlation coefficients greater than 0.998. The quantification of α -TOS in total formulation and liposomal sediment by using calibration curves enables to calculate EE_{TOS} values according to the equation (1). For the liposomal lyophilisates stored during 6 months, the obtained values of EE_{TOS} were higher than 90 %, thus, they indicate successful α -TOS association with SPC membrane bilayers of the liposomes. The chemical stability of liposomal entrapped α -TOS was investigated by monitoring the level of α -TOH. The content of α -TOH did not exceed 5 % of

the α -TOS content as analysed by HPLC assay. The results of the chemical characterisation of α -TOS are summarised in Table I.

The content of α -TOS in the liposomes determined by HPLC was within the range of 95–105 % of the drug concentration in the initial preparations. The data for α -TOH content are expressed as percentages of α -TOS concentration in respective samples. All data represent means of duplicate samples.

Conclusion

We developed an ultracentrifugation technique with a lyophilisation step followed by fast and simple HPLC assay. This procedure allowed characterising of α -TOS trapping into the liposomal vesicles. We used an isocratic reverse-phase HPLC with UV detection for the direct quantification of α -TOS entrapped in liposomes. Other published HPLC assay employed indirect quantification of α -TOS after hydrolysis as α -TOH⁹. However, this method was not suitable for the simultaneous determination of α -TOS and α -TOH agents. It was reported that lyophilised liposomes demonstrated instability and significant drug degradation when lyophilisates contained about 3.5 % of residual water content¹⁰. In our liposomal lyophilisates, the decomposition of α -TOS represented only about 4 % of total α -TOS (cf. Table I), which is acceptable from the pharmaceutical point of view. The residual water content determined by Karl-Fischer titration method remains unchanged in the range of 1.2–1.6 % during storage period. These results document that α -TOS undergoes only minimal hydrolysis during storage, making such formulation applicable for clinical usage. In preclinical testing, liposomal formulation of α -TOS was well tolerated by mice and the anti-cancer effect was demonstrated².

This work was supported in part by the grants from Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE 0002716202) to J.T. and the Academy of Sciences of the Czech Republic (KAN200520703) to J.N. and J.T.

Table I
Chemical stability of α -TOS entrapped in liposomes after lyophilisate rehydration

Storage time (months)	α -TOS content [% of initial]	α -TOS entrapment [%]	α -TOH content [%]
Initial state	100	92	1.1
1	103	92	1.6
2	101	95	2.1
3	97	91	2.9
4	98	93	3.9
5	97	94	4.7
6	95	94	4.9

REFERENCES

1. Neuzil J., Weber T., Gellert N., Weber C.: *Br. J. Cancer* 84, 87 (2001).
2. Turanek J., Wang X.F., Knotigova P., Koudelka S., Dong L.F., Vrublova E., Mahdavian E., Prochazka L., Sangsura S., Vacek A., Salvatore B.A., Neuzil J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237, 249 (2009).
3. Hofheinz R.D., Gnad-Vogt S.U., Beyer U., Hochhaus A.: *Anticancer Drugs* 16, 691 (2005).
4. Rupérez F.J., Martín D., Herrera E., Barbas C.: *J. Chromatogr., A* 935, 45 (2001).
5. Good R.L., Roupe K.A., Fukuda Ch., Clifton G.D., Fariss M.W., Davies N.M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 33 (2005).
6. Teng X.W., Davies N.M., Fukuda Ch., Good R.L., Fariss M.W.: *Biopharm. Drug Dispos.* 26, 195 (2005).
7. Kumar B., Jha M.N., Cole W.C., Bedford J.S., Prasad K.N.: *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 339 (2002).
8. Turanek J.: *Anal. Biochem.* 218, 352 (1994).
9. Tirmenstein M.A., Watson B.W., Haar N.C., Fariss M.W.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 707, 308 (1998).
10. van Winden E.C.A., Crommelin D.J.A.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 295 (1997).

UTILIZATION OF AMALGAM ELECTRODES FOR AMPEROMETRIC DETECTION OF NITRO DERIVATIVES OF AROMATIC COMPOUNDS IN HPLC AND FLOW INJECTION ANALYSIS

**ZUZANA KRÁLOVÁ, JIŘÍ BAREK,
and KAROLINA PECKOVÁ**

*Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic
kralova5@natur.cuni.cz*

Introduction

Nitro derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) represent an extensively studied group of chemical contaminants due to their genotoxicity and/or carcinogenicity. Three primary sources are believed to contribute significantly to the ubiquitous presence of NPAHs in environment¹: (i) the industrial production; (ii) NPAHs originating as direct or indirect products of incomplete combustion; (iii) NPAHs formed in the atmosphere from the gas-phase reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with four rings or less (generally themselves products of incomplete combustion).

NPAHs are formed during combustion processes by reactions of PAHs with nitrating species that are provided by the conversion of nitrogen and oxygen at high temperatures². According to their volatility and polarity, NPAHs are distributed between the vapor and particulate phase of combustion gases, where usually 1-nitropyrene (1-NP), 2-nitrofluorene (2-NF), and 3-nitrofluoranthene (3-NFt) are the dominating substances. The gas-phase formation of NPAHs during daylight hours relies on the attack of hydroxyl radicals to gaseous PAHs, followed by addition of NO₂ and by water molecule elimination. Nighttime gas-phase reaction includes rather nitrate radical addition to the PAH followed by reaction with nitrogen dioxide and loss of nitric acid. Typically, 2-nitrofluoranthene, 2-nitropyrene, and 3-nitrofluorene are formed by these processes³. Other sources of NPAHs include e.g. photocopier toners, cigarette smoke and certain food items, such as grilled meats, teas and coffees^{1,4,5}.

Most frequently used methods for determination of NPAHs are listed in several reviews^{1,5–7} and include: (i) Mass spectrometric techniques combined with gas chromatography, liquid chromatography or electron capture mode; (ii) gas chromatography combined with the flame ionization or the thermoionic detector, electron capture detector, chemiluminescence-based thermal energy analyzer or nitrogen-phosphorus selective detector; (iii) HPLC combined with fluorescence (FD), chemiluminescence, or electrochemical detection (ED). The FD is applicable only after reduction of NPAHs to amino derivatives, because

NPAHs produce very low yield of fluorescence after irradiation by the UV light, as a result of the strong electron withdrawing effect of a nitro group. One of the approaches relies on the electrochemical on-line reduction of NPAHs prior FD^{8,9}. Moreover, ED has been applied as a simple, sensitive, and reproducible method for the reducible NPAHs including 1-NP using mercury/gold^{10,11} or glassy carbon electrodes^{12,13} utilized in thin-layer^{10,11,13} or wall-jet¹² arrangement of amperometric detectors.

In this study, an amperometric wall-jet detector with indicator electrode based on silver solid amalgam was employed for the detection of selected NPAHs. Solid amalgam electrodes (SAE) were re-introduced in electrochemistry in the year 2000 (ref.)^{14,15} and represent electrochemically the most similar alternative to mercury electrodes due to comparable cathodic potential window and relatively high sensitivity. The reason, why SAE are increasingly used, is non-toxicity of amalgam materials and mechanical robustness which allows using them in liquid flow systems. Among all the metals forming amalgams, silver seems to be the best for analytes missing specific interactions (e.g., complexation with metal cations) with the metals of amalgam^{16,17}. Silver solid amalgam electrodes (AgSAE) modified by mercury meniscus (m-AgSAE) were shown to be the most convenient alternative to mercury electrodes regarding sensitivity, limits of determination and signal repeatability for a number of organic analytes^{18,19}. The applicability of AgSAE for detection in flow injection analysis (FIA) using wall-jet or thin-layer arrangement was demonstrated previously for *N*-nitroso antineoplastic drugs²⁰ or in HPLC after separation of selected nitrophenols²¹.

In this study, m-AgSAE employed as an amperometric detector in flow injection analysis (FIA) is used for detection 5-nitroquinoline (5-NQ). Further the separation of tested analytes using HPLC with reversed C₁₈ phase and possibility of the combination of HPLC with amperometric detection at m-AgSAE in “wall-jet” arrangement and spectrophotometric detection using diode array detector (DAD) is presented. Specifically, it includes the determination of NPAHs used as markers of incomplete combustion processes: 1-NP, 2-NF, 3-NFt, and 5-NQ as a representative of polycyclic aromatic nitrogen-containing heterocycles also formed by incomplete combustion²² and recognized as a relatively new class of environmental pollutants with adverse health effect²³.

Experimental

Reagents

The stock solution of 1-NP (purity 99 %), 2-NF (98

%), and 3-NfT (99 %) were prepared by dissolving the substances in 100 ml of methanol (gradient grade purity, Merck, Prague, CZ), the stock solution of 5-NQ (99 %) was prepared by dissolving the substance in 100 ml of deionized water. The concentration of all stock solutions was $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, the pure substances were supplied by Sigma-Aldrich. All stock solutions were stored in glass vessels in the dark. It followed from a spectrophotometric study of the stability of all stock solutions that they are stable for at least 90 days.

Britton – Robinson (BR) buffers were prepared in a usual way, i.e. by mixing a solution of 0.04 mol l^{-1} in phosphoric acid, 0.04 mol l^{-1} in acetic acid and 0.04 mol l^{-1} in boric acid with the appropriate amount of 0.2 mol l^{-1} sodium hydroxide solution. Borate buffer was prepared by mixing 0.05 mol l^{-1} of sodium tetraborate with appropriate amount of 0.1 mol l^{-1} hydrochloric acid to obtain pH 9.0. Phosphate buffer was prepared by mixing 0.01 mol l^{-1} sodium dihydrogen phosphate with appropriate amount of 0.2 mol l^{-1} sodium hydroxide solution to obtain pH 7.0 (all chemicals Lachema, Brno, CZ). Methanol (Merck, Prague, CZ) of gradient grade purity was used for mobile phase preparation. De-ionized water was produced by Milli-Q_{plus} system (Millipore, USA).

Apparatus

Electrochemical detector used in FIA and HPLC measurements consisted of a platinum wire auxiliary electrode, silver/silver chloride (1 mol l^{-1} KCl) reference electrode (both Monokrystal, Turnov, CZ) and the working electrode, m-AgSAE with the disc diameter 2.47 mm in three electrode arrangement used in “wall-jet” arrangement. m-AgSAE was prepared from a drawn-out glass tube, its narrow end was filled with a fine silver powder, amalgamated by liquid mercury and connected to an electric contact¹⁶. The exact volume of mercury ($0.4 \mu\text{l}$ if not stated otherwise) to form the meniscus of m-AgSAE was applied by Hamilton syringe.

The FIA system consisted of linear high-pressure pump HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Prague) and electrochemical and spectrometric detector. ED in “wall-jet” arrangement described earlier¹⁸ was used. Electrode system was driven by potentiostat ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Prague). The working m-AgSAE was kept at a constant potential so that the electrochemical cell served as an amperometric detector. The distance of electrode surface from the end of capillary was 0.5 mm. Samples were injected using six-way valve D (Ecom, Prague). Following parameters for FIA determination were used: detection potential -1.6 V , flow rate 4 ml min^{-1} and injected sample volume 0.1 ml .

Volume of spectrophotometric cell was $10 \mu\text{l}$ and optical path length was 5 mm. Output voltage corresponded to 5 V per 1 A.U. ($1 \text{ mV} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ A.U.}$). The signal of spectrophotometric detection was measured at constant wavelength 220 nm.

Program CSW32 version 1.4.11.06 (DataApex, Pra-

gue), driven under operational system Microsoft Windows 98 (Microsoft Corp.), was used for data collection.

The HPLC system consisted of high-pressure pump L-2130 HTA (Hitachi, Japan) governed by the software EZChrom Elite (Agilent Technologies, USA) working in Windows XP (Microsoft Corporation, USA). The column KROMASIL ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$) with reversed C₁₈ phase (Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used. Manual injection of samples degassed for 3 min by passing of nitrogen (purity 4.0, Linde, Prague, CZ) using $20 \mu\text{l}$ Rheodyne (IDEX Health & Science, Rohnert Park, CA, USA) injection valve was used. The diode array detector L-2450 (LaChrom Elite, Hitachi, USA) for measurement from 220 nm to 400 nm was used. The mobile phase was degassed by ultrasonic bath PS 02000A (Powersonic, USA) followed by passing nitrogen (purity 4.0, Linde, Prague, CZ) continuously for the whole period of measurement. The measurements were carried out at ambient laboratory temperature ($22 \text{ }^\circ\text{C}$).

The pH measurements were carried out by pH meter Jenway 4330 (Jenway, UK) with combined glass electrode (Ag/AgCl/ 3 mol l^{-1} KCl (type: 924005)). The pH meter was calibrated with standard pH buffers (Sevac, Prague, CZ). pH values refer to those of the aqueous phase, pH^f values refer to those of the resulting pH of the mixtures of the aqueous phase with the organic solvent.

Procedures

In the case of flow injection analysis, 0.05 mol l^{-1} borate buffer, pH 9.0 was used as run buffer. More diluted analyte solutions were prepared by diluting of exact volume of 5-NQ stock solution with run buffer. All samples were deaerated with N₂ (5 min) before injection into flow of run buffer. The m-AgSAE was activated before starting the work, as well as after every pause longer than one hour. The electrochemical activation of m-AgSAE was carried out by insert potential -2200 mV for 300 s in the stirred solution of 0.2 mol l^{-1} KCl and then washed by distilled water. No other electrochemical pretreatment was performed prior each injection.

In the case of HPLC-ED, the mixture of 0.01 mol l^{-1} phosphate buffer, pH 7.0 : methanol (15:85, v/v) was used as mobile phase. More diluted analyte solutions were prepared by dilution of exact volume of the stock solutions with mobile phase. The flow rate F_m was set at 1 ml min^{-1} and the injected sample volume V_{inj} was $20 \mu\text{l}$. The m-AgSAE in HPLC experiments was activated by the same way as in FIA measurements. No other electrochemical pretreatment was performed prior each injection.

All calibration curves were measured in triplicate. The statistical parameters of calibration curves were calculated using statistic software OriginPro 6.0 (OriginLab Corporation, USA). The significance of the intercepts of linear calibration dependences was tested by statistic software ADSTAT²⁴, which was also used to calculate the limit of quantitation in FIA measurements.

In HPLC, the limit of detection (L_D) and limit of

quantitation (L_Q) were calculated from the peaks heights as the concentration of an analyte which gave a signal three and ten times the background noise ($S/N = 3$; $S/N = 10$, respectively). All the statistical data are calculated for the level of significance $\alpha = 0.05$.

Results and discussion

Flow injection analysis using m-AgSAE as amperometric sensor

First, the conditions for determination 5-NQ were optimized. 0.05 mol l^{-1} borate buffer pH 9.0 medium was used as a run buffer for FIA determination of 5-NQ. The UV detector was also serially arranged prior to the electrochemical detector for the sake of comparison. Optimal detection potential (E_{det}) inserted on m-AgSAE, flow rate (F_m) of the run buffer and injection volume (V_{inj}) were found during the process of optimization. Firstly, the influence of the E_{det} on electrochemical signal was investigated. $E_{\text{det}} = -1.6 \text{ V}$ was selected as optimum potential as it provides the highest signals. Further, the optimum flow rate was investigated (Fig. 1). $F_m = 4 \text{ ml min}^{-1}$ was set as the maximum of peak heights achieved by electrochemical detector (and optimum for UV detector has the same value). The injected sample volume (Fig. 2) was set at 0.1 ml, which provides the highest signal, further not increasing when higher volumes are injected. This optimum value was reached for both detectors.

Calibration dependences were measured under optimized conditions in the range from $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ to $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ using ED and UV detector, they are linear within the whole concentration range. The peak heights were evaluated from the negative peak height obtained after injection of blank solution into FIA system. The record

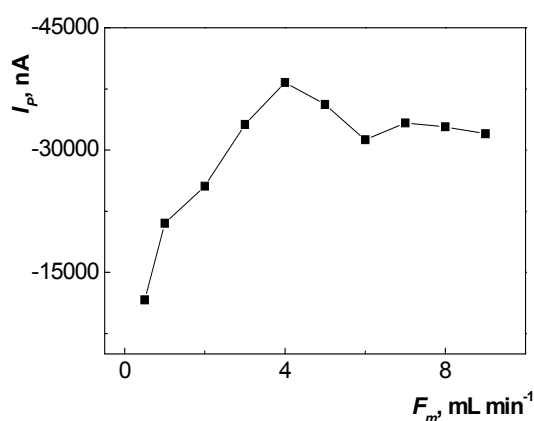


Fig. 1. Dependence of the peak heights I_p of 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) on flow rate F_m ($E_{\text{det}} = -1.6 \text{ V}$) for FIA-ED determination of 5-NQ. Run buffer 0.05 mol l^{-1} borate buffer, pH 9.0; injected volume $V_{\text{inj}} = 100 \mu\text{l}$. Evaluated from peak heights

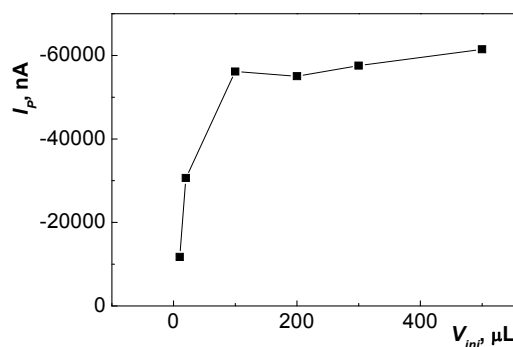


Fig. 2. Dependence of the peak heights I_p of 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) on injected volume V_{inj} ($E_{\text{det}} = -1.6 \text{ V}$) for FIA-ED determination of 5-NQ. Run buffer 0.05 mol l^{-1} borate buffer, pH 9.0, flow rate $F_m = 4 \text{ ml min}^{-1}$. Evaluated from peak heights

peak of the ED is shown in Fig. 3. In Figure 3B detecting the lowest attainable concentration range from $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ to $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, there is a negative peak which is related to the presence of oxygen in the run buffer. The system is probably not totally hermetic and the freshly deaerated blank solution (and the samples) has lower content of oxygen than run buffer. This phenomenon was not observed for UV detector. The L_Q achieved with UV ($6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) and ED ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) are comparable.

The HPLC-ED method for the determination of 1-NP, 2-NF, 3-NFt, and 5-NQ

Firstly, the separation of 1-NP, 2-NF, 3-NFt, and 5-NQ was optimized using reversed C_{18} phase. Mobile phase with high content of organic phase has to be used due to the extended aromatic system of studied NPAHs. Using 0.01 mol l^{-1} phosphate buffer, pH 7.0 : methanol (15:85, v/v) mobile phase, baseline separation of tested analytes was achieved in fifteen minutes.

The detection potential $E_{\text{det}} = -1.5 \text{ V}$ was chosen based on hydrodynamic voltammograms (Fig. 4) of tested analytes and the highest signal to noise ratio. The consequent decrease of peak currents I_p after the height maximum at E_{det} is reached is caused by an increase of the background current due to the cathodic decomposition (i.e., hydrogen evolution) of the mobile phase. It proceeds at relatively negative potentials due to the high content of the organic phase in mobile phase. The noise of the system is independent of E_{det} and it is about 50 nA.

Calibration dependences were measured under optimized conditions within the range from $2 \cdot 10^{-5}$ to $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ using electrochemical detector and within the range from $3 \cdot 10^{-7}$ to $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ using diode array detector (DAD).

Parameters for the electrochemical detector are summarized in the Table I, limit of quantitation ($10 S/N$), is

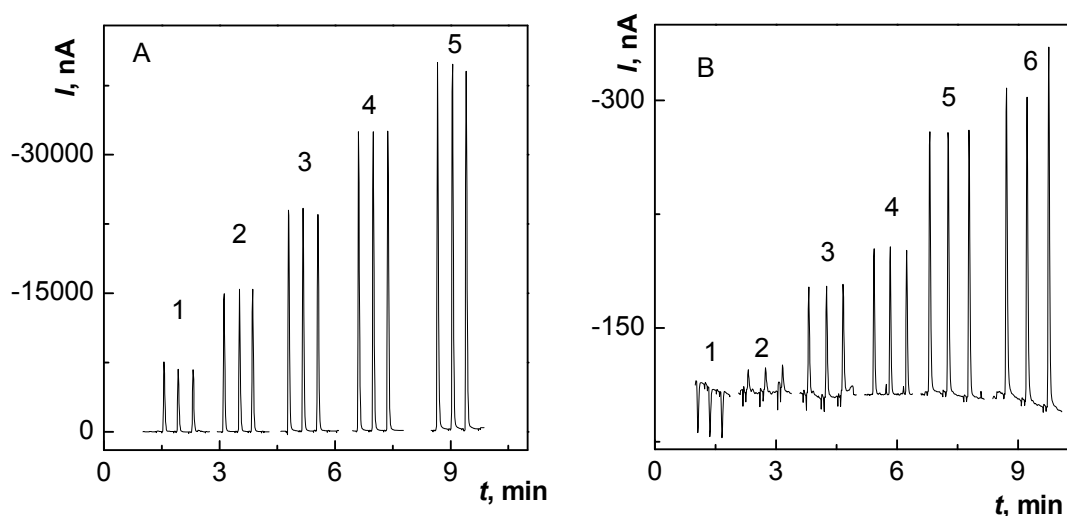


Fig. 3. Peaks of 5-NQ recorded with FIA-ED with m-AgSAE detector in “wall-jet” arrangement for 5-NQ concentration: (A): 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4) and 10 (5) $\cdot 10^{-5}$ mol Γ^{-1} , and (B): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5) and 10 (6) $\cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1} . Run electrolyte 0.05 mol Γ^{-1} borate buffer pH 9.0, $E_{\text{det}} = -1.6$ V, flow rate $F_m = 4$ ml min^{-1} , injected volume $V_{\text{inj}} = 100$ μl

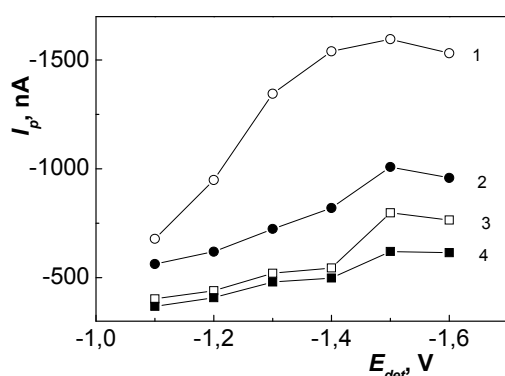


Fig. 4. Dependence of peak heights I_p of 5-NQ (1), 2-NF (2), 1-NP (3), and 3-NFt (4) on detection potential E_{det} in HPLC-ED. Concentration of each analyte $1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1} . Mobile phase 0.01 mol Γ^{-1} phosphate buffer pH 7.0 : methanol (15:85; v/v), $F_m = 1$ ml min^{-1} , $V_{\text{inj}} = 20$ μl

always 3.3 times higher than L_D . The achieved L_{QS} (from $3.0 \cdot 10^{-5}$ mol Γ^{-1} for 5-NQ to $1.0 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1} for 3-NFt) are more than one order of magnitude than L_Q reported above for FIA-ED for 5-NQ ($3 \cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1}). This may be caused by higher noise using the high-pressure pump working in pulse regime in HPLC rather than the linear pump used for FIA.

Using DAD the optimum wavelength was found for each test substance. They are listed in the Table II together with the parameters of calibration dependences evaluated from both, peak areas and peak heights. The noise is independent on the wavelength and its value is about $8 \cdot 10^{-5}$ A.U. The differences of L_D calculated at optimum λ for each compounds listed in Table II (from $0.13 \cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1} for 5-NQ to $0.39 \cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1} for 3-NFt) and for the compromise wavelength of $\lambda = 227$ (from $0.32 \cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1} for 5-NQ to $0.59 \cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1} for 3-NFt) are about comparable. The L_{DS} were evaluated from peak heights.

Table I

Parameters of calibrations dependences for the determination of 5-NQ, 2-NF, 1-NP, and 3-NFt using HPLC-ED with “wall-jet” m-AgSAE detector. Mobile phase 0.01 mol Γ^{-1} phosphate buffer pH 7.0 : methanol (15:85; v/v), $F_m = 1$ ml min^{-1} , $V_{\text{inj}} = 20$ μl , detection potential -1.5 V, evaluated from peak heights

Analyte	Concentration range [$\mu\text{mol } \Gamma^{-1}$]	Slope [mA l mol^{-1}]	Correlation coefficient	L_D [$\mu\text{mol } \Gamma^{-1}$]	L_Q [$\mu\text{mol } \Gamma^{-1}$]
5-NQ	20 – 100	–150	0.9917	9.2	30.4
2-NF	20 – 100	–99	0.9911	17.0	56.1
1-NP	20 – 100	–84	0.9952	28.0	92.4
3-NFt	20 – 100	–64	0.9943	33.0	108.9

Table II

Parameters of calibrations dependences for the determination of 5-NQ, 2-NF, 1-NP, and 3-NFt using HPLC-DAD. Mobile phase 0.01 mol l⁻¹ phosphate buffer pH 7.0 : methanol (15:85; v/v), $F_m = 1 \text{ ml min}^{-1}$, $V_{inj} = 20 \text{ } \mu\text{l}$

Analyte	λ [nm]	Concentration range [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Slope ^a	Correlation coefficient	L_D [$\mu\text{mol l}^{-1}$]
<i>A - evaluated for peak height</i>					
5-NQ	220	0.3 – 100	1790	0.9998	0.13
2-NF	335	0.3 – 100	656	0.9997	0.36
1-NP	238	0.3 – 100	1080	0.9996	0.22
3-NFt	233	0.3 – 100	621	0.9993	0.39
<i>B- evaluated for peak area</i>					
5-NQ	220	0.3 – 100	10510	0.9999	–
2-NF	335	0.3 – 100	5620	0.9996	–
1-NP	238	0.3 – 100	13220	0.9999	–
3-NFt	233	0.3 – 100	7540	0.9996	–

Conclusion

In this study, we focused on the FIA-ED and HPLC-ED determination of selected nitrated aromatic compounds using an amperometric sensor in “wall-jet” detection cell.

FIA-ED was tested using 5-NQ. Using optimized conditions (run buffer 0.05 mol l⁻¹ borate buffer of pH 9.0, detection potential -1.6 V, flow rate 4 ml min⁻¹, injected volume 0.1 ml), the L_Q obtained for FIA-ED ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) is comparable with UV detection ($L_Q = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$).

Further, HPLC separation of 1-NP, 2-NF, 3-NFt, and 5-NQ using C₁₈ phase was proposed in mobile phase consisting of 0.01 mol l⁻¹ phosphate buffer pH 7.0: methanol 15:85 (v/v). Using electrochemical detection, L_{DS} lying mostly in the $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ concentration range were achieved, which is about 2 orders of magnitude higher than using DAD when the optimum wavelengths for each analyte are used. In the following measurement we will focus on the removal of the electronic noise from the measurement system, which contributes significantly to the relatively high L_{DS} of electrochemical detection.

The project was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (projects LC 06035, MSM 0021620857, and RP 14/63) and by Grant Agency of Charles University (project SVV 261 204).

REFERENCES

1. WHO: *Selected Nitro- and Nitro-Oxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. WHO, Geneva 2003.
2. Scheepers P. T. J., Bos R. P.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 64, 149 (1992).
3. Atkinson R., Arey J.: *Environ. Health. Perspect.* 102, 117 (1994).

4. Jacob J., Karcher W., Belliaro J. J., Dumler R., Boenke A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 340, 755 (1991).
5. Moreira J. C., Barek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
6. Netto A. D. P., Moreira J. C., Dias A., Arbilla G., Ferreira L. F. V., Oliveira A. S., Barek J.: *Quim. Nova* 23, 765 (2000).
7. Zielinska B., Samy S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 883 (2006).
8. Kuo C. T., Chen H. W., Lin S. T.: *Anal. Chim. Acta* 482, 219 (2003).
9. Murayama M., Dasgupta K.: *Anal. Chem.* 68, 1226 (1996).
10. MacCrehan W. A., May W. E., D. Y. S., Benner S. D.: *Anal. Chem.* 60, 194 (1988).
11. Rosenkranz H. S.: *Mutat. Res.* 101, 1 (1982).
12. Galceran M. T., Moyano E.: *Talanta* 40, 615 (1993).
13. Jin Z., Rappaport S. M.: *Anal. Chem.* 55, 1778 (1983).
14. Novotny L., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* 94, 1118 (2000).
15. Mikkelsen O., Schroder K.: *Anal. Lett.* 33, 3253 (2000).
16. Yosypchuk B., Novotny L.: *Electroanalysis* 14, 1733 (2002).
17. Yosypchuk B., Novotny L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
18. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007).
19. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
20. Peckova K., Vrzalova L., Bencko V., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1697 (2009).
21. Danhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Electroanalysis* 21, 303 (2009).

22. Naughton A. B. J., Jespersen N. D.: *Anal. Chim. Acta* 251, 95 (1991).
23. Bleeker E. A. J., Wiegman S., de Voogt P., Kraak M., Leslie H. A., de Haas E., Admiraal W. S.: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York 2002.
24. Meloun M., Militký J., Forina M: *Chemometrics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood, Chichester 1992.

LINEAR RETENTION INDICES OF ALL C₄-C₂₃ MONOMETHYL-BRANCHED METHYL ESTERS OF SATURATED FATTY ACIDS ON POLYDIMETHYLSILOXANE STATIONARY PHASE

LADISLAV SOJÁK^a, RÓBERT KUBINEC^a, JAROSLAV BLÁŠKO^a, GABRIELA ADDOVÁ^a, IVAN OSTROVSKÝ^a, WILHELM LORENZ^b, and ANTON AMANN^c

^aInstitute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovakia, ^bMartin-Luther University, Halle – Wittenberg, Department of Chemistry, Institute of Analytical and Environmental Chemistry, Halle, Saale, Germany, ^cInnsbruck Medical University, Department of Anesthesia and General Intensive Care, Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck, Austria
kubinec@fns.uniba.sk

Experimental

Preparation of brached FAME model mixture

Monomethyl-branched FAME C₇-C₂₂ as a model mixture were prepared from mixture of C₆-C₂₁ linear chain FAME (Supelco, Bellefonte, PA, USA) by methylene insertion reaction¹ in an apparatus by Glastrup² by using gaseous diazomethane and UV radiation and completed by individual C₃-C₆ linear chain FAME and C₃-C₆ monomethyl-branched FAMEs (Sigma-Aldrich, Germany). Recovery of this reaction was about 4 % of monomethyl-branched FAME.

Preparation of biological sample

Biological sample was taken from root of the tongue in the amount of approximately 50 µl. In order to avoid the contamination of sample with food, 24 hours before sample collection the patient took fat free food. The sample was driven to dryness at 50 °C. The lipids were extracted with 1 ml of chloroform. After removing of solvent from the extract under stream of nitrogen at 50 °C, 200 µl of hexane and 40 µl of methyl acetate were added and mixed. Methyl esters of fatty acids were prepared using 100 µl of 0.5 M sodium methoxide in dry methanol and for 15 min allowed to react at room temperature with occasional mixing. Then vial was cooled at -20 °C for 10 min, added 60 µl of oxalic acid (0.5 g in 15 ml diethyl ether), and mixed. Vial was centrifuged to settle sodium oxalate precipitate. The upper phase with FAME solution was used for direct analysis by GC (GC-MS).

GC-MS measurements

GC-MS measurements were performed on an Agilent Technologies 6890N gas chromatograph with a 5973 Network mass-selective detector. The 1 µl of sample injection operated at the temperature 320 °C in the split injection mode with a split ratio 100:1 and in the splitless mode for the standard mixture and biological sample, respectively. The monomethyl-branched FAME mixture was separated using capillary column 100 m × 0.25 mm I.D. coated with a film thickness of 0.25 µm of methylsilicone OV-1 as stationary phase (Supelco). The column temperature was 30 °C initially, then the temperature was increased to 310 °C at ramp rate of 1 °Cmin⁻¹, temperature was held at the final temperature 310 °C for 5 min. Helium carrier gas with constant flow of 1.6 ml min⁻¹ was used. The transfer line temperature was set at 330 °C. Quadrupole conditions were as follows: electron energy 70 eV, and ion source temperature 230 °C. Mass spectral data were obtained in the SIM mode. Each GC peak was inspected for constancy of MS pattern in order to detect possible overlapping compounds and to measure their retention data. The GC-MS/SIM chromatograms were obtained for characteristic fragment ions (Table I).

Retention indices

The temperature-programmed retention indices of monomethyl-branched FAME were calculated from three parallel measurements with an average repeatability of ± 0.1 i.u. As standards for index calculations were chosen linear fatty acids, having definition retention indices of 100 multiplying the carbon atom number in the molecule. Monomethyl-branched FAME were identified on the basis of structure-retention relationships of homomorphy factors of individual monomethyl-branched FAME homologous series (2-, 3-, 4-, . . . , 22- monomethyl-branched FAME) on the number of carbon atoms^{3,4} and confirmed by GC-MS⁵.

Results and discussion

The obtained chromatogram of GC separation of C₇-C₂₂ monomethyl-branched FAME from methylene insertion reaction to linear chain FAME with assigned peaks is given in Fig. 1. It can be seen that characteristic mixtures of all isomeric monomethyl-branched FAME were obtained. The measured programmed-temperature linear retention indices I_p^{OV-1} and their standard deviation s from given chromatogram for monomethyl-branched FAME on methylsilicone stationary phase are given in Table I.

Table I

Measured programmed-temperature linear indices I_p of monomethyl-branched FAME on methylsilicone stationary phase and their standard deviations s , homomorphy factors H and specific and molecular MS ions m/z

Methyl x-methyl-y-oate		I	s	H	MS ions m/z
x	y				
2-	propan	353.43	0.078	53.43	57, 88, 101
3-	butan	446.58	0.056	46.582	57, 88, 101
2-	butan	448.28	0.075	48.28	59, 74, 101
2-	pentan	541.43	0.052	41.43	57, 88, 101
3-	pentan	554.92	0.048	54.92	59, 74, 101
4-	pentan	561.82	0.062	61.82	55, 74, 87
2-	hexan	641.28	0.041	41.28	57, 88, 101
3-	hexan	648.61	0.041	48.61	59, 74, 101
5-	hexan	662.85	0.041	62.85	69, 74, 101
4-	hexan	671.66	0.081	71.66	55, 74, 87
2-	heptan	740.32	0.030	40.32	57, 88, 101
3-	heptan	746.53	0.066	46.53	74, 75, 101
4-	heptan	762.31	0.041	62.31	55, 74, 87
6-	heptan	763.42	0.047	63.42	74, 87, 115
5-	heptan	769.87	0.057	69.87	74, 87, 129
2-	octan	839.18	0.066	39.18	57, 88, 101
3-	octan	844.28	0.048	44.28	74, 75, 101
4-	octan	858.23	0.037	58.23	55, 74, 87
5-	octan	859.30	0.059	59.30	74, 101, 129
7-	octan	864.75	0.060	64.75	74, 129, 157
6-	octan	869.17	0.043	69.17	74, 87, 115
2-	nonan	938.06	0.018	38.06	88, 101, 143
3-	nonan	942.77	0.032	42.77	74, 75, 101
5-	nonan	954.80	0.055	54.80	74, 101, 129
4-	nonan	955.74	0.037	55.74	55, 74, 87
6-	nonan	958.68	0.049	58.68	74, 87, 115
8-	nonan	964.60	0.067	64.60	74, 87, 143
7-	nonan	971.34	0.032	71.34	74, 129, 157
2-	decan	1038.41	0.038	38.41	88, 101, 143
3-	decan	1042.57	0.033	42.57	74, 75, 101
5-	decan	1052.42	0.050	52.42	74, 101, 129
6-	decan	1054.55	0.038	54.55	74, 87, 115
4-	decan	1054.71	0.033	54.71	55, 74, 87

Table I
Continuation

Methyl x-methyl-y-oate		<i>I</i>	<i>s</i>	<i>H</i>	MS ions <i>m/z</i>
<i>x</i>	<i>y</i>				
7-	decan	1060.71	0.068	60.71	74, 129, 157
9-	decan	1065.28	0.050	65.28	74, 157, 185
8-	decan	1071.45	0.087	71.45	74, 87, 143
2-	undecan	1137.63	0.035	37.63	88, 101, 143
3-	undecan	1141.77	0.035	41.77	74, 75, 101
5-	undecan	1150.06	0.075	50.06	74, 101, 129
6-	undecan	1150.90	0.094	50.90	74, 87, 115
4-	undecan	1153.37	0.094	53.37	55, 74, 87
7-	undecan	1155.30	0.055	55.30	74, 129, 157
8-	undecan	1159.69	0.075	59.69	74, 87, 143
10-	undecan	1165.09	0.043	65.09	149, 167, 199
9-	undecan	1171.70	0.096	71.70	74, 157, 185
2-	dodecan	1237.14	0.029	37.14	88, 101, 143
3-	dodecan	1241.01	0.018	41.01	74, 75, 101
5-	dodecan	1248.26	0.047	48.26	74, 101, 129
6-	dodecan	1248.40	0.028	48.40	74, 87, 115
7-	dodecan	1251.47	0.047	51.47	74, 129, 157
4-	dodecan	1252.40	0.028	52.40	55, 74, 87
8-	dodecan	1253.98	0.058	53.98	74, 87, 143
11-	dodecan	1259.65	0.045	59.65	74, 185, 213
9-	dodecan	1264.88	0.038	64.88	74, 157, 185
10-	dodecan	1271.74	0.045	71.74	149, 167, 199
2-	tridecan	1336.66	0.055	36.66	88, 101, 143
3-	tridecan	1340.50	0.033	40.50	74, 75, 101
6-	tridecan	1346.56	0.033	46.56	74, 87, 115
5-	tridecan	1346.93	0.033	46.93	74, 101, 129
7-	tridecan	1348.59	0.033	48.59	74, 129, 157
8-	tridecan	1349.84	0.055	49.84	74, 87, 143
4-	tridecan	1351.55	0.076	51.55	55, 74, 87
9-	tridecan	1353.77	0.076	53.77	74, 157, 185
10-	tridecan	1359.32	0.076	59.32	149, 167, 199
12-	tridecan	1364.86	0.033	64.86	74, 199, 227
11-	tridecan	1371.75	0.077	71.75	74, 185, 213
2-	tetradecan	1436.21	0.033	36.21	88, 101, 143
3-	tetradecan	1440.10	0.032	40.10	74, 75, 101

Table I
Continuation

Methyl x-methyl-y-oate		<i>I</i>	<i>s</i>	<i>H</i>	MS ions <i>m/z</i>
<i>x</i>	<i>y</i>				
6-	tetradecan	1445.24	0.052	45.24	74, 87, 115
7-	tetradecan	1445.92	0.031	45.92	74, 129, 157
5-	tetradecan	1446.12	0.031	46.12	74, 101, 129
8-	tetradecan	1446.89	0.053	46.89	74, 87, 143
9-	tetradecan	1449.61	0.030	49.61	74, 157, 185
4-	tetradecan	1451.02	0.052	51.02	55, 74, 87
10-	tetradecan	1453.20	0.020	53.20	149, 167, 199
11-	tetradecan	1459.13	0.053	59.13	74, 185, 213
13-	tetradecan	1464.71	0.028	64.71	191, 213, 241
12-	tetradecan	1471.94	0.043	71.94	74, 199, 227
2-	pentadecan	1535.95	0.021	35.95	88, 101, 143
3-	pentadecan	1539.77	0.053	39.77	74, 75, 101
6-	pentadecan	1544.09	0.031	44.09	74, 87, 115
8-	pentadecan	1544.60	0.044	44.60	74, 87, 143
7-	pentadecan	1544.81	0.054	44.81	74, 129, 157
5-	pentadecan	1544.96	0.031	44.96	74, 101, 129
9-	pentadecan	1546.49	0.021	46.49	74, 157, 185
10-	pentadecan	1548.93	0.032	48.93	149, 167, 199
4-	pentadecan	1550.61	0.031	50.61	55, 74, 87
11-	pentadecan	1553.00	0.021	53.00	74, 185, 213
12-	pentadecan	1559.22	0.014	59.22	74, 199, 227
14-	pentadecan	1564.77	0.016	64.77	227, 229, 255
13-	pentadecan	1572.15	0.059	72.15	191, 213, 241
2-	hexadecan	1635.61	0.022	35.61	88, 101, 143
3-	hexadecan	1639.50	0.035	39.50	74, 75, 101
8-	hexadecan	1642.96	0.059	42.96	74, 87, 143
6-	hexadecan	1643.18	0.058	43.18	74, 87, 115
7-	hexadecan	1643.60	0.059	43.60	74, 129, 157
9-	hexadecan	1643.98	0.034	43.98	74, 157, 185
5-	hexadecan	1644.35	0.022	44.35	74, 101, 129
10-	hexadecan	1645.42	0.035	45.42	149, 167, 199
11-	hexadecan	1648.45	0.022	48.45	74, 185, 213
4-	hexadecan	1650.27	0.013	50.27	55, 74, 87
12-	hexadecan	1652.83	0.033	52.83	74, 199, 227
13-	hexadecan	1659.06	0.032	59.06	191, 213, 241
15-	hexadecan	1664.71	0.031	64.71	74, 75, 241
14-	hexadecan	1672.39	0.029	72.39	227, 229, 255

Table I
Continuation

Methyl x-methyl-y-oate		<i>I</i>	<i>s</i>	<i>H</i>	MS ions <i>m/z</i>
<i>x</i>	<i>y</i>				
2-	heptadecan	1735.34	0.032	35.34	88, 101, 143
3-	heptadecan	1739.30	0.058	39.30	74, 75, 101
9-	heptadecan	1741.36	0.048	41.36	74, 157, 185
8-	heptadecan	1741.42	0.023	41.42	74, 87, 143
6-	heptadecan	1742.31	0.059	42.31	74, 87, 115
10-	heptadecan	1742.36	0.033	42.36	149, 167, 199
7-	heptadecan	1742.42	0.023	42.42	74, 129, 157
5-	heptadecan	1743.76	0.048	43.76	74, 101, 129
11-	heptadecan	1744.93	0.033	44.93	74, 185, 213
12-	heptadecan	1748.22	0.060	48.22	74, 199, 227
4-	heptadecan	1750.11	0.035	50.11	55, 74, 87
13-	heptadecan	1752.56	0.061	52.56	191, 213, 241
14-	heptadecan	1759.14	0.023	59.14	227, 229, 255
16-	heptadecan	1764.72	0.063	64.72	74, 255, 283
15-	heptadecan	1772.63	0.039	72.63	74, 75, 241
2-	octadecan	1835.10	0.039	35.10	88, 101, 143
3-	octadecan	1839.17	0.038	39.17	74, 75, 101
8-	octadecan	1840.34	0.038	40.34	74, 87, 143
10-	octadecan	1840.40	0.024	40.40	149, 167, 199
9-	octadecan	1840.57	0.065	40.57	74, 157, 185
7-	octadecan	1841.33	0.024	41.33	74, 129, 157
6-	octadecan	1841.68	0.038	41.68	74, 87, 115
11-	octadecan	1842.37	0.065	42.37	74, 185, 213
5-	octadecan	1843.54	0.024	43.54	74, 101, 129
12-	octadecan	1844.64	0.037	44.64	74, 199, 227
13-	octadecan	1847.90	0.062	47.90	191, 213, 241
4-	octadecan	1849.88	0.065	49.88	55, 74, 87
14-	octadecan	1852.62	0.049	52.62	227, 229, 255
15-	octadecan	1859.25	0.034	59.25	74, 75, 241
17-	octadecan	1864.67	0.033	64.67	43, 74, 191
16-	octadecan	1872.88	0.032	72.88	74, 255, 283
2-	nonadecan	1934.83	0.041	34.83	88, 101, 143
3-	nonadecan	1939.08	0.028	39.08	74, 75, 101
8-	nonadecan	1939.20	0.035	39.20	74, 87, 143
11-	nonadecan	1939.32	0.059	39.32	74, 185, 213
10-	nonadecan	1939.38	0.037	39.38	149, 167, 199
9-	nonadecan	1940.29	0.030	40.29	74, 157, 185

Table I
Continuation

Methyl x-methyl-y-oate		<i>I</i>	<i>s</i>	<i>H</i>	MS ions <i>m/z</i>
<i>x</i>	<i>y</i>				
7-	nonadecan	1940.53	0.029	40.53	74, 129, 157
6-	nonadecan	1941.32	0.036	41.32	74, 87, 115
12-	nonadecan	1941.99	0.030	41.99	74, 199, 227
5-	nonadecan	1943.14	0.031	43.14	74, 101, 129
13-	nonadecan	1944.30	0.059	44.30	191, 213, 241
14-	nonadecan	1947.75	0.034	47.75	227, 229, 255
4-	nonadecan	1949.70	0.037	49.70	55, 74, 87
15-	nonadecan	1952.43	0.060	52.43	74, 75, 241
16-	nonadecan	1959.22	0.042	59.22	255, 283
18-	nonadecan	1964.62	0.046	64.62	43, 74, 191
17-	nonadecan	1973.06	0.051	73.06	43, 74, 191
2-	eicosan	2034.62	0.043	34.62	88, 101, 143
10-	eicosan	2037.97	0.042	37.97	149, 167, 199
8-	eicosan	2038.28	0.042	38.28	74, 87, 143
9-	eicosan	2038.47	0.070	38.47	74, 157, 185
11-	eicosan	2038.60	0.041	38.60	74, 185, 213
3-	eicosan	2038.79	0.070	38.79	74, 75, 101
12-	eicosan	2039.86	0.042	39.86	74, 199, 227
7-	eicosan	2039.92	0.070	39.92	74, 129, 157
6-	eicosan	2040.87	0.017	40.87	74, 87, 115
13-	eicosan	2041.38	0.042	41.38	191, 213, 241
5-	eicosan	2042.89	0.041	42.89	74, 101, 129
14-	eicosan	2044.09	0.042	44.09	227, 229, 255
15-	eicosan	2047.57	0.040	47.57	74, 75, 241
4-	eicosan	2049.65	0.039	49.65	55, 74, 87
16-	eicosan	2052.43	0.039	52.43	74, 255, 283
17-	eicosan	2059.25	0.066	59.25	43, 74, 191
19-	eicosan	2064.69	0.036	64.69	74, 149, 191
18-	eicosan	2073.28	0.034	73.28	43, 74, 191
2-	heneicosan	2134.41	0.037	34.41	88, 101, 143
10-	heneicosan	2137.03	0.038	37.03	149, 167, 199
9-	heneicosan	2137.16	0.057	37.16	74, 157, 185
11-	heneicosan	2137.16	0.039	37.16	74, 185, 213
8-	heneicosan	2137.36	0.039	37.36	74, 87, 143
12-	heneicosan	2137.75	0.038	37.75	74, 199, 227
3-	heneicosan	2138.54	0.057	38.54	74, 75, 101
13-	heneicosan	2139.20	0.057	39.20	191, 213, 241

Table I
Continuation

Methyl x-methyl-y-oate		<i>I</i>	<i>s</i>	<i>H</i>	MS ions <i>m/z</i>
<i>x</i>	<i>y</i>				
7-	heneicosan	2139.33	0.027	39.33	74, 129, 157
6-	heneicosan	2140.64	0.038	40.64	74, 87, 115
14-	heneicosan	2141.23	0.039	41.23	227, 229, 255
5-	heneicosan	2142.48	0.038	42.48	74, 101, 129
15-	heneicosan	2143.73	0.027	43.73	74, 75, 241
16-	heneicosan	2147.47	0.040	47.47	74, 255, 283
4-	heneicosan	2149.51	0.041	49.51	55, 74, 87
17-	heneicosan	2152.33	0.041	52.33	43, 74, 191
18-	heneicosan	2159.23	0.043	59.23	43, 74, 191
20-	heneicosan	2164.48	0.055	64.48	74, 75, 191
19-	heneicosan	2173.47	0.047	73.47	74, 149, 191
2-	docosan	2234.13	0.028	34.13	88, 101, 143
10-	docosan	2235.90	0.045	35.90	149, 167, 199
11-	docosan	2236.04	0.046	36.04	74, 185, 213
9-	docosan	2236.31	0.057	36.31	74, 157, 185
12-	docosan	2236.44	0.057	36.44	74, 199, 227
8-	docosan	2236.65	0.028	36.65	74, 87, 143
13-	docosan	2236.99	0.057	36.99	191, 213, 241
3-	docosan	2238.56	0.028	38.56	74, 75, 101
14-	docosan	2238.83	0.088	38.83	227, 229, 255
7-	docosan	2238.90	0.028	38.90	74, 129, 157
6-	docosan	2240.33	0.057	40.33	74, 87, 115
15-	docosan	2240.80	0.046	40.80	74, 75, 241
5-	docosan	2242.37	0.057	42.37	74, 101, 129
16-	docosan	2242.92	0.018	42.92	74, 255, 283
17-	docosan	2247.21	0.058	47.21	43, 74, 191
4-	docosan	2249.18	0.028	49.18	55, 74, 87
18-	docosan	2252.18	0.058	52.18	43, 74, 191
19-	docosan	2259.20	0.028	59.20	74, 149, 191
21-	docosan	2264.31	0.028	64.31	74, 75, 191
20-	docosan	2273.57	0.060	73.57	74, 75, 191

Despite using a high resolution 100 m long capillary column, gas chromatographic separation of several monomethyl-branched FAME were not obtained. The separation difficulties increase with the shift of the methyl group to the middle of the molecule carbon chain and with the increasing number of monomethyl-branched FAME carbon atoms. The most difficult separable isomers are those with methyl substitution in the centre of molecule carbon chain and those isomers with new position of methyl group be-

ginning at higher number of carbon atoms.

The retention indices of gas chromatographically unseparated monomethyl-branched FAME isomers were calculated by MS deconvolution. GC-MS deconvolution was performed by using of the characteristic fragment ions formed by cleavage of the carbon-carbon bond adjacent to the tertiary carbon atoms. Each isomer can be characterized by two even mass fragment ions⁵. As an example consider Fig. 2, which shows the result of mass spectro-

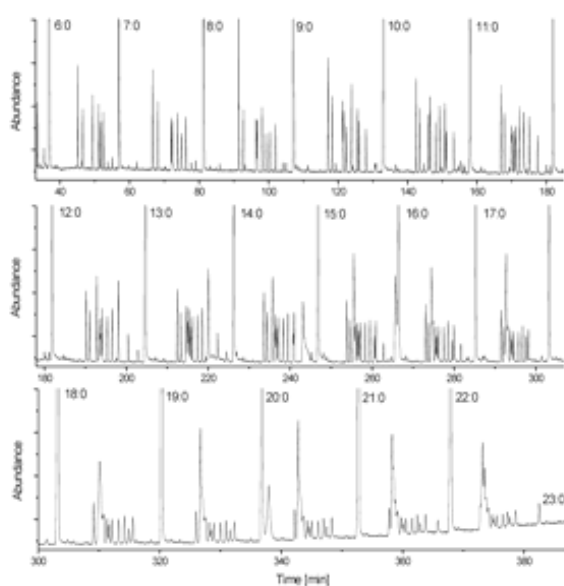


Fig. 1. The obtained chromatogram of GC separation of C₇–C₂₂ monomethyl-branched FAME from methylene insertion reaction to linear chain FAME with assigned peaks

metric deconvolution of the GC unseparated isomers 5-, 6-, 7-, 8-, 9- monomethyl-branched C₁₆ methyl ester. All these isomers were mass spectrometrically deconvoluted by detection of specific fragment ions, obtaining calculated retention times and retention indices. For the deconvoluted 6- and 8-monomethyl C₁₆ methylester pair the

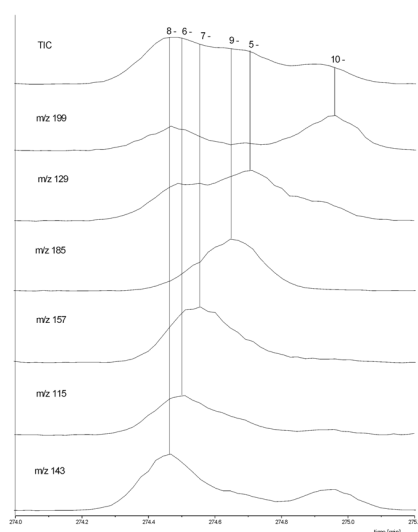


Fig. 2. The result of mass spectrometric deconvolution of the GC unseparated isomers 5-, 6-, 7-, 8-, 9- monomethyl-branched C₁₆ methyl ester

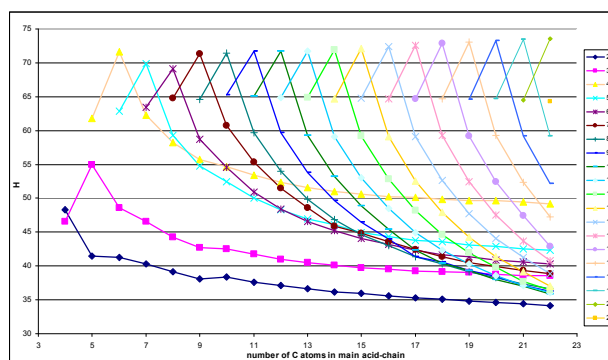


Fig. 3. Dependence of homomorphy factors on the number of carbon atoms of monomethyl-branched FAME homologues series

retention time difference is only 0.04 min corresponding to a retention index difference of 0.21 i.u.

The preliminary identification of monomethyl-branched FAME reaction products was obtained from measured temperature programmed linear retention indices by structure-retention relationships based on the dependence of homomorphy factors on the number of carbon atoms for individual homologous series, i.e. for 2-, 3-, 4-, . . . 20-monomethyl-branched FAME. The homomorphy factor H is defined as the difference of retention index of the given monomethyl-branched FAME homologue and linear chain FAME with the same carbon atom number. Thus, the H value characterizes the contribution of functional group to retention index^{4,6}.

The obtained dependence of $H_p = f(C_n)$ for individual homologous series of monomethyl-branched FAME is presented in Fig. 3.

The preliminary identification of monomethyl-branched FAME as model analytes obtained by methylene insertion reaction to linear chain FAME was confirmed by GC-MS².

Conclusions

The mixture of all 210 possible monomethyl-branched FAME isomers up to C₂₃ was obtained by methylene insertion reaction to linear chain C₆–C₂₁ FAME and completed by individual C₃–C₆ linear chain FAME. The programmed temperature GC linear retention indices prepared compounds on OV-1 stationary phase and their mass spectrometric characteristics were measured.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract Nos. APVV-0163-06, LPP-0198-06, and SK-AT-0014-08 and Grant Agency VEGA under the projects Nos. 1/0297/08 and 1/0298/08.

REFERENCES

1. Simmons M.C., Richardson D.B., Dvoretzky I., in: R.P.W. Scott (ed.), *Gas Chromatography*, p. 211. Butterworth, London 1960.
2. Glastrup J.: *J. Chromatogr.*, A 827, 133 (1988).
3. Sojak L., Vigdergauz M.S.: *Gas Chromatography*. University of Pardubice, Pardubice 1993.
4. Sojak L., Hrivnak J., Majer P., Janak J.: *Anal. Chem.* 45, 293(1973).
5. Kenig F., Damste J.S.S., Dalen A.C.K., Rijpstra W.I.C., Huc A.Y., Deleeuw J.W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 2999 (1995).
6. Sojak L., Kubinec R., Jurdakova H., Hajekova E., Bajus M.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 78, 387 (2007).

L. Soják^a, R. Kubinec^a, J. Blaško^a, G. Addová^a, I. Ostrovský^a, W. Lorenz^b, and A. Amann^c (^a *Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia*, ^b *Martin-Luther University, Halle – Wittenberg, Department of Chemistry, Institute of Analytical and Environmental Chemistry, Halle, Saale, Germany*, ^c *Innsbruck Medical University, Department of Anesthesia and General Intensive Care, Innsbruck, Austria*): **Linear Retention Indices of All C₄–C₂₃ Monomethyl-Branched Methyl Esters of Saturated Fatty Acids on Polydimethylsiloxane Stationary Phase**

Branched methylesters of fatty acids C₇–C₂₇ were prepared by methylene insertion reaction to straight-chain fatty acid methylesters. The programmed temperature linear retention indices of all 210 C₄–C₂₃ monomethylesters of fatty acids on OV-1 stationary phase were measured with an average repeatability ± 0.1 index units (i.u.). Because of the each of standard reference materials of C₄–C₂₃ monomethyl fatty acids, the preliminary identification of monomethyl ester of fatty acid was performed on the basis of regularity the dependence of homomorphy factors on the member of carbon atoms of individual homologous series of positional monomethylesters of fatty acids (FAME). The prediction of retention of isomers with new position of methyl group beginning at higher carbon atoms number, as well as for second, third, fourth, etc., member of homologous series allowed the dependence. $H_p=f(C_n)$ for first, second, third, etc. members of beginning homologous of monomethyl derivatives of fatty acids methylesters. The identification was confirmed by mass spectrometry. All gas chromatographic unseparated methyl isomers of fatty acid methyl esters with methyl-group near the middle of molecule carbon chain were resolved by mass spectrometric deconvolution using SIM-mode.

POROVNANIE GC/MS A LC/MS NA STANOVENIE OBSAHU AKRYLAMIDU V CEREÁLNYCH VÝROBKOCH

KRISTÍNA KUKUROVÁ^a, ALENA BEDNÁRIKOVÁ^a, EMIL KOLEK^a, LUCIE MARKOVÁ^{a,b}, RENÁTA BELKOVÁ^b a ZUZANA CIESAROVÁ^a

^a VÚP Výskumný ústav potravinársky, Priemyslená 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika, ^b Vysoké učení technické, Purkyňova 464, 612 00 Brno, Česká republika
kukurova@vup.sk

Kľúčové slová: akrylamid, cereálne výrobky, GC-MS (NCI), LC/MS/MS

Úvod

Akrylamid vzniká v potravinách v procese Maillardových reakcií dominantne z aminokyseliny asparagínu reakciou s redukujúcimi sacharidmi pri teplotách nad 120 °C. Najvyššie koncentrácie akrylamidu, často krát dosahujúce koncentráciu až niekoľko mg kg⁻¹, boli stanovené v pečených a vyprážených zemiakových výrobkoch (čipsy, hranolky, zemiakové placky a pod.), keďže zemiaky sú bohatým zdrojom aminokyseliny asparagínu, ktorá je hlavným prekurzorom akrylamidu. Výskyt akrylamidu bol zaznamenaný tiež v cereálnych produktoch, dominantne v perníkoch a keksoch s aplikáciou hydrogénuhličitanu amónneho ako kypriacej látky. Nezanedbateľná je aj potravinová expozícia akrylamidom z kávy a kávovín.

Napriek tomu, že doposiaľ nebol jednoznačne preukázaný priamy súvis medzi výskytom rakoviny u ľudí a potravinovou expozíciou akrylamidom, WHO/FAO odporúča všetkým výrobcom potravín zabezpečiť čo najnižší obsah akrylamidu vo svojich produktoch predovšetkým vzhľadom na to, že táto látka je Medzinárodnou agentúrou pre výskum rakoviny (IRAC) klasifikovaná ako potenciálny ľudský karcinogén¹ a taktiež berúc do úvahy výsledky niektorých novších štúdií poukazujúcich na možné priame zdravotné riziko.

Legislatíva SR ani EÚ zatiaľ nestanovila limity pre výskyt akrylamidu v jednotlivých potravinárskych komoditách (okrem pitnej vody s maximálnym prípustným množstvom 1 µg l⁻¹). Otázka analýzy tohto procesného kontaminantu je však neustále aktuálna a venuje sa jej dlhoročná pozornosť zo strany výskumu aj kontrolných orgánov prispievajúcich svojimi výsledkami do európskych databáz.

Na stanovenie akrylamidu je vhodná kvapalinová (LC) a plynová (GC) chromatografia. Bežné detekčné systémy ako ultrafialový detektor (UV, pri 200 nm)

a pulzný ampérometrický detektor (PAD) v spojení LC, alebo plameňovo ionizačný detektor (FID) a detektor elektrónového záchytu (ECD) v spojení s GC nie sú dostatočne selektívne pre stanovenie nízkeho obsahu akrylamidu v potravinách vzhľadom na jeho štruktúrne vlastnosti. Kombinácia informácií získaných z elučných charakteristík a hmotnostných spektier patrí k účinným prostriedkom na identifikáciu tohto procesného kontaminantu aj v zložitej potravinovej matici^{2,3}.

Prítomnosť možných interferencií vo vzorke značne komplikuje jeho stanovenie metódami HPLC-MS ako aj GC-MS (EI). Najvhodnejšou a najviac využívanou technikou pre analýzu akrylamidu je spojenie LC/MS/MS s využitím trojitého kvadrupólu, ktorý umožňuje spoľahlivú identifikáciu akrylamidu v dôsledku sledovania konfirmačných iónov. Obyčajne sa jedná o tranzitné ióny s m/z 72>55, 72>54, 72>44. Cena tejto inštrumentálnej techniky je však aj najvyššia⁴.

Postup analýzy akrylamidu metódou plynovej chromatografie je štandardne založený na derivatizácii akrylamidu na 2,3-dibrómpropiónamid a jeho extrakcii do málo polárneho rozpúšťadla, pričom ako detektor sa používa hmotnostný spektrometer s elektrónovou ionizáciou (EI). Táto metóda je citlivá, avšak derivatizácia vzoriek je časovo náročná. Analýza akrylamidu bez derivatizácie je menej častá⁵.

Experimentálna časť

Vzorky cereálnych výrobkov

V práci boli analyzované vzorky chleba, ktoré boli pripravené z komerčných zmesí od renomovaného slovenského výrobcu (zemiakový, slnečnicový a grahamový chlieb) s použitím domácej pekárnice Moulinex Home Bread Inox (Moulinex, Čína) a vzorky priemyselne vyrábaných lisovaných keksov s prídavkom sušeného ovocia. Jednotlivé druhy keksov (A, B, C) sa odlišovali v receptúre, prípadne v technologickom spracovaní, ktorých cieľom bola eliminácia výslednej koncentrácie akrylamidu.

Všetky cereálne vzorky boli pred extrakciou akrylamidu homogenizované na laboratórnom homogenizátore Grindomix GM 200 (Retsch GmbH, Hann, Nemecko). Vzorky chleba boli okrem toho separované na jednotlivé základné časti – striedku a kôrku (1 mm vrchná vrstva).

Extrakcia akrylamidu

Akrylamid bol zo vzoriek extrahovaný vodou a následne bol preextrahovaný 3-násobnou extrakciou do etylacetátu podľa postupu Ciesarová a kol. (2009)⁶ modifikovaného pre plynovú chromatografiu. Použitý postup extra-

kie bol tiež diskutovaný v príspevku Bednáriková a kol. (2009)⁷. K návažku vzorky (1 g) bol pridaný vnútorný štandard, značený 2,3,3-D₃ akrylamid (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA) zo základného roztoku o koncentrácii 20 mg/100 ml (podľa predpokladaného obsahu akrylamidu a ďalšieho riedenia vzoriek: pre LC-MS bol prídavok D₃ akrylamidu 50 µl z 10krát zriedeného základného roztoku, pre GC-MS 10 µl zo 100 krát zriedeného základného roztoku). K vzorke bolo pridaných 9 ml deionizovanej vody, 0,5 ml Carrezového roztoku I (150 g l⁻¹ K₄[Fe(CN)₆] · 3 H₂O) a 0,5 ml Carrezového roztoku II (300 g l⁻¹ ZnSO₄ · 7 H₂O). Vzorky boli premiešané na vortexe a umiestnené na 5 min do ultrazvuku, následne centrifugované pri rýchlosti 10 000 otáčok/min, teplote – 5 °C počas 10 min. Z vodného extraktu bolo do čistej skúmavky odobratých 5 ml, ku ktorým sa prídalo 5 ml etylacetátu. Skúmavky boli pretrepávané 1 min, po ustálení rovnováhy bola do čistej skúmavky odobratá vrchná etylacetátová vrstva. Extrakcia etylacetátom bola zopakovaná spolu 3krát. Spojené etylacetátové extrakty boli dosucha odparené na rotačnej vákuovej odparke. Pre LC-MS analýzu bol suchý extrakt rozpustený v 1 ml roztoku kyseliny octovej s koncentraciou 0,2 mmol l⁻¹ a pre GC-MS analýzu v 1 ml metanolu. Vzorky boli pripravené pre každé meranie v dvoch paralelkách. Ako štandard bol použitý akrylamid analytickej čistoty (SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Nemecko).

GC-MS (NCI) podmienky stanovenia akrylamidu

Na GC-MS analýzu akrylamidu v cereálnych vzorkách bola aplikovaná metóda bez derivatizácie akrylamidu s využitím negatívnej chemickej ionizácie (NCI) pomocou plynového chromatografu Agilent 7890A s hmotnostným detektorom MSD 5975 Inert (Agilent Technologies, USA) podľa práce Kolek a spol.⁸ za nasledujúcich chromatografických podmienok: nástrek – split/splitless inlet, teplota nástreku 250 °C, objem nástreku 2 µl, pulzný splitless mód, pulzný čas 0,40 min, pulzný tlak nástreku 200 kPa, liner – single tapered; teplotný program 60 °C (1 min), 10 °C min⁻¹, 190 °C (0 min), 50 °C min⁻¹, 240 °C (2 min); kolóna DB-FFAP dĺžka 30 m × vnútorný priemer kolóny 0,25 mm × hrúbka filmu 0,25 µm; nosný plyn hélium, konštantný prietok 1,0 ml min⁻¹. Parametre hmotnostného MSD detektora: Interface 250 °C, iónový zdroj 230 °C, kvadrupól 150 °C; SIM mód, napätie na fotonásobiči 2165 V, dwell time 150 ms, negatívna chemická ionizácia (NCI) s metánom ako reakčným plynom, snímané fragmenty iónov: *m/z* 70,1 pre akrylamid a 73,1 pre D₃ akrylamid.

LC-MS/MS podmienky stanovenia akrylamidu

Na LC-MS analýzu akrylamidu v cereálnych vzorkách bol použitý HPLC systém 1200 série (Agilent Technologies, USA) s Agilent 6410 Triple Quad detektorom vybaveným ESI iónovým zdrojom. Separácia analytu bola vykonaná na kolóne Purospher® STAR RP-8ec (150 mm

× 4,6 mm, 3 µm) použitím izokratickej elúcie mobilnej fázy zlozenej zo 100 ml acetonitrilu a 900 ml vodného roztoku kyseliny perfluorooktánovej (0,05 mmol l⁻¹) s prietokom 0,5 ml min⁻¹ pri laboratórnej teplote miestnosti klimatizovanej na 25 °C. Parametre ESI-MS-MS systému boli založené na tvorbe protonovaných molekulových iónov z akrylamidu a vnútorného štandardu, D₃ akrylamidu, a následnou indukovanou kolíziou boli produkované špecifické fragmenty iónov. Tento typ experimentu sa označuje ako MRM (multiple reaction monitoring – viacnásobné reakčné monitorovanie). Sledované boli prechody: prechod pre akrylamid: 72 → 55 a prechod pre D₃ akrylamid: 75 → 58. Ďalšie parametre použité pre analýzu akrylamidu v ESI+ móde: prietok sušiacieho plynu (N₂) 11 l min⁻¹, teplota splynenia 350 °C, tlak rozprašovania 345 kPa, napätie v kapiláre 2,5 kV, napätie fragmentora 80 V, kolízna energia 5 V, zdržanie (dwell) 50 ms.

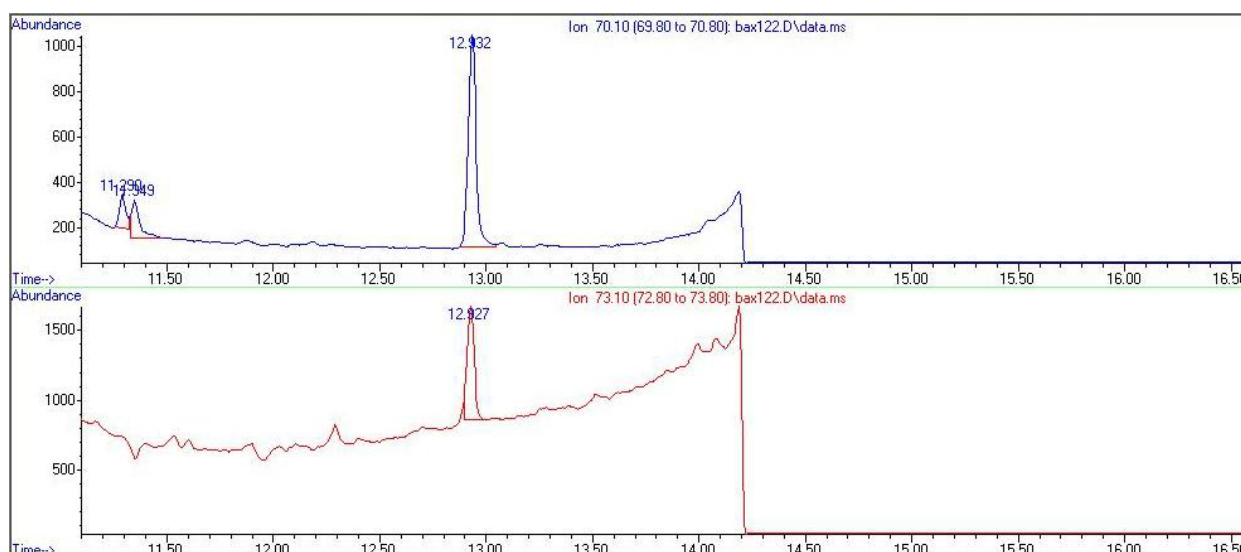
Výsledky a diskusia

Akrylamid je nízkomolekulová hydrofilná zlúčenina, preto je extrakcia vodou optimálna. Rozpustnosť akrylamidu vo vode je 2155 g l⁻¹ (pri 30 °C). V alkoholoch je o čosi nižšia, v metanole 1550 g l⁻¹ a v etanole 860 g l⁻¹. Akrylamid je rozpustný aj v iných polárnych organických rozpúšťadlách, napr. v acetonitrile (396 g l⁻¹), etylacetáte (126 g l⁻¹) alebo acetóne (63 g l⁻¹)¹.

K vzorke bol prídavaný vnútorný štandard, ktorý umožňoval kompenzovať straty analytu počas predúpravy vzorky. Pri návrhu extrakcie akrylamidu z cereálnej potravinovej matrice sa vychádzalo z postupu pre stanovenie LC-MS/MS, čiže jednoduchšej vodnej extrakcie s následnou reextrakciou do etylacetátu, ktorý pomáhal odstraňovať prítomné soli z reálnej matrice, ktoré spôsobovali zhášanie signálu (tzv. „ion-suppression“) v použití iónovom zdroji.

Modifikácia uvedeného postupu prípravy vzorky pre GC-MS analýzu spočívala vo finálnom rozpustení suchého etylacetátového odparku v metanole pred samotným nástrekom. Na základe predchádzajúcich štúdií Koleka a spol.⁸ bola bežne používaná derivatizácia vzoriek, ktorá je všeobecne odporúčaná pre stanovenie akrylamidu GC/MS použitím klasickej elektrónovej ionizácie, úspešne nahradená metódou s využitím negatívnej chemickej ionizácie (NCI). Pre uvedenú metódu je charakteristická vysoká citlivosť pre látky obsahujúce elektronegatívne atómy, pričom ostatné látky pri tomto spôsobe ionizácie signál neposkytujú. Stanovovaný akrylamid sa takto štiepi na *m/z* 70,1, resp. 73,1 pre D₃ akrylamid. Pri tomto spôsobe ionizácie sa interferencia s koelujúcimi látkami nepozorovala (obr. 1). Pri použití techniky SIM bol LOD 5 µg kg⁻¹ a LOQ 10 µg kg⁻¹.

Namerané výsledky využitím LC-MS/MS a GC-MS boli zhodnotené a porovnané pomocou Anova na hladine pravdepodobnosti alfa 0,05. Rozdiely medzi hodnotami akrylamidu stanovenými jednotlivými chromatografickými technikami neboli štatisticky významné.



Obr. 1. Chromatografický záznam analýzy akrylamidu v cereálnych vzorkách metódou GC/MS/NCI

Tabuľka I

Porovnanie stanovenia obsahu akrylamidu v cereálnych vzorkách plynovou a kvapalinovou chromatografiou

	Akrylamid ^{GC} [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Akrylamid ^{LC} [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
Chlieb zemiakový	44±10	54±5
Chlieb zemiakový, striedka	29±1	24±5
Chlieb zemiakový, kôrka	84±7	90±7
Chlieb slnečnicový	19±1	19±2
Chlieb slnečnicový, striedka	17±2	21±11
Chlieb slnečnicový, kôrka	50±6	50±2
Chlieb grahamový	22±11	25±2
Chlieb grahamový striedka	12±5	20±1
Chlieb grahamový kôrka	32±4	28±5
Keksy so sušeným ovocím A	709±25	623±5
Keksy so sušeným ovocím B	1087±32	1059±13
Keksy so sušeným ovocím C	1461±58	1474±2

Záver

Porovnanie výsledkov stanovenia akrylamidu jednotlivými chromatografickými technikami demonštrované v tejto práci je významné z dôvodu zabezpečenia ich možnej suplementácie vzhľadom na aktuálnu potrebu riešenia mnohých projektov zaoberajúcich sa problematikou eliminácie akrylamidu v potravinách a dostupnosti oboch techník na pracovisku VÚP v Bratislave. Na základe nameraných výsledkov obsahu akrylamidu vo vybraných druhoch cereálnych vzoriek v širokej škále obsahu akrylamidu, od nízkych koncentrácií v chlebe blízko LOD = $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ až po takmer $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$ v sladkých keksoch, možno považovať obe chromatografické metódy za porovnateľné a vhodné na stanovenie obsahu tohto procesného kontaminantu v cereálnych výrobkoch.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Centrum excelentnosti pre kontaminujúce látky a mikroorganizmy v potravinách“ na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporovaná tiež Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VMSP-P-0089-09.

LITERATÚRA

1. IRAC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans, 60 (1994).
2. Bermudo E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T.: Anal. Chim. Acta 559, 207 (2006).

3. Lee M.-R., Chang L.-Y., Dou J.: *Anal. Chim. Acta* 582, 19 (2007).
4. Wenzl T., Karasek L., Rosen J., Hellenaes K.E., Crews C., Castle L., Anklam E.: *J. Chromatogr., A* 1132, 211 (2006).
5. Zhang Y., Zhang G., Zhang Y.: *J. Chromatogr., A* 1075, 1 (2005).
6. Ciesarová Z., Kukurová K., Bednáriková A., Morales J.F.: *J. Food Nutr. Res.* 48, 20 (2009).
7. Bednáriková A., Ciesarová Z., Kukurová K.: *4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Prague, Czech Republic, 4-6 November 2009*, Book of Abstracts, p. 427.
8. Kolek E., Šimko P., Šimon P., Jorik V., Šimúth T.: *J. Food Nutr. Res.* 47, 200 (2008).

Abstrakt

Akrylamid je známy procesný kontaminant vznikajúci v širokom sortimente potravinárskych výrobkov počas ich tepelného spracovania. Cereálne výrobky napriek typicky nižšiemu obsahu akrylamidu podľa najnovších štúdií prispievajú významne k celkovej potravinovej expozícii akrylamidom. V centre pozornosti sú najmä základné potraviny ako je chlieb, ale aj bežne konzumované sladké výrobky ako sú keksy.

Prezentovaná práca demonštruje vhodnosť použitia oboch chromatografických techník, kvapalinovej ako aj plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou, na analýzu akrylamidu v rôznych druhoch cereálnych výrobkov. Vo vzorkách keksov bol stanovený obsah akrylamidu od $623 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $1474 \mu\text{g kg}^{-1}$. Akrylamid sa v analyzovaných vzorkách chleba vyskytoval dominantne v kôrke v koncentrácii od $28 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $90 \mu\text{g kg}^{-1}$.

LAKTOSA A JEJÍ ZMĚNY BĚHEM FERMENTACE SYROVÁTKY A MLÉKA TERMOFILNÍMI BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

VERONIKA LEGAROVÁ, LENKA KOUŘIMSKÁ a JANA HÁJKOVÁ

*Katedra kvality zemědělských produktů, ČZU, Kamýcká 129, 165 20 Praha 6 - Suchbátka, Česká republika
legarova@af.czu.cz, kourimska@af.czu.cz,
haj.jana@centrum.cz*

Klíčová slova: laktosa, laktosová intolerance, fermentace, termofilní bakteriální kultury

Úvod

Sladká syrovátka je vedlejším produktem při výrobě sýrů. Je důležitým zdrojem laktosy, vápníku, mléčných proteinů a rozpustných vitaminů, které způsobují, že tento produkt může být zahrnut mezi funkční potraviny a zdroj plnohodnotných živin¹. Laktosa se vyskytuje výhradně v mléce savců a je hlavní složkou syrovátky. Má největší podíl na sušině syrovátky, neboť tvoří 70 až 80 % z celkové sušiny².

Laktosa existuje ve dvou izomerních formách, α -laktosa a β -laktosa². Oba izomery se liší prostorovým uspořádáním hydroxylových skupin na C atomu v glukosové molekule a tím také v rozpustnosti, tvaru krystalů, bodu tání a fyziologických účincích. β -Laktosa je hygroskopická a je tedy příčinou hygroskopičnosti sušené syrovátky³.

Laktosa patří do skupiny oligosacharidů; má sladkou chuť, ale její sladivost je oproti sacharose výrazně nižší (asi 40 % sladivosti). Její konzumace vede ke zvýšení hladiny glukosy v krvi; na rozdíl od sacharosy má ale menší kariogenní (kazotvorné) a laxativní (projímavé) účinky⁴. Laktosa je disacharid skládající se ze dvou molekul monosacharidů galaktosy a glukosy. K její syntéze dochází pouze v mléčné žláze⁵ a na monosacharidové jednotky je hydrolyzována v tenkém střevě pomocí enzymu laktasy^{6,7}.

Pokud se sníží nebo zcela vymizí produkce tohoto enzymu v kartáčovém lemu tenkého střeva, dochází k deficienci laktasy neboli laktosové intoleranci⁸.

Laktosová intolerance není na rozdíl od alergie způsobena reakcí imunitního systému, ale je poruchou metabolickou. Při nedostatku nebo úplné absenci laktasy zůstává mléčný cukr v tenkém střevě částečně nebo zcela nerozštěpen. Osmotickým efektem na sebe pak váže velké množství vody z krevní plazmy, obsah střeva se tím výrazně zvýší. V tlustém střevě pak rozkládají laktosu v trávenině střevní bakterie, za vzniku velkého množství fermentovaných plynů⁸. Typickými příznaky laktosové

intolerance jsou bolesti břicha, nadýmání, plynatost, křeče, průjem a zvracení^{9,10}. Symptomy se objevují zpravidla půl hodiny po konzumaci laktosy a mohou trvat až tři dny. Doba trvání a intenzita příznaků závisí na množství požitých laktosy a na míře deficitu enzymu laktasy. Laktosová intolerance může v jistých případech způsobovat zažívací obtíže. V ojedinělých případech, se mohou rodit děti bez schopnosti produkovat laktasu. U většiny lidí se snižuje schopnost tvorby laktasy postupem času. Okolo dvou let věku začíná tělo snižovat tvorbu laktasy, ačkoli mnoho lidí nevykazuje symptomy laktosové intolerance i ve vyšším věku. U více než 75 % dospělých lidí se vyskytuje laktosová intolerance, zejména u afroameričanů a indiánů a nesnášenlivostí laktosy trpí až 90 % asiátů¹¹. Jelikož je rychlost průchodu tráveniny střevy značně zvýšená, může sekundárně docházet i k snížené digesti a resorpci některých dalších živin¹². Byl také zjištěn vliv mezi alkoholem a laktosou. Po přeměně laktosy na glukosu a galaktosu, je galaktosa přeměněna na glukosu v játrech pomocí epimerasy. Právě tento enzym je však inhibován etanolem¹³.

Fermentace laktosy

Mnoho organismů vyskytujících se v mléce využívá mléčný cukr laktosu jako hlavní zdroj uhlíku a jako zdroj energie pro svůj růst. Z biotechnologického hlediska jsou nejdůležitějšími bakterie mléčného kvašení¹⁴. Fermentací mléka bakteriemi mléčného kvašení dochází ke zvýšení trvanlivosti výrobků, ke změně „flavouru“ a konzistence. Nejběžnějšími výrobky získanými fermentací mléka jsou jogurty a kefíry. Jogurty jsou vyráběny symbiotickým účinkem dvou typů bakterií mléčného kvašení a to: *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*¹⁵. Bakterie mléčného kvašení přeměňují laktosu na kyselinu mléčnou a tím získává jogurt typické jogurtové aroma a nakyslou chuť. Charakteristická krémová konzistence jogurtů je také dána vznikající kyselinou mléčnou, protože kasein, hlavní mléčná bílkovina, je nerozpustná v hodnotách pH kolem izoelektrického bodu (IEB)¹⁶.

Termofilní bakteriální kultury

Bakterie mléčného kvašení fermentují laktosu dvěma metabolickými cestami. Při první z nich, uplatňující se především u rodu *Lactococcus*, je laktosa transportována do buněk fosfoenolpyruvát dependentním fosfotransferasovým systémem a hromaděna zde jako laktosa-6-fosfát, který je hydrolyzován 6-fosfo- β -D-galaktosidasou za vzniku glukosy a galaktosa-6-fosfátu. Tyto jsou následně metabolizovány na kyselinu mléčnou. Při druhé cestě, uplatňující se především u rodu *Lactobacillus*, je laktosa akumulována specifickou permeasou a pak intracelulárně hydrolyzována β -galaktosidasou na glukosu a galaktosu. Glukosa

je metabolizovaná na kyselinu mléčnou, zatímco galaktosa je uvolňována do média¹⁷.

Mezi termofilní bakterie mléčného kvašení patří rody *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Rod *Lactobacillus* je anaerobní či fakultativně anaerobní, energii získává kvasnými pochody. Charakteristickým znakem je homofermentativní nebo heterofermentativní rozklad glukosy za vzniku kyseliny mléčné. Laktobacily vyžadují ke svému růstu různé růstové faktory (aminokyseliny, peptidy, minerální látky, vitamíny, sacharidy, mastné kyseliny, deriváty nukleových kyselin).

Rod *Streptococcus* je značně rozsáhlý. Zástupci tohoto rodu jsou fakultativně anaerobní, pro růst vyžaduje prostředí s aminokyselinami a sacharidy, které jsou homofermentativně zkvašovány na L(+) kyselinu mléčnou. Rod obsahuje i druhy patogenní pro člověka i druhy tvořící kulturní mikrobiotu využívanou v mlékárenském průmyslu¹⁷.

Syrovátka

Syrovátka je vedlejší produkt, který vzniká při výrobě sýrů. Na každý kilogram vyrobeného sýra připadá bezmála 10 litrů syrovátky. Díky velkému objemu vyrobené syrovátky je laktosa v ní obsažená využívána po celém světě. Laktosa je hlavní složkou, v koncentraci cca 5 %. Většinou je laktosa získávána ze syrovátky sušením, ale tento proces sušení je ekonomicky náročný z důvodu spotřeby velkého množství energie. Laktosa obsažená v syrovátkových koncentrátech je používána zejména v pekařství, mlékařství a při výrobě cukrářských výrobků a v neposlední řadě při výrobě kojenecké výživy. Většinou se do těchto výrobků přidává laktasa, aby došlo k hydrolyze disacharidu laktosy, čímž se předejde problémům způsobenými častým výskytem laktosové intolerance. Alternativní využití laktosy spočívá v její přeměně na biomasu, etanol nebo další fermentované produkty¹⁸.

Řešením pro osoby s laktosovou intolerancí může být konzumace fermentovaných mléčných výrobků obsahujících živé bakterie mléčného kvašení. Fermentované mléčné výrobky mají také snížený obsah laktosy, čímž se stávají i při nesnášenlivosti laktosy lépe stravitelnými¹⁹.

Experimentální část

Podstatou práce bylo sledování změn obsahu laktosy v syrovátce a ve vzorcích kravského mléka během fermentace termofilními mlékařskými kulturami.

Hlavní surovinou byla při přípravě fermentované syrovátky sušená syrovátka Lactosérum z Jihlavské mlékárny Moravia Lacto a. s, která byla rozmíchána v teplé pitné vodě, a to vždy 10 g syrovátky ve 100 ml teplé pitné vody. U všech vzorků syrovátky následovala pasterace při teplotě 78 °C po dobu 30 sekund.

Pro přípravu vzorků fermentovaného mléka byly odebrány individuální reprezentativní vzorky mléka mléčného plemene skotu Holštýn z demonstrační stáje ČZU. Ihned po odběru bylo mléko filtrováno přes mléčný filtr

a chlazené co nejrychleji na teplotu 6 °C. Z promíchaného mléka byl oddělen reprezentativní vzorek (1,4 litru), který byl přelit do nerezové sterilní nádoby. Před rozbořením byly vzorky mléka pasterizovány vysokou pasterací (na teplotu 85 °C po dobu 5 sekund), poté bylo mléko zchlazeno na teplotu kultivace. Mléko bylo důkladně promícháno a byl oddělen první vzorek označený jako 0 (mléko bez kultury), další vzorky byly zaočkovány kulturou a vloženy do termostatu na potřebnou teplotu. Vzorek označený jako 0+ je vzorek zaočkovaný kulturou a ihned odebraný k laboratornímu hodnocení, další vzorky byly odebírány v různých časových intervalech dle kultury. Označení vzorků bylo shodné i v případě vzorků syrovátky.

Na základě konzultací s odborníky z Výzkumného ústavu mlékárenského (VÚM) byla doporučena sušená směsná jogurtová kultura, která je tvořena kmeny: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Vzorky samotné syrovátky a mléka byly za aseptických podmínek očkované touto termofilní kulturou (1% zákys) a kultivovány při 43 °C po dobu 4 hodin. Doba kultivace je výrobcem (VÚM) doporučena u těchto typů jogurtové kultury 3,5 až 4,5 hodiny.

V experimentu byly v přesných hodinových intervalech během fermentace odebírány vzorky syrovátky a mléka a byly sledovány změny obsahu laktosy pomocí kapalinové chromatografie (HPLC chromatograf Varian). Na analýzu byla použita analytická kolona AminexR HPX-87H, 300 × 7,8 mm, mobilní fáze 0,005M H₂SO₄, průtok 0,6 ml/min, teplota kolony 65 °C, detekce refraktometrická a teplota detektoru 35 °C.

Pomocí HPLC byly analyzovány při podmínkách metody filtráty, získané zfiltrováním roztoku připraveného z 10 g mléka naváženého s přesností na 0,0002 g do odměrné baňky smíchaného s částí destilované vody (cca 30 ml), poté byly do roztoku přidány 3 ml roztoku ferrokyanidu draselného (CAREZ II) a po promíchání 3 ml síranu zinečnatého (CAREZ I), po dalším promíchání se odměrná baňka doplnila do 100 ml destilovanou vodou. Po 5 minutách byl roztok připraven k filtraci, kdy první podíl filtrátu byly odděleny a vylity. Vzorky roztoků monohydrátu laktosy o definované koncentraci (2, 3, 4, 5, 6 %) pro kalibrační křivku byly připraveny stejným způsobem jako reálné vzorky.

Na základě získaných výsledků bylo diskutováno případné doporučení takovýchto fermentovaných syrovátkových nápojů pro osoby trpící laktosovou intolerancí.

Výsledky a diskuse

Po přidání jogurtové kultury do vzorků mléka byl zaznamenán lehký nárůst koncentrace laktosy, zejména po přidání inokula. Toto mírné zvýšení obsahu může být vysvětleno dávkou inokula – tekutého zákysu. Ovšem již během první hodiny fermentace můžeme sledovat nepatrný pokles obsahu laktosy. Během třetí a čtvrté hodiny fermentace je pokles obsahu laktosy daleko výraznější. Na konci fermentačního cyklu je patrné snížení obsahu lakto-

Tabulka I

Změny obsahu laktosy během fermentace mléka jogurtovou kulturou (% hm)

Doba fermentace [h]	I. měření [% hm.]	II. měření [% hm.]	III. měření [% hm.]	Průměr [% hm.]	SD [% hm.]
0	4,86	5,10	5,07	5,01	0,11
0+	5,09	5,23	5,38	5,23	0,12
1	5,03	5,06	5,21	5,10	0,08
2	4,86	4,91	5,13	4,97	0,11
3	4,19	4,51	4,31	4,34	0,13
4	3,87	4,08	4,08	4,01	0,10

Tabulka II

Změny obsahu laktosy během fermentace mléka jogurtovou kulturou (% relativní)

Doba fermentace [h]	I. měření [%]	II. měření [%]	III. měření [%]	Průměr [%]
0	100	100	100	100
0+	105	102	106	105
1	104	99	103	102
2	100	96	101	99
3	86	88	85	87
4	80	80	81	80

sy ve vzorcích mléka o 1 % (tabulka I). Nejnižší dosažená hodnota byla stanovena během prvního měření, kdy koncentrace laktosy byla po čtyřech hodinách fermentace 3,87 % se směrodatnou odchylkou (SD) 0,10 (tabulka I). V tabulce II je úbytek laktosy vyjádřen procentuálně, kde 100 % je vzorek mléka nebo syrovátky označen „0“ – bez fermentace, tedy bez dávky jogurtového zákysu. Po čtyřech hodinách fermentace byl tedy úbytek laktosy v průměru 20 % relativních (tabulka II).

U vzorků syrovátky byla koncentrace laktosy na začátku procesu fermentace v průměru 5,87 %, opět došlo k mírnému zvýšení koncentrace laktosy po přidání jogurtové kultury a během následujících čtyř hodin inkubace došlo k poklesu koncentrace laktosy. Ovšem ve vzorcích syrovátky došlo během fermentace k poklesu obsahu lak-

tosy „pouze“ o 0,72 % (tabulka III), tedy k nižšímu úbytku laktosy než tomu bylo u vzorků mléka. Nejnižší hodnota po 4 hodinách fermentace byla zjištěna během třetího měření, a to 5,14 % se směrodatnou odchylkou (SD) 0,01.

V tabulce IV jsou opět uvedeny hodnoty úbytku laktosy v relativních procentech, kde 100 % jsou opět vzorky syrovátky označeny „0“ tedy bez fermentace. Z hodnot vyplývá, že po čtyřech hodinách fermentace došlo k úbytku laktosy v průměru pouze o 12 %, což je o 8 % méně než u mléka. Tento rozdíl v prokysávání může být způsoben rozdílným složením a kyselostí použitého média (mléko, syrovátka).

Úbytek laktosy jak ve vzorcích syrovátky, tak ve vzorcích mléka nesplňuje limit dle Vyhlášky 54/2004 Sb., která stanovuje limit laktosy v potravinách s nízkým obsa-

Tabulka III

Změny obsahu laktosy během fermentace syrovátky jogurtovou kulturou (% hm)

Doba fermentace [h]	I. měření [% hm.]	II. měření [% hm.]	III. měření [% hm.]	Průměr [% hm.]	SD [% hm.]
0	5,98	5,81	5,82	5,87	0,08
0+	6,08	6,08	6,06	6,07	0,01
1	5,65	5,65	5,75	5,68	0,05
2	5,49	5,53	5,55	5,52	0,02
3	5,37	5,39	4,42	5,06	0,45
4	5,15	5,16	5,14	5,15	0,01

Tabulka IV

Změny obsahu laktosy během fermentace syrovátky jogurtovou kulturou (% relativní)

Doba fermentace [h]	I. měření [%]	II. měření [%]	III. měření [%]	Průměr [%]
0	100	100	100	100
0+	102	105	104	104
1	94	97	99	97
2	92	95	95	94
3	90	93	76	86
4	86	89	88	88

hem laktosy na 10 g kg⁻¹ a bezlaktosové potraviny mohou obsahovat pouze 100 mg kg⁻¹.

Závěr

Cílem práce bylo sledování změn obsahu laktosy během fermentace ve vzorcích kravského mléka a obnovené syrovátky, kdy pro fermentaci obou typů vzorků byla použita termofilní jogurtová kultura. V těchto vzorcích byly sledovány změny sacharidů během fermentace pomocí kapalinové chromatografie. Ze zjištěných výsledků lze konstatovat, že k výraznějším změnám došlo u vzorků mléka, kdy obsah laktosy klesl o 20 % relativních. Fermentace ve vzorcích syrovátky probíhala pomaleji a obsah laktosy klesl o 12 %, v obou případech však nelze z hlediska obsahu laktosy hovořit o vhodnosti takovýchto nápojů pro osoby trpící laktosovou intolerancí, protože i po 4 hodinové fermentaci zůstává většina laktosy v nápoji nerozštěpena. Nesporným přínosem je ale konzumace kultur, které obsahují enzym laktasu a štěpení laktosy v lidském trávicím traktu napomáhají.

Výzkum byl podpořen záměrem MŠMT č. MSM 6046070901.

LITERATURA

- González-Martínez C., Becerra M., Cháfer M., Albors A., Carot J. M., Chiralt A.: *Trends Food Sci. Tech.* 13, 334 (2002).
- Bylund G.: *Dairy Processing Handbook*. TetraPak, Lund 1995.
- Forman L. a kol.: *Mlékárenská technologie II*. VŠCHT, Praha 1996.
- Davídek J., Janiček G., Pokorný J.: *Chemie potravin*. SNTL/ALFA, Praha 1983.
- Klee W. A., Klee C. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 833 (1970).
- Naim H. Y.: *Histol Histopathol.* 16, 553 (2001).
- Klouďa P.: *Základy biochemie*. Pavel Klouďa, Ostrava 2000.
- Kolektiv autorů. *Lékařská chemie a biochemie*. Avicentrum, Praha 1990.
- <http://www.potravinova-alergie.info/clanek/intolerance-laktoza-nesnasenlivost.php>, staženo 28.

- ledna 2010.
- Stephens A. M., Haddad A. C., Phillips S. J.: *Gastroenter.* 85, 589 (1983).
- Flatz G.: *Adv. Hum. Genet.* 16, 1 (1987).
- Hamilton E., Whitney E.: *Nutrition, Concepts and Controversies*. West publishing company, Minnesota 1979.
- Kern F. Jr., Heller M.: *Gastroenter.* 54, 1250 (1968).
- Gupta R. S.: *Crit. Rev. Microbiol.* 26, 111 (2000).
- Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova T., Frengova G., Spasov Z.: *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1 (2002).
- Adam A. C., Rubio-Teixeira M., Polaina J.: *Lactose: Food Sci. Nutr.* 44, 553 (2004).
- Bohačenko I., Pinkrová J., Peroutková J., Pechačová M.: *Chem. Listy* 101, 911 (2007).
- Sreekrishna K., Dickson R. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7909 (1985).
- <http://www.foodreactions.org/intolerance/lactose/treatments.html>, staženo 8. února 2010.

V. Legarová, L. Kouřimská, and J. Hájková (Department of Quality of Agricultural Products, Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences in Prague, Praha, Czech Republic): Lactose and its Changes During the Fermentation of Whey and Milk by Thermophilic Starter Cultures

Bacteria cultures, known as starters, are used in the manufacture of cultured milk products. They are added to the product and allowed to grow there under controlled conditions. In this study the cow milk and cheese whey samples were fermented by thermophilic bacteria starter cultures at 43 °C to monitor lactose changes during the fermentation. The obtained data were evaluated and the suitability of cultures for fermented milks and fermented whey drinks preparation with regard to content of lactose was discussed. There was the increase of lactose in milk samples by 20 % and in whey samples by 12 % comparing to the samples without fermentation, where the lactose content was taken as 100 %. Because of the high level of residual lactose in the analysed fermented samples, they cannot be conclusively recommended for lactose-intolerant people.

POROVNANIE RÔZNYCH TECHNÍK SKENOVANIA FLUORESCENČNÝCH SPEKTIER V ANALÝZE VÍNNYCH DESTILÁTOV

PAVEL MÁJEK, JANA SÁDECKÁ*
a **LUBOMÍR PÍŠ**

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

V analýze alkoholických nápojov sa pozoruje plynulý nárast využitia infračervenej a Ramanovej spektrometrie, avšak výskumu v oblasti využitia fluorescenčnej a UV/Vis absorpčnej spektrometrie sa venuje menšia pozornosť. Výhodou fluorescenčnej spektrometrie (FS) je vyššia selektivita v porovnaní s inými spektrometrickými metódami a vysoká citlivosť pre širokú paletu analytov. Aj keď tieto charakteristiky zaraďujú FS medzi perspektívne techniky v analýze nápojov, klasická FS založená na meraní len jedného excitačného a emisného spektra často neumožňuje analýzu mnohozložkových zmesí. V takýchto prípadoch možno zlepšiť analytické charakteristiky metódy namerním celkových luminiscenčných alebo celkových synchronných fluorescenčných spektier. Celkové luminiscenčné spektrá sa získajú postupným meraním excitačných a emisných spektier pri rôznych emisných a excitačných

vlnových dĺžkach. Výsledná emisno-excitačná dátová matica poskytuje celkový profil intenzít meranej vzorky v rozsahu skenovaných vlnových dĺžok, a tým aj vyššiu selektivitu. Ak sa použije vhodná hodnota rozdielu emisnej a excitačnej vlnovej dĺžky, synchronná FS znižuje nebezpečenstvo prekryvania fluorescenčných pásov. Celkové synchronne fluorescenčné spektrá sa získajú znázornením intenzity fluorescencie ako kombinovanej funkcie vlnovej dĺžky a hodnoty rozdielu emisnej a excitačnej vlnovej dĺžky a spájajú tak výhody celkových luminiscenčných a synchronných fluorescenčných spektier. Všetky vyššie uvedené techniky skenovania spektier možno zrealizovať buď v pravouhlej geometrii, alebo meraním fluorescencie z povrchu. Druhý spôsob skenovania je veľmi výhodný vtedy, ak analyzované vzorky vykazujú veľké hodnoty absorpcie žiarenia v UV a Vis oblasti spektra, napr. vínne destiláty.

Cieľom tejto práce bolo porovnanie vyššie uvedených techník skenovania fluorescenčných spektier v analýze vínnych destilátov.

Práca vznikla vďaka finančnej podpore EHP finančného mechanizmu SAV-EHP-2008-02-05.

ENANTIOMERIC PURITY CONTROL OF ANTIHISTAMINES IN PHARMACEUTICALS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH CYCLODEXTRIN PSEUDOSTATIONARY PHASES

KATARÍNA MARÁKOVÁ, PETER MIKUŠ, IGOR NEMEC, IVA VALÁŠKOVÁ, and EMIL HAVRÁNEK

*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovak Republic
mikus@fpharm.uniba.sk*

The present work illustrates potentialities of a modular hydrodynamically closed capillary electrophoretic (CE) separation system in a single and double column arrangement for the enantiomeric purity testing of drugs in pharmaceuticals.

In the first case, an anionic cyclodextrin (CD) mediated single column CE separation technique coupled with an on-capillary absorbance ultraviolet (UV) detector was used for the enantioseparation of zwitterionic drug, cetirizine (CET). The optimal separation conditions were based on a mediate pH (~5.2) of buffer (migration velocity of CET molecule was near to zero) and a highly substituted CD derivative, sulfated- β -CD (S- β -CD), serving as an analyte carrier in anionic regime of the separation with suppressed electroosmotic flow. In this way, a baseline enantioseparation, reasonable separation efficiency and short analysis time could be easily achieved. In comparison, similar performance parameters could not be obtained by (i) neutral CDs (native CDs, hydroxypropyl- β -CD) or (ii) charged CD (carboxyethyl- β -CD, CE- β -CD) used in counter-current separation regime.

A column-coupling arrangement of CE was used for the enantioseparation of cationic drug, brompheniramine (BP). Given by a high sample load capacity (30 μ l sample injection volume) and a preconcentration of the BP enanti-

omers in the isotachophoretic (ITP) stage, ng ml⁻¹ concentration limits of detection (LOD) were easily achieved. For the separation of the BP enantiomers, the CE- β -CD was appropriate chiral selector providing complete enantioresolution in the capillary zone electrophoresis (CZE) stage.

The general advantages of the proposed CE methods are their simplicity, and selectivity. Among the benefits of the ITP-CZE method we can count also the low LODs obtainable, enhanced sample loadability, and minimized external sample pretreatment useful for a trace determination. On the other hand, the CE modified by the moving chiral pseudostationary phase can spread the application potential of CE towards neutral analytes. The optimized methods provided favorable performance parameters including separation efficiency, sensitivity, linearity, precision, accuracy/recovery and robustness.

The (S- β -CD)-CZE-UV method was applied for a highly reliable enantioselective determination of the neutral drug's impurity (dextrocetirizine, DCET) besides its major active compound (levocetirizine, LCET) in pharmaceuticals (commercial tablets). The ITP-(CE- β -CD)-CZE-UV method enabled to determine enantiomeric impurity, levobrompheniramine (LBP), in the samples containing a 10³ excess of dexbrompheniramine (DBP), and it was applied for the pharmaceutical tablets with DBP as the active substance. The obtained results clearly indicate potential of the proposed methods for a routine use in highly effective and reliable control of enantiomeric purity of pharmaceuticals.

This work was supported by grant from the Slovak Grant Agency for Science under the project VEGA No. 1/0003/08 and grant from Comenius University No. UK/120/2009.

VSTUP ^{65}Zn a ^{137}Cs CEZ POVRCH LISTOV A ICH DISTRIBNÚCIA V PLETIVÁCH CIEVNATÝCH RASTLÍN

**JANA MAREŠOVÁ, MIROSLAV
HORNÍK, MARTIN PIPÍŠKA
a JOZEF AUGUSTÍN**

*Katedra biotechnológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika
jana.maresova@ucm.sk*

Pri používaní foliárnych prípravkov v poľnohospodárstve, alebo pri styku vegetácie s roztokmi a aerosólmi nachádzajúcimi sa v kontaminovanom prostredí dochádza ku vstupu látok z roztokov do pletív cievnatých rastlín povrchom listov. V takýchto prípadoch musí látka vstupujúca do rastlinných pletív prekonať sériu difúzných bariér listových štruktúr. Najmä v prípade kationov kovov a metaloidov ide o rýchlosti vstupu, ktoré sú o niekoľko poradiakov nižšie ako rýchlosti vstupu kationov kovov z pôdneho roztoku cez koreňový systém a ich koncentrácie v pletivách sa pohybujú v oblasti nanogramov látky na jednotku listovej plochy, alebo hmotnosti rastlinných pletív.

Cieľom tejto práce bolo získanie kvantitatívnych údajov o príjme zinku a cézia povrchom listov cievnatých rastlín.

Ako modelové rastliny boli použité hydroponie tabaku viržinského (*Nicotiana tabacum* L.) a chmeľu obyčajného (*Humulus lupulus* L.) rastúce v Hoaglandovom živnom médiu. Listy boli ponorené do roztokov ZnCl_2 alebo CsCl značených rádionuklidmi $^{65}\text{ZnCl}_2$ (0,8767 MBq/g) a $^{137}\text{CsCl}$ (5,406 MBq/g). Pre rádiometrické stanovenie cézia a zinku v roztokoch a jednotlivých častiach rastlín bol použitý scintilačný detektor Gamaspektrometer 54BP54/2-X a 76BP76/3 so studňovým kryštálom NaI(Tl) firmy Scionix, Holandsko. K výpočtu aktivity sa použil vyhodnocovací softvér Scintivision 32, firmy Ortec, USA. Doba merania 600 s umožňovala získať dáta s relatívnou chybou merania < 2 %. Distribúcia ^{65}Zn a ^{137}Cs v listoch, koreňoch a stonkách bola stanovená dvomi metódami: 1. Autorádiografiou na RTG filmoch (HR-GB 100 NIF, FUJIFILM, JP) s expozičným časom do 40 dní pri 20 °C. Po vyvolaní boli autorádiogramy (18 × 24 cm) z čiernobielej škály prevedené do gradientu farebnej škály použitím grafického programu Adobe Photoshop CS2, Adobe

(USA), skenovaním rádioaktivity s využitím skenovacieho prístroja Typhoon 9210 (Amersham Biosciences) s expozičným časom do 30 dní a počítačovým spracovaním dát. Pre modelovanie koncentrácie iónových foriem zinku v závislosti na pH prostredia sa použil výpočtový program Visual MINTEQ (verzia 2.53).

Zistili sme, že cézium je prijímaný povrchom listov ponorených do roztokov CsCl a je transportované do iných rastlinných pletív nad i pod akceptorovým listom. Výsledky sú v súhlase s poznatkami o vysokých rýchlostiach difúzie kationov alkalických kovov cez umelé a biologické membrány a o dostupnosti transportných dráh draslíka a sodíka v pletivách cievnatých rastlín aj pre cézium. Zinok sa viazal z roztokov ZnCl_2 povrchom listov študovaných rastlín s vyššou účinnosťou ako cézium, avšak na rozdiel od cézia zostával imobilizovaný v kontaktnej časti listu a v krátkodobých experimentoch nebol transportovaný ani do susediacej neponorenej časti listu, ani do iných rastlinných orgánov.

V práci diskutujeme o možných spôsoboch väzby uplatňujúcich sa pri interakcii Zn^{2+} iónov s bunkovými štruktúrami

a komponentami listových pletív. Na základe vysokých hodnôt tabelovaných konštánt stability $\log K$ komplexov zinku usudzujeme, že aminokyseliny, karboxylové kyseliny a fosfáty nachádzajúce sa ako intermediáty vo floémovej šťave v koncentráciách $\leq 10^4 \mu\text{mol l}^{-1}$, spolu s funkčnými skupinami bunkových štruktúr a bielkovín, i alkalické pH floémovej šťavy, vedúce ku vzniku viacerých iónových a neiónových foriem zinku, sa budú podieľať na znižovaní podielu zinku v pletivách v biologicky dostupnej Zn^{2+} forme.

Získané výsledky poukazujú na obmedzenú účinnosť využitia zinku z foliárnych hnojív a na riziká získavania falošne vysokých hodnôt príjmu kovov rastlinami z postrekov na listový povrch v dôsledku unikania postrekových prípravkov do pôdy a vstup kovov cez koreňový systém, ktorý je z hľadiska transportu kovov omnoho účinnejší.

Ďakujeme Ing. Zdene Sulovej, CSc., Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, za umožnenie experimentov skenovania rádioaktivity na prístroji Typhoon 9210.

DISTRIBUCE AKRYLAMIDU V JEDNOTLIVÝCH ČÁSTECH CHLEBA

LUCIE MARKOVÁ^{a,b}, KRISTÍNA KUKUROVÁ^a, ZUZANA CIESAROVÁ^a, ALENA BEDNÁRIKOVÁ^a, PETER ŠIMKO^a, TOMÁŠ BEHAN^c a JÁN KRAVEC^c

^a VÚP Výzkumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika, ^b Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika, ^c Mäspomix, s.r.o., T.G.Masaryka 8, 960 01 Zvolen, Slovenská republika
ciesarova@vup.sk

Klíčová slova: akrylamid, chléb, GC/MS

Úvod

Během pečení chleba dochází k celé řadě fyzikálních a chemických změn, které se v konečném důsledku projeví na vzhledu, textury, barvy, vůně, chuti a dalších vlastností důležitých pro přijetí chleba spotřebitelem. K tvorbě charakteristického zbarvení a vůně chleba dochází Maillardovými reakcemi. Tyto reakce jsou ovlivněny celou řadou faktorů a podmínek během pečení, např. recepturou, teplotou, vlhkostí atd. Během Maillardových reakcí dochází také ke vzniku toxických látek, jako je akrylamid^{1,2}.

Akrylamid je toxická látka řazená mezi potencionální lidské karcinogeny³. Studie ukazují souvislost mezi stoupajícím příjmem akrylamidu z potravin se zvyšujícím se rizikem rakoviny endometria a vaječníků a také spojitost s rakovinou ledvinových buněk^{4,5}. Akrylamidu vzniká zejména v potravinách bohatých na redukující sacharidy a asparagin při teplotách nad 120 °C (cit.^{6,7}). Široký rozsah obsahu akrylamidu je pozorován nejen v různých potravinových kategoriích, ale i v různých značkách potravin ze stejné kategorie⁸.

V současné době je popsána celá řada možných způsobů pro snížení obsahu akrylamidu v tepelně opracovaných výrobcích. U chleba jsou diskutovány především změny teploty, času nebo vlhkosti, případně kombinace těchto parametrů, které by vedly ke snížení obsahu akrylamidu^{9–12}. Další možností snižování obsahu akrylamidu v chlebu je rozsáhlejší fermentace pomocí kvasinek¹³.

Cílem této studie je porovnání obsahu akrylamidu v různých typech chlebů připravených ze směsí určených pro přípravu chleba v domácí pekárně. Dále byl porovnáván obsah akrylamidu v jednotlivých částech těchto chlebů. Nakonec byly porovnávány chleby připravené v domácí pekárně nebo sázením do pece.

Materiál a metodika

Příprava vzorků chleba

Pro přípravu chleba byli společností Mäspomix vyvinuty tři různé druhy směsí určené pro přípravu chleba v domácí pekárně s možností přípravy i v plynové nebo elektrické troubě. Složení jednotlivých směsí je uvedeno v tabulce I. Chleby byly připravovány ze směsí po přidání vody v domácí pekárně Moulinex home bread inox (Moulinex, Čína) při nastavení programu č. 2, hmotnosti 750 g a stupni vypečení 3. Při přípravě chleba v troubě byla použita laboratorní pec (Memmert, Schwabach, Německo), přičemž kroky hnětení a kynutí chleba byly provedeny v domácí pekárně a následně bylo těsto vytvarováno do bochánku a vloženo do laboratorní pece. Podmínky pečení byly nastaveny následovně: pečení ve vyhřáté peci 15 min při 200 °C a poté snížit na 190 °C při celkovém čase vypečení okolo 50 min podle požadovaného stupně vypečení.

Chleby se nechali po upečení 1,5 hodiny chladnout a následně byl u nich stanovován měrný objem, vlhkost a obsah akrylamidu pomocí GC/MS. Stanovení měrného objemu a stanovení vlhkosti bylo provedeno v souladu s normou ČSN 56 0116. Chléb byl po stanovení měrného objemu rozkrojen na 4 stejné čtvrtiny tak, aby byl zachován poměr střídky a kůrky vzhledem k celému chlebu. Obsah akrylamidu byl stanovován v celkovém chlebu, ve střídce a v kůrce. Kůrka o tloušťce 2–3 mm byla okrájena pomocí skalpelu. Poté byla střídka a vzorky celého chleba rozkrájeny na kousky a společně se vzorky kůrky sušeny přes noc v laboratorní peci při teplotě 45 °C, což umožnilo jejich rozemletí a zhomogenizování pomocí grindomixu GM 200 (Retsch GmbH, Hann, Německo) pro následné stanovení obsahu akrylamidu a vlhkosti.

Chléb byl v domácí pekárně připravován v nádobě, která mu dodala konečný tvar v podobě kvádrů. Během pečení se tedy boční a spodní strany chleba této nádoby dotýkaly. Z těchto důvodů byla kůrka chleba rozdělena na kůrku horní, boční, spodní a celkovou kůrku (obsahující všechny tři jednotlivé části kůrky v poměru odpovídajícímu zastoupení na celém chlebu) a obsah akrylamidu byl stanovován zvlášť pro celkovou kůrku i její jednotlivé frakce.

Stanovení obsahu akrylamidu pomocí GC/MS

Extrakce akrylamidu ze vzorků byla založena na postupu Ciesarová a spol. (2009) modifikovaného pro plynovou chromatografii¹⁴. Jako vnitřní standard byl použit d₃-akrylamid (0,02 g na 100 ml metanolu). Nejprve byla provedena extrakce deionizovanou vodou a vyčření pomocí Carrezových roztoků. Následně se vzorky preextrahovaly

Tabulka I

Složení směsí určených pro přípravu chlebů

Směs pro bramborový chléb	Směs pro slunečnicový chléb	Směs pro grahamový chléb
pšeničná mouka	pšeničná mouka	pšeničná mouka
žitná mouka	žitná mouka	—
bramborová mouka (2 %)	—	—
—	slunečnice loupaná (6 %)	—
—	—	grahamová mouka (20 %)
jedlá sůl	jedlá sůl	jedlá sůl
cukr	cukr	cukr
sušené droždí	sušené droždí	sušené droždí
kmín	—	—
—	jablečná vláknina	—
suchý kvas: syrovátka, kukuřičná mouka, sojová mouka, regulátor kyselosti: kyselina citronová, octan sodný	suchý kvas: bramborový škrob, regulátor kyselosti: kyselina mléčná, protihrudkující látka: síran vápenatý	suchý kvas: syrovátka, kukuřičná mouka, sojová mouka, regulátor kyselosti: kyselina citronová, octan sodný
ječmenná sladová mouka	ječmenná sladová mouka	ječmenná sladová mouka
stabilizátor: guarová mouka, kyselina askorbová	stabilizátor: guarová mouka, kyselina askorbová	stabilizátor: guarová mouka, kyselina askorbová

do ethylacetátu. Suchý vzorek po odpaření ethylacetátu na RVO byl před stanovením rozpuštěn v methanolu.

Obsah akrylamidu ve vzorcích byl stanovován pomocí GC/MS (EI) metodou použitím plynového chromatografu série 7890A s hmotnostním detektorem MSD 5975 Inert (Agilent Technologies, USA). Separace analytu byla provedena na koloně DB-FFAP (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm) prostřednictvím helia jako nosného plynu při konstantním průtoku 1,0 ml min⁻¹. Byl použit split/splitless nástřik, teplota nástřiku 250 °C, objem nástřiku 2 μl, pulsní splitless mód, pulsní tlak nástřiku 200 kPa za 0,4 min, skleněný liner. Teplotní program metody byl: 60 °C (1 min), 10 °C min⁻¹, 190 °C (0 min), 50 °C min⁻¹, 240 °C (2 min). Detekce probíhala v SIM módu, kde byl sledován poměr mezi hmotnostmi náboje 71,1 pro akrylamid a 74,1 pro d₃-akrylamid (vnitřní standard).

Kalibrační vzorky byly připraveny ze zásobního roztoku akrylamidu (0,05 g na 100 ml methanolu) v rozmezí 50–2000 ng na 10 ml s 10 μl vnitřního standardu (d₃-akrylamid, 0,02 g na 100 ml methanolu).

Výsledky a diskuse

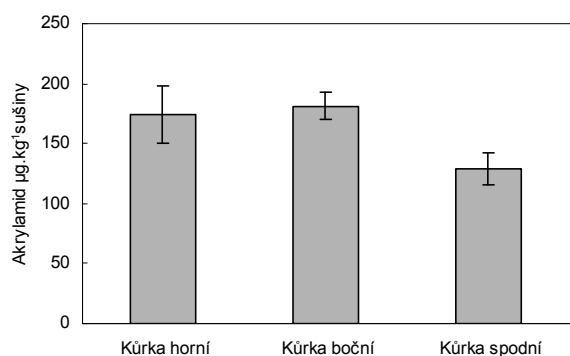
Cílem této práce bylo studium distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba (celý chléb, střídky, kůrka a frakce kůrky) umožňující nastavení vhodných podmínek přípravy vzorků pro stanovení obsahu akrylamidu v chlebu pro následné technologické úpravy, které by vedly k minimalizaci vzniku akrylamidu při domácí přípravě

chleba.

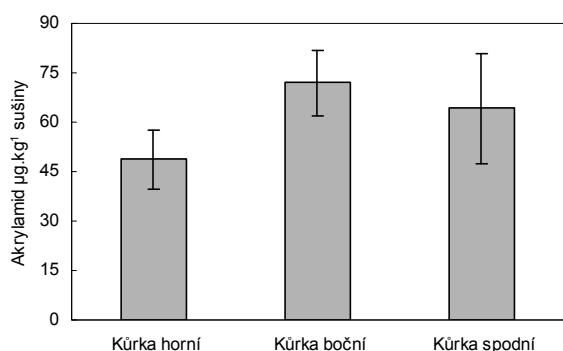
U chlebů z domácí pekárny se spodní a boční strany během pečení dotýkaly formy, v níž byl chléb připravován. Tyto strany měly drsnější povrch než kůrka na horní straně chleba. Také zbarvení povrchu nebylo rovnoměrné. Kůrka na bočních stranách chleba byla tmavší než kůrka na horní a spodní straně, což bylo způsobeno především tím, že topná spirála vede po vnitřním obvodu pekárny a z této příčiny je chléb po bokách propečenější. Nejsvětlejší kůrka byla na horní straně chleba. Na základě poznatků o souvislosti mezi zbarvením produktu a obsahem akrylamidu jsme předpokládali¹⁵, že kůrka na bočních stranách bude obsahovat více akrylamidu než kůrka na horní a spodní straně chleba.

Ze stanovení obsahu akrylamidu v jednotlivých typech kůrek (viz obr. 1a,b,c) vyplývá, že obsah akrylamidu je opravdu mírně vyšší v boční kůrce chleba. Tyto rozdíly nejsou při porovnání obsahu akrylamidu v jednotlivých typech kůrky až tak výrazné a v rámci odchylek poměrně malé. Proto jsme se je rozhodly pro další porovnávání distribuce akrylamidu v daném chlebu i mezi jednotlivými chleby zaměřit pouze na celkovou kůrku.

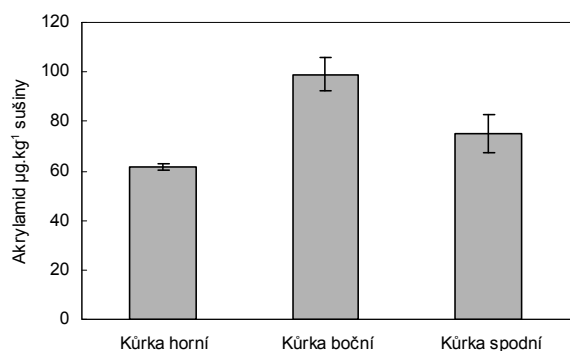
Z porovnání průměrného obsahu akrylamidu v kůrce mezi bramborovým, slunečnicovým a grahamovým chlebem (obr. 2) vyplývá, že bramborový chléb obsahuje v kůrce nejvíce akrylamidu z těchto tří chlebů. To je pravděpodobně způsobeno přítomností bramborové mouky ve směsi pro přípravu tohoto chleba, protože brambory obsahují značné množství aminokyseliny asparagin jako hlavního prekurzoru akrylamidu¹⁶. Obsah akrylamidu ve slunečnicovém chlebu je v porovnání s bramborovým chle-



Obr. 1a. Porovnání obsahu akrylamidu v jednotlivých frakcích kůrky bramborového chleba



Obr. 1b. Porovnání obsahu akrylamidu v jednotlivých frakcích kůrky slunečnicového chleba



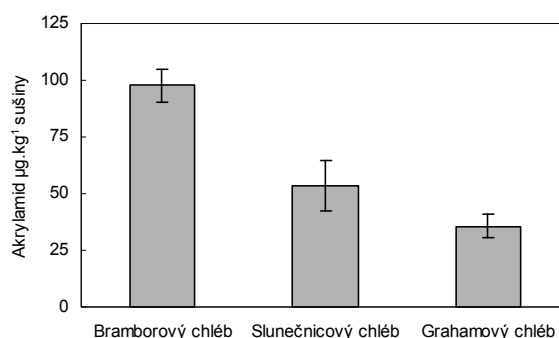
Obr. 1c. Porovnání obsahu akrylamidu v jednotlivých frakcích kůrky grahamového chleba

bem asi poloviční a u grahamového je jeho obsah pouze třetinový. To je pravděpodobně způsobeno použitím surovin s nižším obsahem prekurzorů akrylamidu pro přípravu směsí na tyto chleby.

Také jsme srovnávali mezi jednotlivými chleby obsah akrylamidu ve střídce a v chlebu celkově. Hodnoty získané při stanovení obsahu akrylamidu ve střídce ale byly velmi nízké a blížily se limitu stanovení (LOQ = 10 ppb). To je způsobeno především tím, že teplota střídky chlebu není tak vysoká jako teplota na povrchu chlebu, čímž vzniká méně akrylamidu. Je totiž známo, že k tvorbě akrylamidu dochází až při teplotách vyšších jak 120 °C s maximem tvorby mezi 180 až 200 °C (cit.¹⁷). Další vliv může mít i to, že kůrka, která se vytvoří na povrchu chleba během pečení, slouží jako bariéra bránící rychlému odpařování vody ze střídky během pečení a vyšší obsah vody může vést k nižší tvorbě akrylamidu, jak uvedli ve svých studiích Elmore a spol.¹⁸, Taeymans a spol.¹⁹ nebo Ciesarová a spol.²⁰.

Obsah akrylamidu v celkovém chlebu byl také poměrně nízký a velice se blížil hodnotám střídky. To je dáno především tím, že střídka tvoří více jak 90 % celého chleba a tudíž je obsah akrylamidu v celém chlebu dán především obsahem akrylamidu ve střídce. Podíl obsahu akrylamidu z kůrky bude na celkovém obsahu akrylamidu v chlebu jen velmi malý.

U jednotlivých chlebů byl také porovnáván jejich měrný objem a vlhkost podle normy ČSN (STN) 56 0116. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. II. Z tabulky je patrné, že nejmenší měrný objem měl grahamový chléb, u kterého během přípravy v domácí pekárnice nedošlo k tak velkému nakynutí jako u ostatních dvou chlebů, díky čemuž byl patrně jeho povrch hladší a rovnoměrnější než u chleba bramborového a slunečnicového, které měly povrch nerovnoměrný a dosti hrbolatý. To bylo pravděpodobně způsobeno intenzivnějším kynutím, čímž se na povrchu těsta vytvářeli nevzhledné praskliny, které se pak



Obr. 2. Porovnání obsahu akrylamidu v kůrkách jednotlivých druhů chleba

Tabulka II
Měrný objem a vlhkost jednotlivých chlebů

Chléb	Měrný objem [ml na 100 g chleba]	Vlhkost [%] RSD do 10 %
Bramborový chléb	416 ± 47	47
Slunečnicový chléb	361 ± 60	40
Grahamový chléb	313 ± 26	49

promítly do konečného vzhledu chleba.

I přes nejmenší měrný objem měl grahamový chléb nejvyšší vlhkost z porovnávaných tří chlebů. To by mohlo být i jedním z důvodů, proč má grahamový chléb nejnižší obsah akrylamidu, kdy vyšší obsah vody může vést k nižší tvorbě akrylamidu, jak již bylo zmíněno výše. Naproti tomu toto neplatí v případě bramborového chlebu, který i přes vyšší vlhkost má nejvyšší obsah akrylamidu. U něj je to nejspíše způsobeno, jak již také bylo výše zmíněno, vyšším obsahem prekurzorů akrylamidu.

Podle společností Mäspomix navržených a vyzkoušených podmínek určených pro přípravu chleba pečeného z chlebových směsí pomocí plynové nebo elektrické trouby jsme grahamový chléb připravovali také v laboratorní peci, kde se chléb během pečení stranami nedotýkal formy a byl pouze po vytvarování do bochánku volně položen na pečící plech. Doba pečení byla doporučena 50 min v závislosti na stupni požadovaného vypečení. Bohužel laboratorní pec není určená pro pečení chleba, tudíž chléb v ní připravovaný nedosáhl po 50 min požadovaného zbarvení povrchu kůrky. Proto jsme čas pečení prodloužili o 20 a 40 minut. Při porovnání výsledků stanovení obsahu akrylamidu v grahamovém chlebu pečeného v laboratorní peci (obsah akrylamidu v kůrce chlebu pečeného déle o 20 min: $33 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ sušiny, o 40 min: $36 \pm 4 \mu\text{g kg}^{-1}$ sušiny) s hodnotami získanými z chlebů připravovaných v domácí pekárně bylo patrné, že hodnoty se od sebe liší jen minimálně a v rámci odchylky byli prakticky stejné. To je pravděpodobně způsobeno tím, že chléb z pece během pečení ztratil více vody, což vedlo k dosažení stejného obsahu akrylamidu jako u chleba z domácí pekárníčky. Je ale nezbytné tento pokus zopakovat při použití domácí plynové nebo elektrické trouby pro něž jsou tyto podmínky a způsob přípravy chleba navrženy.

Závěr

Cílem práce bylo studium distribuce akrylamidu v jednotlivých částech tří druhů chlebů připravovaných v domácí pekárně umožňující navrhnouti vhodných technologických úprav vedoucích k minimalizaci vzniku akrylamidu v těchto chlebech. Výsledky ukázaly, že nejvíce akrylamidu vzniká na povrchu chleba v kůrce, kde je během pečení dosahováno nejvyšších teplot urychlujících vznik akrylamidu. S ohledem na toto zjištění, by bylo vhodné

modifikovat složení směsi určené pro přípravu těchto chlebů, například přidávkou vhodných anorganických solí, antioxidantů, enzymu asparagináza atd., které by snižovali obsah akrylamidu. Avšak nejdůležitějším faktorem při úpravě receptury je vliv na senzory a organoleptické vlastnosti finálního produktu, které určují jeho přijatelnost spotřebitelem a tím i volbu snižování obsahu akrylamidu v chlebu připravovaného v domácí pekárně.

Tato publikace byla vytvořena realizací projektu „Centrum excelentnosti pre kontaminujúce látky a mikroorganizmy v potravinách“ na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Evropského fondu regionálneho rozvoje. Tato práce byla podporována taktéž Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe smlouvy č. VMSP-P-0089-09.

LITERATURA

- Ahrné L., Andersson C.-G., Floberg P., Rosén J., Lingnert H.: *Science Direct*. 40, 1708 (2007).
- Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M., Tallmadge D. H., Eberhart B. L., Ewald D. K., Gruber D. C., Morsch T. R., Strothers M. A., Rizzi G. P., Villagran M. D.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 4782 (2003).
- IARC. Acrylamide. TA: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans PG 1994; 60.
- Hogervorst J. G., Schouten L. J., Konings E. J., Goldbohm R. A., Van den Brant. P. A.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 2304 (2008).
- Hogervorst J. G., Schouten L. J., Konings E. J., Goldbohm R. A., Van den Brant. P. A.: *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1428 (2008).
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998 (2002).
- Stadler R. H., Robert F., Riediker S., Varga N., Davidek T., Devaud S., Goldmann T., Hau J., Blank I.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 5550 (2004).
- Friedman M.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 4504 (2003).
- Haase N., Matthaeus B., Vosmann K.: *Getreide, Mehl und Brot.* 57, 180 (2003).
- Springer M., Fischer T., Lehrack A., Freund W.: *Getreide, Mehl und Brot.* 57, 274 (2003).
- Brathen E., Knutsen S. H.: *Food Chem.* 92, 693 (2005).
- Mustafa A., Andersson R., Rosen J., Kamal-Eldin A., Aman P.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 5985 (2005).
- Fredriksson H., Tallving J., Rosen J., Aman P.: *Cereal Chem.* 81, 650 (2004).
- Ciesarová Z., Kukurová K., Bednáriková A., Morales F. J.: *J. Food Nutr. Res.* 48, 20 (2009).
- Gökmen V., Senyuva H. Z.: *Food Chem.* 99, 238 (2006).
- Ciesarová Z.: *Chem. Listy* 99, 483 (2005).
- Knol J. J., van Loon W. A. M., Linssen J. P. H., Ruck

- A.-L., van Boekel M. A. J. S., Voragen A. G. J.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 6133 (2005).
18. Elmore J. S., Koutsidis G., Dodson A. T., Mottram D. S., Wedzicha B. L.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 1286 (2005).
19. Taeymans D., Wood J., Ashby P., Blank I., Studer A., Stadler R. H., Gondé P., Van Eijck P., Lalljie S., Lingnert H., Lindblom M., Matissek R., Müller D., Tallmadge D., O'Brien J., Thompson S., Silvani D., Whitmore T.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 323 (2004).
20. Ciesarová Z., Kiss E., Kolek E.: *Czech J. Food Sci.* 24, 133 (2006).

Abstrakt

The aim of this work was to study the distribution of acrylamide in particular parts of three different breads (potato, sunflower and graham breads) in order to enable a subsequent adjustment of technology leading to the minimization of toxic acrylamide in bread. Acrylamide levels were compared in fractions of crust (top, side, bottom and the total crust) and then across the total bread, crumb and crust within a separate type of bread and among the three selected breads. The most of the acrylamide was found in crust of bread. The highest content of acrylamide was observed in the potato bread since the raw materials used in this bread mix encompassed more acrylamide precursors. Finally, two processes of bread making from the same bread mix were compared: baking in a home bakery and in a bakery oven under the instructions provided by the producer. The contents of acrylamide in bread thus prepared were almost the same.

OPTIMALIZÁCIA CPE METÓDY PRE SELEKTÍVNE STANOVENIE (ULTRA)STOPOVÝCH KONCENTRÁCIÍ Sb(III) V PRÍRODNÝCH VODÁCH

**INGRID HAGAROVÁ, PETER MATÚŠ,
MAREK BUJDOŠ a JANA KUBOVÁ**

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Geologický ústav, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko
hagarova@fns.uniba.sk*

Kľúčové slová: antimón, extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE), atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou (ETAAS), špeciálna analýza, prírodné vody

Úvod

Toxicita antimónu a jeho fyziologické správanie závisia od oxidačného stavu, od chemickej formy a prítomnosti potenciálnych ligandov, ako aj od rozpustnosti jednotlivých zlúčenín¹. Elementárny antimón je toxickejší ako jeho zlúčeniny a všeobecne látky, v ktorých je prítomný ako Sb(III) sú približne 10krát toxickejšie ako tie, v ktorých je prítomný ako Sb(V). Práve poznatky o rozdielnosti toxických účinkov a o kvalitatívne odlišných vplyvoch jednotlivých zlúčenín antimónu na živé organizmy viedli k snahám o analytické rozlíšenie (špeciáciu) jeho rôznych foriem (špecií) v rôznych biologických materiáloch ako aj v rôznych zložkách životného prostredia. V prírodných vodách sa nachádza predovšetkým anorganický Sb(V) a Sb(III). Z organických foriem antimónu boli vo vodách stanovené $\text{CH}_3\text{SbO}(\text{OH})_2$ [dihydroxy(oxo)metylantimón] a $(\text{CH}_3)_2\text{SbO}(\text{OH})$ [hydroxy(oxo)dimetylantimón] (cit.²). Keďže koncentrácie metylovaných druhov antimónu vo vodách predstavujú menej ako 10 % z celkového množstva³ a organické formy antimónu sú menej toxické ako anorganické soli, väčšina špeciálnych štúdií je zameraná na stanovenie anorganického Sb(III) a Sb(V). Cieľom tejto práce je zoptimalizovať postup pre extrakciu s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE) na selektívne stanovenie Sb(III) a stanovenie celkového anorganického antimónu po redukcii Sb(V) na Sb(III). Princíp CPE spočíva v pridaní tenzidu k vodnému roztoku (pričom koncentrácia tenzidu musí byť vyššia ako kritická micelárna koncentrácia, aby dochádzalo k vzniku micel) a následnom zahriatí nad určitú teplotu (ktorá je charakteristická pre každý tenzid). Takýto roztok sa stáva zakaleným v dôsledku preskupenia micelotvorných zložiek a vzniku ďalšej fázy. Takto sa získajú dve fázy; jedna obohatená tenzidom, ktorá obsahuje hydrofóbne a nepolárne zlúčeniny zachytené v nepolárnych jadrách micel, a druhá – vodná fáza s koncentráciou tenzidu blízkou kritickej

micelárnej koncentracii. Pri separácii, prekoncentracii a špeciácii kovov s využitím CPE je jedným z prvých krokov vytvorenie vhodného hydrofóbneho komplexu sledovaného analytu, ktorý môže byť následne zachytený v hydrofóbnom jadre micely. Aby došlo ku kvantitatívnej separácii a boli dosiahnuté vysoké prekoncentračné faktory pre nasledujúce stanovenie, je nutné zvoliť pre vypracovávaný postup vhodné chelatačné činidlo a tenzid, a následne optimalizovať všetky experimentálne parametre (koncentráciu chelatačného činidla a tenzidu, pH roztoku, prídavky činidiel, teplotu a čas inkubácie, separáciu fáz, ako aj výber činidla na riedenie tenzidom obohatenej fázy). V minulosti bola pre detekciu analytov po CPE separácii a prekoncentracii používaná predovšetkým atómová absorpčná spektrometria s plameňovou atomizáciou (FAAS). Aj napriek tomu, že FAAS nemožno uprieť výhody spojené s rýchlosťou analýzy, použitie citlivejšej metódy umožňuje značne znížiť limity detekcie pre mnohé analyty (vrátane antimónu). V tomto prípade je atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou (ETAAS) vhodnejšou alternatívou pre záverečnú detekciu nakoncentrovaného analytu a spojenie CPE a ETAAS umožňuje dosahovať značne nižšie limity detekcie pre sledované analyty (rádovo aj o dva poriadky). Výhodou ETAAS je aj to, že doprevádzajúca matrica pozostávajúca prevažne z tenzidu použitého pri CPE je odstránená ešte počas pyrolýzy pred samotnou atomizáciou analytu, a teda neruší samotné stanovenie. Ďalšou výhodou ETAAS je možnosť dávkovania veľmi malých objemov vzorky (rádovo desiatky mikrolitrov). V tomto smere je práve ETAAS najvhodnejšou metódou, keďže objemy tenzidom obohatenej fázy, ktoré je možné pri CPE získať sa pohybujú rádovo v stovkách mikrolitrov⁴.

V tejto práci je opísaná optimalizácia CPE postupu pre selektívne stanovenie Sb(III) pred jeho stanovením metódou ETAAS, pričom ako chelatačné činidlo je použitý pyrolidín ditiokarbamát amónny (APDC) a ako extrakčné činidlo bude použitý neiónový tenzid Triton X-114 (TX-114). Certifikovaný referenčný materiál pre stopové prvky v riečnej vode SLRS-4 je použitý na kontrolu spoľahlivosti navrhnutého postupu pre stanovenie celkového antimónu po redukcii Sb(V) na Sb(III). V závere je zoptimalizovaná metóda použitá na selektívne stanovenie Sb(III) v prírodných vodách.

Experimentálna časť

Použitie prístroje a zariadenia

Na stanovenie antimónu bol použitý atómový absorpčný spektrometer firmy Perkin-Elmer 3030 (Norwalk, CT, USA) s elektrotermickým atomizátorom HGA 600

v spojení s automatickým podávačom vzoriek AS-70 tej istej firmy. Pre korekciu pozadia bol použitý korektor pozadia využívajúci Zeemanov jav. Ako ochranný plyn bol použitý argón. Merania boli robené na pyrolytických grafitových kvetách firmy Perkin-Elmer. Dávkované objemy vzoriek boli 20 μl , dávkované objemy modifikátora (Pd (NO_3)₂) boli 10 μl . Pre vyhodnotenie boli použité plochy pík. Ako zdroj žiarenia bola použitá bezelktródová výbojka pre Sb (Perkin-Elmer) pracujúca pri 8 W. Zvolená vlnová dĺžka bola 217,6 nm a šírka štrbiny bola 0,7 nm. Teplotný program pre stanovenie Sb po CPE separácii a preconcentracii je uvedený v tab. I.

Termostatovaný vodný kúpeľ VL-12 (Kavalier, Sázava, Česká republika), analytické váhy Sartorius 1702 (Göttingen, Nemecko), pH meter MS-31 (Praha, Česká republika) a centrifúga MPW-360 (Machaniky precyzyjna, Varšava, Poľsko) boli použité pri extrakčnom postupe a príprave vzoriek.

Použité chemikálie

Všetky použité chemikálie boli čistoty p.a. Všetky roztoky boli pripravované v deionizovanej vode (DV). Roztoky s rôznou koncentráciou neiónového tenzidu boli pripravené rozpustením vhodného množstva Tritonu X-114 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) v DV. Roztoky chelatačného činidla s rôznou koncentráciou boli pripravené rozpustením vhodného množstva pyrolidín ditiokarbamátu amónneho (Sigma-Aldrich) v DV. Zásobný roztok Sb(III) (1000 mg l^{-1}) bol pripravený z vínanu antimonito draselného (Sigma-Aldrich) v DV. Zásobný roztok Sb(V) (1000 mg l^{-1}) bol pripravený z hexahydroxy antimoničnanu draselného (Sigma-Aldrich) v DV. Pracovné roztoky boli pripravené nezávislým riedením zo zásobného roztoku tesne pred použitím. Kyselina chlorovodíková (Merck, Darmstadt, Nemecko) a hydroxid sodný (Merck) boli použité na úpravu pH modelových roztokov a vzoriek. Všetky zásobné roztoky boli uskladnené v polyetylénových nádobách pri teplote 4 °C. Zásobný roztok dusičnanu paládnateho (s koncentráciou Pd 10 g l^{-1}) (Merck) bol po vhodnom nariadení DV použitý ako chemický modifikátor. Metanol (Merck) bol použitý na prípravu riediaceho činidla pre tenzidom obohatenú fázu. Certifikovaný referenčný materiál pre stopové prvky v riečnej vode SLRS-4 (National Research Council of Canada, Ottawa, Kanada) bol použitý na kontrolu spoľahlivosti navrhnutého postupu.

Použité vzorky

Syntetická voda (SV) (pripravená rozpustením $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (294 mg), NaCl (216 mg), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (86 mg), KCl (9,7 mg) a $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (7,3 mg) v 1000 ml DV) (cit.^{5,6}) bola pripravená na overenie vplyvu „bežne“ sa nachádzajúcich kovov vo vodách na extrakčnú výťažnosť sledovaného analytu. Tri jazerné vody (JV1, JV2 a JV3) z Ľubietovej boli odobraté zo severovýchodnej časti Slovenského Stredohoria, ktorá zahŕňa neovulkanic-

ký masív Poľana a severnú časť Čierťaž (z pohoria Veporské Vrchy). Kontaminovaná voda (KV) bola odobratá z domácej studne z Komárna. Prírodné vody boli filtrované (0,45 μm filter) ihneď po odbere a uskladnené v polyetylénových nádobách pri teplote 4 °C.

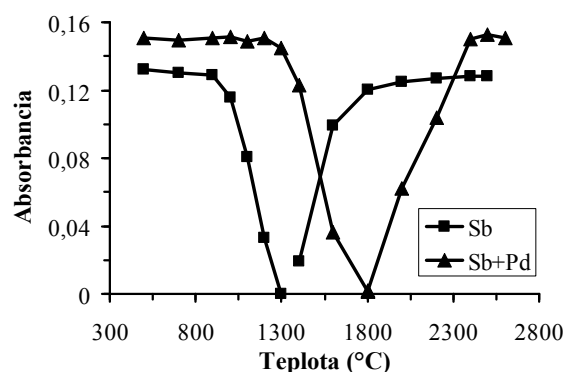
Pracovný postup

10 ml vzorky (pH upravené na $5,5 \pm 0,1$) obsahujúcej 0,02 % (m/v) APDC a 0,08 % (m/v) TX-114 bolo zahrievané v termostatovanom vodnom kúpeli 5 min pri 45 °C. Následne bola zmes 5 min centrifugovaná pri 4000 rpm (urýchlenie fázovej separácie) a 10 min chladená v ľadovom kúpeli (zvýšenie viskozity tenzidom obohatenej fázy). Vodná fáza bola odstránená dekantáciou. K tenzidom obohatenej fáze sa pridalo 200 μl metanolickeho roztoku 0,2 mol l^{-1} HNO_3 a takto pripravený roztok sa použil pre stanovenie nakoncentrovaného analytu metódou ETAAS.

Výsledky a diskusia

Optimalizácia teplotného programu pre ETAAS stanovenie

Pre elimináciu možných interferencií a zvýšenie spoľahlivosti stanovenia relatívne prchavých prvkov metódou ETAAS je použitie chemických modifikátorov takmer nevyhnutnosťou⁷. Keďže k stratám antimónu z grafitovej kvety môže dôjsť pri relatívne nízkej teplote, na jeho stabilizáciu bolo opísané použitie rôznych chemických modifikátorov (väčšinou platinové kovy). Medzi nimi patrí medzi najčastejšie využívané paládium. V našej práci, boli porovnané merania bez modifikátora a s použitím dusičnanu paládnateho (koncentrácia Pd 1000 mg l^{-1}) ako chemického modifikátora. Krivky termického rozkladu a krivky



Obr. 1. Krivky termického rozkladu a krivky atomizácie namerané pre Sb(III) po CPE separácii a preconcentracii; koncentrácia Sb(III): 1,60 $\mu\text{g l}^{-1}$; koncentrácia APDC: 0,10 % (m/v); koncentrácia TX-114: 0,20 % (m/v)

Tabuľka I

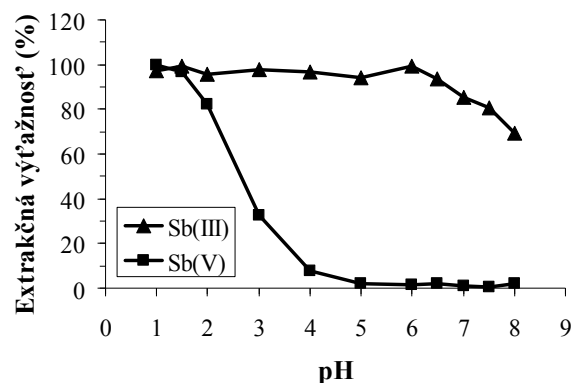
Teplotný program pre stanovenie Sb po CPE separácii a prekoncentracii metódou ETAAS

Krok	Teplota [°C]	Čas nárastu [s]	Čas zotrvania [s]	Prietok argónu [ml min ⁻¹]
Sušenie	110	10	20	250
Pyrolýza	1200	10	20	250
Atomizácia	2500	0	3	0
Čistenie	2550	1	1	250

atomizácie pre štandardný roztok Sb(III) po CPE separácii a prekoncentracii namerané bez modifikátora a v prítomnosti dusičnanu paládnatého sú znázornené na obr. 1. Krivka termického rozkladu bola meraná v rozmedzí teplôt 500–1800 °C a krivka atomizácie v rozmedzí teplôt 1400–2600 °C. Z nameraných závislostí je zrejmé, že maximálna teplota termického rozkladu, ktorú možno použiť pri meraní bez modifikátora je 900 °C a 1300 °C pri meraní v prítomnosti paládia. Pri porovnaní kriviek atomizácie možno zhodnotiť, že bez modifikátora možno použiť teplotu atomizácie 1800 °C a pri použití paládia je to 2400 °C. Zvyčajne teploty nad 600 °C postačujú na elimináciu organickej matrice, ktorá zostáva po CPE postupe⁴, takže merania bez modifikátora by z tohoto pohľadu mohli postačovať, avšak vyššia citlivosť ako aj presnosť merania boli dosahované v prítomnosti paládia. Nakoniec boli všetky nasledujúce merania robené s dusičnanom paládnatým, pri použití teploty termického rozkladu 1200 °C a teploty atomizácie 2500 °C (vid' tab. I).

Optimalizácia CPE postupu: pH

V prípade kovových chelátov, optimálne hodnoty pH súvisia s optimálnymi hodnotami pH, pri ktorých vznikajú stabilné neiónové komplexy. Rovnako veľmi dôležitú úlohu zohráva pH pri zlepšení extrakčnej účinnosti v prípadoch, pri ktorých sa nepoužívajú prídavky chelatačných činidiel, pretože v tomto prípade pH ovplyvňuje celkový náboj analytu, čo následne ovplyvňuje vznik komplexu medzi kovom a poly(oxyetylén)-ovými skupinami použitého tenzidu. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať výberu vhodného pH v prípadoch, kedy je navrhovaný CPE postup používaný na špeciáciu kovov, pričom je dôležité, aby pri zvolenom pH iba jedna iónová forma sledovaného analytu spoľahlivo vytvorila neiónový komplex, zatiaľ čo iná iónová forma sledovaného analytu pri danom zvolenom pH neiónový komplex tvoriť nesmie⁸. Pri optimalizácii postupu pre selektívne stanovenie Sb(III) v prítomnosti Sb(V) je práve tento parameter rozhodujúci pre navrhnutie spoľahlivého CPE postupu. V našom prípade bolo pH študované v rozmedzí 1,0–8,0. Výsledky meraní znázornené na obr. 2 poukazujú na to, že zatiaľ čo Sb(III) bol kvantitatívne extrahovaný v rozmedzí pH 1,0–6,0,

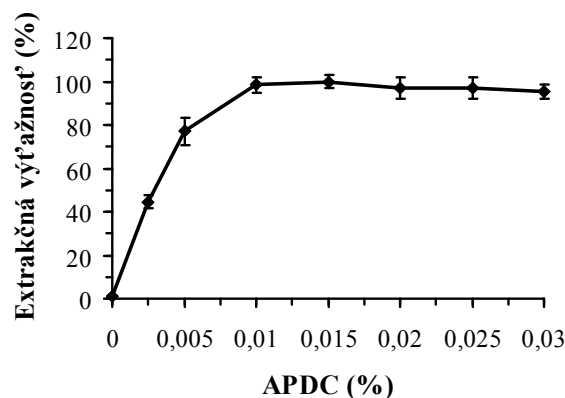


Obr. 2. Vplyv pH na extrakciu Sb(III), koncentrácia Sb(III): 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$; koncentrácia Sb(V): 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$; koncentrácia APDC: 0,10 % (m/v); koncentrácia TX-114: 0,20 % (m/v)

Sb(V) bol kvantitatívne extrahovaný pri pH < 1,5. Pri pH > 4,0 nedochádzalo k tvorbe komplexu Sb(V) s APDC, a teda Sb(V) nebol následne extrahovaný do tenzidom obohatenej fázy. Na základe týchto výsledkov, selektívna separácia Sb(III) od Sb(V) môže byť dosiahnutá pri pH 5,0–6,0. Nasledujúce experimenty boli nakoniec robené pri pH 5,5 \pm 0,1. Tieto závery podporujú zistenia, ktoré opísali vo svojej práci Li a spol.⁹

Optimalizácia CPE postupu: koncentrácia APDC

Chelatačné činidlo pyrolidín ditiokarbamát amónny (APDC) tvorí veľmi stabilné komplexy s prvkami, ktoré majú prázdny d orbitál alebo majú d orbitál s nízkou energiou, ako je to v prípade prechodových kovov a polokovov¹⁰. Netvorí komplexy s alkalickými kovmi a kovmi alkalických zemín, čo je zväčš výhodné pri navrhovaní CPE postupu pre (ultra)stopové prvky nachádzajú-



Obr. 3. Vplyv koncentrácie APDC na extrakciu Sb(III), koncentrácia Sb(III): 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$; koncentrácia TX-114: 0,10 % (m/v)

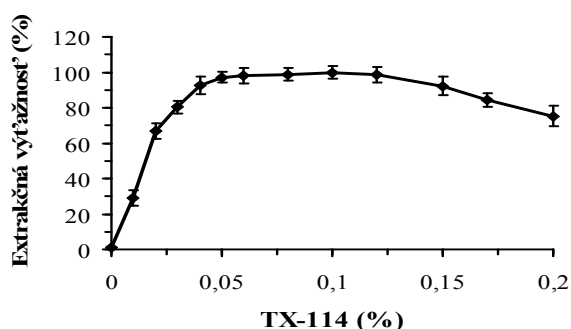
ce sa v prírodných vodách. V našom prípade bol APDC použitý ako chelatačné činidlo pre Sb(III). Pre voľbu vhodnej koncentrácie APDC bola zostrojená závislosť extrakčná výťažnosť vs. zvyšujúca sa koncentrácia APDC, ktorá je znázornená na obr. 3. Z nameranej závislosti je zrejmé, že ku kvantitatívnej extrakcii dochádzalo pri prekročení koncentrácie 0,01 % (m/v). Pre nasledujúce experimenty bola nakoniec zvolená koncentrácia 0,02 % (m/v).

Optimalizácia CPE postupu: koncentrácia TX-114

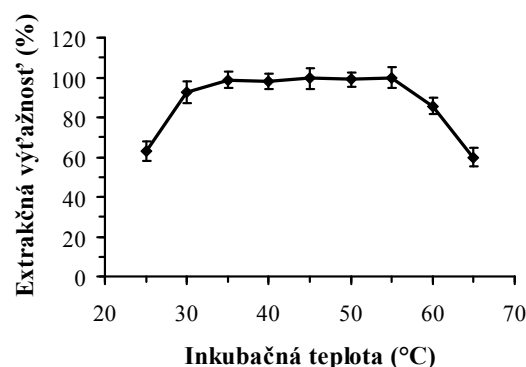
Z neiónových tenzidov, ktoré možno pre CPE postupu využiť bol zvolený Triton X-114 (TX-114), a to vďaka svojim optimálnym fyzikálno-chemickým vlastnostiam (nízka teplota potrebná na vytvorenie zákalu 23–25 °C, čo je zvlášť dôležité pri extrakcii termálne nestabilných kovových chelátov; vysoká hustota 1,052 g ml⁻¹, čo uľahčuje fázovú separáciu). K jeho výhodám patrí tiež to, že je komerčne dostupný s vysokou čistotou (za relatívne nízku cenu), je stabilný, neprchavý a netoxický¹¹. Pri voľbe vhodnej koncentrácie TX-114 bola zostrojená závislosť extrakčná výťažnosť vs. zvyšujúca sa koncentrácia TX-114, ktorá je znázornená na obr. 4. Z nameranej závislosti je zrejmé, že ku kvantitatívnej extrakcii dochádzalo pri prekročení koncentrácie 0,05 % (m/v). Pri použití koncentrácie vyššej ako 0,15 % (m/v) začala extrakčná výťažnosť klesať v dôsledku zvyšovania objemu tenzidom obohatenej fázy. Pre nasledujúce experimenty bola nakoniec zvolená koncentrácia 0,08 % (m/v).

Optimalizácia CPE postupu: koncentrácia metanolického roztoku HNO₃

Pre zníženie viskozity tenzidom obohatenej fázy a možnosť bezproblémového nadávkovania vzorky do grafitovej kyvety je ďalším dôležitým krokom výber vhodného činidla na riedenie tenzidom obohatenej fázy. V prípade ETAAS detekcie sú najčastejšie používanými činidlami metanolické alebo etanolické roztoky minerálnych kyselín (najčastejšie HNO₃). V našom prípade sme



Obr. 4. Vplyv koncentrácie TX-114 na extrakciu Sb(III), koncentrácia Sb(III): 0,40 µg l⁻¹; koncentrácia APDC: 0,02 % (m/v)



Obr. 5. Vplyv inkubačnej teploty na extrakciu Sb(III), koncentrácia Sb(III): 0,40 µg l⁻¹; koncentrácia APDC: 0,02 % (m/v); koncentrácia TX-114: 0,08 % (m/v)

otestovali metanol a metanolické roztoky s rôznou koncentráciou HNO₃ (0–0,3 mol l⁻¹). Zo získaných výsledkov možno urobiť nasledovné závery. Použitie čistého metanolu viedlo k extrakčnej výťažnosti okolo 85 %. Pri použití metanolických roztokov s koncentráciou HNO₃ 0,2 mol l⁻¹ a viac boli dosahované extrakčné výťažnosti nad 95 %. Na záver tejto časti možno skonstatovať, že prídavok HNO₃ je dôležitý a napomáha vyhnúť sa stratám analytu, ku ktorým môže dôjsť napr. v dôsledku jeho adsorpcie na stenu použitej nádoby. Pre nasledujúce experimenty bol nakoniec zvolený metanolický roztok HNO₃ s koncentráciou 0,2 mol l⁻¹.

Optimalizácia CPE postupu: inkubačná teplota a čas

Pre dosiahnutie maximálneho prekoncentračného faktora je potrebné uskutočňovať CPE pri teplotách nad teplotou potrebnou na vytvorenie zákalu^{12,13}. V našom prípade boli testované teploty v rozmedzí 25–65 °C. Získané výsledky sú znázornené na obr. 5. Extrakčná výťažnosť presahujúca 95 % bola získaná pri teplotách v rozmedzí 30–55 °C. Teploty nižšie ako 30 °C sú nevhodné pre navrhnutie spoľahlivého CPE postupu, pretože publikovaná teplota na vytvorenie zákalu pre TX-114 je 23–25 °C (cit.¹³). Teploty vyššie ako 60 °C sú takisto nevhodné, pretože pri týchto zvýšených teplotách dochádza pravdepodobne k termálnej degradácii Sb(III)-PDC komplexu. Pre nasledujúce experimenty bola nakoniec zvolená teplota 45 °C. Pri tejto konštantnej teplote, bola zisťovaná aj závislosť extrakčnej výťažnosti od inkubačného času. Táto závislosť bola študovaná v rozmedzí časov 1–10 min. Už čas 1 min bol postačujúci pre kvantitatívnu extrakciu Sb(III). Pre optimalizovaný CPE postup bol však zvolený inkubačný čas 5 min, pri ktorom bola dosahovaná vyššia reprodukovateľnosť.

Optimalizácia CPE postupu: iónová sila a čas centrifugácie

Vplyv iónovej sily na extrakčnú výťažnosť Sb(III) bol sledovaný v prítomnosti známych koncentrácií NaCl. Študované koncentrácie sa pohybovali v rozmedzí 0–3 % (m/v). Extrakčné výťažnosti viac ako 95 % boli dosahovateľné bez ohľadu na použitú koncentráciu NaCl. Nakoniec v navrhnutom CPE postupe nebol použitý žiadny prídavok NaCl.

Vplyv času centrifugácie na extrakčnú výťažnosť Sb(III) bol sledovaný v rozmedzí časov 5–20 min. Kompletná fázová separácia bola dosiahnutá už po 5 min centrifugácie. Tento čas bol nakoniec zvolený a použitý v zoptimalizovanom CPE postupe.

Štúdium interferencií

Vďaka vysokej selektivitě merania pri použití ETAAS, hlavná pozornosť pri štúdiu interferencií bola venovaná prekoncentračnému kroku. Ako možné interfenty boli volené kovové ióny, ktoré reagujú s APDC a môžu byť následne spoluextrahované s Sb(III) do tenzidom obohatej fázy. V tejto časti štúdia sa použili modelové roztoky s objemom 10 ml, ktoré obsahovali 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$ Sb(III) a potenciálny interferent o rôznych koncentráciách. Z testovaných pomerov (analyt : potenciálny interferent) to boli 1:5, 1:10 a 1:100 pre Ag(I), Cd(II), Co(II), Cu(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II) a Se(IV), ďalší pomer 1:500 bol testovaný pre Fe(III) a Zn(II) a pomer 1:1000 pre Al(III) a As(III). Pri všetkých týchto modelových vzorkách boli dosahované extrakčné výťažnosti v rozmedzí 90–110 %.

Vplyv „bežne“ sa nachádzajúcich kovov v prírodných vodách na extrakčnú výťažnosť Sb(III) bol študovaný na syntetickej vode^{5,6} s prídavkami štyroch rôznych koncentrácií Sb(III). Získané výsledky sú uvedené v tab. II. Z výsledkov je zrejme, že alkalické kovy a kovy alkalických zemí nachádzajúce sa v SV neovplyvňovali selektívne stanovenie Sb(III).

Pre overenie selektívneho stanovenia Sb(III) v prítomnosti Sb(V) bolo pripravených päť modelových roztokov obsahujúcich 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$ Sb(III) s rôznymi koncentráciami Sb(V). Sledované pomery Sb(III):Sb(V) boli 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 a 1:40. Získané výsledky sú uvedené

Tabuľka II

Stanovenie Sb(III) v syntetickej vode (SV) po CPE separácii a prekoncentracii

Vzorka	Pridaný Sb(III) [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Stanovený Sb(III) [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Extrakčná výťažnosť [%]
SV	0,40	0,41 ± 0,02	102,5
SV	0,80	0,79 ± 0,03	97,5
SV	1,60	1,68 ± 0,02	105,0
SV	3,20	3,26 ± 0,01	101,9

Tabuľka III

Stanovenie Sb(III) v modelových roztokoch po CPE separácii a prekoncentracii

Sb(III):Sb(V)	Extrakčná výťažnosť [%]
1:1	99,2 ± 3,1
1:5	106,5 ± 2,5
1:10	101,6 ± 3,9
1:20	103,5 ± 4,5
1:40	108,7 ± 1,6

v tab. III. Extrakčné výťažnosti v týchto modelových roztokoch sa pohybovali v rozmedzí 99–109 %.

Analytické parametre

Analytické parametre charakterizujúce navrhnutý postup sú nasledovné. Relatívna štandardná odchýlka (RSD) získaná pre 10 vzoriek s koncentráciou 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$ Sb(III), ktoré boli použité pri opísanom CPE postupe bola 6,5 %. Prekoncentračný faktor (PF) počítaný ako pomer smerníc kalibračných kriviek pre kalibračné roztoky po CPE a bez CPE separácie a prekoncentracie bol 28 (pri pôvodnom objeme vzoriek 10 ml). Lineárny rozsah bol medzi 0,10–3,50 $\mu\text{g l}^{-1}$ Sb(III). Získaná kalibračná závislosť mala smernicu 0,1882 (pre 5 štandardných roztokov, $n = 3$) a korelačný koeficient 0,998. Limit detekcie počítaný ako trojnásobok štandardnej odchýlky slepeho pokusu bol 30 ng l^{-1} .

Analýza reálnych vzoriek

Zoptimalizovaná CPE metóda bola použitá na selektívne stanovenie Sb(III) v troch vzorkách jazerných vôd z Lúbietovej (JV1, JV2 a JV3) a jednej kontaminovanej vody (KV) z domácej studne z Komárna. Získané výsledky sú uvedené v tab. IV. Po pridaní 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$ Sb(III) k týmto reálnym vzorkám boli vypočítané extrakčné výťažnosti, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 91–105 %. Spôľahlivosť navrhnutého postupu bola overená analýzou certifikovaného referenčného materiálu SLRS-4. V tomto prípade sa stanovoval celkový antimón po redukcii Sb(V) na Sb(III) s použitím L-cysteínu^{14,15}.

Záver

V prezentovanej práci je opísaná optimalizácia CPE postupu na selektívne stanovenie (ultra)stopových koncentrácií Sb(III) v prírodných vodách metódou ETAAS. Dosiahnutý prekoncentračný faktor pri použití navrhnutého postupu bol 28 (pričom pôvodný objem vzoriek bol 10 ml). Dosiahnutý limit detekcie bol 30 ng l^{-1} . Zo získaných výsledkov je zrejme, že prezentovaný CPE postup umožňuje značne zvýšiť citlivosť použitej detekčnej metódy.

Tabuľka IV

Selektívne stanovenie Sb(III) a stanovenie celkového Sb v reálnych vzorkách vôd po CPE separácii a prekoncentracii

Vzorka	Pridaný [$\mu\text{g l}^{-1}$] Sb(III)	Stanovený [$\mu\text{g l}^{-1}$] ^a		Extrakčná výťažnosť [%]	
		Sb(III)	Sb(total) ^b	Sb(III)	Sb(total)
KV	---	$0,35 \pm 0,04$	$2,06 \pm 0,05$	---	---
	0,40	$0,72 \pm 0,02$	$2,48 \pm 0,06$	92,5	105,0
JV1	---	$0,13 \pm 0,02$	$2,25 \pm 0,01$	---	---
	0,40	$0,51 \pm 0,03$	$2,62 \pm 0,05$	95,0	92,5
JV2	---	$0,28 \pm 0,04$	$2,20 \pm 0,03$	---	---
	0,40	$0,69 \pm 0,02$	$2,58 \pm 0,02$	102,5	95,0
JV3	---	$0,44 \pm 0,01$	$2,93 \pm 0,03$	---	---
	0,40	$0,83 \pm 0,02$	$3,35 \pm 0,02$	97,5	105,0
SLRS-4 ^c	---	---	$0,21 \pm 0,03$	---	91,3
	0,40	$0,41 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,01$	102,5	97,5

^a Priemer zo štyroch stanovení \pm štandardná odchýlka, ^b stanovené po redukcii Sb(V) na Sb(III) s použitím L-cysteínu,^c Certifikovaná hodnota pre celkový antimón: $0,23 \pm 0,04 \mu\text{g l}^{-1}$

dy pre stanovený analyt. Na záver možno skonštatovať, že extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov ponúka relatívne jednoduchú, rýchlu, bezpečnú, dostupnú a cenovo nenáročnú alternatívu v porovnaní s inými separačno-prekoncentračnými metódami^{7,16}.

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektov finančne podporených grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja LPP-0038-06 a Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA 1/0272/08.

LITERATÚRA

- Krachler M., Emons H., Zheng J.: TRAC-Trends Anal. Chem. 20, 173 (2001).
- Andreae M. O., Asmode J. F., Foster P., Van't dack L.: Anal. Chem. 53, 1766 (1981).
- Cabon J. Y., Madec C. L.: Anal. Chim. Acta 504, 209 (2004).
- Hagarová I., Kubová J., Matúš P., Bujdoš M.: Acta Chim. Slov. 55, 528 (2008).
- Žemberyová M., Shearman A., Šimonovičová A., Hagarová I.: Intern. J. Environ. Anal. Chem. 89, 569 (2009).
- Matúš P., Hagarová I., Bujdoš M., Diviš P., Kubová J.: J. Inorg. Biochem. 103, 1473 (2009).
- Farkašová I., Závadská M., Žemberyová M.: Chem. Listy 93, 173 (1999).
- Hagarová I.: Chem. Listy 103, 712 (2009).
- Li Y., Hu B., Jiang Z.: Anal. Chim. Acta 576, 207 (2006).
- Meeravali N. N., Reddy M. A., Kumar S. J.: Anal. Sci. 23, 351 (2007).
- Farajzadeh M. A., Fallahi M. R.: Anal. Sci. 22, 635 (2006).
- Hinze W. L., Pramauro E.: Crit. Rev. Anal. Chem. 24, 133 (1993).
- Silva M. F., Fernandez L., Olsina R. A., Stacchiola D.: Anal. Chim. Acta 342, 229 (1997).
- Fan Z.: Microchim Acta 152, 29 (2005).
- Feng Y. L., Narasaki H., Chen H. Y., Tian L. C.: Anal. Chim. Acta 386, 297 (1999).
- Hagarová I., Kubová J.: Chem. Listy 102, 782 (2008).

PROFIL MASTNÝCH KYSELÍN V RASTLINÁCH PASIENKA A V OVČOM MLIEČNOM TUKU POČAS PASTEVNEJ SEZÓNY

**BEÁTA MELUCHOVÁ^a, JAROSLAV
BLÁŠKO^a, RÓBERT KUBINEC^a,
RENÁTA GÓROVÁ^a, MILAN
MICHALEC^b, VLADIMÍRA VARGOVÁ^b,
ZUZANA KOVÁČIKOVÁ^b, MILAN
MARGETÍN^c a LADISLAV SOJÁK^a**

^a Institute of Chemistry, Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic, ^b Grassland and Mountain Agriculture Research Institute, Mládežnícka 36, 974 05 Banská Bystrica, Slovak Republic, ^c Research Institute of Animal Production in Trenčianska Teplá, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Slovak Republic
meluchova@fns.uniba.sk

Abstrakt

Zmeny zloženia mastných kyselín (FA) rastlinných druhov porastu počas pasienkovej sezóny v dvoch meteorologických rozdielnych rokoch a ich zmeny v ovčom mlieku sa analyzovali plynovou chromatografiou. Zmeny v obsahu *cis*-9,*trans*-11 18:2 (CLA) sú primárne určované obsahom kyseliny α -linolénovej (ALA) v rastlinách pasivy. ALA je najobsažnejšou FA porastu. Jej obsah v suchšom roku 2007 od polovice mája do polovice augusta klesol zo 62,4 % na 38,8 % (g 100 g⁻¹ rastlinného tuku) a potom v polovici septembra narástol na podobný obsah ako v máji. Podobný trend sa zistil aj v zmene obsahu CLA v mlieku, keď obsah 2,3 % v máji klesol v júli na 1,3 % a v septembri narástol na 2,3 % (g 100 g⁻¹ mliečného tuku). V roku 2008, ktorý bol menej teplý a s väčším avšak rozdielnym úhrnom zrážok počas mesiacov pasienkovej sezóny sa potvrdili najvyššie obsahy CLA v máji (2,3 %) a v septembri (2,0 %), avšak minimum v sezónnej zmene obsahu CLA v mlieku (1,3 %) sa zistilo v júni v zhode s vyššou priemernou teplotou a nižším úhrnom zrážok v porovnaní s júlom 2008. Podľa zloženia mastných kyselín v ovčom mliečnom tuku, vrátane obsahu CLA, septembrové ovčie mlieko bolo podobnej kvality ako májové mlieko.

Úvod

Zo zdravotného hľadiska je dôležité sledovať zloženie mlieka, najmä mastných kyselín. Nasýtené mastné kyseliny C4-C10 (najmä kys. maslová), mononenasýtené (najmä kys. olejová) a polynenasýtené kyseliny (najmä n-3 kyseliny) sa považujú za potenciálne zdraviu prospeš-

né, zatiaľ čo nasýtené mastné kyseliny C12-C16 ako aj niektoré *trans*-kyseliny sú z hľadiska srdcovocievnych ochorení rizikové. Preto je dôležité kvantifikovať zmeny obsahu v krmivách prítomných prekursorov mastných kyselín mliečného tuku, aby sa zistili možnosti modifikácie obsahu zdraviu prospešných mastných kyselín v mliečnych produktoch. Vedeckovýskumný záujem sa sústreďuje najmä na izoméry konjugovanej kyseliny okta-dekadiénovej (CLA), ktoré sa vyznačujú potenciálnymi antikarcinogénnymi, antiaterogénnymi, anti-diabetickými, antiobezitnými ako aj imunomodulačnými účinkami.

Najvýznamnejším faktorom ovplyvňujúcim obsah CLA v mlieku je krmivo. Holandskí autori¹ konštatovali, že za ostatné štyri desaťročia sa zloženie mastných kyselín mlieka stalo pre ľudské zdravie menej vhodné v súvislosti so zmenami v kŕmení a v manažmente zvierat vzhľadom na vyšší podiel koncentrátov a siláže v kŕmnych dávkach a menším podielom pasivy. Udvávajú, že obsahy esenciálnych mastných kyselín (kys. α -linolénovej ALA a kys. linolovej LA), ako aj CLA v mliečnych produktoch významne poklesli. Zistilo sa, že mlieko a mliečne produkty prežúvavcov kŕmených pasením majú vyšší pomer nenasýtených k nasýteným mastným kyselinám, viac polynenasýtených mastných kyselín, vrátane CLA, v porovnaní s mliekom prežúvavcov kŕmených silážou a koncentrátmi. Štúdiom vzťahov medzi obsahom kyselín porastu konzumovanej prežúvavcami a zložením ich mliečného tuku sa zistilo, že prítomnosť CLA v mliečnom tuku prežúvavcov je výsledkom izomerizácie a biohydrogenácie kys. α -linolénovej a linolovej, ako hlavných nenasýtených mastných kyselín v trávnych porastoch, bacherovými baktériami a aktivitou Δ -9 desaturázy v mliečnej žľaze². Dhiman³ zistil, že obsah ALA v krmive zvyšoval obsah CLA v kravskom mlieku, keď obsahový pomer LA/ALA v krmive bol 1:1 alebo menší, a obsah LA v krmive zvyšoval obsah CLA v mlieku, keď obsahový pomer LA/ALA v krmive bol 5:1 alebo väčší.

Obsah CLA v mliečnom tuku môže byť modifikovaný krmivom s rozdielnym obsahom tukových prekursorov. Obsah prekursorov v krmive závisí od rastlinných druhov porastu, stupňa zrelosti rastlín, teploty a intenzity svetla⁴. Dewhurst a King⁵ zistili, že čerstvá tráva mala vyšší obsah ALA a LA ako zvednutá tráva a trávové seno. Clapham⁶ analýzou profilov mastných kyselín 13-tich rastlinných druhov počas troch oddelených zberov v trojtýždňových intervaloch za skleníkových podmienok zistili, že obsah mastných kyselín, vrátane ALA a LA, klesal so stupňom zrelosti rastlín na polovicu až tretinu obsahu. Trávy si však zachovali podobné zloženie mastných kyselín, keď obsah ALA bol v priemere 66 % a LA 13 % z celkového obsahu mastných kyselín. Dhiman⁷ zistil, že mlieko kráv pasených na poraste bez prídavku zrna alebo koncentrátov obsahovalo 500 % viac CLA ako mlieko kráv kŕmených zrnom

a koncentrátom. Tieto výsledky dokumentujú, že pasenie je najlepší prirodzený spôsob zvýšenia obsahu CLA v mlieku aj v mäse prežúvavcov. Vyšší obsah CLA v mlieku prežúvavcov kŕmených na mladom poraste sa vysvetľuje tým, že čerstvá tráva podporuje syntézu CLA zvýšenou aktivitou Δ -9 desaturázy v mliečnej žľaze a príspevkom ďalších zatiaľ neznámych faktorov⁸.

Vplyv krmiva oviec na profil mastných kyselín v mlieku počas prechodu zo zimného krmiva na pastvu aj v súvislosti s menšou dostupnosťou krmiva počas letnej sezóny sme študovali v predchádzajúcej práci⁹. Cieľom tejto práce bolo plynovou chromatografiou analyzovať zmeny zloženia mastných kyselín porastu počas pasienkovej sezóny apríl – september v meteorologicky rozdielnych rokoch 2007 a 2008, ako aj zodpovedajúce zmeny zloženia mastných kyselín v ovčom mlieku.

Materiály a metódy

Agrobotanické a rastlinné druhy pasienka počas pasienkovej sezóny apríl – september 2007 na experimentálnej farme Ústavu chovu oviec a kôz v Trenčianskej Teplej sa analyzovali metódou projektívnej dominancie¹⁰ raz mesačne s výnimkou júla. Vzorky rastlinného materiálu z piatich stanovíšť (50 × 50 cm) sa homogenizovali a stanovili sa podiely botanických skupín (trávy, bôbovité a byliny) ako aj rastlinné druhy týchto skupín. Priemerné rastlinné vzorky ako aj tri dominantné rastlinné druhy botanických skupín v jednotlivých mesiacoch pasenia sa analyzovali plynovou chromatografiou na obsah individuálnych metylesterov mastných kyselín¹¹. Štatisticky sa výsledky botanickej analýzy rastlinných vzoriek nevyhodnotili, pretože na analýzu boli dostupné iba priemerné vzorky. V roku 2008 sa mesačne vzorkovali iba priemerné vzorky pasienka. Obsah tuku v rastlinných vzorkách sa stanovil metódou Soxhlet-Henkel.

Na experimentálnej farme v Trenčianskej Teplej sa chovalo 350 mliečnych oviec troch plemien (zošľachtená valaška, cigája, lacaune) a ich kríženci. Počas pasienkovej sezóny od polovice apríla do polovice septembra sa ovce pásli na prírodnom trávnom pasienku na prikrmovali sa koncentrovaným krmivom 0,2 kg/deň počas strojového dojenia. Vzorky ovčieho mlieka na plynovo chromatografickú analýzu mastných kyselín sa odoberali dvakrát mesačne. Meteorologické podmienky, priemerná teplota vzduchu (°C) a priemerný úhrn atmosférických zrážok (mm) počas pasienkovej sezóny v Trenčianskej Teplej v roku 2007 a 2008 sú uvedené v tab. I.

Obsah mastných kyselín rastlinných a mliečnych vzoriek sa analyzoval nasledovne¹¹. Lipidy rastlinných a mliečnych vzoriek sa extrahovali zmesou chloroform-metanol (2:1), extrakty sa filtrovali cez bezvodý síran sodný a potom sušili a skladovali pri –18 °C. Na prípravu metylesterov mastných kyselín sa použil zásadou katalyzovaný metylačný postup roztokom metoxidu sodného v metanole. Plynovo chromatografické merania rastlinných a mliečnych extraktov sa uskutočnili na plynovom chro-

Tabuľka I

Priemerná denná teplota (°C) a priemerný denný úhrn zrážok (mm) počas pastevej sezóny v Trenčianskej Teplej v rokoch 2007 a 2008.

	Priemerná denná teplota [°C]		Priemerný denný úhrn zrážok [mm]	
	2007	2008	2007	2008
Apríl	11,0	10,0	0,1	1,5
Máj	16,4	14,8	3,0	1,8
Jún	18,6	19,0	3,5	2,6
Júl	19,4	19,8	2,3	3,5
August	19,4	18,3	2,5	2,6
Priemer	17,0	16,3	2,29	2,4

matografe Agilent Technologies 6890N s plameňovoionizačným a hmotnostnospektrometrickým detektorom. Metylestery mastných kyselín sa separovali v kapilárnej kolóne 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm zmočenej s DB-23 ako stacionárnou fázou, pri programovaní teploty kolóny 70–240 °C. Na separáciu a stanovenie retenčných časov plynovou chromatografiou neseparovaného tripletu izomérov CLA, vrátane izoméru *cis*-9,*trans*-11 18:2, sa použila chemometrická dekonvolúcia¹². Separované zložky sa identifikovali podľa referenčných materiálov, publikovaných plynovo chromatografických retenčných údajov a hmotnostnospektrometrických údajov. Kvantitatívne sa chromatogramy vyhodnotili metódou vnútornej normalizácie použitím publikovaných relatívnych odozvočných faktorov plameňovoionizačného detektora pre metylestery mastných kyselín¹³.

Výsledky a diskusia

Zmeny zloženia mastných kyselín v rastlinách porastu

Počas pasienkovej sezóny boli zistené významné zmeny v zložení botanických druhov ako aj rastlinných druhov. Po celú sezónu mali najvyššie zastúpenie v poraste trávy, ktorých podiel v poraste počas mesiacov apríl – august rástol z 50 % na 82 %, a v septembri klesol na 64 %. Obsah bôbovitých v poraste v období apríl – máj rástol z 20 % na 27 %, v období jún – august klesol z 18 % na 7 %, a v septembri stúpil na 25 %. Obsah bylín v poraste klesal z 30 % v apríli na 11 % v septembri. V poraste sa identifikovalo 27 rastlinných druhov. V mesiacoch apríl – máj v poraste prevládala *Bromus inermis* Leys (28–40 %), v mesiacoch jún – august *Festuca rubra* L. (42–45 %), a v septembri *Dactylis glomerata* L. (31 %). Z ďalších rastlín bola najvýznamnejšia *Trifolium repens* L., ktorej obsah 20–25 % z mája – apríla klesol do augusta na 6 %, a potom v septembri stúpil na 18 % (obsah podobný ako v apríli).

Obsah tuku v priemernej rastlinnej vzorke stúpala z 3,4 % v apríli na 3,5 % v máji, 3,8 % v júni, v auguste klesol na 3,2 %, a v septembri stúpala na 4,2 %. Obsah tuku v jednotlivých rastlinách sa so sezónou menil rozdielne, pre *Bromus inermis* Leys je charakteristický nárast obsahu tuku z 3,4 % v auguste na 4,4 % v septembri, pre *Trifolium repens* L. nárast v období apríl – jún z 3,3 % na 4,2 %, v auguste pokles na 3,3 %, a v septembri nárast na 4,1 %. Obsah tuku v *Achillea millefolium* L. rástol z 3,1 % v apríli na 5,5 % v júni, v auguste klesol na 4,2 %, a v septembri sa zvýšil na 5,2 % (obsah podobný ako v júni). U všetkých troch rastlinných druhov sa pozoroval nárast obsahu tuku z apríla do júna, potom v auguste dochádzalo k poklesu a v septembri k významnému nárastu obsahu tuku na hodnoty porovnateľné s najvyšším obsahom tuku počas celej pasienkovej sezóny.

Počas pasienkovej sezóny v Trenčianskej Teplej, pasienkový porast obsahoval štyri hlavné masné kyseliny: ALA, LA, kys. palmitovú (PA) a kys. olejovú (OA), ktorých celkový obsah v priemere bol 90 %. V priebehu pasienkovej sezóny sa obsah týchto masných kyselín a ich vzájomný pomer v priemernej vzorke porastu aj v jednotlivých rastlinách menil. Najobsažnejšia masná kyselina v priemernej rastlinnej vzorke bola ALA, ktorej obsah od mája do augusta klesol zo 62 % na 39 %, a v septembri stúpala na 60 %, teda na podobný obsah ako na začiatku sezóny v apríli. Obsah LA ako druhej najobsažnejšej kyseliny stúpala od apríla – mája zo 14 % na 20 % v auguste, a potom v septembri klesol na 17 %. Obsah PA v poraste stúpala od apríla do júna z 13 % na 19 %, potom v septembri klesol na 13 %, čiže na podobný obsah ako v apríli. Obsah OA stúpala z májových 1,3 % na 8,8 % v auguste, a v septembri klesol na 1,8 % (na obsah podobný ako na začiatku sezóny).

Podobné sezónne zmeny v obsahu masných kyselín sa zistili aj u dominantných rastlinných druhov. Tieto zmeny v obsahu masných kyselín sa najvýraznejšie prejavili pri *Trifolium repens* L., ktorá bola medzi tromi dominantnými rastlinnými druhmi porastu počas celej pasienkovej sezóny. Obsah najobsažnejšej ALA klesol zo 61 % v apríli – máji na 48 % v júni – auguste, a v septembri narástol na 63 % (obsah podobný ako na začiatku sezóny). Obsah LA narástol zo 14 % v apríli – máji na 19 % v júni – auguste, a potom v septembri klesol na 17 %. Obsah PA narástol z 12 % v apríli – máji na 18 % v júni, v auguste klesol na 14 %, a v septembri na 11 % (podobný obsah ako v apríli). Z ostatných rastlinných druhov pre *Achillea millefolium* L. obsah ALA klesol z 55 % v apríli – máji na 48 % v júni, obsah LA stúpala z 20 % v apríli – máji na 24 % v júni, a obsah PA stúpala zo 14 % v apríli – máji na 18 % v júni. Aj keď sa do porovnania vzali zmeny obsahu masných kyselín pre zostávajúce pasienkové rastlinné druhy (*Bromus inermis* Leys. a *Festuca rubra* L.) všeobecne platí, že obsah ALA v rastlinách v mesiacoch apríl – august klesol a potom v septembri narástol na obsah ako na začiatku sezóny. Obsah LA v rastlinách rástol v apríli – auguste a potom v septembri klesol. Obsah PA v rastlinách rástol v apríli – júni, a potom do septembra klesol. Obsah

OA v rastlinách rástol od apríla do augusta, potom v septembri klesol na úroveň obsahu v apríli. Teda na rozdiel od výsledkov Claphama⁶, ktorí zistili relatívne s časom sa nemeniace zloženie masných kyselín študovaných rastlín v skleníkových podmienkach, v našich pasienkových podmienkach dochádzalo k zmenám frakčného príspevku jednotlivých masných kyselín k ich celkovému obsahu.

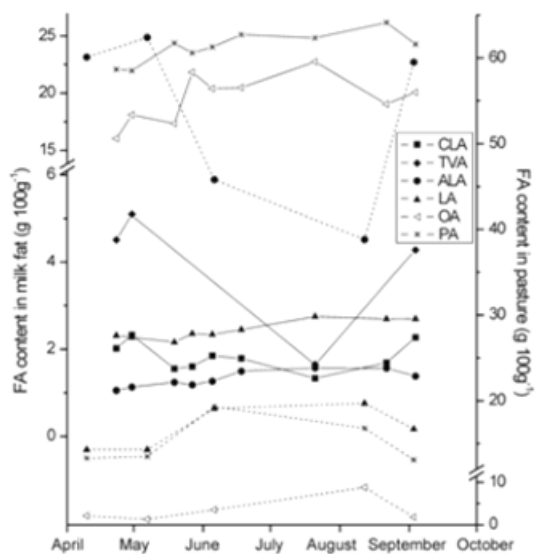
Priemerný obsah zloženia FA z troch experimentálnych miest v Trenčianskej Teplej v roku 2008 sa porovnal so zložením FA v pastve v roku 2007. Najväčšie rozdiely boli v obsahu ALA, ktorá sa počas sezóny v roku 2008 menila len minimálne (priemerný obsah 51,2 %) v porovnaní s rokom 2007, a obsah ALA v máji (57,2 %) a septembri (50,4 %) bol nižší a v júni–auguste vyšší (51,9 %) ako v roku 2007. Pokles v obsahu ALA bol sprevádzaný nárastom obsahu LA podobne ako v roku 2007.

Zmeny zloženia masných kyselín v ovčom mlieku

Zmeny zloženia najvýznamnejších masných kyselín v rastlinných vzorkách a zodpovedajúce zmeny zloženia významných masných kyselín v ovčom mlieku v priebehu pasienkovej sezóny v Trenčianskej Teplej sú znázornené na obr.1. Obsah CLA v mlieku na začiatku pasienkovej sezóny bol pomerne vysoký (2,3 %), porovnateľný s najvyššími obsahmi CLA v mlieku pasených oviec ako aj kráv¹⁴, potom klesol v júli na 1,3 % a následne narástol na 2,3 % v strede septembra, teda na obsah podobný ako na začiatku sezóny. Tieto zmeny v obsahu CLA v mlieku zodpovedajú zmenám v obsahu ALA v rastlinných vzorkách v priebehu pasienkovej sezóny, jej vysokým obsahom (60 %) v poraste na začiatku a na konci pasienkovej sezóny, ako aj nižšiemu obsahu (39 %) v auguste. Sezónny 35 % pokles v obsahu ALA v poraste zodpovedal 45 % poklesu obsahu CLA v mlieku.

Monotónny pokles obsahu CLA (aj ALA) v ovčom mlieku z 2,2 % na 1,1 % počas pasienkovej sezóny (druhá polovica februára – prvá polovica júna) publikovali Nudda¹⁵. Náš experiment ukázal po poklese v období máj – júl na opätovný nárast obsahu CLA v septembrovom mlieku na obsah CLA porovnateľný s májovým mliekom. To je v zhode so zvýšeným obsahom ALA v septembrovom pasienkovom poraste. Naše výsledky dokazujú, že z hľadiska zloženia masných kyselín ovčieho mliečného tuku, vrátane obsahu CLA, je septembrové ovčie mlieko a z neho vyrobené mliečne produkty (bryndza) podobnej kvality ako májové mlieko.

Charakteristický pokles obsahu CLA v mlieku a obsahu ALA v poraste počas letnej pasienkovej sezóny súvisel s meteorologickými podmienkami roku 2007, ktorý bol v Trenčianskej Teplej veľmi teplý a úhrny zrážok nižšie ako priemerné (tab. I). Meteorologické podmienky v r. 2008 sa v porovnaní s r. 2007 vyznačovali nižšou priemernou teplotou a vyššími úhrnmi zrážok počas pasienkovej sezóny, čo sa prejavilo aj vo vyššej priemernej relatívnej vlhkosti vzduchu (72,4 % resp. 69,7 %). Meteorologicky



Obr. 1. Zmeny v zložení mastných kyselín (FA) v pastve (prerušovaná čiara) a v ovčom mliečnom tuku (plná čiara) počas pasienkovej sezóny v Trenčianskej Teplej v roku 2007 ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)

priaznivejší rok 2008 sa v porovnaní s rokom 2007 prejavil stálejším zložením mastných kyselín porastu počas pasienkovej sezóny, vrátane vyššieho obsahového pomeru ALA/LA v letných mesiacoch (2,4 resp. 2,0) a nižšieho pomeru (3,1 resp. 4,0) v máji a septembri. Najviac sa zmenil obsah LA, ktorý bol v roku 2008 v priemere vyšší o 2,2 % (12 % rel.).

Na obr. 2 sú znázornené závislosti obsahu CLA v mlieku od obsahu ALA v poraste na pasienku v Trenčianskej Teplej na základe meraní v r. 2007 a 2008. Z obrázku je zrejmé, že závislosti obsahu CLA v mlieku od mesiaca pasienkovej sezóny pre obidva roky sú dosť podobné. Predsa však najnižší obsah CLA v mlieku (1,3 %) sa v r. 2008 zistil v júni a v roku 2007 v júli, v zhode s vyššou priemernou teplotou v júni 2008 ($19,0 \text{ }^\circ\text{C}$) ako v júni 2007 ($18,6 \text{ }^\circ\text{C}$), ako aj s nižším úhrnom atmosférických zrážok v júni v roku 2008 (2,6 mm) ako v júni roku 2007 (3,5 mm). Vyššie teploty a nižšie úhry atmosférických zrážok nepriaznivo ovplyvňujú vegetáciu pasienkového porastu a tým aj kvalitu mlieka, v dôsledku zmien v obsahu prekursorov mastných kyselín, biohydrogenačnej aktivity bachorových baktérií a pH bachora, ako aj vzhľadom na menšiu dostupnosť vegetácie a s tým súvisiace relatívne zvýšenie podielu koncentráту pridávaného pri dojení k celkovému krmovinovému príjmu oviec. V súvislosti s uplatňovaním sa týchto rozdielnych faktorov sa obsah ALA v poraste v priebehu meteorologicky priaznivejšej pasienkovej sezóny 2008 nemenil tak výrazne ako v r. 2007.

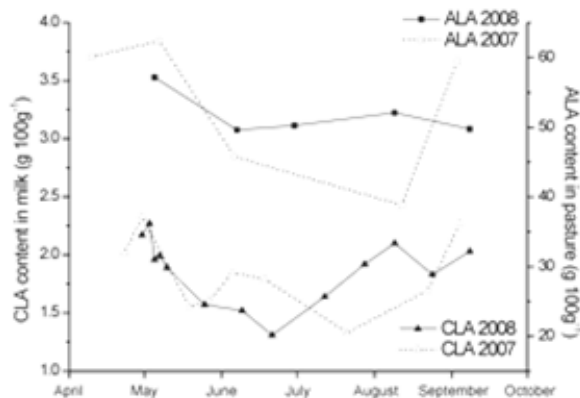
Pomer obsahu LA/ALA v poraste počas pasienkovej sezóny v Trenčianskej Teplej rástol v r. 2007 z 0,23 v máji na 0,42 v júni, na 0,51 v auguste, a v septembri klesol na

0,28 (pomer podobný ako v máji). Dhiman³ uviedli, že obsah CLA v kravskom mlieku sa zvyšoval, keď obsahový pomer kyselín LA/ALA v krmive bol $\leq 1:1$, a podobný údaj pre byvolie mlieko publikovali Tyagi¹⁶. Tieto výsledky potvrdzujú, že zistené zmeny v obsahu CLA v ovčom mlieku počas celej pasienkovej sezóny sú primárne určované obsahom ALA v poraste.

Na rozdiel od vyššie uvedenej publikácie Nuddu¹⁵, v ktorej sa uvádzal pokles ALA v ovčom mlieku počas pasienkovej sezóny z 1,1 % na 0,7 %, v tejto práci sa zistil nárast obsahu ALA v mlieku v r. 2007 z 1,1 % v máji na 1,5 % v auguste, a v r. 2008 z 1,0 % v máji na 1,7 % v auguste (obr. 1). Tento rozdiel v trendoch zmien obsahu ALA v ovčom mlieku počas pasienkovej sezóny nášho a talianskeho pasienka pravdepodobne súvisel s rozdielmi v bachorovom prostredí (type baktérií, pH), ktoré v našom prípade znižujú biohydrogenačnú aktivitu v bachore, čím sa zvyšuje obsah ALA ako zbytkového prekursora v mlieku.

Záver

Zmeny v zložení mastných kyselín rastlinných druhov počas pasienkovej sezóny v dvoch meteorologicky rozdielnych rokoch a zmeny mastných kyselín v ovčom mlieku sa analyzovali plynovou chromatografiou. Zmeny obsahu *cis*-9,*trans*-11 18:2 (CLA) v mlieku sú primárne určované obsahom kys. α -linolénovej (ALA) v pasienkovom poraste. Obsah ALA ako najobsažnejšej mastnej kyseliny v pasienkovom poraste v suchšom roku 2007 klesal z polovice mája do polovice augusta zo 62,4 % na 38,8 % ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ rastlinného tuku) a v polovici septembra sa zvýšil na obsah ako v máji. Podobne, obsah CLA v mlieku z 2,3 % ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ mliečného tuku) v máji klesol na 1,3 % v júli a následne sa zvýšil na 2,3 % v septembri. V roku 2008, ktorý bol počas pasienkovej sezóny chladnejší a vlhší, najvyšší obsah CLA sa zistil tiež v máji (2,3



Obr. 2. Zmeny v obsahu *cis*-9,*trans*-11 18:2 (CLA) v ovčom mlieku a α -linolénovej kyseliny (ALA) v pastve ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) počas pastvej sezóny v rokoch 2007 a 2008

%) a v septembri (2,0 %), avšak minimálny obsah CLA v mlieku (1,3 %) sa zistil v júni v zhode s vyššou priemernou teplotou a menšími zrážkami v porovnaní s júlom 2008. Podľa zloženia mastných kyselín ovčieho mlieka, najmä vzhľadom na obsah CLA, septembrové ovčie mlieko bolo podobnej kvality ako májové mlieko.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract Nos. APVV-0163-06, LPP-0198-06, and Grant Agency VEGA under the projects Nos. 1/0297/08 and 1/0298/08.

LITERATÚRA

1. Elgersma A., Tamminga S., Ellen G.: Anim. Feed Sci. Technol. 131, 207 (2006).
2. Collomb M., Schmid A., Sieber R., Wechsler D., Ryhänen E.L.: Int. Dairy J. 16, 1347 (2006).
3. Dhiman T.R., Satter L.D., Pariza M.W., Galli M.P., Albright K., Tolosa M.X.: J. Dairy Sci. 83, 1016 (2000).
4. Hawke J.C. in: Butler G.W., Bailey R.W. (Eds.), *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, p. 213. Academic Press, London 1973.
5. Dewhurst R.J., King P.J.: Grass Forage Sci. 53, 219 (1998).
6. Clapham W.M., Foster J.G., Neel J.P.S., Fedders J.M.: J. Agric. Food Chem. 53, 10068 (2005).
7. Dhiman T.R., Anand G.R., Satter L.D., Pariza M.W.: J. Dairy Sci. 82, 2146 (1999).

COMPARISON OF ANALYTICAL METHODS USING VARIOUS TYPES OF REGRESSION

VIERA MRÁZOVÁ^a, JÁN MOCÁK^a, JÁN BALLA^b, and ADRIANA BEDNÁROVÁ^a

^a Department of Chemistry, University of Ss. Cyril and Methodius, J. Herdu 2, 917 01 Trnava, ^b Analytical – diagnostic laboratory, Kováčska 15, 080 01 Prešov, Slovak Republic
jan.mocak@ucm.sk

Key words: regression, glycated haemoglobin, diabetes mellitus, the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), National Glycohaemoglobin Standardisation Programme (NGSP)

Introduction

A consistent statistical comparison of two quantitative laboratory methods is a frequent task performed in analytical laboratories and represents also a necessary step when a new analytical method is validated. The method comparison itself is usually made by linear regression, which uses a series of results obtained by the investigated and the reference methods, which measure the same objects. The results of the measurements made by the reference method are usually plotted on the horizontal (X) axis and those corresponding to the investigated method are plotted on the vertical (Y) axis. Then the slope of the regression dependence is tested with respect to the theoretical value 1.0, supposed by the null hypothesis of the t -test, and the same test is also applied to find whether the intercept is or is not significantly different from 0.0 (supposed by the null hypothesis). A proportional systematic error is indicated when a significant difference between the observed and theoretical slopes is found. Similarly, a significant difference between the observed and theoretical intercepts is an indication of a constant systematic error. In case of discordant results confirmed by either of the tests, it is not possible to find, just using these tests, which one of the compared methods is incorrect. Nevertheless, it is possible and useful to use these findings for harmonization of the compared methods¹.

Ordinary least-squares regression analysis (OLS) presumes that the measurements for one of the methods are without random error, i.e., the corresponding standard deviation is zero, and that the standard deviation for the other method is constant throughout the measurement range. Both assumptions are not always fulfilled. Therefore, it is reasonable to consider alternatives to ordinary least-squares regression analysis for assessment of the methods comparison.

Weighted least-squares regression analysis allows for a non-constant standard deviation for the investigated method (Y), but it is still presumed that the reference method (X) is without random measurement errors. Weights are introduced in the way that are inversely proportional to the squared standard deviation of Y measurements at a given concentration.

The Deming regression (DR) allows measurement errors for both compared methods, requiring that the ratio between their analytical standard deviations is known. The DR is primarily used when the standard deviations are constant. The deviations between the observed and regression points are considered along the line, which is not parallel to Y axis but is located at an angle determined by the ratio λ of the variances of the compared methods, $\lambda = s_X^2 / s_Y^2$. Then, as it is obvious in the least squares method, the sum of squared deviations is minimized. A weighted modification of the DR takes into account non-constant measurement errors for both methods. It still has to be presumed that the ratio between the variances or standard deviations is constant. This is true for the common situation with standard deviations proportional to concentration (constant relative standard deviations or coefficients of variation) for both methods². Orthogonal regression (OR) is a special case of DR assuming that the mentioned ratio $\lambda = 1$, which means that the effect of random errors on both variables is equal.

In addition to the above mentioned parametric alternatives (fulfilling assumptions about distribution of errors), several nonparametric versions of linear regression were established in the method comparison studies, of which the Passing–Bablok regression (PB) probably is the most widely used variant^{3–5}. PB is based on the rank principle and is claimed insensitive to outliers so that it is better in this aspect than its parametric counterparts.

Haemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) is an important marker for long-term assessment of glycemic state in patients with diabetes. Glycation is the nonenzymatic addition of a sugar residue to amino groups of proteins. Numerous proteins in the body are glycated, but glycated haemoglobin (GHb) in blood is the analyte most widely used clinically to monitor the glycemic control. The concentration of GHb is directly proportional to the mean concentration of glucose in the blood and the lifespan of erythrocytes (the mean = 120 days). Thus, the GHb concentration represents an *integrated* value for glucose over the preceding 2–3 months. GHb provides a very suitable index of glycemic control that is free of the wide diurnal glucose fluctuations and is unaffected by recent exercise or food ingestion⁶.

Non-enzymatic protein glycation plays a role in the evaluation of metabolic control, and in our understanding of the pathogenetic mechanisms of chronic complications and the relationship between metabolic equilibrium and

the development of complications in diabetes. Measurement of early glycation products has shown itself to be a precious and consolidated instrument in the metabolic monitoring of diabetic patients. The possibility of being able to monitor some intermediate and advanced glycation end-products will certainly provide important information on the pathogenesis and progression of chronic complications, and will be useful in verifying the effectiveness of anti-oxidants and glycating substances in diabetes⁷.

Most of the HbA_{1c} methods are certified for traceability to the Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) designated comparison method, which originally was a high-performance liquid chromatography (HPLC) method (Bio-Rex 70, Bio-Rad)⁸. In the US, an HPLC method was introduced as the designated comparison method for the US National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)⁹.

Since there was no internationally agreed reference method, the International Federation of Clinical Chemistry Working Group (IFCC) on HbA_{1c} Standardization developed a new reference method. In the first step haemoglobin is cleaved into peptides by the enzyme endoproteinase Glu-C, and in the second step the glycosylated and non-glycosylated *N*-terminal hexapeptides of the β -chain obtained are separated and quantified by HPLC and electrospray ionisation mass spectrometry or in a two-dimensional approach using HPLC and capillary electrophoresis with UV-detection. Both principles give identical results. HbA_{1c} is measured as the ratio between the glycosylated and non-glycosylated hexapeptides. Calibrators consisting of mixtures of highly purified HbA_{1c} and HbA₀ are used¹⁰. However, the new IFCC reference system gives measurements of HbA_{1c} between 1 and 2 % lower than used in the DCCT for persons with type 2 Diabetes Mellitus. The reason for this is the lack of specificity of the original BioRex 70 HbA_{1c} assay¹¹.

Although NGSP harmonization have improved HbA_{1c} standardization along the preceding time, now the new better IFCC program, which is scientifically superior in concept and system, has been available. It should replace the DCCT methods in the near future with consensus and agreement from all related healthcare teams and patients to take the full advantages of this new reference system¹².

Experimental

HbA_{1c} measurement

Two automatic analyzers were used, Advia and Hitachi. Chemistry Systems Bayer (Advia 1200) provides the NGSP – calibrated assay. On the other hand, Roche Diagnostic Systems (Hitachi 912) is calibrated according to the IFCC reference method. The HbA_{1c} values were determined using both methods.

The data set of 53 patient samples was used, 27 men from 27 to 82 years, and 26 women from 31 to 78 years. All patients were medically treated with respect to Diabetes Mellitus 2.

Method comparison

The method comparison study was performed by Deming regression, Passing-Bablok method, orthogonal regression, weighted Deming regression, and, just for comparison, by ordinary least squares and weighted ordinary least squares methods. Several software commercial packages were used, particularly Analyse-it¹³, ver. 2.12, MedCalc¹⁴, ver. 10.4.0.0. and JMP¹⁵, ver. 8. The variances ratio λ and its reciprocal value δ were obtained from parallel measurements.

Table I

The comparison of IFCC-derived NGSP and NGSP HbA_{1c} values according the Master Equation

Method ^a	Parameter	b_1	b_0	b_{1L}	b_{1U}	b_{0L}	b_{0U}
DR <i>Analyse-it</i>	$\lambda = 1.425$	0.932	0.211	0.899	0.965	-0.036	0.458
DR <i>MedCalc</i>	$\lambda = 1.422$	0.932	0.207	0.899	0.966	-0.041	0.456
DR <i>JMP</i>	$\delta = 0.702$	0.931	0.216	0.903	0.961	n.c.	n.c.
OR <i>JMP</i>	$\lambda = 1$	0.931	0.219	0.903	0.960	n.c.	n.c.
WDR <i>Analyse-it</i>	$\lambda = 1.303$	0.943	0.122	0.916	0.970	-0.068	0.312
PB <i>Analyse-it</i>		0.940	0.107	0.910	0.972	-0.112	0.354
PB <i>Medcalc</i>		0.940	0.100	0.910	0.973	-0.123	0.356
OLS <i>Analyse-it</i>		0.926	0.263	0.897	0.955	0.016	0.509
WLS <i>Analyse-it</i>		0.939	0.153	0.913	0.966	-0.046	0.353

^aDR – Deming regression, OR – orthogonal regression, WDR – weighted Deming regression, PB – Passing-Bablok regression, OLS – ordinary least squares, WLS – weighted least squares. $\lambda = s_X^2 / s_Y^2$, $\delta = s_Y^2 / s_X^2$. Indices *L* and *U* denote lower and upper limits of the corresponding confidence intervals, resp., both for the slope b_1 and intercept b_0 ; n.c. - not calculated by the used software.

Results and Discussion

The values of the mean and the standard deviation (SD) of HbA_{1c} determination were 8.32±1.98 % and 8.32±2.13 %, from Hitachi and Advia, respectively. The relationship between NGSP and IFCC methods is described by the following Master Equation¹⁶:

$$\text{NGSP-HbA}_{1c} = 0.9148(\text{IFCC-HbA}_{1c}) + 2.152 (\%)$$

Comparison of both methods was performed using four regression techniques, which respect the fact that neither of the methods is error-free. Moreover, several kinds of software, nowadays common for clinical chemists, were utilized in order to give a suitable overview on the regression techniques as well as the practical ways of calculations.

The comparison of the IFCC-derived NGSP values found according to the Master Equation and originally determined NGSP HbA_{1c} values shows (Table I) that the slope is significantly different from 1, whereas the intercept is not significantly different from 0 (except OLS, where is intercept significantly different from 0). It means that the using of the Master Equation adjust the difference between the two reference methods (as follows from the above Master Equation), but deflects the line so that the differences are pronounced particularly for higher HbA_{1c} values. In other words, the shift of about 2 % between the compared methods has been corrected but at the expense of non-theoretical slope, as shown e.g. on Fig. 1.

Deming regression and orthogonal regression provide almost equivalent results. Another couple of similar results provide weighted Deming regression and Passing-Bablok method, which are not too far from the previous couple of methods. Due to relatively good agreement between Passing-Bablok method and remaining three techniques it may be stated that there is no outlier in the data sets otherwise the results of the robust PB method would be significantly

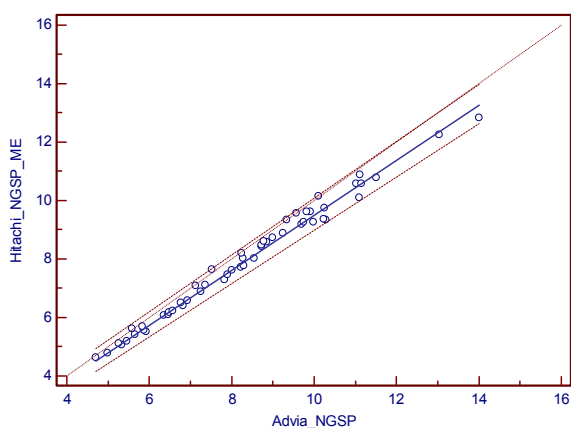


Fig. 1. Comparison of the IFCC-derived NGSP values (via Master Equation) and measured by Hitachi 912 and authentic NGSP values measured by Advia 1200 using Passing Bablok regression and MedCalc software

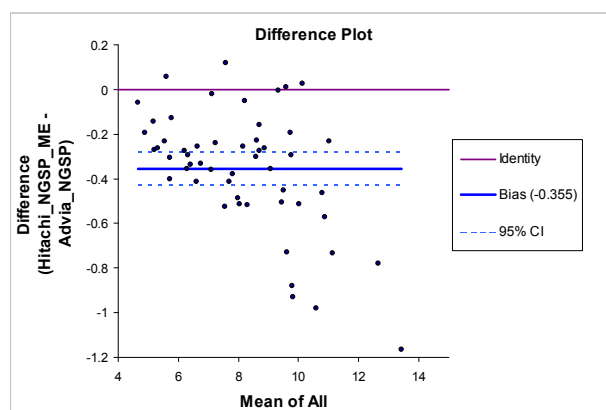


Fig. 2. Difference plot (Hitachi_NGSP_ME - Advia_NGSP) vs. the mean of both methods constructed by software Analyze-It

different. An excellent agreement between OR and DR is caused by the lambda values in DR set not too different from 1. In any case, the final result is the same for all four techniques – the confidence interval for the intercept contains zero and the confidence interval for the slope does not contain one.

In clinical chemistry, in addition to the use of regression techniques an illustrative way of comparison provides also the graphs invented by Bland and Altman¹⁷, where the differences between the compared methods are well visible. Among the used software packages, Analyze-it and MedCalc provide this possibility. At the same time they allow verify the assumption about the normal distribution of the differences. The graph is complemented also by the lines expressing the boundaries of 95 % reliability intervals. Software Analyze-it exhibits also the identity line showing the consistency of the methods. Considering the significant bias from the identity line, Fig. 2 expresses the disagreement of the compared methods. Moreover, the points not parallel to the horizontal axis indicate non constant standard deviation of the methods, which prefer the results of weighted Deming regression or Passing-Bablok regression, which is independent of the symmetry of the error distribution.

The authors wish to acknowledge and thank the project VVCE-0004-07 and VEGA projects 1/1005/09 and 1/0066/09 for support of this work.

REFERENCES

1. Mocak J., Balla B., Bobrowski A., Blazicek P.: Chem. Pap. 57, 143 (2003).
2. Linnet K.: Clin. Chem. 39, 424 (1993).
3. Passing H., Bablok W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709 (1983).
4. Passing H., Bablok W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 431 (1984).

5. Bablok W., Passing H., Bender R., Schneider B.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26, 783 (1988).
6. Sacks D. B.: *Clin. Chem.* 49, 1245 (2003).
7. Lapolla A., Traldi P., Fedele D.: *Clin. Biochem.* 38, 103 (2005).
8. Penttilä I. M., Halonen T., Punnonen K., Tiikkainen U.: *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 65, 453 (2005).
9. Manley S., John W. G., Marshall S.: *Diabetic Med.* 21, 673 (2004).
10. Jeppsson J. O., Kobold U., Barr J., Finke A., Hoelzel W., Hoshino T., Miedema K., Mosca A., Mauri P., Paroni R., Thienpont L., Umemoto M., Weykamp C.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 78 (2002).
11. Schneider H. G., Goodall I., Colman P. G., McLean M., Barker G.: *Int. Med. J.* 37, 213 (2007).
12. Paisooksantivatana K., Kongsomgan A., Leohirun L., Atamasirikul K., Kunakorn M.: *Diabetes Res. Clin. Pr.* 83, 43 (2009).
13. Hoelzel W., Weykamp C., Jeppsson J. O., Miedema K., Barr J. R., Goodall I., Hoshino T., John W. G., Kobold U., Little R., Mosca A., Mauri P., Paroni R., Susanto F., Takei I., Thienpont L., Umemoto M., Wiedmeyer H. M.: *Clin. Chem.* 50, 166 (2004).
14. Analyse-it for Microsoft Excel, ver. 2.12: <http://www.analyse-it.com>, 2010.
15. Medcalc ver. 10.4.0.0.: <http://medcalc.be>, 2010.
16. JMP 8: <http://jmp.com>, 2010.
17. Bland J. M., Altman D. G.: *Stat. Methods Med. Res.* 8, 135 (1999).

Abstract

The objective of this work is correct statistical comparison of two assay methods for determination of glycosylated haemoglobin HbA_{1c}. The immunoturbidimetric determination of HbA_{1c} was performed using automatic analyser Hitachi 912, calibrated according to the IFCC reference system (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) and analyser Advia 1200 utilizing the NGSP reference system (National Glycohaemoglobin Standardization Program). For statistical comparison of these two analytical methods several advanced regression methods were used, which respect random errors of both compared methods. Specifically, Deming regression, orthogonal regression and Passing-Bablok regression were employed. The results demonstrate the presence of proportional systematic error therefore it is concluded that the investigated analytical assay methods do not correspond to each other.

HODNOTENIE RIZIKA KONTAMINÁCIE VÔD ARZÉNOM A ANTIMÓNOM V BANSKEJ OBLASTI LUBIETOVÁ

DANIELA BOROŠOVÁ^a, IVETA NAGYOVÁ^b a ZUZANA MELICHOVÁ^b

^a Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Cesta k nemocnici, 975 56 Banská Bystrica, ^b Fakulta prírodných vied, UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica, Slovenská republika
daniela.borosova@vzbb.sk; nagyova@fpv.umb.sk; melichov@fpv.umb.sk

Úvod

Lubietová patrí medzi dôležité rudné ložiská v okolí Banskej Bystrice. Je situovaná v severovýchodnej časti Slovenského stredohoria, ktoré zahŕňa aj severnú časť neovulkanitového masívu Poľany a severnú časť Veporských vrchov. V minulosti sa v okolí Lubietovej ťažilo zlato, medené i železné rudy a malý podiel tvorili nikel-kobaltové rudy. Najvýznamnejší podiel mali však rudy medi. Dobývali sa na troch samostatných banských ložiskách: na Podlipe, v Svätodušnej doline a v menšej miere na Kolbe. Ložisko Podlipa leží pri miestnej časti Podlipa a reprezentuje územie zreteľne zmenené exploataciou medených rúd hlavne od 15. až 16. storočia do konca 19. storočia. Je to najznámejšie ložisko z tejto oblasti, s minimálne 23 štôľňami. Rudné žily, tvorené ankeritom – Ca(Fe,Mn,Mg)(CO₃)₂ a sideritom – FeCO₃, vystupujú hlavne v kyslých horninách kryštalinika a v drobkách permského veku, pre ktoré je typická zvýšená rádioaktivita. Hlavnými rudnými minerálmi sú chalkopyrit – CuFeS₂, Ag-tetraedrit – Cu₁₂Sb₄S₁₃ a pyrit – FeS₂. Ložisko sa vyznačuje aj výskytom početných vzácnych sekundárnych minerálov [libethenit – Cu₂(PO₄)(OH), brochantit – Cu₄(SO₄)(OH)₆, langit – Cu₄(OH)₆(SO₄) · 2H₂O, malachit – Cu₂(CO₃)(OH)₂, azurit – Cu₃(CO₃)₂(OH)₂, atď.]. V súčasnosti na Podlipe sa nachádza iba haldové pole zaujímavé raritnými sekundárnymi minerálmi pre zberateľov minerálov. Druhé najväčšie ložisko v tomto banskom revíri je v Svätodušnej doline. Nachádza sa približne 5 km východne od Lubietovej, v doline Peklo, v juhozápadnom chrbte vrchu Kolba. Hlavným rudným minerálom bol chalkopyrit, tetraedrit, hojnejšie je tu zastúpenie Fe minerálov ankeritu a sideritu. Súčasnosť ložiska prezentuje iba haldový materiál. Na ložisku Svätodušná dolina prevláda arzén, ktorý reprezentujú nasledujúce sekundárne minerály: euchroit, olivenit, klinoklas, strašimirit, parnauit, cornubit, tirolit, lirokunit a chalkofylit.

Skúmané depónia nie sú prvkovo stabilné a prebiehajú v nich abiotické aj biogénne procesy. Pokles pH v technogénnych sedimentoch spôsobuje uvoľnenie ťažkých kovov (predovšetkým Cu, Fe, Cd, As, Sb, Pb, Zn, Mn, Ni, Co) z tuhej fázy, kde sa tieto nachádzajú vo forme ťažšie roz-

pustných minerálov alebo v sorpčnom komplexe, do podzemnej a povrchovej vody. Odolnosť krajinných zložiek voči kontaminácii ťažkými kovmi je významne podmienená rôznymi prírodnými sorbentmi. Najdôležitejšími potenciálnymi prírodnými sorbentmi v sledovanej oblasti je skupina ílových minerálov a hydrogoethit, ktoré vznikajú pri zvetrávaní hornín. V oblasti haldových polí sme identifikovali rtg-difrakčnou analýzou hlavne illit, muskovit a smektit, menej kaolinit a chlority¹.

Ílové minerály, kryštalické hlinítokremičitany s vrstevnatou štruktúrou, sú väčšinou nositeľmi stálych negatívnych povrchových nábojov², ktoré môžu sorbovať kationy Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, Al³⁺, Mn²⁺ a kationy ťažkých kovov alebo môžu byť nahradené inými³. Hydrogoethit – FeOOH · H₂O vzniká v hypergénnych podmienkach oxidáciou železo obsahujúcich rúd a niektorých mafických horninových minerálov. Hydroxid železitý, ktorý vzniká pri hydrolyze síranu železitého je hydrosol, ktorý ľahko koaguluje. Vylúči sa z neho gél, ktorý sa čiastočne dehydratuje a vzniká z neho monohydrát. Hydrogoethit má záporný povrchový náboj a vyznačuje sa veľkým sorpčným povrchom, čo ho predurčuje k tomu, aby sa stal vynikajúcim prírodným sorbentom ťažkých kovov. Mobilita väčšiny ťažkých kovov v prírode je determinovaná predovšetkým ich schopnosťou sorpcie na prírodné sorbenty, medzi ktorými majú dominantné postavenie predovšetkým ílové minerály⁴. Pri ílových mineráloch je dominantným procesom iónová výmena medzi roztokom a tuhou fázou, ale čiastočne aj fyzikálny proces adsorpcie².

Z hľadiska environmentálneho rizika sú v študovanej lokalite najdôležitejšími ťažkými kovmi Cu, As a Sb⁵. Hlavným zdrojom medi na haldovom poli sú tetraedrit, chalkopyrit a sekundárne minerály medi. Hlavným zdrojom As v lokalite Lubietová je tetraedrit. Pri zvetrávaní sa arzénové rudné minerály ľahko oxidujú, pričom arzén prechádza z foriem s nižším oxidačným číslom na As(V), pričom tvorí zlúčeniny kyseliny arzeničnej⁶. Táto je rozpustná vo vode, ale obvykle nemigruje na väčšie vzdialenosti, pretože rýchlo reaguje s kationmi ťažkých kovov za vzniku arzeničnanov. As vo vode vystupuje najčastejšie vo forme H₂AsO₄⁻, HAsO₄²⁻ a HAsO₂ (cit.⁷). As(III) je v oxidačnej zóne zvetrávania mobilnejší ako As(V)⁸. V hypergénnych podmienkach haldového poľa Lubietová výrazne prevláda As(V)⁵. Sorpčná kapacita ílových minerálov, hydrogoethitu a Fe-oxihydroxidov voči As je veľmi vysoká (napr. až 76 mg As na 1g Fe-oxihydroxidu pri pH 5). Sorpcia As závisí od pH, času, koncentrácie As v roztoku a teploty⁹. K najintenzívnejšej sorpcii dochádza pri pH 4^{10,11}. Podľa Mohapatra et al.⁹ je spomedzi ílových minerálov prítomných na haldovom poli Lubietová – Podlipa najlepším sorbentom As(V) kaolinit. 25 až 35-násobne lepšie sorpčné vlastnosti vykazujú halloyzit a chlority. Menej toxický As (V) sa voči toxickejšiemu As(III) sorbuje na ílové minerály omnoho ľahšie a kvantitatívnejšie. As(III) sa pri tomto pro-

cese oxiduje na As(V). Redukčný proces sa pri štúdiu sorpcie As nepotvrdil⁶. Väčšina Sb pochádza z tetraedritu. Sb(III) aj Sb(V) existujú v environmentálnych podmienkach v nasledovných formách: Sb(V) ako $[Sb(OH)_6]^-$ a Sb(III) ako $Sb(OH)_3$ ¹². Hydrogoethit a Fe-hydroxidy sú dôležitými sorbentmi Sb. Sb(III) i Sb(V) vytvárajú na ich povrchu komplexné zlúčeniny. Sb(III) sa najlepšie sorbuje pri pH 3 až 12, kým k maximálnej sorpcii Sb(V) dochádza pri pH < 7. Na povrchu hydrogoethitu a Fe-hydroxidov môže hlavne v rozmedzí pH 3 až 5,9 v priebehu niekoľkých dní dochádzať k oxidácii Sb(III). Pri pH ~ 9 dochádza k jeho mobilizácii a uvoľňovaniu do roztoku, kým pri pH < 7 ostáva viazaný na povrchu Fe-oxidov¹³.

Arzén a antimón sú známe svojimi toxickými účinkami na ľudský organizmus, pri akútnej aj chronickej expozícii. As má schopnosť kumulovať sa v riečnych sedimentoch, patrí medzi tzv. inhibítory biochemických oxidácií a sú preukázané aj jeho karcinogénne účinky¹⁴. Hlavným zdrojom príjmu týchto prvkov pre človeka je pitná voda. Preto je prítomnosť arzénu a antimónu vo vode nežiaduca. Na odstraňovanie arzénu z vody sa používajú procesy založené na reverznej osmóze¹⁵, adsorpcii na sorbentoch^{16–18}, iónovej výmene¹⁹ a pod. Analýza arzénu a antimónu ako aj ich špeciácia sa vykonáva metódou AAS, a to predovšetkým prietokovou injekčnou analýzou generovaním hydridov (HG FI AAS). Prehľad prác venovaných stanoveniu arzénu a antimónu ako aj ich špeciácie bol publikovaný v nedávnej dobe^{20,21}.

Cieľom práce je, na základe dlhodobého výskumu v sledovanej oblasti, zhodnotiť riziká kontaminácie povrchových a podzemných vôd arzénom a antimónom, pochádzajúce zo zvetrávania haldového materiálu ako pozostatku mohutnej banskej činnosti. Ďalším cieľom práce bolo porovnať získané výsledky s výsledkami získanými skríningovými analýzami publikovanými v nedávnej dobe, ktoré upozornili na zvýšené koncentrácie týchto prvkov vo vodách²². Dôležitosť výskumu vyplýva z dôvodu využívania, povrchovej vody z Hutného potoka na závlahy a podzemnej vody ako pitnej vody, obyvateľmi obce Ľubietová aj napriek tomu, že nepodliehajú pravidelnej kontrole kvality vody určenej na ľudskú spotrebu orgánmi štátnej správy v zmysle platných predpisov²³.

Experimentálna časť

Odbery vzoriek vody, v sledovanom období od 31.3.2008 do 6.10.2009 boli vykonané podľa STN EN ISO 5667 (cit.²⁴). Vzorky vody L1–L7 z haldového poľa Ľubietová-Podlipa (L1 je minerálna voda Linhartovka), L11–L15 z haldového poľa Svätodušná dolina, boli odobierané v označených miestach podľa obr. 1. Odobraté boli aj vzorky pitnej vody (pramenitá podpovrchová voda) LP1–LP4 a povrchovej vody L8, používanej na závlahy, zo zdrojov nachádzajúcich sa priamo v obci Ľubietová.



Obr. 1. Odberové miesta - haldové polia Ľubietová Podlipa a Svätodušná dolina; L1 – minerálna voda Linhartovka (reg. č. BB-52), L2 – vzorka povrchovej vody z Hutného potoka nad obcou Ľubietová – na konci obce pri prameni minerálnej vody Linhartovka, L3 – vzorka drenážnej vody z „retenčnej nádrže“ pod haldovým poľom Podlipa, L4 – vzorka drenážnej vody z malého jazierka v depresii pod haldovým poľom Podlipa, L5 – vzorka vody z potoka severovýchodne od severného okraja haldového poľa Podlipa – referenčná lokalita, L6 – vzorka povrchovej vody z Hutného potoka po pripojení potoka drenujúceho Zelenú dolinu pod haldovým poľom Podlipa, L7 – vzorka povrchovej vody z Hutného potoka pod obcou Ľubietová a pod Galvanizovňou KNK, L11 – vzorka povrchovej vody z potoka nad brodom na lokalite Svätodušná dolina, L12 – vzorka povrchovej vody z potoka v lokalite Svätodušná dolina pod haldou Svätodušná, L13 – vzorka drenážnej vody zo štólne pod haldou Svätodušná, L14 – vzorka povrchovej vody z potoka v blízkosti štólne na lokalite Svätodušná, pred výtokom drenážnej vody L15, L15 – vzorka drenážnej vody zo štólne na lokalite Svätodušná

Predúprava vzorky vody pre následné stanovenie kovov sa vykonala podľa normy STN EN ISO 5667 (cit.²⁴). Konzervovala sa prídavkom koncentrovanej kyseliny dusičnej na hodnotu pH < 2.

Pracovný postup stanovenia As, Sb metódou HG FI AAS

Pre-redukcia As(V) na As(III), Sb(V) na Sb(III). K 20 ml vzorky alebo štandardu sa pridalo 2,4 ml konc. HCl a 3 ml roztoku 5% (w/v) KI a 5% (w/v) kyseliny askorbovej. Po 16 hodinovom státi pri laboratórnej teplote sa vykonalo meranie.

Obsah arzénu a antimónu vo vzorkách vôd bol meraný technikou tvorby hydridov AAS na prístroji PERKIN ELMER 4100ZL v prietokovom systéme Flow Injection Analyser 100. Na tvorbu hydridov bol použitý tetrahydridoboritan sodný v kyslom prostredí, ktorý bol unášaný prúdom argónu do kremennej cely, kde pri teplote 900 °C nastala atomizácia a bola meraná absorbanca žiarenia pri vlnovej dĺžke 193,7 nm pre As a 217,6 nm pre Sb. Ako zdroj žiarenia bola použitá bezelektrodová lampička As, Sb,

merací mód integrovaná absorbcia. Podmienky HG-FI-AAS sú uvedené v tab. I.

Chemikálie

Štandardné roztoky As, Sb s obsahom 1,000 g /l príslušného analytu (SMU Bratislava).

Redukčné činidlo: 0,2 % NaBH₄ v 0,05 % NaOH, (p.a., MERCK)

Nosný roztok: 10 % (v/v) HCl (Suprapur, MERCK)

Preredukcia: HCl konc., 5 % (m/v) KI (p.a., MIKRO-CHEM) + 5 % (m/v) kyselina askorbová (p.a., MERCK)

Tabuľka I

Podmienky merania HG-FI-AAS

Vodiaci roztok	10 % (v/v) HCl
Prietoková rýchlosť	9 ml min ⁻¹
Redukčný roztok	0,2 % NaBH ₄ v 0,05 % NaOH
Prietoková rýchlosť	5 ml min ⁻¹

Na určenie neistoty bol použitý výpočet štandardnej odchýlky reprodukovateľnosti s_R (RSDR) podľa Horwitzovej funkcie. Horwitzova funkcia vyjadruje empirický vzťah medzi presnosťou metódy a koncentráciou analytu bez ohľadu na druh analytu, matrice a metódy. Pre analytické metódy jednoduché, bez úpravy vzorky stačí používať 1/3 príp. 1/4 vypočítanej hodnoty, pre jednoduché, s jednoduchou úpravou vzorky, používať 1/2 vypočítanej hodnoty, pre viacstupňové používať 2/3 vypočítanej hodnoty.

Horwitzovu rovnicu²⁵ vyjadruje vzťah:

$$s_R = \frac{2^{(1-0,5 \cdot \log(X'))} \cdot X}{100}$$

kde X' je koncentrácia analytu v jednotkách, na ktoré sa vzťahuje množstvo analytu (napr.: 1 mg/kg = 0,000001 kg/kg); X je koncentrácia analytu uvádzaná v použitých jednotkách.

Medza detekcie a kvantifikácie boli vypočítané metódou hornej hranice jednostranného pásu spoľahlivosti kalibračnej priamky (ULA), novšie odporúčanou IUPAC²⁶. Výpočet je založený na presnosti kalibračnej priamky a využíva reziduálnu štandardnú odchýlku lineárnej regrese a kritickú hodnotu t -rozdelenia. Správnosť je uvedená ako relatívna chyba (v %) vyjadrená rozdielom medzi priemernou hodnotou získanou z veľkého počtu opakovaných výsledkov stanovení a prijatou referenčnou hodnotou, podeleným referenčnou hodnotou. Zhodnosť je uvedená ako relatívna smerodajná odchýlka (v %). Metrologické vlastnosti použitých metód sú zhrnuté v tab. II.

Tabuľka II

Metrologické vlastnosti metód

Vlastnosti	As	Sb
Medza detekcie, mg l ⁻¹	0,0002	0,0001
Medza kvantifikácie, mg l ⁻¹	0,0005	0,0004
Správnosť, %	3,5	3,2
Zhodnosť, %	9,5	9,7
Rozsah, mg l ⁻¹	(0,001–0,100)	(0,0004–0,050)
Neistota, mg l ⁻¹	(0,0002–0,006)	(0,0004–0,006)

Výsledky a diskusia

Hodnotenie kvality povrchových, pitných vôd a minerálnej vody Linhartovka (reg. č. BB-52) zo sledovaných odberových miest bolo uskutočnené v zmysle platných noratívov, ako sú uvedené v tab. III s príslušnými limitmi pre sledované ukazovatele As a Sb.

Podľa Nariadenie vlády SR 354/2006 (cit.²³) je definovaný pojem najvyššia medzná hodnota zdravotne významného ukazovateľa (NMH) kvality pitnej vody, ktorej prekročenie vylučuje použitie vody ako pitnej.

Pre povrchovú vodu je určený limit odporúčanej hodnoty sledovaného ukazovateľa a medzná hodnota²⁷.

Podľa Výnosu Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR²⁸ je prírodná minerálna voda druh kvalitnej, mikrobiologicky bezchybnej vody pôvodného zloženia a čistoty, získanej zo zdroja podzemnej vody vyhláseného podľa osobitného predpisu, ktorá je v pôvodnom stave alebo po povolennej úprave vzhľadom na svoje zloženie, priaznivo pôsobí na ľudský organizmus a je v primeranom množstve vhodná ako nápoj. Podľa tohto Výnosu je definovaný pojem najvyššia medzná hodnota ukazovateľa zdravotnej neškodnosti (NMH) ako hodnota tohto ukazovateľa, ktorej presiahnutie vylučuje uvádzanie vody do obehu.

Analýzy vzoriek vody z lokalít Podlipa a Svätodušná dolina sa vykonali 10x v období 2 rokov – od 31. marca 2008 do 6. októbra 2009 tak, aby boli zahrnuté všetky sezónne vplyvy. Výsledky analýz sú uvedené v tab. IV a V.

V tab. VI sú uvedené hodnoty arzénu vzoriek vôd zo zdrojov nachádzajúcich sa priamo v obci Lúbietová, ktoré obyvatelia používajú ako pitné vody (pramenitá podpovrchová voda) LP1–LP4. Tieto zdroje však nepodliehajú pravidelnej kontrole podľa platných noratívov²³, nakoľko celá obec Lúbietová má zabezpečené zásobovanie pitnou vodou verejným vodovodom, a tá je pravidelne monitorovaná²³.

V 3 vzorkách z lokality Svätodušná dolina bola uskutočnená špeciálna analýza v skúšobnom laboratóriu GEL, Turčianske Teplice za účelom zistenia podielu As(III) a As

Tabuľka III
Prehľad normatívo platných v SR

	Jednotka	Druh limitu	As	Sb
Nariadenie vlády SR 354/2006 ²³ Požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu vody určenej na ľudskú spotrebu.	[mg l ⁻¹]	NMH	0,010	0,005
Nariadenie vlády 296/2005 ²⁷ Kvalitatívne ciele povrchových vôd a limitné hodnoty ukazovateľov znečistenia odpadových vôd a osobitných vôd	[µg l ⁻¹]	OH	30	Nie je definovaný
Na závlahy	[µg l ⁻¹]		50	Nie je definovaný
Vhodné pre život a reprodukciu pôvodných druhov rýb			Nie je definovaný	Nie je definovaný
Na odber pre pitnú vodu	[µg l ⁻¹]	OH-MH	10 – 10/ kat. A1 20 – 50/ kat. A2 50 – 100/ kat. A3	Nie je definovaný
Vyhláška MPSR a MZ SR 608/9/2004 – 100 ²⁸ Hlava Potravinového kódexu SR upravujúca prírodnú minerálnu vodu, pramenitú vodu a balenú pitnú vodu	[mg l ⁻¹]	NMH	0,010	0,005
Minerálna voda				
Pramenitá voda a príprava stravy pre dojčatá	[mg l ⁻¹]	NMH	0,005	0,003

OH – odporúčaná hodnota, MH – medzná hodnota, NMH – najvyššia medzná hodnota

Tabuľka IV
Namerané hodnoty koncentrácií As

Dátum odberu	Arzén [mg l ⁻¹]									
	31.3.2008	29.4.2008	9.6.2008	21.8.2008	9.10.2008	2.12.2008	25.3.2009	6.5.2009	9.6.2009	
L1	Podlipa	0,0020	0,0017	0,0014	0,0017	0,0015	–	–	–	0,0015
L2		ND	ND	0,0012	0,0013	0,0011	0,001	0,0011	0,0012	0,0011
L3		0,0014	ND	0,0011	0,0010	ND	0,0017	0,0015	0,0017	0,0016
L4		0,0020	0,0015	0,0038	0,0018	0,0011	0,0024	0,0028	0,0020	0,0024
L5		ND	ND	0,0013	0,0014	ND	ND	ND	0,0012	0,0013
L6		0,0011	ND	0,0018	0,0019	0,0016	0,0012	0,0013	0,0016	0,0017
L7		0,0012	0,0010	0,0021	0,0020	0,0017	0,0012	0,0012	0,0017	0,0019
L11	Svätodušná	–	–	0,0032	0,0023	0,0026	0,0017	–	0,0019	0,0022
L12		–	–	0,0307	0,0350	0,0385	0,0389	–	0,0474	0,0499
L13		–	–	0,0252	0,0410	0,0374	0,0371	–	0,0739	0,0539
L14		–	–	0,1082	0,0310	0,0336	0,0319	–	0,0440	0,0404
L15		–	–	0,0368	0,0595	–	–	–	0,0770	0,0014

Tabuľka V
Namerané hodnoty koncentrácií Sb

Dátum odberu	Antimón [mg l^{-1}]								
	31.3.2008	29.4.2008	9.6.2008	21.8.2008	9.10.2008	2.12.2008	25.3.2009	6.5.2009	9.6.2009
L1	ND	0,0009	ND	ND	0,0001	–	–	–	ND
L2	0,0007	0,0010	0,0006	ND	ND	ND	ND	0,0006	0,0009
L3	0,0018	0,0028	0,0027	0,0021	0,0022	0,0015	0,0015	0,0027	0,0022
L4	0,0018	0,0024	0,0026	0,0021	0,0025	0,0019	0,0016	0,0021	0,0024
L5	0,0010	0,0017	0,0018	0,0010	0,0013	0,0009	0,0010	0,0018	0,0021
L6	0,0007	0,0011	0,0008	0,0007	0,0007	0,0007	0,0006	0,0008	0,0008
L7	0,0008	0,0012	0,0011	0,0009	0,0009	0,0008	0,0007	0,0011	0,0012
L11	–	–	0,0006	ND	ND	ND	ND	ND	0,0006
L12	–	–	0,0051	0,0063	0,0076	0,0066	0,0090	0,0085	0,0051
L13	–	–	0,0052	0,0065	0,0057	0,0051	0,0091	0,0066	0,0052
L14	–	–	0,0022	0,0047	0,0067	0,0064	0,0086	0,0069	0,0022
L15	–	–	0,0075	0,0009	–	–	ND	ND	0,0075

ND – nezistené použitou metódou

Tabuľka VI
Namerané hodnoty As pre pitné vody LP1-LP4

Dátum odberu 6.10.2009	As [mg l^{-1}]
LP1	0,0015
LP2	<0,001
LP3	0,0022
LP4	<0,001

(V). Na analýzu špecii arzénu bola použitá hydridová technika AAS na prístroji VARIAN. Zastúpenie As(III) a As(V) bolo nájdené v pomere cca 1:5 a je uvedené v tab. VII. Nájdené hodnoty celkového arzénu boli porovnateľné v oboch laboratóriách.

Obsahy As a Sb vo vzorkách pitných vôd neprekročili najvyššie medzné hodnoty podľa NV SR 354/2006 (cit.²³). Obsahy As a Sb v minerálnej vode Linhartovka

počas sledovaného obdobia neprekročovali najvyššie medzné hodnoty podľa Výnosu MP SR a MZ SR 608/9/2004 – 100 o minerálnych vodách²⁸. Povrchová voda v oblasti Podlipa vyhovovala požiadavkám odporúčaných hodnôt pre As a Sb v zmysle NV vlády 296/2005 (cit.²⁷). Povrchová voda v oblasti Svätodušná L12 a L14 prekročovala odporúčané hodnoty 0,030 mg l^{-1} pre obsah As v zmysle NV vlády 296/2005 počas celého sledovaného obdobia. Povrchové vody L13 a L15 prekročovali odporúčané hodnoty 0,030 mg l^{-1} pre obsah As v zmysle NV 296/2005 (cit.²⁷) a v jarných mesiacoch 2009 prekročovali aj odporúčané hodnoty 0,050 mg l^{-1} As pre závlahovú vodu, rovnako, jednorázovo 9.6.2008, túto hodnotu prekročila aj vzorka L14 (0,108 mg l^{-1}). Obsahy Sb podľa príslušných normatívnych predpisov neboli prekročené.

Tabuľka VII
Špeciačná analýza As

	As [mg l^{-1}]RÚVZ	As [mg l^{-1}]GEL Tur. Teplice	As(III) [mg l^{-1}] [%]	As(V) [mg l^{-1}] [%]
L12	0,0499	0,0430	0,0082 (19,1)	0,0350 (81,4)
L13	0,0539	0,0460	0,0085 (18,5)	0,0380 (82,6)
L14	0,0404	0,0340	0,0063 (18,5)	0,0280 (82,4)

Záver

Hodnotenie rizík kontaminácie podzemných a povrchových vôd arzénom a antimónom v oblasti Ľubietová, zaťaženej banskou činnosťou, vykonané na základe dlhodobého sledovania obsahu týchto kovov vo vodách, v tejto štúdii je v dobrej zhode s predchádzajúcimi výsledkami, získanými autormi v rokoch 2006 až 2008 (cit.²²). Koncentrácie arzénu dosahovali maximálne hodnoty v drenážnych vodách – výtokoch zo štôlní na haldovom poli Svätodušná dolina (0,0615 mg l⁻¹). Koncentrácie antimónu v celej sledovanej oblasti neprekročili maximálnu hodnotu 0,0051 mg l⁻¹, ktorá opäť bola nameraná vo výtokových vodách zo štôlní na haldovom poli Svätodušná dolina.

Nízke koncentrácie sledovaných prvkov vo vode v Hutnom potoku, ktorú obyvatelia používajú na zavlažovanie ako aj v minerálnej vode Lihartovke a ďalších podzemných vodách v obci používaných na pitie, svedčia o tom, že ílové minerály ako prirodzené sorbenty v danej oblasti sorbujú väčšinu ťažkých kovov a dokázaná bola aj prítomnosť ich voľnej sorpčnej kapacity. Ťažké kovy sa tu nachádzajú vo forme ťažko rozpustných sulfidov, ku oxidácii ktorých dochádza pozvoľna. Podľa EPA metód bolo zistené minimálne riziko tvorby kyslých banských vôd, ktoré by mohli ťažké kovy uvoľňovať do vodného prostredia. Ťažké kovy sa nachádzajú aj v sedimentoch, sú unášané do vzdialenejších miest, kde môže pri náhlom prekyslení v dôsledku priemyselnej výroby dochádzať k uvoľneniu do vodného prostredia.

Možno však konštatovať, že už samotný fakt výskytu vysokých hodnôt koncentrácie arzénu vo výtokových vodách zo štôlní v oblasti haldového poľa Svätodušná dolina, vyžaduje v lokalite pravidelný monitoring, predovšetkým kôli jeho toxicite a karcinogenite, ktorý sa doteraz cielene nevykonával.

Práca vznikla za podpory vedeckej grantovej agentúry MŠ SR a SAV v rámci riešenia projektu VEGA-1/0789/08.

LITERATÚRA

- Andráš P., Nagyová I., Melichová Z.: Chem. Listy 101, 100 (2007).
- Kozáč J.: Mineralia Slovaca - Geovestník 28, 5 (1969).
- Čurlík J.: *Pôdna reakcia a jej úprava*. Jaroslav Suchoň Publ., Bratislava 2003.
- Missana T., Garcia-Gutierrez M., Alonso U.: Phys. Chem. Earth 33, 156 (2008).
- Andráš P., Lichý A., Rusková J., Matúšková L.: Proc. World Acad. Sci., Engineering and Technology, Venice, 29.-31. October 2008, 34, s. 97. Venice Waset 2008.
- Lin Z., Puls R. V.: Environ. Geol. 39, 753 (2000).
- Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie prvků*. Informatorium, Praha 1993.
- Manning B. A., Goldberg S.: Environ. Sci. Technol. 31, 2005 (1997).
- Mohapatra D., Mishra D., Chaudhury G. R., Das R. P.: Korean J. Chem. Eng. 24, 256 (2007).
- García-Sánchez A., Alvarez-Ayuso E., Rodríguez-Martin F.: Clay Miner. 37, 187 (2002)
- Lombi E., Wenzel W. W., Sletten R. S.: J. Plant Nutr. Soil Sci. 162, 451 (2000).
- Filella M., Belzile N., Chen Y. W.: Earth Sci. Rev. 59, 265 (2002).
- Leus A. K., Mönch H., Johnson C. A.: Environ. Sci. Technol. 40, 7277 (2006).
- Styblo M. et al.: *Metabolism and Toxicity of Arsenicals in Cultured Cells*, In: *Arsenic Exposure and Health Effects*. s. 311. Elsevier, Amsterdam (1999).
- Nyng Y.R.: Desalination 3, 237 (2002).
- Chen W. et al.: Water Res. 9 1851 (2007).
- Vaughan L.R., Reed E.B.: Water Res. 6 1005 (2005).
- Elizalde-González M.P. et al.: Chem. Eng. J. 1-3, 187 (2001).
- Vaaramaa K., Letho J.: Desalination 2, 157 (2003).
- Hagarová I., et al.: Chem. Listy 100, 901 (2006).
- Farkašová I., Závadská M., Žemberyová M.: Chem. Listy 93, 173 (1999).
- Rusková, J., Andráš, P., Lichý, A., Matúšková, L. 2009: Kontaminácia vody v oblasti Ľubietovských Cu - baní. *Seminár Geochemia 2009*. (Jurkovič, Ľ., Slaninka, I., Ďurža, O., ed.), SAGCH, Katedra geochemie PRIF UK, Odd. geochemie ŽP ŠGÚ D. Štúra, Bratislava, 99-101.
- Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 354/2006, ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu., Zbierka zákonov 2006, čiastka 124, str. 2524.
- STN EN ISO 5667-3. Kvalita vody. Odber vzoriek, SÚTN, Bratislava, 2005.
- Horwitz, W.: Anal. Chem. 54., 67 (1982).
- Mocak, J., Bond, A. M., Mitchell, S., Schollary, G.: Pure & Appl. Chem. 69, 297 (1997).
- Nariadenie vlády Slovenskej republiky, č. 296/2005, ktorým sa ustanovujú kvalitatívne ciele povrchových vôd a limitné hodnoty ukazovateľov znečistenia odpadových vôd a osobitných vôd, Zbierka zákonov 2005, čiastka 127, str. 2928.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 15. marca 2004 č. 608/9/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca prírodnú minerálnu vodu, pramenitú vodu a balenú pitnú vodu.

D. Borošová^a, I. Nagyová^b, and Z. Melichová^b
(^a*Regional Authority of Public Health, Banská Bystrica,*
^b*Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences,*
Matej Bel University, Banská Bystrica): **Evaluation of Risk of Arsenic and Antimony Surface and Groundwater Contamination at Ľubietová Mining Region**

The environmental study at the Ľubietová Podlipa and Svätodušná valley dump-fields presents the results of the As and Sb contamination of the surface and groundwater reached during the period of March 2008 – October 2009. The results show, that the present natural sorbents, predomi-

nantly the clay minerals (illite, muscovite, smectite, caolinite and chlorite) and hydrogoethites are good sorbents of heavy metals and was proved also their free sorption capacity. Natural sorbents form such natural geochemical barrier. The highest concentrations of As and Sb was measured at Svätodušná valley dump-field and are in good agreement with results published previously. However formation of acid mine drainage (AMD) according the calculation and so releasing the large amounts of As and Sb into the water is less probable at the Ľubietová locality, because of toxic and carcinogenic properties of these elements, their regular monitoring is required.

DETERMINATION OF RESVERATROL IN COMMON BUCKWHEAT AND TARTARY BUCKWHEAT USING HPLC-ED WITH A CARBON PASTE ELECTRODE

**LENKA NĚMCOVÁ, JIŘÍ ZIMA,
and JIŘÍ BAREK**

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague, Czech Republic
nemcova.len@seznam.cz, zima@natur.cuni.cz,
barek@natur.cuni.cz

Keywords: *Trans*-resveratrol; Common buckwheat; Tartary buckwheat; HPLC, Electrochemical detection; Carbon paste electrode.

Introduction

Extensive research has revealed that most chronic illnesses such as cancer, cardiovascular and pulmonary diseases, neurological diseases, diabetes, and autoimmune diseases exhibit dysregulation of multiple cell signaling pathways that have been linked to inflammation. Thus mono-targeted therapies developed for the last two decades for these diseases have proven to be unsafe, ineffective and expensive. Although fruits, vegetables and herbs are regarded to have therapeutic potential against chronic illnesses, neither their active component nor the mechanism of action is well understood¹. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenolic phytoalexin produced by plants in response to exogenous stimuli like UV light, ozone exposition, mechanical damage or fungal infection². Resveratrol exists in two isomeric forms *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol (Fig. 1). The *trans*-isomer is the more stable form, *trans* to *cis* isomerisation is facilitated by UV light and high pH, the *cis* to *trans* conversion is facilitated by visible light, high temperature, or low pH^{3,4}. Both isomers can be present in variable amounts in plants, but amount of *trans*-resveratrol usually predominates⁵. Resveratrol was first detected in the roots of white hellebore (*Veratrum grandiflorum*) in 1940⁶. It can be found in more than 72 plants, which are often components of a human diet⁷, for example in wine grapes⁸, also in red (in concentrations 1–6 mg l⁻¹)^{9,10} and less in white (0,2–0,8 mg l⁻¹)¹¹ wine, peanuts¹², cabbage, beetroot, broccoli¹³, blueberries, cranberries¹⁴.

The remarkable interest in resveratrol noticed over the past decade, is mainly due to its antiinflammation, antioxidation, neuroprotective, antiaging properties, inhibition of platelet aggregation, chemoprevention of cancer and protection of coronary heart diseases^{15–18}. Quantitative determination of *trans*-resveratrol is mainly done by

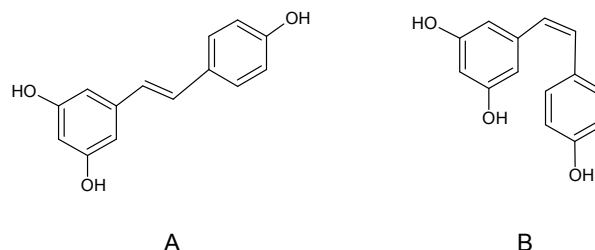


Fig. 1. Structure of *trans*-resveratrol (A) and *cis*-resveratrol (B)

HPLC with UV/VIS^{19,20}, MS^{21,22} and electrochemical detection^{13,23}, by GC/MS^{24,25} or electrophoresis^{26,27}. For electrochemical detection, glassy carbon electrodes were used as working electrode at the potential of +0.75 V (ref.¹³) and +0.5 V (ref.²³), obtained limits of detection were 8 µg l⁻¹ (3.5·10⁻⁸ mol l⁻¹)¹³ and 10 µg l⁻¹ (4.4·10⁻⁸ mol l⁻¹)²³.

Resveratrol was identified in buckwheat among several other flavonoids²⁸. Buckwheat is the most important alternative annual crop, it is pseudocereal but its grains belong to cereals because of their similar use²⁹. There are two buckwheat (*Fagopyrum*) species used for food around the world. Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) originates from Southwest China and gradually has been spread to the all continents, while tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) is grown and used in the mountainous regions of northern India, Bhutan and Nepal³⁰. Common buckwheat, or sweet buckwheat, is usually consumed in Asia, Europe, North America, South Africa, and Australia, whereas tartary buckwheat is consumed rarely because of its bitter taste. Tartary buckwheat contains more bioactive components than common buckwheat. Flavonoid content of tartary buckwheat is higher than that of common buckwheat³¹. The main flavonoid is rutin and its content in buckwheat grains ranges from 120 to 360 mg kg⁻¹ dry matter²⁹. Historically, buckwheat was a very important crop in Europe. In many regions, buckwheat was very popular and it was included in many daily meals. But its importance was subsequently decreased, yet recently it has been observed to increase because of the health-promoting properties of its grains.

The aim of this work was to develop an HPLC method with UV spectrophotometric detection and amperometric detection on carbon paste electrode (CPE) for the determination of trace amounts of *trans*-resveratrol in samples of common and tartary buckwheat. The advantages of CPEs³² are broad potential window, low background current, possibility of chemical or biological modification of the carbon paste and ease of renewal of work-

ing surface of the carbon paste electrode. CPEs are very useful electrochemical sensors for the determination of organic compounds that can be anodically oxidized^{33–37}. CPE have not yet been used as amperometric detector in HPLC-ED determination of resveratrol. Their main advantage is ease of preparation and ease of regeneration of the working electrode surface. CPEs present less expensive, comparatively sensitive and more selective alternative to spectrophotometric detection.

Instruments

The HPLC system consisted of high-pressure piston pump HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Prague, Czech Republic), injection valve D with 20- μ l sample loop (Ecom, Prague, Czech Republic), spectrophotometric detector Sapphire 800 UV/VIS (Ecom, Prague, Czech Republic), electrochemical detector CHI 802B (CH Instruments Electrochemical Analysis, USA) with three-electrode system consisting of reference silver/silver chloride electrode RAE 113 (Monokrystaly, Turnov, Czech Republic) filled with 3 M KCl, working CPE (3 mm in diameter) and platinum wire auxiliary electrode. Column Kromasil C-18 (7 μ m), 125 \times 4 mm (Prochome, India) and precolumn Gemini C-18, 4 \times 3 mm (Phenomenex, USA) were used. The amperometric detector, employing electrochemical oxidation of phenolic hydroxy groups, was placed behind the UV/VIS detector operating at 306 nm. CPE was working in a wall-jet configuration. The system was operated by Clarity 2.3.0 programme (DataApex, Czech Republic) and CHI 6.26 programme (CH Instruments, USA) working in the Windows XP sys-

tem (Microsoft). The mobile phase was acetonitrile : Britton-Robinson buffer pH 7, 10 times diluted by deionized water (30:70, v/v), the flow rate was 1 ml min⁻¹. For preparation of the concentrated ethanolic samples of buckwheat seeds a vacuum evaporator Buchi B-480, R-114 (Switzerland) was used.

An ultrasonic bath PS02000A (Powersonic, USA) was used to facilitate the dissolution of the analytes. The pH of the solutions was measured with a pH meter Jenway 4330 (Jenway, UK) with a combined glass electrode. Spectrophotometer Agilent 8453 (Agilent, USA) was used to study the stability of the stock solution. All experiments were carried out at a laboratory temperature.

Materials

Trans-resveratrol was purchased from Sigma–Aldrich (USA). Its stock solution (1 \cdot 10⁻³ mol l⁻¹) was prepared by dissolving an accurately weighed amount of the substance in p.a. methanol (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic) and stored away from daylight at 4 °C until used. Solutions of lower concentrations were prepared by dilution of the stock solution with methanol. Stock solution of *cis*-resveratrol was prepared from solution (1 \cdot 10⁻⁴ mol l⁻¹) of *trans*-resveratrol by UV-irradiation on daylight.

A spectrophotometric study of the stability of the *trans*-resveratrol stock solution demonstrated that it was stable for at least one year, if it is stored away from daylight at 4 °C.

Britton-Robinson (BR) buffers were prepared in a usual way, by mixing 0.04 mol l⁻¹ phosphoric acid, 0.04 mol l⁻¹ acetic acid and 0.04 mol l⁻¹ boric acid with an ap-

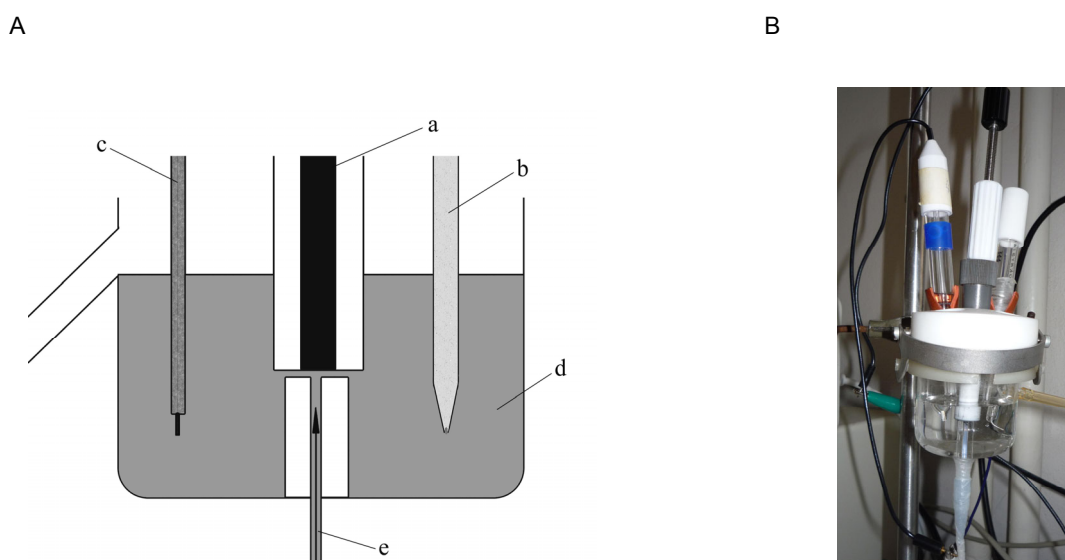


Fig. 2. Design of electrochemical cell (A) scheme: working CPE a, reference electrode b, auxiliary electrode c, mobile phase in an overflow vessel d, mobile phase inlet e; and (B) photograph of a complete system

appropriate amount of 0.2 mol l⁻¹ sodium hydroxide. Ethanol was used for extraction of resveratrol from buckwheat. All the chemicals used were of analytical reagent grade (Lachema, Brno, Czech Republic).

The mobile phase for HPLC contained acetonitrile for HPLC (Merck, Germany) and aqueous BR buffer diluted 10 times.

Carbon paste contained 250 mg of spherical micro particles of glassy carbon with a diameter 0.4–12 µm (Alpha Aesar, USA) and 90 µl of mineral oil (Fluka Biochemica, Switzerland).

All aqueous solutions were prepared using deionized water obtained from a MilliQ Plus system (Millipore, Molsheim, France).

Samples of buckwheat

The amounts of *trans*-resveratrol were determined in 5 samples of common buckwheat and 2 samples of tartary buckwheat (Table I). All samples were supplied by Crop Research Institute, Department of Gene Bank (Drnovská 507, Prague 6 Ruzyně, Czech Republic).

Extraction of buckwheat

A literature reported method²⁸ for extraction antioxidant compounds in buckwheat flour was modified to extract resveratrol from buckwheat grains. Grains were sepa-

Table I
List of plant material of buckwheat samples

NS ^a	ECN ^b	Name	Origin
Tartary buckwheat (<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn)			
1	01Z510000	Unnamed	Bhutan
	7		
2	01Z510001	Unnamed	USA
	4		
Common buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i> Möench)			
3	01Z500007	Špačinská 1	Slovakia
	0		
4	01Z500007	Zelenocvetkovaya 90	Ukraine
	6		
5	01Z500011	Emka	Poland
	1		
6	01Z500012	Kara-Dag	Ukraine
	3		
7	01Z500013	Rubra	Russian Federation
	4		

^aNS number of a sample, ^bECN National accession number

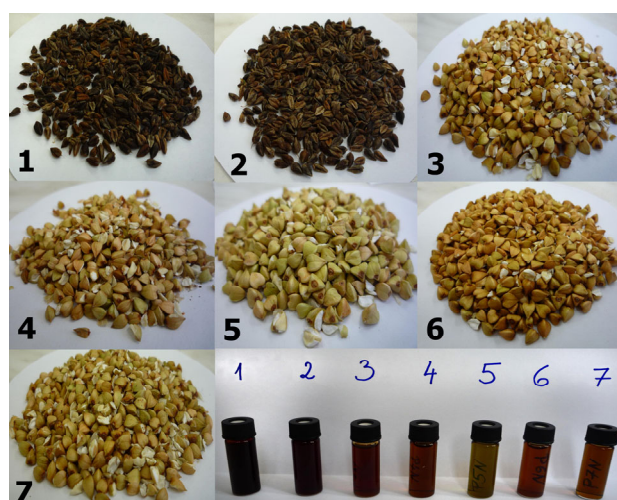


Fig. 3. Buckwheat samples and concentrated ethanolic extracts, numbers corresponds to NS (number of sample) from Table I

rated from hulls except of 2 samples of tartary buckwheat (with tartary buckwheat the separation of hulls from grains is impossible), grinded by kitchen mixer, 12 g of buckwheat flour was weighted into a distillation flask and 300 ml of ethanol was added, and extracted under reflux for 2 h, the solid substances were separated by filtration through filtration paper FN 1/ 90 g cm⁻² (Filtrak, Bärenstein, Germany). The filtrates were concentrated under reduced pressure at 50 °C to the volume less than 5 ml, and refilled to 5 ml with ethanol and filtrated through microfilter ProFill Plus PVDF/0.45 µm (Fischer Scientific, Pardubice, Czech Republic). The filtrates were ready for consequent analyses.

Results and discussion

At first, optimum conditions for amperometric detection on CPE were found. One of the problems while determining *trans*-resveratrol is the fact, that *trans*-resveratrol isomerizes to *cis*-resveratrol, when exposed to UV radiation, including the daylight. The mobile phase containing 50 % acetonitrile and 50 % of BR buffer allowed us to separate these two isomers in 4.5 min (with resolution of 1.6). The separation of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol was found to be independent of the pH of the mobile phase within pH 3 to 7. Therefore, optimum pH was determined from hydrodynamic voltammograms from pH values compatible with the used column. Hydrodynamic voltammograms in BR buffers of pH 3, 5 and 7 in the potential range from 0 to +1.4 V are shown in Fig. 4. The highest and best developed peaks were obtained with BR buffer pH 7 : acetonitrile (1:1) at a potential of +1.2 V. The calibration curves were measured in the concentration range of 4·10⁻⁸

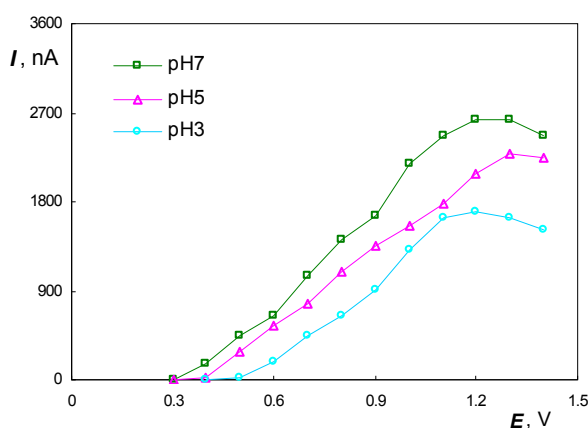


Fig. 4. Hydrodynamic voltammograms of *trans*-resveratrol (injected 20 μl of $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) on CPE in the mobile phase BR buffer : acetonitrile (1:1)

$1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Calibration curves were measured in triplicate and evaluated by a linear regression method. The limit of detection (L_D) was $3.5 \cdot 10^{-8}$ mol l^{-1} ($R^2 = 0.9986$) for electrochemical detection ($E = +1.2$ V) and $3.2 \cdot 10^{-8}$ mol l^{-1} ($R^2 = 0.9993$) for spectrophotometric detection (306 nm). The limit of detection was calculated as the amount of *trans*-resveratrol, which gave the signal three times higher than the background noise (S/N). It can be observed that the electrochemical detection on carbon paste electrode gives comparable results as the UV/VIS detection.

After optimization of detection conditions, optimum conditions for separation *cis*- and *trans*-resveratrol in concentrated ethanolic extract of buckwheat seeds were found. Composition of a mobile phase acetonitrile : BR buffer

(50:50, 40:60, 35:65, 30:70) was tested first. Optimum conditions for the determination of *trans*- and *cis*-resveratrol with amperometric detection using CPE were found to be: a mobile phase acetonitrile : BR buffer (30:70) and a potential of + 1.2 V. *Trans*-resveratrol was detected and determined in all buckwheat samples, but *cis*-resveratrol was not found in any sample. Chromatograms of concentrated ethanolic extracts are shown in Fig. 5 for spectrophotometric detection and in Fig. 6 for electrochemical detection, an arrow shows the peaks of *trans*-resveratrol. Standard addition method has been applied for the determination of *trans*-resveratrol in concentrated ethanolic extract and obtained contents are shown in Table II. Three measurements were replicated for each sample to obtain the average values and standard deviations (mean \pm SD). There are no big differences in *trans*-resveratrol amounts within analyzed varieties. But the content of *trans*-resveratrol in tartary buckwheat is almost three times higher than in samples of common buckwheat. We cannot compare obtained results with any previous data because there are no literature data available regarding the content of resveratrol in buckwheat.

Conclusion

We have developed an HPLC method with electrochemical detection on carbon paste electrode and spectrophotometric detection to determine *trans*-resveratrol in samples of common and tartary buckwheat. Optimal conditions for the determination of *trans*-resveratrol were a mobile phase consisting of acetonitrile : BR buffer pH 7 (30:70) with spectrophotometric detection at 306 nm and a potential of + 1.2 V for electrochemical detection. The content of *trans*-resveratrol was 3.43–3.50 mg kg^{-1} of seeds of tartary buckwheat and 0.98–1.68 mg kg^{-1} of seeds of common buckwheat.

Table II

Content of *trans*-resveratrol in concentrated ethanolic extracts and seeds, obtained using HPLC with spectrophotometric (306 nm, from height of peak) and electrochemical ($E = +1.2$ V, from height of peak) detection, mobile phase acetonitrile : BR buffer (30:70)

NS	HPLC-UV/VIS		HPLC-ED	
	c in extract ^a [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	m ^a [mg kg^{-1}]	c in extract ^a [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	m ^a [mg kg^{-1}]
1	36.1 \pm 3.6	3.43 \pm 0.35	36.51 \pm 4.8	3.47 \pm 0.46
2	36.5 \pm 4.2	3.47 \pm 0.40	36.84 \pm 4.7	3.50 \pm 0.45
3	17.7 \pm 2.5	1.68 \pm 0.24	17.25 \pm 1.8	1.64 \pm 0.17
4	11.0 \pm 1.9	1.05 \pm 0.18	11.29 \pm 2.5	1.07 \pm 0.24
5	13.8 \pm 1.3	1.31 \pm 0.12	14.25 \pm 2.9	1.35 \pm 0.28
6	10.8 \pm 1.1	1.02 \pm 0.10	10.31 \pm 2.4	0.98 \pm 0.23
7	13.0 \pm 1.2	1.23 \pm 0.11	12.98 \pm 3.4	1.23 \pm 0.32

^a Means (of three measurements) \pm SD

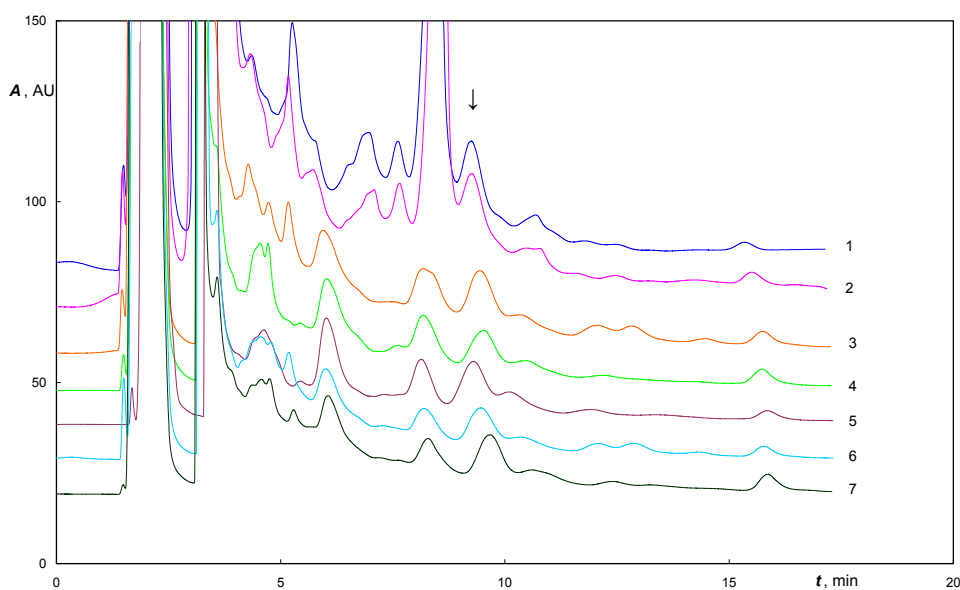


Fig. 5. HPLC chromatograms with spectrophotometric detection (306 nm) of concentrated ethanolic extracts of buckwheat samples, numbers of curves corresponds to NS (number of sample) from Table I, mobile phase acetonitrile : BR buffer pH 7 (30:70), flow rate 1 ml min^{-1}

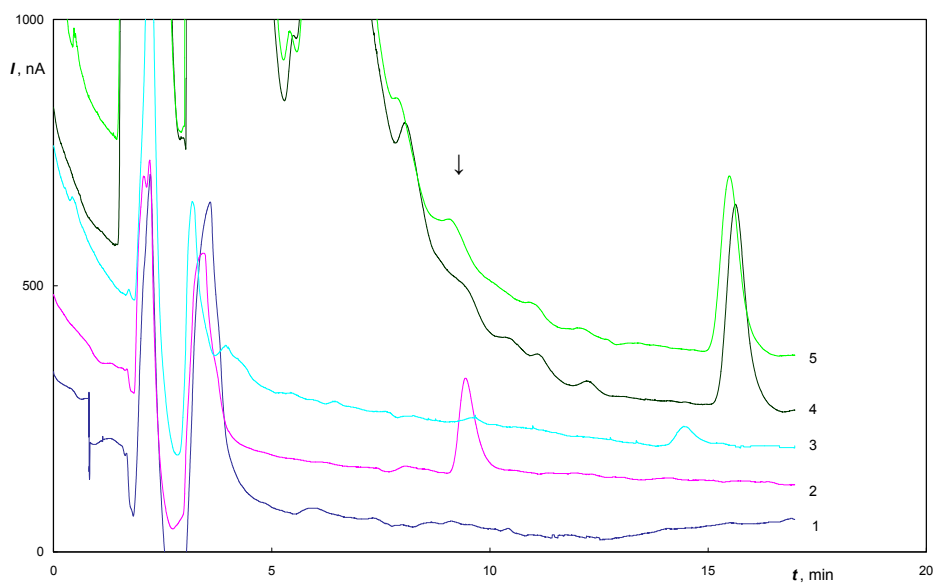


Fig. 6. HPLC chromatograms with electrochemical detection on CPE ($E = +1.2 \text{ V}$) of methanol (1), $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ of *trans*-resveratrol (2), $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ of *cis*-resveratrol (3), concentrated ethanolic extract of common buckwheat Zelenocvetkovaya 90 (4), concentrated ethanolic extract of common buckwheat Zelenocvetkovaya 90 with standard addition of $9.09 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ *trans*-resveratrol (5); mobile phase acetonitrile : BR buffer pH 7 (30:70), flow rate 1 ml min^{-1} , injected $20 \mu\text{l}$

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project LC 06035, MSM 0021620857, and RP 14/63) and by the Grant Agency of Charles University (GAUK project SVV 261 204).

REFERENCES

1. Harikumar K. B., Aggarwal B. B.: Cell Cycle 7, 1020 (2008).
2. Pirola L., Frojdo S.: Life 60, 323 (2008).

3. Goldberg D. M., Ng E., Karumanchiri A., Yan J., Diamandis E. P., Soleans G. J.: *J. Chromatogr., A* 708, 89 (1995).
4. Wang L., Zhang Z.: *Anal. Chim. Acta* 592, 115 (2007).
5. Trela B. C., Waterhouse A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 1253 (1996).
6. Shakibaei M., Harikumar K. B., Aggarwal B. B.: *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 115 (2009).
7. Šmidral J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., BUCKIOVÁ D., KŘÍSA B.: *Chem. Listy* 95, 602 (2001).
8. Fan E., Zhang K., Juany S., Yan Ch., Bai Y.: *Anal. Sci.* 24, 1019 (2008).
9. Souto A. A., Carneiro M. C., Seferin M., Senna M. J. H., Conz A., Gobbi K.: *J. Food Compos. Anal.* 14, 441 (2001).
10. Delgado M. A. R., González G., Trujillo J. P. P., Montelongo F. J. G.: *Food Chem.* 76, 371 (2002).
11. Hernandez J. L., Losada P. P., Silva A. T. S., Yusty M. A. L.: *Eur. Food Res. Technol.* 225, 789 (2007).
12. Bolivar F. M., Condori J., Rimando A. M., Hubstenberger J., Shelton K., Keefe S. F., Bennett S., Dolan M. C.: *Phytochemistry* 68, 1992 (2007).
13. Kolouchová I., Melzoch K., Šmidrkal J., Filip V.: *Chem. Listy* 99, 492 (2005).
14. Rimando A. M., Cody R.: *LCGC North America* 23, 1192 (2005).
15. Huang H., Zhang J., Chen G., Lu Z., Wang X., Sha N., Shao B., Li P., Guo D.: *Biomed. Chromatogr.* 22, 421 (2008).
16. Delmas D., Jannin B., Latruffe N.: *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 377 (2005).
17. Kueck A., Pipari A. W., Griffith K. A., Tan L., Choi M., Huang J., Wahl H., Liu J. R.: *Gynecol. Oncol.* 107, 450 (2007).
18. Sönmez U., Sönmez A., Erbil G., Tekmen I., Baykara B.: *Neurosci. Lett.* 420, 133 (2007).
19. Zhu Z., Klironomos G., Vachereau A., Neirinck L., Goodman D. W.: *J. Chromatogr., B* 724, 389 (1999).
20. Pineiro Z., Palma M., Barroso C. G.: *J. Chromatogr., A* 1110, 61 (2006).
21. Stecher G., Huck Ch. W., Popp M., Bonn G. K.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 371, 73 (2001).
22. Liu R., Zhang J., Liang M., Zhang W., Yan S., Lin M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1007 (2007).
23. McMurtrey K. D., Minn J., Pobanz K., Schultz T. P.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2077 (1994).
24. Luan T., Li G., Zhang Z.: *Anal. Chim. Acta* 424, 19 (2000).
25. Flamini R., Vedova A. D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1925 (2004).
26. Gu X., Ureasy L., Kester A., Zeece M.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 3223 (1999).
27. Peng Y., Zhang Y., Ye J.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 1838 (2008).
28. Qian J. Y., Mayer D., Kuhn M.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 9, 343 (1999).
29. Christa K., Smietana M. S.: *Czech J. Food Sci.* 26, 153 (2008).
30. Bonafaccia G., Fabjan N.: *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj.* 81, 349 (2003).
31. Liu Ch. L., Chen Y. S., Yang J. H., Chiang B. H.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 173 (2008).
32. Švancara I., Schachl K.: *Chem. Listy* 93, 490 (1999).
33. Zima J., Stoica A.I., Zítová A., Barek J.: *Electroanalysis* 18, 158 (2005).
34. Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: *Sensors* 4, 47 (2004).
35. Zima J., Švancara I., Barek J., Vytřas K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 204 (2009).
36. Barek J., Moreira J. C., Zima J.: *Sensors* 5, 148 (2005).
37. Zima J., Švancara I., Pecková K., Barek J., in : *Progress on drinking water research* (LeFebvre M.H., Roux M.M., ed.), Ch. 1, pp. 1–53. Nova Science Publishers, Inc., New York 2008.

DIRECT ENANTIOSELECTIVE DETERMINATION OF DRUGS IN BIOLOGICAL SAMPLES BY CYCLODEXTRIN-MEDIATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS IN COLUMN-COUPLING ARRANGEMENT WITH CAPILLARY ISOTACHOPHORESIS

**IGOR NEMEC, PETER MIKUŠ,
KATARÍNA MARÁKOVÁ, IVA
VALÁŠKOVÁ, and EMIL HAVRÁNEK**

*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovak Republic
mikus@fpharm.uniba.sk*

The present work illustrates possibilities of column coupling chiral capillary electrophoresis (CE-CE) for the direct quantitative determination of trace chiral drugs in multicomponent ionic matrices applicable in enantioselective clinical analysis, metabolic and pharmacokinetic studies.

Capillary isotachopheresis (ITP) served as an ideal injection technique within the CE-CE module transferring a well defined sample portion into capillary zone electrophoresis (CZE) stage. Moreover, the ITP provided an effective on-line sample pretreatment {partial sample clean up removing macroconstituents from the sample matrices, preconcentration of the trace (ng ml^{-1}) analytes from 5-20-times diluted urine samples} prior to the CZE separation. In this way, demands on sample preparation were minimized and an external manipulation with the sample was avoided. This provided (i) shorter analysis time, (ii) simplification of analytical procedure, and (iii) higher reliability of analytical results.

The CZE stage provided an enantiomeric separation of the pretreated analytes. A negatively charged carboxyethyl- β -cyclodextrin (CE- β -CD) was highly effective as a chiral selector in the analytical CZE stage for the enantioseparations of pheniramine (PHM), dimethindene (DIM), and dioxopromethazine (DIO). A neutral derivative, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), was effective for the enantioseparation of amlodipine (AML). This high recognition capability of the chiral selectors used was demonstrated by a sufficient enantioseparations

of the drugs as well as their separations from the micro- and semi-macroconstituents migrating in CZE stage and detectable by an absorbance ultraviolet (UV) detector. Due to lack of interferences between the drugs and sample-matrix constituents in the optimized chiral CZE systems, demands on both spacers in ITP stage and multiple column-switching, usually required in ITP-CZE techniques, were minimized. Enhanced separation selectivity due to the combination of different separation mechanisms (ITP vs. chiral CZE) enabled to obtain pure (monocomponent) zones of the analytes, suitable for their detection and quantitation.

The chiral ITP-CZE-UV method with the charged and uncharged cyclodextrins used as chiral selectors appeared to be a useful analytical approach for the trace enantiomers in complex ionic matrices as it combined enhanced (i) separation selectivity and (ii) sample loadability (a 30 μl sample injection volume) with (iii) high separation efficiency and provided (iv) favorable performance parameters including sensitivity, linearity, precision, accuracy/recovery and robustness with minimal demands on sample preparation.

The proposed chiral ITP-CZE-UV methods, successfully optimized and validated, were applied for the enantioselective analyses of the drugs and their metabolites in clinical urine samples. For example, the analysis of urine sample taken from a patient treated by PHM showed a concentration profile of the PHM enantiomers and their metabolites. Another chiral ITP-CZE-UV method was successfully applied for an enantioselective pharmacokinetic study of AML. These examples illustrated potentialities of this analytical approach for the routine use in clinical research.

This work was supported by grant from the Slovak Grant Agency for Science under the project VEGA No. 1/0003/08 and grant from Comenius University No. UK/120/2009.

VÝSKYT ARZÉNU A ANTIMÓNU V ZDROJOCH PODZEMNÝCH VÔD NITRIANSKÉHO KRAJA

VLADIMÍR PAVLÍK^{a,b}, ONDREJ HEGEDÚS^a a ALŽBETA HEGEDÚSOVÁ^c

^a Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Nitre, Štefánikova 58, 949 63 Nitra, ^b Katedra ekológie a environmentalistiky, Fakulta prírodných vied Univerzity Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra, ^c Katedra chémie, Fakulta prírodných vied Univerzity Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra, Slovenská republika
nr.ocha@uvzs.sk, nr.ocha@uvzs.sk, ahegedusova@ukf.sk

Kľúčové slová: arzén, antimón, stanovenie, podzemné vody

Úvod

Jedným z najdôležitejších problémov, na ktoré ľudstvo v súčasnej dobe kladie dôraz, je okrem zabezpečenia potravy a energetických zdrojov, aj ochrana životného prostredia. Medzi vyčerpateľné zdroje ľudskej potreby nesporne patrí aj pitná voda. Svojimi vlastnosťami a svojím zložením, ako zdroj pitnej vody, je najvhodnejšia podzemná voda. Podzemné vody patria medzi tie zložky životného prostredia, ktoré pomerne rýchlo odrážajú všetky negatívne dopady ľudskej činnosti. Je to dôsledok faktu, že podzemné vody zóny zvetrávania sú v bezprostrednom kontakte so všetkými základnými zložkami životného prostredia (atmosféra, biomasa, pôdy, zvetraliny, horniny, a to prostredníctvom infiltrujúcich zrážkových a povrchových vôd).

Prítomnosť a realita zvyšovania koncentrácie toxických prvkov (As, Hg, Cd, Sb a i.) a ich zlúčenín vo vode, v pôde a v ovzduší je vážny problém, s ktorým ľudstvo v nasledujúcich desaťročiach musí zápasit'. Nízke koncentrácie kovov nachádzajúcich sa vo vodách, sú prevažne prirodzeného pôvodu^{1,2}. Vyššie množstvá poukazujú na možnú kontamináciu. Hlavným zdrojom tejto kontaminácie sú väčšinou odpadové vody z ťažby a spracovania rúd z hút, z valcovní, z povrchových úprav kovov, z textilného, kožiarskeho a chemického priemyslu ale aj z poľnohospodárstva³.

V Slovenskej republike prebieha systematické sledovanie kvality podzemných vôd sústredené do významných vodohospodárskych oblastí od roku 1982. V súčasnosti je v platnosti Nariadenie vlády SR č.354/2006 (cit.⁴), ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu.

Súčasný problém predstavuje zvýšený obsah toxických prvkov v podzemných vodách, medzi iným zvýšený obsah arzénu, ktorý má nepriaznivé účinky na ľudský organizmus. Maximálne prípustné koncentrácie As v pitnej vode boli legislatívou mnohých krajín (vrátane Európskej únie) ustanovené na 10 µg l⁻¹. Arzén sa v prírodných vodách vyskytuje v dvoch formách: redukovaný „trojmocný“ As^(III), typický pre spodné vody s nedostatkom kyslíka a oxidovaný „päťmocný“ As^(V), ktorý prevláda v povrchových vodách⁵. Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny (I.A.R.C. Lyon) zaradila arzén ako dokázaný karcinogén pre človeka, do 1. skupiny s karcinogénnymi, mutagénnymi a teratogénnymi účinkami. Najčastejšími karcinogénnymi prejavmi sú rakovina kože, pečene, ciev a obličiek.

V prírode sa vyskytuje všade; v zemskej kôre cca. 2 mg kg⁻¹, v usadeninách až 13 mg kg⁻¹ (cit.⁶). Prirodzene je súčasťou ložísk niektorých sulfidov vo forme arzenitanov, arzeničnanov a v kombinácii s kyslíkom, chlóróm a sírou. Najrozšírenejšou formou výskytu arzénu v prírode je arzenopyrit FeAsS.

Štátny geologický ústav Dionýza Štúra v auguste 2007 uverejnil správu o najviac zamorených slovenských obciach. Medzi dvadsiatku najviac postihnutých patrí Závadka, Markušovce, Rudník, Rudňany, Zlatá Idka a Smolník. Voda a pôda v týchto obciach obsahuje vysoké koncentrácie arzénu a antimónu⁷.

V prírode spolu s arzénom je často prítomný aj antimón. Maximálna prípustná koncentrácia antimónu v pitnej vode je stanovená na 0,005 mg l⁻¹ (cit.⁴). Antimón je toxický prvok, vyskytujúci sa väčšinou spolu so sírou a arzénom. Jeho koncentrácia v zemskej kôre sa odhaduje na 0,2–0,3 mg kg⁻¹ (cit.⁸).

Najdôležitejšia zlúčenina antimónu vyskytujúca sa v prírode je Antimonit (Sb₂S₃), ktorá obsahuje 71 až 75 % čistého kovu a rýchlo oxiduje. Koncentrácia antimónu v pôdach sa pohybuje v rozmedzí 0,3–1,8 mg kg⁻¹. Zvýšené koncentrácie boli pozorované v ťažkých pôdach bohatých na látky organickej povahy. Vyššie obsahy môžu byť v dôsledku antropogénnej činnosti.

Antimónové zrudnenie má zvláštne postavenie v oblasti Západných Karpát. Ťažba antimónových rúd v oblasti Malých Karpát, Nizkých Tatier (Dúbrava), vo východnej časti Slovenského Rudohoria, ale aj v neovulkanitoch stredného a východného Slovenska, dlhodobo pokrývala domácu spotrebu antimónu a zároveň v minulosti výrazne ovplyvňovala rozvoj rudného baníctva v týchto regiónoch, ale aj kvalitu podzemných vôd⁹.

Nitriansky kraj je charakteristický tým, že hlavnými zdrojmi pitnej vody sú diaľkovody: Ponitriansky skupinový vodovod, vodný zdroj Jelka – Galanta a hlavne vodný zdroj Gabčíkovo. Podiel obyvateľov v okresoch zásobovaných pitnou vodou z vodovodu je na úrovni 90 %. Táto

oblasť sa vyznačuje aj množstvom artézskych studní, ktoré sú zdrojom podzemnej pitnej vody. Na tieto artézske studne sme upriamili našu pozornosť. Sústredené sú do okresov Nové Zámky a Šaľa. Hĺbky týchto studní sa pohybujú na úrovni 60–500 metrov.

Cieľom práce bolo zhodnotenie prítomnosti a sledovanie stability koncentrácie arzénu a antimónu v podzemných vodách, pochádzajúcich z artézskych studní okresov Nové Zámky a Šaľa.

Experimentálna časť

Použité prístroje a zariadenia

Na stanovenie arzénu a antimónu sa použil atómový absorpčný spektrometer AA240Z fy. Varian, Austrália. Merania sa uskutočnili využitím techniky elektrotermickej atomizácie so Zeemanovou kompenzáciou pozadia.

Chemikálie a reagenty

- základný roztok arzénu a antimónu o koncentrácii 1000 mg l^{-1} , Merck
- pracovné roztoky sa pripravili riedením základného roztoku v $0,03 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$, Suprapur®, Merck
- kyselina dusičná Suprapur®, Merck
- deionizovaná voda s vodivosťou pod $< 0,1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$
- Paládium – modifikátor pre ETAAS $c(\text{Pd}) = 10,0 \pm 0,2 \text{ g l}^{-1}$ ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ v $15 \% \text{ HNO}_3$), Merck
- horčík, štandardný roztok, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$, $1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ Mg}$ CertiPUR®, Merck
- peroxid vodíka p.a., Merck
- tetrahydrát štvorsodnej soli kyseliny etyléndiaminotetraoctovej (EDTA), Calbiochem®.

Podmienky merania

Pri použití elektrotermickej atomizácie sa na meranie arzénu použila katódová arzenová výbojka, prúd na lampe 10 mA , vlnová dĺžka $193,7 \text{ nm}$, šírka štrbiny $0,5 \text{ nm}$, so Zeemanovou kompenzáciou pozadia. Dávkovaný objem

vzorky 18 ml . Pre stanovenie arzénu sa použila zmes paládiového modifikátora a $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v roztoku $1,0 \% \text{ HNO}_3$ v dávkovanom objeme $5 \text{ } \mu\text{l}$.

Pre stanovenie antimónu sa použila lampka s dutou katódou, prúd na lampe 10 mA , vlnová dĺžka $217,6 \text{ nm}$, šírka štrbiny $0,2 \text{ nm}$, so Zeemanovou kompenzáciou pozadia. Dávkovaný objem vzorky $20 \text{ } \mu\text{l}$. Modifikátorom bola HNO_3 použitá na konzerváciu vzoriek¹⁰.

Pre vyhodnotenie výsledkov sa použila metóda kalibračnej krivky.

Použité metódy stanovenia boli podrobené validácii, pričom sa stanovili nasledovné vybrané validačné charakteristiky metódy¹¹, ktoré sú uvedené v tabuľke I.

Analyzovaný materiál

Na analýzy sa použili vzorky vody z artézskych studní rôznej hĺbky z okresov Šaľa a Nové Zámky, resp. prameň z mesta Nitra, ktoré boli odobrané podľa platných noriem¹².

Spracovanie vzoriek

Na odber vzoriek sa použili nádoby z polyetylénu, ktoré boli vopred namáčané v EDTA a následne vyčistené kyselinou dusičnou o koncentrácii $1,5 \text{ mol l}^{-1}$ a opláchnuté deionizovanou vodou.

Vzorky boli ihneď po odbere doručené v chlade, pri teplote okolo $5 \text{ } ^\circ\text{C}$, ku spracovaniu do laboratória a následne upravené prídavkom kyseliny dusičnej ($c = 1,4 \text{ g ml}^{-1}$) tak, aby výsledné pH bolo od 1 do 2. Rovnaký objem sa použil na prípravu slepého pokusu, kde sa skúšobná dávka nahradila deionizovanou vodou.

Diskusia

Problém výskytu arzénu v podzemných vodách okresov Nové Zámky a Šaľa sa objavil v roku 1998, keď došlo k zmene stanovených ukazovateľov vychádzajúcich z požiadavky STN 75 7111: Kvalita vody – Pitná voda,

Tabuľka I

Validačné charakteristiky metódy stanovenia arzénu

Validačné charakteristiky	As		Sb	
	požiadavka	namerané	požiadavka	namerané
Medza detekcie (LOD), mg l^{-1}	<0,0010	0,00031	<0,0013	0,0010
Medza stanovenia (LOQ), mg l^{-1}	<0,0030	0,00097	<0,0038	0,0021
Opakovateľnosť metódy ako výberový variačný koeficient (s_R), %	<10	5,9	<15	9,3
Správnosť metódy ako výťažnosť, %	$100 \pm u_c$	109	$100 \pm u_c$	94
Horná hranica rozsahu merania, mg l^{-1}	>0,10	0,30	>0,10	0,20
Štandardná kombinovaná neistota metódy (u_c), %	< 25	19	<15	7,9

Tabuľka II
Obsah arzénu v sledovaných vodných zdrojoch za obdobie 2005–2009

Miesta odberu	Obsah As [mg l^{-1}]					priemer	s_R^a [%]
	2005	2006	2007	2008	2009		
Šaľa, Horná ulica	–	0,0014	0,0011	0,0013	0,0010	0,0012	16
Šaľa, Hviezdoslavova ulica	–	0,0011	0,0011	0,0010	0,0011	0,0011	4,4
Šaľa, Námestie svätej Trojice	–	0,0097	0,0082	0,0083	0,0075	0,0084	11
Šaľa, Vlčanská ulica	–	0,0057	0,0043	0,0044	0,0029	0,0043	27
Šaľa, Pribinovo námestie	–	0,0028	0,0019	0,0023	0,0018	0,0022	21
Šaľa, Záhradnícka ulica	0,0130	–	0,0132	0,0125	0,0124	0,0140	14
Nové Zámky, ul. M. R. Štefánika	0,0280	0,0411	0,0291	0,0290	0,0242	0,0287	22
Nové Zámky, Majzonovo námestie	0,0180	0,0167	0,0164	0,0156	0,0130	0,0150	13
Nové Zámky, Námestie P. O. Hviezdoslava	0,0120	0,0130	0,0116	0,0092	0,0114	0,0101	21
Nové Zámky, Tajovského ulica	0,0084	0,0084	0,0080	0,0076	0,0084	0,0071	18
Nové Zámky, Andovská ulica	0,0085	0,0085	0,0074	0,0067	0,0073	0,0070	19
Nové Zámky, Gúgska ulica	<0,0054	0,0060	–	–	0,0058	0,0057	4,3
Šurany, námestie	0,0370	0,0322	0,0300	0,0332	0,0391	0,0343	11
Šurany, rekreačný areál	0,0570	0,0519	0,0416	0,0460	–	0,0491	14
Černík, prímestie	0,0340	0,0345	0,0263	0,0291	0,0298	0,0307	11
Nitra, prameň Šindolka	0,0092	0,0100	0,0121	0,0093	0,0107	0,0104	11

^a Výberový variačný koeficient

novelizovanej v júli roku 1998, keď v dovedty platnej norme ČSN 75 7111: Jakost vod – Pitná voda z roku 1989, limitná hodnota arzénu bola $0,050 \text{ mg l}^{-1}$ a pre antimón limitná hodnota stanovená nebola¹³. Novelizáciou normy sa limitná hodnota upravila pre arzén na $0,010 \text{ mg l}^{-1}$ a v prípade antimónu sa stanovila hodnota $0,005 \text{ mg l}^{-1}$ (cit.¹⁴). Dôsledkom tejto úpravy niektoré vodné zdroje artézskych studní, ktoré spĺňali požiadavky kvality na obsah arzénu, novelizáciou normy sa stali nevyhovujúcimi. Normou stanovené hodnoty týchto prvkov znamenali aj pre kontrolné laboratória novú výzvu vo voľbe a zostavení analytických metód, ktorými je možné v rutínnej praxi stanovené hodnoty spoľahlivo stanovovať. Pre tento účel sa najčastejšie využíva atómová absorpčná spektrometria, ktorá bola použitá aj v tejto práci, a ktorej validačné charakteristiky, vypočítané na podmienky nášho pracoviska, sú uvedené v metodologickej časti tejto práce.

Tabuľka II uvádza obsah arzénu vo vodných zdrojov artézskych studní sledovaných okresov a stabilitu jeho koncentrácie za obdobie 2005–2009.

Výsledky analýz poukazujú na skutočnosť, že z 15 sledovaných artézskych studní v siedmich dochádza k prekročeniu najvyššej medznej hodnoty, stanovenej pre arzén. Ďalší sledovaný zdroj, prameň Šindolka v Nitre vykazuje hodnotu arzénu na hranici najvyššej medznej hodnoty. Vo všetkých prípadoch prekročenia najvyššej medznej hod-

noty je päťročný priemer v oblasti 10 až $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Sledovaním stability koncentrácie arzénu v analyzovaných vodách počas piatich rokov sa nezistili veľké výkyvy v jeho obsahu. Vypočítaný variačný koeficient za uvedené obdobie je vo väčšine prípadov nižší ako 25 % (iba v prípade – Šaľa, Vlčanská ulica má hodnotu 26,5 %), čo je na úrovni neistoty merania.

Pri každej analýze spolu s arzénom bol stanovovaný aj antimón. V prípade antimónu sa v každej vzorke stanovila nižšia hodnota prvku ako je jeho detekčný limit, t.j. $0,0010 \text{ mg l}^{-1}$. Znamená to, že antimón sa v týchto sledovaných vzorkách nenachádzal v merateľných koncentráciách.

Vzhľadom na skutočnosť, že sledované zdroje majú hĺbku 60 až 500 m , dá sa predpokladať, že pôvod zvýšenej koncentrácie arzénu sa nemá hľadať v antropogénnej činnosti, ale má skôr geogénny pôvod.

Pre zdroje podzemných vôd so zvýšeným výskytom kontaminantov v súčasnosti existujú technológie úpravy vody, ktoré sú úspešne využiteľné a sú úspešne využívané v rôznych oblastiach Slovenskej republiky¹⁵. Nakoľko sledované artézske studne (aj prameň Šindolka v Nitre) nie sú nevyhnutnými zdrojmi zásobovania obyvateľstva pitnou vodou, technológia úpravy vody sa v týchto prípadoch neriešila. Príslušný prevádzkovateľ oboznamuje obyvateľov o nevhodnosti týchto vôd pre pitné účely.

LITERATÚRA

1. Ilavský J., Barloková D., Munka K.: Pitná voda, 10. konferencia s medzinárodnou účasťou. Trenčianske Teplice, 9.–11. október 2007, Zborník prednášok, str. 337. Hydrotechnológia Bratislava, s.r.o., Bratislava 2007.
2. Rozložník L. a kol.: *Ložiská nerastných surovín a ich vyhľadávanie*. ALFA-SNTL, Bratislava 1987.
3. Ďurža O.: Acta geol. Univ. Comen. 58, 29 (2003).
4. Nariadenie vlády Slovenskej republiky 354/2006 Z.z. ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu.
5. Macášek F.: *Voda s arzénom aj v Amerike*, <http://www.noveslovo.sk/archiv/1999-30/ospolocnosti.html#04>, stiahnuté 25.10.2007.
6. Kafka Z., Punčochářová J.: Chem. Listy 96, 611 (2002).
7. Dietzová Z.: *Odhad zdravotného rizika u obyvateľov obce Zlatá Idka z arzénu a antimónu prítomného v životnom prostredí*. Záverečná správa. Manuskript. ŠZÚ Košice (2003).
8. Flower B. A., Goering P. L.: Antimony v.: *Metals and Their Compounds in the Environment*, (Merian E., ed.). VCH, Weinheim 1991.
9. Slavkovský J.: Acta Montanistica Slovaca 2, 351 (1997).
10. Niskavaara H., Virtasalo J., Lajunen L. H. J.: Spectrochim. Acta, Part B 40, 1219 (1985).
11. Hegedüs O., Hegedúsová A., Gašparík, J., Ivičičová A.: Chem. Listy 99, 518 (2005).
12. STN ISO 5667-5: Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 5: Pokyny na odber vzoriek pitnej vody z úpravní vŕd a z distribučnej siete. (apríl 2007).
13. ČSN 75 7111: Jakost vod. Pitná voda. (1.1.1991).
14. STN 75 7111: Kvalita vody. Pitná voda. (júl 1998).
15. Koppová K., Drímal M.: Poznatky a skúsenosti z prvého roku plnenia projektu EÚ – Hodnotenie rizika arzénu a molekularna epidemiológia, Zborník – Pitná voda 2003, str. 134. Trenčianske Teplice 2003.

V. Pavlík^{a,b}, O. Hegedüs^a, and A. Hegedúsová^c
(^a Regional Public Health Authority in Nitra, Slovak Republic, ^b Department of Ecology and Environmentalistics Constantine the Philosopher University in Nitra, Slovak Republic, ^c Department of Chemistry Constantine the Philosopher University in Nitra, Slovak Republic): **Appearance of Arsenic and Antimony in the Goundwater Resources of Nitra Region**

The article reports an evaluation of results of the total arsenic and antimony determination in samples of drinking water of artesian wells in the Nitra region. The maximum levels of arsenic reached to 0,057 mg l⁻¹, the antimony content was at the detection limit. The detection limit for arsenic was at 0,00031 mg l⁻¹ and 0,0010 mg l⁻¹ for antimony. Analysis of water from artesian wells in Nitra region showed higher levels of arsenic in some observed sources. Given the depth of resources, it can be assumed that the presence of arsenic has geogenically origin.

MONITORING OF CADMIUM TRANSLOCATION WITHIN ST. JOHN'S WORT AND MAIZE PLANTS TREATED WITH CADMIUM SELENATE AND SELENITE

MATÚŠ PEŠKO^a, KATARÍNA KRÁĽOVÁ^b, and INGRID HAGAROVÁ^c

^a Department of Ecosozology and Physiotactics, ^b Institute of Chemistry, ^c Institute of Geology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic
pesko@fns.uniba.sk

Key words: bioaccumulation and translocation factor, cadmium, flame atomic absorption spectrometry, *Hypericum perforatum* L., selenium oxidation state, *Zea mays* L.

Introduction

Cadmium belongs to wide-spread contaminants, whereby anthropogenic Cd contamination often results from mining or smelting of metal ores, waste incinerators or urban traffic. However, Cd was also released into the environment by application of phosphate fertilizers¹. Phytotoxic effects of cadmium are manifested on different levels. The most apparent visible symptoms of Cd toxicity in plants are retardation of plant growth, chlorosis and stunting^{1,2}. Decline in growth, chlorophylls and carotenoids content in the presence of cadmium was confirmed by many authors^{3,4}. Cd inhibits uptake and accumulation of essential cations⁵ probably by damaging of root plasma membrane due to peroxidation of lipids and degradation of proteins, by affecting ATP-ase and other carriers and by reducing of root respiration. In the presence of Cd iron deficiency symptoms in plants can be observed due to decreased activity of reductases occurring in membranes of root cells which transform Fe³⁺ ions into Fe²⁺ form which is available for plants⁶. The decrease of water content at reduced transpiration rate indicates that high Cd concentration reduces the uptake and water transport in plants⁷. Reduction of transpiration rate and water content in plants is connected with decrease of stomata conductivity⁸.

Cadmium also inhibits activity of photosystems (PS I and PS II)^{9–11}, whereby PS II is more sensitive to Cd stress than PS I (ref.^{11,12}). Moreover, in the presence of Cd activities of Rubisco and PEP-carboxylase are inhibited, too¹³. Wang et al.¹⁴ confirmed that Cd stress initially reduced the activities of Rubisco and PEPC and subsequently affected the PS II electron transfer in maize plants, suggesting that the Calvin cycle reactions are the primary target of the Cd toxic effect rather than PS II.

Selenium is trace element which is not essential micronutrient in higher plants but it functions as an antioxi-

dant and has a positive effect on crop growth and stress tolerance at low concentrations. On the other hand, high Se concentrations are phytotoxic¹⁵. Higher plants differ in capacities to accumulate and tolerate selenium. Brassicaceae species including Indian mustard (*Brassica juncea* L.), broccoli (*Brassica oleracea botrytis* L.) and canola (*Brassica napus* spp. *oleifera* L.) have been classified as primary Se accumulators^{16–18}. Se can be incorporated into amino acids as a replacement of sulphur^{19,20}. According to de Souza et al.²¹ the reduction of selenate by ATP sulfurylase is a rate-limiting step for Se uptake in higher plants, whereas selenite can be relatively quickly incorporated into selenoamino acids^{19,21,22}. There are indications that Se might affect biosynthesis of chlorophylls²³ as well as nitrogen assimilation²⁴.

Cadmium interferes with some essential elements (eg Zn, Fe), including Se²⁵. Shanker et al.²⁶ found that the presence of sodium selenate(VI) and selenite(IV) reduced Cd accumulation in maize shoots. Selenium oxidation state significantly affected bioaccumulation of Cd and Se in pea plants and treatment with CdSeO₄ resulted in much higher mobility of Cd and Se within the plants than the treatment with CdSeO₃ (ref.²⁷).

A variety of methods can be successfully used for the determination of cadmium in different matrices (including plant materials). Among them, atomic spectrometric methods such as electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) and flame atomic absorption spectrometry (FAAS) are the most widely used. FAAS is specially favoured on account of its selectivity, expeditiousness and fairly low operational cost. Its inadequate sensitivity for the extremely low concentrations is the main reason for using ETAAS determination. In our study, concentrations of cadmium in all studied samples were determined reliably by FAAS and finally the method was used for monitoring of cadmium translocation within experimental plants.

This paper is aimed to investigate the effect of cadmium selenate and selenite on plant biomass as well as Cd accumulation in plant organs of hydroponically cultivated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants, whereby for monitoring of cadmium translocation within experimental plants flame atomic absorption spectrometry was used.

Material and methods

Cadmium compounds CdSeO₄ and CdSeO₃ used for experiments were prepared according to procedures described in Kráľová et al.²⁸ Chemicals of analytical purity used for preparation of Knop nutrient solution were purchased from Lachema (Brno, Czech Republic).

Cultivation of experimental plants

For cultivation of experimental plants seeds of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) (Research Institute of Agroecology in Michalovce, Slovakia) were used. Six weeks old plants 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: 28°C): control variant in Hoagland solution and metal variants containing studied compounds (12, 24 and $60 \mu\text{mol dm}^{-3}$, respectively) and the response of plants to metal treatment were evaluated 7 d after Cd application. Then dry mass of roots and shoots was determined.

The seeds of maize (*Zea mays* L.), cv. Lucia (FAO 380) were soaked in distilled water for 24 h, then for 3 days germinated in filter paper scroll moistured with distilled water and consequently hydroponically cultivated in Knop nutrient solution under controlled conditions (7 days; photoperiod 16 h day/8 h night; irradiance $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR; air temperature 25°C). After 7-day cultivation dry mass of roots and shoots was estimated. 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 Cd content in plants

Roots of plants used for Cd 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 Cd analysis and the total root and shoot accumulation of Cd was determined. Mineralization of plants was carried out in the PTFE-coated stainless steel pressure vessels ZA-1 (JZD Zahnašovice, Czech Republic). $0.1\text{--}0.5 \text{ g}$ of the plant sample was weighted to the vessel and 5.0 cm^3 of concentrated HNO_3 p.a. (Lachema, Czech Republic) was added. Vessel was closed and heated in the oven at 160°C for 6 h. After this procedure the solution was diluted to 25 cm^3 with redistilled water and stored in a 50 cm^3 polyethylene (PE) bottle. Cadmium contents were determined using the flame atomic absorption spectrometry method (AAS Perkin-Elmer Model 1100, at 228.8 nm with deuterium background correction). Standard reference Cd 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 of cadmium was $2 \mu\text{g dm}^{-3}$. The detection limit corresponding to three times the standard deviation of the blank was $2 \mu\text{g dm}^{-3}$. The precision expressed by relative standard deviation (RSD) for five successive determinations varied in the range from 1 % to 3 %.

Results and discussion

The dependence of root and shoot dry mass of St. John's wort and maize plants treated with CdSeO_4 and CdSeO_3 is presented in Fig. 1. The phytotoxic effect of the highest applied concentration of studied compounds ($60 \mu\text{mol dm}^{-3}$) was manifested by desiccated leaves and leaf fall of St. John's wort plants what was reflected in great reduction of shoot dry mass. The leaves of these experimental plants were yellow or brownish. Significant reduction of the formation of lateral roots of maize plants was observed mainly for the treatment with $60 \mu\text{mol dm}^{-3}$ CdSeO_4 and CdSeO_3 , whereby the leaves of plants cultivated in the presence of $60 \mu\text{mol dm}^{-3}$ CdSeO_4 exhibited symptoms of chlorosis. Due to the supply of studied compounds dry mass of shoots was affected to a greater extent than root dry mass. The reduction of plant biomass by Cd toxicity could be the direct consequence of the inhibition of chlorophyll synthesis²⁹ and photosynthesis³⁰.

The dependence of cadmium content in roots and shoots of experimental plants treated with CdSeO_4 and CdSeO_3 is shown in Fig. 2. Selenite treatment resulted in significantly lower Cd accumulation in plant organs of John's wort and maize plants than that of selenate. This is in agreement with the results of several authors^{27,28, 31,32}. In the studied concentration range ($0\text{--}60 \mu\text{mol dm}^{-3}$) Cd content in roots and shoots of John's wort (Fig. 2: *I, II*) and in shoots of maize (Fig. 2: *III'*) increased linearly with increasing CdSeO_4 and CdSeO_3 concentration in hydroponics. On the other hand, in roots of maize (Fig. 2: *III*) the increase of supplemented Cd led to gradual saturation of root tissue with this metal. Cadmium bioaccumulating capacity of roots of John's wort was much higher than that of maize roots, whereby Cd accumulation in shoots of both experimental plant species was similar (slightly higher Cd shoot concentration was determined for maize). Higher Cd bioaccumulating capacity of *H. perforatum* roots could be connected with effective synthesis of phytochelatins due to metal stress. This detoxification mechanism utilizes complexation of phytochelatins with Cd and storage of these metal complexes in root vacuoles. Ligands participating in complexing heavy metals in vacuoles may be also metal chaperones, organic acids such as citric, malic and malonic acids or even histidine, nicotianamine and phytates^{33–36}. The great difference in bioaccumulating capacity of plant roots related to Cd can be also affected by different age of tested plant species (7 week old plants of *H. perforatum*) and 10 d old maize seedlings) as well as different tolerance of tested plant species with respect to Cd stress. High tolerance of *H. perforatum* to Cd was previously confirmed^{37,38}. Similarly, some authors reported relative high tolerance of some maize variants to Cd stress^{39,40}. It is necessary to stress that higher shoot concentrations of cadmium suggest higher Cd mobility (root to shoot transfer) within the plant.

Bioaccumulation factor (BAF) expresses the ratio of the metal concentration in the biological material (in μmol

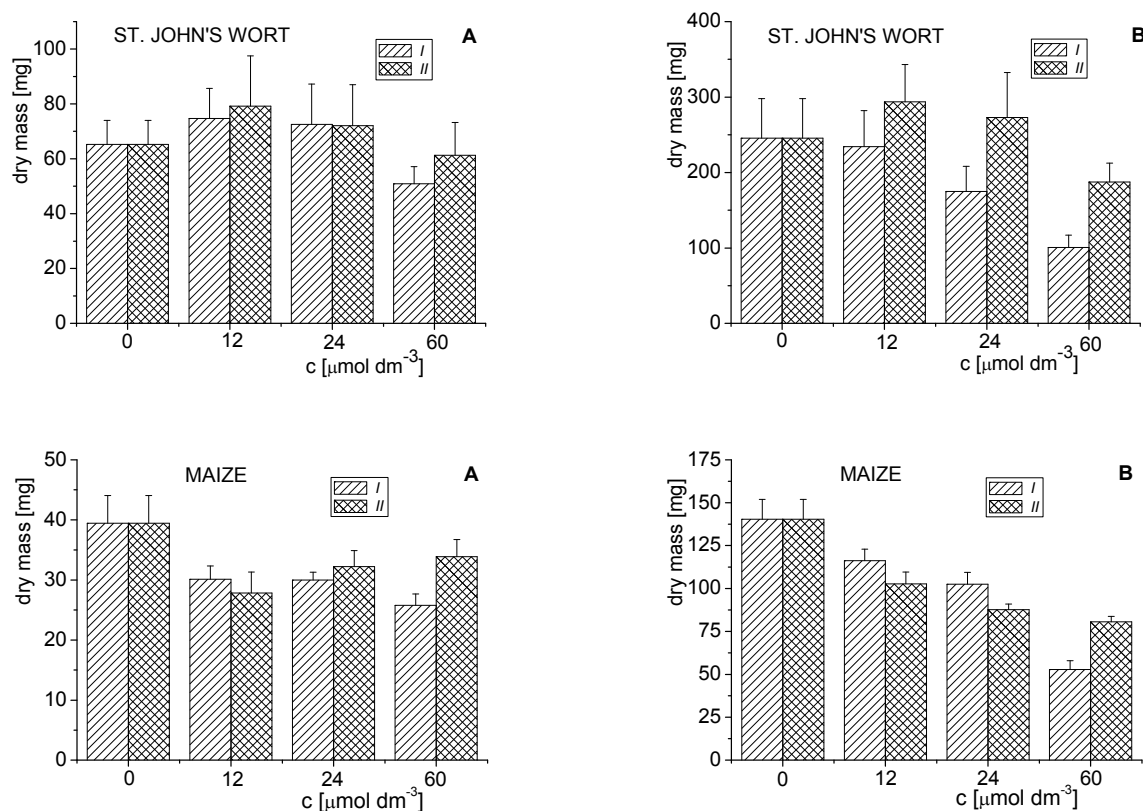


Fig. 1. Dependence of root (A) and shoot (B) dry mass of St. John's wort and maize plants on the concentration of CdSeO₄ (I) and CdSeO₃ (II). Mean \pm S.E.; S.E. - standard error

or $\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass) to the metal concentration in external solution (in μmol or $\mu\text{g dm}^{-3}$). After supply of both tested Cd compounds the roots of St. John's wort accumulated much more Cd than maize roots (Fig. 3) and the corresponding BAF values determined for roots varied in the range from 378 to 441 (CdSeO₄) and from 182 to 198 (CdSeO₃), respectively. The BAF values estimated for shoots were 17.1–20.2 (CdSeO₄) and 2.8–4.1 (CdSeO₃). Higher accumulation of Cd in maize plant organs due to CdSeO₄ application was reflected in the corresponding BAF values determined for roots as well as shoots, which were approximately twofold in comparison with those estimated after CdSeO₃ treatment. In comparison with St. John's wort lower BAF values related to plant roots were determined for maize plants: these BAF values varied from 69.3 to 213.1 for CdSeO₄ and from 35.2 to 114.8 for CdSeO₃ treatment. The corresponding BAF values related to maize shoots were estimated as follows: 28.0–57.9 for CdSeO₄ and 11.5–26.0 for CdSeO₃ treatment.

The translocation factor (TF) corresponds to the ratio of accumulated Cd amount in shoots and roots and thus it depends also on the actual dry mass of these plant organs, similarly as the portion from the total accumulated metal

amount by the plant occurring in the shoots. TF values related to Cd in maize plants treated with compounds containing selenium in different oxidation state varied in the range from 0.828 to 1.049 (CdSeO₄) and from 0.484 to 0.836 (CdSeO₃), respectively. Significantly lower TF values were determined for St. John's wort plants: 0.104–0.121 for CdSeO₄ and 0.058–0.070 for CdSeO₃ treatment.

In maize plants portion from the total accumulated metal amount by the plant occurring in the shoots was about 43 % in the whole studied concentration range (12–60 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) for both tested compounds (CdSeO₄ a CdSeO₃). On the other hand, in St. John's wort the values of this portion were significantly lower: 9.4–10.8 % for CdSeO₄ and 5.4–6.5 % for CdSeO₃ application. The Cd portion accumulated in shoots of *V. radiata* (with respect to total Cd amount accumulated by plants) was approximately twofold higher in the case of CdSeO₄ treatment than after CdSeO₃ application⁴¹. Similar values were obtained also for *Matricaria recutita* plants when after application of 12 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ CdSeO₄ this portion reached 50.3 % for cv. Goral and 37.65 % for cv. Lutea, whereby at application of 12 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ CdSeO₃ the corresponding portion was only 32.6 % and 16.6, respectively^{28,32}. Never-

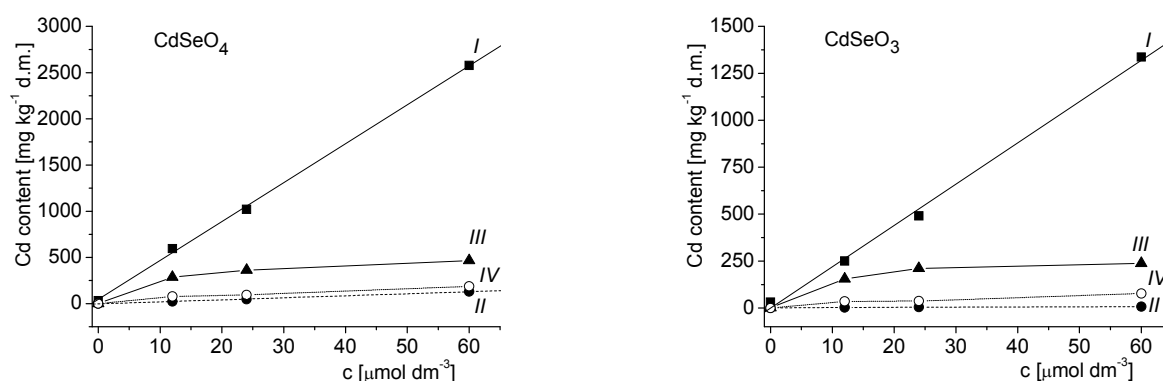


Fig. 2. Dependence of cadmium content in roots (I) and shoots (II) of St. John's wort as well as roots (III) and shoots (IV) of maize plants on CdSeO_4 and CdSeO_3 concentration; d.m.- dry mass

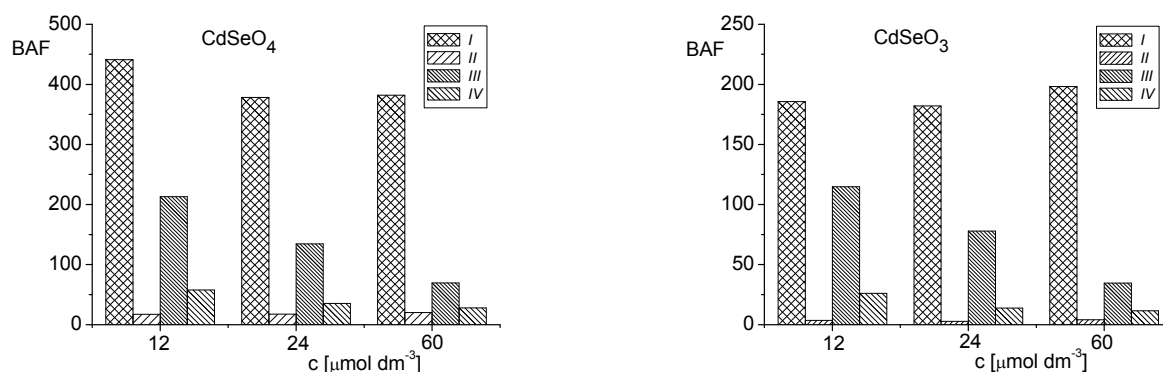


Fig. 3. Dependence of bioaccumulation factors (BAF) related to Cd determined for roots (I) and shoots (II) of St. John's wort as well as roots (III) and shoots (IV) of maize plants on the applied CdSeO_4 and CdSeO_3 concentration

theless, *M. recutita* plants are considered to be significant Cd accumulators^{38,42}. Experiments with *Pisum sativum* L. showed that due to CdSeO_4 treatment up to 38 % of Cd and 89 % of Se from the total accumulated metal amount by pea plants was accumulated in the shoots whereas these values for CdSeO_3 reached only 18 % for both Cd and Se (ref.²⁷).

The above results confirmed high effectiveness of maize plants (cv. Lucia) to accumulate Cd in their shoots. It is necessary to stress that despite of bioavailability of both selenate and selenite, plants absorb preferentially selenate which will be converted to organic compounds⁴³. Shanker et al.³¹ studied uptake and translocation of Cd absorbed by roots of mung bean treated with selenate and selenite and irrigated by solution containing $2 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cd. The authors observed statistically significant reduction of

Cd uptake with increasing selenite and selenate concentration whereby selenite application resulted in more effective reduction of Cd uptake. This is connected with the fact that the less mobile selenite after being reduced to selenide tends to form Cd-Se complex, which appears to be unavailable for the plants. The more mobile anion selenate is available for Cd-Se formation only after following a more complicated redox processes involving Se(VI) in SeO_4^{2-} , Se(IV) in SeO_3^{2-} , and Se(0) species. Reduced Cd accumulation in maize shoots in the presence of sodium selenate (VI) and sodium selenite(IV) was confirmed by Shanker et al.²⁶. Landberg a Greger²⁵ studied the effects of Se(IV) and Se(VI) on Cd uptake in pea and wheat plants and found that selenite caused approximately threefold increase of Cd root concentration whereas application of selenate increased Cd shoot concentration by 50 %.

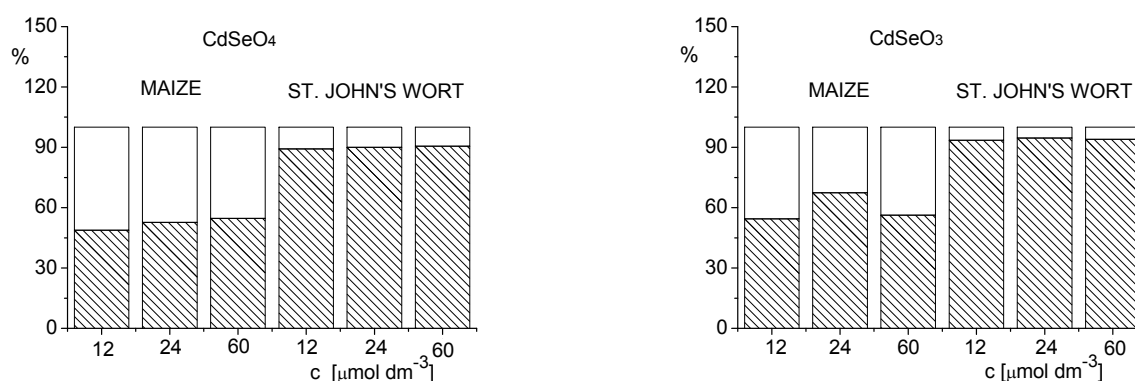


Fig. 4. Comparison of Cd portion of Cd occurring in roots (shaded) and shoots (white) of St. John's wort and maize plants treated with CdSeO₄ and CdSeO₃

Conclusion

Flame atomic absorption spectroscopy was used for monitoring cadmium translocation within St. John's wort and maize plants treated with cadmium selenate and selenite. It was found that Cd accumulation in plant roots was higher than its accumulation in the shoots. Selenium oxidation state significantly affected effectiveness of cadmium uptake and accumulation by plants. Cd content in plant organs of experimental plant species treated with selenate was significantly higher than in plants treated with selenite. Roots of St. John's wort exhibited higher Cd bioaccumulating capacity than maize roots, however Cd bioaccumulating ability of shoots was comparable. In the young maize plants portion from the total accumulated metal amount by the plant occurring in the shoots was about 43 % in the whole studied concentration range (12–60 μmol dm⁻³) for both tested compounds (CdSeO₄ a CdSeO₃). Therefore it is necessary to monitor metal concentrations in maize grown on the polluted fields whether Cd content in biomass do not exceed the limits of toxicity for animal feed. Similar monitoring is important also for St. John's wort plants, above ground part of which is utilized for phytotherapeutic purposes.

This study was financially supported by Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences under the contract No. VEGA 1/0272/08 and by Sanofi Aventis Pharma Slovakia. The authors thank Assoc. Prof. Iveta Ondrejková from Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava for preparation of the studied compounds.

REFERENCES

- Sanita di Toppi L., Gabrielli R.: *Environ. Exp. Bot.* **41**, 105 (1999).
- Das P., Samantaray S., Rout G.R.: *Environ. Pollut.* **98**, 29 (1997).
- Lagriffoul A., Mocquot B., Mench M., Vangronsveld J.: *Plant Soil* **200**, 241 (1998).
- John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S.: *Int. J. Plant Prod.* **3**, 65 (2009)
- Wu F., Zhang G., Yu J.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **34**, 2003 (2003).
- Siedlecka A.: *Acta Soc. Bot. Pol.* **64**, 265 (1995).
- Kastori R., Petrovič M.: *J. Plant Nutr.* **15**, 2427 (1992).
- Barceló J., Poschenrieder C.: *J. Plant Nutr.* **13**, 1 (1990).
- Siedlecka A., Krupa Z.: *Acta Soc. Bot. Pol.* **65**, 277 (1996).
- Siedlecka A., Krupa Z.: *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 833 (1996).
- Šeršeň F., Kráľová K.: *Photosynthetica* **39**, 575 (2001)
- Barua B., Jana S.: *Photosynthetica* **20**, 74 (1986).
- Stiborová M., Doubravová M., Leblová S.: *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **81**, 373 (1986).
- Wang H., Zhao S. C., Liu R. L., Zhou W., Jin J. Y.: *Photosynthetica* **47**, 277 (2009).
- Lauchli A.: *Bot. Acta* **106**, 455 (1993).
- Zayed A. M., Lytle C. M., Terry N.: *Planta* **206**, 284 (1998).
- Ajwa H. A., Banuelos G. S., Mayland H.F.: *J. Environ. Qual.* **27**, 1218 (1998).
- Banuelos G.S., Zambruzski S., Mackey B.: *Plant Soil* **224**, 251 (2000).
- Pilon-Smits E. A. H., Hwang S. B., Lytle C. M., Zhu Y. L., Tai J. C., Bravo R. C., Chen Y. C., Leustek T., Terry N.: *Plant Physiol.* **119**, 123 (1999).
- Terry N., Zayed A. M., de Souza M. P., Tarun A. S. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 401 (2000).
- De Souza M. P., Pilon-Smits E. A. H., Lytle C. M., Hwang Seongbin, Tai J., Honma T. S. U., Yeh L., Terry N.: *Plant Physiol.* **117**, 1487 (1998).

22. Zhang Y., Pan G., Chen J., Hu Q.: *Plant Soil* 253, 437 (2003).
23. Padmaja K., Prasad D. D. K., Prasad A. R. K.: *Phytochemistry* 28, 3321 (1989).
24. Aslam M., Harbit K.B., Huffaker R. C.: *Plant Cell Environ.* 13, 773 (1990).
25. Landberg T., Greger M.: *Physiol. Plant.* 90, 637 (1994).
26. Shanker K., Mishra S., Srivastava S., Srivastava R., Dass S., Prakash S. and Srivastava M. M.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 419 (1996).
27. Škopíková A., Kráľová K., Masarovičová E.: *Proceedings Ecopole 08. 2*, 135 (2008).
28. Kráľová K., Masarovičová E., Ondrejkočová I., Bujdoš M.: *Chem. Pap.* 61, 171 (2007).
29. Padmaja K., Prasad D. D. K., Prasad A. R. K.: *Photosynthetica* 24, 399 (1990).
30. Baszynski T., Wajda L., Krol M., Wolinska D., Krupa Z., Tukendorf A.: *Physiol. Plant.* 48, 365 (1980).
31. Shanker K., Mishra S., Srivastava S., Srivastava R., Dass S., Prakash S., Srivastava, M. M.: *Chem. Spec. Bioavail.* 7, 97 (1995).
32. Lešíková J., Kráľová K., Masarovičová E., Kubová J., Ondrejkočová I.: *Acta Hort. (ISHS)* 749, 223 (2007).
33. Krämer U., Cotter-Howells J. D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C.: *Nature* 379, 635 (1996).
34. Stephan U.W., Schmidke I., Stephan V. W., Scholz G.: *BioMetals* 9, 84 (1996).
35. Rauser W.E.: *Phytochelatin. Annu. Rev. Biochem.* 59, 61 (1990).
36. Salt D.E., Prince R.C., Baker A.J.M., Raskin I., Pickering I. J.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 713 (1999).
37. Chizzola R.: *Z. Arzn. Gew. Pfl.* 3, 91 (1998).
38. Marquard R., Schneider M., in: *Fachtagung „Arznei- und Gewürzpflanzen“* (Marquard R., Schuber E., ed.), p. 9, Giessen 1.- 2. Oktober 1998.
39. Yang X., Baligar V. C., Martens D. C., Clark R. B.: *J. Environ. Heal. B* 30, 569 (1995).
40. Weissenhorn I., Leyval C., Berthelin J.: *Biol. Fert. Soils* 19, 22 (1995).
41. Peško M., Kráľová K., Masarovičová E., in: *Vliv abiotických stresorů na vlastnosti rostlin 2009. Sborník příspěvků.* (Bláha L. ed.), p. 275, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, 2009.
42. Grejtovský A., Pirč R.: *J. Appl. Bot. Angew. Bot.* 74, 169 (2000).
43. Barceloux D.G.: *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 145 (1999).

AUTENTICITA MORAVSKÝCH VÍN

IVANA POUSTKOVÁ^a, LUBOŠ BABIČKA^a, LUDVÍK BUDÍN^a, ADAM MÉHEŠ^b, JIŘÍ MAZÁČ^b, JAN POUSTKA^c a LADISLAV STARUCH^d

^a Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbát, ^b Celně-technické laboratoře, Generální ředitelství cel, Budějovická 7, 140 96 Praha 4, ^c Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^d Ústav biotechnologie a potravinářství, Fakulta chemické a potravinářské biotechnologie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
poustkova@af.czu.cz

Úvod

České a moravské vinohradnictví a vinařství zaznamenalo v poslední době velký rozmach. Před vstupem do Evropské unie došlo k rozšíření plochy vinic na téměř 20 tisíc hektarů. Vinohradnické a vinařské podniky jsou postupně vybavovány moderními technologiemi, které jsou základním předpokladem výroby kvalitních vín. Jedním z marketingových nástrojů je kladení důrazu na typický produkt, který byl vypěstovaný a vyrobený v České republice. Nezbytným marketingovým předpokladem je pak kvalita vína a autenticita vína. Hlavním úkolem vinohradníků, vinařů a konečně i pracovníků v reklamě a marketingu je nalezení hmatatelných důkazů, které prokáží spotřebiteli autenticitu vína z pohledu regionu, kde byly dopěstované hrozny a následně vyrobené víno. V tradičním francouzském vinařství je možné nazvat vztah vína k určité lokalitě pojmem „terroir“. „Terroir“ je velmi významným marketingovým nástrojem světového vinařství. Aktuální je tento výzkum zejména ve státech, kde nemá „terroir“ svoji tradici. Mezi takové vinařské země patří Německo, kde vína s charakterem „terroir“ nesou označení „Erste Gewächs“, Rakousku, kde se taková vína označují známkou „DAC – Districtus Austriae Controlatus“, nebo v Kanadě.

Prokázání autenticity vín je složitou souhrou mnoha analytických a senzorních metod, které mají za cíl prokázat skutečnou jedinečnost geografického původu a úzký vztah k lokalitě, vinařské obci, nebo regionu. Při prokázání takové jedinečnosti vína v určité lokalitě může docházet k rozvoji venkova a zemědělství formou propagace vína, agroturistiky a modernizace vinohradnických a vinařských

podniků z fondů Evropské unie.

Prvky mohou být významné jako dobré indikátory původu vína, protože nejsou metabolizované v průběhu bonifikace^{1,2}. Schopnost rozlišit vína podle oblastí na základě obsahu a složení mikroprvků a makroprvků naznačuje, že prvky jsou ovlivněny především při přechodu z horniny do půdy a z půdy do hroznů. Multielementární složení půdy je silně ovlivněné rozpustností anorganických látek v půdě. Model vína v zásadě odráží geochemii původu půdy³. Na základě metody ICP-OES a analýzy 16 prvků – Al, B, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, Mg, P, Pb, Si, Sn, Sr, V a Zn se podařilo rozdělit sledovaná vína do jednotlivých skupin podle původu⁴. Na základě analýzy 9 prvků – Na, K, Rb, Cs, Cr, Fe, Co, Zn, Ag – bylo rozlišeno 18 německých vín, kde byly nalezeny významné korelace mezi obsahem prvků v půdě a ve víně pro Na, K, Rb, Cs (cit.⁵). Baxter a spol. rozlišil na základě multielementární analýzy 48 prvků s využitím metody ICP-MS v souboru 55 španělských a 67 anglických vín⁶. Klasifikace španělských vín z oblasti „Galicia“ bylo dosaženo pouze na základě 2 prvků – vápníku a barya⁷. Nejčastěji kvantifikované prvky při analýze původu vín jsou následující prvky – K, Na, Fe, Zn, Rb, Ca, Mg, Mn, Cu, Cr, Co, Sb, Cs, Br, Al, Ba, As, Li, Ag^{8–11}.

Cílem práce byla analýza 27 bílých a červených vín vyrobených z různých odrůd a z různých vinařských obcí ve vinařské oblasti Morava. Na základě analýzy minerálních látek byla hledaná rozdílnost mezi sledovanými víny na základě odrůdy a na základě svého geografického původu.

Experimentální část

Všechna hodnocení byla provedena na odrůdových komerčních vínech, které pocházely od čtyř různých vinařských podniků. Podrobnou charakteristiku sledovaných vín z pohledu odrůdy, ročníku, jakostního stupně, vinařské obce a viniční tratě ukazuje tabulka I.

Stanovení minerálních látek v odrůdových vínech – Ca, K, Mg, Na, Zn – 10 ml destilačního zbytku bylo zmineralizováno s 5 ml koncentrované kyseliny dusičné v mikrovlnném rozkladném zařízení Millestone Ethos Plus při 160 °C. Po doplnění na 50 ml deionizovanou vodou a promíchání byly prvky stanoveny na ICP spektrometru Iris Intrepide XSP-Duo (Thermo Scientific). Z důvodu interferencí při stanovení Ca a K bylo provedeno stanovení těchto prvků v roztocích, které byly ještě 10× zředěny. Výsledky byly přepočteny z ředění roztoků a z hmotnostních bilancí destilací na mg prvků v litru vína.

Na závěr byla provedena statistická analýza zahrnující stanovení: průměru, směrodatné odchylky, testu homogenity rozptylů, testu analýzy rozptylů (ANOVA) a metody následného testování metodou minimální průkazné

Tabulka I

Charakteristika sledovaných vín z pohľadu odrúdy, ročníku, jakostného stupňa, viničnej obce a viničnej trať

Odrúda	Ročník	Jakostný stupeň	Vinařská obec	Viničná trať
Zweigeltrebe	2003	výběr z hroznů	Hrušky	Ovčáčka
Zweigeltrebe	2004	výběr z hroznů	Hrušky	Ovčáčka
Zweigeltrebe	2003	pozdní sběr	Žarošice	Oulehle
Zweigeltrebe	2003	pozdní sběr	Žarošice	Oulehle I.
Zweigeltrebe	2004	jakostní	Žarošice	Oulehle
Zweigeltrebe	2002	výběr z hroznů	Novosedly	Stará hora
Zweigeltrebe	2004	výběr z hroznů	Novosedly	Stará hora
Frankovka	2004	pozdní sběr	Valtice	Kamenné hory
Frankovka	2003	jakostní	Žarošice	Oulehle
Modrý Portugal	2004	jakostní	Archlebov	Malíny
Modrý Portugal	2003	pozdní sběr	Archlebov	Malíny
André	2004	pozdní sběr	Žarošice	Klášovky
André	2003	pozdní sběr	Žarošice	Klášovky
Ryzlink rýnský	2003	pozdní sběr	Žarošice	Plešnice
Ryzlink rýnský	2004	výběr z hroznů	Novosedly	Růžová hora
Ryzlink rýnský	2004	pozdní sběr	Valtice	Kamenné hory
Ryzlink vlašský	2003	pozdní sběr	Žarošice	Oulehle
Rulandské bílé	2003	výběr z hroznů	Žarošice	Klášovky
Rulandské bílé	2004	pozdní sběr	Žarošice	Klášovky
Rulandské bílé	2004	pozdní sběr	Mikulov	Pod valtickou
Chardonnay	2004	pozdní sběr	Mikulov	Pod valtickou
Chardonnay	2004	výběr z hroznů	Dobré Pole	Daniel
Rulandské šedé	2004	pozdní sběr	Valtice	Horní čtvrtě
Sauvignon	2004	výběr z hroznů	Jevišovka	Stará hora
Sauvignon	2004	pozdní sběr	Hrušky	Újezd
Neuburské	2004	výběr z hroznů	Novosedly	Stará hora
Veltlínské zelené	2003	pozdní sběr	Hrušky	Podsedky
Muškat moravský	2003	pozdní sběr	Hrušky	Ovčáčka

diference byla provedena na programu UNISTAT. Statistické vyhodnocení hroznovou (cluster) analýzou, euklidovou metodou nejbližšího souseda byla provedena v programu STATGRAPHIC.

Výsledky a diskuse

Naměřené výsledky stanovení vápníku, draslíku, hořčíku, sodíku a zinku jsou uvedeny v tabulce II. Nejvyšší obsah vápníku byl zjištěn ve vínech vyrobených z tzv. „burgundských odrůd“, ve vínech z lokality Mikulov – Pod valtickou. Jedná se o vzorky č. 20 a 19 (Chardonnay – 128,00 mg l⁻¹ a Rulandské bílé – 127,00 mg l⁻¹). Vysoký obsah vápníku v těchto vínech může mít úzký vztah k lokalitě, protože se jedná o vinici nacházející se na vápe-

natém geologickém podloží. Nejnižší obsah vápníku byl zjištěn v červených vínech z lokalit Žarošice a Archlebov. Jedná se o vzorky č. 10 (Modrý Portugal – 36,10 mg l⁻¹), č. 8 (Frankovka – 37,20 mg l⁻¹) a č. 3 (Zweigeltrebe – 37,80 mg l⁻¹). Vína s nejnižším obsahem vápníku pochází z jiné vinařské podoblasti a geologicky rozdílné lokality.

Draslík je významný ve výživě révy vinné, je spojen rovněž s technologiemi výroby vína, zejména změnou obsahu organických kyselin a stabilitou vína. Nejvyšší obsah draslíku byl zjištěn opět u „burgundských odrůd“, jmenovitě u odrůdy Rulandské bílé. Jedná se o vzorky č. 19 (1265,00 mg l⁻¹) a č. 18 (1172,00 mg l⁻¹). Zajímavé je zjištění, že nejvyšší obsah draslíku byl zjištěn v bílých vínech, podobně jako u vápníku. V případě vzorků Rulandské bílého se jedná o vína z velmi rozdílných lokalit a jiných vinařských podoblastí. Nejnižší obsah draslíku byl

Tabulka II

Obsah minerálnych látok - Ca, K, Mg, Na, Zn - ve sledovaných vínoch

	Odrúda	Ročník	Vinařská obec	Obsah Ca [mg l ⁻¹]	Obsah K [mg l ⁻¹]	Obsah Mg [mg l ⁻¹]	Obsah Na [mg l ⁻¹]	Obsah Zn [mg l ⁻¹]
1	Zweigeltrebe	2003	Hrušky	41,80	878,00	93,30	3,13	0,50
2	Zweigeltrebe	2004	Hrušky	44,70	832,00	81,20	5,20	0,70
3	Zweigeltrebe	2003	Žarošice	37,80	956,00	96,10	3,25	0,70
4	Zweigeltrebe	2003	Žarošice	39,50	857,00	92,40	2,78	0,60
5	Zweigeltrebe	2004	Žarošice	45,90	930,00	106,00	3,74	0,70
6	Zweigeltrebe	2002	Novosedly	58,70	1072,00	105,00	4,77	1,20
7	Frankovka	2004	Valtice	57,60	849,00	85,90	3,96	0,30
8	Frankovka	2003	Žarošice	37,20	706,00	107,00	2,74	1,40
9	Modrý Portugal	2004	Archlebov	40,90	1022,00	103,00	5,38	0,60
10	Modrý Portugal	2003	Archlebov	36,10	975,00	93,20	3,65	1,10
11	André	2004	Žarošice	47,20	983,00	109,00	3,85	1,00
12	André	2003	Žarošice	43,30	820,00	105,00	6,22	0,90
13	Ryzlink rýnský	2003	Žarošice	88,80	536,00	85,30	6,15	0,50
14	Ryzlink rýnský	2004	Novosedly	59,60	447,00	79,00	19,90	0,30
15	Ryzlink rýnský	2004	Valtice	88,50	1134,00	80,50	11,80	0,50
16	Ryzlink vlašský	2003	Žarošice	52,50	640,00	113,00	6,65	0,50
17	Rulandské bílé	2003	Žarošice	94,10	750,00	105,00	10,40	0,40
18	Rulandské bílé	2004	Žarošice	78,20	1172,00	108,00	7,42	0,50
19	Rulandské bílé	2004	Mikulov	127,00	1265,00	92,90	14,50	1,10
20	Chardonnay	2004	Mikulov	128,00	1129,00	94,60	14,20	1,10
21	Chardonnay	2004	Dobré Pole	118,00	741,00	94,60	23,80	0,70
22	Rulandské šedé	2004	Valtice	110,00	1120,00	85,50	13,50	0,60
23	Sauvignon	2004	Jevišovka	76,10	640,00	86,20	16,90	0,40
24	Sauvignon	2004	Hrušky	110,00	722,00	84,00	12,20	0,40
25	Neuburské	2004	Novosedly	38,20	976,00	77,10	16,70	1,10
26	Veltlínské zelené	2003	Hrušky	98,70	1015,00	84,20	12,60	1,00
27	Muškrát moravský	2003	Hrušky	79,00	905,00	61,60	11,00	0,30

stanoven rovněž v bílých vínech, z odrúdy Ryzlink rýnský. Jedná se o vzorky č. 14 (447,00 mg l⁻¹) a č.13 (536,00 mg l⁻¹).

Nejvyšší obsah hořčiku byl zjištěn u vzorku č. 16 (Ryzlink vlašský – 113,00 mg l⁻¹), č. 11 (André – 109,00 mg l⁻¹), č. 18 (Rulandské bílé – 108,00 mg l⁻¹) a č. 8 (Frankovka – 107,00 mg l⁻¹). Všechna tato vína pochází z vinařské podoblasti Slovácké, lokality Žarošice. Existuje zde tudíž úzký vztah mezi geologickými a půdními na lokalitě a obsahem hořčiku v uvedených vínech. Nízký obsah hořčiku byl stanoven u vzorků č. 27 (Muškát moravský – 61,60 mg l⁻¹) a č. 14 (Ryzlink rýnský – 79,00 mg l⁻¹).

Obsah sodíku ve vínech je viditelně nižší, než obsah vápníku, draslíku a hořčiku. Nejnižší obsah sodíku byl zjištěn v červených vínech – ve vzorku č. 8 (Frankovka –

2,74 mg l⁻¹), č. 4 (Zweigeltrebe – 2,78 mg l⁻¹) a č.1 (Zweigeltrebe – 3,13 mg l⁻¹). Vysoký obsah sodíku byl naproti tomu pozorován u bílých vín a to u vzorků č. 21 (Chardonnay – 23,80 mg l⁻¹) a č. 14 (Ryzlink rýnský – 19,90 mg l⁻¹).

Nejvyšší obsah zinku byl zjištěn v červených vínech – jedná se o vzorek č. 8 (Frankovka – 1,40 mg l⁻¹) a vzorek č. 6 (Zweigeltrebe – 1,20 mg l⁻¹). Nejnižší obsah zinku byl stanoven ve vínech č. 7 (Frankovka – 0,30 mg l⁻¹), č. 14 (Ryzlink rýnský – 0,30 mg l⁻¹) a č. 27 (Muškát moravský – 0,30 mg l⁻¹).

Výsledky analýzy prvků v jednotlivých vínech byly vyhodnocené statistickými metodami testu homogenity rozptylu, analýzy rozptylu a následným testováním metodou minimální průkazné diference. V tabulce III jsou uve-

Tabulka III

Hodnocení obsahu vápníku, draslíku, hořčíku, sodíku a zinku v závislosti na jednotlivých odrůdách se statistickým vyhodnocením metodou ANOVA a minimální průkazné diference

Víno	Obsah Ca [mg l ⁻¹]	Obsah K [mg l ⁻¹]	Obsah Mg [mg l ⁻¹]	Obsah Na [mg l ⁻¹]	Obsah Zn [mg l ⁻¹]
André	45±3 a	(9±1)x10 ²	(1,1±0,00)x10 ² d	5±2 ab	1,00±0,10
Frankovka	47±14 a	(8±1)x10 ²	(1,00±0,20)x10 ² bcd	3,4±1,0 a	0,9±0,8
Modrý Portugal	39±3 a	(1,00±0,03)x10 ³	(1,00±0,10)x10 ² cd	4,5±1,2 ab	0,9±0,4
Zweigeltrebe	45±7 a	(0,9±0,1)x10 ³	(1,00±0,10)x10 ² bcd	3,8±1,0 a	0,7±0,2
Ryzlink rýnský	79±17 ab	(0,7±0,3)x10 ³	(0,8±0,0)x10 ² ab	13±7 bcd	0,43±0,12
Ryzlink vlašský	52,5 a	640	113 d	6,7 abc	0,5
Rulandské bílé	(1,0±0,3)x10 ² bc	(1±0,3)x10 ³	(1,0±0,1)x10 ² cd	10,77±3,55 abc	0,7±0,4
Chardonnay	123±7 c	(0,9±0,3)x10 ³	(0,9±0,0)x10 ² bcd	19±7 d	0,9±0,3
Rulandské šedé	110 bc	1120	85,5 bc	13,5 bcd	0,6
Sauvignon	(0,9±0,2)x10 ² bc	(0,68±0,06)x10 ³	(0,9±0,0)x10 ² bc	15±3 cd	0,4±0,0
Neuburské	38,2 a	976	77,1 ab	16,7 cd	1,1
Veltlínské zelené	98,7 bc	1015	84,2 abc	12,6 abcd	1
Muškat moravský	79 ab	905	61,6 a	11 abcd	0,3
F test	**	ns	**	**	ns

n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl, *statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 95 %, **statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 99 %, statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými parametry: odrůdou (a), lokalitou (b), ročníkem (c) a jakostním stupněm (d)

deny výsledky ANOVA (F-test) následujícím způsobem: n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl, *statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 95 %, **statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 99 %. Jako metoda následného testování byla použita metoda minimální průkazné diference, kde malá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými parametry: odrůdou (a), lokalitou (b), ročníkem (c) a jakostním stupněm (d).

Nejvyšší obsah vápníku byl zjištěn u odrůdy Chardonnay (123,00 mg l⁻¹), která se odlišuje od všech ostatních odrůd révy vinné. Nejnižší obsah vápníku byl naproti tomu stanoven u odrůdy Neuburské (38,20 mg l⁻¹), a u odrůdy Modrý Portugal (38,50 mg l⁻¹). Nižší obsah vápníku byl zjištěn převážně u odrůd pro výrobu červených vín, jako jsou André, Frankovka, Modrý Portugal a Zweigeltrebe. Na základě statistického vyhodnocení se tyto odrůdy odlišují od většiny odrůd pro výrobu bílých vín.

U obsahu draslíku ve sledovaných vínech nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi odrůdami. Nejvyšší obsah draslíku byl naměřen u odrůdy Rulandské šedé (1120,00 mg l⁻¹), následovaný odrůdou Rulandské bílé (1062,33 mg l⁻¹). Nejnižší obsah draslíku byl zjištěn ve vínech odrůdy Ryzlink vlašský (640,00 mg l⁻¹) a Frankovka (777,50 mg l⁻¹).

Odrůdy je možné rozlišit na základě obsahu hořčíku

ve sledovaných vínech. Nejnižší obsah byl stanovený ve víně z odrůdy Muškát moravský (61,60 mg l⁻¹). Víno z této odrůdy je statisticky odlišeno od všech ostatních odrůd. Nízký obsah hořčíku byl stanoven i ve vínech z odrůd Ryzlink rýnský (81,60 mg l⁻¹) a Neuburské (77,10 mg l⁻¹). Tyto dvě odrůdy se rovněž odlišují od ostatních odrůd. Vysoký obsah hořčíku byl stanoven ve vínech z odrůd Ryzlink vlašský (113,00 mg l⁻¹) a André (107,00 mg l⁻¹). Obě tyto odrůdy jsou opět statisticky odlišné od ostatních odrůd.

Mezi jednotlivými odrůdovými víny byl stanoven rozdíl rovněž na základě obsahu sodíku v odrůdových vínech. Nejvyšší obsah sodíku byl zjištěn ve vínech z odrůdy Chardonnay (19,00 mg l⁻¹) – vína z této odrůdy se odlišují od vín z ostatních odrůd. Nejnižší obsah sodíku byl stanoven v červených vínech z odrůd Frankovka (3,35 mg l⁻¹), a Zweigeltrebe (3,81 mg l⁻¹). Rovněž tyto dvě odrůdy jsou na základě obsahu sodíku odlišné od všech ostatních vín.

Podle obsahu zinku nebyl nalezen významný rozdíl mezi jednotlivými odrůdami. Nejnižší obsah zinku byl zjištěn u vína z odrůdy Muškát moravský (0,30 mg l⁻¹). Nejvyšší obsah naproti tomu ve vínech z odrůd Veltlínské zelené (1,00 mg l⁻¹) a Neuburské (1,10 mg l⁻¹).

Minerální látky mohou sloužit jako velmi dobrý indikátor geografického původu vín. Rovněž v tomto hodnocení byla posuzována vína z rozdílných lokalit, aby bylo

Tabulka IV

Hodnocení obsahu sodíku a zinku v závislosti na jednotlivých lokalitách se statistickým vyhodnocením metodou ANOVA a minimální průkazné difference

Lokalita	Obsah Ca [mg l ⁻¹]	Obsah K [mg l ⁻¹]	Obsah Mg [mg l ⁻¹]	Obsah Na [mg l ⁻¹]	Obsah Zn [mg l ⁻¹]
Žarošice	(0,6±0,2)×10 ² ab	(0,84±0,19)×10 ³	103±9 c	5±2 a	0,7±0,3
Archlebov	(0,4±0,0)×10 ² a	(1,0±0,0)×10 ³	98±7 bc	4,5±1,2 a	0,9±0,4
Dobré Pole	118 cd	741	93,9 abc	23,8 c	0,7
Hrušky	(0,7±0,3)×10 ² abc	(0,87±0,11)×10 ³	81±12 a	9±4 ab	0,6±0,3
Jevišovka	76,1 abcd	640	86,2 abc	16,9 bc	0,4
Mikulov	(1,3±0,0)×10 ² d	(1,20±0,01)×10 ³	93,8±1,2 abc	14,4±0,2 bc	1,1±0,0
Novosedly	(0,52±0,12)×10 ² ab	(0,8±0,3)×10 ³	87±16 abc	14±8 b	0,9±0,5
Valtice	(0,9±0,3)×10 ² bcd	(1,0±0,16)×10 ³	84±3 ab	10±5 ab	0,5±0,2
F-test	**	n.s.	**	**	n.s.

n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl, *statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 95 %, **statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 99 %, statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými parametry: odrůdou (a), lokalitou (b), ročníkem (c) a jakostním stupněm (d)

Tabulka V

Hodnocení obsahu prvků v závislosti na jednotlivých ročnících se statistickým vyhodnocením metodou ANOVA a minimální průkazné difference

Rok	Obsah Ca [mg l ⁻¹]	Obsah K [mg l ⁻¹]	Obsah Mg [mg l ⁻¹]	Obsah Na [mg l ⁻¹]	Obsah Zn [mg l ⁻¹]
2002	58,7	1072	105	4,77 ab	1,2
2003	(0,6±0,3)×10 ²	(0,82±0,15)×10 ³	(0,94±0,14)×10 ²	6±4 a	0,7±0,3
2004	(0,8±0,3)×10 ²	(0,9±0,2)×10 ³	(0,91±0,11)×10 ²	12±6 b	0,7±0,3
F-test	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.

n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl, *statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 95 %, **statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 99 %, statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými parametry: odrůdou (a), lokalitou (b), ročníkem (c) a jakostním stupněm (d)

možné se pokusit zjistit autenticitu vín na základě jejich geografického původu. Analýzy obsahu vápníku, draslíku, hořčíku, sodíku, zinku na základě jednotlivých lokalit jsou uvedené v tabulce IV. Statisticky průkazné rozdíly mezi lokalitami bylo možné zjistit na základě obsahu vápníku, hořčíku a sodíku.

Nejvyšší obsah vápníku byl zjištěn na lokalitě Mikulov – na této lokalitě je vidět jasný vztah s geologickým podložím lokality, které je vápencové. Lokalita Mikulov se odlišuje od všech ostatních lokalit. Nejnižší obsah vápníku byl stanovený na lokalitě Archlebov, která je rovněž odlišná od všech ostatních lokalit. Na základě obsahu draslíku nebylo možné rozlišit vína na základě jejich geografického původu. Nejvyšší obsah draslíku byl analyzován na lokalitách Mikulov a Valtice, nejnižší na lokalitách Jevišovka a Dobré Pole. Rovněž u těchto dvou lokalit je podobný geologický základ. Lokality je možné rozlišit i na základě

obsahu hořčíku. Nejvyšší obsah hořčíku byl stanovený na lokalitě Žarošice – tato lokalita se svými víny odlišuje od všech ostatních. Nejnižší obsah hořčíku byl nalezený na lokalitě Hrušky. Nejvyšší obsah sodíku byl stanoven ve vínech z lokality Dobré Pole. Nejnižší obsah sodíku byl nalezen ve vínech z geologicky příbuzných lokalit Žarošice a Archlebov. Na základě obsahu zinku byly potom mezi lokalitami statisticky nevýznamné rozdíly. Nejnižší obsah zinku byl zjištěn na lokalitě Jevišovka, nejvyšší na lokalitě Mikulov.

Hodnocení jednotlivých minerálních látek v závislosti na ročníku ukazuje detailně tabulka V. Výsledky ukazují, že podle většiny sledovaných minerálních látek není možné rozlišit jednotlivé ročníky. Podobných výsledků bylo dosaženo i u rozlišení jakostních stupňů vína, které jsou zobrazeny v tabulce VI.

Tabulka VI

Hodnocení obsahu prvků v závislosti na jakostním stupni vína se statistickým vyhodnocením metodou ANOVA a minimální průkazné diference

Jakostní stupeň	Obsah Ca [mg l ⁻¹]	Obsah K [mg l ⁻¹]	Obsah Mg [mg l ⁻¹]	Obsah Na [mg l ⁻¹]	Obsah Zn [mg l ⁻¹]
Jakostní	41±4	(0,89±0,16)×10 ³	105±2	4±1 a	0,9±0,4
Pozdní sběr	(0,8±0,3)×10 ²	(0,9±0,2)×10 ³	(0,92±0,13)×10 ²	8±4 ab	0,7±0,3
Výběr z hroznů	(0,7±0,3)×10 ²	(0,8±0,2)×10 ³	(0,90±0,11)×10 ²	13±8 b	0,7±0,3
F-test	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl, *statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 95 %, **statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 99 %, statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými parametry: odrůdou (a), lokalitou (b), ročníkem (c) a jakostním stupněm (d)

Analýza geografického původu a případně odrůdy je nejhodnější na základě vícenásobné statistické analýzy s využitím údajů získaných z měření jednotlivých minerálních látek. Celkové výsledky byly vyhodnoceny metodou hroznové statistické analýzy s cílem získat dendrogram rozdělení jednotlivých odrůd révy vinné a jednotlivých lokalit. K analýze byla využita Euklidova metoda, metodou nejbližšího souseda. S využitím této statistické metody se podařilo zřetelně rozdělit sledovaná vína na skupinu červených vín a skupinu bílých vín. V dendrogramu můžeme najít skupiny, které mají logickou souvislost. V prvním shluku jsou odrůdy Frankovka (FR) a Zweigeltrebe (ZW), které jsou geneticky příbuzné. Dále můžeme v diagramu vidět příbuznost dvou vzorků odrůdy Zweigeltrebe (ZW) a jednoho vína z odrůdy André. I zde se jedná o odrůdy se stejným genetickým základem. V části obsahující bílá vína můžeme najít shluk tvořený odrůdami Rulandské bílé a Chardonnay, které jsou rovněž geneticky příbuzné. Na základě provedených analýz však lze konstatovat, že nedošlo k rozlišení jednotlivých odrůd, ale pouze vín podle barvy.

Podle rozlišení vín na základě geografického původu dendrogram zřetelně oddělil vína z lokalit Žarošice a Archlebov. Tyto lokality patří navzájem logicky k sobě, protože spolu sousedí a navazují na sebe geologickými i půdními podmínkami. Obě lokality patří do vinařské podoblasti Slovácko. Zřetelně se rovněž odděluje lokalita Dobré Pole a Mikulov. Tyto lokality patří do Mikulovské vinařské podoblasti a zejména lokalita Mikulov je typická svým vápenatým geologickým základem. Jako příbuzné se jeví lokality Hrušky a Valtice, doplňované lokalitou Novosedly.

Závěr

Odrůda révy vinné má velmi důležitý vliv na obsah kovů ve víně. Obsah kovů ve víně je určen dostupností těchto látek z půdy, výživě a hnojení. Obsah prvků je urč-

ný rovněž geologickým původem půdy. Na jejich základě je proto možné odlišit vína podle regionu jejich původu – stanovení obsahu kovů ve víně je proto dobře využitelný nástroj k rozlišení vín různého geografického původu. 27 moravských odrůdových vín se podařilo rozlišit na základě odrůdy a geografického původu podle obsahu vápníku, hořčíku a sodíku.

Tato práce byla realizována ve spolupráci s Celně technickou laboratoří Generálního ředitelství cel v Praze. Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (Výzkumný záměr MSM 6046070901).

LITERATURA

1. Arvanitoyannis I.S., Kallithraka S., Kefalas P., El-Zajouli A., Soufleros E., Psarra E.: *Food Chem.* 53, 501 (2001).
2. Arvanitoyannis I.S., Katsota M.N., Psarra E.P., Soufleros E.H., Kallithraka S.: *Trends Food Sci. Technol.* 10, 321 (1999).
3. Almeida C.M.R., Vasconcelos M.T.S.D.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 4788 (2003).
4. Thiel G., Geisler G., Blechschmidt I., Danzer K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1630 (2004).
5. Siegmund H., Bächmann K.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 164, 1 (1977).
6. Baxter M.J., Crews H.M., Dennis M.J., Goodall I., Anderson D.: *Food Chem.* 60, 443 (1997).
7. Latorre J.M., Garcia-Jares C., Medina B., Herrero C.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 1451 (1994).
8. Marengo E., Aceto M.: *Food Chem.* 81, 621 (2003).
9. Moret I., Scarponi G., Cescon P.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 1143 (1994).
10. Seeber R., Sferlazzo G., Leardi R.: *J. Agric. Food Chem.* 39, 1764 (1991).
11. Day M.P., Zhang B.L., Martin G.J.: *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 79 (1994).

I. Poustková^{a*}, L. Babička^a, L. Krejčí^a, A. Méhes^b, J. Mazáč^b, J. Poustka^c, and L. Staruch^d
(^aDepartment of Quality of Agricultural Products, Czech University of Life Sciences in Prague, Czech Republic, ^bCustoms Technical Laboratory, General Directorate of Customs, Prague, Czech Republic, ^cDepartment of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology in Prague, Czech Republic, ^dInstitute of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovak Republic): Authenticity of Moravian Wines

Determination of food authenticity is one of the most crucial issues in food quality control and safety. The introduction of new techniques, in conjunction with greater consumer demands and expectation for safer products, gives tremendous impetus to food quality assurance. Wine adulteration, mainly in terms of varieties and regions of origin, has been very widespread. Authenticity of wine has been extensively investigated because wine is an easy adulterated product. For authenticity analysis of wines are used these chemical compounds: mineral compounds,

isotopic ratios, phenol compounds, aromatic compounds, amino acids and amines. The aim of this work was analysis of wine authenticity with utilisation of mineral compounds (Ca, K, Mg, Na, and Zn). Mineral contents of wines depend on several factors including grape variety, area of production, soil characteristic, and environmental conditions. Their determination has been considered to be of great interest because it allows the definition of a “fingerprint” for each of them and represents one of the criteria used for evaluating the identity and authenticity of wine.

27 wines were analysed in this work. Wines originated from white and red grapevine varieties and different geographical localities. According to contents of calcium, magnesium and sodium it is possible grape varieties and geographical origin of wines. The results of this work are very interesting from geographical origin of wines. Cluster analysis show very significant distinguishes single localities. The localities from wine sub-region “Slovácko”, the village’s Žarošice and Archlebov are very different from other localities.

ANALÝZA VEDLEJŠÍCH PRODUKTŮ FERMENTACE NÁPOJŮ

IVANA POUSTKOVÁ^a, LUBOŠ BABIČKA^a, LUCIE KREJČÍ^a, TOMÁŠ HOSNEDL^b, PAVEL HAVELEC^b, JAN POUSTKA^c a LADISLAV STARUCH^d

^a Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, ^b Celně-technické laboratoře, Generální ředitelství cel, Budějovická 7, 140 96 Praha 4, ^c Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^d Ústav biotechnologie a potravinářství, Fakulta chemické a potravinářské biotechnologie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
poustkova@af.czu.cz

Úvod

V současnosti se začínají objevovat nápoje nazývané „alcopops“, u kterých nelze jednoznačně říci, zda se jedná o fermentované nápoje nebo o lihoviny. Přidavek lihovin (ethylalkoholu) může být v jistých případech detegován izotopovými metodami, jestliže je botanický původ přidaného alkoholu odlišný od fermentovaného alkoholu a pokud se izotopové hodnoty dostatečně liší. Pokud však má přidaná lihovina stejný botanický původ, potom je zcela nemožné určit, zda byl k podezřelému výrobku přidán ethylalkohol a tím pádem se již nejedná o čistý fermentovaný výrobek. Z tohoto důvodu byla práce zaměřena na validaci metod pro stanovení vedlejších produktů fermentace – glycerolu, 2,3-butandiolu (L, D a meso formy), kyseliny jantarové a kyseliny šikimové (nevyskytují se ani ve stopových množstvích před fermentací).

Obsah ethanolu ve víně a pívu je různý – závisí na typu piva a vína a na stupni prokvašení. Jsou uváděny jeho hodnoty ve víně v rozmezí od 45 do 160 g l⁻¹, což odpovídá 9 až 13 obj.% (cit.¹⁻³), pro pivo u 10 % světlých piv rozsah 2,7 až 3,1 hm.% a u 12 % světlých piv rozsah 3,5 až 4 hm.%. Tmavá piva mají nižší obsah ethanolu následkem nižšího prokvašení⁴. Glycerol vzniká jako vedlejší produkt přeměny glukózy při lihovém kvašení, a to převážně na počátku a je vytvářen především divokými kvasinkami³. Při destilaci lihu, vzhledem k jeho bodu varu, do surového lihu nepřechází⁵. Obsah glycerolu ve víně se pohybuje v rozmezí 4–20 g l⁻¹, v pívu v rozmezí 1,5–3,1 g l⁻¹ (cit.^{1,4}). 2,3-Butandiol vzniká činností různých mikroorganismů, kvasinek a bakterií, nejspíše vzniká bakteriálním rozkladem kyseliny citronové⁶. Ve víně se nachází

v množství 0,3 až 1,35 g l⁻¹, u piva je to v koncentraci 0,1 až 0,3 g l⁻¹ (cit.^{1,2}). Kyselina jantarová se v potravinářském průmyslu používá k zesilování chuťových vlastností masných výrobků, jako ochucovadlo a regulátor kyselosti⁷. Kyselina jantarová vzniká především odbouráním kyseliny jablečné kvasinkami, a je tak pravidelně vznikajícím vedlejším produktem kvašení. Její obsah se v průměru ve vínu pohybuje do 1 g l⁻¹ (cit.^{1,3}). Kyselina šikimová vzniká fermentací pomocí geneticky upravených bakterií *Escherichia coli*, která neumožňuje biosyntézu aromatických aminokyselin⁸. V množství kyseliny šikimové ve víně se autoři velice liší – u chorvatských vín byly zjištěny hodnoty v rozmezí 5–21 mg l⁻¹ (cit.⁹), u chilských to bylo méně 1–12 mg l⁻¹ (cit.¹⁰).

Bylo analyzováno čtyřicet vzorků vína a čtyřicet vzorků piv pocházejících z české tržní sítě.

Experimentální část

Bylo analyzováno 40 vzorků vína a 40 vzorků piv pocházejících z České republiky. U vína se jednalo o dva ročníky, a to o ročník 2007 (29 vzorků) a 2006 (10 vzorků). U jednoho vzorku nebyl ročník uveden. Všechna vína měla objem 0,75 l, byla různých odrůd a byla z různých vinařských závodů. U vzorků piv se jednalo o piva z různých pivovarů, různých druhů a různého množství alkoholu. Všechna byla ve skle o objemu 0,5 l, jednovzorek bylo pivo ve skle o objemu 0,33 l a čtyři vzorky byla piva v plechu o objemu 0,5 l.

Ethanol a glycerol byly stanoveny u vína i piva. Vzorek byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 μm (RC 0,45 μm, UNIFLO® 13, Whatman, USA) a analyzován pomocí HPLC (Agilent 1200 Series, USA) s refraktometrickou detekcí (RI 101, SHODEX, USA). Podmínky stanovení byly následující: kolona IEX 300 (300 × 8 mm, 8 μm, WATREX, Česká republika), teplota kolony 80 °C, mobilní fáze: 0,005 M H₂SO₄, průtok 1,2 ml min⁻¹.

2,3-butandiol byl stanoven ve vzorcích vína a piva. 300 μl vzorku bylo předloženo do 25ml Erlenmayerovy baňky a bylo přidáno 5 ml dichlormethanu obsahujícího interní standard 1,5-pentadiol o koncentraci 10 mg l⁻¹. Voda obsažená ve vzorku byla odstraněna přidáním cca 1,7 g síranu sodného. Obsah baňky byl třepán po dobu 1 minuty a poté byla dichlormethanová fáze přelita do 25ml odpařovací baňky obsahující 600 μl čistého ethanolu. Zbylý síran sodný byl propláchnut dvakrát 5 ml dichlormethanu a organické fáze byly spojeny v odpařovací baňce. Analyty v roztoku byly zakonzentrovány pomocí rotační vakuové odpařky a analyzovány pomocí GC (Agilent 6890N) s plamenově ionizačním detektorem (FID). Podmínky GC stanovení byly následující: kolona RTX624

(30 m × 0,33 mm × 1,8 μm, Restek, USA), nosný plyn He, split 25 ml min⁻¹, teplota nástřiku 250 °C, nástřik 1 μl, teplota detektoru 250 °C, teplotní program: 50 °C po dobu 1 min, poté nárůst 10 °C min⁻¹ do 200 °C, vydrž 1 min.

Kyselina jantarová byla analyzována jen u vína. Vzorek byl 100× naředěn, poté přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 μm (RC 0,45 μm, UNIFLO® 13, Whatman, USA) a následně analyzován pomocí kapilární izotachofórey

Tabulka I

Obsah ethanolu, glycerolu, kyseliny jantarové, kyseliny šikimové a 2,3-butandiolu ve vzorcích vína

Vzorek vína	Obsah ethanolu [g l ⁻¹]	Obsah glycerolu [g l ⁻¹]	Obsah kyseliny jantarové [mg l ⁻¹]	Obsah kyseliny šikimové [mg l ⁻¹]	Obsah L,D formy 2,3-butandiolu [mg l ⁻¹]	Obsah meso formy 2,3-butandiolu [mg l ⁻¹]
1	88,43	4,87	416,50	20,60	275,95	75,55
2	83,71	4,40	357,00	21,55	223,17	65,72
3	84,53	6,37	777,00	24,75	281,25	65,49
4	95,82	5,41	614,00	16,85	325,32	94,16
5	114,65	6,83	517,50	14,75	444,15	135,76
6	98,91	5,33	489,50	25,90	280,30	82,83
7	84,67	6,57	442,00	7,85	272,26	66,30
8	99,18	5,37	421,00	13,50	299,64	82,98
9	103,72	6,42	836,50	12,25	310,02	79,89
10	93,02	5,20	435,50	32,25	335,67	99,47
11	84,37	6,51	593,50	17,50	281,94	70,28
12	111,63	6,96	526,50	23,10	510,28	149,08
13	95,88	7,64	1049,00	11,95	375,56	98,60
14	95,00	6,48	485,00	7,60	312,41	92,39
15	80,77	4,86	334,50	11,10	190,07	51,90
16	82,61	5,27	370,00	14,90	188,73	50,84
17	95,85	7,96	645,50	27,15	468,93	151,02
18	95,12	7,92	615,50	39,00	505,52	165,52
19	99,89	8,97	628,50	29,45	527,49	156,31
20	104,31	7,93	574,50	26,90	481,22	164,41
21	92,67	5,74	477,00	18,95	303,75	89,82
22	89,42	6,93	556,50	20,55	386,75	115,29
23	97,87	6,61	443,00	14,40	265,48	84,05
24	106,30	7,64	627,00	37,25	426,37	127,71
25	108,66	5,90	433,00	14,05	331,32	103,23
26	102,81	6,91	479,50	14,60	608,12	183,74
27	111,19	8,35	474,00	23,20	576,19	175,37
28	103,15	6,21	356,50	16,20	345,24	102,06
29	103,16	7,22	457,50	15,80	561,81	168,56
30	110,20	7,53	423,00	22,60	497,05	145,22
31	108,32	9,51	1019,50	31,25	422,81	119,18
32	109,32	9,41	1024,00	27,60	408,00	114,86
33	101,24	7,31	448,00	42,65	399,11	117,59
34	109,98	6,72	407,00	19,6	419,29	121,33
35	104,78	6,67	388,00	19,15	429,93	124,79
36	106,17	6,84	412,00	15,75	372,62	111,13
37	112,33	6,60	524,00	20,25	332,91	95,21
38	104,97	9,90	895,50	34,75	421,23	128,09
39	104,06	9,08	913,00	32,65	430,07	140,09
40	112,85	9,31	925,50	9,95	847,03	281,02

Tabulka II

Obsah ethanolu, glycerolu, kyseliny jantarové, kyseliny šikimové a 2,3-butandiolu ve vzorcích vína

Vzorek piva	Obsah ethanolu [g l ⁻¹]	Obsah glycerolu [g l ⁻¹]	Obsah L,D formy 2,3-butandiolu [mg l ⁻¹]	Obsah meso formy 2,3-butandiolu [mg l ⁻¹]
1	41,41	1,59	227,90	57,78
2	37,67	1,33	57,33	23,22
3	32,70	0,99	59,40	22,80
4	31,82	1,07	46,44	17,84
5	41,41	1,39	60,96	16,70
6	39,02	1,68	50,42	17,54
7	33,82	1,15	51,02	17,23
8	32,20	1,02	76,41	23,51
9	32,82	1,03	82,05	23,13
10	33,00	1,13	47,70	12,77
11	36,03	1,35	72,84	27,24
12	36,29	1,37	70,48	26,63
13	33,75	0,97	59,87	24,21
14	94,02	4,65	476,08	146,76
15	37,34	1,35	75,36	19,80
16	40,92	1,57	73,74	28,88
17	37,43	1,53	78,77	35,02
18	39,44	1,58	70,75	29,19
19	74,79	3,85	430,20	117,07
20	47,49	1,88	96,09	45,49
21	39,03	1,57	70,65	26,67
22	36,04	1,44	54,46	17,93
23	36,89	1,44	80,01	41,95
24	35,74	1,36	74,93	30,31
25	56,35	1,83	106,68	32,43
26	39,60	1,45	62,65	21,90
27	38,21	1,44	67,21	26,61
28	37,00	1,56	64,77	31,35
29	39,78	1,62	71,82	36,76
30	26,76	1,10	88,97	19,43
31	35,58	1,39	66,26	18,90
32	40,40	1,63	78,79	37,35
33	34,63	1,30	53,31	29,87
34	28,23	1,04	43,74	13,40
35	19,84	0,78	41,85	12,58
36	25,64	0,90	44,98	13,23
37	27,36	0,96	38,84	12,07
38	32,13	1,23	67,04	18,63
39	41,72	1,49	65,33	22,75
40	40,60	1,37	58,12	13,73

(Villa Labeco EA 202A, Slovensko). Podmínky izotachografie byly následující: kapilára 160 × 0,3 mm, vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl, 12 mM β-alanin, 1% HPMC, koncový elektrolyt: 5 mM kyselina kapronová, předseparační

proud 350 μA, hnací proud 70 μA, koncový proud 25 μA.

Kyselina šikimová byla stanovována jen u vína. Vzorek byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 μm (RC 0,45 μm, UNIFLO® 13, Whatman, USA), poté následovala analýza

pomocí HPLC/DAD (Agilent 1200 Series, USA): kolona Biospher C18 (250 × 4 mm, 5 μm, WATREX, Česká republika) v tandemu s IEX (300 × 8 mm, 8 μm, WATREX, Česká republika), mobilní fáze: 0,005 M H₂SO₄, průtok mobilní fáze 0,8 ml min⁻¹, teplota kolony 60 °C, detekce 210 nm.

Výsledky a diskuse

U vína byl na čtyřiceti vzorcích od různých vinařů měřen ethanol, glycerol, kyselina jantarová, kyselina šikimová a 2,3-butandiol (tabulka I). Všechna vína měla objem 0,75 l, byla různých odrůd a byla z různých vinařských závodů. U vín od čísla 1 po číslo 16 byla vína připravena na zakázku a jejich původ, přesněji řečeno původ hroznů, byl jak z oblasti české, tak z oblasti moravské. Vína s číslem 17 a 18 pocházela z Templářských sklepů v Čejkovicích, u vín s číslem 19 a 20 byl výrobce Znovín ze Znojma, víno číslo 21 pocházelo od Spielberga, víno 22 a 23 bylo od jednoho z největších výrobců, a to ze závodu Vinium z Velkých Pavlovic, víno číslo 24 bylo víno od Patria Kobylí a poslední skupina – vína od čísla 25 do čísla 40 – pocházela z Valtic, od firmy Moravino. Z větší části se jednalo o přívlastková vína, bílá, suchá.

U piva byl na čtyřiceti vzorcích od různých pivovarských společností měřen ethanol, glycerol a 2,3-butandiol (tabulka II). U vzorků piv se jednalo o piva z různých pivovarů, různých druhů a různého množství alkoholu. Všechna byla ve skle o objemu 0,5 l, pouze vzorek číslo 17 bylo pivo ve skle o objemu 0,33 l a vzorky číslo 13, 14, 39, 40 byla piva v plechu o objemu 0,5 l. Pokud jde o výrobce, jednalo se o pivovary Staropramen (vzorek č. 1, 6, 8, 9 a 39), Plzeňský Prazdroj (vzorek č. 2, 3, 4, 7, 11, 12, 13, 36, 37 a 38), Budějovický Budvar (vzorek č. 5, 10, 34 a 40), pivovar Holba (č. 35), pivovar Náchod (č. 14, 19), pivovar Svijany (č. 15), pivovar Rohozec (č. 16, 21), Žatecký pivovar (č. 17), pivovar Kutná Hora (č. 18), pivovar Nymburk (č. 20), pivovar Zubr (č. 22), Jihomoravské pivovary (č. 23), pivovar Pernštejn (č. 24), pivovar z Ústí nad Labem (č. 25), Bohemia Regent (č. 26), Městský pivovar Platan (č. 27), Budějovický měšťanský pivovar (č. 28, 33), pivovar Chodovar (č. 29), pivovar Klášter (č. 30), Litovel (č. 31) a pivovar Černá Hora (č. 32). Ve většině případů se jednalo o světlé ležáky.

Před samotným proměřováním reálných vzorků vín a piv byly vyvinuty a/nebo optimalizovány metody pro stanovení námi sledovaných vedlejších produktů fermentace (glycerolu, 2,3-butandiolu, kyseliny jantarové, kyseliny šikimové). Pro stanovení ethanolu a glycerolu byly použity již dříve známé metody, proběhla tedy jen jejich validace. Pro stanovení 2,3-butandiolu byla zkoušena metoda kapalinové i plynové chromatografie. Na kapalinovém chromatografu však nebyly výsledky uspokojivé (problém s detekcí meso formy 2,3-butandiolu), proto byla dále optimalizován postup přípravy vzorku pro plynovou chromatografii do podoby zmíněné výše. Kyselina jantarová byla

nejprve stanovována kapalinovou chromatografií za pomoci proplachování přes různé druhy ionexů (Dowex 1×8, MIXBED, Biorex), na kterých se kyselina jantarová měla zachytit a pomocí roztoku kyseliny sírové měla být vymyta. Bohužel výsledky ani s jedním s ionexů nebyly uspokojivé, proto byla použita kapilární izotachoforéza v dvoukapilárním systému s předseparační kolonou. Pro kyselinu šikimovou byla již existující metoda pouze validována.

Při srovnání naměřených hodnot námi sledovaných analytů s hodnotami uváděnými v literatuře nebyly nalezeny výrazné rozdíly. Pro víno vycházely tyto hodnoty: ethanol 81–115 g l⁻¹, glycerol 4–10 g l⁻¹, 2,3-butandiol 0,2–1,1 g l⁻¹, kyselina jantarová 0,3–1 g l⁻¹ a jen kyselina šikimová se od údajů v literatuře lišila vyšší horní hranicí – námi analyzované vzorky se pohybovaly v rozmezí 7–43 mg l⁻¹ oproti 5–21 mg l⁻¹ (cit.9) a 1–12 mg l⁻¹ (cit.10). U vzorků piva všechny zjištěné hodnoty byly v souladu s údaji uvedenými v literatuře. Hodnota naměřeného ethanolu se nacházela v rozmezí od 20 do 94 g l⁻¹ a glycerolu od 0,8 do 4,7 g l⁻¹. Hodnoty 2,3-butandiolu byly mírně vyšší – od 0,05 do 0,6 g l⁻¹ oproti literatuře, která uvádí obsah 0,1 až 0,3 g l⁻¹ (cit.2).

Všechna získaná data byla podrobena statistickému vyhodnocení, kde se měla nalézt závislost mezi obsahem výše zmíněných látek a obsahem ethanolu, který byl paralelně u všech vzorků také stanovován. Byla vytvořena korelační matice pro víno a pivo, kdy u piva byly výsledky velmi pozitivní (korelační koeficienty se blížily hodnotě 1). U vína tomu tak nebylo, na prokázání pravosti je nutné stanovovat pro jistotu více jednotlivých složek fermentace.

Závěr

Cílem této práce bylo získání vědeckých podkladů, na jejichž základě by bylo možné rozlišit pivo a víno jako čisté fermentované nápoje od nápojů, do nichž výrobce přidal etylalkohol – hlavně z hlediska výše spotřební daně (spotřební daň na alkoholické nápoje není jednotná a u každé skupiny se velmi liší). Byl proveden pokus nalézt takovou metodu, která by byla schopná určit, je-li analyzovaný fermentovaný nápoj čistý nebo zda byl připraven smícháním plně fermentovaného nápoje s etanolem nebo lihovinou. Z toho důvodu byly vybrány sledované sloučeniny, které vznikají jako vedlejší produkty fermentace a nevyskytují se ani ve stopových množstvích před fermentací. Získaná data byla statisticky zpracována s cílem nalézt závislost mezi obsahem výše zmíněných látek a obsahem ethanolu. Dle získaných výsledků je patrné, že míra závislosti jednotlivých sloučenin na sobě je u vína velice slabá, tedy při kontrole zboží bude nutné stanovovat více vedlejších produktů fermentace, aby bylo zcela jisté, že byl fermentovaný nápoj upravován. Naproti tomu u piva je síla závislosti velká, a proto bude možné proměřovat vždy jen dva vybrané vedlejší produkty fermentace.

Tato práce byla realizována ve spolupráci s Celně technickou laboratoří Generálního ředitelství cel v Praze. Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (Výzkumný záměr MSM 6046070901).

LITERATURA

1. Krumphanzl V.: *Kvasná chemie a technologie – Vinařství*. SNTL, Praha 1970.
2. Belitz H. D., Grosch W.: *Food Chemistry*. Springer, Berlin 1999.
3. Steidl R.: *Sklepní hospodářství*. Radix, Praha 2002.
4. Basařová G., Čepička J.: *Sladařství a pivovarství*. SNTL, Praha 1985.
5. Kubánek V.: *Lih a lihoviny*. Generální ředitelství cel, Praha 2007.
6. Farkaš J.: *Technologie a biochemie vína*. SNTL, Praha 1982.
7. Vodrážka Z.: *Biochemie*. Academia, Praha 1996.
8. Krämer M., Bongaerts J., Bovenberg R., Kremer S., Müller U., Orf S., Wubbolts M., Raeven L.: *Metab. Eng.* 5, 277 (2003).
9. Maletić E., Kontić J. K., Preiner D., Jeromel A., Patz C. D., Dietrich H.: *J. Food, Agric. Environ.* 7, 48 (2009).
10. Mardones C., Hitschfeld A., Contreras A., Lepe K., Gutierrez L., von Baer D.: *J. Chromatogr.* 1085, 285 (2005).
11. Day M.P., Zhang B.L., Martin G.J.: *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 79 (1994).

I. Poustková^{a*}, L. Babička^a, L. Krejčí^a, T. Hosnedl^b, P. Havelec^b, J. Poustka^c, and L. Staruch^d
^aDepartment of Quality of Agricultural Products, Czech University of Life Sciences in Prague, Czech Republic, ^bCustoms Technical Laboratory, General Directorate of Customs, Prague, Czech Republic, ^cDepartment of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology in Prague, Czech Republic, ^dInstitute of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovak Republic): **Analysis of By-Products of Fermentation of Beverages**

The aim of this work was to obtain scientific data, which could help to distinguish pure fermented beverages, i.e. wine and beer, and beverages where ethylalcohol was added by producers. In such cases, it is a very difficult to determine consumption tax level. Consumption tax is vari-ous in each group of alcoholic beverages. For this reason it was decided to find a method that would have been able to determine to: if analyzed fermented drink is pure or whether it was prepared by mixing fully fermented beverage with ethanol or spirit. Four compounds which appear as by-products of fermentation were chosen – glycerol, 2,3-butanediol (L,D and meso form), succinic acid and shikimic acid, which do not appear even in trace quantities before fermentation. Selected analytical methods have been tested for all compounds. It was analyzed forty samples of wines and forty samples of beers. All samples were of Czech origin and all were analyzed by verified methods. Obtained data were subjected to statistical interpretation and should have been found dependence between contents of mentioned compounds and content of ethylalcohol.

Obtained results show that dependency rate of individual compounds in wine is very weak. It means it is necessary to establish more by-products of fermentation to identify fermented beverages and beverages enriched with ethylalcohol. In contrast, beers have strong dependency rate between tested compounds. It means that it would have been enough to establish only two selected by-products of fermentation. Also were established limits in which individual by-products of fermentation may be found in beers and wines.

VYUŽITÍ FT-NIR SPEKTROMETRIE PRO HODNOCENÍ BARVY SALÁMŮ

**ZUZANA PROCHÁZKOVÁ^a,
MICHAELA DRAČKOVÁ^a, ALENA
SALÁKOVÁ^b, LEO GALLAS^b, MATĚJ
POSPIECH^c, LENKA VORLOVÁ^a,
BOHUSLAVA TREMLOVÁ^c
a HANA BUCHTOVÁ^b**

^a Ústav hygieny a technologie mléka, ^b Ústav hygieny a technologie masa, ^c Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika
zprochazkova@vfu.cz

Úvod

Konvenční metody používané ke stanovení fyzikálně – chemických parametrů masných výrobků jsou časově náročné, pracné a finančně nákladné. Blízká infračervená spektrometrie je moderní, nedestruktivní a vysoce senzitivní metoda s možností simultánního stanovení několika parametrů. Umožňuje kontrolu jakosti potravinářských surovin, meziproductů i finálních výrobků a stanovení takových parametrů jako je obsah vody, sacharidů, bílkovin a také elektrické vodivosti, pH a dalších parametrů^{1,2}. Během posledních tří desetiletí se ukázalo, že NIR je velmi efektivní a perspektivní metodou pro zhodnocení kvality masa i masných výrobků^{3,4}.

Kvalita masa a masných výrobků je úzce spjata s viditelnými charakteristikami, především s barvou masa. Při výběru masa a masných výrobků je barva pro spotřebitele rozhodující vlastností, podle které se orientují při nákupu⁵. Je spojena s ostatními senzoricými vlastnostmi masa, jako je křehkost a šťavnatost. Všechny tyto charakteristiky závisí na kvalitě masa, případně výskytu jakostních odchylek (PSE, DFD) a na způsobu balení masa a použité atmosféře. Barva masa je v masném průmyslu rutinně využívána pro klasifikování kvality vepřového masa⁶. Mnohé práce popisují stanovování barvy masa a masných výrobků v souvislosti s druhem atmosféry použité při balení a se způsobem skladování^{7–10}.

Cílem naší práce bylo zjistit možnosti použití FT-NIR spektrometrie jako rychlé a senzitivní metody pro stanovení barvy salámů.

Materiál a metodika

V této studii bylo provedeno vyšetření 42 vzorků salámu Vysočina vyrobeného v technologické dílně na

Ústavu hygieny a technologie masa na VFU Brno. Před analýzou byly salámy uchovávány v souladu s platnou legislativou.

K měření barvy salámů byl použit spektrofotometr Minolta CM-2600d (Konica Minolta, Japonsko), přístroj byl před měřením nakalibrován na bílou a černou barvu. Jako zdroj bylo použito denní světlo D₆₅ a standardní úhel pozorovatele 10° s použitím měřicí clony o průměru 3 mm. Měření probíhalo v režimu CSI, který měří reflektanci včetně rozptýlených složek. Každý salám byl změřen pětikrát na různých řezech a k vyhodnocení bylo použito průměrné hodnoty ze všech pěti měření. K vyhodnocení byl použit program Spectra Magic 3.1 (Konica Minolta, Japonsko). Barva salámů byla hodnocena v systému CIE L*a*b*, kde L* je světlost, a* je podíl červené barvy a b* je podíl žluté barvy. Pro lepší popis barvy a barevných rozdílů slouží další veličiny: h (odstín barvy) a C* (syttost barvy).

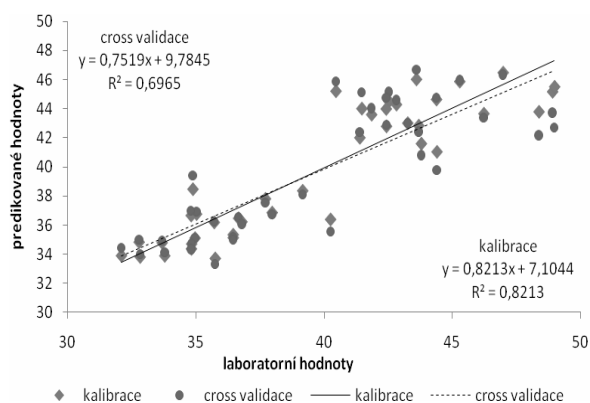
Pro účely měření na FT-NIR spektrometru byly vzorky salámu homogenizovány rozmixováním. Každý vzorek byl změřen třikrát, pro kalibraci bylo použito průměrné spektrum. Vzorky byly proměřeny na spektrometru NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, Madison, USA) ve spektrálním rozsahu 10 000–4000 cm⁻¹ se 100 scany. Čas snímání jednoho spektra se pohyboval okolo 1,5 min. Spektra byla měřena na integrační sféře v režimu reflektance s kompresní kyvetou. Naměřená data byla zpracována pomocí programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) a ověřena pomocí cross validace. Pro identifikaci odlehlých spekter a standardů byly použity diagnostiky Spectrum Outlier a Leverage. Dále byl zvolen optimální počet PLS faktorů pro kalibraci (PRESS).

Výsledky analýz byly zpracovány programem Microsoft Excel 2003. U všech referenčních ukazatelů byly vy počteny souhrnné statistické charakteristiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum).

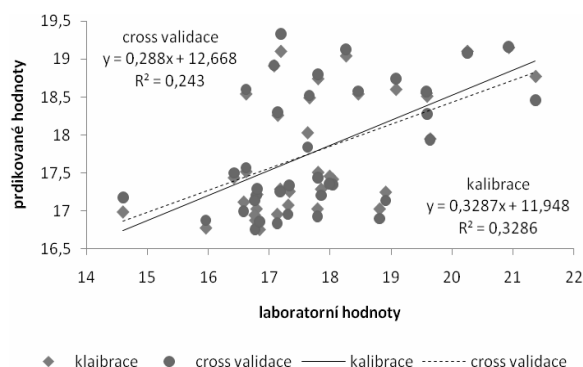
Výsledky a diskuse

Spektra vzorků byla měřena v rozsahu vlnočtů 10 000–4000 cm⁻¹. Rozpětí referenčních hodnot pro dané parametry byla vyjádřena pomocí směrodatných odchylek průměru (tab. I).

Pomocí diagnostických nástrojů Spectrum Outlier a Leverage byly odstraněny odlehlé standardy, u kterých byly nepřesně stanoveny referenční hodnoty nebo se objevila spektrální odchylka. Kalibrační modely pro podíl červené barvy, podíl žluté barvy a pro syttost barvy byly upraveny pomocí druhé derivace, ostatní modely byly vytvořeny bez použití derivace. Kalibrační modely (obr. 1 a 2) pro všechny sledované parametry byly vytvořeny pomocí PLS



Obr. 1. Kalibrační a validační model pro světlost



Obr. 2. Kalibrační a validační model pro sytost barvy

algoritmu. PLS využívá u vyšetřených vzorků spektrální a současně koncentrační informaci ke stanovení latentních proměnlivých PLS faktorů v souboru dat¹¹. Nejvyšší počet faktorů byl zaznamenan pro světlost (5 faktorů), nejmenší počet faktorů byl použit u parametrů podíl červené barvy a sytost barvy (1 faktor).

Na obr. 1 a 2 můžeme posoudit kalibrační a validační výsledky pro stanovení světlosti a sytosti barvy. V optimálním případě se regresní přímky pro kalibraci a cross validaci plně překrývají a pak se jedná o pevnou závislost. U obou uvedených parametrů bylo dosaženo dobrých výsledků. Neúplné překrývání se regresních přímek odpovídá vyšším hodnotám SEC a SECV (směrodatná odchylka kalibrace, směrodatná odchylka cross validace) u obou parametrů.

Spolehlivost kalibračního modelu byla ověřena křížovou validací. Pro vytvoření validačních modelů (obr. 1 a 2) byla použita stejná sada vzorků jako při kalibraci. Křížová validace představuje pevnou závislost mezi hodnotami referenčními a hodnotami predikovanými. Přesnost validace byla posouzena na základě korelačních koeficientů validace (R) a směrodatných odchylek kalibrace a validace (SEC a SECV)¹¹. Na základě posouzení hodnot parametrů kalibračních variačních koeficientů (CCV) a predikčních

variačních koeficientů (PCV) byla posouzena spolehlivost kalibračních modelů. Pokud CCV u žádného ze sledovaných parametrů nepřesáhne hodnotu 5 % a PCV hodnotu 10 % můžeme kalibraci i validaci posoudit jako vysoce spolehlivé, pokud jeden z nich přesahuje danou hodnotu, jedná se o spolehlivý model a pokud oba koeficienty přesahují dané hodnoty, jedná se o nespolehlivý model¹² (tab. II).

Nejllepší výsledky byly získány pro parametry světlost a sytost barvy, kdy bylo dosaženo nejvyšších korelačních koeficientů, avšak s poměrně vysokými hodnotami SEC a SECV, což koreluje s vysokými směrodatnými odchylkami zjištěnými v souboru referenčních hodnot. Pro ostatní parametry bylo dosaženo méně robustních, i když spolehlivých modelů, kromě parametru podíl žluté barvy, kde hodnoty CCV a PCV ukazují na nespolehlivost kalibračního modelu. Dosažené výsledky lze vysvětlit použitím malého souboru dat s příliš velkým rozpětím hodnot a nerovnoměrně zastoupenými hodnotami získanými referenčními metodami. Pro dosažení lepších výsledků by bylo potřeba doplnit soubor referenčních dat tak, aby rovnoměrněji pokrývaly celé rozpětí hodnot. To by umožnilo získání více spolehlivých kalibračních modelů pro všechny parametry.

Tabulka I

Hodnoty individuálních parametrů získané měřením barvy

Parametry	n	minimum	maximum	průměr	SD
L*	42	32,1	51,6	40,0	5,2
a*	42	11,5	18,3	15,0	1,6
b*	42	6,7	11,9	9,8	1,2
C*	42	13,9	21,4	17,9	1,6
h	42	27,1	40,5	33,2	3,5

n – počet vzorků, SD – směrodatná odchylka

Tabulka II

Kalibrační a validační výsledky individuálních parametrů stanovené pomocí FT-NIR spektrometrie

Parametry	Kalibrace			Cross validace			PLS
	R	SEC	CCV [%]	R	SECV	PCV [%]	
L*	0,906	2,050	5,16	0,835	2,690	6,77	5
a*	0,797	0,855	5,77	0,642	1,090	7,35	2
b*	0,452	0,992	10,20	0,178	1,140	11,72	1
C*	0,573	1,130	6,35	0,494	1,210	6,80	1
h	00824	1,980	5,69	0,767	2,280	6,86	3

R – korelační koeficient, SEC – směrodatná odchylka kalibrace, SECV – směrodatná odchylka cross validace, CCV – kalibrační variační koeficient, PCV – predikční variační koeficient, PLS – počet použitých PLS faktorů

Závěr

Zhodnocení výsledků bylo provedeno na základě korelace mezi referenčními hodnotami a hodnotami vypočtenými pomocí FT-NIR spektrometrie. Korelační koeficienty (R) se v optimálním případě přibližují hodnotě 1, což je pro použitelnost modelu nejvhodnější. Spolehlivost celého kalibračního modelu byla posouzena na základě korelačních variačních koeficientů (CCV) a predikčních variačních koeficientů (PCV). Pro většinu námi sledovaných parametrů byly získány spolehlivé kalibrační modely. Naše studie naznačuje možnost využití FT-NIR spektrometrie jako spolehlivé a vysoce senzitivní metody pro hodnocení barvy salámů.

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

LITERATURA

1. Cozzolino D., Corbella E.: *J. Api. Res.* 1-2, 16 (2003).
2. Rodriguez-Otero J. L., Hermida M., Centeno J.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 2817 (1997).
3. Prieto N., Andrés S., Giráldez F. J., Mantecón A. R., Lavín, P.: *Meat. Sci.* 74, 489 (2006).
4. Ripoll G., Albertí P., Panea B., Olleta J. L., Sañudo C.: *Meat. Sci.* 80, 697 (2008).
5. Tan J.: *J. Food Eng.* 61, 27 (2004).
6. Xing J., Ngadi M., Guenenc A., Prasher S., Garipey C.: *J. Food Eng.* 82, 138 (2007).
7. Esturk O. Ayham Z.: *J. Food. Process. Pres.* 33, 114 (2009).
8. Grobbel J. P., Dikeman M. E., Hunt M. C., Milliken G. A.: *J. Anim. Sci.* 86, 1191 (2008).
9. De Santos F., Rojas M., Lockhorn G., Brewer M. S.: *Meat. Sci.* 77, 520 (2007).
10. Viana E. S., Gomide L. A. M., Vanetti M. C. D.: *Meat. Sci.* 71, 696 (2005).
11. Sørensen L. K., Jepsen R.: *Int. Dairy J.* 8, 866 (1998).
12. Albanell E., Cáceres P., Caja G., Molina E., Gargouri I.: *J. AOAC Int.* 82, 755 (1999).

MOŽNOSTI VYUŽITIA TLC A IEC V KOMBINÁCIÍ SO SKENOVANÍM PRE VÝVOJ METÓD V HPLC ANALÝZE HUMÍNŮVÝCH LÁTOK

**JANKA RÁCZOVÁ, MILAN HUTTA
a JURAJ PESSL**

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

Úvod

Humínové látky sú pravdepodobne najrozšírenejšie prírodné organické zlúčeniny na zemskom povrchu ktoré vznikli chemickým a biologickým rozkladom organickej hmoty a syntetickou činnosťou mikroorganizmov. Sú pokladané za najdôležitejší zdroj organického uhlíka v pôdnom i vodnom prostredí a majú kľúčovú úlohu v prírode, pretože prispievajú k rastu rastlín, sú zodpovedné za štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy a tiež sa spájajú s väčšinou povrchových javov, ktoré v pôde nastávajú¹. Humínové látky sú najstabilnejšie časti organického materiálu v pôdach a môžu pretrvávajúť po tisíc rokov². Vznikajú mikrobiálnou degradáciou rastlinných pletív a látok (napríklad aromatických lignínových polymérov) a možno živočíšnych biomolekul rozptýlených v životnom prostredí po odumretí živých buniek. Popri spomenutých názoroch na ich štruktúru sa v poslednom desaťročí začína presadzovať tiež názor, že humusový materiál je supramolekulová štruktúra, ktorá je tvorená pomerne malými silne agregovanými bio-organickými molekulami (majúce relatívnu molekulovú hmotnosť <1000). Humínové látky na základe ich rozpustnosti delíme do 3 skupín: na humínové kyseliny (frakcia humínových látok, ktorá nie je rozpustná vo vode pri kyslých podmienkach (pH < 2) ale je rozpustná pri vyšších pH hodnotách), fulvokyseliny (frakcia humínových látok, ktorá je rozpustná vo vode pri všetkých pH hodnotách) a humíny (frakcia humínových látok, ktorá nie je rozpustná vo vode pri žiadnom pH ani v zásadách).

Humínové kyseliny (HK) sú všadeprítomné prirodzene sa vyskytujúce materiály, ktoré sú dôležitými prekursorami bituménov, ropy a uhlia. Vyskytujú sa v pôdach, sedimentoch, rašeline, uhlí, riekach, moriach, rastlinách a korálových skeletoch. Zvyšujú pôdnu úrodnosť, urýchľujú fotodegradáciu pesticídov a znižujú toxicitu ťažkých kovov. Znižujú účinnosť produkcie oxidov hliníka a produkciu karcinogénov počas rafinácie vody po ťažbe rúd¹.

Molekuly humínových látok majú hlavne vďaka karboxylovým a hydroxylovým skupinám záporný náboj. V závislosti od pH a iónovej sily roztoku, v ktorom sa nachádzajú, dochádza tiež k zmene tvaru týchto polyelektrolytov. V roztoku s vysokým pH alebo nízkou iónovou silou sú totiž roztiahnuté v dôsledku tzv. intramolekulárnej repulzie medzi zápornými skupinami v rámci jednotlivých molekúl. Súčasne pôsobí tzv. intermolekulárna repulzia

medzi zápornými skupinami susediacich molekúl, ktoré tak v silne alkalických roztokoch vytvárajú pravé roztoky. Pri pH < 7 alebo vysokej iónovej sile sú polyelektrolyty humínových látok stočené do klobiek a vytvárajú agregáty, čo vysvetľuje vyzrážanie humínových kyselín v kyslom prostredí, na rozdiel od kyslejších a teda aj zápornejších fulvokyselín. To znamená, že veľkosť makromolekul humínových látok je premenlivá a ako taká ťažko definovateľná.

Humínové kyseliny sú charakterizované ako organické zlúčeniny, ktoré sa získavajú z alkalického pôdneho extraktu pôsobením silných kyselín (HCl, H₂SO₄). Majú vyššiu molekulovú hmotnosť, obsahujú viac aromatických častíc a karboxylových skupín ako fulvokyseliny. Humínové kyseliny sú vo vode slabo rozpustné a s viacmocnými kationmi vytvárajú ťažko rozpustné zlúčeniny – humáty. Kyslý charakter humínových kyselín, a tým aj ich schopnosť výmeny kationov, závisí od prítomnosti –COOH skupín a v malej miere aj od alkoholových a fenolových –OH skupín. Množstvo týchto funkčných skupín je v humínových kyselinách mierne nižšie ako pri fulvokyselinách.

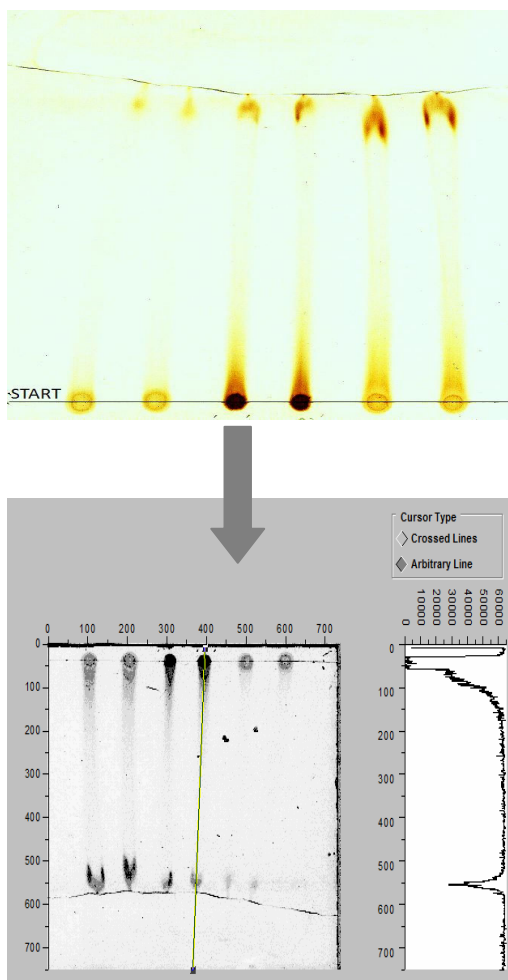
Schopnosť viazať prechodné kovy je jednou z najvýznamnejších vlastností humínových látok. V prírodných systémoch tieto látky môžu viazať znečisťujúce kovy, a následne tak významným spôsobom ovplyvňovať také procesy ako sú transportné javy, toxicita, regeneračné a čistiace procesy týchto systémov a podobne^{3,4}. Je pravdepodobné, že v prírodných systémoch pri určitej hodnote pH a iónovej sile s prítomnými kovmi prednostne reagujú vždy určité typy molekúl humínových látok, ich určité frakcie⁵.

Mnohé štúdie ukázali, že humínové látky majú aj aromatické aj alifatické vlastnosti. Hlavné funkčné skupiny, ktoré prispievajú k povrchovému náboju a reaktivite humínových látok sú fenolové hydroxyskupiny a karboxylové skupiny⁶⁻⁸. Humínové látky môžu tvoriť cheláty s viacvalentnými kationmi ako sú Mg²⁺, Ca²⁺ a Fe³⁺. Tvorba chelátov zvyšuje dostupnosť týchto kationov organizmom, vrátane rastlín.

Napriek priamemu dôkazu možného uplatnenia iónovo-výmennému (IEC) mechanizmu na delenie a charakterizovanie humínových kyselín, je nedostatok článkov k tejto téme. Preto sme sa rozhodli vyhodnotiť účinnosť a citlivosť aniónovo výmennej a kationovo výmennej tenkovrstvovej chromatografie (TLC) na charakterizáciu humínových kyselín (rôzneho pôvodu) a následne spracovať získané údaje a obrázky.

Experimentálna časť

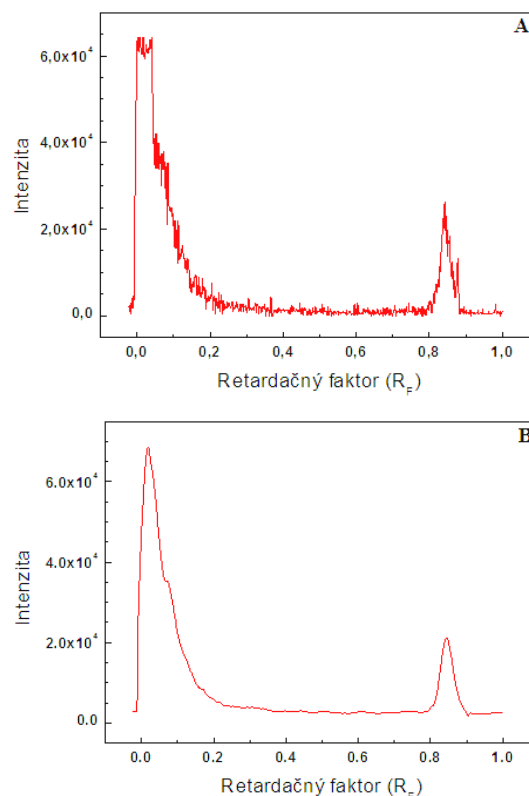
Pri tomto štúdiu sme používali dva druhy tenkovrstvových platní: prvou platňou bol FIXION 50X 8 (Reanal,



Obr. 1. Princíp získania a spracovania údajov z IEC-TLC platní na charakterizáciu humínových látok rôzneho pôvodu

Budapešť, MR), ktorý je silne kyslý katex v sodnom cykle a druhou POLYGRAM IONEX 25 SB-Ac (Macherey-Nagel, Duren, Nemecko), ktorý je silne zásaditý annex v octanovom cykle. Na chromatografickú analýzu sme používali rôzne typy komerčne dostupných a izolovaných humínových kyselín (Aldrich, Ecohum, Cerová, Rašelina 1 a Rašelina 3). TLC platne boli vyvíjané v uzavretých komorách, pričom ako mobilné fázy sme používali rôzne typy vodných roztokov ako aj tlmivých roztokov (H_2O , NaCl , Na_2SO_4 a citrónan sodný). Vodné roztoky rovnako ako tlmivé roztoky mali rôznu iónovú silu a pH. Taktiež sme porovnávali dva spôsoby nanášania vzorky – na suché TLC platne a na mokré TLC platne.

Pre kvantitatívne získanie údajov z TLC vrstiev sme využili počítač, ktorý bol vybavený bežným skenerom. Zo získaných obrázkov sme následne získali chromatogramy (ktoré predstavujú grafickú závislosť retardačného faktora od intenzity signálu). Tieto chromatogramy sme získali použitím programu Microcal® ORIGIN® Pro 8 (obr. 1 a 2).



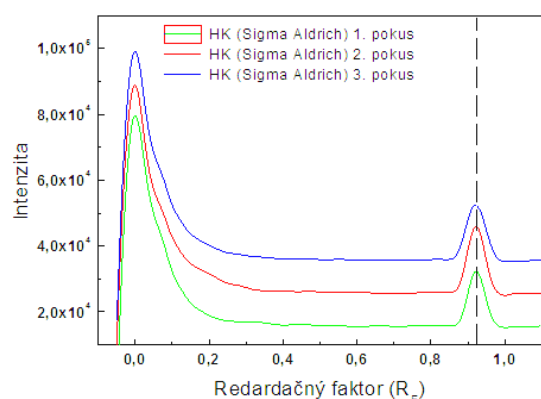
Obr. 2. Signál získaný spracovaním TLC platne použitím programu Microcal® ORIGIN® Pro 8, humínová kyselina pochádzala od firmy Sigma Aldrich a jej koncentrácia bola 12 mg ml^{-1} ; A) bez vyhladenia B) s vyhladením (Savitzky-Golay algoritmus 50 bodov)

Výsledky a diskusia

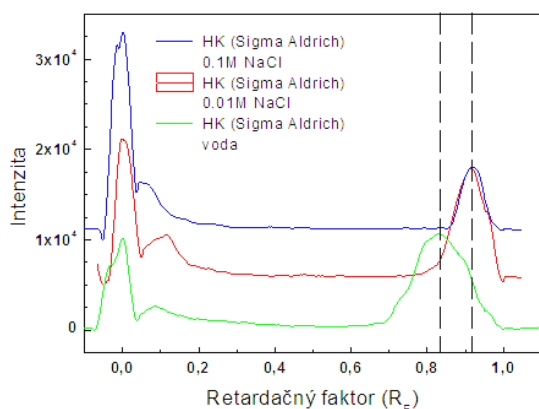
Na zistenie reprodukovateľnosti retardačných faktorov humínovej kyseliny (od firmy Sigma Aldrich) sme $3\times$ nanášali na mokré TLC platňu FIXION 50 X8 príslušnú humínovú kyselinu (o koncentrácii 12 mg ml^{-1}), pričom sme následne túto platňu nechali vyvíjať v uzavretej komore vo vode alebo v NaCl , Na_2SO_4 a citrónane sodnom (obr. 3).

Na porovnanie retardačných faktorov humínovej kyseliny (opäť od firmy Sigma Aldrich) sme mokré TLC platne s nanesenými príslušnými humínovými kyselinami nechali vyvíjať vo viacerých uzavretých komorách, v ktorých boli ako mobilné fázy voda, chlorid sodný s koncentráciou $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a chlorid sodný s koncentráciou $0,01 \text{ mol/l}$. Po následnom zosťovení závislosti sme dané výsledky za daných podmienok porovnávali (obr. 4).

Z uskutočnených pokusov ako aj z nameraných výsledkov vyplýva, že IEC TLC metóda nám umožňuje získať spoľahlivé a reprodukovateľné údaje na charakterizáciu humínových látok. Kvôli definovaným a obmedzeným separačným priestorom je IEC TLC využiteľná najlepšie



Obr. 3. **Reprodukovateľnosť** retardačných faktorov humínovej kyseliny (Sigma Aldrich); Experimentálne podmienky: TLC platňa: FIXION – 50 X8, nanášanie na mokro, koncentrácia HK: 12 mg ml^{-1} , vyvíjací vodný roztok: 0.1 mol l^{-1} NaCl



Obr. 4. **Porovnanie** retardačných faktorov humínovej kyseliny (Sigma Aldrich) v rôznych typoch vodných a tlmivých roztokov s rôznou iónovou silou; Experimentálne podmienky: TLC platňa: FIXION – 50 X8, nanášanie na mokro, koncentrácia HK: 12 mg ml^{-1}

ako frakcionačná alebo ako úpravná technika a umožňuje tiež archívne zálohovanie fyzicky separovaných humínových kyselín.

Ďalšou možnosťou je preniesť získané údaje do IEC HPLC kolónových techník alebo ďalej analyzovať TLC frakcie pomocnými technikami.

Záver

Preukázali sme, že spôsob charakterizovania humínových kyselín, ktorý sme si vybrali, sa v prípadnej kombinácii s inými separačnými ukazuje ako užitočný základný nástroj na charakterizovanie a analyzovanie rôznych typov humínových kyselín, hoci nie je príliš známy. Potenciál tejto vybranej metódy budeme aj naďalej skúmať.

Táto práca bola podporovaná projektmi VEGA 1/4474/07, VEGA 1/0870/09, APVV-0597-07 a VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

1. Skybová M.: Acta Montanistica Slovaca II 2, 362 (2006).
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Humic_acid 23.01.2010
3. Klučáková M.: J. Polym. Mater. 17, 337 (2000).
4. Warwick P., Hall T.: Analyst 117, 151(1992).
5. Powell H. K. J., Town R. M.: Anal. Chim. Acta 267, 47(1992).
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Humic_acid 23.01.2010
7. Hayes M. H. B.: *Emerging concepts of the compositions and structures of humic substances*. In: (Hayes M.H.B., Wilson W.S., ed.), *Humic Substances, Peats, and Sludges. Health and Environmental Aspects*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3 (1997).
8. Tan K. H.: *Humic Matter in Soil and the Environment. Principles and Controversies*, str. 1. Marcel Dekker Inc., New York 2003.

MECHANISTIC EVALUATION OF Co AND Zn SORPTION PROCESSES USING EQUILIBRIUM MODELING, FTIR AND SEM-EDX ANALYSIS

**LUCIA REMENÁROVÁ, MARTIN
PIPIŠKA, MIROSLAV HORNÍK,
and JOZEF AUGUSTÍN**

University of SS. Cyril and Methodius, J. Herdu 2, 917 01
Trnava, Slovakia
pipiska@ucm.sk

1. Introduction

Contamination and redistribution of toxic metals and radionuclides have become one of the most serious environmental problems of today. Conventional methods of toxic metals and radionuclides removal from wastewaters, such as chemical precipitation, electrowinning, membrane separation, evaporation and ion-exchange, may not be always technologically applicable or economically viable¹. Above mentioned techniques are incapable for removing trace amounts of metals and radionuclides from large volumes of water. There exist also various technologies based on interaction between pollutants and biological systems in contaminated environment. If soluble chemicals are present in aqueous environment, where also the biomass can be found, sorbates interact with biological materials and are bound to cellular surfaces in the process called biosorption². Current research activity in the field attempts to evaluate whether biosorption may eventually provide such an effective and economical treatment process alternative.

Physical and chemical characteristics of biosorbents are important for understanding the metal binding mechanism on the biomass surface³. Many techniques such as potentiometric titration, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray analysis (EDX) have been used to study metal binding to biosorbent. The use of a variety of analytical techniques may help to elucidate metal binding mechanisms⁴.

Our previous research demonstrated that moss biosorbent represents easily fractionable, well sedimenting material with a large specific surface area, suitable for biosorption of dissolved solutes e.g. metal ions and organic pollutants^{5,6}. However, before application of low-cost locally available biosorbents in water treatment processes is necessary: a) to characterize the mechanism of sorption process, b) to determine functional groups participating on metal sorption, c) to quantify sorption capacity and equilibrium and d) mutual competitive effects of metals in multi-component systems. Therefore in this study scanning electron microscopy connected with EDX and FTIR analy-

sis were used for characterization of biosorbent and study of metal biosorption mechanism. Equilibrium isotherm models according to Langmuir and Freundlich were used for mathematical description of sorption equilibria in single and binary systems.

2. Materials and methods

2.1. Biosorbent preparation

Moss *Rhytidiadelphus sp.* obtained from the forests in High Tatras Mountains, Slovak Republic was used as biosorbent. After washing twice in deionised water, biomass was oven-dried for 72 h at a maximum of 45 °C to avoid the degradation of binding sites. Before using in experiments moss biomass was ground and sieved. Fraction 300–600 µm was used in sorption experiments.

2.2. Biosorption experiments in single and binary systems

The metal sorption capacity of biosorbent was determined by suspending of moss biomass (2.5 g l⁻¹, d.w.) in 8 ml metal solutions (pH 6.0) containing CoCl₂ or ZnCl₂ in concentration range 100–4000 µM spiked with ⁶⁰CoCl₂ or ⁶⁵ZnCl₂ and exposing for 4h at 20 °C on a reciprocal shaker (120 rpm). At the end biomass was filtered out, washed twice in deionised water and radioactivity of both biosorbent and liquid phase was measured. Biosorption in binary-metal system Co²⁺–Zn²⁺ was carried out at the same operating conditions in solutions containing both CoCl₂ and ZnCl₂ in different initial molar ratios 2:1, 1:1, 1:2, spiked with ⁶⁰CoCl₂ or ⁶⁵ZnCl₂.

The metal uptake was calculated as $Q = V(C_0 - C_{eq})/m$ where Q is the uptake (µmol g⁻¹, d.w.), C_0 and C_{eq} is the initial and the final metal concentrations in solution (µmol l⁻¹) and m is the amount of dried biosorbent (given in grams). All experiments were performed in duplicate.

2.3. Radiometric analysis

For radiometric determination of ⁶⁰Co and ⁶⁵Zn in both liquid samples and biosorbent, gamma spectrometric scintillation detectors 54BP54/2-X and 76BP76/3 with well type crystal NaI(Tl) (Scionix, Netherlands) and data processing software Scintivision32 (Ortec, USA) were used. Standardized ⁶⁰CoCl₂ (5.181 MBq ml⁻¹, CoCl₂ 20 mg l⁻¹ in 3 g l⁻¹ HCl) and ⁶⁵ZnCl₂ (0.8767 MBq/ml, ZnCl₂ 50 mg l⁻¹ in 3 g l⁻¹ HCl) solutions were obtained from the Czech Institute of Metrology (Prague, Czech Republic).

2.4. FTIR and SEM-EDX analysis

To identify the chemical functional groups present on biosorbent FTIR analysis (FTIR-8400S, SHIMADZU) of control sample and metal loaded biosorbent was done. Samples were mixed with KBr at a ratio 1:100 for making pellets. The FTIR spectra were obtained for within the range of 400–4000 cm^{-1} .

Biosorbent was firstly pretreated by 0.5 M solution of CaCl_2 for 4 h. The surface structure analysis of Ca pretreated biosorbent before and after Co^{2+} and Zn^{2+} sorption from single systems and EDX microanalysis were performed by scanning electron microscope VEGA TESCAN (Czech Republic) coupled with an EDX, QUANTAX QX2 detector (RONTEC, Germany). Prior the SEM and EDX analysis, the samples of biosorbent were dried (45 °C, 72 h) and sticked to aluminium sample holder using conductive adhesive (Ag). Moss samples were then coated with Au using BP 343.7 Evaporator (TESLA ELMI, Czech Republic). The analyses were performed at voltage 30 kV, vacuum pressure $36 \cdot 10^{-3}$ Pa and magnification 200 \times .

2.5. Equilibrium modeling

The Langmuir (eq 1) and Freundlich (eq 2) isotherms for single metal systems are represented by the following equations:

$$Q_{\text{eq}} = \frac{bQ_{\text{max}}C_{\text{eq}}}{1 + bC_{\text{eq}}} \quad (1)$$

$$Q_{\text{eq}} = KC_{\text{eq}}^{(1/n)} \quad (2)$$

where Q_{max} represents the maximum sorption capacity upon complete saturation of the sorbent, b is a constant related to the energy of adsorption. K and $1/n$ values are the Freundlich constants referring to adsorption capacity and intensity of adsorption, respectively.

For description of equilibrium in binary system we used in our study the competitive Langmuir model (eq 3) developed under the concept of original Langmuir isotherm for single systems where one binding site was only available for one sorbate:

$$Q_{\text{eq}}[\text{Me}_i] = \frac{Q_{\text{maxMe}_i} b_{\text{Me}_i} C_{\text{eq}}[\text{Me}_i]}{1 + b_{\text{Me}_i} C_{\text{eq}}[\text{Me}_i] + b_{\text{Me}_j} C_{\text{eq}}[\text{Me}_j]} \quad (3)$$

where $Q_{\text{eq}}[\text{Me}_i]$ represents equilibrium sorption capacities of metal Me_i , $C_{\text{eq}}[\text{Me}_i]$ and $C_{\text{eq}}[\text{Me}_j]$ represent equilibrium concentration of metals remaining in solution and Q_{max} is the maximum sorption capacity for the binary component systems. b_{Me_i} and b_{Me_j} represent affinity constants of Langmuir model for the first and second metal ions⁷.

To calculate the maximum sorption capacities Q_{max} values and the corresponding parameters of adsorption

isotherms non-linear regression analysis was performed by the ORIGIN 8.0 Professional (OriginLab Corporation, Northampton, USA). The 3D sorption surfaces for binary system Co^{2+} - Zn^{2+} were obtained by plotting the experimental metal equilibrium concentrations C_{eq} on the X and Y axes, against the cobalt and zinc uptake Q_{eq} on the Z axis. The TableCurve 3D 4.0 (Systat Software, Inc., Chicago, USA) was used for this purpose.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of Co and Zn biosorption using equilibrium modeling

3.1.1. Single sorption systems

Equilibrium modeling provides useful information of the studied sorption systems. Equilibrium isotherms are suitable for comparison of sorption capacities of different biosorbents and affinities of metal ions for the same biosorbent. In this study, two well known isotherm models – Langmuir and Freundlich were used for analyzing biosorption equilibrium. Both isotherms were fitted to the experimental equilibrium data for Co^{2+} and Zn^{2+} ion biosorption by moss biosorbent (Fig. 1) and the calculated isotherm parameters obtained by non-linear regression analysis are reported in Table I.

The adequacy of the two models for mathematical description of Co^{2+} and Zn^{2+} biosorption was compared using Akaike's information criterion AIC_c ⁸. The isotherm model with the lower AIC_c value is considered most likely to be correct. The Langmuir isotherm describes equilibrium data better than the Freundlich isotherm (Table I) as is demonstrated by the more homogenous standard deviation of each observed parameter, lower AIC_c and residual sum of squares (RSS) values, as well as root mean squared error (RMSE). Therefore the results will be discussed on the basis of Langmuir parameters reflecting the two important characteristics of the sorption system.

The maximum sorption capacity Q_{max} for cobalt ions obtained from Langmuir isotherm (eq 1) at pH 6.0 was found to be $208 \pm 4 \mu\text{mol g}^{-1}$. Higher value of Q_{max} $298 \pm 11 \mu\text{mol g}^{-1}$ was observed in the case of Zn^{2+} sorption. The affinity constant b of the isotherms corresponds to the initial gradient, which indicates the biosorbent affinity at low concentrations of metal ions. A greater initial gradient corresponds to a higher affinity constant⁹. Comparison of b values ($0.008 \pm 0.001 \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}$ for Co and $0.004 \pm 0.001 \text{ l } \mu\text{mol}^{-1}$ for Zn) suggests that biosorbent displays higher affinity for cobalt than for zinc ions. Note that K (Freundlich affinity constant) also shows higher affinity of biosorbent for cobalt (Table I). From Fig. 1 it is evident that the cobalt isotherm is steeper at lower equilibrium concentrations than that for zinc. Nevertheless, moss biosorbent showed high affinity for cobalt, the binding capacity was higher for zinc also reflected well by higher Q_{max} value.

Table I

Langmuir and Freundlich equilibrium parameters (\pm standard deviation) for Co^{2+} and Zn^{2+} sorption by moss biosorbent from single systems at pH 6.0 obtained by non-linear regression analysis

Metal	Langmuir		R^2	RSS	RMSE	AIC _c
	Q_{\max} [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	b [$\text{l } \mu\text{mol}^{-1}$]				
Zn^{2+}	298 ± 11	0.004 ± 0.001	0.992	341.8	10.67	51.12
Co^{2+}	208 ± 3	0.008 ± 0.001	0.997	51.30	4.135	41.64
	Freundlich		R^2	RSS	RMSE	AIC _c
	K [l g^{-1}]	$1/n$				
Zn^{2+}	287 ± 15.4	0.29 ± 0.07	0.898	4128	37.34	63.65
Co^{2+}	32.2 ± 16.5	0.24 ± 0.07	0.856	2740	30.22	61.53

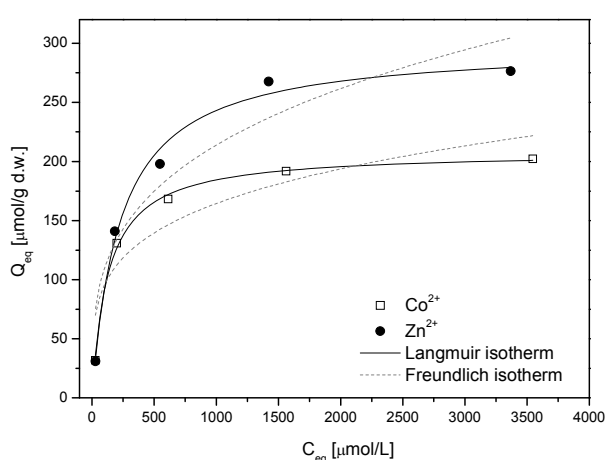


Fig. 1. Fit of the Langmuir and Freundlich isotherms of Co^{2+} and Zn^{2+} sorption by moss biosorbent (2.5 g l^{-1} , d.w.) from single metal solutions after 4 h interaction at 20°C and initial pH 6.0

It should be realized that despite the fact that Langmuir isotherm offers no insights into the mechanism of biosorption¹⁰ it remains a convenient tool for comparing equilibrium data on a quantitative basis (determination of maximum sorption capacity Q_{\max} and affinity parameters b) and providing information on biosorption potential.

3.1.1. Binary sorption system

Before application of unconventional biosorbents for water treatment is necessary take into account that wastewater represents multi-component system, where mixture of pollutants (e.g. metal ions, organic compounds) is encountered. The evaluation of biosorption in multi-metal systems is rather complicated because of possible interactions between metal ions and competition for binding sites^{9,11}. Following results from single metal experiments where Langmuir isotherm represented the experimental data of Co^{2+} and Zn^{2+} biosorption reasonably well, we

used the competitive Langmuir model (eq 3) for quantitative interpretation of sorption equilibrium uptake in Co^{2+} - Zn^{2+} binary system and parameters obtained by non-linear regression analysis are shown in Table II. Fig. 2A and 2B represent the 3D sorption isotherm surfaces of the binary mixture Co^{2+} - Zn^{2+} . The mesh surfaces correspond to each metal uptake according to competitive Langmuir model. The high values of coefficient of determination and low values of RMSE indicate a good agreement between isotherm model and experimental equilibrium data.

We found that the presence of Co^{2+} in binary system Co^{2+} - Zn^{2+} caused significant decrease in Zn^{2+} sorption from 178 to $105 \mu\text{mol g}^{-1}$. Sorption of Co^{2+} clearly decreased from 127 to $62 \mu\text{mol g}^{-1}$ due to the presence of Zn^{2+} cations in solution. This effect is probably related to the competition of metal ions for binding sites on the biosorbent surface. A comparison of the isotherms in Figures 2A and 2B showed that zinc exerted a much greater competitive effect on the cobalt sorption than vice-versa. In term of affinity of studied metals higher b_{Zn} values indicate that moss biosorbent has higher affinity to zinc ions in binary system Co^{2+} - Zn^{2+} . Pérez-Marín et al.¹² show that the preference of biosorbent for metals in multi-component systems could be also attributed to different ionic characteristics of metal ions.

3.2. Analysis of Co and Zn biosorption using SEM-EDX and FTIR analysis

Despite the fact that both metals and radionuclides sorption by various biosorbents is extensively studied (see Gadd¹³ for review), appropriate analytical techniques (such as SEM-EDX, XRD, XPS, FTIR and others) are needed to elucidate the mechanisms participate on biosorption processes and to get insight into the localization and chemical nature of metals sorbed by biomass. Preliminary examination of biosorbent prepared from moss *Rhytidiadelphus sp.* by scanning electron microscopy (SEM) revealed that there are no morphological changes on the biomass surface after sorption of Co^{2+} and Zn^{2+} ions in comparison with unloaded biomass (Fig. 3A, 4A, 5A).

Table II

Competitive Langmuir isotherm parameters for Co^{2+} and Zn^{2+} sorption in binary Co^{2+} - Zn^{2+} system by moss biosorbent obtained by non-linear regression analysis

Model	Q_{\max} [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	b_{Co} [$1 \mu\text{mol}^{-1}$]	b_{Zn} [$1 \mu\text{mol}^{-1}$]	R^2	RMSE
$Q(\text{Co}) = \frac{b_{\text{Co}} Q_{\max \text{Co}} C_{\text{eqCo}}}{1 + b_{\text{Co}} C_{\text{eqCo}} + b_{\text{Zn}} C_{\text{eqZn}}}$	211 ± 5	$0,006 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$	0,978	8,91
$Q(\text{Zn}) = \frac{b_{\text{Zn}} Q_{\max \text{Zn}} C_{\text{eqZn}}}{1 + b_{\text{Zn}} C_{\text{eqZn}} + b_{\text{Co}} C_{\text{eqCo}}}$	294 ± 5	$0,004 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	0,992	7,37

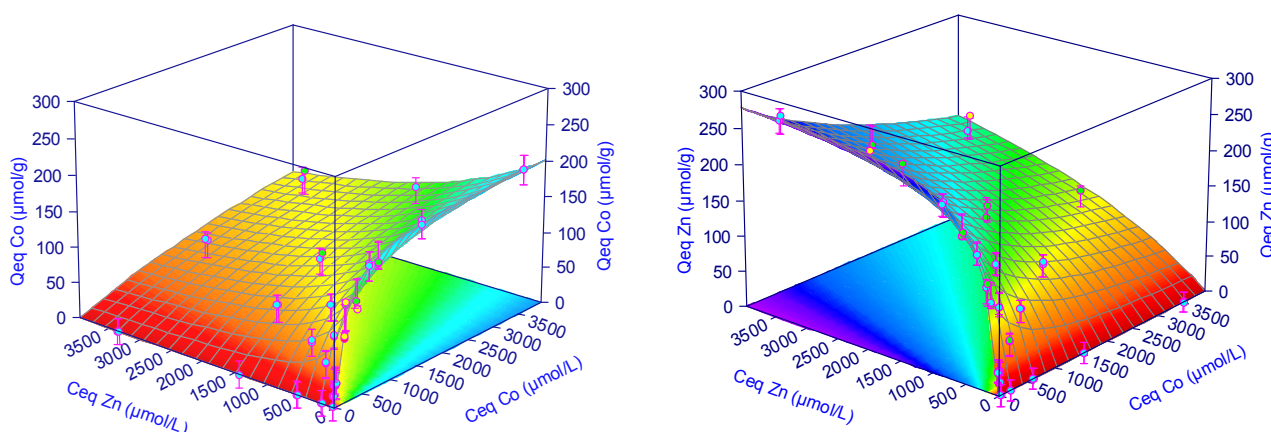


Fig. 2. **Three-dimensional sorption isotherm surfaces of Co^{2+} - Zn^{2+} binary system: (A) Co^{2+} sorption ($\mu\text{mol g}^{-1}$) and (B) Zn^{2+} sorption ($\mu\text{mol g}^{-1}$).** The surfaces are predicted by the competitive Langmuir model (eq 3) and the symbols are experimental data obtained at pH 6.0 and 20 °C. Bars represent 95 % confidence interval

For investigation of sorption mechanism, moss biomass was pretreated by CaCl_2 solution and then used in sorption experiments. Fig. 3B, 4B and 6B show typical EDX spectrum of biosorbent before and after sorption of Co^{2+} and Zn^{2+} ions. EDX spectra before sorption did not show the characteristic signals of Co^{2+} and Zn^{2+} . The presence of cobalt and zinc on EDX spectra after biosorption confirms binding of metals cations onto moss surface by interactions with negative charged functional groups. Comparison of EDX spectra before and after sorption also shows that there is evident decrease of Ca peak after metal sorption as a result of Co^{2+} and Zn^{2+} binding. This indicates that ion exchange mechanism participates on the sorption of Co^{2+} and Zn^{2+} ions, however it is probable that at least some other mechanisms such as surface complexation, coordination and chelation of metals, adsorption or precipitation are acting simultaneously, to varying degrees, depending on the biosorbent and the solution chemistry. Chen and Wang¹⁴ studied sorption mechanism of Zn by yeast *Saccharomyces cerevisiae* using SEM-EDX analysis and confirmed ionic binding interactions between Zn and the biomass. Ion-exchange mechanism in Cd^{2+} and Pb^{2+}

sorption by mango peel waste confirmed also Iqbal et al.¹⁵ using EDX analysis. Despite the fact, that SEM-EDX provides only qualitative analysis of sorption process, obtained results are valuable contribution to the understanding of interactions between biological sorbents and metal cations.

To identify the chemical functional groups of moss surface responsible for Co^{2+} and Zn^{2+} sorption, the FTIR spectra of *Rhytidiadelphus sp.* before and after metal biosorption were performed. As can be seen from Fig. 6 obtained FTIR spectra reflect the complex character of moss biomass evidenced by different characteristic bands with the possible presence of phenolic, carboxylic, hydroxyl and carbonyl groups. Changes in band intensity and frequency after metal binding can be used to identify the functionalities involved in binding⁴.

The broad band with strong intensity ranging from 3200 to 3400 cm^{-1} belongs to $-\text{OH}$ group of polymeric compounds. The peak at $\sim 2918 \text{ cm}^{-1}$ could be assigned to asymmetric vibration of $-\text{CH}_3$ group. Absorption peak at 1647 cm^{-1} should be ascribed to strong asymmetric vibra-

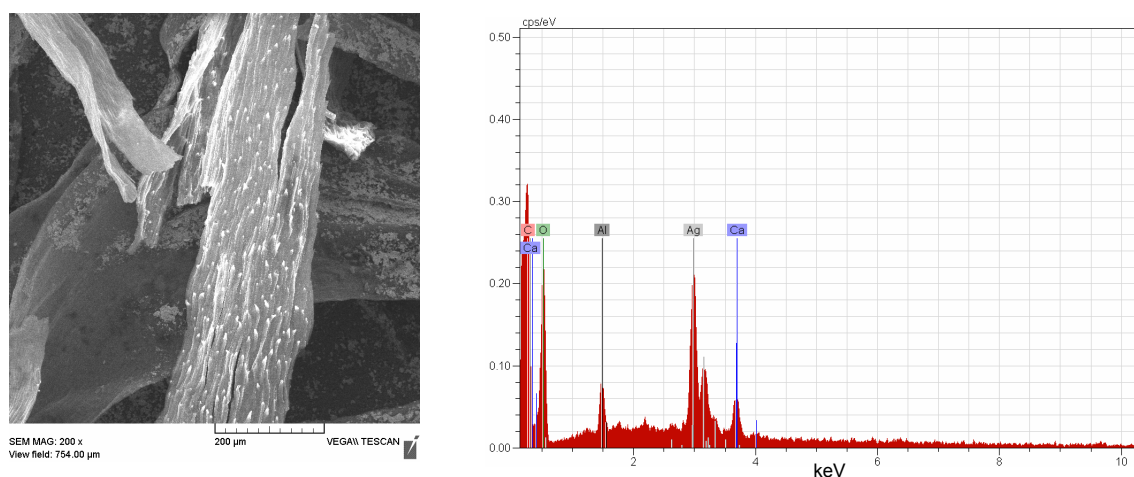


Fig. 3. SEM picture (A) and the EDX elemental spectra of the native biosorbent pretreated with 0.5 M CaCl_2 before Co and Zn uptake. Al peak comes from sample holder, Ag peak from sample fixation

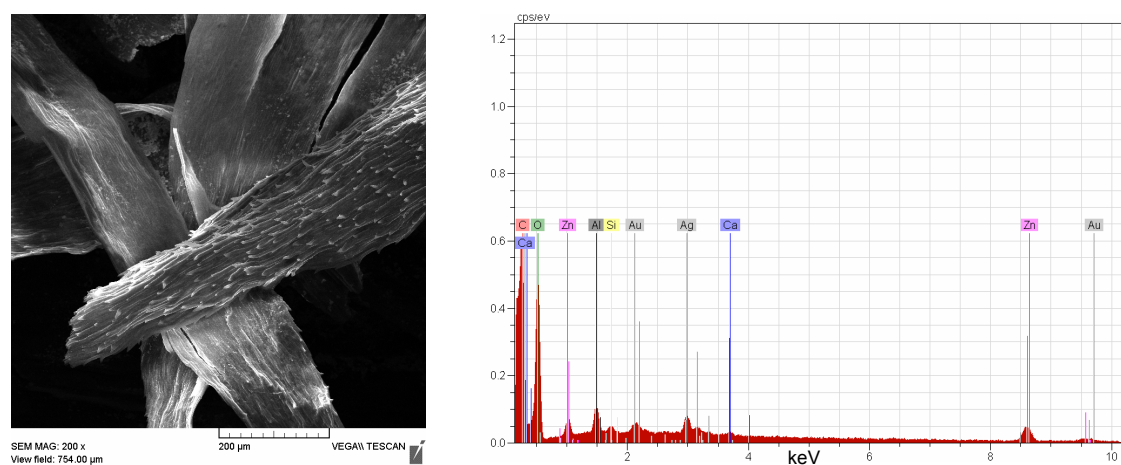


Fig. 4. SEM picture of biosorbent (A) and the EDX elemental spectra after Zn^{2+} (0.5 M ZnCl_2) sorption from single system. Al peak comes from sample holder, Ag and Au peaks from sample fixation and coating, respectively

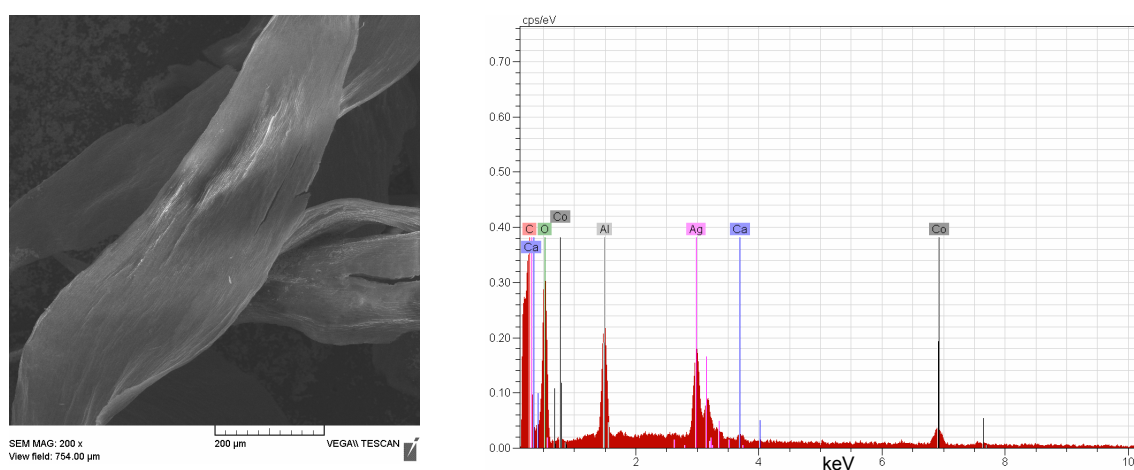


Fig. 5. SEM picture of biosorbent (A) and the EDX elemental spectra after Co^{2+} (0.5 M CoCl_2) sorption from single system. Al peak comes from sample holder, Ag peak from sample fixation

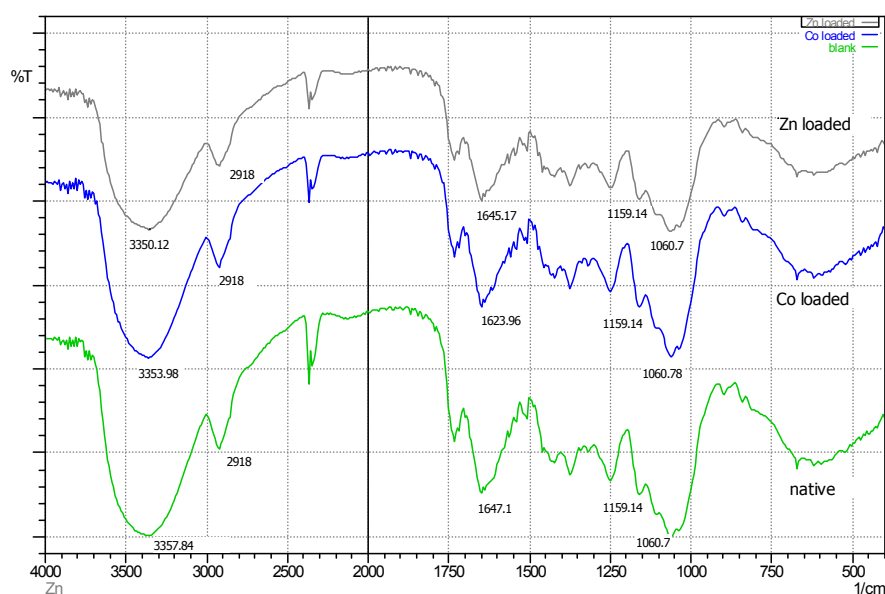


Fig. 6. FTIR spectra of unloaded, Zn^{2+} loaded ($C_0 = 0.5 \text{ M ZnCl}_2$) and Co^{2+} loaded ($C_0 = 0.5 \text{ M ZnCl}_2$) moss biosorbent

tion and peak at 1417 cm^{-1} to symmetric vibration of carboxylic group^{16,17}. The peaks at 1159 cm^{-1} and 1060 cm^{-1} are attributed to C-O-C and -OH groups of polysaccharides. Comparing of infrared spectra of native and metal loaded biosorbent shows that the absorption band at 3357 cm^{-1} corresponding to -OH group shifted to 3353 cm^{-1} after the Co^{2+} sorption and to 3350 cm^{-1} after the Zn^{2+} sorption. These shifts in term of wavenumbers correspond to change of binding energy for -OH functional group indicating that this group was included in the binding of metals. Shifts in case of -COOH groups were not strong (to 1645 cm^{-1} after Zn^{2+} sorption and to 1623 cm^{-1} after Co^{2+} sorption), this should be caused by the presence of naturally Ca^{2+} and Mg^{2+} cations bound onto carboxylic acid groups of moss, which were replaced by Co^{2+} and Zn^{2+} cations in the process of ion exchange¹⁸. The FTIR characterization of biosorbents functional groups and their contribution to metal binding was studied by many authors. Sun et al.¹⁹ showed that functional groups such as alcoholic and carboxylate, would be the main binding sites for biosorption of Co^{2+} and Zn^{2+} by aerobic granules. Sari et al.²⁰ found that in the process of Pd^{2+} biosorption by moss *Racomitrium lanuginosum* could be carried out by ion-exchange between hydrogens of -OH, $-\text{NH}_2$ and -COOH groups on the biomass surface and Pd^{2+} cation. The same mechanism was proposed in the case of Zn^{2+} and Cd^{2+} biosorption using moss *Fontinalis antipyretica*²¹.

4. Conclusions

The maximum sorption capacity Q_{max} of *Rhytidiadelphus* sp. for cobalt ions obtained from Langmuir isotherm was found to be $208 \pm 4 \mu\text{mol g}^{-1}$. Higher value of Q_{max} ($298 \pm 11 \mu\text{mol g}^{-1}$) was observed in the case of Zn^{2+} sorption. According to the affinity constant b moss biosorbent showed high affinity towards cobalt, the binding capacity was higher for zinc also reflected well by higher Q_{max} value. The experimental biosorption data in Co^{2+} - Zn^{2+} binary system were well described by the competitive Langmuir model. The comparison of the isotherms showed that zinc exerted a much great competitive effect on the cobalt sorption than vice-versa. In term of affinity of studied metals moss biosorbent has higher affinity to zinc ions in binary system Co^{2+} - Zn^{2+} .

Participation of -OH and -COOH groups in Co^{2+} and Zn^{2+} biosorption was proved by FTIR analysis. The presence of cobalt and zinc on EDX spectra after biosorption indicates binding of metal cations onto moss surface by interactions with negative charged functional groups. SEM-EDX analysis also confirmed that Co^{2+} and Zn^{2+} ions replaced Ca^{2+} ions from biosorbent surface and therefore ion exchange mechanism participate in cobalt and zinc biosorption. Although the results provided by the combination of these techniques offer mainly qualitative data, they are valuable contribution to the understanding of mechanisms involved in sorption of metal ions by biosorbents.

REFERENCES

1. Nayak H., Lahiri S.: J. Radioanal. Nucl. Chem. 267, 59 (2006).
2. Chojnacka K.: Environ. Int. 36, 299 (2010).
3. Arief V.O., Trilestari, K., Sunarso, J., Indraswati, N., Ismadji, S.: Clean 36, 937 (2008).
4. Naja G.M., Volesky B., Murphy V.: In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, (Flickinger, M., ed.). Wiley Interscience, NY, 2010 (in press).
5. Remenárová L., Pipiška M., Horník M., Augustín J.: Nova Biotechnol. 9, 53 (2009).
6. Pipiška M., Horník M., Remenárová L., Augutín J., Lesný J.: Acta Chim. Slov. 57, 163 (2010).
7. Chong K.H., Volesky B.: Biotechnol. Bioeng. 47, 451 (1995).
8. Burnham K.P., Anderson D.R.: *Model Selection and Multimodel Inference—A Practical Information-theoretic Approach*. Springer, New York 2002.
9. Sheng P.X., Ting Y.P., Chen J.P.: Ind. Eng. Chem. Res. 46, 2438 (2007).
10. Liu Y., Liu Y.-J.: Sep. Purif. Technol. 61, 229 (2008).
11. Pipiška M., Horník M., Vrtoch L., Augustín J., Lesný J.: Chem. Ecol. 24, 181 (2008).
12. Pérez-Marín A.B., Ballester A., Gonzáles F., Blázquez M.L., Muñoz J.A., Saéz J., Meseguer Zapata V.: Bioresour. Technol. 99, 8101 (2008).
13. Gadd G.M.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 84, 13 (2009).
14. Chen C., Wang J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 293 (2008).
15. Iqbal M., Sabed A., Zafar S.I.: J. Hazard. Mater. 164, 161 (2009).
16. Sheng P.X., Ting Y.-P., Chen J.P., Hong L.: J. Colloid Interface Sci. 275, 13 (2004).
17. Lodeiro P., Barriada J.L., Herrero R., Sastre de Vincente M.E.: Environ. Pollut. 142, 264 (2006).
18. Balaria A., Schiewer S.: Sep. Purif. Technol. 63, 577 (2008).
19. Sun X-F., Wang S-G., Liu X-W., Gong W-X., Bao N., Gao B-Y.: J. Colloid Interface Sci. 324, 1 (2008).
20. Sari A., Mendil D., Tuzen M., Soylak M.: J. Hazard. Mater. 162, 874 (2009).
21. Martins R.J.E., Pardob R., Boaventura R.A.R.: Water Res. 38, 693 (2004).

STANOVENIE SYNTETICKÝCH FARBÍV V MÄSOVÝCH VÝROBKOCH

DENISA ROSINSKÁ

Štátny veterinárny a potravinový ústav Dolný Kubín, Janoškova 1161/58, 026 01 Dolný Kubín, Slovenská republika
rosinska@svpudk.sk

Kľúčová slova: syntetické farbivá, HPLC, detektor diódového poľa

Abstrakt

Farbivá do potravín sú prírodné alebo syntetické látky, ktoré dodávajú alebo obnovujú farbu v potravinách¹. V Európskej únii nesmú byť prírodné alebo syntetické farbivá pridávané do čerstvých potravín napr. ovocia, zeleniny, mäsa, sušeného a kondenzovaného mlieka, čaju a kávy⁶⁻⁸. Ostatné potraviny musia mať obsah syntetických farbív jasne vyznačený na obale. Hygienické normy, ktoré popisujú použitie farbív do potravín sú uvedené v Potravinovom kódexe Slovenskej republiky.

Syntetické farbivá boli analyzované vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou, použitím kolóny RP-18 a mobilnej fázy acetonitril : octanový pufer (v/v 70:30) a octanový pufer. Farbivá boli detegované detektorom diódového poľa.

Štátny veterinárny a potravinový ústav roanalyzoval obrovské množstvo mäsových výrobkov a prípravkov zo Slovenska, ale aj z rôznych krajín Európskej únie. Prítomnosť syntetických farbív bola zistená v 8,5 % vzoriek mäsových výrobkov a prípravkov.

Úvod

Syntetické farbivá sú látky používané na prifarbovanie potravín. Ich význam je v tom, že zvyšujú organoleptické vlastnosti – vzhľad výrobku, najmä v prípadoch, kde prírodné farbivá sú zastúpené v malých množstvách, alebo sa vplyvom technologických podmienok zmenili¹. Syntetické farbivá do potravín môžeme po chemickej stránke rozdeliť do niekoľkých skupín: azofarbivá, difenylmetánové, trifenylmetánové, nitrofarbivá, pyrazonové, xanténové, antrachinonové, chinolinové a indigoidné farbivá. Väčšinou sú vo vode rozpustné².

Z veľkého počtu syntetických farbív sú u nás povolené najmä tartrazín (E102), chinolinová žltá (E 104), žltá SY (E 110), ponceau 4 R (E 124), azorubín (E 122), allura červená (E 129), erytrozín (E 127), brilantná modrá (E 133), patentná modrá (E 131), indigotín (E 132), zelená S (E 142) a brilantná čierna BN (E 151) atď.

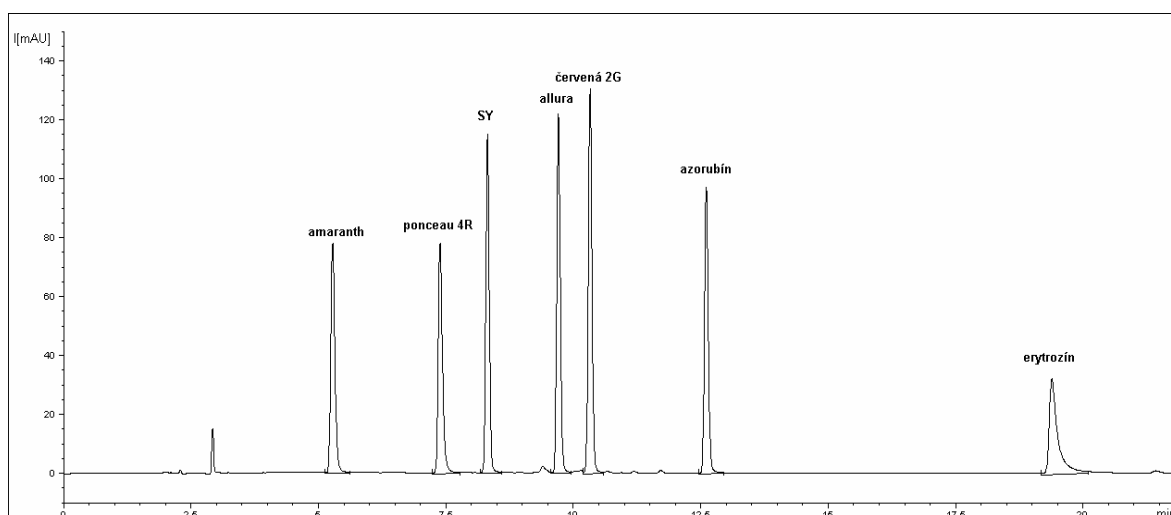
Jednou skupinou metód dokazovania farbív sú orientačné, ktoré dokazujú iba to, či potravina bola prifarbovaná. Medzi ďalšie analytické metódy, ktoré sú už kvantitatívne, patria chromatografické a spektrometrické metódy³⁻⁵. Farbivá sa používajú na prifarbenie skoro všetkých potravín s výnimkou použitia syntetických farbív do mäsa, mlieka, múky, chleba a potravín pre dojčenskú a detskú výživu – tu je ich použitie legislatívou zakázané⁶⁻⁸. Nemajú dobrý vplyv hlavne na malé deti a môžu spôsobiť alergie, hyperaktivitu a nepokojnosť. Sú vo všetkých potravinách najmä v cukrovinkách a sladkostiach, ktoré sú až veľmi sýto farebné. Farbivá tiež obsahujú mnohé nápoje.

Neškodnosť aplikovaných prídavných látok garantuje Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) a Svetová organizácia pre poľnohospodárstvo a výživu (FAO) prostredníctvom spoločnej Komisie Codex Alimentarius FAO/WHO. Rozhodnutia orgánov komisie vychádzajú z odporúčaní nezávislého Spoločného výboru odborníkov pre potravinárske prídavné látky FAO/WHO (tzv. JECFA), ktorý je sformovaný zo špičkových svetových odborníkov v danej oblasti a nezastáva žiadne komerčné záujmy. Legislatíva Codex Alimentarius sa považuje za celosvetový štandard, od ktorého sa odvíjajú regionálne i národné predpisy (vrátane predpisov Európskej únie a Slovenskej republiky). Zámerom je zabezpečenie rovnakej úrovne ochrany spotrebiteľov na celom svete a správnych praktík pri obchodovaní s potravinami. Tieto predpisy sú súčasťou Slovenskej legislatívy, ktorá popisuje povolené syntetické farbivá ako aj ich najvyššie prípustné množstvá. Potravinový kódex⁶⁻⁸ prísne stanovuje povolené množstvá prídavných farbív, ktoré by výrobcovia vzhľadom na to, že ide o chemikálie mali striktné dodržiavať a navyše, pridávajú sa do výrobkov cukrárskeho a cukrovinkárskeho priemyslu, ktoré vo veľkej miere konzumujú deti.

V roku 2008 bola zistená prítomnosť syntetických farbív v mäsových výrobkoch a prípravkoch na slovenskom trhu v 8,5 % výrobkov. Na základe stáleho výskytu syntetických farbív je kontrola mäsových výrobkov a prípravkov na ich prítomnosť stále potrebná.

Príprava vzorky

Zhomogenizované vzorky boli zaliaté zmesou benzín : acetón. Po rozdelení vrstiev sa horná vrstva opatrne zliala a spodná vrstva vysušila do sucha. Sušina sa extrahovala zmesou metanol : amoniak v ultrazvukovom kúpeľi. Extrakt sa prefiltraval cez sklenenú vatú a zahustil. Objem bol upravený podľa intenzity sfarbenia destilovanou vodou. Prípadný zákal bol odstránený prefiltrovaním⁹.



Obr. 1. Chromatogram separácie štandardného roztoku vybraných syntetických farbív (koncentrácia jednotlivých syntetických farbív 10 mg l^{-1})

Chromatografická analýza

Vzorky boli analyzované na chromatografickej kolóne Merck Lichrospher 100 RP-18e, $250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$. Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitril : octanový pufer (v/v 70:30) a octanový pufer. Na separáciu bola použitá gradientová elúcia, prietok mobilnej fázy 1 ml min^{-1} a detekcia detektorom diódového poľa. Kvantifikácia syntetických farbív je vykonávaná pomocou externej kalibrácie⁹.

Výsledky

Na obr. 1 je zobrazený chromatogram separácie syntetických farbív (amaranth, ponceau 4R, SY, allura, červe-

ná 2G, azorubín a erytrozín) HPLC metódou, gradientovou elúciou s DAD detekciou.

Na syntetické farbivá bolo v roku 2008 vyšetrených 1462 vzoriek. Z toho 457 vzoriek boli mäsové výrobky. Počet vzoriek, pri ktorých bola zistená prítomnosť syntetických farbív, bol 39. Podľa Nariadenia Európskeho parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 zo 16. decembra 2008 o prídavných látkach v potravinách a Výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 11. februára 2008 č. 04650/2008-OL, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca prídavné látky v potravinách a Smernice Európskeho parlamentu a Rady ES 94/36 z 30. júna 1994 o farbivách pre použitie do potravín (Ú.v. ES L 237, 10.9.1994) nie sú syntetické farbivá povolené používať do mäsových výrobkov, okrem tých,

Tabuľka I

Prehľad vyšetrených vzoriek podľa krajiny pôvodu

Krajiny pôvodu	Celkový počet vzoriek	Vyhovujúce vzorky	Nevyhovujúce vzorky	Nevyhovujúce vzorky v %
Slovenská výroba	342	311	31	9,1
Výrobky z Európskej únie	115	106	9	7,8

Tabuľka II

Prehľad vyšetrených vzoriek podľa spôsobu vyšetrenia

Spôsob vyšetrenia	Celkový počet vzoriek	Vyhovujúce vzorky	Nevyhovujúce vzorky	Nevyhovujúce vzorky v %
Cielená kontrola	136	126	10	7,4
Potravinový dozor	310	291	19	6,2

Tabuľka III

Prehľad vyšetrených vzoriek podľa druhu mäsového výrobku

Druh výrobku	Celkový počet vzoriek	Vyhovujúce vzorky	Nevyhovujúce vzorky	Nevyhovujúce vzorky v %
Mäkké salámy	113	111	2	1,8
Suché salámy	67	48	19	28,4
Údené mäso	63	60	3	4,8
Mleté mäso	45	45	0	0
Párky	58	55	3	5,2
Klobása	45	37	8	17,8
Konzervy	36	34	2	5,6
Ostatné	31	29	2	6,5

ktoré sú uvedené v tabuľke príslušnej legislatívy⁶⁻⁸. Na základe toho, všetkých 39 vzoriek predstavovalo aj vzorky nevyhovujúce, čo je 8,5 % nevyhovujúcich vzoriek na syntetické farbivá v mäsových výrobkoch.

Vyšetrené vzorky mäsových výrobkov nie sú len slovenskej výroby, ale aj výroby krajín Európskej únie (viď tabuľka I).

Vzorky boli vyšetované v rámci potravinového dozoru, ale taktiež boli vykonané cieľené kontroly (viď Tabuľka II).

U 30 vzoriek bola zistená prítomnosť syntetického farbiva ponceau 4R (E 124), z toho 2 vzorky obsahovali aj SY (E 110) a 2 vzorky alluru červenú (E 122). Prítomnosť SY (E 110) bola zistená u 1 vzorky a u 14 vzoriek bola zistená prítomnosť allury červenej (E 122).

Vyšetované boli rôzne druhy mäsových výrobkov (viď tabuľka III).

Záver

V Slovenských mäsových výrobkoch, vzhľadom na počet odobratých vzoriek, bola zistená prítomnosť syntetických farbív v podstate rovnaká ako u výrobkov z krajín Európskej únie.

Na zistenie prítomnosti syntetických farbív v mäsových výrobkoch boli úspešnejšie cieľené kontroly.

Najviac pozitívnych vzoriek bolo zistených u suchých salám. U 12 vzoriek bola zistená prítomnosť allury červenej (E 122) a u 9 ponceau 4R (E124). Taktiež tu bola zistená prítomnosť SY (E 110). Ďalšou skupinou mäsových výrobkov, ktoré sú najviac prifarbované syntetickými farbivami sú klobásky. U klobás bola zistená prítomnosť ponceau 4R (E124) v kombinácii s SY (E 110).

Na základe hodnotenia výsledkov pozitívnych náleзов v roku 2008 je naďalej potrebná kontrola nielen výrobkov zo Slovenska, ale aj výrobkov dovážaných z krajín Európskej únie.

LITERATÚRA

- Rosival L., Szokolay A. a kol.: *Cudzorodé látky v požívatinách*, p. 286–406. Osveta, Martin 1983.
- Macrae R.: *HPLC in food analysis*, Chap. 7, p. 259–273. Academic Press, Cambridge 1988.
- Davídek J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, p. 78. Alfa, Bratislava 1981.
- Gilhooley R.A., Hoodless M.: J. Chromatogr. 72, 325 (1972).
- Nollet L.M.L.: *Food analysis by HPLC*, Chap. 13., p. 523–574. Marcel Dekker, Inc., New York 2000.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 11. februára 2008 č. 04650/2008-OL, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca prídavné látky v potravinách.
- Smernica Európskeho parlamentu a Rady ES 94/36 z 30. júna 1994 o farbivách pre použitie do potravín (Ú.v. ES L 237, 10.9.1994).
- Nariadenie Európskeho parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 zo 16. decembra 2008 o prídavných látkach v potravinách.
- Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív Časť chémie, doplnok 1/2008, príloha 61, CH-10.1, Stanovenie syntetických farbív metódou HPLC.

STANOVENÍ KASEINOVÝCH FRAKCIÍ V KOZÍM MLÉČE METODAMI HPLC A ELEKTROFORÉZOU

LENKA RUPRICHOVÁ, MICHAELA DRAČKOVÁ, IVANA BORKOVCOVÁ, BOHUMÍRA JANŠTOVÁ a LENKA VORLOVÁ

*Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 61242, Brno, Česká republika
ruprichoval@vfu.cz*

Klíčová slova: kasein, kozí mléko, RP HPLC, elektroforéza SDS-PAGE

Abstrakt

Cílem práce bylo stanovení kaseinových frakcí v kozím mléce pomocí chromatografické a elektroforetické metody a porovnání těchto metod. Bylo analyzováno celkem 17 vzorků kozího mléka, které byly dodány z farmy z jihomoravského kraje v rozmezí 5 měsíců. Pro zjištění obsahu kaseinových frakcí byly použity metody RP-HPLC a elektroforéza SDS-PAGE. U obou metod byly nalezeny vhodné validační parametry. Obě metody byly shledány jako vhodné pro stanovení bílkovin kozího mléka.

Úvod

Mléko obsahuje více jak 100 různých proteinů, největší zastoupení však mají kaseiny (78 %). V současné době se ke kvantitativní a kvalitativní analýze jednotlivých proteinů nejčastěji používají metody: chromatografické (HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie), elektrochemické (elektroforéza) a imunochemické (ELISA)¹. Cílem této práce bylo ke stanovení kaseinových frakcí použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází RP-HPLC a gelové elektroforézy SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis). Při posuzování metod byla brána v úvahu analytická, technická i ekonomická kritéria.

Materiál a metodika

Vzorky

Vzorky kozího mléka byly získány z kozí farmy v Jihomoravském kraji České republiky. Farma má 75 koz plemene bílá krátkosrstá koza na 1. až 8. laktaci,

s průměrnou dojivostí 2–3 l denně, 600–800 l za rok. V období od poloviny května do začátku listopadu byly kozy krmeny letní krmnou dávkou zahrnující pastvu, 0,5 kg sena a do 1 kg jádra (ječmen, triticales, oves), vitamínová minerální směs a sůl, ve zbylém období zimní krmnou dávkou: 3 kg travní senáž, 1 kg cukrovková siláž, 1 kg seno a do 1 kg jádra, vitamínová minerální směs a sůl. Dojení bylo prováděno strojně 2× denně. Po nadojení bylo mléko zchlazeno na teplotu 4–6 °C. Při této teplotě bylo uchováno po dobu 12–24 h do tepelného ošetření stacionární pasterací při teplotě 72 °C po dobu 20 s. Odběr vzorků byl realizován po odstavu kůzlat v období duben – září 2005. Vzorky zchlazené na teplotu 4–6 °C, byly transportovány tak, aby nedošlo ke zvýšení jejich teploty na více než 8 °C. Po příjmu do laboratoře byly vzorky zamrazeny a při této teplotě skladovány do doby vyšetření.

Kaseiny byly izolovány a následně lyofilizovány² pomocí lyofilizátoru Lyovac GT 2 (Amsco/Finn-Aqua, Finland).

Chemikálie

Acetonitril (Merck, Německo), akrylamid, bisakrylamid, persíran sodný, TEMED, bromfenolová modř, glycin, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 2-merkapt ethanol, Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), trifluoroctová kyselina (TFA), standardy α_s -casein, β -casein, κ -casein (Sigma-Aldrich, Německo).

Příprava vzorků

Pro HPLC analýzu byl lyofilizovaný kasein rozpuštěn v roztoku Tris-HCl (pH 6,8) a byl přidán 2-merkapt ethanol. Dále byly vzorky přefiltrovány přes nylonový membránový filtr (0,2 μ m) do vialek.

Ke stanovení pomocí gelové elektroforézy SDS-PAGE byl lyofilizovaný kasein rozpuštěn v Tris-HCl (pH 6,8) za přídavku redukujícího pufru s 2-merkapt ethanol. Vzorky byly 2 min povařeny.

Podmínky stanovení

Ke stanovení byl použit kapalinový chromatograf Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou X Bridge TM C18, 150 \times 3,0 mm, 3,5 μ m (Waters, Irsko). Teplota kolony byla 45 °C. Mobilní fáze A obsahovala vodu/acetonitril/trifluoroctovou kyselinu (TFA) v poměru 95/5/0,1 (v/v/v) a mobilní fáze B vodu/acetonitril /TFA v poměru 5/95/0,1 (v/v/v). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹. Detekce byla prováděna při 205 nm. Velikost nástříku byla 10 μ l.

K separaci kaseinových frakcí u gelové elektroforézy byl použit separační gel (15 % T, 2,6 % C) a zaostřovací gel (3 % T, 2,6 % C)³ za použití Mini-Protean III Cell Electrophoresis apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Pro migraci byl použit dělicí pufr (30,3 g Tris, 144 g glycin, 10 g SDS doplněno do 1 litru destilovanou vodou) ředěný 1:9 s destilovanou vodou. Elektroforéza probíhala při 110 V při pokojové teplotě. Gely byly barveny Commaissie Brilliant Blue R-250.

Vyhodnocení

Sběr a vyhodnocení dat u metody RP-HPLC byly provedeny v programu Empower2 (Waters, USA) metodou vnějšího standardu. U gelové elektroforézy SDS-PAGE byla kvantifikace provedena v programu ElfoMan 2.0 (Servis Sale of Laboratory Equipment, Praha, ČR) na základě hustoty pixelů (převedené na %) jednotlivých ploch bandů kaseinových frakcí.

Základní statistické charakteristiky (průměr, medián, směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka, maximální hodnota, minimální hodnota a procenta) byly vypočítány pomocí Microsoft Excel.

Výsledky

Validace a optimalizace RP-HPLC metody

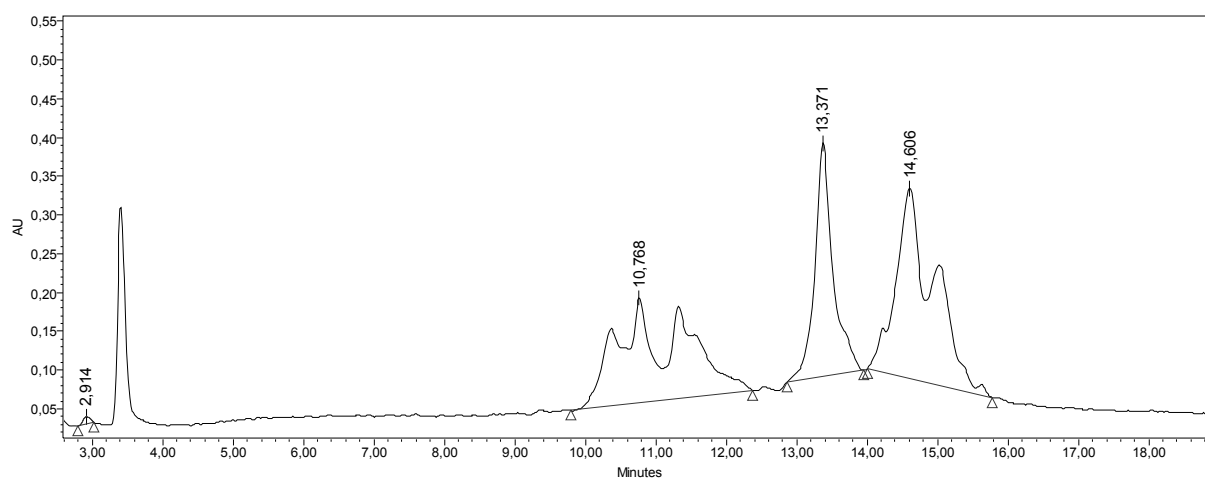
Optimalizace HPLC analýzy byla provedena pomocí standardních roztoků α -, β - a κ -kaseinu. Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnějšího standardu a kvantifikace byla provedena metodou časových skupin (timed groups). Individuální píky byly seskupeny do skupiny a zpracovány jako jeden pík. V případě κ -kaseinu byly sumarizovány píky v časovém rozmezí 10,00–12,50 min, u α -kaseinu 13,20–14,40 min a u β -kaseinu v rozmezí 14,10–16,00 min. Opakovatelnost postupu byla stanovena z výsledků

několikanásobného měření jednoho vzorku ($n = 6$) a byla stanovena jako RSD 4,6 % u α -kaseinu, RSD 6,7 % u β -kaseinu a RSD 0,7 % u κ -kaseinu. Limit detekce byl stanoven jako 3 S/N (poměr signál/šum) 0,0045 mg ml⁻¹ a mez stanovitelnosti (určena jako 10 S/N) byla 0,015 mg ml⁻¹. Ukázka chromatogramu standardů kaseinů je na obr. 1.

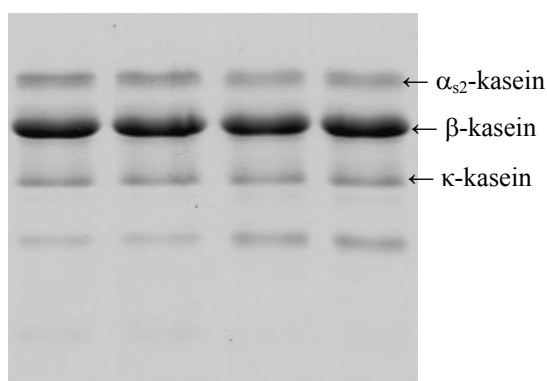
Validace a optimalizace metody SDS-PAGE

Optimalizace metody SDS-PAGE byla provedena pomocí standardního roztoku kaseinů. Kalibrační křivky byly sestaveny v koncentračním rozsahu: pro α -kasein a β -kasein 0,39–3,15 mg ml⁻¹ (α -kasein: $y = 0,7688x + 0,1107$, $R^2 = 0,9996$; β -kasein $y = 0,4542x - 0,0178$, $R^2 = 0,9933$), pro κ -kasein 0,40–3,20 mg ml⁻¹ ($y = 0,8317x - 0,0844$, $R^2 = 0,9908$). Citlivost metody byla zjištěna jako směrnice kalibračních přímek. Opakovatelnost metody byla zjištěna z výsledků několiknásobného měření jednoho vzorku a byla vyjádřena jako RSD = 11 % α -kasein; 11 % β -kasein; 11 % κ -kasein. Dále byla stanovena reprodukovatelnost nástřiku: RSD = 2,5 % α -kasein; 3,9 % β -kasein; 3,0 % κ -kasein. Limit detekce byl stanoven jako 3 S/N (poměr signál/šum) 0,08 mg ml⁻¹ pro α -kasein, 0,04 mg ml⁻¹ pro β -kasein a 0,07 mg ml⁻¹ pro κ -kasein. Mez stanovitelnosti (určena jako 10 S/N) byla 0,27 mg ml⁻¹ pro α -kasein, 0,14 mg ml⁻¹ pro β -kasein a 0,24 mg ml⁻¹ pro κ -kasein. Výtěžnost metody byla 75–108 %. Na obr. 2 je ukázka elektroforeogramu kozího mléka.

V tab. I jsou uvedeny obsahy kaseinů ve vzorcích kozího mléka. Literatura uvádí obsah kaseinových frakcí v kozím mléce: α -kasein 5,6 %, α -kasein 19,2 %, β -kasein 54,8 % a κ -kasein 20,4 %⁴. Ve srovnání s kravským mlékem je frakce α -kaseinu zastoupena v malých koncentracích na rozdíl od α -kaseinu⁵. Při rozdělení kaseinových frakcí pomocí elektroforézy SDS-PAGE byl chromatogram posouzen na základě srovnání s chromatogramem uvedeném v článku autorů Tomotake a spol.⁵. Pomocí



Obr. 1. Chromatogram standardů α -kasein, β -kasein, κ -kasein



Obr. 2. Elektroforeogram vzorku kozího mlieka

metody SDS-PAGE vyšla priemerná hodnota α_{S2} -kaseinu 14,06 %, β -kasein 73,62 % a κ -kasein 8,26 %. Hodnoty α_{S2} -kaseinu jsou srovnatelné s literaturou⁵. Hodnoty pro β -kasein a κ -kasein se liší, rozdíly mohou být způsobeny v závislosti na plemeni, výživě, ročním období, geografických podmínkách apod.⁴

Pomocí metody RP-HPLC byly zjištěny průměrné hodnoty pro α_{S1} -kasein 5,53 %, β -kasein 66,25 % a κ -

kasein 28,22 %. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s literaturou viz. výše⁴.

Závěr

Ke stanovení kaseinových frakcí v kozím mléce byla použita metoda RP-HPLC s PDA detekcí a gelová elektroforéza SDS-PAGE. Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že frakce α -kaseinu a κ -kaseinu se podstatně liší. Rozdíl výsledků může být daný tím, že u elektroforézy byl stanoven pouze α_{S2} -kasein, který je v kozím mléce podstatně více zastoupen než α_{S1} -kasein. U RP-HPLC byl stanoven α_{S1} -kasein. Elektroforéza SDS-PAGE je časově náročnější metoda v porovnání s RP-HPLC, ale na druhou stranu je SDS-PAGE cenově dostupnější.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

LITERATURA

1. Grappin R., Dupont D., Pochet S., Lefier D.: Analytical Methods, v knize: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F. *Encyclopedie of Dairy Science*, 3, p. 1967. Academic press, Amsterdam 2003.

Tabulka I

Obsah kaseinů jednotlivých vzorků v kozím mléce stanovený metodami RP-HPLC a elektroforézou SDS-PAGE

Číslo vzorku, %	RP-HPLC			Elektroforéza SDS-PAGE		
	α_{S1} -kasein	β -kasein	κ -kasein	α_{S2} -kasein	β -kasein	κ -kasein
1	4,06	76,00	19,95	8,00	78,50	9,50
2	5,40	72,89	21,71	10,50	79,00	6,50
3	4,94	67,00	28,06	11,00	78,00	9,00
4	5,48	65,90	28,63	18,50	66,00	7,50
5	5,08	67,94	26,99	19,50	68,00	7,50
6	4,87	64,38	30,75	15,00	68,50	7,50
7	4,25	66,46	29,28	6,50	86,50	8,00
8	6,77	72,17	21,06	20,50	67,00	6,00
9	5,07	66,65	28,28	13,00	74,00	10,50
10	4,83	68,07	27,10	12,50	78,00	5,50
11	4,39	67,36	28,25	20,00	66,50	8,50
12	5,43	64,53	30,05	9,00	82,00	9,00
13	7,65	61,51	30,84	8,50	86,00	8,00
14	5,56	62,06	32,39	16,00	54,50	16,00
15	9,08	58,46	32,46	13,00	75,00	9,50
16	5,38	61,04	33,59	16,00	75,00	5,50
17	5,82	63,77	30,41	21,50	69,00	6,50
<i>Průměr [%]</i>	<i>5,53</i>	<i>66,25</i>	<i>28,22</i>	<i>14,06</i>	<i>73,62</i>	<i>8,26</i>

2. López-Fandiño R., Olano A., Corzo N., Ramos M.: J. Dairy Res. 60, 339 (1993).
3. Laemmli U. K.: Nature 227, 680 (1970).
4. Park Y. W., v knize: Park Y. W., Haenlein G. F. W.: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, p. 34. Blackwell Publishing, London 2006.
5. Tomotake H., Okuyama R., Katagiri M., Fuzita M., Yamato M., Ota F.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 2771 (2006).

IDENTIFIKÁCIA MARKEROV RADIAČNÉHO OŠETRENIA VLAŠSKÝCH ORECHOV AKO POTENCIÁLNYCH KOMPONENTOV PEKÁRENSKÝCH ZMESÍ

JANA SÁDECKÁ a EMIL KOLEK

*Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovensko
sadecka@vup.sk*

Úvod

Produkcia kvalitných a bezpečných potravín nezaťažených prítomnosťou mikrobiálnej kontaminácie sa javí v súčasnosti ako jeden z globálnych problémov. V roku 1984 Komisia pre Codex Alimentarius vypracovala medzinárodnú normu pre radiačné ošetrovanie potravín a z legislatívneho hľadiska poskytla zásady správneho radiačného ošetrovania potravín do výšky priemernej dávky 10 kGy. Od počiatku 80. rokov rad predovšetkým rozvinutých krajín zaviedol legislatívne predpisy pre radiačné ošetrovanie potravín odpovedajúce zásadám kódexovej normy, a tak v 37 štátoch bolo povolených okolo 40 druhov radiačne ošetrovaných potravín¹. Rozdiely medzi národnými zákonmi, týkajúcimi sa ošetrovania potravín ionizujúcim žiarením a podmienkami jeho aplikácie, obmedzujú voľný pohyb potravín, môžu vytvoriť nerovnaké konkurenčné podmienky a tým priamo ovplyvňovať fungovanie vnútorného trhu v Európskom spoločenstve. Vzhľadom na uvedené skutočnosti Európsky parlament a Rada EÚ prijali rámcovú smernicu 1999/2/ES² o:

- aproximácii zákonov členských štátov týkajúcich sa potravín a potravinových prísad ošetrovaných ionizujúcim žiarením,
- ustanovení zásad správneho radiačného ošetrovania potravín do výšky priemernej dávky žiarenia 10 kGy,
- zásadách kontroly ožarovacieho procesu,
- prijatí zoznamu potravín v rámci Európskeho spoločenstva, ktoré možno ošetriť ionizujúcim žiarením, a tak zabezpečiť voľný pohyb tovaru na spoločnom trhu.

Vykonávacou smernicou 1999/3/EC (cit.³) Európskeho parlamentu a Rady EÚ bol ustanovený počiatočný zoznam radiačne ošetrovaných potravín a potravinových prísad – Community positive list of foodstuffs authorised for irradiation – zahŕňajúci sušené aromatické byliny, koreniny a rastlinné prísady ožiarené najvyššou priemernou dávkou žiarenia 10 kGy za účelom dezinfekcie a zníženia, resp. eliminácie patogénnych mikroorganizmov. Následne od roku 2000 je v členských štátoch EÚ povolené radiačné ošetrovanie sušených aromatických bylín, korenín a rastlinných prísad, ako i obdoby a obchodovanie s nimi na spoločnom trhu. Zoznam radiačne ošetrovaných potravín je priebežne dopĺňaný o ďalšie komodity navrhované členskými štátmi EÚ.

Čo sa týka výskumu chemických zmien a detekčných metód na identifikáciu ožiarených potravín, tento je vysoko aktuálny a venujú sa mu výskumné tímy jednotlivých krajín^{4–14}. Navyše Rada a Komisia EÚ a tiež jej členské štáty dali vyhlásenie v smernici 1999/2/ES (cit.²) o podporovaní ďalšieho rozvoja normalizovaných, alebo už schválených analytických metód, zameraných na overovanie a dôkaz radiačne ošetrovaných potravín.

Identifikácii markerov radiačného ožarovania rôznych korenín (aníz, bazalka, škoricca, oregano, chilli, čierne korenie, paprika, rozmarín, šalvia) γ -žiarením dávkami 5 a 10 kGy bola venovaná práca autorov⁴. Zistilo sa, že γ -žiarenie indukuje v koreninách tvorbu nenasýtených uhlíkovodíkov, a to alkénov C_{16:2}, C_{16:1}, C_{17:2}, C_{17:1}, ktorých množstvo rástlo s dávkou žiarenia. Najmä alkén C_{17:1} sa ukázal ako dobrý indikátor aplikácie γ -žiarenia, pretože jeho obsah v silici korenín sa menil lineárne s dávkou ožarovania od 5 do 10 kGy. Tvorba nenasýtených uhlíkovodíkov ako potenciálnych markerov ošetrovania ionizujúcou energiou sa ukazuje byť zvlášť zaujímavá v súvislosti so štúdiom takto ošetrovaných orechovín, obsahujúcich významný podiel lipidickej frakcie, o to viac, že tieto potravinárske komodity môžu byť aktuálne pre ošetrovanie ionizujúcim žiarením hlavne v dôsledku prítomnosti mykotoxínov. Práve zastúpenie mastných kyselín v lipidickej frakcii orechovín ako prekursorov alkénov indikuje ich možnú prítomnosť po expozícii matrice ionizujúcou energiou^{15–17}.

V súvislosti s momentálnym trendom prípravy pekárskych výrobkov v domácich pekárňach – a to tak u nás, ako i v rámci Európy – javí sa perspektívne príprava kompletných múčnych zmesí určených pre maloobchod, vhodných na domácu výrobu chleba a jemného pečiva, ktoré by spĺňali atribúty potravinovej bezpečnosti a organoleptickej kvality. Okrem receptúr reflektujúcich stravovacie návyky slovenských konzumentov, je snaha rozšíriť sortiment kompletných múčnych zmesí aj o kategóriu napr. špeciálnych druhov chlebových zmesí s prídavkom vlašských orechov, slnečnicových jadier, sezamových semienok.

Vzhľadom k uvedeným skutočnostiam cieľom tejto práce bolo:

- štúdium chemických zmien v lipidickej frakcii vlašských orechov ožiarených γ -žiarením so zámerom charakterizovať tieto zmeny spôsobujúce prípadný pokles ich organoleptickej kvality,
- určiť optimálnu dávkou žiarenia pre elimináciu prítomnej nežiadúcej mikroflóry pri súčasnom zachovaní organoleptickej kvality orechov,
- pokus o identifikáciu markerov ožarovania v predmetnej potravinárskej komodite.

Experimentálna časť

Experimentálny materiál

Vlašské orechy (*Juglans regia* L.), odroda Jupiter/Apollo, lúpané, 15 kg.

Obsah sušiny 96,2 % (stanovené pri 105 °C, počas 5 h do konštantnej hmotnosti, výsledok je priemerná hodnota z troch paralelných stanovení).

Dodávateľ: súkromný producent (Chorvátsky Grob).

Balenie experiment. vzoriek: orechové jadrá boli navážené do polyetylénových vreciek so suchým zipsom, v ochrannej atmosfére N₂. Hmotnosť jednotlivých experiment. vzorky bola 50 g. Po ožarovaní boli balíčky experiment. vzoriek obalené alumíniovou fóliou na eliminovanie priepustnosti O₂ a vzdušnej vlhkosti. Tento spôsob balenia má súčasne simulovať jednu z možností používaných obalových materiálov orechovín v maloobchodnej sieti. Skladovanie experiment. vzoriek: v mrazničke pri –18 °C.

Ožarovanie v komerčných podmienkach

Zdroj žiarenia: γ -žiarenie z Co⁶⁰, miesto ožarovania: ARTIM, s.r.o. Praha – CZ, hladiny γ -žiarenia: 0 kGy, 0,25 kGy, 0,5 kGy, 1 kGy, 1,5 kGy, 2 kGy, 3 kGy, 4 kGy, 5 kGy pri dávkovej rýchlosti 2 kGy h⁻¹.

Mikrobiologická analýza

V intenciách požiadaviek Potravinového kódexu sa pre neošetrenú (kontrolnú) vzorku vlašských orechov stanovil počet koliformných baktérií, kvasiniek a plesní i celkový počet mikroorganizmov (CPM) podľa platných noriem: STN EN ISO 4833, STN ISO 4832, STN ISO 7954. Analýzy sa realizovali zriedňovacou kultivačnou metódou podľa STN EN ISO 6887-1. Súčasne sa sledoval vývoj mikrobiologickej situácie počas doby skladovania (3 mesiace, 6 mesiacov) ako kontrolnej, tak i ožiarených vzoriek.

Senzorická analýza

Hodnotiteľský panel tvorilo 7 posudzovateľov (4 ženy, 3 muži, priemerný vek 40 rokov). Hodnotilo sa v 8 kvalitatívnych parametroch (deskriptoroch): chuť – sladká, horkastá orechová, typická orechová, typická tuková, tuková zoxidovaná (rybacia), celková chuťnosť, vôňa, doznievanie arómy v 6-bodovej kvantitatívnej škále (0–5). Pre vyhodnotenie senzorickej analýzy sa využilo štatistické spracovanie dát metódou kanonickej diskriminačnej analýzy programom Unistat® (Unistat Ltd., 4 Shirland Mews, London W9 3DY, England).

Izolácia lipidickej frakcie vlašských orechov, GC analýzy profilu mastných kyselín

Izolácia lipidickej frakcie vlašských orechov podľa Soxhleta

Metóda je kombináciou bázičky a kyslo katalyzovanej esterifikácie. Vzniknuté metylestery mastných kyselín sa analyzovali pomocou plynovej chromatografie s využitím plameňovo-ionizačného detektora (GC/FID). Z každej vzorky (0 kGy, 0,25 kGy, 1 kGy, 1,5 kGy, 2 kGy, 3 kGy, 4 kGy, 5 kGy) sa realizovali 2 paralelné izolácie lipidickej frakcie, ktoré sa v ďalšom esterifikovali a chromatograficky separovali a analyzovali.

GC/FID analýzy profilu mastných kyselín

Predmetné stanovenia boli realizované ako akreditované analýzy podľa štandardného pracovného postupu ŠPP ORG.M.047 GC s medzilaboratórnym porovnaním.

Identifikácia markerov indukovaných ožiarení v tukovej frakcii vlašských orechov

Postupovalo sa v intenciách normy STN EN 1784: Detekcia ožiarených potravín obsahujúcich tuk. Metóda je založená na GC detekcii ožiarením vytvorených uhl'ovodíkov.

Izolácia tukovej frakcie z vlašských orechov (podľa predmetnej normy, bod 7.3. Extrakcia tuku zo vzoriek syra a ovocia). Z každej dávky ožiarených orechov sa urobili 2 paralelné izolácie tuku.

Prečistenie tuku na kolóne s Florisilom

Príprava Florisilu: podľa uvedenej normy.

Prídavok štandardného roztoku C₂₀: po extrakcii sa zmiešal vždy 1 g získaného tuku s 1 ml roztoku *n*-eikozánu v hexáne (*c* = 3 µg ml⁻¹).

Kolónová chromatografia s Florisilom: frakcia uhl'ovodíkov sa získala adsorpčnou kolónovou chromatografiou na Florisile. Uhl'ovodíky sa izolovali použitím cca 20 g deaktivovaného Florisilu pre každú vzorku. Po naplnení Florisilom sa kolóna zmáčala cca 50 ml *n*-hexánu. Množstvo 1 g vyextrahovaného tuku sa kvantitatívne prenieslo do chromatografickej kolóny, pridalo sa 3 ml vnútorného štandardu C₂₀ a uhl'ovodíky sa vymývali 60 ml eluentu s prietokom asi 3 ml min⁻¹. Získaný eluát sa zakoncentroval na 1 ml odľúkaním dusíkom a použil sa na analýzu plynovou chromatografiou.

Separácia a detekcia uhl'ovodíkov pomocou GC/MS

Kolóna: DB-XLB (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm), nosný plyn hélium, ionizačná energia 70 eV

Spôsob dávkovania: Splitless, 1 µl

Teplotný program: 60 °C (1 min), 10 °C min⁻¹, 245 °C, 70 °C min⁻¹, 320 °C (4,0 min)

Režim MSD: SIM mód

Z každej frakcie uhl'ovodíkov sa realizovali 2 GC/MS analýzy, t.j. 4 analýzy z príslušnej dávky (0 kGy, 0,5 kGy, 1 kGy, 3 kGy, 5 kGy) ožiarených orechov

Štandardné roztoky uhl'ovodíkov (pre výpočet obsahu uhl'ovodíkových markerov ožiarenia)

8-heptadecén 8-17:1

6,9-heptadekadién 6,9-17:2

Z každého štandardu uhl'ovodíka bolo pripravených 5 koncentračných úrovní: $1 \mu\text{g ml}^{-1} \text{C}_6$, $2 \mu\text{g ml}^{-1} \text{C}_6$, $3 \mu\text{g ml}^{-1} \text{C}_6$, $4 \mu\text{g ml}^{-1} \text{C}_6$, $5 \mu\text{g ml}^{-1} \text{C}_6$, z každej koncentračnej úrovne sa urobili 3 GC analýzy. Výpočet obsahu uhl'ovodíkov ako markerov radiačného ošetrenia sa vykonal metódou kalibračnej krivky.

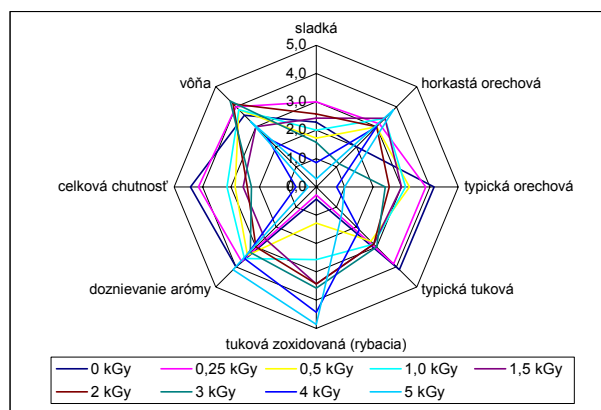
Výsledky a diskusia

Štúdium vplyvu dávky ionizujúceho žiarenia na mikrobiologickú kvalitu vlašských orechov

Výsledky mikrobiologickej analýzy (tab. I) poukazujú na fakt, že experimentálna vzorka neošetrených vlašských orechov bola mikrobiologicky pomerne málo kontaminovaná – celkový počet mikroorganizmov (CPM) bol $6,0 \cdot 10^2 \text{ KTJ g}^{-1}$. V dôsledku toho, dávka 1,5 kGy až 2 kGy ionizujúceho žiarenia bola postačujúca na eliminovanie prítomnej bakteriálnej mikroflóry v predmetnej vzorke orechov. Čo sa týka prítomnosti kvasiniek a plesní, na ich zlikvidovanie bola účinná hladina 0,5 kGy ionizujúceho žiarenia. Ukázalo sa, že uvedené dávky žiarenia sú účinné pre elimináciu prítomnej mikrobiologickej záťaže minimálne počas 6 mesačnej doby skladovania predmetnej vzorky vlašských orechov.

Senzorická analýza vo vzťahu k ožarovaniu

Výsledky senzorickej analýzy realizovanej panelom hodnotiteľov sú vizualizované v hviezdicových diagramoch (obr. 1 a 2). Najmä obr. 2 jasne demonštruje vplyv ionizujúceho žiarenia na pokles pozitívnych kvalitatívnych senzorických deskriptorov (celková chuťnosť, sladká chuť,



Obr. 1. Hviezdicový diagram senzorickej hodnotenia vlašských orechov pred a po ožiarení ionizujúcim žiarením dávkami od 0,25 kGy do 5 kGy

typická orechová chuť, typická tuková chuť, vôňa) s nárastom hladiny ožiarenia. Naopak, dávka žiarenia výrazne zhoršuje deskriptory typu: tuková zoxidovaná (rybacia) chuť, horkastá orechová chuť, ktoré sú dôsledkom oxidácie tukovej frakcie orechov vplyvom ionizujúceho žiarenia. Na základe parametrov kanonickej diskriminačnej analýzy vyplýva, že na diskrimináciu najvýznamnejšie prispievajú prvé tri diskriminačné funkcie (DF), ktoré sa kumulatívne podieľajú 96 % na celkovej variabilite dát.

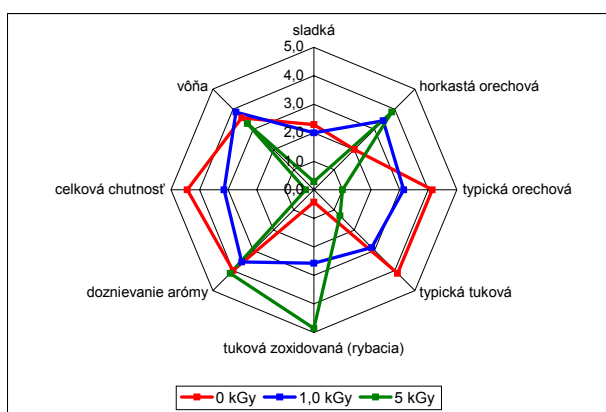
Najvýznamnejšia je prvá DF so 77 %, druhá s 12 % a tretia so 7 %. Súčasne, hodnoty vlastného čísla (eigenvalue) sú pre tieto DF významné a sú väčšie ako 1 a hodnoty Wilksovej lambdy pre všetky DF sú blízke hodnote 0. Podľa hodnôt štandardizovaných koeficientov na diskrimináciu v 1. DF najviac prispievajú nasledovné senzorické deskriptory: zoxidovaná chuť, celková chuťnosť a vôňa, v 2. DF zoxidovaná chuť, vôňa a tuková aróma a v 3. DF horkastá chuť, tuková aróma a doznievanie arómy.

Tabulka I

Mikrobiologická analýza radiačne ošetrených vlašských orechov okamžite po ožiarení

Vlašský orech dávka ožiarenia	CPM (KTJ.g ⁻¹)	Koliformné baktérie (KTJ.g ⁻¹)	Kvasinky a plesne (KTJ.g ⁻¹)
0 kGy	$6,0 \cdot 10^2$	<10	pozit.
0,25 kGy	<10	<10	pozit.
0,5 kGy	<10	<10	negat.
1 kGy	$1,5 \cdot 10^1$	<10	negat.
1,5 kGy	$1,0 \cdot 10^1$	<10	negat.
2 kGy	<10	<10	negat.
3 kGy	<10	<10	negat.
4 kGy	<10	<10	negat.
5 kGy	<10	<10	negat.

^a KTJ – kolóniotvorná jednotka



Obr. 2. Hviezdicový diagram senzorickeho hodnotenia ožiarených vlašských orechov vybranými dávkami ionizujúceho žiarenia (0 kGy, 1 kGy a 5 kGy)

Podľa matice štruktúr s DF najlepšie korelujú deskriptory charakterizujúce zoxidovanú chuť, tukovú arómu a horkastú chuť. Klasifikačnou procedúrou pri kanonickej diskriminačnej analýze sa dosiahla úspešnosť 76,2 % zatried'ovania vzoriek podľa jednotlivých dávok ožiarenia (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 a 5 kGy). Kroková diskriminačná analýza selektovala deskriptory senzorickeho hodnotenia podľa významnosti vplyvu na diferenciáciu v nasledovnom klesajúcom poradí: zoxidovaná chuť, celková chuťnosť, vôňa a horkastá chuť. Pri senzorickej hodnotení extrahovaných dávok ožiarenia 0, 1, 2, 3, 4 a 5 kGy sa dosiahla veľmi vysoká úspešnosť 95,2 % klasifikácie. Získané výsledky v súčinnosti s multivariačným štatistickým spracovaním dát demonštrujú vysokú citlivosť senzorickeho hodnotenia ožiarených vlašských orechov pri predmetných šetrných a súčasne veľmi blízkych hladinách radiačného ošetrovania na základe dobre zostaveného panelu hodnotiteľov (počet hodnotiteľov, pohlavie, vek), ako aj vhodne vybraných deskriptorov, čo sa týka kvalitatívnych i kvantitatívnych ukazovateľov.

Isolácia lipidickej frakcie vlašských orechov, GC analýzy profilu mastných kyselín

Sumarizácia výsledkov je uvedená v tab. II. Relatívne

Tabuľka II
GC/FID analýzy profilu mastných kyselín vlašských orechov

Mastná kyselina	Relatívne zastúpenie (%)								
	0 kGy	0,25kGy	0,5 kGy	1 kGy	1,5 kGy	2 kGy	3 kGy	4 kGy	5 kGy
K. α -linolénová 18:3	13,2	13,0	12,0	12,2	11,9	12,1	12,1	11,9	11,8
K. linolová 18:2	58,0	57,8	57,0	56,3	57,7	56,1	57,2	56,7	56,2
K. olejová 18:1	19,5	20,1	22,2	22,2	21,2	22,6	21,4	21,9	21,7
K. palmitová 16:0	6,8	6,7	6,5	6,6	6,8	6,8	6,8	7,0	6,8
K. stearová 18:0	2,5	2,4	2,4	2,6	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5
Tuk	64,6	63,1	65,7	64,8	62,7	65,0	63,4	65,4	65,0

zastúpenie lipidickej frakcie v prípade analyzovaného kultivaru vlašských orechov dosahuje hodnoty v intervale 62,7–65,7 % v závislosti na použitej dávke žiarenia. Z tab. II je zjavné, že lipidická frakcia vlašských orechov je tvorená dominantne tromi nenasýtenými mastnými kyselinami (MK), s najvyšším zastúpením kyseliny linolovej (58 %), následne kyseliny olejovej (19,5 %) a kyseliny linolénovej (13,2 %). Tieto vysoké hladiny nenasaturovaných MK môžu mať jednak dopad na trvanlivosť, resp. dobu skladovania vlašských orechov v porovnaní k iným druhom orechovín, ako aj významný príspevok k charakteristickej aróme vlašských orechov. Čo sa týka štúdia vplyvu dávky γ -žiarenia na obsahy jednotlivých MK, výsledky v tab. II poukazujú na fakt, že hodnoty relatívneho zastúpenia nasýtených MK (kyselina palmitová, kyselina stearová) oscilujú okolo hodnôt nameraných v neožiarennej vzorke orechov, a teda s rastúcou hladinou žiarenia nie je pozorovaný zrejmy trend v náraste či poklese, čo poukazuje na relatívnu stabilitu saturovaných MK.

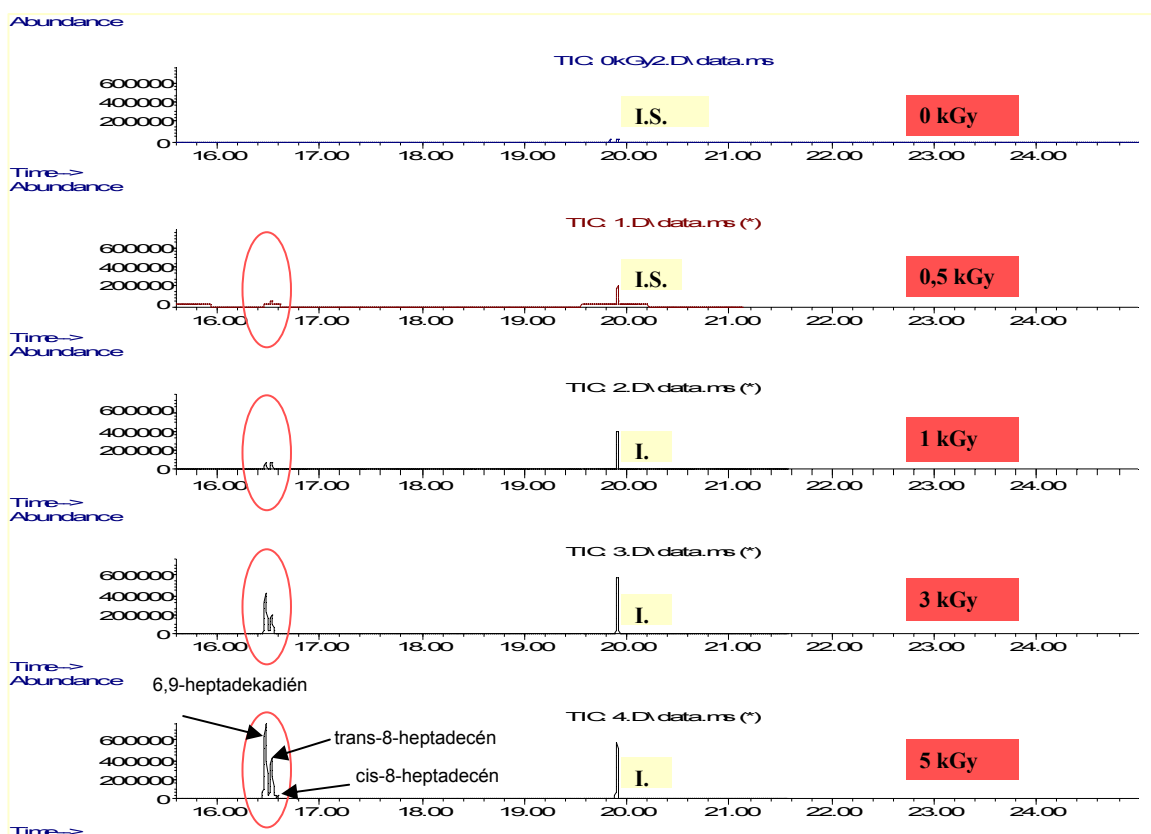
Čo sa týka relatívneho zastúpenia nenasýtenej MK s jednou dvojitou väzbou (kyselina olejová), s aplikovanou dávkou žiarenia narastá jej relatívny obsah rôznou mierou, nie proporčne. Naopak, so zvyšujúcou sa hladinou ožiarenia je jasný trend v poklese obsahu kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej, ktoré sú charakteristické vysokou mierou nenasýtenosti (prítomnosť dvoch, resp. troch dvojitých väzieb).

Identifikácia markerov indukovaných ožiarovaním v tukovej frakcii vlašských orechov

Výsledky identifikácie a kvantifikácie nenasýtených uhl'ovodíkov ako markerov radiačného ošetrovania vlašských orechov, získané z GC/MS analýz realizovaných

Tabuľka III
Kvantifikácia markerov radiačného ošetrovania vlašských orechov (výsledky sú uvedené v $\mu\text{g g}^{-1}$ tuku)

Marker ožiarenia	Dávka žiarenia			
	0,5 kGy	1 kGy	3 kGy	5 kGy
6,9-heptadekadién	0,22	0,90	3,64	7,03
trans-8-heptadecén	1,50	1,18	1,93	3,91
cis-8-heptadecén	0,30	0,22	0,21	0,26



Obr. 3. GC/MS analýza markerov radiačného ošetrovania

2 mesiace po ožiarení, sú uvedené v tab. III.

Detekcia ožiarených vlašských orechov sa overovala pre dávky 0,5 kGy a vyššie, čím sa pokrývajú komerčné aplikácie pre túto komoditu. Z výsledkov je zrejmé, že kvantita 6,9-heptadekadiénu s narastajúcou hladinou ionizujúceho žiarenia sa evidentne zvyšuje. Čo sa týka polohových izomérov 8-heptadecénu, tento trend sa nepozoroval. Významné však je, že už hladina 0,5 kGy je z hľadiska detekcie radiačného ošetrovania pomocou tejto metódy preukázateľná (obr. 3).

Záver

Študovaný bol vplyv rôznych hladín ionizujúceho žiarenia v intervale 0–5 kGy jednak na redukciu, resp. elimináciu prítomnej mikrobiálnej mikroflóry, ako i na zložky lipidickej frakcie lúpaných vlašských orechov s využitím metód plynovej chromatografie (GC/FID, GC/MS). Z mikrobiologických analýz danej vzorky orechov vyplynulo, že dávka 1,5 kGy až 2 kGy ionizujúceho žiarenia je postačujúca na eliminovanie prítomnej bakteriálnej

mikroflóry ($\text{CPM} = 6,0 \cdot 10^2 \text{ KTJ g}^{-1}$). Čo sa týka prítomnosti kvasiniek a plesní, na ich zlikvidovanie bola účinná hladina 0,5 kGy ionizujúceho žiarenia. S aplikovanou dávkou žiarenia boli pozorované významné zmeny v relatívnom zastúpení niektorých mastných kyselín, najmä kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej. Pozornosť sa venovala aj identifikácii markerov radiačného ošetrovania vlašských orechov (špecifické nenasýtené uhl'ovodíky) pomocou metód GC. Ukázalo sa, že už hladina 0,5 kGy ionizujúceho žiarenia je z hľadiska detekcie radiačného ošetrovania preukázateľná. Významná časť práce sa venovala senzorickej analýze so štatistickým vyhodnotením. Pri senzorickej hodnotení extrahovaných dávok ožiarenia 0, 1, 2, 3, 4 a 5 kGy sa dosiahla veľmi vysoká úspešnosť 95,2 % klasifikácie. Získané výsledky v súčinnosti s multivariačným štatistickým spracovaním dát demonštrujú vysokú citlivosť senzorickej hodnotenia ožiarených vlašských orechov pri predmetných šetrných a súčasne veľmi blízkych hladinách radiačného ošetrovania na základe dobre zostaveného panelu hodnotiteľov (počet hodnotiteľov, pohlavie, vek), ako aj vhodne vybraných deskriptorov, čo sa týka kvalitatívnych i kvantitatívnych ukazovateľov.

Táto práca bola riešená v rámci projektu VMSP – P-0089-09 podporovaného agentúrou APVV a projektu „Vybudovanie HiTech centra pre výskum vzniku, eliminácie a hodnotenia prítomnosti kontaminantov v potravinách“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- Loaharanu P.: Food Technol. 5, 124 (1994).
- Smernica 1999/2/ES Európskeho parlamentu a Rady z 22.februára 1999 o aproximácii zákonov členských štátov týkajúcich sa potravín a potravinových prísad upravovaných ionizujúcim žiarením.
- Smernica 1999/3/EC Európskeho parlamentu a Rady z 22.februára 1999 o zostavení zoznamu potravín a potravinových prísad Spoločenstva, upravovaných ionizujúcim žiarením.
- Bendini A., Gallina-Toshi T., Lercker G.: Z. Lebensm. Unters. Forsch./Food Res. Technol. 3, 214 (1998).
- Polovka M., Brezová V., Šimko P.: J. Food Nutr. Res. 46, 75 (2007).
- Polovka M., Suhaj M., Sádecká J., in: *Books of abstr.*, Austrian Food Chem. Days, Eisenstadt, Austria, 27-30 May 2008, p. 44, 2008.
- Raffi J., Yordanov N.D., Chabane S., Douifi L., Gancheva V., Ivanova S.: Spectrochim. Acta, A 56, 409 (2000).
- Ukai M., Shimoyama Y.: Appl. Magn. Reson. 24, 1 (2003).
- Smith J.S., Pillai S.: Food Technol. 58, 48 (2004).
- Yordanov N.D., Aleksieva K.: Radiat. Phys. Chem. 69, 59 (2004).
- Suhaj M., Rácová J., Polovka M., Brezová V.: Food Chem. 97, 696 (2006).
- Sádecká J.: Czech J. Food Sci. 25, 231 (2007).
- Sádecká J., Polovka M.: J. Food Nutr. Res. 47, 85 (2008).
- Sádecká J.: Czech J. Food Sci. 28, 44 (2010).
- Sánchez-Bel P., Martín-Madrid M.C., Egea I., Romojaro F.: J. Agric. Food Chem. 53, 2567 (2005).
- Crews C.: J. Agric. Food Chem. 53, 4843 (2005).
- Crews C.: J. Agric. Food Chem. 53, 4853 (2005).

Abstract

Microbiological quality, sensory and chemical changes of lipid fractions of γ -irradiated walnuts (*Juglans regia* L.) were evaluated using microbiological analysis, sensory evaluation, methods of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and gas chromatography with flame-ionising detector (GC/FID). Doses of γ -irradiation were set in interval 0.5–5 kGy, whereas 10 kGy level represents the highest permitted dose for food applications. Microbiological analysis proved that γ -irradiation was an effective sterilisation tool which eliminated present microorganisms and coliform bacteria from initial count $6.0 \cdot 10^2$ CFU g^{-1} already by 1.5 kGy dose. Dose of only 0.5 kGy was sufficiently effective for killing of present moulds. Quoted levels of ionising radiation were adequate for elimination of microbiological load during 6 months storage minimally. Organoleptic properties of irradiated walnuts were only slightly influenced at dose of 2 kGy. The higher irradiation levels affected organoleptic status of studied walnuts negatively. Significant changes in relative content of some fatty acids, mainly linoleic and linolenic acid were observed by influence of ionising radiation. Unsaturated hydrocarbons such as 6,9-heptadecadiene, *trans*- and *cis*-8-heptadecenes, determined by GC/MS proved to be suitable markers of γ -irradiation capable of detection already of 0.5 kGy dose application.

TROJROZMERNÉ FLUORESCENČNÉ SPEKTRÁ LIEHOVÍN AROMATIZOVANÝCH BORIEVKAMI

**JANA SÁDECKÁ, PAVEL MÁJEK
a DIANA MARKECHOVÁ**

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

Úvod

Liehoviny aromatizované borievkami sú liehoviny, ktoré sa vyrábajú na Slovensku aromatizovaním liehu, obilného destilátu, alebo obilného brandy látkami získanými z bobúľ borievky cédrovitej (*Juniperus oxycedrus*), do ktorých možno pridávať prírodné vonné a chuťové látky; vôňa a chuť borievok musí byť rozlíšiteľná; takto vyrobenú liehovinu možno nazvať borovička¹. V Európskej únii sú v tejto kategórii chránené značky Spišská borovička, Slovenská borovička Juniperus, Slovenská borovička, Inovecká borovička a Liptovská borovička². Senzorické vlastnosti aromatizovaných nápojov súvisia s prítomnosťou rôznych prchavých a semiprchavých zložiek v plodoch borievky a závisia od mnohých faktorov (botanický druh borievky, lieh, geografická poloha, výrobný postup).

V literatúre možno nájsť rôzne výsledky stanovení prchavých/semiprchavých zložiek v plodoch, ihličí a dreve borievky, avšak analýze málo prchavých aromatických zlúčenín sa venuje malá pozornosť. Len nedávno bola publikovaná prvá komplexnejšia práca o stanovení flavonoidov a biflavonoidov v plodoch borievky metódou HPLC³. Analýzou ihličia borievky sa zistilo, že obsahuje tokoferol⁴; v dreve borievky sa nachádza napr. naringenin a aromadendrin⁵. Mnohé z týchto zložiek môžu prispievať k fluorescencii destilátov aromatizovaných borievkami. Ďalšie zaujímavé fluorofory sú kumaríny⁶, aj keď kvantitatívne údaje nie sú v literatúre dostupné.

Z borievkových destilátov je vo svete najrozšírenejší gin. V literatúre sú dostupné informácie o stanovení prchavých/semiprchavých zložiek v éterickom oleji používanom na výrobu ginu metódou GC-GC/MS⁷, avšak analýza menej prchavých zlúčenín je zriedkavá. V nedávno publikovanej práci autori⁸ metódou GC-MS identifikovali a stanovili v gine rôzne diterpenoidy a ukázali, že hierarchická klastrová analýza umožňuje rozlíšiť rôzne značky ginu.

Cieľom tejto práce bolo štúdium možností využitia trojrozmernej fluorescenčnej spektrometrie v kombinácii s metódou PARAFAC (Parallel Factor Analysis)⁹ na charakterizáciu a klasifikáciu borovičiek slovenských výrobcov. Trojrozmerné fluorescenčné spektrá sa získali postupným meraním emisných spektier pri rôznych excitačných vlnových dĺžkach.

Experimentálna časť

Prístroje a zariadenia

Na meranie fluorescenčných spektier sa použil Perkin-Elmer LS 50 Luminescence spectrometer s Xe lampou. Spectrometer LS 50 bol spojený s počítačom; na zber údajov a následné spracovanie spektier sa použil FL Data Manager Software (Perkin-Elmer). Merali sa emisné fluorescenčné spektrá vzoriek destilátov v 1×1 cm kremennej kvyete v rozsahu vlnových dĺžok 250–550 nm, pričom excitačná vlnová dĺžka sa nastavovala od 200 do 450 nm s krokom 5 nm. Získalo sa 51 emisných spektier. Šírka excitačnej a emisnej štrbiny monochromátora bola 2,5 nm, rýchlosť skenovania bola 200 nm min⁻¹.

Vzorky destilátov

Merali sa fluorescenčné spektrá 44 vzoriek destilátov slovenských producentov 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), Original Spiš borovička (GAS Família) obsahujúca vetvičku borievky, Original Spišská borovička (GAS Família) obsahovala bobule borievky.

PARAFAC

Z nameraných spektier sa pre každú vzorku vytvorila excitačno-emisná dátová matica (EEM). Súbor matíc sa upravil a spracoval programami Microsoft Office Excel 2003, Statistica version 7.0 (StatSoft, USA, 2004), MATLAB version 7.0 (The MathWorks Inc., USA, 2005) a The N-way toolbox for MATLAB¹⁰ metódou PARAFAC.

PARAFAC je zovšeobecnená metóda hlavných komponentov (PCA, principal component analysis) pre N-rozmerné dáta, často využívaná na modelovanie fluorescenčných excitačno-emisných dát. Podrobný opis metódy, typ dát vhodných pre PARAFAC, ako aj využitie metódy v chemometrii možno nájsť v práci⁹, ktorú publikoval Bro v r. 1997. Rôzne ďalšie informácie, modelové dáta, ako aj voľne dostupné programy, sú napr. na stránke <http://www.models.life.ku.dk/source/nwaytoolbox>. Tu len veľmi stručne uvedieme princíp modelu PARAFAC a výsledky, ktoré možno jeho riešením získať.

Ak sa vo vzorke nachádza F fluoroforov f , intenzita fluorescencie x_{jk} pri emisnej vlnovej dĺžke j a excitačnej vlnovej dĺžke k je:

$$x_{jk} = \sum_{f=1}^F a_f b_{jf} c_{kf}$$

kde a_f je koncentrácia fluoroforu f , b_{jf} je relatívna emisia fluoroforu f pri emisnej vlnovej dĺžke j a c_{kf} je relatívna absorpcia fluoroforu f pri excitačnej vlnovej dĺžke k . Pre viac vzoriek je intenzita fluorescence vzorky i pri emisnej vlnovej dĺžke j a excitačnej vlnovej dĺžke k :

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf}$$

kde x_{ijk} je intenzita fluorescence vzorky i pri emisnej vlnovej dĺžke j a excitačnej vlnovej dĺžke k a a_{if} je koncentrácia fluoroforu f vo vzorke i . Model PARAFAC má podobný tvar:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$

kde e_{ijk} predstavuje zostávajúci šum (podobne ako matica reziduí – odchýlok – v PCA) a vypočíta sa minimalizovaním sumy štvorcov odchýlok e_{ijk} . Výsledkom riešenia sú relatívne koncentrácie (sample scores, loadings) a spektrálne profily – excitačné a emisné spektrum (spectral loadings – excitation/emission loadings) fluoroforov (factors, components) vo vzorkách⁹. V PCA je obvyklé označenie skóre komponentov (scores) a váhy komponentov (loadings). Pre PARAFAC by preklad mohol byť: sample scores – skóre komponentov a excitation/emission loadings – váhy excitačných/emisných komponentov.

Výsledky a diskusia

Fluorescenčná spektrometria

Na obr. 1 sú uvedené fluorescenčné spektrá troch vzoriek borovičiek vo forme vrstevnicových spektrálnych máp – súradnicová poloha na mape je kvalitatívnou charakteristikou fluoroforu (λ_{ex} a λ_{em}) a vrstevnice spájajúce body s rovnakou intenzitou fluorescence obsahujú kvantitatívnu informáciu. Spektrá týchto troch vzoriek dobre reprezentujú celú sériu borovičiek – prvá vzorka je „čistá“

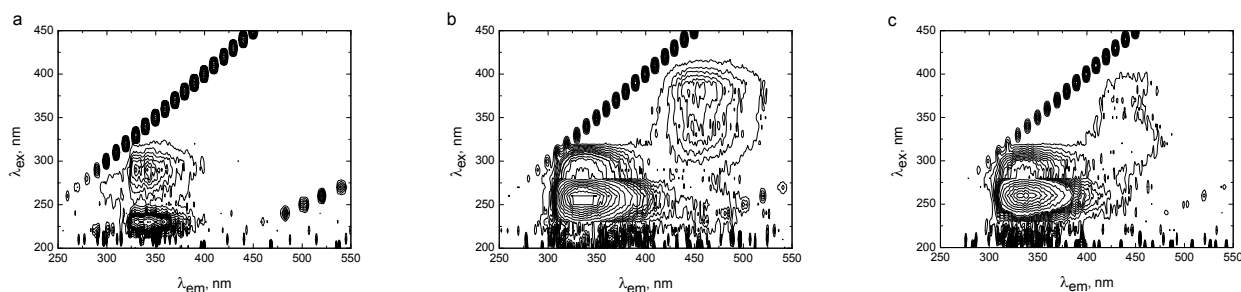
borovička, druhá borovička obsahovala vetvičku a v tretej vzorke sa nachádzali bobule borievky.

Všetky vzorky vykazujú fluorescenciu v intervale emisných vlnových dĺžok 310–380 nm pri excitácii v intervale 230–300 nm. Jednotlivé borovičky sa odlišujú nielen polohou maxim fluorescenčných pásov, ale hlavne intenzitou fluorescence v tejto oblasti. Pre niektoré borovičky sa namerali dva pomerne málo intenzívne pásy pri excitácii v oblasti 220–240 nm a 270–300 nm a jeden emisný pás okolo 320–380 nm. V nedávno publikovanej práci autori identifikovali v gine rôzne diterpenoidy⁸; niektoré z nich, napr. totarol, môžu byť zdrojom uvedenej fluorescence¹¹. Pre vzorky obsahujúce vetvičku borievky sa pri excitácii v intervale 350–400 nm pozorovala fluorescencia v oblasti 440–480 nm (obr. 1b). Podobnú, len menej intenzívnu fluorescenciu, možno pozorovať aj pre vzorky obsahujúce bobule borievky (obr. 1c), a jej zdrojom môžu byť kumaríny, amentoflavón, naringenín, chlorofyl^{5,6,12–14} a iné zložky.

Z vizuálneho porovnania spektier všetkých vzoriek vyplynulo, že rozdiely medzi rôznymi borovičkami sú hlavne v oblasti pásov s excitáciou okolo 230–300 nm a emisiou v intervale 310–450 nm. Na základe tohto výsledku sa redukovali pôvodné excitačno-emisné dátové matice a na ďalšie spracovanie modelom PARAFAC sa použili hodnoty namerané v intervale excitačných vlnových dĺžok 230–300 nm (počet λ_{ex} bol 15) a intervale emisných vlnových dĺžok 310–450 nm (počet λ_{em} bol zredukovaný na 41). Takto určené intervaly ($\lambda_{ex} < \lambda_{em}$) neobsahujú pásy prislúchajúce Rayleighovmu rozptylu, čo umožňuje priame modelovanie EEM metódou PARAFAC.

PARAFAC

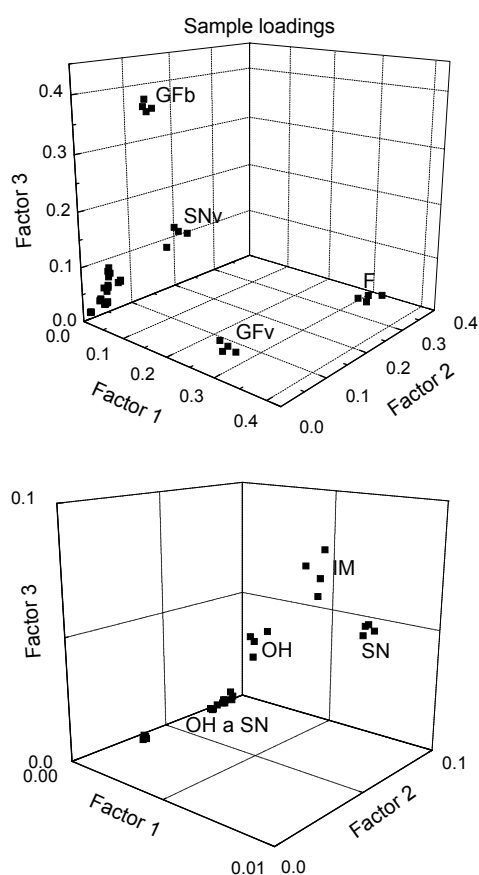
PARAFAC model sa riešil pre EEM namerané v intervale $\lambda_{ex} = 230–300$ nm a $\lambda_{em} = 310–450$ nm. Pre každú vzorku sa vytvorila EEM rozmerov 41×15 (počet $\lambda_{em} \times$ počet λ_{ex}) a z týchto matíc sa potom vytvorilo pole s rozmermi $44 \times 41 \times 15$ (počet vzoriek \times počet $\lambda_{em} \times$ počet λ_{ex}). Model sa počítal pre rôzny počet faktorov a s obmedzením skóre a váh spektrálnych komponentov na kladné hodnoty⁹, keďže fluorescenčné spektrá a koncentrácie sú



Obr. 1. Fluorescenčná vrstevnicová mapa borovičiek; a) Liptovium borovička (St. Nicolaus), b) Original Spiš borovička (GAS Familia) (obsahuje vetvičku), c) Original Spišská borovička (GAS Familia) (obsahuje bobule)

kladné čísla. Počet faktorov sa vybral na základe analýzy rezíduí a analýzy dát rozdelených na dve časti. Základnou charakteristikou PARAFAC modelu je, že poskytuje jedinečné riešenie. Ak sa teda vyberie správny počet faktorov, získajú sa rovnaké výsledky – rovnaké hodnoty váh – pre celý súbor dát, aj jeho časti⁹. Výsledky ukázali, že trojfaktorový model je optimálny. To znamená, že zdrojom fluorescence analyzovaných borovičiek sú tri rôzne fluorofory. Model opisuje 99,6 % celkovej variability, pričom variabilita opisovaná jednotlivými faktormi postupne klesá od faktoru 1 k faktoru 3. Relatívne vysoké hodnoty reziduálnych chýb sa pozorovali pri nízkych hodnotách excitačnej vlnovej dĺžky ($\lambda_{ex} < 240$ nm), čo síce neznehodnocuje model ako taký, ale poukazuje na problémy spôsobené rozptylom žiarenia pri nízkych vlnových dĺžkach. Výsledky z modelu PARAFAC sú uvedené na obr. 2 a obr. 3.

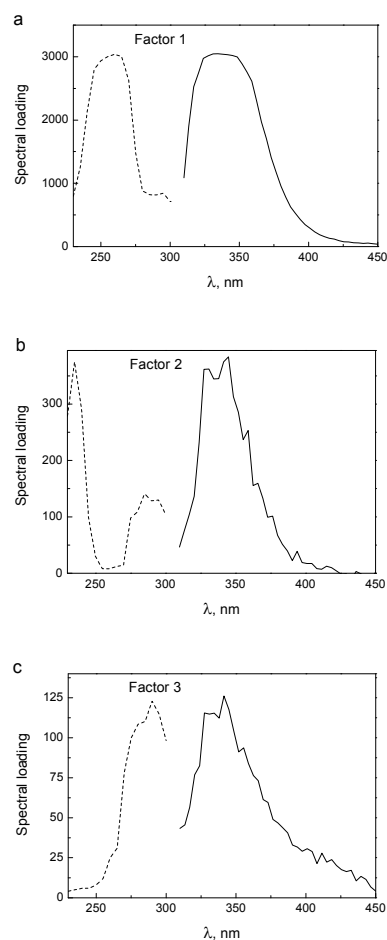
Obr. 2 znázorňuje hodnoty skóre (sample loadings) jednotlivých faktorov rôznych vzoriek vynesené navzájom proti sebe. Tento obrázok ukazuje možnosti modelu PARAFAC v klasifikácii slovenských borovičiek. Hodnoty skóre $> 0,5$ poskytujú produkty označené výrobcom ako



Obr. 2. Sample loadings jednotlivých faktorov modelu PARAFAC pre vzorky borovičiek; F - Frucon, GF - GAS Família, SN - St. Nicolaus, IM - Imperator, OH - Old Herold, v - vetvička, b - bobule borievky

Original; model umožňuje klasifikovať tieto produkty podľa výrobcov a rozlíšiť borovičky obsahujúce bobule alebo vetvičku borievky. Ostatnú výroby poskytujú malé hodnoty skóre; klasifikácia v tejto skupine výrobkov s použitím zvolených experimentálnych podmienok, možná nie je. Lepšie rozlíšenie vzoriek si vyžaduje namerať spektrá pri väčšej šírke excitačnej/emisnej štrbiny.

Na obr. 3a–c sú váhy excitačných a emisných komponentov pre jednotlivé faktory znázornené ako spektrá. Faktor 1 (obr. 3a) má excitačné maximum okolo 260 nm a emisné maximum okolo 337 nm, teda v oblasti charakteristickej pre fenyl deriváty; napr. excitačné a emisné spektrum totarolu v etanole¹¹ má pásy v intervale 250–310 nm a 310–360 nm. Emisný profil faktora 1 je omnoho vyšší v porovnaní so zvyšnými dvoma. Na obr. 3b je pre faktor 2 vidno excitačné maximum okolo 235 nm a menej intenzívne maximum okolo 285 nm, pričom emisné maximum je okolo 345 nm. Faktor 3 (obr. 3c) má excitačné maximum



Obr. 3. (a–c) Spectral loadings pre tri faktory modelu PARAFAC; excitácia - - -, emisia —

okolo 290 nm a emisné maximum okolo 341 nm. Faktory 2 a 3 sú pravdepodobne ďalšie (bi)fenyl deriváty¹⁵.

Záver

Využitie viacrozmerného modelu PARAFAC v kombinácii s fluorescenčnou spektrometriou sa ukazuje ako progresívny spôsob charakterizácie a klasifikácie slovenských borovičiek. Na základe uvedených výsledkov sa začala vytvárať knižnica excitačno-emisných spektier v intervale excitačných vlnových dĺžok 230–300 nm a intervale emisných vlnových dĺžok 310 – 450 nm nielen pre šírku štrbiny 2,5 nm, ale aj pre štrbinu 5,0 nm, ktorá pravdepodobne umožní podrobnejšiu chemometrickú analýzu nameraných dát.

Práca vznikla vďaka finančnej podpore EHP finančného mechanizmu SAV-EHP-2008-02-05.

LITERATÚRA

1. 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.
2. Regulation (EC) No 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008 on the definition, description, presentation, labeling and the protection of geographical indications of spirit drinks and repealing Council Regulation (EEC) No 1576/89. Official Journal of the European Union, 51, L39, 16–54.
3. Innocenti M., Michelozzi M., Giaccherini C., Ieri F., Vincieri F.F., Mulinacci N.: J. Agric. Food Chem. 55, 6596 (2007).
4. Szymanska R., Kruk J.: Plant Physiol. Biochem. 46, 29 (2008).
5. Nunez Y.O., Salabarría I.S., Collado I.G., Hernandez-Galan R.: Phytochem. 68, 2409 (2007).
6. Stassi V., Verykokidou E., Loukis A., Harvala C.: Pharm. Acta Helv. 72, 311 (1998).
7. Mac Namara K., Howell J., Huang Y., Robbat Jr. A.: J. Chromatogr., A 1164, 281 (2007).
8. Vichi S., Riu-Aumatell M., Buxaderas S., López-Tamames E.: Anal. Chim. Acta 628, 222 (2008).
9. Bro. R.: Chemometr. Intel. Lab. Syst. 38, 149 (1997).
10. Andersson C.A., Bro R.: The N-way Toolbox for MATLAB. Chemometr. Intel. Lab. Syst. 52, 1 (2000). <http://www.models.life.ku.dk/source/nwaytoolbox>.
11. Mateo C.R., Prieto M., Micol V., Shapiro S., Villalain J.: Biochim. Biophys. Acta 1509, 167 (2000).
12. Chen Y., Yang J., Wang Z., Wu X., Wang F.: Spectrochim. Acta, Part A 66, 686 (2007).
13. Tomeckova V., Guzy J., Kusnir J., Fodor K., Marekova M., Chavkova Z., Perjesi P.: J. Biochem. Biophys. Meth. 69, 143 (2006).
14. Sharma A., Machwe M.K., Murti V.V.S.: Curr. Sci. 52, 858 (1983).
15. Bridges J.W., Creaven P.J., Williams R.T.: Biochem. J. 96, 872 (1965).

STANOVENIE FORIEM Hg V KRVI SYSTÉMOM GC-ICP-MS

RASTISLAV SERBIN, MONIKA
URSÍNYOVÁ, IVETA UHNÁKOVÁ
a ZUZANA HUŠEKOVÁ

*Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová
12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika
monika.ursinyova@szu.sk*

Stanovovanie špecií ortuti vo vzorkách pre biomedicínske štúdie a v klinických vzorkách vzhľadom na ich rôznu toxicitu ($\text{Hg}^{2+} < \text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+ < \text{CH}_3\text{Hg}^+ < \text{CH}_3\text{HgCH}_3, \dots$), fyzikálno-chemické vlastnosti ako aj ich rôzny metabolizmus odbúravania je kľúčové z hľadiska hodnotenia zdravotných rizík. Avšak aj napriek tomuto faktu je v literatúre publikovaných veľmi málo analytických techník pre tento účel, čo ma za následok, že aj v praxi realizované štúdie sa zakladajú len na výsledkoch zo stanovenia celkovej ortuti.

Práca popisuje metodiku s jednoduchou predúpravou vzorky pre stanovenie obsahu MeHg^+ v krvi človeka použitím plynovej chromatografie spriahnutej s hmotnostným spektrometrom s indukčne viazanou plazmou (GC-ICP-MS) na prístrojoch Thermo Trace GC Ultra a Thermo ICP-MS X Series 2. Pred stanovením špecií Hg optimalizova-

nou metodikou bol celkový obsah Hg vo vzorkách stanovený amalgamačnou technikou na prístroji AMA 254.

Samotná úprava vzorky venóznej krvi pred stanovením špecií Hg bola založená na extrakcii so zmesou 6M HCl s NaCl, úprave pH extraktu a následnej derivatizácii s $\text{NaB}(\text{Ph})_4$ so súčasťou extrakciou produktov do hexánu.

Pre GC separáciu špecií ortuti bola použitá kolóna TR-5; 7 m; 0,32 mm I. D.; 0,25 μm vrstva. Nosným plynom bolo hélium. Extrakt bol dávkovaný na „on column“ injektor. Detekcia s ICP-MS bola uskutočňovaná v štandardnom móde. Experimentálne podmienky separácie ako aj detekcie boli optimalizované pomocou štandardných roztokov a modelových vzoriek so štandardnými prídavkami. Detekčný limit systému a optimalizovanej metódy pre MeHg^+ bol vypočítaný ako $3 \times S_0$ nameraného šumu 10 slepých pokusov a predstavuje koncentrácie na úrovniach 2 a 140 ppt (ako Hg). Pracovný objem vzorky pre opakované stanovenie je v rozmedzí 150–500 μl v závislosti od celkovej koncentrácie Hg v krvi. Metodika bola overená na stanovení MeHg^+ v certifikovanom referenčnom materiáli SRM NIST 966 Level 2.

Štúdia bola plne financovaná z finančného mechanizmu EHP, nórskeho finančného mechanizmu a zo štátneho rozpočtu SR, projekt SK0020.

STANOVENIE Cd, Hg a Pb V KRVI PRE HODNOTENIE PRENATÁLNEJ A POSTNATÁLNEJ EXPOZÍCIE U DETÍ

MONIKA URSÍNYOVÁ, IVETA UHNÁKOVÁ, ZUZANA HUŠEKOVÁ, RASTISLAV SERBIN a LADISLAVA WSÓLOVÁ

*Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika
monika.ursinyova@szu.sk*

Stanovenie toxických chemických prvkov v humánnej medicíne je významné aj z hľadiska ich potenciálu ako endokrinných disruptorov už pri expozícii organizmu subtoxickým koncentráciám. Stanovenie koncentrácií toxických prvkov a následné hodnotenie zdravotných rizík kladie nároky na spoľahlivosť použitých analytických metód. Táto štúdia bola zameraná na hodnotenie expozície u ročných detí vybraným prvkom (Pb, Cd a Hg) v prenatálnom a postnatálnom období vývoja a na hodnotenie dopadov expozície na ich zdravotný stav (sekrécia hormónov štítnej žľazy). Vzhľadom na obmedzený objem vzorky bola optimalizovaná metóda stanovenia kovov priamo zo vzorky bez predchádzajúcej mineralizácie. Stanovenie chemických prvkov bolo realizované metódou AAS-bezplameňovou technikou pre Pb a Cd a amalgamačnou technikou pre celkovú Hg. Spoľahlivosť stano-

vení bola overovaná použitím certifikovaného referenčného materiálu (Seronorm™, Whole blood -Level 1, Norway) a úspešnou účasťou v externej kontrole kvality v rámci medzilaboratórnych porovnávacích testoch (SEKK, ČR). Stanovenie hladín hormónov štítnej žľazy bolo realizované elektrochemiluminiscenčnou analýzou systémom Elecsys (Roche, Switzerland) v akreditovanom klinickom laboratóriu.

Použitie metódy stanovenia vybraných chemických prvkov preukázali vhodnosť pre aplikáciu pri hodnotení zdravotných rizík z expozície subtoxickým koncentráciám ako aj v biochemickej praxi. Štatistické hodnotenie výsledkov štúdie (softvér SPSS, verzia 15.0) preukázalo: koreláciu medzi environmentálnou expozíciou matky a jej dieťaťa u olova ($r = 0,790$, $P < 0,001$) a ortuti ($r = 0,771$, $P < 0,001$) kvantifikovanou stanovením príslušného prvku v krvi matky a pupočníkovej krvi; zníženie hladín TSH dieťaťa vplyvom zvýšenej expozície matky olovu ($r = -0,293$, $P < 0,05$) a kadmium ($r = -0,203$, nie však na štatisticky významnej hladine) a vplyvom zvýšenej expozície dieťaťa ortuti ($r = -0,263$, $P < 0,05$).

Táto štúdia bola realizovaná s finančnou podporou MZ SR (2005/41-SZU-19) a Centra excelentnosti SAV (CENDO).

VPLYV KRMIVA OBOHATENÉHO O ĽANOVÉ SEMENO A KLINČEK NA PROFIL MASTNÝCH KYSELÍN HYDINOVÉHO MÄSA

LADISLAV STARUCH^a, MILAN ČERTÍK^a, ZUZANA ADAMECHOVÁ^a, SLAVOMÍR MARCINČÁK^b a IVANA POUSTKOVÁ^c

^a Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej biotechnológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

^b Katedra hygieny a technológie potravín Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Komenského 73 041 81 Košice, Slovenská republika, ^c Katedra kvality zemiedľských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a prírodných zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol, Česká republika

ladislav.staruch@stuba.sk

Úvod

Spotreba hydínového mäsa v uplynulých desaťročiach významne vzrástla, a to ako celosvetovo, tak aj Slovenskej republiky. Jeho spotreba presahuje cca 30 % z celkovej spotreby mäsa. Produkcia mäsa je relatívne nenáročná, a jatočná zrelosť sa dosahuje v priebehu niekoľkých týždňov. Mäso hydiny je rovnako ako mäso iných živočíšnych druhov bohatým zdrojom esenciálnych nutričov (živín). Ako súčasť potravy prispieva mäso podstatným spôsobom na saturovaní organizmu živinami. Mäso a mäsové výrobky sú dobrým zdrojom bielkovín, lipidov, minerálnych látok a vitamínov¹. Lipidy predstavujú pre konzumenta vysoko koncentrovaný zdroj energie. Hydínové mäso obsahuje vyšší podiel nenasýtených mastných kyselín, ktoré nie sú považované za cholesterolemické, nemá z hľadiska zloženia tukov tak nebezpečný charakter, ako sa pôvodne uvažovalo vo vzťahu k cievnyim ochoreniam. Práce viacerých autorov poukazujú na úzku koreláciu medzi obsahom mastných kyselín v krmive a následným chemickým zložením lipidickej frakcie hydínového mäsa. V príspevku bude analyzovaný vplyv prídavku ľanového semena a klinčeka na profil mastných kyselín².

Experimentálna časť

Brojlerové kurčata plemena ROSS 308 boli rozdelené do 3 skupín a od 25. dňa výkrmu boli kŕmené nasledovne:

Označenie

K – kontrola, komerčná KZ HYD 04 a 02. KZ – (kŕmna zmes)

KL5 – kurčatá kŕmené KZ HYD 04 a 02 s prídavkom klinčeka 2% a ľanového semena, v dávke 5 %

KL7 – kurčatá kŕmené KZ HYD 04 a 02 s prídavkom klinčeka 2% a ľanového semena, v dávke 7 %.

Vzorky na analýzu boli odoberané v 41. deň výkrmu. Lipidická zložka bola izolovaná z kuracích prs a stehien.

Príprava transesterifikačného činidla

V zmesi 30 ml metanolu a 20 ml benzénu sa rozpustí 7,5 mg fenolfaleínu a 1,15 g kovového sodíka, pričom vzniká roztok metanolátu sodného v benzéne s koncentráciou asi 1 mol dm⁻³.

Príprava metanolickej HCl

K 60 ml koncentrovanej H₂SO₄ sa opatrne prikvapkáva 30 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a vznikajúci plynný HCl sa zavádza do predlohy so 60 ml metanolu. Vznikne asi 13 % metanolickej HCl.

Izolácia lipidov a príprava metylesterov mastných kyselín

Lipidy z kuracieho mäsa boli izolované zmesou chloroform/metanol (2:1, v/v) podľa metódy Čertík a spol.¹. Vyzolovaný lipid (cca 10–20 mg) sa rozpustí v 0,8 ml zmesi hexán/chloroform (9:1). Následne sa pridá po 0,1 ml transesterifikačného činidla, dôkladne premieša na vortexe a nechá 20 min stáť. Potom sa pridá 0,2–0,4 ml metanolickej HCl, dôkladne premieša na vortexe a centrifuguje (5000 otáčok/min, 5 min). Pripravené metylestery mastných kyselín nachádzajúce sa vo vrchnej hexánovej vrstve sa odoberú na analýzu plynovou chromatografiou³.

Analýza metylesterov mastných kyselín plynovou chromatografiou

Metylestery mastných kyselín boli merané plynovou chromatografiou prístrojom GC-6890 N (Agilent Technologies)⁴. Do kolóny DB-23 (50%-kyanopropylmetylpolsiloxán, dĺžka 60 m, priemer 0,25 mm, hrúbka filmu 0,25 μm) sa automaticky nastrekovalo 1 μl vzorky metylesterov mastných kyselín, ktoré boli analyzované pri nasledovných podmienkach: nosný plyn – vodík (44 cm s⁻¹ pri 130 °C), teplota nástreku – 220 °C, split – 1:50, FID detektor (250 °C, prietok vodíka: 30 ml min⁻¹, prietok kyslíka: 500 ml min⁻¹), teplotný režim: 130 °C – 1 min, 130–170 °C – 6,5 °C min⁻¹, 170–215 °C – 2,7 °C min⁻¹, 215 °C – 7 min, 220–240 °C – 20 °C min⁻¹, 240 °C – 2 min). Záznamy boli vyhodnotené pomocou ChemStation B0103 (Agilent Technologies) a kvantifikované na základe retenčných časov známych štandardov mastných kyselín C4 – C24 (Sigma, USA). Index nenasýtenia mastných kyselín (IU) bol kalkulovaný

podľa vzorca⁵:

$$IU = [1(\Sigma\% \text{ monenas.MK}) + 2(\Sigma\% \text{ dinenas.MK}) + 3(\Sigma\% \text{ trinenas.MK}) + \dots]/100.$$

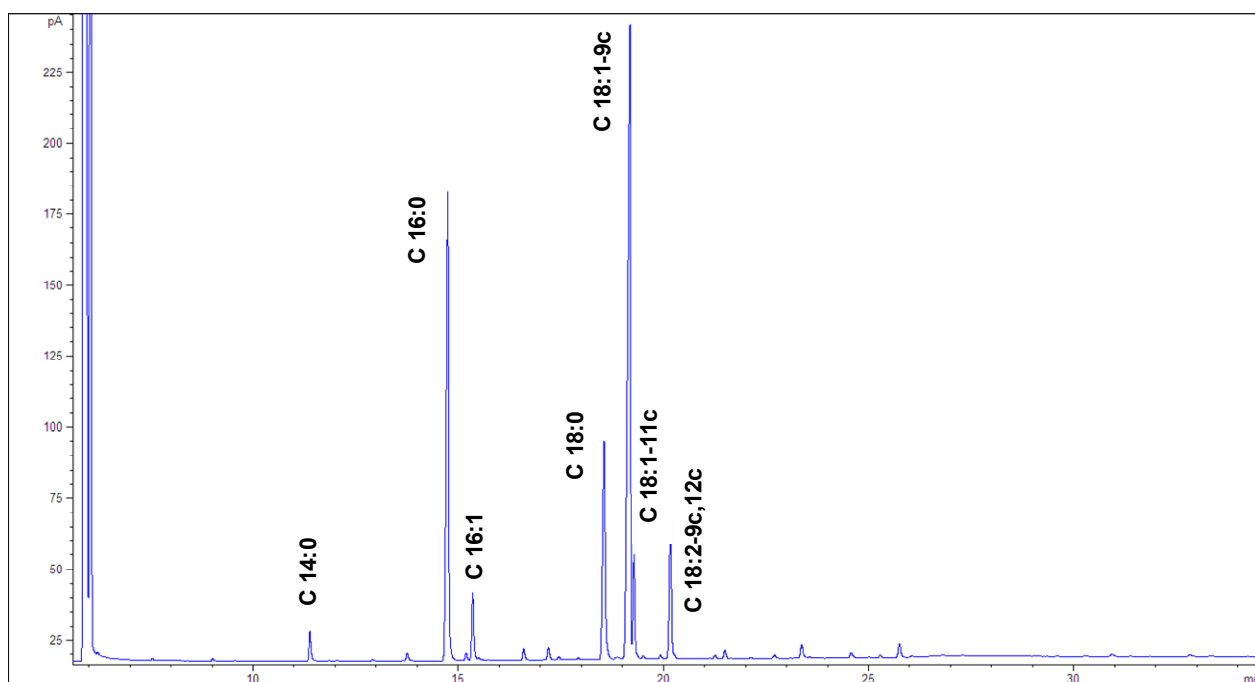
Výsledky a diskusia

Celkovo bol analyzovaný profil mastných kyselín v celkových lípidoch zo 6 vzoriek kuracieho mäsa, z toho 3 kuracích pŕs a 3 kuracích stehien. Tabuľka I a obr. 1 ukazujú, že dominantnými mastnými kyselinami vo všet-

kých vzorkách boli kyselina palmitová (C16:0; 20.6–23.5 %), palmitolejová (C16:1-9c; 4.1–6.9 %), stearová (C18:0; 5.2–6.0 %), olejová (C18:1-9c; 35.5–40.6 %) a linolová (C18:2-9,12c; 16.4–21.1 %). Ako minoritné mastné kyseliny boli detegované kyselina cis-vakcénová (C18:1-11c; 2.2–3.2 %), α -linolénová (C18:3-9,12,15c; 1.4–4.8 %) a arachidónová (C20:4-5,8,11,14c; 0.3–1.3 %). Kuracie mäso obsahovali aj malé množstvá esenciálnych mastných kyselín, ako kyselina γ -linolénová (C18:3-6,9,12c), dihomo- γ -linolénová (C20:3-8,11,14c), eikozapentaénová (C20:5-5,8,11,14,17c), dokozapenténová (C22:6-7,10,13,16,19c) a dokozaheptaénová (C22:6-

Tabuľka I
Profil mastných kyselín vo vzorkách kuracieho mäsa

Mastné kyseliny [% , w/w]	Vzorka kuracieho mäsa					
	kontrola prsia	kontrola stehno	KL5 prsia	KL5 stehno	KL7 prsia	KL7 stehno
C 10:0	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
C 12:0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
C 14:0	0.49	0.46	0.45	0.43	0.50	0.49
C 14:1	0.14	0.15	0.10	0.14	0.16	0.14
C 15:0	0.07	0.07	0.08	0.07	0.06	0.08
C 15:1-10c	0.14	0.14	0.45	0.06	0.26	0.09
C 16:0	21.95	21.62	20.83	20.77	22.70	20.64
C 16:1-9c	5.98	6.49	4.07	6.02	6.33	5.38
C 17:0	0.10	0.08	0.13	0.09	0.08	0.10
C 17:0 cyclo	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07	0.08
C 18:0	5.57	5.31	6.57	5.36	5.61	6.05
C 18:1-9t	0.18	0.17	0.17	0.17	0.17	0.18
C 18:1-9c	40.25	40.27	35.54	39.63	39.50	38.70
C 18:1-11c	2.67	2.58	2.35	2.71	2.97	2.20
C 18:2-9c,12c	18.87	19.38	21.11	18.43	16.44	19.67
C 18:3-6,9,12c	0.20	0.16	0.20	0.15	0.17	0.18
C 18:3-9,12,15c	1.56	1.44	4.87	4.28	3.15	4.13
C 18:2-c9,t11/t9,c11 (CLA)	0.08	0.07	0.15	0.13	0.11	0.11
C 20:0	0.12	0.10	0.11	0.10	0.09	0.11
C 20:1-11c	0.46	0.40	0.42	0.45	0.43	0.43
C 20:2-11c,14c	0.22	0.21	0.30	0.19	0.21	0.21
C 20:3-8,11,14c	0.15	0.14	0.25	0.14	0.19	0.16
C 20:4-5,8,11,14c	0.40	0.43	0.77	0.28	0.43	0.36
C 20:5-5,8,11,14,17c	0.06	0.08	0.31	0.09	0.00	0.17
C 22:1-13c	0.03	0.03	0.11	0.00	0.02	0.05
C 22:5-7,10,13,16,19c	0.09	0.09	0.36	0.14	0.19	0.18
C 22:6-4,7,10,13,16,19c	0.06	0.04	0.23	0.09	0.10	0.09
Suma nasýtených MK	28.35	27.66	28.20	26.83	29.07	27.49
Suma nenasýtených MK	71.65	72.34	71.81	73.17	70.93	72.51
Suma vyšších esenc. MK	2.50	2.39	6.98	5.17	4.23	5.26
Index nenasýtenia MK (IU)	0.98	0.94	1.04	1.03	1.10	0.98



Obr. 1. Reprezentatívny chromatografický záznam profilu mastných kyselín v celkovom lipide kuracieho mäsa

4,7,10,13,16,19c). V sledovaných vzorkách boli taktiež namerané malé koncentrácie trans mastných kyselín, hlavne kyselina elaidová (C18:1-9t) a zmes konjugovaných izomérov kyseliny linolovej (C18:2-c9,t11/t9,c11).

Analýzy ukázali, že mäso z kuracích stehien obsahuje viac celkových nenasýtených mastných kyselín než mäso z kuracích prs. Je však zaujímavé, že celkový index nenasýtenia mastných kyselín (vyjadruje počet dvojitých väzieb na jednotkovú dĺžku reťazca mastných kyselín) vykazoval vyššie hodnoty v kuracích prsiach. Množstvá vyšších esenciálnych mastných kyselín s počtom 3 až 6 dvojitých väzieb kolísali a nemožno jednoznačne kategorizovať ich hladiny na základe ich zdroja (prsia alebo stehná). Kuracie prsia vo všeobecnosti vykazujú väčší pomer celkových C18/C16 mastných kyselín, väčší pomer kyseliny linolovej/kyseliny olejovej a a vyšší pomer kyseliny γ -linolénovej/kyseliny linolovej než lipidy izolované z kuracích stehien.

Záver

Je známe, že nenasýtené mastné kyseliny sú syntetizované v živočíšnych bunkách pomocou rôznych desaturáz a elongáz. Naše experimenty jednoznačne potvrdili, že kuracie mäso má aktívne desaturačno/elongačné enzymatické vybavenie. Zreteľné korelácie v boli zistené pre Δ^9 desaturázu (katalyzuje konverziu kyseliny palmitovej na palmitolejovú a kyseliny steárovej na olejovú), Δ^{12} desatu-

rázu (katalyzuje konverziu kyseliny olejovej na linolovú), Δ^5 desaturázu (katalyzuje konverziu kyseliny dihomogamma-linolénovej na arachidónovú) a Δ^4 desaturázu (katalyzuje konverziu kyseliny dokozapentaénovej na dokozahexaénovú), kde ich aktivity boli priamoúmerné zvyšujúcim sa hladinám ich jednotlivých prekurzorov. Naopak, pre Δ^6 desaturázu (katalyzuje konverziu kyseliny linolovej na γ -linolénovú) a Δ^{15} desaturázu (katalyzuje konverziu kyseliny linolovej na α -linolénovú) takéto korelácie neboli zistené.

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantov VEGA č. 1/0234/09 a 1/0235/08 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied.

LITERATÚRA

1. Staruch, L., Bradová, O., Strmiska, F.: in: *Book of abstracts, Hygiene Alimentorum XXI*, 123–124 (2000).
2. Staruch, L., Pipek, P.: *Maso*. 20, 30 (2009).
3. Čertík, M., Andráši, P., Šajbidor, J.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 357 (1996).
4. Čertík, M., Adamechová, Z., Hanusová, V., Breierová, E.: *Acta Agronom. Hung.* 56, 377 (2008).
5. Čertík, M., Breierová, E., Juršiková, P.: *Internatl. Bio-deterioration Biodegradation* 55, 195 (2005).

L. Staruch^a, M. Čertík^a, Z. Adamechová^a, S. Marcinčák^b, and I. Poustková^c (^a *Institute of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovak Republic,* ^b *The University of veterinary medicine and pharmacy in Košice, Slovak Republic,* ^c *Department of Quality of Agricultural Products, Czech University of Life Sciences in Prague, Czech Republic*):
Effect of Feed Fortified with Linseed and Clove on Fatty Acid Profile of Chicken Meat

Effect of feed fortified with linseed and clove, from 25th day of feeding period in broiler chicken, on profile of fatty acids was studied. Addition of 5 and 7 % of linseed and clove to feed increased polyunsaturated fatty acids (mainly α -linolenic acid) amount in chicken lipids isolated from breast and thigh muscles significantly.

THE CONTENT OF SOME ELEMENTS IN DIETARY SUPPLEMENTS USED FOR CLIMACTERIC SYMPTOMS ELIMINATION

BLANKA TOBOLKOVÁ^{a,b}, JANA ZEMANOVÁ^b, and PETER ŠIMKO^a

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

Introduction

The market with food supplements containing concentrated nutrients offering the supplementation of their intake from normal diet is strongly developed in the Czech Republic and throughout the Europe. They cover a wide range of products that just look like medicinal products, but they are definitely not medicaments, as they are used only to mitigate the symptoms of some, usually health problems. Supplements contain active ingredients – nutritional factors, e.g., vitamins, minerals, amino acids, essential fatty acids, fiber and various plants and herbals extracts. They appear in various forms, tablets, capsules, powders and liquids (drops or syrup)¹.

European regulation for dietary supplements (Directive 200/46/EC) refers to dietary supplements which are marketed and offered as foodstuffs. In the Czech Republic, their market is regulated by the relevant national regulation for dietary supplements and food fortification^{1,2}.

Dietary supplements are used to supply the intake of vitamins and minerals, but they can also strengthen the immune system. Recently, the growing attention is focused on supplements used for climacteric symptoms suppression, because climacteric symptoms affect every woman around the fiftieth year of life. At this time, woman's fertile period ends and this process is associated with the gradual decline of the activity of reproductive organs, as well as with the decrease or even end of female sex hormones production. As a consequence, women in climacteric period suffer from specific problems. Extensive symptomatology of climacteric symptoms is divided into vegetative symptoms (vasomotor and psychological problems), organic (skin changes and changes of body weight) and metabolic symptoms (affecting the atherosclerosis and osteoporosis development)^{3,4}. Formulations used for climacteric symptoms mitigation are usually available in form of tablets and capsules, but sometimes in form of herbal drops or syrups. These products may contain active ingredients such as herbal extracts (containing phytoestrogens), bee product (bee pollen and royal jelly), some vitamins (especially of B group, vitamin A, D, E) and minerals (e.g. Ca, Mg, Fe, Zn, Se)⁶.

To ensure their safety, the detailed analysis of individual components in final products before distribution is strongly required. As follows from previous investigations, some dietary supplements can contain elevated content of metals and other elements^{6,7}. While some of them, such as selenium, cobalt, iron, copper and zinc are essential at low concentration level as they can be incorporated in some vitamins' structure (cobalt in vitamin B12), the others, e.g., arsenic, cadmium and lead, are toxic. Special attention must be focused on heavy metals presence monitoring. They are present in dietary supplements for two main reasons – as contaminants of natural product and as result of secondary contamination during the manufacturing process⁷.

The concentration level of some elements of interest presented in dietary supplements requires the application of high sensitive analytical methods capable of their reliable detection and determination. For these purposes, spectral methods are used routinely, most frequently inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS)^{8,9}.

This work was aimed at the determination of elements present in selected dietary supplements used for climacteric symptoms mitigation prepared according to the original recipes by means of ICP-MS. The macroelements (Na, Mg, K, Ca) as well as trace elements (Mn, Fe, Cu, Zn, Se and Sn) and heavy metals (As, Cd, Pb) was monitored.

Experimental

Sample preparation

Original recipe of two dietary supplements (capsules and herbal syrup) containing active ingredients which are generally accepted as effective in climacteric symptoms elimination was proposed. Following them, and individual supplements were prepared in form of capsules and herbal syrup. Capsules' content was prepared by mix the appropriate amounts of dried red clover (*Trifolium pratense*), soybean (*Glycine max*), cultivated flax (*Linum usitatissimum*), passionflower (*Passiflora incarnata*), and black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). Calcium carbonate was added as the source of calcium, as well.

Herbal syrup was made from simple syrup (64 % sucrose solution), to which alcoholic extracts of red clover (*Trifolium pratense*), hops (*Strobilus lupuli*), lady's mantle (*Alchemilla vulgaris*) and sage (*Salvia officinalis*) were added. To improve a taste of liquid product, citric acid and potassium sorbate were added, the last mentioned as conserving agent.

Conditions of ICP MS analysis

In case of capsules, their content was crushed by pestle in mortar to a fine powder, and gently mixed. The digestion and subsequent analysis of both, powder and liquid samples was performed according to the modified method of Peachey et. al.⁷. Briefly, the following digestion conditions were used: the sample (0.5 g, capsules' content; 1 g, liquid syrup) was accurately weighted into Teflon vessels of a Milestone 1200 digester. Mixture of nitric acid (conc.) and hydrogen peroxide (conc.), 6:1 (v/v) was used as the digestion medium. In accord with digester operating manual instructions, for the digestion of powders, dried plant tissue mode was set, whereas for syrups, juice or syrup mode. The digestion took up to 20 min at maximum microwave power, 650 W. After cooling to ambient temperature, the sample was transferred into 25 ml volumetric flask and filled up to the mark with deionized water. The analysis of the so-prepared samples was realized using an Agilent 7500 Series ICP-MS spectrometer (Agilent, USA) in a collision mode.

The calibration curve with correction to the internal standards serves for individual elements determination. Multi-elemental solutions of Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Sn, As, Cd and Pb, prepared in 4% HNO₃ were used for calibration curves construction. Two sets of calibration solutions were prepared, for macroelements and trace elements, respectively.

The details of ICP-MS operating conditions and concentrations of individual elements are listed in Table I.

Respective investigated samples were diluted 5 times by deionized water prior the analysis. Internal standard

solutions (Sc, Ge, In, Bi) with concentrations of 200 µg l⁻¹ each, were on-line added to each sample. Parameters of measurement are presented in Table II. All measurements were performed in duplicates.

Results and discussion

Dietary supplements prepared in two forms, capsules and herbal syrups according to the original recipes were subjected to ICP-MS analysis in order to determine the content of selected majority elements (Na, Mg, K, Ca), trace elements (Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Sn) and heavy metals (As, Cd, Pb). The average concentrations of individual elements are listed in Table III. The concentration of individual elements determined for both forms of supplements were subsequently mutually compared and confronted with the actual legislation limits.

As follows from data presented in Table III, plenty of elements were determined in both, capsules' content and herbal syrups. As no one of them were added into food supplements intentionally, exception for calcium (added as calcium carbonate) and potassium (added as potassium sorbate) we suppose their occurrence follows from either natural compounds used for their preparation, or from contamination of ingredients during their production, as finally mentioned above.

Regarding to their concentration, the significant differences among them were found within one form of dietary supplement, as well as between them. In accord with expectations, the concentrations of all elements determined in capsules' content were several folds higher then in

Table I
ICP-MS instrumental conditions

<i>ICP-MS settings</i>		
Cell gas flow rate	Plasma	15 l min ⁻¹
	Auxiliary	0.9 l min ⁻¹
	Carrier	0.85 l min ⁻¹
	Make up	0.25 l min ⁻¹
RF Power	1500 W	
Sampling depth	8 mm	
Nebulizer	Type	MicroMist (concentric)
	Pump	0.1 rps
Spray chamber	Type	Scott (glass)
	Temperature	2 °C
Collision cell (octopole)	Gas	Helium
	Flow rate	5.5 ml min ⁻¹
<i>Standard solutions</i>		
Macroelements	Elements	Concentration
	Na, Mg, K, Ca	0-0.5-5-20-100 mg l ⁻¹
Trace elements	Fe	0-20-200-500-2000 µg l ⁻¹
	Mn, Cu, Zn, Se, Sn, As, Cd, Pb	0-0.1-1-10-100 µg l ⁻¹

Table II
Parameters of measurement

Analyte		LOD ^a [$\mu\text{g l}^{-1}$]	BEC ^b [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Internal standard
Mass element	Ele- ment			
23	Na	3	57	Sc
24	Mg	2	5	Sc
39	K	7	49	Sc
44	Ca	8	14	Sc
55	Mn	0.011	0.010	Sc
57	Fe	0.224	0.540	Sc
63	Cu	0.018	0.109	Ge
66	Zn	0.069	0.751	Ge
75	As	0.003	0.011	Ge
82	Se	0.326	0.392	Ge
111	Cd	0.001	0.005	In
119	Sn	0.017	0.039	In
208	Pb	0.002	0.018	Bi

^a Limit of detection, ^b Concentration of equivalent background

Table III
Concentration of individual elements in dietary supplements determined by ICP-MS

	Ele- ment	Capsules' content	Herbal syrup
Macro- elements [g kg^{-1}]	Na	1.39±0.02	0.0096±0.0004
	Mg	1.51±0.01	0.0062±0.0005
	K	1.15±0.02	0.676±0.007
	Ca	91.65±0.73	0.451±0.003
Trace elements, [mg kg^{-1}]	Mn	15.46±0.19	0.273±0.007
	Fe	69.9±2.0	0.092±0.009
	Cu	3.64±0.01	0.094±0.005
	Zn	8.66±0.13	0.029±0.004
	Se	0.18±0.03	<LOD
Heavy metals [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Sn	0.116±0.001	0.0088±0.0005
	As	198.5±1.8	11.11±0.62
	Cd	72.0±1.1	6.54±0.62
	Pb	364±12	1.02±0.37

herbal syrup. It is a logic consequence of the ways of supplements preparation. While the powder content of capsules was prepared from parts of whole plants, the syrups were prepared from their ethanolic extracts. Plant materials usually contain number of micronutrients and toxic elements coming from soils, which are not extracted into

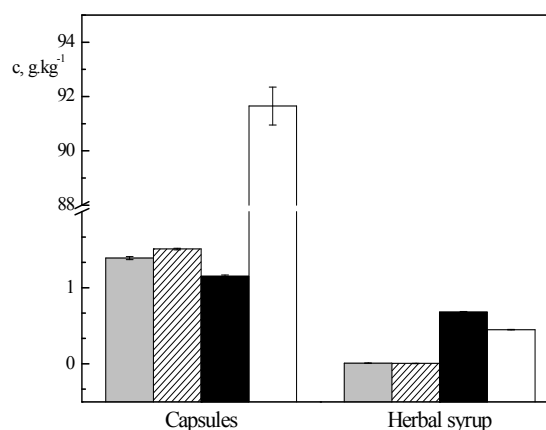


Fig. 1. Concentration of selected macroelements (□ Na, ▨ Mg, ■ K, □ Ca) determined in dietary supplements by ICP-MS

organic solvents. In addition, macroelements are important extra- and intracellular components maintaining an osmotic pressure inside and outside the cells; contributing also to acidobasic balance maintenance¹⁰.

As depicted on Fig. 1, Ca ions were determined to be the dominant element in the capsules' content (concentration ~ 92 g kg^{-1}), whereas the concentrations of other main macronutrients, Na, Mg and K differs significantly, reaching the concentrations ~ 1 g kg^{-1} . Higher concentration of calcium in capsules' content can be explained by the fact, that the calcium carbonate was used to prepare this form of food supplements. On the other hand, K ions with concentration ~ 0.68 g kg^{-1} are dominant macronutrients in herbal syrup. Again, the results obtained are probably connected with the recipe of herbal syrup preparation.

Minor constituents, e.g. Mn, Fe, Cu, Zn, Se and Sn are important biogenic elements whose daily needs are very low but their absence leads to serious health complications. In the human body, they are incorporated in the structure of various metalloenzymes and/ or involved in metabolic processes¹⁰. Similarly like in the case of macroelements, their concentrations in capsules' content were much higher than in herbal syrup. The dominant trace elements in capsules were Fe (69.92 mg kg^{-1}) and Mn (15.46 mg kg^{-1}) while their concentration in herbal syrup was minimal. Concentration of Mn, dominant trace element in herbal syrup, was sixty times lower than in capsules' content. Concentrations of other elements were very low and did not exceed 0.1 mg kg^{-1} .

The content of heavy metals in foods including dietary supplements is one of the main indicators of food safety for consumers. As mentioned above, concentrations of heavy metals determined in supplements under study were compared with those set by legislation (Table IV). However, as the legislation limits for macro and microelements (if available) are presented in the form of their maximum daily allowance and not as absolute concentra-

Table IV
Comparison of heavy metal content in dietary supplements with legislative limits

Element	Legislative limit [mg kg ⁻¹] ^{12,14}	Experimental results [mg kg ⁻¹]	
		capsules' content	herbal syrup
As	1	0.199	0.011
Cd	1	0.072	0.007
Pb	3	0.364	0.001

tions, only the data obtained for heavy metals were compared. Legislative limit for lead is 3 mg kg⁻¹ and 1 mg kg⁻¹ for cadmium¹². Limit for arsenic in dietary supplements has not been established neither by the Czech or European legislative; only its limits in variety of foodstuffs (i.e. chocolate and cacao butter, baby food, fruit and fruit juice) are available¹³. Thus, the existing British general limit for arsenic in foods, i.e., 1 mg kg⁻¹, was taken into consideration¹⁴.

Data presented in Table IV clearly demonstrate that dietary supplements contain heavy metals (As, Cd, Pb) in relatively low concentrations, in compliance and within the existing legislation limits. In accord with macro- and trace elements, the concentration of heavy metals in capsules' content' was higher than in herbal syrup. As illustrated on Fig. 2, lead with concentration ~ 0.364 mg kg⁻¹ was found as dominant heavy metal in capsules' content. In spite of this, its concentration reached only 12.13 % of maximum permitted limit. On the contrary, its concentration in herbal syrup was ~ 0.001 mg kg⁻¹ (0.03 % of legislation limit), the lowest from the monitored heavy metals. The content of arsenic and cadmium in capsules (0.199 mg kg⁻¹ and 0.072 mg kg⁻¹) represents approx. 19 % and 7.2 % of permitted limits, respectively.

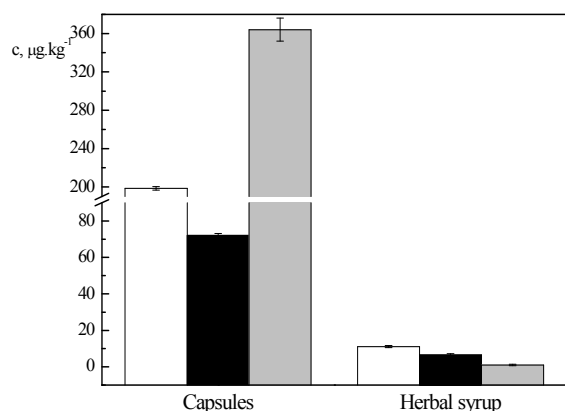


Fig. 2. Concentration of heavy metals (□ As, ■ Cd, ▒ Pb) determined in capsules' content and herbal syrups by ICP-MS

As regards to the results obtained for heavy metal, conclusion analogous to these above-presented for macro and microelements can be done. Presence of heavy metals in foodstuffs is closely related to their presence in the environment. Plants including herbs, are capable to accumulate metals from the soil (lead and cadmium) and water (arsenic)⁹. These elements remained unaffected during capsules preparation, while did not transfer into macerate during their extraction and subsequent herbal syrup preparation.

Conclusion

Due to their toxicity when present at high concentrations, the content of metal elements and especially heavy metals in foods including dietary supplements must not exceed the maximum recommended daily dose. In view of this, their exact determination and monitoring during the entire production process as well in the final production is of great importance for both, food producers and consumers to ensure food safety.

ICP-MS has been introduced as simple and reliable analytical method for multi-elemental determination of macroelements, trace and heavy metals in dietary supplements potentially applicable for climacteric syndromes suppression. Two forms of these products were prepared at laboratory conditions following the original recipes, i.e., powdered herbs encapsulated into capsules and herbal extracts added into syrup. Concentrations of all monitored metal elements in capsules' content were several times higher in comparison to their amounts in herbal syrup. Although some heavy metals, such as arsenic, lead and cadmium were detected in both food supplement forms, none of these elements was presented in concentration exceeding the existing legislation limits. It can be concluded that from the metal ions content point of view, the food supplements analyzed in this study are safe for consumption. However, in order to find the commercial application with supposed positive effects on climacteric syndromes mitigation, the further extended study of their medical effects is strongly required.

REFERENCES

1. Michalová I.: *Doplňky stravy (Potraviny k doplnění jídelničky)*. Sdružení českých spotřebitelů, Praha 2007.
2. Directive 200/46/EC of the European Parliament and of Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements.
3. Živný J.: *Interní Med.* 8, 403 (2004).
4. Jokinen K., Rautava P., Mäkinen J., Ojanlava A., Sundell J., Helenius H.: *Maturitas* 46, 199 (2003).
5. Dennehy C. E., Midwifery J.: *Womens Health* 51, 402 (2006).

6. Krejčová A., Kahoun D., Černohorský T., Pouzar, M.: *Food Chem.* 98, 171 (2006).
7. Peachey E., Hearn, R., Elahi, S. *Agilent Technologies Appl.*, 1 (2008). Available from WWW: <http://www.agilent.com/chem>, cited on March, 7, 2010.
8. Das A. K., Chakrabarty R.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357, 1 (1997).
9. Zhang Z.-W., Shimbo S., Ochi N., Eguchi M., Watanabe T., Moon Ch.-S., Ikeda M.: *Sci. Total Environ.* 205, 179 (1997).
10. Velišek J. *Chemie potravín 2*. OSSIS, Tábor 2002.
11. Leary S. C., Cobine P. A., Kaufman B. A., Guercin G. H., Mattman A., Palaty J., Lockitch G., Winge D. R., Rustin P., Horvath R., Shoubridge E. A.: *Cell Metab.* 5, 9 (2007).
12. Commission Regulation (EC) No 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
13. Vyhláška č. 305/2004 ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.
14. The Arsenic in Food Regulations 1959 (S.I. [1959] No. 831), as amended. Stationery Office.

B. Tobolková^{a,b}, J. Zemanová^b, and P. Šimko^a
(^a VUP Food Research Institute Department of Chemistry and Food Analysis, Bratislava, Slovak Republic, ^b Brno Technical University, Faculty of Chemistry, Brno, Czech Republic): **The Content of Some Elements in Dietary Supplements Used for Climacteric Symptoms Elimination**

To ensure dietary supplements safety, the detailed analysis of individual components in final products before distribution into food market is strongly required. The concentration level of some elements presented in dietary supplements requires the application of high sensitive analytical methods capable of their reliable detection and determination. This work was aimed at the determination of macroelements, trace elements and heavy metals present in two forms of dietary supplements (capsules and herbal syrup) with proposed effects on climacteric symptoms mitigation prepared according to the original recipes by means of ICP-MS method. The content of macroelements (Na, Mg, K, Ca), trace elements (Mn, Fe, Cu, Zn, Se and Sn) and heavy metals (As, Cd, Pb) was monitored. Results obtained proved that the concentrations of all of them in capsules' content were several times higher than in herbal syrup. In case of capsules, the content of individual element decreased in the following order: Ca > Mg > Na > K > Fe > Mn > Zn > Cu > Se > Sn; whereas in herbal syrup in the order: K > Ca > Na > Mg > Mn > Fe > Cu > Zn > Sn > Se. Although some heavy metals, such as arsenic, lead and cadmium were detected in both food supplement forms, none of these elements was presented in concentration exceeding the existing legislation limits. Concentrations of heavy metals in capsules' content was found to decrease in the order: Pb > As > Cd, and for herbal syrup in the order: As > Cd > Pb.

PRIAME STANOVENIE BIZMUTU V PÔDACH A KALOCH METÓDOU ETAAS A JEHO POROVNANIE S KONVENČNÝMI POSTUPMI ROZKLADU VZORIEK

PETER TÖRÖK
a MÁRIA ŽEMBERYOVÁ

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava 4, Slovensko
torok@fns.uniba.sk

Úvod

Kvôli značnej antropogénnej činnosti nadobúda analýza vzoriek súvisiacich so životným prostredím čoraz väčšiu dôležitosť. Na prvkovú analýzu uvedených vzoriek sa úspešne používajú techniky atómovej spektrometrie, ktoré však vo väčšine prípadov vyžadujú rozklad tuhej vzorky. Prevedenie tuhých environmentálnych vzoriek do roztoku je jedným z najnáročnejších krokov celého analytického postupu, hlavne kvôli ťažkostiam spojených so získaním kvantitatívneho výťažku^{1,2}. Rozklad vzorky vnáša do celého analytického procesu najväčšiu neistotu, pretože vo fáze rozkladu je zvýšené riziko kontaminácie vzorky alebo straty analytu³. Namiesto roztokovej analýzy môžeme pre pevné vzorky použiť aj priame dávkovanie. Adaptácia ETAAS pre priamu analýzu pevných vzoriek sa javí ako najvhodnejšia spomedzi metód atómovej spektrometrie, vďaka pomerne jednoduchému zavádzaniu pevnej vzorky do elektrotermického atomizátora⁴. Výhodou priamej analýzy pevnej vzorky s ETAAS – Solid Sampling (SS-ETAAS) v porovnaní s konvenčnou ETAAS je možnosť analýzy tuhých vzoriek bez predchádzajúceho rozkladu, čo vedie k značnému skráteniu celkového času analýzy a k minimalizácii rizika kontaminácie^{4,5}. SS-ETAAS bola pôvodne vyvinutá a prakticky sa využívala pre stanovenie stopových a ultrastopových obsahov nečistôt v ťažko rozložiteľných vzorkách (keramiky, cementy, kovy, a pod.) v rôznych oblastiach priemyslu⁶. Z prehľadových článkov zaoberajúcich sa problematikou priamej analýzy pevných vzoriek^{4,5} je zrejme, že uvedenú metodiku je možné využiť aj pre environmentálny monitoring⁷.

Bizmut patrí medzi analyticky významné a zaujímavé prvky, hlavne kvôli potenciálnej toxicite. Jeho obsah v zemskej kôre je približne 0,1 až 0,2 mg kg⁻¹ (cit.⁸). Vyskytuje sa väčšinou v pyrite a do životného prostredia sa dostáva hlavne zvetrávaním hornín, ťažobnou alebo priemyselnou činnosťou⁹. Má podobné chemické vlastnosti ako arzén a antimón¹⁰. Pre stanovenie bizmutu možno použiť rozličné analytické metódy, z ktorých najpoužívanejšia je technika generovania hydridov, ktorá môže byť aplikovaná v spojení s atómovou absorpčnou^{11–14}, atómovou emisnou¹⁵ alebo hmotnostnou spektrometriou^{16–18}. Pomocou kolekcie hydridov v grafitovej kyvete („*in situ* trapping“) je možné dosiahnuť značné zvýšenie citlivosti

jeho stanovenia^{19,20}. Bizmut v environmentálnych vzorkách je možné stanoviť aj technikou ETAAS, pričom stanovenie komplikuje jednak pomerne vysoká prchavosť analytu²¹ a taktiež aj značné interferencie²². Hlavným interferentom pri stanovení Bi sú chloridy, pričom za ich prítomnosti dochádza k stratám bizmutu počas pyrolýzy už pri relatívne nízkej teplote²¹ (približne 400 °C). Bolo navrhnutých niekoľko zmesných modifikátorov na báze paládia²³, molybdénu^{23,24}, alebo volfrámu²⁵ s prídavkom kyseliny vínnej pre účinnú stabilizáciu bizmutu v environmentálnych vzorkách. Mierzwa a spol.²⁶ navrhli pre rýchle priame stanovenie Bi v pôdach a sedimentoch využitie techniky dávkovania jemnej suspenzie do elektrotermického atomizátora („slurry sampling“) za prítomnosti Pd(NO₃)₂ ako modifikátora analytu.

V uvedenej práci je opísaný postup pre stanovenie bizmutu vo vzorkách pôd a kalov technikou ETAAS využitím metódy priamej analýzy pevných vzoriek a jeho porovnanie s roztokovou ETAAS. Vypracovanie analytickej metodiky pre stanovenie bizmutu v uvedených vzorkách metódou SS-ETAAS je zaujímavé z hľadiska značného skrátenia a skvalitnenia celého analytického postupu. Tiež nie je zanedbateľná potenciálna možnosť využitia SS-ETAAS ako alternatívnej techniky ku konvenčnej ETAAS využívajúcej rozklad vzorky pri analýze pre kontrolu kvality výsledkov a hodnotenia homogenity vzorky.

Experimentálna časť

Použitie prístroje a zariadenia

Na priame stanovenie bizmutu vo vzorkách pôd a kalov sa použil spektrometer AAS 5EA (Analytik Jena, Jena, SRN) s priečne vyhrievanou grafitovou trubicou a deutériovou korekciou nešpecifickéj absorpcie, ktorý bol pôvodne navrhnutý na analýzu kvapalných vzoriek. Friese a Kriván²⁷ jeho jednoduchou modifikáciou dosiahli priame dávkovanie pevných vzoriek umiestnených na platforme. Navrhnutým mechanizmom sa môže platforma ľahko uchopiť, transportovať a vložiť do trubice atomizátora. Vzorky sa pred analýzou navažovali na mikrováhach M500P s rozlíšením 10⁻⁶ g (Sartorius, Göttingen, Nemecko). Ako ochranný plyn bol použitý vysokočistý argón (Messer Tatragas a.s., Bratislava).

Na stanovenie bizmutu vo výluchoch pôd a kalov bol použitý atómový absorpčný spektrometer firmy Perkin-Elmer 1100B (Norwalk, Connecticut, USA) s elektrotermickým atomizátorom HGA-700 v spojení s automatickým podávačom vzoriek AS-70 tej istej firmy. Celkový rozklad pôd a kalov za mokra pri atmosferickom tlaku (za postupného použitia koncentrovanej HNO₃, HClO₄ a HF) sa uskutočnil v teflónových miskách na pieskovom

Tabuľka I

Pracovné podmienky pre stanovenie bizmutu v pôdach a kaloch a dosiahnuté analytické parametre

	SS-ETAAS	Roztoková ETAAS	
Zdroj žiarenia	HCL	EDL	
Prúd lampy /výkon	5,0 mA	8,0 W	
Analytická čiara	306,8 nm	306,8 nm	
Štrbina	0,5 nm	0,7 nm	
Korekcia pozadia	D ₂	D ₂	
Použitý mod.	10 µg Pd + 5 µg Mg(NO ₃) ₂	5 µg Pd + 200 µg NH ₄ NO ₃	200 µg glukóza + 200 µg NH ₄ NO ₃
Kalib. rozsah	0,5–3,0 ng	0,25–1,5 ng (12,5–75,0 µg l ⁻¹)	
Použité navážky	0,20–1,50 mg	–	–
Životnosť platformy	250	>100	>100
m _o ^a	43 pg	46 pg	37 pg

^a Charakteristická hmotnosť

Tabuľka II

Teplotný program pre priame stanovenie (SS-ETAAS) bizmutu v pôdach a kaloch za prítomnosti 10 µl zmesného modifikátora obsahujúceho 10 µg Pd a 5 µg Mg(NO₃)₂ pri atomizácii z platformy

Krok	Teplota [°C]	Nárast teploty [°C s ⁻¹]	Držanie teploty [s]	Prietok Ar [l min ⁻¹]
Sušenie	110	20	30	1,2
	200	20	30	1,2
Pyrolýza	500	50	20	1,2
	1100	50	20	1,2
Atomizácia	2000	2000	4	0,1
Čistenie	2500	2500	3	1,2

kúpeli²⁸. Pseudototálny rozklad vzoriek (výluh lúčavkou kráľovskou) bol uskutočnený vo varnej banke, pod spätným chladičom, podľa ISO normy č. 11466. Optimalizované inštrumentálne parametre pre SS-ETAAS a pre roztokovú ETAAS sú zhrnuté v tabuľke I. Teplotné programy pre priamu analýzu pevných vzoriek a pre analýzu rozložených vzoriek a výluhov sú uvedené v tabuľkách II a III.

Tabuľka III

Teplotný program pre stanovenie bizmutu v rozložených pôdach a kaloch pri atomizácii z platformy

Krok	Teplota, [°C]	Nárast teploty [s]	Držanie teploty [s]	Prietok Ar [l min ⁻¹]
Sušenie ^a	110	1	30	0,30
	150	2	30	0,30
Pyrolýza	700 ^{b,c}	10	30	0,30
Atomizácia	1900 ^b 1700 ^c	0	3	0,01
Čistenie	2200	1	3	0,30

^a Počas dávkovania grafitová kyveta bola vyhriata na 80 °C; ^b za prítomnosti 10 µl zmesného modifikátora obsahujúceho 5 µg Pd + 200 µg NH₄NO₃; ^c za prítomnosti 100 µg glukózy + 200 µg NH₄NO₃

Chemikálie, roztoky a vzorky pôd a kalov

Na prípravu roztokov bola použitá deionizovaná voda zo zariadenia Water PRO-PS (Labconco, Kansas City, USA). Na prípravu kalibračných roztokov a roztokov modifikátorov bola použitá 1% v/v kyselina dusičná od firmy Merck. Lúčavka kráľovská bola pripravená z vysokočistej koncentrovanej HCl a HNO₃ (Merck, Darmstadt, SRN). Kalibračné roztoky boli pripravené vhodným zriedením štandardného roztoku bizmutu (Merck) s koncentráciou prvku 1,000 g l⁻¹ s 1% (v/v) kyselinou dusičnou. Dusičnan horečnatý (hexahydrát), dusičnan paládnatý (dihydrát) obe od firmy Merck, dusičnan amónny a glukóza (Lachema Brno, ČR) vo forme roztokov boli použité ako modifikátory. Do roztoku modifikátora pre SS-ETAAS bol pridaný tenzid Triton X-100 (Fluka, Buchs, Švajčiarsko), pre zaisťenie homogénneho zmáčania tuhej vzorky. Koncentrácia tenzidu v roztoku modifikátora bola 0,1 % (v/v).

Štandardné referenčné materiály pôd S-VM č. 12-1-07 Eutric Cambisols, S-MS č. 12-1-08 Orthic Luvisols, S-SP č. 12-1-09 Rendzina boli dodané Ústavom rádioekológie a využitia jadrovej techniky (Košice). Štandardné referenčné materiály kalov z čistiarní odpadových vôd s nízkym (WT-L č. 12-3-12), stredným (WT-M č. 12-3-13) a vysokým (WT-H č. 12-3-14) obsahom toxických prvkov dodala firma pb-anal (Košice).

Pracovný postup

Pred priamou analýzou sa približne 5 až 10 g z každého referenčného materiálu odobralo zo zásobnej fľaše a odobraný podiel sa zhomogenizoval a sušil pri teplote 105 °C po dobu 15 min. Po vysušení sa vzorky uchovávali v polyetylénových nádobách. Z takto upravených vzoriek množstvá do 1,5 mg sa po pridaní kvapalného modifikátora

ra vložili do elektrotermického atomizátora. Analýza každej vzorky v tuhom stave sa opakovala desaťkrát.

Celkový rozklad a výluh lúčavkou kráľovskou sa uskutočnil dvakrát pre každú vzorku. Dávkovaný objem vzorky do grafitovej kyvetky bol 20 μl , a objem zmesného modifikátora 10 μl . Pre urýchlenie sušenia sa grafitová piecka počas dávkovania vyhrieva na 80 °C (tzv. hot injection). Všetky rozložené vzorky boli analyzované dvakrát.

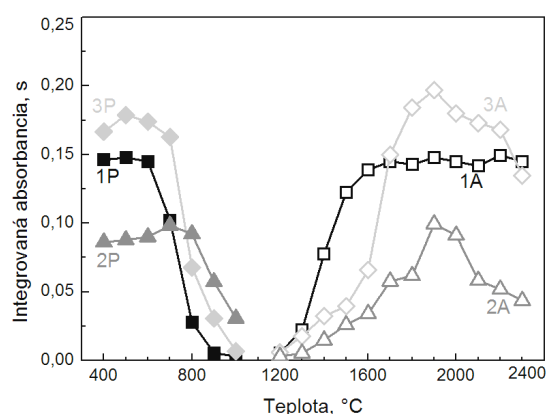
Výsledky a diskusia

Priame stanovenie Bi v pôdach a kaloch

Najdôležitejšími krokmi pri vypracovaní SS-ETAAS metodiky sú: výber vhodnej analytickej čiary, ktorá zabezpečí dostatočnú citlivosť, výber vhodného modifikátora a optimalizácia teplotného programu. Kvôli prchavosti bizmutu nie je možné aplikovať dostatočne vysokú teplotu pyrolýzy na vzorku, a tak nedochádza k úplnému odstráneniu rušivých zložiek z matrice. Prchavosť bizmutu je možné značne znížiť vhodným stabilizátorom analytu. Najčastejšie sa na tento účel používa zmesný modifikátor obsahujúci 5 μg Pd a 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (cit.²⁹) alebo Ir (cit.^{20,30,31}), Zr (cit.^{20,30–32}), Ta (cit.³²), W (cit.³²), Nb (cit.³²) ako permanentné modifikátory. V prípade použitia kvapalných modifikátorov nedochádza k stratám analytu pri teplote pyrolýzy do 1100 °C, za prítomnosti permanentných modifikátorov do teploty 900 až 1000 °C. Uvedené teploty sú postačujúce na zjednodušenie matrice vzorky pri konvenčnej roztokovej analýze ETAAS. Je však otázne či prebehne efektívna modifikácia analytu v pevných vzorkách a či bude možné aplikovať dostatočne vysokú teplotu pyrolýzy na pevnú vzorku.

Ďalším problémom pri stanovení bizmutu je poloha jeho hlavných rezonančných čiar (223,1 nm, 222,8 nm) v krátkovlnnej UV oblasti, kde je značná možnosť výskytu interferencií. Bizmut disponuje aj alternatívnou analytickou čiarou pri 306,8 nm, s 35% citlivosťou v porovnaní s jeho hlavnou analytickou čiarou. Je vysoko pravdepodobné, že vyparovanie pevnej vzorky pri podmienkach merania vyvolá značnú nešpecifickú absorpciu, ktorá pri použití čiary 306,8 nm bude najmenšia. Kvôli jeho spomenutým kladným analytickým vlastnostiam posledne zmienenú analytickú čiaru sme vybrali pre stanovenie bizmutu v pôdach a kaloch.

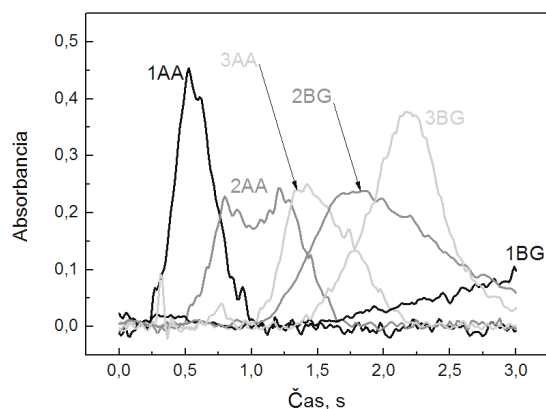
Z nameraných kriviek pyrolýzy (obr. 1.) je zrejmé, že bez prídavku modifikátora je analyt stabilný vo vodnom roztoku do 600 °C a v pevných vzorkách do 650 až 700 °C. Pre pevné vzorky je optimálna teplota atomizácie približne o 300 °C vyššia ako pre vodný štandard. Pravdepodobne tento jav súvisí s obtiažnejším uvoľnením analytu z tuhej matrice. Maximá na krivkách atomizácie pevných vzoriek môžu poukazovať na rušivý vplyv matrice vzorky. Pri atomizačnej teplote prislúchajúcej maximu sa podarilo oddeliť Bi od ostatných zložiek matrice (to sa prejavilo



Obr. 1. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A, 1,0 ng Bi v 10 μl roztoku), pôde S-SP (krivky 2P a 2A, 1,00 mg vzorky) a kale WT-H (krivky 3P a 3A, 1,00 mg vzorky) bez prítomnosti modifikátora pri atomizácii z platformy

vzrastom signálu Bi). Ďalším zvyšovaním teploty atomizácie sa analyt a matrice vyparujú spoločne a signál analytu klesá v dôsledku sťaženej disociácie.

Na obr. 2. sú zobrazené priebehy absorpčných signálov bizmutu atomizovaného zo štandardného roztoku a z pevných vzoriek bez prídavku modifikátora. Je vidieť, že bez prítomnosti modifikátora maximum atomového absorpčného signálu bizmutu pri atomizácii zo štandardného roztoku sa objaví skôr ako pri atomizácii z pevných vzoriek. Taktiež nešpecifická absorpcia je značná, nakoľko kvôli prchavosti analytu nebolo možné aplikovať dostatočne vysokú teplotu pyrolýzy a tak nedošlo k žiadanej zjednodušeniu matrice. Tvary absorpčných signálov bizmutu z pevných vzoriek sa značne odlišujú od tvaru signá-

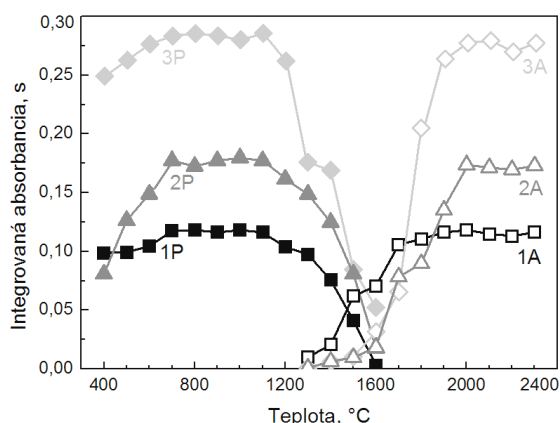


Obr. 2. Signály atómovej absorpcie (AA) a nešpecifickej absorpcie pri atomizácii Bi zo štandardného roztoku (krivky 1AA a 1BG, 0,5ng Bi v 10 μl roztoku), z kalu WT-H (krivky 2AA a 2BG, 0,455 mg vzorky) a z pôdy S-SP (krivky 3AA a 3BG, 0,341 mg vzorky) bez prídavku modifikátora (teplota pyrolýzy 600 °C a teplota atomizácie 1800 °C pre všetky vzorky)

lu získaného pri atomizácii zo štandardného roztoku. Signály zo vzoriek sú časovo posunuté, deformované a taktiež rozšírené v porovnaní so signálom zo štandardného roztoku. Bizmut zo vzorky kalu sa uvoľňoval pri atomizácii v dvoch vlnách (štípenie absorpčného signálu), čo poukazuje na rozdielne typy väzieb analytu v matrici. Rozšírenie a časové posuny píkov môžu poukazovať na rozdielnu kinetiku, aktivačnú energiu a energetickú (termodynamickú) náročnosť atomizácie bizmutu z roztoku a z pevných vzoriek.

Kvôli výskytu matricového efektu pri atomizácii pevných vzoriek bolo nutné (podľa očakávania) použiť chemický modifikátor. Pre termickú stabilizáciu Bi v pevných vzorkách sme sa rozhodli aplikovať paládium (vo forme roztoku $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) v množstve 10 μg Pd na jednu analýzu, podobne ako v práci²⁶. Pre zaistenie účinného termického rozkladu matrice modifikátor analytu sme Pd kombinovali s mineralizačným činidlom dusičnanom horečnatým v množstve 5 μg na jednu analýzu. Vo fáze atomizácie v prítomnosti modifikátora sa zvolil nárast teploty 2000 $^\circ\text{C s}^{-1}$ (namiesto maximálnej 3000 $^\circ\text{C s}^{-1}$). Táto voľba súvisela s predpokladom účinnejšieho vytvorenia intermetallickej zlúčeniny Bi_xPd_y , čo by malo zaručiť zjednotenie kinetiky atomizácie Bi z vodného štandardu a z pevnej vzorky. Atomizačná teplota (2000 $^\circ\text{C}$) bola zvolená na základe dosiahnutia čo najlepšieho oddelenia absorpčného signálu analytu od signálu nešpecifickej absorpcie.

Krivky pyrolýzy Bi za prítomnosti zmesného modifikátora (obr. 3.) poukazujú na účinnú modifikáciu analytu, pretože termická stabilita analytu vzrástla z 700 $^\circ\text{C}$ (bez modifikátora) na 1100 $^\circ\text{C}$ vo vodnom štandarde aj v pevných vzorkách. Pre vodný štandard bizmutu a tiež aj pre analyzované vzorky pôd a kalov sa zistil dobrý súhlas stanovenej optimálnej teploty pyrolýzy (1100 $^\circ\text{C}$) s literárnymi údajmi^{23–26} (1000 až 1250 $^\circ\text{C}$). Klesanie krivky pri nízkych teplotách (400 až 700 $^\circ\text{C}$) pravdepodobne



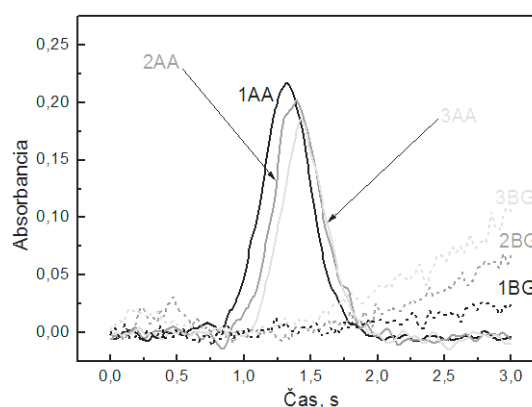
Obr. 3. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A; 2,0 ng Bi v 10 μl roztoku), pôde S-SP (krivky 2P a 2A; 1,00 mg vzorky) a kale WT-H (krivky 3P a 3A, 1,00 mg vzorky) v prítomnosti zmesného modifikátora obsahujúceho 10 μg Pd a 5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pri atomizácii z platformy

súvisí s vysokou aktivačnou energiou tvorby intermetallickej zlúčeniny medzi Bi a Pd. Podobne, ako bez prítomnosti modifikátora, aj v prítomnosti modifikátora bola pre pevné vzorky optimálna teplota atomizácie značne vyššia ako pre vodný štandard.

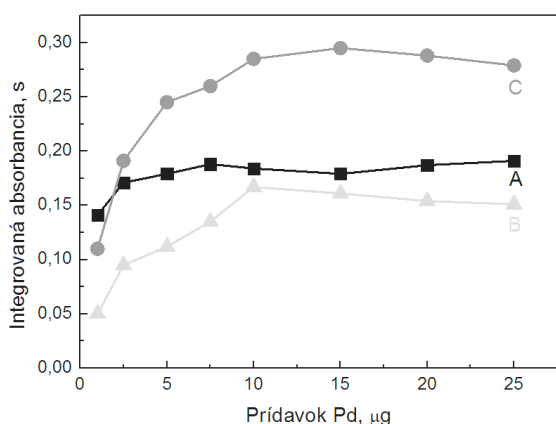
Pri komplikovaných vzorkách sa odporúča použitie tepelnej úpravy vzoriek vo viacerých krokoch³³ a preto sme sa rozhodli aplikovať tento postup aj pre nami analyzované vzorky. Najprv sa vzorky pyrolyzovali pri 500 $^\circ\text{C}$ a následne pri 1100 $^\circ\text{C}$. Pri použití dvojkrokovej pyrolýzy sa dosiahlo výrazné zníženie nešpecifickej absorpcie (zaistí sa účinný kontakt modifikátora so vzorkou) a taktiež absorpčné signály analytu boli symetrické. V prítomnosti zmesného modifikátora nastáva zjednotenie kinetiky atomizácie medzi vodným štandardom a pevnými vzorkami pôd a kalov, ako je to zrejme z priebehov absorpčných signálov zobrazených na obr. 4.

Po optimalizácii teplotného programu nasledovala optimalizácia množstva stabilizátora analytu pridaného ku vzorkám, pričom množstvo modifikátora matrice zostalo nezmenené a ďalej sa neoptimalizovalo. Nameral sa signál Bi z vodného štandardu a z pevných vzoriek pri rôznych množstvách pridaného paládia. Analýzou vplyvu množstva paládia na veľkosť a tvar absorpčného signálu bizmutu sa zistilo, že paládium účinne modifikuje Bi v analyzovaných vzorkách už pri množstve 10 μg na jednu analýzu, preto sme sa rozhodli použiť tento prídavok pri ďalších analýzach. Pri prídavku paládia <10 μg absorpčné signály analytu z pevných vzoriek boli deformované a rozštiepené, čo môže poukazovať na nedostatočnú modifikáciu. Závislosť signálu bizmutu od pridaného množstva Pd je na obr. 5.

Počas stanovovania bizmutu v pevných vzorkách sme sa zamerali aj na sledovanie životnosti platformy resp. stavu pyrolytickej vrstvy na nej v závislosti od počtu absolvovaných atomizačných cyklov. Vhodným indikátorom stavu pyrolytickej vrstvy na platforme je symetria a tvar ab-

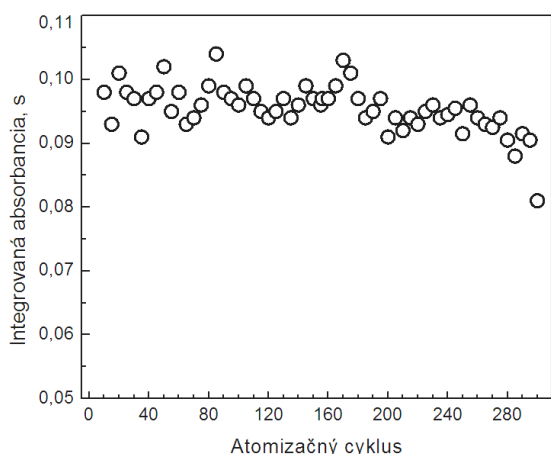


Obr. 4. Signály atómovej absorpcie (AA) a nešpecifickej absorpcie pri atomizácii Bi zo štandardného roztoku (krivky 1AA a 1BG, 0,5 ng Bi v 10 μl roztoku), z kalu WT-H (krivky 2AA a 2BG, 0,455 mg vzorky) a z pôdy S-SP (krivky 3AA a 3BG, 0,341 mg vzorky) s prídavkom zmesného modifikátora 10 μg Pd a 5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$



Obr. 5. Vyhodnotenie vplyvu množstva modifikátora analytu (paládia) na signál bizmutu (krivka A: 2,5 ng Bi v 10 µl roztoku, krivka B: 1,00 mg pôda S-SP, krivka C: 1,00 mg kal WT-H)

sorbčných signálov a taktiež aj dlhodobá opakovateľnosť, prípadne výskyt nedokonalé vyvinutých absorbných signálov. Kvôli postupnej degradácii atomizačného povrchu počas sérií analýz je vhodné zaradiť po určitých počtoch atomizačných cyklov rekalibráciu premeraním jedného bodu kalibračnej krivky. Pomocou rekalibrácie môžeme zaistiť účinnú korekciu výsledkov, ktoré vykazujú drift vplyvom postupného opotrebovania platformy. Fyzický stav platformy sme vyhodnocovali empiricky zo závislosti absorbného signálu 1,0 ng bizmutu od počtu atomizačných cyklov v prítomnosti zmesného modifikátora. Uvedené údaje sa získali počas rekalibrácií (každé piate meranie bolo rekalibrácia) a sú graficky spracované na obr. 6. Pomerne častá rekalibrácia bola nutná kvôli odhaleniu predpokladanej rýchlej erózie platformy. Podľa očakávania pri priamej analýze pôd a kalov nastávala postupná degradácia



Obr. 6. Vyhodnotenie životnosti platformy (signál 1,0 ng Bi zo štandardného roztoku v prítomnosti zmesného modifikátora Pd/Mg(NO₃)₂)

pyrolytickej vrstvy platformy vplyvom jednak sintrácie zvyškov matrice s povrchom platformy ale taktiež aj kvôli korozívnemu účinku použitého modifikátora (hlavne Mg(NO₃)₂). Degradácia povrchu platformy mala vplyv hlavne na deformáciu atomizačných signálov, ku koncu životnosti platformy nastávalo nedokonalé uvoľnenie analytu z matrice, a taktiež sme pozorovali zvýšenie hodnôt slepých pokusov.

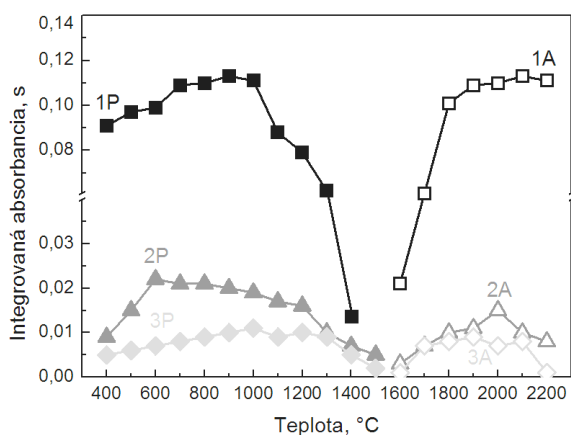
V prítomnosti modifikátora obsah bizmutu v analyzovaných vzorkách pôd a kalov sme vyhodnocovali kalibráciou na vodné štandardy (zarobené v 1% v/v HNO₃) a metódou prídavku štandardu. Pomerne nízky obsah analytu nám dovoľoval zvýšiť návažky vzorky pre jednotlivé analýzy, čo znamená podstatné zvýšenie reprezentatívnosti výsledkov analýz.

Stanovenie Bi v pôdach a kaloch s využitím ETAAS z roztokov

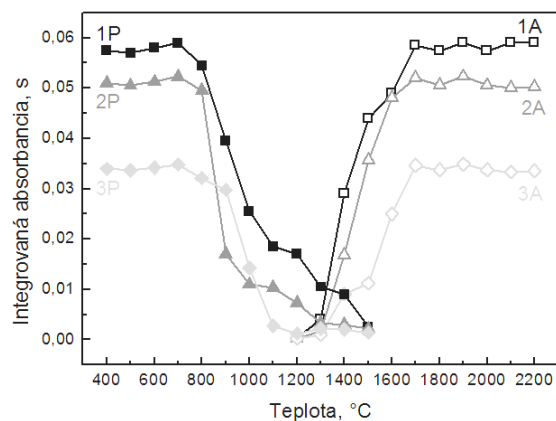
Nakoľko väčšina analyzovaných vzoriek nemala certifikovaný obsah bizmutu, a preto bolo nutné výsledky získané SS-ETAAS porovnať s výsledkami roztokovej analýzy ETAAS využívajúcej rozklad vzoriek. Pre rozklad vzoriek sme zvolili celkový rozklad s postupným použitím koncentrovanej HNO₃, HClO₄, HF za atmosferického tlaku a výluh s lúčavkou kráľovskou.

Najsilnejšie interferencie sa objavili pri analýze výluhov, a preto bol na týchto roztokoch študovaný vplyv modifikátorov. Ako už bolo spomenuté pri stanovení Bi (aj v rozložených vzorkách) je nutné jednak stabilizovať analyt, ale taktiež je nutné odstrániť rušivú maticu. Ako vidieť z kriviek pyrolýzy a atomizácie výluhov lúč. kráľovskou (obr. 7.) na spomenutý účel nie je vhodný univerzálne doporučovaný zmesný modifikátor Pd/Mg(NO₃)₂, nakoľko neodstraňuje chloridovú maticu. Podobnú interferenciu sme zaregistrovali aj pri analýze celkových rozkladov pôd a kalov. Na odstránenie rušivých chloridov je možné použiť NH₄NO₃ (cit.³⁴). Použitie zmesného modifikátora Pd/NH₄NO₃ však neprineslo očakávané zlepšenie analytickej metodiky. Pri použití zmienenej zmesného modifikátora sa analyt a matica vyparovala súčasne, o čom svedčia maximá na krivkách atomizácie (obr. 8). Navyše tento modifikátor stabilizuje Bi v rozličných rozložených vzorkách rozlične, čo je evidentné z rozdielnych kriviek termického rozkladu pre rozložené pôdy a kaly. Rozdielna termická stabilizácia v rozličných vzorkách zvyšuje riziko strát analytu počas pyrolýzy nevhodnou voľbou teplotného programu.

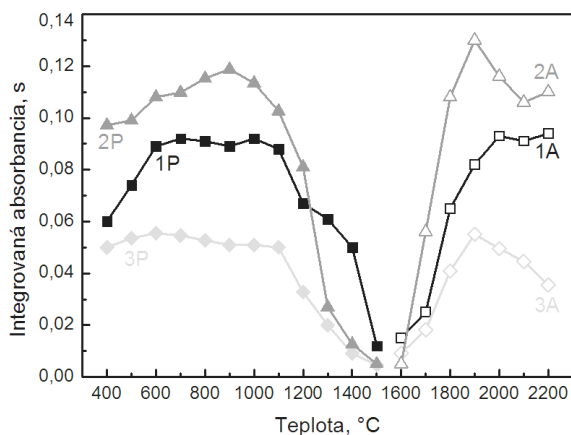
Preto bolo nutné nájsť taký modifikátor analytu, ktorý by zabránil stratám Bi počas tepelnej úpravy vzorky, a naopak na stabilitu zložiek matrice by mal zanedbateľný vplyv. Z tohto pohľadu neprichádzajú do úvahy žiadne z konvenčných stabilizátorov analytu na báze platinových kovov alebo karbidotvorných prvkov. Perez-Corona a spol.³⁵ dosiahli začnú termickú stabilizáciu Sb a Se (až do 1300 °C) použitím glukózy, ako chemického modifikátora. Bizmut je chemicky podobný antimónu a preto sme sa rozhodli tento modifikátor využiť s prídavkom NH₄NO₃



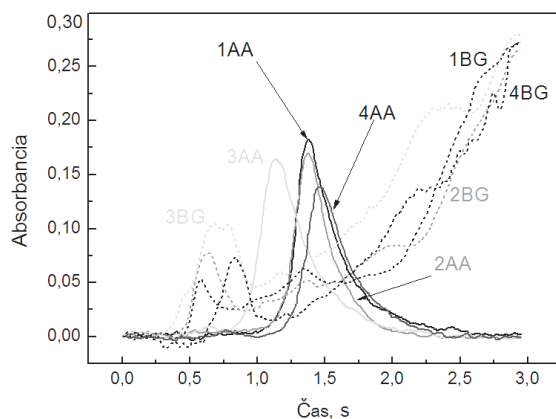
Obr. 7. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A, 1,0 ng Bi v 20 µl roztoku), výluh lúčavkou kráľovskou kalu WT-H (krivky 2P a 2A) a výluh lúčavkou kráľovskou pôdy S-SP (krivky 3P a 3A) v prítomnosti zmesného modifikátora obsahujúceho 5 µg Pd a 3 µg $Mg(NO_3)_2$ pri atomizácii z platformy



Obr. 9. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A; 0,5 ng Bi v 20 µl roztoku), výluh lúčavkou kráľovskou kalu WT-H (krivky 2P a 2A) a výluh lúčavkou kráľovskou pôdy S-SP (krivky 3P a 3A) v prítomnosti zmesného modifikátora obsahujúceho 200 µg glukózy a 200 µg NH_4NO_3 pri atomizácii z platformy



Obr. 8. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A, 1,0 ng Bi v 20 µl roztoku), výluh lúčavkou kráľovskou kalu WT-H (krivky 2P a 2A) a výluh lúčavkou kráľovskou pôdy S-SP (krivky 3P a 3A) v prítomnosti zmesného modifikátora obsahujúceho 5 µg Pd a 200 µg NH_4NO_3 pri atomizácii z platformy



Obr. 10. Signály atómovej absorpcie (AA) a nešpecifickej absorpcie (BG) pri atomizácii Bi z štandardného roztoku (krivky 1AA a 1BG, 0,5 ng Bi v 10 µl roztoku), výluhov z kalu WT-H (krivky 2AA a 2BG) a z pôdy S-SP (krivky 4AA a 4BG) a z totálneho rozkladu kalu WT-H (krivky 3AA a 3BG) s prídavkom zmesného modifikátora 100 µg glukózy a 200 µg NH_4NO_3

(kvôli účinnej eliminácii chloridov) pre jeho stanovenie v rozložených vzorkách. Z kriviek pyrolýzy štandardného roztoku a rozložených vzoriek v prítomnosti glukózy a NH_4NO_3 je možné usúdiť, že uvedený zmesný modifikátor rovnako stabilizuje Bi vo všetkých médiách (obr. 9). Ďalej tento zmesný modifikátor nám dovoľuje použiť pomerne nízku teplotu atomizácie (1700 °C), čo napomáha účinnej separácii analytu od rušivej matrice. Separácia analytu od matrice je zrejma aj z priebehov absorpčných signálov, zobrazených na obr. 10.

Správnosť navrhnutých postupov rozkladu bola overená analýzou štandardného referenčného materiálu kalu z čistiarne odpadových vôd WT-L. Výluhom lúčavkou kráľovskou bola stanovená hodnota $2,82 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$ a totálnym rozkladom bol stanovený obsah Bi $3,48 \pm 0,12 \text{ mg g}^{-1}$ (počet opakovaní v oboch prípadoch bol 4), zatiaľ čo certifikovaná hodnota bola $3,73 \pm 0,55 \text{ mg g}^{-1}$. Zhodnosť stanovených obsahov bizmutu s certifikovanou hodnotou sme zisťovali pomocou Studentovho testu (T-test) na hladine významnosti 95 %. Zhodnosť výsledkov s certifikovaným obsahom Bi sa potvrdila iba v prípade použitia totálneho rozkladu

Tabuľka IV

Porovnanie stanoveného obsahu bizmutu^a vo vzorkách pôd a kalov roztokovou ETAAS a SS-ETAAS

Vzorka	Výluh lúč. kr. ^{b,c}	Celkový rozklad ^{b,c}	Priama analýza ^b
S-MS	0,467 ± 0,040	2,22 ± 0,07	2,41 ± 0,20 ^c 2,32 ± 0,29 ^d
S-VM	0,456 ± 0,014	2,40 ± 0,13	2,45 ± 0,21 ^c 2,50 ± 0,33 ^d
S-SP	0,606 ± 0,089	1,68 ± 0,12	1,65 ± 0,17 ^c 1,73 ± 0,25 ^d
WT-L	2,82 ± 0,04	3,48 ± 0,12	3,69 ± 0,12 ^c 3,77 ± 0,35 ^d
WT-M	1,46 ± 0,05	2,91 ± 0,02	3,05 ± 0,19 ^c 2,85 ± 0,24 ^d
WT-H	2,43 ± 0,13	2,59 ± 0,02	2,88 ± 0,17 ^c 2,75 ± 0,30 ^d

^a Priemerná hodnota ± SD (počítaná zo 4 hodnôt pri roztokovej ETAAS a z 10 hodnôt pri SS-ETAAS); ^b výsledky sú prezentované v $\mu\text{g g}^{-1}$; ^c metóda kalibračnej krivky; ^d metóda prídavku štandardu

du, výluh lúčavkou kráľovskou poskytol nižší výsledok, pravdepodobne z dôvodu neúplného rozkladu.

Porovnanie výsledkov stanovenia Bi v pôdach a kaloch metódou SS-ETAAS a v roztokoch

V tabuľke IV sú uvedené výsledky získané priamou analýzou pevných vzoriek a porovnané s výsledkami získanými výluhom lúčavkou kráľovskou a výsledkami získanými celkovým rozkladom. Porovnanie poukazuje na všeobecný trend, že výluh lúčavkou kráľovskou poskytuje nižšie výťažky, ako celkový rozklad vzoriek, pričom medzi výsledkami získaných priamou analýzou a celkovým rozkladom pevných vzoriek je štatisticky nevýznamný rozdiel (T-test, na hladine významnosti 95 %).

Záver

Priama analýza pevných vzoriek metódou ETAAS predstavuje vhodnú analytickú metódu na stanovenie bizmutu vo vzorkách pôd a kalov. Pri stanovení bizmutu vo všetkých vzorkách bolo nutné použiť chemickú modifikáciu. V prípade priamej analýzy pevných vzoriek sa na tento účel osvedčilo použitie paládia s prídavkom $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pre zaistenie účinného rozrušenia anorganickej matrice. Naopak pri analýze rozložených vzoriek použitie paládia spôsobilo zvýšenie rušivých vplyvov z matrice. Uvedený problém bolo možné vyriešiť vymenením paládia za glukózu, ktorá efektívne zabránila stratám analytu počas pyrolýzy ale taktiež dovoľila použiť pomerne nízku teplotu

atomizácie (1700 °C). Nízka teplota atomizácie napomáhala úspešnému oddeleniu analytu od rušivých matricových zložiek. Interferencia vyvolaná vysokým obsahom chloridov v rozložených vzorkách a vo výluhoch lúčavkou kráľovskou bola eliminovaná prídavkom NH_4NO_3 .

Kvantitatívne vyhodnotenie obsahu Bi v pevných vzorkách bolo uskutočnené metódou kalibračnej krivky na vodné štandardy a metódou prídavku štandardu. Porovnaním výsledkov získaných analýzou rozložených vzoriek s výsledkami priamej analýzy vzoriek v pevnom stave je možné usúdiť, že po dôslednej optimalizácii teplotného programu a použitia vhodného modifikátora je možné obsah Bi vo všetkých analyzovaných vzorkách spoľahlivo vyhodnotiť metódou kalibračnej krivky na vodné štandardy. Dosiahli sa teda také parametre analýzy, pri ktorých veľkosť absorpčného signálu analytu len málo závisela od zloženia matrice.

Práca bola podporovaná grantmi Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA/1/0430/08 a Slovenskou agentúrou pre výskum a vývoj VVCE-0070-07.

LITERATÚRA

- Karanasiou A. A., Thomaidis N. S., Eleftheriadis K., Siskos P. A.: *Talanta* 65, 1196 (2005).
- Nash M. J., Maskall J. E., Hill S. J.: *J. Environ. Monitor.* 2, 97 (2000).
- Krakovská E., Kuss H. M., in: *Rozklady v analytickej chémii*, Viena, Košice, 2001.
- Vale M. G. R., Oleszczuk N., dos Santos W. N. L.: *Appl. Spectrosc. Rev.* 41, 377 (2006).
- Welz B., Vale M. G. R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 2085 (2007).
- Hoening M., de Kresabiec A.M., in: *Ako zabezpečiť kvalitu výsledkov v atómovej absorpčnej spektrometrii s elektrotermickou atomizáciou?*, Slovenská Spektroskopická Spoločnosť, Bratislava 1999.
- Resano M., Aramendia M., Garcia-Ruiz E., Crespo C., Bellara M. A.: *Anal. Chim. Acta* 571, 142 (2006).
- Ojebuoboh F. K.: *J. Min. Met. Mater. Soc.* 44, 46 (1992).
- Simón M., Martín F., Ortiz I., García I., Fernández J., Fernández E., Dorronsoro C., Aguilar J.: *Sci. Tot. Environ.* 279, 63 (2001).
- Feldmann J., Krupp E. M., Glindemann D., Hirner A. V., Cullen W. R.: *Appl. Organometal. Chem.* 13, 739 (1999).
- Kuldvere A.: *Analyst* 114, 125 (1989).
- Kempton S., Sterritt R. M., Lester J. N.: *Talanta* 29, 675 (1989).
- Asami T., Kubota M., Saito S.: *Water Air Soil Poll.* 62, 349 (1992).
- Saini B. L., Sharma R. P., Vajay R. G.: *Indian Minerals* 60, 193 (2006).
- Pahlavanpour B., Thompson M., Thorne L.: *Analyst* 105, 756 (1980).

16. Hall G. E. M., Pelchat J.-C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 97 (1997).
17. Hall G. E. M., Pelchat J.-C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 103 (1997).
18. Hall G. E. M., MacLaurin A. I., Pelchat J.-C., Gauthier G.: *Chem. Geology* 137, 79 (1997).
19. Moscoso-Pérez C., Moreda-Pinero J., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D.: *Talanta* 61, 633 (2003).
20. Murphy J., Schlemmer G., Shuttler I., Jonesa P., Hill S. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1593 (1999).
21. Pszonicki L., Dudek J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1755 (1999).
22. Tokman N., Akman S.: *Spectrochim. Acta, Part B* 60, 291 (2005).
23. Acar O., Türker A. R., Kilic Z.: *Fres. J. Anal. Chem.* 360, 645 (1998).
24. Acar O., Türker A. R., Kilic Z.: *Talanta* 49, 135 (1999).
25. Acar O., Türker A. R., Kilic Z.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357, 656 (1997).
26. Mierzwa J., Sun Y. C., Yang M. H.: *J. Chin. Chem. Soc.* 44, 581 (1997).
27. Friese K. H. – Kriváň V.: *Spectrochim. Acta, Part B* 53, 1069 (1998).
28. Jiří Z., in: *Analýza půd II, Jednotné pracovní postupy, ÚKZ ÚZ, Brno* 1996.
29. Schlemmer G., Welz B.: *Spectrochim. Acta, Part B* 41, 1157 (1986).
30. Tsalev D. L., D'Ulivo A., Lampugnani L., Marco M. D., Zamboni R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 1003 (1995).
31. Tsalev D. L., D'Ulivo A., Lampugnani L., Marco M. D., Zamboni R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 979 (1996).
32. Haug H.O., Liao Y.-P.: *Fres. J. Anal. Chem.* 356, 435 (1996).
33. Huang M. D., Kriváň V.: *Spectrochim. Acta, Part B* 62, 297 (2007).
34. Welz B., Sperling M., in: *Atomic Absorption Spectrometry* (3. vyd.), str. 531. Wiley-VCH, Weinheim 1999.
35. Perez-Corona M. T., De La Calle-Guntinas M. D., Madrid Y., Camara C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 321 (1995).

P. Török and M. Žemberyová (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Determination of Bismuth in Soils and Sludges by Solid Sampling – ETAAS and Its Comparison with Liquid Sampling ETAAS**

The aim of this work was to develop a rapid and simple procedure for direct solid sampling determination of bismuth in soils and sludges of various origins by ETAAS. To overcome the interferences from the undecomposed solid matrix and also for avoiding the pre-atomization losses of the analyte the mixed Pd/Mg(NO₃)₂ modifier was utilized. The alternative analytical line at 306.8 nm was used for determination of Bi in selected solid samples in order to allow the introduction of reasonably high sample mass into the furnace, what is a pre-requirement for an acceptable precision. The quantification of Bi in solid samples was performed by calibration using aqueous standards and by three point estimation-standard addition method (generalized standard addition procedure). For verifying the accuracy and the precision of the proposed method the results obtained by solid sampling ETAAS were compared with dissolution based ETAAS analysis. Two decomposition procedures were tested, namely total dissolution at the atmospheric pressure using HNO₃, HClO₄, HF and aqua regia leaching, respectively. The accuracy of the selected decomposition procedures were checked by analyzing a certified reference material of sludge. The recoveries were 76 ± 1 % for aqua regia leaching and 94 ± 3 % for total dissolution, hence the results of total dissolution were used for comparison. With SS-ETAA the 3 SD detection limit 0.04 µg g⁻¹ and 10 SD quantification limit of 0.13 µg g⁻¹ and a characteristic mass of 43 pg were obtained. For all the matrices under scrutiny, a good agreement with the results obtained by ETAAS analysis of dissolved samples was achieved with RSD values around 10 %.

ANALÝZA ZAPÁCHAJÚCICH LÁTOK VZNIKAJÚCICH PRI VÝROBE BUNIČÍN A PAPIERA

FRANTIŠEK KAČÍK, VERONIKA VELKOVÁ, LUBOMÍR LUŠTEK a DANICA KAČÍKOVÁ

*Technická univerzita vo Zvolene, T.G. Masaryka 24, 960 53 Zvolen, Slovensko
kacik@vsld.tuzvo.sk, velkova@vsld.tuzvo.sk*

Úvod

Pri výrobe buničín a papiera môžu vznikáť látky nepriaznivo ovplyvňujúce senzorké vlastnosti medziproduktov aj finálneho výrobku a znečisťujúce životné prostredie. Zapáchajúce látky sa uvoľňujú do pracovného a životného prostredia, čím nepríjemne pôsobia na pracovníkov a obyvateľov v okolí podniku vyrábajúceho buničinu a papier. Okrem toho sa môžu dostať aj do papiera, ktorý sekundárne negatívne vplyva na používateľov. Obzvlášť vážne problémy môžu zapáchajúce látky v papieri spôsobiť, ak sa papier používa na balenie potravín. Zápach z papiera môže ovplyvniť senzorké vlastnosti potravín, čo môže viesť až k ich znehodnoteniu a nespokojnosti zákazníkov. Problém so zápachom a chuťou nie je jednoduché riešiť, pretože neexistujú jednoduché a ľahko použiteľné metódy na ich hodnotenie. Ďalšie problémy spôsobuje skutočnosť, že aróma sa môže pri skladovaní papiera meniť a preto môže byť iná pri posudzovaní spotrebiteľmi a iná pri kontrole kvality vo výrobnom podniku. Existuje niekoľko zdrojov zapáchajúcich látok a vzniknuté látky sa rozdeľujú do viacerých skupín. Vo výrobnom procese s uzavretým systémom vody alebo pri recyklovaní buničínových vlákien je zvyčajne hlavným zdrojom zápachu mikrobiologická aktivita. Oxidácia extraktívnych látok je najdôležitejším zdrojom zápachu pri výrobe mechanickej buničiny alebo pri sulfítovom spôsobe výroby buničiny. Prídavné látky do papiera a ich degradácia môžu byť takisto zdrojom zápachu¹⁻³.

Problémom pri analýze zapáchajúcich látok sú rozdielne výsledky pri chemických analýzach a pri senzorkom hodnotení úrovne zápachu. Uvádza sa, že súčasne dostupné metódy analýz nedosahujú presnosť a citlivosť ľudského nosa, a že senzorké hodnotenie je jediná metóda, ktorej sa dá dôverovať. S týmto názorom sa však dá polemizovať. Výber panela posudzovateľov je dôležitý pre zaručenie objektivity hodnotenia. Posudzovatelia musia byť starostlivo vyberaní, dobre vyškolení a hodnotenie musia vykonávať za stabilných a dobre definovaných podmienok. Za uvedených predpokladov panel posudzovateľov môže poskytnúť objektívne hodnotenie zápachu vzoriek a rozdielov medzi jednotlivými vzorkami. Senzorké hodnotenie je veľmi užitočné, ak sa kombinuje

s prístrojovými metódami analýzy. Napr. spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) v kombinácii so senzorkým hodnotením môže pomôcť pri určení zdrojov zápachu.

Pri výrobe buničín a papiera sa vyskytuje mnoho problémov, ktoré spôsobujú mikroorganizmy. Spóry, ktoré sú odolné voči zvýšenej teplote môžu kontaminovať finálny produkt a mikroorganizmy môžu produkovať zapáchajúce látky. Pri anaerobných podmienkach mnohé mikroorganizmy vytvárajú prchavé organické kyseliny, ktoré majú typickú arómu. Kyselina octová (etánová) má octový zápach, kyselina maslová (butánová) má zápach ako zatuchnuté pokazené maslo, kyselina propiónová (propánová) ako ementálsky syr, nepríjemný zápach má aj kyselina valérová (pentánová). Baktérie redukujúce síru môžu vytvárať sulfán (sirovodík, H₂S), ktorý zapácha ako pokazené vajcia^{1,4,5}.

Najjednoduchším spôsobom, ako odstrániť zápach spôsobený mikrobiálnymi aktivitami, je zabrániť tvorbe prchavých organických kyselín. Tieto sa tvoria za anaerobných podmienok, preto je potrebné zabezpečiť dostatočný prísun kyslíka. Medzi metódy ako pomerne jednoducho zabezpečiť prísun kyslíka patrí dobrá cirkulácia vody, prevzdušňovanie vôd a odstránenie miest so stojatou vodou. Prchavé organické kyseliny sú rozpustné a pri výrobnom procese dochádza k ich premiešaniu. Bez dostatočných koncentračných gradientov môže byť problematické nájsť pôvod zdroja prchavých organických kyselín sledovaním ich aktuálnych koncentrácií vo vodnom systéme. Treba poznamenať, že prebytok kyslíka vo vodnej fáze nezaručuje dostatok kyslíka v biologickej vrstve a v agregátoch mikroorganizmov. Biologická vrstva teda môže predstavovať aerobný povrch a anaerobný vnútrojšok, pričom kyslík sa spotrebúva pri difúzii dovnútra. Tento efekt bol dokázaný pri relatívne tenkých vrstvách (tenších ako 0,2 mm). Minimalizácia biologických vrstiev a biologických aktivít všeobecne je teda nevyhnutná na odstránenie lokálnych anaerobných podmienok, ktorých výsledkom je tvorba prchavých organických kyselín⁶.

Prevzdušnenie však nie je vždy dostatočným riešením a musia byť použité biocídne prostriedky na zabránenie množenia mikroorganizmov vo vodnom systéme. Treba však mať na zreteli, že aj niektoré biocídne prostriedky majú silný zápach. Biocídy by sa mali používať aj pri odstávkach zariadení.

Uzavretie vodného systému pravdepodobne spôsobuje vzrast problémov so zapáchajúcimi látkami vplyvom mikroorganizmov. Nebezpečenstvo anaerobných podmienok vzrastá so zvyšujúcimi sa koncentraciami živín a zníženou rozpustnosťou kyslíka v dôsledku vzrastajúcej teploty. Problémy so zápachom v dôsledku činnosti mikroorganizmov sú väčšie pri alkalickom spôsobe výroby buničín, nakoľko mikroorganizmy majú vhodnejšie hodnoty

pH na svoj rast.

Extraktívne látky sú hlavným zdrojom zápachu v papieroch obsahujúcich mechanické alebo sulfítové buničiny. Problémy sú obzvlášť výrazné pri nebielených buničinách pre vyšší obsah extraktívnych látok a kovových iónov.

Tuky a vosky tvoria hlavnú frakciu extraktívnych látok v dreve, okrem nich sa v dreve vyskytujú aj voľné mastné kyseliny. Výskyt tukov, voskov a voľných mastných kyselín v dreve závisí od mnohých faktorov (druh dreveniny, ročné obdobie, lokalita rastu, poveternostné podmienky ap.), preto sa ich množstvo môže líšiť v pomerne veľkom rozsahu. Niektoré mastné kyseliny sú nenasýtené a ľahko podliehajú oxidácii, pri ktorej sa tvorí veľa prchavých zápachajúcich zlúčenín. Oxidácia mastných kyselín vzdušným kyslíkom sa nazýva autooxidácia a zvyčajne ju označujeme ako tuchnutie tukov. Na papier sa pri sušení pôsobí horúcim vzduchom, neskôr je papier vystavený vzdušnému kyslíku pri skladovaní a používaní. V dôsledku uvedených vplyvov z tukov v papieri vznikajú zápachajúce látky.

Autooxidácia je veľmi komplikovaná radikálová reťazová reakcia. Reakcia začína na uhlíkovom atóme v susedstve dvojitej väzby a oxidácia končí rozštiepením uhlíkového reťazca pôvodnej mastnej kyseliny za vzniku menších a ľahšie prchavých zlúčenín. Rozštiepenie vzniká v blízkosti pôvodnej násobnej väzby. Typické nenasýtené mastné kyseliny v dreve sú kyselina linolová (C18:2), olejová (C18:1) a linolénová (C18:3), možno preto očakávať vznik zlúčenín z počtom uhlíkových atómov 3 až 9. Takéto zlúčeniny boli dokázané pri analýze prchavých látok z papiera, konkrétne acetón, butanal, pentanol, pentanal, hexanal, 2-hexenal, heptanal, 2-heptenal, oktanal, nonanal. Niektoré z uvedených zlúčenín majú prah citlivosti na úrovni niekoľkých ppb a vyskytujú sa aj v stuchnutých jedlých tukoch, čo sa prejavuje typickým zápachom. Alifatické aldehydy majú rôzny zápach, niektoré nepríjemný, niektoré sú bez zápachu, niektoré majú ovocnú vôňu^{1,7,8}.

V ihličnanoch sa nachádzajú najmä tieto živičné kyseliny – pimarová, palustrová, levopimarová, izopimarová, abietová, dehydroabietová, neoabietová. V rôznych ihličnatých drevinách bolo identifikovaných viac ako 20 rôznych mastných kyselín, nasýtené, s jednou dvojitou väzbou, s dvomi aj tromi nenasýtenými väzbami. Ich dĺžka je väčšinou v rozmedzí C16–C22, ale boli zistené aj kyseliny s kratším (C10–C14) a dlhším (C24–C30) reťazcom. V pomerne veľkých množstvách sa nachádzajú kyselina olejová (C18:1(9)), linolová (C18:2(9,12)) a 5,9,12-oktadekatriénová (C18:3(5,9,12)). Menšie množstvá boli stanovené v prípade kyseliny palmitovej (C16:0) a stearovej (C18:0). Existujú však rozdiely v obsahu mastných kyselín v závislosti od ročného obdobia. V smrekovom dreve boli zistené kyseliny s kratšími reťazcami na začiatku leta a vzrast kyseliny linolénovej (C18:3) v zimnom období⁹.

Značná časť mastných kyselín sa v listnatých drevinách nachádza viazaná vo forme triglyceridov, najčastejšie

sú to kyselina linolová, stearová, palmitová, linolénová.

Oxidáciu nenasýtených mastných kyselín katalyzujú niektoré kovové ióny, napr. železa, medi a mangánu, ktoré prejavujú katalytickú aktivitu už pri koncentráciách, v ktorých sa vyskytujú vo vodných systémoch pri výrobe buničín. Je dôležité uvedomiť si, že oxidácia mastných kyselín pokračuje aj po ukončení výroby papiera. Preto sa intenzita zápachu aj jeho charakter mení pri skladovaní papiera.

Najjednoduchšie vyriešenie problémov so zápachom spôsobeným extraktívnymi látkami je ich odstránenie. Žiaľ, nie je to ľahká úloha. Veľká časť extraktívnych látok sa vyskytuje v parenchymatických bunkách, čo sťažuje pôsobenie chemických látok na túto frakciu. Extraktívne látky sa tiež vyskytujú ako rozpustené a koloidné zložky a môžu byť aj nalepené na vláknoch. Kombinácia dokonalého prepierania a následného odstránenia jemného podielu môže byť účinné, avšak ťažko akceptovateľné z environmentálneho hľadiska.

Keďže niektoré kovové ióny majú silný katalytický vplyv na reakcie spôsobujúce tvorbu zápachajúcich látok, použitie chelatačných činidiel (napr. EDTA) je veľmi efektívne. Kovové ióny strácajú katalytický efekt vplyvom chelatačných činidiel, ktoré majú priaznivý vplyv aj bez následného premývania.

Ďalšími chemikáliami, ktoré chránia tuky voči oxidácii, sú antioxidanty. Tieto však nedokážu reparovať už poškodené tuky. Niektoré testované antioxidanty zlepšili senzორické vlastnosti papiera. Aj keď bol efekt pomerne malý, tento spôsob je zaujímavý kvôli nízkym cenám antioxidantov. Niektoré antioxidanty sa používajú ako prídavky do potravín, preto ich použitie pri papieri nebráni použitiu takto modifikovaného papiera na balenie potravín.

Prídavné látky sú popri mikrobiologickej aktivite a degradácii extraktívnych látok tretím hlavným zdrojom zápachu v papieri. Známym problémom je rozklad škrobu. Uvádza sa, že aj prostriedky na zníženie penivosti spôsobujú zápach. Pri výrobe papiera si treba uvedomiť, že prídavné látky sa môžu v papieri rozkladať, preto pri jeho hodnotení je možné robiť závery až po určitej dobe skladovania. Medzi ďalšie zápachajúce látky, ktoré vznikajú pri výrobe buničín a papiera, patria prchavé sírne organické zlúčeniny (TRS – total reduced sulphur) a terpény. K zlúčeninám typu TRS patria najmä sulfán, metylmercaptán, dimetylsulfid a dimetyldisulfid, ktoré sa uvoľňujú do okolia pri sulfátovom spôsobe výroby buničín.

Stanovenie zápachajúcich látok nie je jednoduchou záležitosťou. Moderné analytické metódy posunuli riešenie problému značne dopredu. Na analýzy sa používajú vzorky rôznych matric, zlúčeniny spôsobujúce zápach sa zisťujú v ovzduší (najmä v skladových priestoroch produktov), alebo sa ich prítomnosť sleduje vo vzorkách produktov, či odpadových vodách a výluhoch. Prístrojové merania je vhodné spájať so stanovením zápachu panelom posudzovateľov, ktorí posúdia pach stanovených zlúčenín. Stanovenie pachu, ako prídavný faktor, je bezrozmerné, no na porovnanie sa zvykne uvádzať v jednotkách zápachu (odour units – ou). Vzorky ovzdušia sú zachytávané

v špeciálne upravených sorbentoch podľa druhu analyzovaných zlúčenín, alebo sa využíva extrakcia plynnou fázou (headspace), keď sa prchavé zlúčeniny zo vzoriek (buničina, papier, odpadová voda) zachytávajú v špeciálnej sklenenej tube a priamo uvoľnený plyn je podrobený inštrumentálnej analýze. K najviac používaným technikám patrí plynová chromatografia v kombinácii s plameňovoionizačným detektorom (GC-FID) pre prchavé organické zlúčeniny (VOC) aj karboxylové kyseliny alebo hmotnostným detektorom (GC-MS) pre VOC a extraktívne látky. Častou metódou, najmä na stanovenie karbonylových zlúčenín, je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), kde sa aldehydy a ketóny analyzujú vo forme príslušných 2,4-dinitrofenylhydrazónov. Reakcia aldehydov a ketónov s 2,4-dinitrofenylhydrazínom sa s výhodou používa k ich selektívnemu oddeleniu od ostatných skupín látok, ale aj k ich súčasnému nakoncentrovaniu, čo je veľmi výhodné pri identifikácii aj stanovení stopových množstiev karbonylových zlúčenín^{10–15}.

Cieľom práce bolo analyzovať vybrané zápachujúce látky v kondenzáte z výroby buničín (karbonylové zlúčeniny, karboxylové kyseliny) a sledovať zmeny ich koncentrácií pri pôsobení rôznych činidiel na znižovanie zápachu.

Experimentálna časť

Na analýzy bola použitá vzorka kondenzátu odobratá z prevádzky podniku na výrobu buničín. Vo vzorke boli stanovené karbonylové zlúčeniny a karboxylové kyseliny a boli sledované zmeny ich koncentrácií po úprave rôznymi činidlami s cieľom znížiť zápach kondenzátu.

Analýza karbonylových zlúčenín

Karbonylové zlúčeniny boli analyzované vo forme ich 2,4-dinitrofenylhydrazónov po vyzrážaní zo vzorky. Vyzrážané a prefiltrované 2,4-dinitrofenylhydrazóny jednotlivých aldehydov a ketónov sa vysušili v podobe malých červeno-hnedých kryštálikov pri teplote 105 °C do konštantnej hmotnosti. Zachytené karbonylové zlúčeniny sa extrahovali acetonitrilom a zahustili na odparke. Odparok sa rozpustil v roztoku veratrylaldehydu (0,01 %), ktorý slúžil ako vnútorný štandard. Takto získaný roztok sme analyzovali metódou vyso-koúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

Z 2,4-dinitrofenylhydrazónov bola pripravená štandardná modelová zmes v acetonitrile. Koncentrácia jednotlivých látok bola 0,01 µg v 1 µl acetonitrilu. Na analýzu bola použitá metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

Pri optimalizácii podmienok kvapalinovej chromatografie boli otestované rôzne izokratické aj gradientové programy separácie 2,4-dinitrofenylhydrazónov jednotlivých aldehydov a ketónov. Analýza jednotlivých zložiek ovzdušia bola vykonaná metódou kvapalinovej chromatografie za nasledovných podmienok:

Chromatograf: LiChroGraph L-6200 A (Merck-Hitachi)
Detektor: L-4250 UV-VIS a L-7455 DAD (Merck-

Hitachi)

Kolóna: ChromSpher C-18 – 150 mm × 3 mm I.D., 5 µm, (Chrompack)

Injektor: Rheodyne 7125

Prietok mobilnej fázy: 1 cm³ min⁻¹

Detekcia: VIS 365 nm, DAD 250–800 nm

Mobilná fáza:

A – voda/acetonitril/tetrahydrofurán: 60/30/10

B – voda/acetonitril: 40/60

Gradient:

0 min – 100%A

3 min – 100%A

15 min – 100%B

20 min – 100%B

25 min – 100%A

30 min – 100%A

Údaje z detektora boli vyhodnocované pomocou programu HPLC System Manager (Merck-Hitachi).

Analýza karboxylových kyselín

Karboxylové kyseliny boli analyzované metódou plynovej chromatografie na sklenenej náplňovej kolóne s priamym nástrekom za nasledovných podmienok:

Chromatograf: Chrom V (Laboratórny prístroj)

Detektor: Plameňovoionizačný (FID)

Kolóna: Chromosorb 102 (80–100 mesh), 0,35 cm × 120 cm

Nosný plyn: Dusík

Prietok nosného plynu: 48 cm³ min⁻¹

Teplota termostatu: 195 °C

Teplota injektora a detektora: 245 °C

Údaje z detektora boli vyhodnocované pomocou programu ChromCard v.1.21 (Fisons).

Výsledky a diskusia

Výber najvhodnejšieho činidla na zníženie zápachu

Na zníženie zápachu boli predbežne zvolené štyri činidlá, označené 1,2,3,4, pôvodná vzorka bola označená 0.

Z každého činidla sme pridali do 200 ml vzorky také množstvo, ktoré zodpovedalo koncentrácii 0,05 mol dm⁻³. Vzorka s činidlom sa ihneď dôkladne premiešali. K sensorickému porovnávaniu bola použitá aj vzorka kondenzátu bez prídavku činidla, pre vzájomné porovnanie všetkých vzoriek. Hlavným kritériom výberu činidla sa stalo sensorické hodnotenie potlačeného zápachu vzorky. Sensorické pozorovanie (čuchom) sme vykonali okamžite po nadávkovaní činidiel a potom priebežne až po uplynutí 60 min od prídania činidla. Bezprostredne po prídaní činidiel boli pozorované rozdiely v zápachu medzi pôvodnou vzorkou (bez činidla) a ostatnými vzorkami. Vzorky s činidlami začali nadobúdať charakteristické vône, ktoré boli vnímateľne odlišné v porovnaní s pôvodnou vzorkou.

Po uplynutí 1 hodiny od prídania činidla sa zmeny

Tabuľka I
Retenčné časy látok v zmesiach štandardov

Zlúčenina ^a	Čas [min]	
	GC-FID	HPLC
Kyselina octová	1,26	
Kyselina propiónová	2,21	
Kyselina valérová	4,19	
2-furaldehyd	5,72	
C1		1,62
C2		2,03
C3		3,05
C4		4,42
C5		6,78
C6		9,00
C7		9,97
C8		10,57
C9		11,1
C10		11,46
C11		11,87
C12		12,23

^a C1 – metanal, C2 – etanal, C3 – propanal, C4 – butanal, C5 – pentanal, C6 – hexanal, C7 – heptanal, C8 – oktanal, C9 – nonanal, C10 – dekanal, C11 – undekanal, C12 – dodekanal

zápachu ustálili a bolo možné zoradiť čínilá podľa ich účinku na zníženie zápachu vzorky. Účinok čínidiel bol odlišný, väčšinou sa zápach znížil (pri čínidle C4 došlo k jeho zvýšeniu). Pri vzorke s čínidlom C2 nebolo síce cítiť pôvodný zápach, ale výrazne dominantným sa zas stal ostro štipľavý zápach. Čínidlom C1 sa nám podarilo mierne potlačiť pôvodný zápach kondenzátu, no senzoričky pozorovaný rozdiel nebol markantný. Ako najúčinnšie sa nám ukázalo čínidlo C3. Pri čuchovom hodnotení tohto čínidla sa nepríjemný zápach najvýraznejšie potlačil, no vo vzorke však bolo cítiť zápach po kyseline octovej, čo sa potvrdilo aj chemickými analýzami. Tento zápach sme však nehodnotili ako obťažujúci.

Po senzorickej analýze zápachu sme sa zamerali na stanovenie karboxylových zlúčenín a karboxylových kyselín vo všetkých vzorkách s čínidlami ako aj v čistej vzorke.

Tabuľka II
Vplyv čínidiel na koncentráciu karboxylových kyselín v kondenzáte (mg dm⁻³)

Kyselina	0	1	2	3	4
Kyselina octová	22,84	13,05	17,38	25,34	20,35
Kyselina propiónová	13,98	6,77	9,02	8,21	7,52
Kyselina maslová	18,00	7,54	9,19	8,08	6,93

Retenčné časy sú uvedené v tabuľke I.

Výsledky stanovenia karboxylových kyselín pred a po pôsobení čínidiel na zníženie zápachu sú v tabuľke II. Kyselina valérová nebola vo vzorke kondenzátu zistená, je však možné, že sa v kondenzáte nachádzala pod limitom detekcie a aj v takejto nízkej koncentrácii mohla ovplyvňovať senzoričné vlastnosti vzoriek.

Výsledky stanovenia aldehydov pred a po pôsobení čínidiel na zníženie zápachu sú v tabuľke III. Aldehydy s počtom uhlíkov C8 až C12, ktoré boli prítomné v štandardnej zmesi, neboli zistené vo vzorkách.

Chemickými analýzami boli zistené karboxylové kyseliny (C2–C4) a aldehydy (C1–C7). Pôsobením čínidiel na zníženie zápachu došlo k poklesu množstiev kyselín vo vzorke kondenzátu, s výnimkou kyseliny octovej pri použití čínidla č. 3. Zvýšenie koncentrácie sa dalo očakávať v dôsledku rozkladu uvedeného čínidla. Koncentrácie kyseliny propiónovej a maslovej sú po pôsobení rôznych čínidiel približne rovnaké a nie je zrejme súvislosť medzi ich koncentraciami a odlišnými senzoričnými zisteniami pri použití čínidiel. Väčšie rozdiely pri pôsobení čínidiel boli zistené v množstvách aldehydov. Najväčší pokles bol pozorovaný pri čínidle č. 2, čomu však nezodpovedala senzoričná skúška.

Záverom k tejto časti možno konštatovať, že sa nepreukázala priama závislosť medzi analyzovanými látkami a senzoričným hodnotením. Môže to byť spôsobené tým, že zápach spôsobujú ďalšie látky, ktoré neboli predmetom analýzy, alebo zápach spôsobujú tie látky, ktorých koncentrácia sa síce znížila nepatrne, ale dostatočne na to, aby sa to prejavilo znížením zápachu. Ďalšou možnosťou môže byť aj zmena vzájomných koncentrácií zápachajúcich látok, ktorá môže znížiť ich synergický efekt. Na rozdiely medzi senzoričným hodnotením a výsledkami chemických analýz sa poukazuje aj v odbornej literatúre.

Výber najefektívnejšieho čínidla znižujúceho zápach a sledovanie koncentračnej aj časovej závislosti účinnosti čínidla

Ako najefektívnejšie čínidlo bolo na základe senzoričného hodnotenia zvolené čínidlo č. 3 a sledoval sa vplyv jeho koncentrácie na vzorke kondenzátu. Boli testované koncentrácie 0,1 M, 0,05 M, 0,025 M, 0,0125 M, 0,00625 M. Najlepšie výsledky boli zistené pri koncentrácii 0,05 M. Pri použití nižších koncentrácií nebolo pozorované dostatočné zníženie zápachu, vyššie koncentrácie spôsobovali sekundárny zápach.

Tabuľka III

Vplyv číndiel na koncentráciu aldehydov v kondenzáte (mg dm⁻³)

Aldehyd ^a	0	1	2	3	4
C1	0,17	0,14	0,42	0,37	0,12
C2	1,55	0,96	0,09	0,94	1,31
C3	0,66	0,08	0,30	0,60	0,51
C4	0,25	0,04	0,27	0,23	0,21
C5	0,16	0,29	0,06	0,29	0,06
C6	0,15	0,07	0,07	0,11	0,08
C7	0,18	0,05	0,18	0,05	0,04

^a C1 – metanal, C2 – etanal, C3 – propanal, C4 – butanal, C5 – pentanal, C6 – hexanal, C7 – heptanal

Tabuľka IV

Vplyv času pôsobenia 0,05 M činidla č. 3 na koncentráciu karboxylových kyselín v kondenzáte (mg dm⁻³)

Kyselina	Čas [min]				
	0	10	20	30	110
Kyselina octová	65,54	257,04	246,72	232,47	149,03
Kyselina propiónová	25,82	21,80	20,65	19,10	14,04
Kyselina maslová	24,62	20,45	18,85	18,19	13,40

Optimálna koncentrácia bola sledovaná aj v časovej závislosti a to sensorickým hodnotením aj chemickými analýzami. V tomto prípade sa ukázala lepšia závislosť medzi sensorickým hodnotením a chemickými analýzami ako pri pôsobení jednotlivých číndiel. Výsledky chemických analýz sú uvedené v tab. IV aV.

Z výsledkov vyplýva, že pôsobením činidla č. 3 dochádza k zníženiu karboxylových kyselín (s výnimkou kyseliny octovej) v závislosti od času pôsobenia. Mierne zvýšenie koncentrácií kyseliny propiónovej a maslovej po 60 minútach pôsobenia môže byť spôsobená oxidačným pôsobením činidla na mastné kyseliny v kondenzáte a postupným vznikom oxidačných produktov. Sensorické hodnotenie však nevykazovalo zvýšenie zápachu ani po 60 minútach pôsobenia a ani v dlhšom časovom intervale (niekoľko dní).

Pri pôsobení činidla č. 3 došlo k zníženiu množstva niektorých aldehydov vo vzorke kondenzátu v závislosti od času, niektoré v prvej etape pôsobenia zvýšili svoju koncentráciu, pravdepodobne v dôsledku štiepenia mastných kyselín. Podobne možno vysvetliť aj vzrast aldehydov v neskorších etapách pôsobenia, na sensorické hodnotenie to však nemalo negatívny vplyv.

Tabuľka V

Vplyv času pôsobenia 0,05 M činidla č. 3 na koncentráciu karboxylových zlúčenín v kondenzáte (mg dm⁻³)

Zlúčenina ^a	Čas pôsobenia [min]				
	0	10	20	30	110
C1	0,20	0,39	0,41	0,34	0,60
C2	1,31	1,01	0,92	0,83	1,19
C3	0,62	0,52	0,44	0,43	0,70
C4	0,22	0,22	0,16	0,18	0,27
C5	0,21	0,11	0,07	0,08	0,13
C6	0,16	0,13	0,09	0,11	0,16
C7	0,20	0,16	0,07	0,13	0,14

^a C1 – metanal, C2 – etanal, C3 – propanal, C4 – butanal, C5 – pentanal, C6 – hexanal, C7 – heptanal

Záver

Eliminácia pachov pri výrobe buničiny a papiera je problém pretrvávajúci niekoľko rokov, až desaťročí. Uzavretím cyklu výroby sa vo vysokej miere vyriešilo obťažovanie obyvateľstva v okolí celulózok a papieri. Zlúčeniny vznikajúce rôznymi pochodmi pri výrobe a skladovaní však stále v podstatnej miere spôsobujú komplikácie pri používaní papierenských výrobkov, najmä na potravinárske účely. V príspevku sú prezentované výsledky práce, kde boli analyzované dve skupiny zápachajúcich látok (karboxylové kyseliny a aldehydy) a boli sledované ich reakcie na rôzne číndlá. Najlepší účinok bol pozorovaný pri činidle č. 3, kde bol zaznamenaný pokles koncentrácií analyzovaných zlúčenín aj sensorické vylepšenie pachu.

Táto práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/0490/09.

LITERATÚRA

1. Wiik K., Helle T.: <http://www.chemeng.ntnu.no/research/paper/Publications/1998/eucepa-98.pdf> 14.03.2010.
2. Wiik K., Gromsrud M., Helle T.: <http://www.chemeng.ntnu.no/research/paper/Publications/1998/cppa98.pdf> 14.03.2010.
3. <http://www.patentstorm.us/patents/6849158-fulltext.html> 14.03.2010.
4. <http://www.pfi.no/datablad/new/Paper%20chemistry/Volatile%20compounds%20and%20odour%20formation.pdf> 20. 3. 2007.
5. Oyaas K.: Nordic Pulp. Paper Res. J. 17, 111 (2002).
6. http://goliath.ecnext.com/coms2/gi_0199-5120823/

- Emission-of-volatile-organic-compounds.html
14.03.2010.
7. Holmback J., Pranovich A., Auer M., Holmbom B.: http://www.tappsa.co.za/archive3/Journal_papers/Influence_of_knotwood/influence_of_knotwood.html 14.03.2010.
 8. Oyaas K.: "Factors affecting fatty acid oxidation and odour formation during TMP production" *Tappi Journal* 2, 25 (2003).
 9. Holmback J., Pranovich A., Auer M., Holmbom B.: http://www.tappsa.co.za/archive3/Journal_papers/Influence_of_knotwood/influence_of_knotwood.html 14.03.2010.
 10. Nykänen J.: <http://www.joensuu.fi/biologia/enste/Vuosikirja/2005/Jenni%20Nykanen.pdf> 20. 3. 2007.
 11. Rodbotten M., Wiik K., Helle T.: <http://www.chemeng.ntnu.no/research/paper/Publications/1997/ppq1.pdf> 14.03.2010.
 12. Wiik K., Rodbotten M., Bakken T., Helle T.: <http://www.chemeng.ntnu.no/research/paper/Publications/1997/ppq2.pdf> 20. 3. 2007.
 13. Makowski M., et al.: *Holzforschung* 59, 519 (2005).
 14. <http://www.docstoc.com/docs/26709375/Analysis-of-Samples-for-Odour-Volatile-Sulphur-Compounds-Volatile> 14.03.2010.
 15. Pugh S., Guthrie J. T.: *Cellulose* 7, 247 (2000).

APLIKACE DYNAMICKÉ MIKROEXTRAKCE JEDNOU KAPKOU PRO ANALÝZU BYLINNÝCH SILIC

**KAREL VENTURA,
PETRA PAVLÍKOVÁ, ALEŠ EISNER
a MARTIN ADAM**

*Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10 Pardu-
bice, Česká republika
Karel.Ventura@upce.cz*

Úvod

Silice jsou velmi rozmanitou skupinou látek. Jednotná definice jejich chemické podstaty je proto dosti složitá. Lze říci, že silice jsou komplexní směsi těkavých organických sloučenin, které jsou obsaženy v rostlinách. Vyskytují se prakticky ve všech jejich částech (květy, plody, listy, stonky, kořeny ...). Skládají se především z terpenových sloučenin (monoterpeny a seskviterpeny). Tyto sloučeniny však většinou nemají významný vliv na aroma a chuť silic, což je způsobeno tím, že nositelem těchto vlastností jsou hlavně kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, estery atd.)^{1,2}.

Vliv silic na lidské zdraví je známý již mnoho let. Lidé využívali mnoho druhů bylin a koření k léčení různých nemocí (např. satirejka působí proti křečím a průjmům, levandule má protizánětlivý a analgetický účinek, meduňka je používána proti kašli, pelyněk pro zažívání, atd.)³.

Běžně používané metody pro izolaci silic z rostlin jsou destilace s vodní parou, lisování či extrakční metody. Avšak vzhledem k tomu, že silice jsou těkavé sloučeniny, je možné je analyzovat po zakoncentrování z plynného prostoru nad vzorkem, tzv. headspace⁴. K tomuto účelu se

jako perspektivní jeví metoda mikroextrakce jednou kapkou (single-drop microextraction – SDME), a to jak ve statickém, tak případně i v dynamickém provedení.

SDME je proces založený na ustavování rovnováhy mezi vzorkem, headspace prostorem a povrchem kapky vhodného extrakčního rozpouštědla, které je v případě dynamického provedení kontinuálně doplňováno. Získaný extrakt obsahující zachycené sloučeniny je pak přímo nastříknut do nástřikového portu plynového chromatografu bez nutnosti zařazení desorpčního kroku^{5,6}. Pro identifikaci jednotlivých sloučenin je možné použít metodu standardního přídatku, popř. hmotnostní detektor.

Hlavními cíli této studie byla optimalizace experimentálních podmínek dynamickou mikroextrakcí jednou kapkou (dLPME) z headspace prostoru a dosažení výsledky porovnat s hodnotami získanými klasickou technikou destilace s vodní parou, což je metoda prováděná dle normy ČSN ISO 6571 (cit.⁷).

Experimentální část

Zkoumané vzorky byly extrahovány z plynného prostoru nad vzorkem, tzv. headspace (HS), technikou dLPME. Používána byla GC mikrostřikačka HAMILTON Microliter 701 o objemu 10 μ l (Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko). Před samotnou extrakcí byly vzorky nejprve 30 minut temperovány v termostatu při teplotě 70 °C. Byl používán termostat Julabo EC-5 (Julabo Labor-technik, Seelbach, Německo).

Pro nalezení vhodných sloučenin k charakterizaci různých druhů bylin metodou HS-dLPME s následnou analýzou na plynovém chromatografu a ke stanovení kvantitativního zastoupení těchto složek v různých druzích bylin byly použity vzorky ze soukromých zahrádek

Tabulka I
Charakteristika sledovaných sloučenin

Sloučenina	Teplota varu [°C]	Hustota [g cm^{-3}]	Mol. hmotnost [g mol^{-1}]	Sumární vzorec
α -Pinen	156-158	0,858	136,24	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
Myrcen	167	0,793	136,24	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
1,4-Cineol	173	0,900	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
Limonen	176-177	0,843	136,24	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
Eukalyptol	176-177	0,924	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
Kamfor	204	0,990	152,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$
Menton	207-210	0,893	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
Borneol	208	1,001	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
Mentol	216	0,890	156,27	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$
Nerol	225-230	0,877	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
Thymol	232	0,965	150,22	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$

z oblasti Pardubic sklizené v průběhu roku 2009. Všechny vzorky byly rozděleny na jednotlivé části (květ, list, nať) a usušeny při laboratorní teplotě. Skladovány byly na temném místě v tmavých lahvích v lednici (při cca 4 °C). Analýze byly podrobeny listy a květy šalvěje lékařské (*Salvia officinalis* L.) a levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* L.). Standardy analyzovaných sloučenin, jejichž přehled je v tab. I, v čistotě převyšující 90 % byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR).

Extrakce složek silic metodou dLPME byly prováděny v termostatu při 70 °C bezprostředně po temperaci vzorku. Na hrotu mikrostříkačky byla vytlačena kapka o velikosti 2 µl *p*-xylynu, která byla vždy po 90 s doplněna o 1 µl čerstvého rozpouštědla, a to až do celkové spotřeby 5 µl *p*-xylynu. Pro stabilizaci procesu byly před extrakcí ke vzorku přidány 3 µl *p*-xylynu.

Pro metodu destilace s vodní parou, která byla prováděna dle normovaného postupu, bylo 20 g sušené byliny destilováno s 300 ml destilované vody, přičemž sledované sloučeniny byly zachytávány do vrstvy 1 ml *p*-xylynu. Destilace byla prováděna po dobu 4 hodin. Z rozdílu objemů organické fáze před a po destilaci byl zjištěn celkový objem silic ve vzorku.

Získané extrakty byly analyzovány na plynovém chromatografu Hewlett-Packard 5890 (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA) s plamenovým ionizačním detektorem na kapilární koloně Ultra 2 o rozměrech 25 m × 0,32 mm, film 0,52 µm fenylmethylsilikon (HPST s.r.o., Praha, ČR). Podmínky GC analýzy byly následující: teplota nástřiku 250 °C, teplota FID detektoru 250 °C, nosný plyn dusík (čistota 4,6, Linde Gas a.s. Praha, ČR) o přetlaku na hlavě kolony 50 KPa) a s děličem toku v poměru 1:10. Teplotní program byl následující: počáteční teplota 55 °C, po 6 min nárůst rychlostí 6 °C min⁻¹ do 120 °C, nárůst rychlostí 20 °C do 250 °C a tato teplota byla 5 min udržována konstantní. Vyhodnocování jednotlivých silic bylo prováděno metodou standardního přídatku, pomocí nějž byla nejen potvrzena přítomnost sledovaných sloučenin, ale i provedena kvantitativní analýza jednotlivých silic.

Výsledky a diskuse

Cílem této studie bylo optimalizovat jednotlivé extrakční podmínky pro aplikaci techniky mikroextrakce jednou kapkou v dynamickém provedení pro stanovení zastoupení rostlinných silic, dosažené výsledky porovnat s normovanou metodou využívající destilaci složek silic s vodní parou a zhodnotit tak použitelnost zvolené mikroextrakční techniky pro tento typ analýz.

Nejprve byla provedena optimalizace jednotlivých extrakčních parametrů, jakými jsou volba extrakčního rozpouštědla a jeho objemu, způsob a rychlost obnovování mikrokapky extrakčního rozpouštědla, teplota extrakce a množství vzorku.

V souladu s normovanou metodou pro stanovení obsahu silic v bylinách založenou na destilaci s vodní parou

byl jako extrakční rozpouštědlo zvolen *p*-xylen. Vzhledem k velikosti použité mikrostříkačky (10 µl) a k předchozím zkušenostem se statickým provedením mikroextrakce jednou kapkou (SDME) byl pro extrakci silic z headspace zvolen objem 2 µl *p*-xylynu.^{8,9}

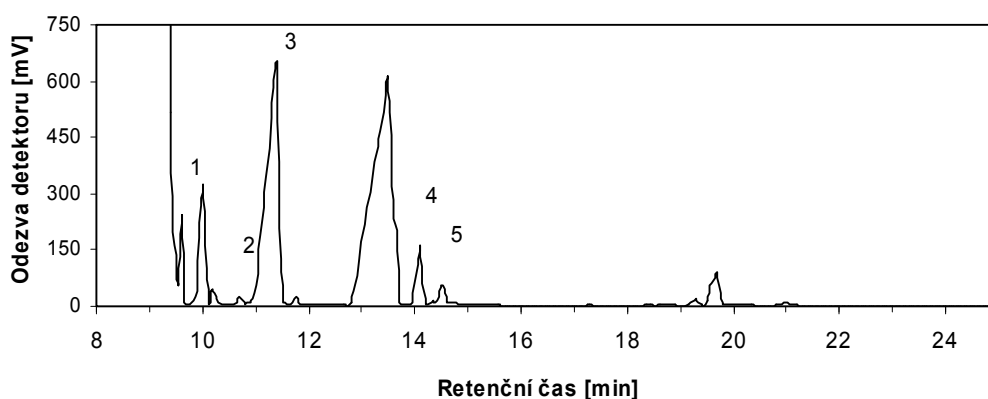
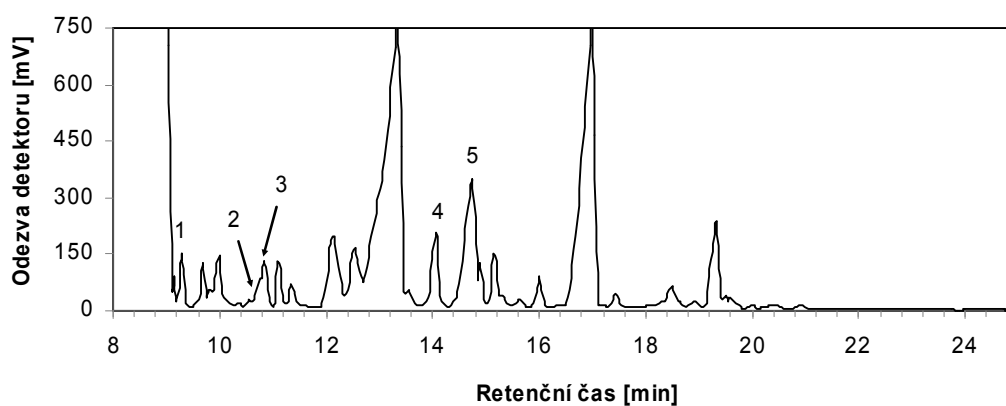
Jako dostačující množství vzorku pro analýzu bylo zvoleno 0,2 g sušené byliny do 10 ml nádoby. Toto relativně malé množství vzorku bylo vzhledem k předpokládané citlivosti metody shledáno jako dostatečné, avšak je třeba předpokládat, že se snižujícím se množstvím vzorku je třeba věnovat větší pozornost odběru dostatečně reprezentativního vzorku a zajistit tak přijatelnou reprodukovatelnost dosažených výsledků.

Při předchozích experimentech s metodou SDME, kdy bylo 70 °C vyhodnoceno jako vhodná extrakční teplota, byla tato teplota zkoumána i při dynamickém provedení. Při této teplotě bylo sledováno postupné odpařování 2 µl kapky *p*-xylynu, přičemž každých 90 s byla kapka vtažena zpět do mikrostříkačky a odečten zbývající objem *p*-xylynu. Bylo zjištěno, že rychlost odpařování *p*-xylynu při daných podmínkách je téměř konstantní, přičemž během 90 s dojde k odpaření cca 1 µl. V následujících experimentech bylo zjišťováno celkové množství *p*-xylynu vhodného pro izolaci sledovaných sloučenin z bylin. Při extrakci byl počáteční objem 2 µl *p*-xylynu každých 90 s navyšován o 1 µl čerstvého rozpouštědla. Bylo zjištěno, že až do celkového objemu 5 µl *p*-xylynu bylo možné pozorovat nárůst celkového množství zachycených složek silic. Při vyšších objemech však docházelo k poklesu koncentrace sledovaných sloučenin v kapce, což lze pravděpodobně vysvětlit narůstajícím množstvím *p*-xylynu odpařeného přímo do headspace prostoru vzorkovací nádoby, kde pak dojde k rozpouštění silic i mimo extrakční kapku. Celkové množství 5 µl *p*-xylynu bylo tedy shledáno jako postačující a bylo použito pro všechny následující extrakce.

Optimalizované podmínky byly následně aplikovány na reálné vzorky bylin uvedených v experimentální části. Jednalo se konkrétně o listy šalvěje lékařské a květy levandule lékařské. Chromatogramy dLPME extraktů obou vzorků jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Vyhodnoceny byly i meze detekce (LOD) jednotlivých sloučenin pro danou metodu. Bylo zjištěno, že tyto hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,10 (eukalyptol) do 164,07 (thymol) µg/100 g. Poměrně velký rozdíl v hodnotách LOD je dán těkavostí jednotlivých sloučenin, která tak přímo souvisí s koncentrací dané sloučeniny v headspace prostoru.

Oba zmíněné vzorky byly pro srovnání analyzovány i s využitím metody destilace s vodní parou prováděnou v souladu s normovaným postupem. Dosažené výsledky včetně příslušných hodnot reprodukovatelnosti vyjádřených jako relativní směrodatné odchylky (RSD) jsou shrnuty v tab. II a III. Všechny experimenty byly prováděny třikrát ($n=3$).

Z tabulky II je patrné, že u vzorku šalvěje lékařské byl největší obsah zjištěn u eukalyptolu, a to pro obě použité metody. Dále byly v listech šalvěje lékařské identifikovány borneol, α -pinen, kamfor a 1,4-cineol. Obsahy

Obr. 1. Chromatogram extraktu šalvĕje; 1 – α -pinen, 2 – 1,4-cineol, 3 – eukalyptol, 4 – kamfor, 5 – borneolObr. 2. Chromatogram extraktu levandule lékařské; 1 – α -pinen, 2 – limonen, 3 – eukalyptol, 4 – kamfor, 5 – borneol

Tabulka II

Obsah silic ve vzorcích šalvĕje lékařské ($n=3$)

Složka silice	dLPME		Destilace s vodní parou	
	mg/100 g ^a	RSD [%]	mg/100 g ^a	RSD [%]
α -Pinen	22,80	0,9	14,09	19
1,4-Cineol	0,77	15	0,71	9,1
Eukalyptol	130,55	16	58,78	8,0
Kamfor	16,61	2,9	7,56	10
Borneol	27,11	6,1	13,66	11

^a Výsledky vyjadřovány jako hmotnost dané sloučeniny ve 100 g sušené byliny

ostatních sledovaných sloučenin uvedených v experimentální části byly pod hodnotami meze detekce pro danou sloučeninu.

Jak je uvedeno v tabulce III, v květech levandule lékařské byl zjištěn nejvyšší obsah borneolu a kamforu, a to opět oběma použitými metodami. V menším množství se vyskytovaly eukalyptol, limonen a α -pinen. Ostatní

Tabulka III
Obsah silic ve vzorcích levandule lékařské ($n=3$)

Složka silice	dLPME		Destilace s vodní parou	
	mg/100 g ^a	RSD [%]	mg/100 g ^a	RSD [%]
α -Pinen	1,84	15	0,58	15
Limonen	1,40	9,0	1,29	8,7
Eukalyptol	2,24	16	4,64	1,2
Kamfor	44,92	8,7	16,60	2,9
Borneol	210,17	4,5	43,60	0,7

^a Výsledky vyjadřovány jako hmotnost dané sloučeniny ve 100 g sušené byliny

sledované sloučeniny byly opět shledány pod hodnotami detekčních limitů.

Jak lze z obou tabulek vyzorovat, jsou obě použité metody, tedy dLPME a destilace s vodní parou, srovnatelné z hlediska kvalitativního zastoupení sledovaných sloučenin. Obě metody jsou přibližně srovnatelné i z hlediska reprodukovatelnosti, což lze chápat i jako důkaz, že 0,2 g vzorku použitého pro metodu dLPME je množství dostatečně reprezentativní.

Z hlediska kvantitativního obsahu sledovaných sloučenin lze ve výsledcích pozorovat značné odlišnosti, které jsou však dány především odlišnými mechanismy obou zkoumaných metod. Tyto rozdíly se nepodařilo eliminovat ani použitím stejného záchytného rozpouštědla u obou metod, kterým byl *p*-xylen. Dalším rozdílem obou metod je jejich různá citlivost. V neposlední řadě mohou být odlišné výsledky zapříčiněny i tím, že se jedná o tuhé a ne úplně homogenní vzorky, ve kterých je problematické sledované sloučeniny správně kvantifikovat.

Závěr

Moderní extrakční technika mikroextrakce jednou kapkou v dynamickém provedení (dLPME) ve spojení s metodou plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) byla použita pro analýzu složek silic v bylinách. Jednalo se konkrétně o levanduli lékařskou a šalvěj lékařskou. Nejdříve byla provedena experimentální optimalizace jednotlivých extrakčních parametrů. Nalezené podmínky byly následně aplikovány na extrakci silic z reálných vzorků bylin. Na základě kvalitativního a kvantitativního zastoupení složek silic u jednotlivých vzorků bylin lze říci, že jednotlivé metody mají různou selektivitu a citlivost vůči stanovovaným silicím. Metoda dLPME není zcela selektivní pouze pro silice, proto je nutné se orientovat ve složitějších, a tedy hůře přehledných chromatogramech. Na základě získaných výsledků lze říci, že vyvinutá mikroextrakční metoda může být vhodnou alternativou ke klasické metodě destilace s vodní parou pro stanovení bylinných silic. Mezi její hlavní přednosti patří především rychlost provedení,

která je ve srovnání s destilací s vodní parou trvající 4 hodiny výrazně kratší.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantových projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502)

LITERATURA

1. Velíšek J.: in: *Chemie potravin 2*. Osssiss, Tábor 2002.
2. Hálková J., Rumišková M., Riedlová J., v: *Analýza potravin*. Vydavatel RNDr. Ivan Straka, Újezd u Brna 2000.
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: *Food Chem. Toxicol.* 46, 446 (2008).
4. Fakhari A.R., Salehi P., Heydari R., Ebrahimi S.N., Haddad P.R.: *J. Chromatogr., A* 1098, 14 (2005).
5. Jeannot M.A., Cantwell F.F.: *Anal. Chem.* 68, 2236 (1996).
6. Jeannot M.A., Cantwell F.F.: *Anal. Chem.* 69, 235 (1997).
7. ČSN ISO 6571: *Stanovení obsahu těkavých olejů (silic)*, (červen 1995).
8. Adam M., Dobiáš P., Eisner A., Ventura K.: *J. Sep. Sci.* 31, 356 (2008).
9. Adam M., Dobiáš P., Pavlíková P., Ventura K.: *Cent. Eur. J. Chem.* 7, 303 (2009).

Souhrn

Byla navržena analytická metoda založená na mikroextrakci jednou kapkou v dynamickém provedení (dLPME) s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie s plamenovým-ionizačním detektorem (GC-FID) pro stanovení vybraných složek bylinných silic. Uvedená metoda byla po optimalizaci jednotlivých experimentálních parametrů aplikována na vybrané vzorky bylin a dosažené výsledky byly zhodnoceny a porovnány s normovanou metodou založenou na destilaci s vodní parou.

ANALÝZA AKRYLAMIDU VO VYBRANÝCH ODRÔDÁCH ZEMIAKOV METÓDOU PLYNOVEJ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNOU DETEKCIOU

MIRIAM VLČÁKOVÁ a MICHAELA VIERIKOVÁ

*Štátny Veterinárny a Potravinový ústav, Jánoškova
1611/58, 026 01 Dolný Kubín, Slovenská republika
vierikova@svpuudk.sk*

Kľúčové slová: akrylamid, GC/MS/MS, kultivar

Abstrakt

Hlavným mechanizmom vzniku akrylamidu je reakcia voľnej aminokyseliny asparagínu s karbonylovými zlúčeninami (napr. glukóza a fruktóza) ako súčasť Maillardovej reakcie, najmä pri vyššej teplote (120 °C) a to počas tepelnej úpravy istého typu potravín ako lupienky, hranolky, placky, cereálne produkty, káva a pod. Cieľom práce bolo zmonitorovať obsah akrylamidu v zemiakových hranolkách, pripravených zo 16 kultivarov zemiakov pestovaných na území SR. Selekcioiu kultivarov s nízkym obsahom sacharidov a so správnym pomerom glukózy a fruktózy, ale aj s dodržaním technologických podmienok pri zbere, skladovaní a spracovaní zemiakov¹⁰ možno dosiahnuť nižší obsah akrylamidu vo finálnom výrobku. Hranolky boli fritované pri teplote 170 °C, do dosiahnutia zlatožltej farby. Koncentrácia akrylamidu bola stanovená metódou plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS/MS). Obsah akrylamidu varioval od 381–2755 $\mu\text{g kg}^{-1}$ v závislosti od kultivaru.

Úvod

Akrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) je biela kryštalická látka s molekulovou hmotnosťou 71,08. Je rozpustný vo vode, acetóne a etanole, má vysokú mobilitu v pôde a podzemných vodách, je biodegradovateľný¹⁸. Akrylamid môže byť potenciálne prítomný v životnom prostredí ako dôsledok antropogénnych, ale aj prirodzených procesov. Je zložkou cigaretového dymu, čo indikuje jeho tvorbu počas zohrievania biologických materiálov¹⁹. Akrylamid sa v žiadnej forme nepridáva do potravín, a teda jeho prítomnosť v potravinách má iný pôvod. Môže to byť jednak kontamináciou z vonkajšieho prostredia, kontaktom s obalovými materiálmi, alebo čo sa ukázalo ako najpravdepodobnejšie, samotným vznikom akrylamidu počas tepelnej úpravy potravín. Za hlavný mechanizmus jeho vzniku je všeobecne považovaná reakcia medzi voľnou geneticky kódovanou neesenciálnou aminokyselinou asparagí-

nom a karbonylovými zlúčeninami ako súčasť Maillardovej reakcie, ktorá patrí medzi najvýznamnejšie a zároveň najrozšírenejšie chemické reakcie počas skladovania a spracovania potravín^{15,20}. Akrylamid môže vzniknúť termicky indukovanou dekarboxyláciou asparagínu na 3-aminopropánamid s následnou deamináciou zo samotného asparagínu, pričom nevyhnutná je prítomnosť redukujúcich sacharidov pre efektívnu konverziu asparagínu na akrylamid²¹. Rýchlosť jeho tvorby je aproximovaná z bimolekulárnych reakcií glukózy, respektíve fruktózy s asparagínom^{3,1}. Ketosacharidy (fruktóza) sú efektívnejšie v tvorbe akrylamidu pri relatívne nízkej teplote a nízkej vlhkosti v porovnaní s aldosačaridmi (glukóza). Fruktóza je dvakrát reaktívnejšia ako glukóza a dokonca 15× reaktívnejšia ako laktóza⁵. Sacharóza ako neredukujúci sacharid neprispieva k tvorbe akrylamidu v niektorých potravinách, napr. v medovníkoch². Zemiaky majú síce relatívne vysoký obsah asparagínu (38–40 % z celkového obsahu voľných aminokyselín), ale jeho koncentrácia je relatívne konštantná^{13,8}. Väčší zásah do potenciálnej tvorby akrylamidu umožňuje regulácia obsahu redukujúcich sacharidov. Nižší obsah akrylamidu v zemiakových výrobkoch môže byť dosiahnutý selekciou kultivarov s nízkym obsahom sacharidov a so správnym pomerom glukózy a fruktózy, ale aj s dodržaním technologických podmienok pri zbere, skladovaní a spracovaní zemiakov¹⁰. Kultivary zemiakov s nízkym obsahom redukujúcich sacharidov majú aj nízky potenciál tvorby akrylamidu. Vplyvom skladovania dochádza k významnej zmene. Zníženie teploty pod 8 °C má za následok drastický nárast potenciálnej tvorby akrylamidu spôsobený prudkým nárastom obsahu redukujúcich sacharidov^{7,11,17}. Ďalším technologickým krokom na odstránenie asparagínu a sacharidov z povrchu očistených zemiakov je blanžirovanie a premývanie v horúcej alebo v studenej vode^{14,20}. Teplotný režim spracovania výrobkov je takisto dôležitý, pretože tvorba akrylamidu sa začína pri teplote nad 100 °C a s rastúcou teplotou v rozmedzí 120 až 210 °C sa zvyšuje, ale zároveň stúpa aj rýchlosť degradácie⁵. To znamená, že niektoré vzorky obsahujú viac akrylamidu pri vysokých teplotách, zatiaľ čo iné naopak. Kvalita oleja, t.j. oxidácia oleja a hydrolyza oleja nemajú žiadny vplyv na tvorbu akrylamidu¹⁶. Fyzikálny nástroj ako znížiť obsah tvorby akrylamidu do 95 % je použitie nízko-teplotného vyprážacieho vákuového systému pre zemiakové lupienky¹².

Materiál a metodika

Z 16 druhov zemiakových odrôd (tabuľka I), ktoré boli náhodne vybrané, boli pripravené hranolky.

Tabuľka I
Popis jednotlivých odrôd zemiakov

Odrôda	Popis jednotlivých odrôd zemiakov
ROSARA	Skorá odroda stredného až pevného varného typu, podlhovastého tvaru s červenou šupkou a žltou dužinou. Obsah škrobu v hľuzách je okolo 13%.
AGRIA	Stredne skorá odroda s drsnou žltou až žltouhnedou šupkou a sýtožltou dužinou. Obsah škrobu v hľuzách je okolo 16-18%.
MONACO	Veľmi skorá nová odroda, žltá dužina šalátovej chuti.
BACARA	Skorá žltušupká odroda so žltou dužinou. Obsah škrobu v hľuzách je okolo 13%.
MARANCA	Stredne skorá odroda so žltou šupkou a svetložltou dužinou. Obsahuje nižšie percento škrobu.
MARABEL	Stredne skorá odroda s hladkou šupkou a žltou dužinou. Obsah škrobu v hľuzách je okolo 14%.
PRINCESS	Skorá odroda so žltou šupkou a žltou dužinou. Obsah škrobu v hľuzách je nízky.
ANDANTE	Stredne skorá odroda s veľmi hladkou a jemnou šupkou, žltou dužinou.
RED ANNA	Stredne skorá červenošupká odroda s tmavožltou farbou dužiny. Obsah škrobu v hľuzách je na úrovni 14%.
LAURA	Stredne skorá odroda s hladkou šupkou a tmavožltou dužinou.
MARKIES	Stredne neskorá odroda, má žltú stredne drsnú šupku a žltú dužinu.
AGATA	Veľmi skorá odroda s hladkou žltou šupkou. Obsah škrobu v hľuzách je na úrovni 14%.
RAFAELA	Stredne skorá odroda s hladkou šupkou.
IMPALA	Veľmi skorá odroda s hladkou žltou šupkou a svetložltou dužinou. Obsah škrobu v hľuzách je 12-14%.
VERA	Veľmi skorá odroda s hladkou žltou šupkou a žltou dužinou.
SOLARA	Stredne skorá odroda so žltou šupkou a žltou dužinou. Obsahuje vyššie percento škrobu.

Tabuľka II
Doba fritovania zemiakových hranoliek

Doba fritovania	ROSARA	AGRIA	MONACO	BACARA	MARANCA	MARABEL	PRINCESS	ANDANTE	RED ANNA	LAURA	MARKIES	AGATA	RAFAELA	IMPALA	VERA	SOLARA
t, min	10,28	8,22	4,30	7,44	12,10	6,32	8,21	15,10	5,00	10,00	12,10	3,12	4,39	5,18	7,49	12,41

Hranolky boli nakrájané na 1cm hrúbku a boli fritované pri 170 °C do zlatožlta. V tabuľke II je doba v minútach potrebná na dosiahnutie zlatožltej farby.

Na stanovenie akrylamidu v hranolkách bola použitá metóda plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou.

Do odmerného valca sa naváži zhomogenizovaná vzorka. Pridá sa vnútorný štandard D₃ akrylamid a redestilovaná voda a 10 min sa mixuje na Ultraturaxe. Obsah sa preniesie do polypropylénovej centrifugačnej skúmavky a 10 min sa centrifuguje pri 23 000 x g. Supernatant sa prefiltruje cez filter Whatman GF/A. Pridá sa KBr, ktorý mie-

šaním rozpustíme. Upraví sa pH na 1–3 koncentrovaným HBr, potom sa pridá nasýtená brómová voda a zamieša sa. Vzorka sa vloží do ľadového kúpeľa v tme a nechá sa reagovať 1 hodinu. Prebytok brómu sa odstráni pridaním 1 M Na₂S₂O₃ · H₂O opatrne po kvapkách až do odfarbenia. Pridá sa vyžihávaný Na₂SO₄, krúživým pohybom sa opatrne zamieša tak, aby vzniknutá zrazenina ostala neporušená. Roztok sa prevedie do 250 ml deliaceho lievika a extrahuje sa 2× octanom etylnatým. Organická fáza sa presuší cez vrstvu bezvodého Na₂SO₄ a filter sa premyje octanom etylnatým. Spojené organické fázy sa odparia do sucha na

Tabuľka III

Parametre nastavenia iónov akrylamidu a vnútorného štandardu akrylamidu D₃

Analyt	Rodičovský ión [m/z]	RT [min]	Produkovaný ión [m/z]	CID RF [m/z]	CID Volt [V]
Akrylamid	152	11,08	135	48	20
D3-akrylamid	155	11,08	137	48	20

rotačnej vákovej odparke (RVO). Rezíduá sa rozpustia v octane etylnatom. Takto pripravené rezíduá vzoriek sú injektované „on column“ do GC/MS/MS systému.

Teplotný program kolóny CP Sil 24 CB LOW BLEED/MS izotermicky 2 min pri 55 °C, potom 17,5 °C min⁻¹ do 220 °C, držať pri 220 °C 2 min, 30 °C min⁻¹ do 270 °C a izotermicky 3 min. Teplotný program injektora 0,2 min pri 65 °C, potom 150 °C min⁻¹ do 220 °C, izotermicky 10 min 220 °C a schlaďiť na 65 °C. Nástrek je 1 µl. Analýza je prevedená použitím elektrónovej ionizácie 70 eV a selektívneho iónového monitoringu. Identifikácia analytov je prevedená sledovaním rodičovských iónov a kvantifikácia analytov sledovaním produkovaných iónov podľa tabuľky III.

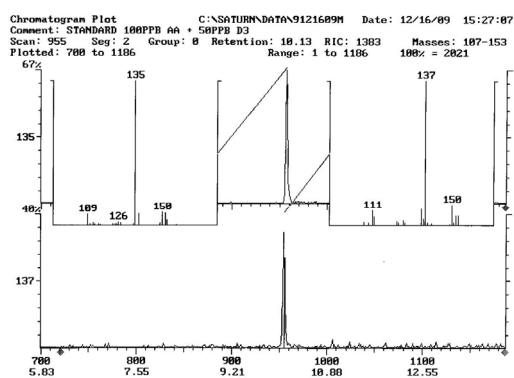
Výsledky a diskusia

Obsah akrylamidu v zemiakových hranolkách bol analyzovaný plynovou chromatografiou s hmotnostnou detekciou po bromácii akrylamidu. Použitá metóda je akreditovaná SNAS a validovaná podľa nariadenia 2002/657/EC. Správnosť metódy bola overená účasťou v medzinárodných laboratórnych porovnávacích testoch s úspešnosťou z-score do 1. Chromatografický záznam štandardu akrylamidu (koncentrácia 100 µg l⁻¹) + vnútorný

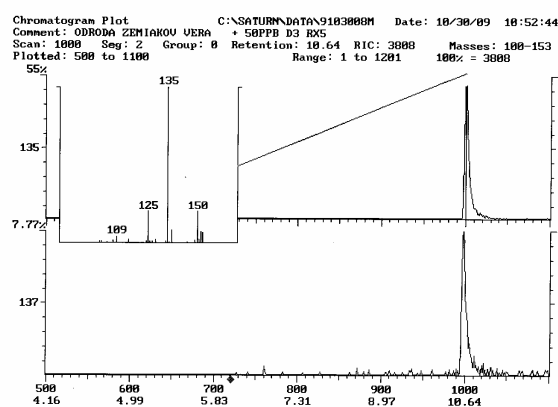
štandard akrylamidu D₃ (koncentrácia 50 µg l⁻¹) je na obr. 1 a vzorky zemiakových hranoliek odrody VERA je na obr. 2.

Výsledky nameraných hodnôt akrylamidu v jednotlivých typoch zemiakových hranoliek sú v tab. IV.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že na obsah akrylamidu výrazne vplýva odroda zemiakov, z ktorých sú hranolky vyrobené. Koncentrácia akrylamidu sa pohybovala v rozmedzí 381–2755 µg kg⁻¹. Na výrobu zemiakových hranoliek sú vhodné najmä odrody Maranca, Impala, Rosara, Monaco, Agata, Andante a Marabel, kde sa namerané hodnoty akrylamidu pohybovali v rozmedzí 500 až 600 µg kg⁻¹. V súčasnosti ešte nie je stanovený maximálny reziduálny limit akrylamidu v jednotlivých potravinových komoditách. Opatrenia zamerané na zníženie obsahu akrylamidu vo vybraných komoditách majú len odporúčací charakter. Od roku 2007 členské štáty Európskej únie monitorujú hladiny akrylamidu, z dôvodu ustanovenia maximálneho reziduálneho limitu. Prehľad nameraného obsahu akrylamidu v zemiakových hranolkách, ktoré boli pripravené z rôznych odrôd zemiakov, môže v budúcnosti pomôcť výrobcom pri výbere vhodných odrôd zemiakov. Doba fritovania nemala vplyv na tvorbu akrylamidu z dôvodu, že všetky hranolky boli fritované do dosiahnutia zlatožltej farby.



Obr. 1. Chromatografický záznam štandardu akrylamidu (koncentrácia 100 µg l⁻¹) + vnútorný štandard akrylamidu D₃ (koncentrácia 50 µg l⁻¹)



Obr. 2. Chromatografický záznam vzorky odrody VERA; koncentrácia akrylamidu 1680 µg kg⁻¹ + vnútorný štandard akrylamidu D₃ o koncentracii 50 µg l⁻¹

Tabuľka IV
Namerané hodnoty akrylamidu v jednotlivých odrodách zemiakov

Odroda zemiakov	ROSARA	AGRILA	MONACO	BACARA	MARANCA	MARABEL	PRINCESS	ANDANTE	RED ANNA	LAURA	MARKIES	AGATA	RAFAELA	IMPALA	VERA	SOLARA
Akrylamid, $\mu\text{g kg}^{-1}$	524	1283	535	1347	381	605	1677	577	687	2755	1153	556	1074	392	1680	868

Záver

Na stanovenie obsahu akrylamidu v zemiakových hranolkách bola použitá metóda plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou. Na analýzu sa použilo 16 rôznych odrôd zemiakov, z ktorých boli pripravené zemiakové hranolky. Z výsledkov analýz vyplýva, že obsah akrylamidu výrazne závisí od zvolenej odrody zemiakov, ktoré sa použijú na výrobu hranoliek a doba fritovania nemá vplyv na tvorbu akrylamidu z toho dôvodu, že všetky hranolky boli fritované do dosiahnutia zlatožltej farby.

LITERATÚRA

- Amrein T. M., Bachmann S., Noti A., Biedermann M., Barbosa M. F., Biedermann-Brem S., Grob K., Keiser A., Realini P., Escher F., Amado R.: *J. Agr. Food Chem.* 51, 5556 (2003).
- Amrein T. M., Schönbacher B., Escher F., Amado R.: *J. Agr. Food Chem.* 52, 4282 (2004).
- Biedermann M., Noti A., Biedermann-Brem S., Mozzetti V., Grob K.: *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93, 668 (2003).
- Biedermann M., Grob K.: *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 94, 406 (2003).
- Biedermann M., Biedermann-Brem S., Noti A., Grob K.: *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93, 653 (2002).
- De Wilde T., De Meulenaer B., Mestdagh F., Govaert Y., Vandenberghe S., Ooghe W., Fraselle S., Demeulemeester K., Van Peteghem C., Calus A., Degroodt J.-M., Verhé R.: *J. Agr. Food Chemistry* 53, 6550 (2005).
- De Wilde T., De Meulenaer B., Mestdagh F., Verhé R., Govaert Y., Fraselle S., Degroodt J.-M., Vandenberghe S., Demeulemeester K., Calus A., Ooghe W., Van Peteghem C.: *Czech J. Food Sci.* 22, 15 (2004).
- Doyle E.: Reported free asparagine levels in foods: January 2003.
- EPA – Method 8032A, Acrylamide by Gas Chromatography, December 1996.
- Friedman M.: *J. Agr. Food Chem.* 51, 4504 (2003).
- Noti A., Biedermann – Brem S., Biedermann M., Grob K., Albisser P., Realini P.: *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 94, 167 (2003).
- Granda C., Moreira R.G., Tichy S.E.: *J. Food Sci.* 69, E405 (2004).
- Granvogl M., Jezussek M., Koehler M., Schieberle P.: *J. Agr. Food Chem.* 52, 4751 (2004).
- Grob K., Biedermann M., Biedermann – Brem S., Noti A., Imhof D., Amrein T. M., Pfefferle A., Bazzocco D.: *Eur. Food Res. Technol.* 217, 185 (2003).
- JIFSAN: Acrylamide in food Workshop, Chicago, April (2004)
- Mestdagh F., Meulenaer B., Petghem C., Cromphout C., Thas O.: *Czech J. Food Sci.* 22, 11 (2004).
- Olsson K., Svensson R., Roslund C.-A.: *J. Sci. Food Agr.* 84, 447 (2004).
- OSHA Method PV2004, Acrylamide; OSHA Analytical Methods, (pp 12). Salt Lake City, UT, US: U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, OSHA Analytical Laboratory. www.osha.gov (1991).
- Smith C. J., Perfetti T. A., Rumble M. A., Rodgman A., Doolittle D. J.: *Food Chem. Toxicol.* 38, 371 (2000).
- Weisshaar R.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 786 (2004).
- Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M., Tallmadge M., Eberhart B. L., Ewald D. K., Gruber D. C., Morsch T. R., Strothers M. A., Rizzi G. P., Villigram M. D.: *J. Agr. Food Chem.* 52, 4782 (2003).

ANALYSIS OF CONTENT COMPOUNDS IN EXTRACTS OF *ECHINACEA PURPUREA*

JANA ZEMANOVÁ, JAN MICHALÍČEK
and EVA VÍTOVÁ

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry,
Department of Food Chemistry and Biotechnologies, Pur-
kyňova 118, Brno, CZ-612 00, Czech Republic
zemanova@fch.vutbr.cz

Introduction

In this study, high-performance liquid chromatography was used for a quantitative determination of caffeic acid and its derivatives including chlorogenic acid, cichoric acid and echinacoside as the content compounds present in the alcoholic extracts of *Echinacea* species^{1,2}.

To the most significant *Echinacea* species belong *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* and *Echinacea pallida*. Their importance lies in^{1,2}:

- the content of a wide range of effective compounds such as alkamides, caffeic acid derivatives, polyacetyles and polyenes, polysaccharides and flavanoids
- *Echinacea* species show antioxidative, antibacterial, antiviral and antifungal properties. More recently, *Echinacea* has been studied even as an inhibition of HIV replication.
- *Echinacea* occupies a fundamental place between herbal plants that have been more and more used in a treatment of various diseases.

Material and Methods

In the experimental part, the determination of the total compounds content and echinacoside content in *Echinacea* extracts was made. The extracts were produced by pressurized solvent extraction (PSE) from *Echinacea purpurea* under various conditions³. Chemically pure standards of chlorogenic acid, cichoric acid, caffeic acid and echinacoside have been chosen as those compounds, whose content was determined in available *Echinacea* extracts.

Pressurized solvent extraction was used to prepare extracts from leaves, blooms and roots of *Echinacea purpurea*. Two mixtures of ethanol and water in different ratios were used as solvent systems in combination with three temperatures at a constant pressure to show the influence of temperature and a solvent composition on the amount of extracted compounds.

The first solvent system (ethanol/water = 60/40, v/v) was tested at 40, 60 and 80 °C as well as the second sol-

vent system (ethanol/water = 40/60, v/v). For the extraction, 0.5 g of a dry plant material was used. The process ran under the pressure of 15 kPa in two cycles over a period of 2×10 minutes. The system was rinsed with nitrogen for 20 seconds between each cycle and 2 minutes after the last cycle. Volume of a cartridge filled with a sample and an inert support was 11 ml.

In this way, 12 samples were prepared. The next procedure of samples adjustment was identical with a preparation of *Echinacea* products. The extracts were filtered through Nylon microfilters (0.45 μm) and diluted up to 6-times depending on their individual concentrations. Prepared samples were injected for HPLC analysis^{4,5}. Analyses were performed using Supelcosil™ LC-18-DB column (25 cm \times 4.6 mm; 5 μm) that was heated to 35 °C in a column oven. Isocratic elution was run using a mixture of methanol and water in a ratio of 25:75 with an addition of 1 % of acetic acid as a mobile phase. Flow rate was set at 1.0 ml min⁻¹ and the injection volume was 10 μl . Chromatograms were recorded at the wavelength of 330 nm chosen on the base of an absorption spectrum measurement of the caffeic acid standard solution. Detection at 330 nm showed the highest absorption of the solution, therefore this wavelength was used for the analyses.

Every morning, a pump was rinsed with the mobile phase until all bubbles of the air were removed. Then the whole chromatography system was rinsed for 15 minutes before the analyses. Between the individual analyses, the system was rinsed for 5 minutes. All analyses were made three-times.

Results and Discussion

Samples marked with the index a in the Fig. 2–4 were extracted in solvent containing 60 % of ethanol and 40 % of water, while samples marked with the index b (Fig. 2–4) were extracted in a mixture consisted of 40 % of ethanol and 60 % of water. Marks A, B, C (Fig. 1) describe root extracts and marks D, E, F (Fig. 1) describe leaves and blooms extracts of *Echinacea purpurea*.

It is obvious that the most concentrated samples were obtained when extracting at 80 °C (samples C, F, Fig. 1). It holds for root extracts as well as for leaves and blooms extracts independently on the solvent composition. Looking at the solvent composition, a higher content of water was more propitious (samples C2, F2, Fig. 1).

When extracting at 40 °C and 60 °C, conclusion is not so evident. Temperature of 40 °C was more suitable for the solvent system with 60 % of water in the case of roots (A1, A2, Fig. 1). For leaves and blooms, it is better to use more alcoholic solvent (D1, D2, Fig. 1).

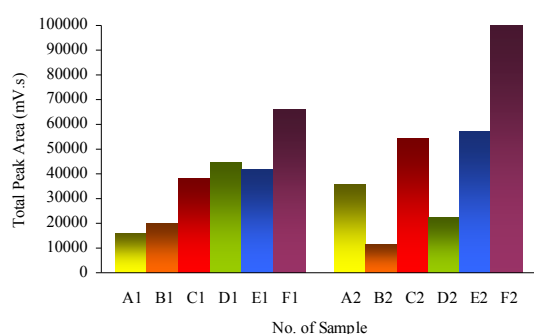


Fig. 1. Comparison of a Total Compounds Content in PSE Extracts

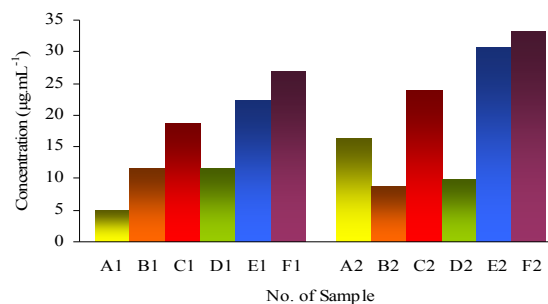
The opposite situation happened at 60 °C, when more alcoholic solvent was better for root extraction (B1, B2, Fig. 1), but not for extraction of leaves and blooms (E1, E2, Fig. 1).

Generally, when comparing the total content of the effective compounds in the root and leaf-bloom extracts, more compounds were extracted from the aerial part of the plant. From Fig. 1, it is clear that the temperature influence is much higher in the case of solvent with 60 % of water than when using the mixture with 60 % of ethanol.

The highest content of echinacoside was found in the leaf-bloom extract prepared at 80 °C in the solvent system composed of 40 % of ethanol and 60 % of water (sample F2, Fig. 2). When using ethanol/water = 40/60, high echinacoside amounts with small differences were observed in the individual leaf-bloom extracts prepared at 60 °C and 80 °C (samples E2, F2, Fig. 2). Generally, higher tempera-

ture showed better results than lower one. Extraction of roots gave the highest content of echinacoside running in ethanol/water = 40/60 as a solvent system at 80 °C (sample C2, Fig. 2). There the echinacoside content was remarkably different compared to the other root extracts, except of sample C1 (Fig. 2) in which the similar concentration of echinacoside was found.

Values of the peak areas of the content compounds and concentrations of echinacoside are shown in Tab. I.



index 1 - EtOH/water = 60/40
 index 2 - EtOH/water = 40/60
 A - root extracts, 40°C
 B - root extracts, 60°C
 C - root extracts, 80°C
 D - leaf-bloom extracts, 40°C
 E - leaf-bloom extracts, 60°C
 F - leaf-bloom extracts, 80°C

Fig. 2. Comparison of Echinacoside Content in PSE Extracts

Table I
 Overview of Echinacoside Content in PSE Extracts and Total Peak Areas

Sample Number	Dilution	Total Peak Area [mV s]	Echinacoside	
			Peak Area [mV s]	Concentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]
A1	0	15868.322	190.985	4.912
A2	2	17769.944	390.749	16.307
B1	2	10034.719	242.392	11.492
B2	2	5743.634	158.650	8.774
C1	2	19294.878	467.080	18.785
C2	2	27312.370	625.770	23.935
D1	2	22213.820	243.927	11.542
D2	2	11205.463	192.730	9.881
E1	4	10404.479	231.683	22.290
E2	4	14229.277	362.776	30.799
F1	4	16581.200	301.112	26.796
F2	6	16633.959	230.118	33.282



Fig. 3. **Echinacea extracts** (40 °C; K = roots; LK = leaves, blooms ; a = EtOH/water = 60/40; b = EtOH/water = 40/60)

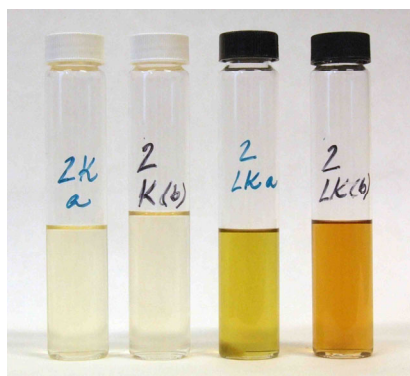


Fig. 4. **Echinacea extracts** (60 °C; K = roots; LK = leaves, blooms; a = EtOH/water = 60/40; b = EtOH/water = 40/60)

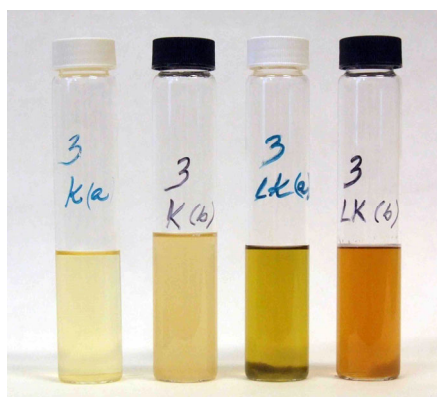


Fig. 5. **Echinacea extracts** (80 °C; K = roots; LK = leaves, blooms; a = EtOH/water = 60/40; b = EtOH/water = 40/60)

In Fig. 3, 4, and 5, there are Echinacea extracts showing visible color differences indicating various concentrations of compounds released from the herbal drug. Sam-

ples labeled LK have a more expressive color indicating the presence of leaves and blooms pigments.

Conclusion

The determination of the total compounds content and echinacoside content in *Echinacea* extracts was made. The extracts were produced by pressurized solvent extraction from *Echinacea purpurea* under various conditions.

Following conditions were found as the optimal:

- Extraction at 80 °C and 15 kPa using a mixture of ethanol/water (40/60, v/v) as a solvent system gave the most concentrated samples at all.
- Extraction at 60 °C and 15 kPa using a mixture of ethanol/water (40/60, v/v) as a solvent system is proper for a leaf and bloom material, while root material is better to be extracted in ethanol/water (60/40, v/v).
- When extracting at 40 °C and 15 kPa using a solvent system of ethanol/water (40/60, v/v), more concentrated samples were obtained from roots. In the case of leaves and blooms, it is good to use ethanol/water (60/40, v/v).
- The highest content of echinacoside was observed in the root extracts as well as leaf-bloom extracts prepared in ethanol/water = 40/60 at 80 °C and 15 kPa.

Isocratic method applied to the separation of the individual compounds in the real samples was showed to be unsatisfactory. The determination of the components by high-performance liquid chromatography using a gradient elution can be a base for the next study.

REFERENCES

1. Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L.H., Molgaard, P.: *Food Chem.* 101, 74 (2007).
2. Dalby-Brown, L., Barsett, H., Landbo, A.-K.R., Meyer, A.S., Molgaard P.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 9413 (2005).
3. Vrchotová, N., Kužel, S., Tříška, J., Kolář, L., Totušek, J.: *Chem. Listy* 96, 636 (2002).
4. Glowniak, K., Zgorzka, G., Koryza, M.: *J. Chromatogr., A* 730, 25 (1996).
5. Lee, M.-H., Lin, Ch.-Ch.: *Food Chem.* 105, 223 (2007).

ZMĚNY CHUTNOSTI SÝRŮ EIDAMSKÉHO TYPU BĚHEM ZRÁNÍ

EVA VÍTOVÁ, EVA HÝSKOVÁ, RADKA MOKÁNOVÁ a JANA ZEMANOVÁ

*Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno
evavitova@post.cz*

Eidamské sýry patří do skupiny přírodních tvrdých sýrů s nízkodohřivanou sýřeninou. Mají jemnou, nepřliš slanou chuť a ve srovnání s jinými typy sýrů velmi jemnou (téměř nezatelnou) vůni. Barva eidamu je nažloutlá, přílišná bledost ukazuje na nedostatečnou zralost¹. V ČR patří tyto typy sýrů mezi spotřebitelé k nejoblíbenějším. Obsah tuku v sušině bývá 40 nebo 45 %, Eidam s nižším obsahem tuku (20 či 30 %) je považován za české specifikum. Charakteristické organoleptické vlastnosti sýra, tj. vzhled, barva, chuť a vůně (chutnost) a konzistence, jsou výsledkem správně provedených technologických operací a správně probíhajících mikrobiologických procesů. Během výroby sýrů podléhají všechny složky mléka řadě fyzikálně-chemických a biochemických změn, především v procesu zrání sýr získává svou výslednou strukturu, vůni a chuť. K nejrozsaáhlejším změnám patří proteolytické reakce, jejichž intenzita závisí na celé řadě faktorů, mezi nimiž důležité místo zaujímá délka zrání². Doba zrání eidamu se pohybuje od 4 do 12 týdnů^{1,3}.

Cílem této práce bylo sledovat změny organoleptických vlastností sýrů eidamského typu během procesu zrání. Byly testovány vzorky eidamského salámového polotvrdého sýra (50 % sušina, 30 % tuk v sušině) vyrobeného společností MILTRA B s. r. o. Městečko Trnávka. Vzorky byly odebírány od ukončení výroby v týdenních intervalech až do plné zralosti, kdy se sýry expedují. Vzhled, vůně, chuť a textura sýrů byly hodnoceny senzoričky pomocí 5-bodové ordinální stupnice. Pro doplnění byl proveden ještě profilový test, kde se hodnotila intenzita vybraných deskriptorů chuti (mléčně kyselá, hořkomandlová, sladká, sýrová, hořká) a vůně (mléčně kyselá, hořkomandlová) taktéž podle 5-bodové intenzitní stupnice. Senzorické hodnocení probíhalo ve specializované senzoričce laboratoři. Jako hodnotitelé byly použiti studenti a zaměstnanci FCH VUT v Brně.

Charakteristická chuť sýrů je výsledkem rovnováhy celé řady aromaticky aktivních látek (AAL) vznikajících především v průběhu zrání. Z chemického hlediska se jedná o těkavé sloučeniny zahrnující alkoholy, aldehydy, ketony, nižší mastné kyseliny, estery, laktony, terpeny a další. Dalším cílem této práce bylo sledování vývoje identifikovaných AAL během zrání sýrů. AAL byly stanoveny metodou solid-phase microextraction ve spojení s plynovou chromatografií (SPME-GC)⁴.

Významné změny ($P < 0,05$) organoleptických vlastností se většinou projeví až po 2–3 týdnech zrání, v této

fázi se již plně rozbíhají proteolytické změny uvnitř sýra. Vzhled vzorků sýra se v průběhu zrání měnil pomalu. Na počátku zrání bylo na řezu sýra patrné bílé jádro, které během zrání s pokračující proteolýzou mizí. Zralé eidamské sýry mají mít tuhé, světle žluté těsto s malými nepravidelnými oky. Celkový vzhled a barva sýrů v pozdějších fázích zrání byly hodnoceny jako charakteristické a velmi dobré.

U vůně nebyla během zrání zaznamenána statisticky významná změna ($P < 0,05$). Vůně sýrů eidamského typu je velmi jemná a její intenzita se významně nezvyšuje ani v pozdějších fázích zrání. Na počátku byla některými hodnotiteli identifikovaná slabá tvarohová vůně.

Chuť sýrů byla zpočátku hodnocena jako kyselá, málo sýrová a nevýrazná, až v poslední fázi zrání se objevuje charakteristická, jemně oříšková, typicky sýrová a slaná chuť. Celkově byly vzorky hodnoceny jako velmi dobré a chutné. Paradoxně se některým hodnotitelům zralé sýry zdály již příliš aromatické na eidamský sýr, což svědčí o tom, že konzervativní český spotřebitel preferuje sýry méně výrazné chutnosti. Během zrání sýrů se mohou vyskytnout i různé senzoričké vady, typickým příkladem je hořká chuť. Je způsobena zpravidla peptidy s 2–25 aminokyselinami, které existují v kaseinovém komplexu a při jejich odštěpení se projeví jejich hořkost. V některých případech se počáteční hořkost při dalším zrání ztratí, důvodem je pokračující proteolýza, kdy hořké peptidy jsou dále degradovány na menší peptidy nebo aminokyseliny, které již hořkou chuť nemají². U našich vzorků hořká chuť nebyla detegována, což svědčí o správném průběhu proteolýzy.

V hodnocení textury byla uváděna především výrazná tuhost, což může souviset s nízkým obsahem tuku v sýrech. Tuk zůstává i ve zralých sýrech nerozložen a ovlivňuje konzistenci, ale i zlepšuje chuť sýra. Kucukoner⁵ ve své studii zabývající se fyzikálně-chemickými a reologickými vlastnostmi u různých tučných eidamských sýrů zjistil, že nízkotučný sýr je tužší a gumovitější než plnotučný.

Pomocí metody SPME-GC bylo ve vzorcích sýra identifikováno celkem 30 AAL. Z kvantitativního hlediska byly nejvýznamnější: acetoin, acetaldehyd, butan-2,3-dion (biacetyl), ethanol, kyselina octová a 2-methylpropan-2-ol. Koncentrace ostatních látek nepřesáhla 1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Celkový obsah AAL se v průběhu zrání sýra podle očekávání zvyšoval, především na konci doby zrání (6 týdnů) došlo k významnému ($P < 0,05$) nárůstu. V této fázi se již plně rozbíhají proteolytické změny uvnitř sýra nutné pro tvorbu AAL, charakteristických pro typ sýra.

Celkem lze shrnout, že senzoričká kvalita sýrů se podle očekávání během zrání zlepšovala. Dochází ke změnám především ve vzhledu, barvě a chuti sýrů, nejprve zvolna, po 2–3 týdnech zrání rychleji. Vzhledem k typu

sýra a především s ohledem na nízký obsah tuku v sušině (30 %) lze očekávat konečnou chutnost jemnou a nepřilíš výraznou⁶. Obsah AAL se během zrání sýra zvyšoval. Některé látky přechází do sýra z použitého mléka, část vzniká během výroby, většina z nich se však tvoří až v poslední fázi zrání. S tím souvisí vývoj organoleptických vlastností sýra, u většiny z nich se projeví statisticky významné změny ($P < 0,05$) až po 2–3 týdnech zrání. Charakteristická chutnost sýrů v plné zralosti odpovídá nalezenému vysokému obsahu AAL. Vzorky byly expedovány po necelých 2 měsících zrání a už v této době měly charakteristickou chutnost a byly hodnoceny jako velmi dobré. Při delší době zrání se chuť a vůně sýrů dále zvyrazňuje, což už bylo hodnotiteli vnímáno jako negativní. Jelikož dlouhá doba zrání zvyšuje náklady na výrobu, je snahou výrobců tuto dobu minimalizovat. Český spotřebitel je tak zvyklý na sýry ne plně zralé, které jsou běžně dostupné na našem trhu.

LITERATURA

1. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F., in: *Encyclopedia of Dairy Science*, p. 428. London, Academic Press 2002.
2. Sousa M.J., Ardo Y., McSweeney P.L.H.: *Int. Dairy J.* 11, 327 (2001).
3. Guinee T. P., Carić M., Kaláb M., in: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, p. 349. Elsevier Applied Science, London 1997.
4. Vítová E., Loupancová B., Štoudková H., Zemanová J.: *J. Food Nutrition Res.* 46, 84 (2007).
5. Kucukoner E., Haque Z.U.: *Eur. Food Res. Technol.* 217, 281 (2003).
6. Ritvanen T., Lampolahti S., Lilleberg L., Tupasela T., Isoniemi M., Appelbye U., Lyytikainen T., Eerola S., Uusi-Rauva E.: *Food Qual. Prefer.* 16, 479 (2005).

POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ HPLC METOD NA STANOVENÍ METANEFRINU A NORMETANEFRINU Z MOČE A Z KREVŇÍ PLAZMY VZHLEDEM K DIAGNOSTICE TUMORU FEOCHROMOCYTOMU

ALICE VRÁNKOVÁ, TEREZA ŠKRAMLÍKOVÁ, JIRÍ WIDIMSKÝ jr., JAN ŠKRHA a ZDENA JÚZOVÁ

Laboratoř endokrinologie a metabolismu ÚKBLD a III. Interní kliniky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, U Nemocnice 1, 128 21 Praha 2, Česká Republika
alice.vrankova@vfn.cz

Úvod

Stanovení katecholaminů a jejich *O*-methylmetabolitů, zejména metanefrinu (MN) a normetanefrinu (NMN), je užitečné v diagnostice tumoru chromafinních buněk feochromocytomu (FEO). Tento typ nádoru syntetizuje, ukládá a metabolizuje katecholaminy a většinou je také vylučuje. Proto je možné zvýšené koncentrace katecholaminů a jejich metabolických produktů v moči a v plazmě využít jako diagnostické markery tohoto typu nádoru¹. Nadprodukce katecholaminů nádorem vede u většiny pacientů k zvýšení krevního tlaku, proto podezření na FEO vzniká převážně u pacientů s hypertenzí. Existuje více různých druhů (fenotypů) FEO. Fenotyp adrenergní produkující převážně adrenalin, resp. jeho metabolit MN, fenotyp noradrenergní produkující převážně noradrenalin, resp. NMN, a fenotyp smíšený sekretující ve zvýšené míře oba analyty současně. V případě adrenergního fenotypu FEO mívají pacienti spíše hypotenzi (nízký krevní tlak), případně normotenzi (normální krevní tlak) a k výkyvům tlaku do vysokých hodnot dochází záchvatovitě².

Stanovení metanefrinů je často upřednostňováno před stanovením katecholaminů. Jedním z důvodů preference metanefrinů jako markerů FEO je kontinuální produkce těchto látek nádorovou buňkou na rozdíl od katecholaminů, které jsou produkovány jen periodicky. Také je zapotřebí si uvědomit, že katecholaminy jsou normálně produkovány sympatoadrenomedulárním systémem, a nejsou tedy specifické pro FEO. Rovněž bylo zjištěno, že u pacientů s FEO pochází převážná část nadprodukce NMN a MN v plazmě z metabolismu katecholaminů v dřeni nadledvin, nikoli z nádorových buněk. Toho se využívá zejména u takových typů FEO, jejichž nádorové buňky katecholaminy neprodukují. Zde se stanovením metanefrinů zamezí vzniku falešně negativních výsledků³. Metanefriny také nejsou ovlivněny případným stresem pacienta (např. při odběru krve) tolik, jako katecholaminy. Nárůst koncentrace metanefrinů u pacientů s FEO přibližně odpovídá velikosti nádoru².

Nejvíce používanou metodou pro stanovení NMN a MN v plazmě i v moči je HPLC s elektrochemickou

detekcí (ED)^{4–8}. Metanefriny z moče je možné stanovit rovněž pomocí HPLC s fluorescenčním (FLD), nebo s UV detektorem. V literatuře se často hovoří také o kapilární elektroforéze v kombinaci s posledně jmenovanými typy detekce^{9–13}. Uvedené typy detektorů je možné použít z toho důvodu, že koncentrace NMN a MN v moči se pohybuje v řádu nmol l⁻¹. Koncentrace metanefrinů v plazmě je přibližně 1000× nižší, proto je nezbytné vybrat citlivější detekci. Nákladnější alternativou pro stanovení metanefrinů jsou separační techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií^{7,14–16}. Další možností jsou imunochemické metody založené na reakci se značenými protilátkami^{17,18}. U imunochemických metod se poukazuje na problém zkřížených reakcí a analytických interferencí⁷, rovněž pořizovací cena imunochemických souprav je vyšší.

Cílem této práce bylo porovnat výsledky metody stanovení volných metanefrinů v plazmě pomocí HPLC-ED a metody stanovení konjugovaných metanefrinů v moči (HPLC-FLD) vzhledem k jejich schopnosti diagnostikovat FEO. Metoda stanovení metanefrinů v plazmě HPLC-ED byla validována v naší publikaci¹⁹ a její schopnost indikovat FEO zde byla porovnána s metodou, která stanovuje volné katecholaminy v moči pomocí HPLC-FLD. Výsledky z publikace plně odpovídají procesům probíhajícím v metabolismu (viz výše) a dokazují, že stanovení metanefrinů v plazmě je v diagnostice FEO oprávněně preferováno před stanovením katecholaminů v moči. Vzhledem k tomu, že vědecké studie z poslední doby vydvíhují volné metanefriny z plazmy jako vůbec nejcitlivější marker FEO^{20,21}, rozhodli jsme se pro doplnění porovnat stanovení volných metanefrinů z plazmy a konjugovaných metanefrinů z moče v této publikaci.

Experimentální část

Chemikálie

Stanovení metanefrinů v plazmě (HPLC-ED)

Standardy – NMN ((±) normetanefrin hydrochlorid), MN ((±) metanefrin hydrochlorid) a HMBA (4-hydroxy-3-methoxybenzylamin-hydrochlorid) používaný jako vnitřní standard (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA).

Chemikálie pro extrakci na pevné fázi (SPE) – hydroxid draselný (Penta, Chrudim, ČR), hydroxid amonný a dihydrogenfosforečnan amonný (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), methanol, koncentrovaná kyselina octová a voda pro chromatografii (Merck KGaA, Darmstadt, Německo).

Chemikálie pro přípravu mobilní fáze (MF) – acetonitril, voda pro chromatografii, a kyselina fosforečná (Merck, Darmstadt, Německo), oktansulfonová kyselina,

dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát a dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Stanovení metanefrinů v moči (HPLC-FLD)

Standardy – NMN ((±) normetanefrin hydrochlorid), MN ((±) metanefrin hydrochlorid) a HMBA (4-hydroxy-3-methoxybenzylamin-hydrochlorid), používaný jako vnitřní standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Chemikálie pro hydrolyzu a extrakci na pevné fázi (SPE) – pentaboritan amonný, dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), hydroxid amonný, hydroxid sodný a octan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), voda pro chromatografii, kyselina octová (Merck KGaA, Darmstadt, Německo), kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR).

Chemikálie pro přípravu mobilní fáze (MF) – methanol, voda pro chromatografii a kyselina fosforečná (Merck, Darmstadt, Německo), kyselina oktansulfonová, dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Přístroje a doplňkový materiál

Stanovení metanefrinů v plazmě (HPLC-ED)

Extrakce: čtyřriadvacetipolohový vakuový extraktor (Phenomenex, Torrance, USA), SPE kolonky obsahující iontoměnič (Varian, Palo Alto, USA), dávkovače kapalin Seripettor (Brand, Wertheim, Německo), vakuová odparka Jouan RC10.22 (Saint-Herblain, Francie).

Chromatografie: HPLC systém Agilent 1100 složený z odplyňovače G1379A, kvartérní pumpy G1311A, autosampleru G1329A, termostatu autosampleru G1330B, termostatu kolony G 1316A (Agilent Technologies, Wilmington, USA), elektrochemický (coulometrický) detektor (ESA, Chelmsford, USA), předkolona SecurityGuard [4.0×3.0 mm] a analytická kolona C18, velikost částic 5 μm, [250×4.6 mm] (Phenomenex, Torrance, USA).

Stanovení metanefrinů v moči (HPLC-FLD)

Hydrolyza a extrakce: Vodní lázeň (Falc Instruments, Treviglio, Itálie), SPE kolonky obsahující katex a anex (Bio-Rad, Mnichov, Německo), dávkovače kapalin Seripettor (Brand, Wertheim, Německo)

Chromatografie: HPLC systém Agilent 1100 složený z odplyňovače G1379A, kvartérní pumpy G1311A, autosampleru G1329A, termostatu autosampleru G1330B, termostatu kolony G 1316A, fluorescenčního detektoru G1316A (Agilent Technologies, Wilmington, USA), analytická kolona C18, velikost částic 5 μm, [100×3 mm] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Podmínky odběru vzorku

Odběr krve

Krev na stanovení plazmatických metanefrinů je odebírána na lačno pomocí kanyly a po předchozí dietě. Omezení určitých potravin a léků je zapotřebí z důvodu

možné interference při chromatografické analýze. Odběr krve se provádí vleže nebo vsedě, pacientovi se zavede kanyla a po patnáctiminutovém klidu se přistupuje k odběru. Tím se nezvyšují hodnoty analytů stresem. Po odběru je nutné co nejrychleji oddělit krvinky od plazmy centrifugací, aby se sledované látky nerozkládaly. Jako stabilizátor používáme heparin a plazmu uchováváme při –80 °C do dalšího zpracování²².

Sběr moče za 24 h

Moč na stanovení metanefrinů se sbírá po dobu 24 h do sběrné nádoby obsahující 10 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové. Kyselé prostředí zajišťuje stabilitu analytů a 24 h sběr moče lépe vyhovuje danému účelu než sběr ranní moče. Během tohoto intervalu je možné zachytit i exkreci katecholaminů při záchvatovité hypertenzi, která může nastat u pacientů s určitým fenotypem FEO, viz výše. Několik dní před sběrem a v jeho průběhu je nezbytné dodržet dietu a vyhnout se požití určité medikace z důvodu eliminace interferujících látek na chromatogramu.

Extrakce

Stanovení metanefrinů v plazmě (HPLC-ED)

Extrakční kolonky je nutné nejdříve aktivovat a promýt. To je realizováno propláchnutím kolonek roztokem 10% hydroxidu amonného a 1% hydroxidu draselného v methanolu a poté vodou. Následně je možné aplikovat vzorky plazmy spolu s vnitřním standardem (IS) 4-hydroxy-3-methoxybenzylaminem (HMBA).

Dalším krokem je promytí extrakčních kolonek roztokem 10 mmol l⁻¹ kyseliny octové v methanolu, poté 20 mmol l⁻¹ fosforečnanem amonným o pH 8,5 a nakonec vodou.

Analyty zadržené na kolonkách jsou nakonec eluovány 10% hydroxidem amonným v methanolu. Eluát je poté odpařen na vakuové odparce a odparek rozpuštěn ve 300 μl MF. 40 μl roztoku je nakonec dávkováno na kolonu kapalinového chromatografu¹⁹.

Stanovení metanefrinů v moči (HPLC-FLD)

Pro diagnostiku FEO se metanefriny z moče stanovují v konjugované formě, proto je nezbytné analyty před extrakcí nejdříve uvolnit z vazby. Vázané metanefriny se v moči vyskytují převážně jako sulfáty nebo glukuronid-metabolity²³. K vyvázání používáme kyselou hydrolyzu. Vzorky moče se nejdříve zcentrifugují, přidá se vnitřní standard a pomocí kyseliny chlorovodíkové se upraví pH na 0,7–0,9. Poté se vzorky hydrolyzují ve vodní lázni o teplotě 95–100 °C 30 min.

Na kationtové extrakční kolonky se uvede hydrolyzovaný vzorek naředěný vodou 1:1, s pH upraveným na 6–7. Současně se přidá 4% pentaboritan amonný a 0,1% EDTA. Dále se kolonky důkladně propláchnou deionizovanou vodou. Následuje přidavek 3% hydroxidu amonného. Eluát z kationtových kolonek se poté aplikuje na kolonky aniontové, které se následně propláchnou vodou. Analyty zadržené na anexu jsou eluovány 2% octanem amonným.

K eluátu se přidá 400 µl 6% kyseliny octové a 100 µl roztoku je nakonec dávkováno na kolonu kapalinového chromatografu²⁴.

Výsledky a diskuse

Porovnáním výsledků metody stanovení volných plazmatických metanefrinů (HPLC-EC) s výsledky stanovení konjugovaných močových metanefrinů (HPLC-FLD) bylo zjištěno, jak se výstupy metod shodují a zároveň byla ověřena jejich vypovídací schopnost. Obě metody stanovení metanefrinů byly zavedeny na našem pracovišti.

Spolehlivost metod byla vyjádřena diagnostickou senzitivitou a specificitou. Senzitivita je definována jako pravděpodobnost, že výsledek stanovení bude vyhodnocen jako pozitivní u nemocných, specificita jako pravděpodobnost, že výsledek bude označen jako negativní u osob bez nemoci²⁵.

Sledovali jsme správně zařazení výsledků stanovení 40 pacientů, u nichž byly metanefriny změřeny oběma metodami. Z těchto pacientů mělo 8 pacientů nádor FEO (pozitivní), zbylí pacienti prokazatelně nádor neměli (negativní). Ověření přítomnosti (nepřítomnosti) FEO bylo potvrzeno počítačovou tomografií (CT) nebo magnetickou rezonancí (MR), případně histologicky.

Při výpočtu senzitivity a specificity jsme vycházeli ze skutečnosti, že pacient musí mít zvýšenou koncentraci buď NMN nebo MN, případně obou analytů současně, aby byl zařazen jako pozitivní. Negativní pacienti (bez nádoru) nesmí mít tedy zvýšenou koncentraci NMN ani MN. Z této úvahy a z definice senzitivity a specificity jsme odvodili následné vztahy pro výpočet. Senzitivitu metod jsme vypočítali jako podíl správně pozitivních výsledků buď NMN nebo MN a správně pozitivních výsledků jednoho z těchto analytů plus falešně negativních výsledků obou z analytů. Dále jsme určili specificitu metod jako podíl správně negativních výsledků obou analytů a správně negativních výsledků obou analytů plus falešně pozitivních výsledků buď NMN nebo MN.

Metodou HPLC-ED jsme na základě stanovení NMN v plazmě správně zařadili 38 pacientů. 31 pacientů z 32 bez FEO jsme správně určili jako negativní a 7 pacientů s FEO z 8 jako pozitivní, viz tab. I. Stanovením MN jsme správně zařadili 30 z 32 pacientů bez FEO (negativní) a všech 8 pacientů s FEO jsme označili jako pozitivní. Je zapotřebí uvést, že koncentrace analytů u pacientů bez nádoru, na základě kterých byli pacienti metodou špatně zařazení jako pozitivní, byly pouze mírně zvýšené nad koncentrační hranici. Tato koncentrační mez byla stanovena v předešlé publikaci¹⁹ a rozděluje pacienty na ty, kteří mají normální hodnoty metanefrinů (bez FEO) a hodnoty zvýšené (s FEO). K tomuto mírnému nárůstu koncentrace analytů mohlo dojít například tzv. fenoménem bílého pláště. Tento fenomén může nastat vlivem rozrušení pacientů např. při odběru krve a způsobí zvýšení hladiny stre-

Tabulka I

Počet správně zařazených pacientů jednotlivými metodami z celkového počtu 40 pacientů

Správně zařazení pacienti	Stanovení volných metanefrinů v plazmě (HPLC-EC)		Stanovení konjugovaných metanefrinů v moči (HPLC-FLD)	
	NMN	MN	NMN	MN
<i>Pacienti bez FEO (n = 32)</i>				
Negativní	31	30	27	30
<i>Pacienti s FEO (n = 8)</i>				
Pozitivní	7	8	8	8

sových hormonů ve vzorku. Jeden z vyšetřovaných pacientů s FEO, který byl na základě stanovení NMN špatně zařazen jako negativní, měl adrenergní fenotyp nádoru, tedy zvýšeně produkující pouze NM. Navíc k tomu, aby byl pacient zařazen jako pozitivní, stačí zvýšená hodnota pouze jednoho z analytů, viz výše.

Metoda HPLC-FLD zařadila všech 8 pacientů s FEO jako pozitivní vyšetřením NMN i MN. V případě pacienta s adrenergním fenotypem nádoru se tedy zřejmě jedná o chybu metody. Pět pacientů bez FEO tato metoda špatně zařadila jako pozitivní na základě stanovení NMN a dva pacienty stanovením MN. Zde je opět nutné uvést, že se jednalo pouze o mírné zvýšení hodnot analytů nad koncentrační mez.

Z uvedeného jsme vypočítali senzitivitu a specificitu obou metod. Zjistili jsme, že obě metody jsou 100 % senzitivní. Specificita HPLC-EC metody stanovení metanefrinů z plazmy je 94 % a specificita HPLC-FLD metody stanovení katecholaminů z moči 80 %. Dříve publikovaná studie, která byla ovšem provedena s mnohonásobně vyšším počtem pacientů, uvádí senzitivitu a specificitu metanefrinů v plazmě 99 %, resp. 89 % a senzitivitu a specificitu metanefrinů v moči 97 %, resp. 69 % (cit.²⁰).

Závěr

Diagnostická senzitivita potvrdila vynikající schopnost obou metod spolehlivě určit pacienty s nádorem. Na základě nižší specificity, zejména u HPLC-FLD metody stanovení konjugovaných metanefrinů v moči, lze výjimečně falešně pozitivní hodnotu připustit. Jedná se pouze o mírné zvýšení koncentrace jednoho z analytů nad stanovenou mez. Z uvedených výsledků vyplývá, že obě analytické metody jsou velmi spolehlivé v diagnostice nádoru feochromocytomu.

Práce vznikla za podpory výzkumných záměrů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM 0021620807 a MSM 0021620808.

LITERATURA

1. Eisenhofer G., Walther M. M., Huynh T. T., Li S. T., Bornstein S. R., Vortmeyer A., Mannelli M., Goldstein D. S., Linehan W. M., Lenders J. W. M., Pacák K.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1999 (2001).
2. Eisenhofer G., Lenders J. W. M., Goldstein D. S., Mannelli M., Csako G., Walther M. M., Brouwers F.M., Pacák K.: *Clin. Chem.* 51, 735 (2005).
3. Pacák K.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Praha 2002.
4. Lenders J. W., Eisenhofer G., Armando I., Keiser H. R., Goldstein D. S., Kopin I. J.: *Clin. Chem.* 39, 97 (1993).
5. Roden M., Raffesberg W., Raber W., Bernroider E., Niederle B., Waldhäusl W., Gasic S.: *Clin. Chem.* 47, 1061 (2001).
6. Pagliari R., Cottet-Emard J. M., Peyrin L.: *J. Chromatogr.* 563, 23 (1991).
7. Lagerstedt S. A., O’Kane D. J., Singh R. J.: *Clin. Chem.* 50, 603 (2004).
8. Ulrychová M., Vávrová J., Palička V.: *Klin. Biochem. Metab.* 15, 218 (2007).
9. Kaplan P., Tejral M., Nentwich I.: *J. Liquid Chromatogr.* 15, 2561 (1992).
10. Guattari B.: *J. Chromatogr. Biomed. Apl.* 567, 254 (1991).
11. Sirén H., Karjalainen U.: *J. Chromatogr., A* 853, 527 (1999).
12. Vuorensola K., Sirén H.: *J. Chromatogr., A* 895, 317 (2000).
13. Baranowska I., Plonka J.: *J. Liquid Chromatogr.* 31, 2974 (2008).
14. Jong W. H. A., Graham K. S., van der Molen J. C., Links T. P., Morris M. R., Ross H. A., de Vries E. G. E., Kema I. P.: *Clin. Chem.* 53, 1684 (2007).
15. Peterson Z. D., Collins D. C., Bowerbank Ch. R., Lee M. L., Graves S. W.: *J. Chromatogr., B* 776:2, 221 (2002).
16. Crockett D. K., Frank E. L., Roberts W. L.: *Clin. Chem.* 48, 332 (2002).
17. Gao I. C., Lu H. K., Luo Q. Y., Chen L. B., Deng Y., Zhu R. S.: *Clin. Exp. Med.* 8, 87 (2008)
18. Pacák K., Aguilera B., Saban E., Kvetnansky R. (ed.): *Stress Current Neuroendocrine and Genetic Approaches*, str. 582. New York Academy of Sciences, New York 2004.
19. A. Vráňková, T. Škramlíková, J. Widimský jr., T. Zelinka, O. Petrák, R. Holaj, B. Štrauch, J. Rosa, J. Škrha, Z. Jůzová: *Chem. Listy*, k tisku.
20. Lenders J. W. M., Pacák K., Walther M. M., Linehan W. M., Mannelli M., Friberg P., Keiser H. R., Goldstein D. S., Eisenhofer G.: *J. Am. Med. Assoc.* 287, 1427 (2002).
21. Goldstein D., Eisenhofer G., Flynn J. A., Wand G., Pacák K.: *Hypertension* 43, 907 (2004).
22. Willemsen J. J., Sweep C. G. J., Lenders J. W. M., Ross H. A.: *Clin. Chem.* 49, 1951 (2003).
23. Singh R. J., Grebe S. K., Yue B., Rockwood A. L., Cramer J. S., Gombos Z., Eisenhofer G.: *Clin. Chem.* 51, 472 (2005).
24. Bio-Rad Instruction Manual-“Urinary Metanephrines by HPLC“. Bio-Rad Laboratories, Kanada, 1995.
25. <http://new.euromise.org/czech/tajne/ucebnice/html/html/node5.html>, staženo 10. prosince 2007.

A. Vráňková, T. Škramlíková, J. Widimský Jr., J. Škrha^a, and Z. Jůzová: (*3rd Internal Department, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Comparison of Results of HPLC Methods for Determination of Methanephrine and Normethanephrine from Urine and Blood Plasma Considering the Diagnosis of Tumor Pheochromocytoma**

Determination of catecholamines and their *O*-methyl metabolites normetanephrine (NMN) and metanephrine (MN), in biological fluids plays an important role in the diagnosis of pheochromocytoma (PHEO) – chromaffin cells tumor.

The aim of the study was to compare a HPLC-ED method for the determination of methanephrine and normethanephrine in blood plasma and a HPLC-FLD method for the determination of the same analytes in conjugated form from urine. Both methods interpret the results in relation to the presence of PHEO. The ability of methods to distinguish the patients with and without PHEO has been proved.

The sensitivity and specificity of methods in tumor diagnosis has been calculated. It has been shown that the sensitivity of both methods has reached 100%, the specificity of methods is lower (94% for the HPLC-ED method and 80% for the HPLC-FLD). The sensitivity shows excellent ability of both methods to recognize the patients with PHEO. Weaker specificity mainly of the HPLC-FLD method rarely admits false-positive results.

NOVÉ PRÍSTUPY KU ŠTÚDIU KINETIKY BIOSORPCIE ORGANICKÝCH FARBÍV

**LUBOŠ VRTOCH, MARTIN PIPÍŠKA,
MIROSLAV HORNÍK a JOZEF
AUGUSTÍN**

*Katedra biotechnológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2,
917 01 Trnava, Slovenská republika
lubos.vrtch@ucm.sk*

Úvod

Biosorpcia je zložitý fyzikálno-chemický jav, ktorý sa intenzívne študuje už niekoľko desaťročí. Procesy biosorpcie významne ovplyvňujú migráciu látok v životnom prostredí pričom súčasne predstavujú alternatívnu metódu ku konvenčným metódam odstraňovania toxických látok zo znečistených vôd¹. Biosorpčný proces možno študovať z dvoch hľadísk a to z hľadiska kinetiky a rovnováhy. Kinetika biosorpcie je oproti sorpčnej rovnováhe menej preskúvaná z dôvodu jej komplexného charakteru i z toho dôvodu, že rovnovážne štúdie predstavujú len limitný prípad kinetiky, keď časovo premenlivý systém prechádza do rovnováhy. Podľa súčasného stavu poznania sorpčný proces môže byť opísaný nasledujúcimi za sebou idúcimi krokmi: (i) prestup látky v objeme roztoku; (ii) difúzia látky cez kvapalinový film, ktorý je vytvorený okolo častíc sorbentu; (iii) difúzia látky v kvapaline nachádzajúcej sa v póroch sorbentu a pozdĺž stien pórov (vnútročasticová difúzia); (iv) adsorpcia a desorpcia častíc látky na/z povrchu sorbentu². Celková rýchlosť sorpcie môže byť kontrolovaná ktorýmkoľvek z vyššie spomenutých krokov, pričom je možná aj kombinácia týchto krokov. Pri riešení kinetiky sorpcie sa vychádza z určitých teoretických predpokladov, na základe ktorých boli navrhnuté rôzne kinetické modely opisujúce sorpciu látok z roztokov na tuhú fázu. Príkladom je teória absolútnej rýchlosti (teória ART)³ a teória štatistickej rýchlosti (teória SRT)⁴. Iný prístup ku štúdiu kinetiky použili Brouers a Sotolongo-Costa⁵. Títo autori na základe prác^{6–11} navrhli zovšeobecnenú rovnicu fraktálovej kinetiky, ktorá berie do úvahy komplexnosť adsorpčného procesu a fraktálový povrch sorbentu. Do súčasnosti bolo publikovaných viacero prác, ktoré sa zaoberali využitím teórie fraktálovej kinetiky pri štúdiu sorpčných procesov^{12–15}. Touto prácou chceme poukázať na možnosť využitia tejto teórie pri skúmaní kinetiky biosorpcie organických látok. V práci bola študovaná kinetika sorpcie organického farbiva safranínu O biomasou húb *A. bisporus* ako známym sorbentom toxických organických látok^{16,17}.

Experimentálna časť

Organické farbivo

Ako model organického farbiva bolo vybrané katiónové farbivo safranín O (C₂₀H₁₉N₄Cl; M_r 350,84 g mol⁻¹; C.I. 50240; Aldrich) o čistote ~ 80 %. Všetky pracovné roztoky boli pripravené rozpusteným známeho množstva farbiva v destilovanej vode. Počiatočné pH roztokov bolo upravené na 6,0 prídavkom 1 M NaOH. V ďalšom texte budeme používať pre toto farbivo skratku SAF.

Biosorbent

Pre štúdium kinetiky sorpcie SAF boli ako biosorbent použité komerčne dostupné plodnice makrohuby *Agaricus bisporus*, v obchodnej sieti distribuované pod názvom šampiňóny. Pred úpravou boli plodnice opláchnuté destilovanou vodou a mechanicky rozdelené na klobúky, stopky a spórovú vrstvu. Pre ďalšie spracovanie boli vybrané klobúky, ktoré predstavujú najväčšiu časť biomasy plodníc *A. bisporus*. Klobúky boli narezané na malé kúsky a vysušené pri teplote 60 °C počas 24 h. Po vysušení bola biomasu niekoľkokrát premytá destilovanou vodou pre odstránenie vodorozpustných látok. Následne bola biomasu znova vysušená pri 60 °C počas 24 h. Vysušená biomasu sa ďalej pomlela a následne frakcionovala s využitím normovaných sít. Pre biosorpčné experimenty bola využitá frakcia 150–310 µm.

Kinetické experimenty

Kinetické experimenty boli uskutočnené vo vsádzkovom usporiadaní pri teplote 20 °C. Do Erlenmayerových baniek (50 cm³) s 10 cm³ roztoku SAF o koncentrácii 140, 235 alebo 350 mg dm⁻³ a s počiatočnou hodnotou pH 6,0 sa pridalo 30 mg biosorbentu, banky sa uzavreli parafilmom a umiestnili na trepačku (200 rpm). V časových intervaloch (0–300 min) bola z jednotlivých baniek odobratá kvapalná vzorka, ktorá bola bez potreby centrifugácie vhodne zriedená destilovanou vodou a spektrofotometricky analyzovaná pre zvyškovú koncentráciu SAF. Sorpcia SAF (q_t , mg g⁻¹) v danom čase t (min) bola vypočítaná z rovnice

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{W} \quad (1)$$

kde C_0 (mg dm⁻³) je počiatočná koncentrácia SAF v roztoku, C_t (mg dm⁻³) je koncentrácia SAF v danom čase t (min), W (g) je návažok biosorbentu (such. hm.) a V (dm³) je objem roztoku SAF.

Stanovenie safranínu O

Vzorky s obsahom SAF boli analyzované spektrofotometricky s využitím UV/VIS spektrofotometra Genesys 10UV (Thermo-Spectronic, USA) pri vlnovej dĺžke 518 nm v kremennej kyvete o hrúbke 1 cm. Koncentrácia farbiva bola odčítaná z kalibračnej priamky. Kalibrácia bola spravená zo sériou 10 štandardných vodných roztokov SAF v koncentračnom rozmedzí 1 až 10 mg dm⁻³ pri pH 6,0 a 20 °C s použitím 1 cm kremennej kyvety. Kalibráciou sa získala kalibračná funkcia: Abs = (0,0886±0,0004)C s R²=0,9994; kde Abs je absorbancia a C je koncentrácia farbiva v mg dm⁻³.

Kinetické modelovanie a štatistická analýza

Pre hodnotenie časových závislostí sorpcie SAF biomasou *A. bisporus* sa využili kinetické rovnice, ktorých parametre boli odhadnuté nelineárnou regresnou analýzou s využitím algoritmu *Levenberg-Marquardt*. Regresná analýza bola uskutočnená s použitím počítačového softvéru OriginPro[®] 7.0. Štatistická významnosť odhadnutých parametrov bola hodnotená podľa štandardnej neistoty, *t*-testu a *p*-hodnoty na hladine významnosti 0,05. Pre posúdenie kvality regresných modelov boli použité nasledovné kritériá:

1. Koeficient determinácie (*R*²)

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (q_{i,\text{mod}} - q)^2}{\sum_{i=1}^m (q_{i,\text{exp}} - q)^2} \quad (2)$$

2. Súčet štvorcov reziduálnych odchýlok (*SSE*)

$$SSE = \sum_{i=1}^m (q_{i,\text{mod}} - q_{i,\text{exp}})^2 \quad (3)$$

3. Štandardná neistota modelu (*SEE*)

$$SEE = \sqrt{\frac{1}{m-p} \sum_{i=1}^m (q_{i,\text{mod}} - q_{i,\text{exp}})^2} \quad (4)$$

4. Akaikeho informačné kritérium upravené pre malý počet meraní (*AIC_C*)

$$AIC_C = m \ln \left[\frac{\sum_{i=1}^m (q_{i,\text{mod}} - q_{i,\text{exp}})^2}{m} \right] + 2(p+1) + 2(p+1) \left(\frac{p+2}{m-p-2} \right) \quad (5)$$

kde $q_{i,\text{mod}}$ je *i*-tá hodnota sorpcie (mg g⁻¹) odhadnutá modelom, $q_{i,\text{exp}}$ je *i*-tá experimentálne zistená hodnota sorpcie (mg g⁻¹), *m* je počet experimentálne nameraných hodnôt $q_{i,\text{exp}}$ v danom časovom rozpätí, *p* je počet parametrov regresného modelu a *q* je priemerná hodnota sorpcie, ktorá je daná výrazom

$$q = \frac{\sum_{i=1}^m q_{i,\text{exp}}}{m} \quad (6)$$

Výsledky a diskusia

Diferenciálnu rovnicu fraktálovej kinetiky navrhnuté Brouers a Sotolongo-Costa⁵, z ktorej sme vychádzali v tejto práci, možno napísať v tvare

$$-\frac{dq_{n,\alpha}(t)}{dt^\alpha} = K_{n,\alpha} [q_e - q_{n,\alpha}(t)]^n \quad (7)$$

kde $q_{n,\alpha}$ (mg g⁻¹) je sorpcia v čase *t* (min), q_e (mg g⁻¹) je sorpcia v rovnováhe, $K_{n,\alpha}$ (gⁿ⁻¹ mg¹⁻ⁿ min^{-α}) je konštanta, *n* je poriadok reakcie, *α* je fraktálový časový index pričom 1/*α* je mierou energetickej heterogenity systému a t^α (min^α) je fraktálový čas.

V závislosti od hodnôt parametrov *n* a *α* dostávame riešením diferenciálnej rovnice (7) rôzne typy kinetických modelov.

Ak *n* = 1, *α* = 1, dostávame kinetický model pseudo-prvého poriadku:

$$-\frac{dq(t)}{dt} = K_1 [q_e - q(t)] \rightarrow q_t = q_e [1 - \exp(-K_1 t)] \quad (8)$$

Ak *n* = 2, *α* = 1, dostávame kinetický model pseudo-druhého poriadku:

$$-\frac{dq(t)}{dt} = K_2 [q_e - q(t)]^2 \rightarrow q_t = q_e^2 K_2 t / (1 + q_e K_2 t) \quad (9)$$

Ak *n* = 1, *α* ≠ 1, dostávame rovnicu fraktálovej kinetiky typu (1, *α*) (t.j. rovnicu Weibullovoho rozdelenia):

$$-\frac{dq_\alpha(t)}{dt^\alpha} = K_\alpha [q_e - q_\alpha(t)] \rightarrow q_t = q_e [1 - \exp(-(t/\tau_\alpha)^\alpha)] \quad (10)$$

Ak *n* ≠ 1, *α* = 1, dostávame kinetický model pseudo-*n*-tého poriadku:

$$-\frac{dq(t)}{dt} = K_n [q_e - q(t)]^n \rightarrow q_t = q_e - [q_e^{1-n} - K_n t (1-n)]^{1/1-n} \quad (11)$$

Ak $n \neq 1$, $\alpha \neq 1$, dostávame všeobecnú rovnicu fraktálovej kinetiky (n, α):

$$q_t(n, \alpha) = q_e [1 - (1 + (n-1)(t/\tau_{n,\alpha})^\alpha)^{-1/(n-1)}] \quad (12)$$

kde $\tau_{n,\alpha}$ je charakteristický čas (min), ktorý je daný výrazom

$$\tau_{n,\alpha} = (q_e^{n-1} K_{n,\alpha})^{-1/\alpha} \quad (13)$$

Rovnica fraktálovej kinetiky (n, α) umožňuje definovať „polčas reakcie“ $\tau_{1/2}$ (min). Pod „polčasom reakcie“ rozumieme čas, za ktorý dôjde k sorpcii látky v množstve $q_e/2$ (mg g^{-1}). $\tau_{1/2}$ je definovaný rovnicou

$$\tau_{1/2} = \tau_{n,\alpha} [-\ln_n(1/2)]^{1/\alpha} \quad (14)$$

kde deformovaný n -logaritmus je daný výrazom¹⁸

$$\ln_n(1/2) \equiv \frac{(1/2)^{1-n} - 1}{1-n} \quad (15)$$

Kinetické modely pseudo-prvého a pseudo-druhého poriadku boli doteraz intenzívne využívané pre opis kinetiky biosorpcie anorganických i organických látok ako čisto empirické vzťahy bez racionálneho vysvetlenia^{2,3}. Avšak ako vyplýva z predchádzajúcich vzťahov, tieto rovnice možno interpretovať ako limitný prípad fraktálovej kinetiky, keď index α je rovný jednej. Nedávno Azizian a Fallah¹⁹ navrhli novú empirickú rovnicu, ktorú sme tiež použili v tejto práci pre opis kinetických dát. V diferenciálnom tvare možno túto rovnicu napísať nasledovne

$$\frac{dq_t}{dt} = k_n \left(\frac{q_e^{n-1}}{q_e^{n-1}} \right) (q_e^n - q_t^n) \quad (16)$$

Integrovaním rovnice (16) v hraniciach $q_t = 0$ pri $t = 0$ a $q_t = q_t$ pri $t = t$ dostávame rovnicu, ktorú autori nazvali rovnicou modifikovaného pseudo- n -tého poriadku

$$q_t = q_e [1 - \exp(-nk_n q_e^{n-1} t)^{1/n}] \quad (17)$$

kde n je poriadok reakcie, k_n ($\text{g}^{n-1} \text{mg}^{1-n} \text{min}^{-1}$) je rýchlostná konštanta a q_e (mg g^{-1}) je sorpcia v rovnováhe. Táto rovnica na rozdiel od rovnice (12) prechádza pri $n = 1$ na rovnicu pseudo-prvého poriadku (rov. 8).

Výsledky regresnej analýzy pre jednotlivé kinetické modely sú uvedené v tabuľkách I a II. Vhodnosť jednotlivých modelov pre opis experimentálnych dát sme skúmali z dvoch hľadísk: z hľadiska významnosti modelu ako celku (skúmanie tesnosti preloženia experimentálnych bodov regresnými krivkami) a z hľadiska štatistickej významnosti regresných koeficientov. V tab. I sú uvedené hodnoty kritérií určujúce vhodnosť modelu ako celku: R^2 , SEE , SSE a AIC_C (pozri Experimentálna časť). Literatúra uvádza ako najmenej vhodné kritérium R^2 . Podobne aj táto práca potvrdzuje túto skutočnosť. Oproti ostatným trom kritériám, kritérium R^2 sa javí ako najmenej citlivé pre posúdenie tesnosti preloženia bodov regresnou krivkou. Malé rozdiely medzi jednotlivými hodnotami R^2 robia toto kritérium v podstate nepoužiteľné pri výbere najvhodnejšieho modelu. Nevýhodou tohto kritéria je, že vôbec neberie do úvahy počet experimentálnych bodov (m) ani počet parametrov regresného modelu (p), čo sú dôležité premené určujúce stupeň voľnosti systému. Z tohto hľadiska sa javí ako najvhodnejšie kritérium AIC_C ²⁰. Nami zistené hodnoty AIC_C potvrdzujú adekvátnosť použitia tohto kritéria pre hodnotenie regresných modelov. Podľa tohto kritéria sa javí ako najvhodnejší model fraktálovej kinetiky (n, α). Ako druhý najlepší model možno považovať rovnicu pseudo- n -tého poriadku (rovnica 11). Vhodnosť ostatných modelov je podstatne menšia. Empirická rovnica (17), navrhnutá Azizian a Fallah¹⁹ s cieľom získať univerzálnejšiu rovnicu v porovnaní s modelmi pseudo-prvého a pseudo-druhého poriadku, sa neukázala ako vhodný model pre opis časovej závislosti biosorpcie SAF. Ak porovnáme hodnotu kritérií v závislosti od počiatkovej koncentrácie SAF, môžeme vidieť, že vhodnosť všetkých kinetických modelov klesá s rastúcou koncentráciou SAF. Napriek tomuto javu zostáva fraktálová kinetická rovnica (12) najlepším modelom opisujúcim časovú závislosť sorpcie SAF biomasou *A. bisporus* čo potvrdzujú aj grafické zobrazenia regresných závislostí kinetiky sorpcie SAF (obr. 1).

Pri hodnotení schopnosti regresných modelov opísať závislosť sorpcie v celom časovom rozpätí, v ktorom bola sorpcia SAF sledovaná, sme využili relatívnu chybu (RE) definovanú vzťahom¹⁹

$$RE = \frac{q_{i,\text{mod}} - q_{i,\text{exp}}}{q_{i,\text{exp}}} \quad (18)$$

Z rovnice (18) vyplýva, že $RE = 0$ ak $q_{i,\text{mod}} = q_{i,\text{exp}}$, v iných prípadoch je $RE \neq 0$, pričom hodnota RE bude tým viac vzdialená od nuly čím väčší bude rozdiel medzi modelovou hodnotou ($q_{i,\text{mod}}$) a experimentálne nameranou hodnotou ($q_{i,\text{exp}}$). Závislosť RE na čase t pre kinetické modely použité v tejto práci sú na obr. 2. Z grafických závislostí je zrejme, že všetky použité modely majú vyššie hodnoty RE v počiatkových fázach sorpcie (prvé minúty sorpcie). Túto skutočnosť zistili aj Azizian a Fallah¹⁹ pri kinetickom modelovaní sorpcie organických látok na aktívne uhlie a živice. Napriek tomu tieto závislosti potvrdzujú, že všeobecná rovnica fraktálovej kinetiky (n, α) je najvhod-

Tabuľka I

Hodnoty vybraných kritérií pre posúdenie vhodnosti kinetických rovníc ako nelineárnych regresných modelov pre opis kinetiky sorpcie safranínu O biomasou *A. bisporus*

Kinetický model	C_0 farbiva [mg dm ⁻³]	R^2	SEE	SSE	AIC_C
Fraktálová kinetika (n, α)	140	0,9998	0,216	0,745	-46,9
	235	0,9996	0,429	2,573	-16,6
	350	0,9989	0,808	9,133	4,89
Fraktálová kinetika (1, α)	140	0,9988	0,479	3,897	-19,2
	235	0,9975	1,090	17,83	12,1
	350	0,9956	1,549	35,98	24,0
Pseudo- n -tý poriadok	140	0,9994	0,357	2,163	-30,4
	235	0,9990	0,693	7,211	-3,25
	350	0,9985	0,916	12,59	6,23
Modifikovaný pseudo- n -tý poriadok	140	0,9987	0,510	4,431	-16,8
	235	0,9968	1,223	22,44	16,1
	350	0,9941	1,802	48,70	29,2
Pseudo-prvý poriadok	140	0,9985	0,523	4,930	-18,0
	235	0,9960	1,341	28,78	16,7
	350	0,9907	2,188	76,63	33,4
Pseudo-druhý poriadok	140	0,9847	1,677	50,61	26,2
	235	0,9904	2,063	68,12	31,4
	350	0,9950	1,607	41,30	22,9

R^2 – koeficient determinácie; SSE – štandardná neistota modelu; SSE – súčet štvorcov reziduálnych odchýlok; AIC_C – Akaikeho informačné kritérium upravené pre malý počet meraní

nejším modelom pre opis kinetiky sorpcie SAF biomasou *A. bisporus*.

Odhadnuté parametre kinetických modelov sú uvedené v tabuľke II. Všetky parametre, okrem parametra k_n modifikovaného pseudo- n -tého poriadku, sú štatisticky významné na hladine významnosti 0,05 ($P < 0,0001$) na čo poukazujú aj uvedené štandardné neistoty parametrov (výsledky t -testu nie sú uvedené). Z tabuľky II vyplýva, že všetky použité modely dávajú veľmi podobné odhady parametra q_e , pričom veľkosť odhadu tohto parametra narastá so zväčšujúcou sa počiatočnou koncentráciou SAF. Hodnota tohto parametra odhadnutá modelom fraktálovej kinetiky sa pohybuje v rozmedzí 43,5 až 74,4 mg g⁻¹.

Dôležitým kinetickým údajom pre objasnenie mechanizmu sorpcie je poriadok reakcie. Najbežnejšími modelmi používanými pre opis kinetiky sorpcie z vodných roztokov na pevnú fázu sú modely pseudo-prvého a pseudo-druhého poriadku² hlavne z dôvodu ich matematickej jednoduchosti (rovnice sú linearizovateľné) a jednoduchej interpretácie kinetických parametrov. Avšak ako uvádza Liu a Liu²¹ nie je vhodné opisovať kinetiku sorpcie pseudo-prvým, pseudo-druhým alebo akýmkoľvek iným poriadkom pokiaľ nie

je známy mechanizmus sorpcie. Z uvedeného dôvodu títo autori navrhli na základe efektívnej koncentrácie miest dostupných pre sorpciu na povrchu sorbentu všeobecnú kinetickú rovnicu pseudo- n -tého poriadku (11), ktorú sme využili v tejto práci ako limitný prípad fraktálovej kinetickej rovnice, keď index $\alpha = 1$ (rov. 12). Z tab. I a II je vidieť, že kinetické modely reprezentované rovnicami (8), (9) a (10) sú nevyhovujúce, čo vyplýva zo skutočnosti, že poriadok reakcie sa mení v závislosti od efektívnej koncentrácie dostupných miest na povrchu sorbentu a teda by sa mal meniť aj s počiatočnou koncentráciou SAF v roztoku čo táto práca potvrdzuje. Na základe fraktálovej kinetiky (n, α) sme zistili, že poriadok reakcie narastá s počiatočnou koncentráciou SAF z hodnoty 1,4 ($C_0=140$ mg dm⁻³) na 1,9 ($C_0=350$ mg dm⁻³). Pri použití modelu pseudo- n -tého poriadku, poriadok reakcie tiež narastá s počiatočnou koncentráciou SAF a to z hodnoty 1,2 na hodnotu 1,5. Tieto výsledky sú v zhode s predstavou, že pri nižších koncentráciách SAF dochádza najprv k sorpcii na tie aktívne miesta na povrchu sorbentu, ktoré vykazujú najvyššiu afinitu ku SAF a až po obsadení týchto miest dochádza k obsadzovaniu ďalších miest

Tabuľka II

Hodnoty kinetických parametrov šiestich modelov použitých pre opis biosorpcie safranínu O biomasou *A. bisporus*. Parametre boli odhadnuté nelineárnou regresnou analýzou s využitím algoritmu *Levenberg-Marquardt*. Hodnoty parametrov sú uvedené v tvare: bodový odhad \pm štandardná neistota

C_0 farbiva [mg dm ⁻³]	Kinetický model					
	Fraktálová kinetika (n, α)	Fraktálová kinetika (1, α)	Pseudo- n -tý poriadok	Modifikovaný pseudo- n -tý poriadok	Pseudo-prvý poriadok	Pseudo-druhý poriadok
140	$q_e = 43,5 \pm 0,1$ $n = 1,44 \pm 0,06$ $\tau_{n,\alpha} = 4,85 \pm 0,13$ $\alpha = 1,17 \pm 0,03$ $\tau_{1/2} = 4,05$	$q_e = 43,2 \pm 0,2$ $\tau_\alpha = 6,07 \pm 0,11$ $\alpha = 0,95 \pm 0,02$ $\tau_{1/2} = 4,13$	$q_e = 43,4 \pm 0,2$ $K_n = 0,098 \pm 0,011$ $n = 1,16 \pm 0,03$ $\tau_{1/2} = 4,09$	$q_e = 43,2 \pm 0,2$ $k_n = 0,115 \pm 0,028$ $n = 1,06 \pm 0,04$ $\tau_{1/2} = 4,27$	$q_e = 43,1 \pm 0,2$ $K_1 = 0,165 \pm 0,003$ $\tau_{1/2} = 4,20$	$q_e = 45,9 \pm 0,6$ $K_2 = 0,0057 \pm 0,0005$ $\tau_{1/2} = 3,82$
235	$q_e = 67,8 \pm 0,3$ $n = 1,71 \pm 0,10$ $\tau_{n,\alpha} = 4,73 \pm 0,18$ $\alpha = 1,23 \pm 0,05$ $\tau_{1/2} = 4,32$	$q_e = 66,9 \pm 0,4$ $\tau_\alpha = 6,78 \pm 0,23$ $\alpha = 0,88 \pm 0,04$ $\tau_{1/2} = 4,47$	$q_e = 67,4 \pm 0,3$ $K_n = 0,048 \pm 0,009$ $n = 1,31 \pm 0,05$ $\tau_{1/2} = 4,33$	$q_e = 66,8 \pm 0,4$ $k_n = 0,052 \pm 0,024^*$ $n = 1,18 \pm 0,08$ $\tau_{1/2} = 4,45$	$q_e = 66,5 \pm 0,4$ $K_1 = 0,148 \pm 0,006$ $\tau_{1/2} = 4,69$	$q_e = 70,7 \pm 0,8$ $K_2 = 0,0036 \pm 0,0003$ $\tau_{1/2} = 3,93$
350	$q_e = 74,4 \pm 0,6$ $n = 1,88 \pm 0,20$ $\tau_{n,\alpha} = 4,61 \pm 0,35$ $\alpha = 1,18 \pm 0,09$ $\tau_{1/2} = 4,43$	$q_e = 72,8 \pm 0,6$ $\tau_\alpha = 7,22 \pm 0,33$ $\alpha = 0,79 \pm 0,04$ $\tau_{1/2} = 4,54$	$q_e = 73,9 \pm 0,5$ $K_n = 0,020 \pm 0,005$ $n = 1,53 \pm 0,07$ $\tau_{1/2} = 4,35$	$q_e = 72,5 \pm 0,6$ $k_n = 0,016 \pm 0,010^{**}$ $n = 1,37 \pm 0,12$ $\tau_{1/2} = 4,57$	$q_e = 71,9 \pm 0,7$ $K_1 = 0,140 \pm 0,008$ $\tau_{1/2} = 4,95$	$q_e = 76,6 \pm 0,7$ $K_2 = 0,0031 \pm 0,0002$ $\tau_{1/2} = 4,21$

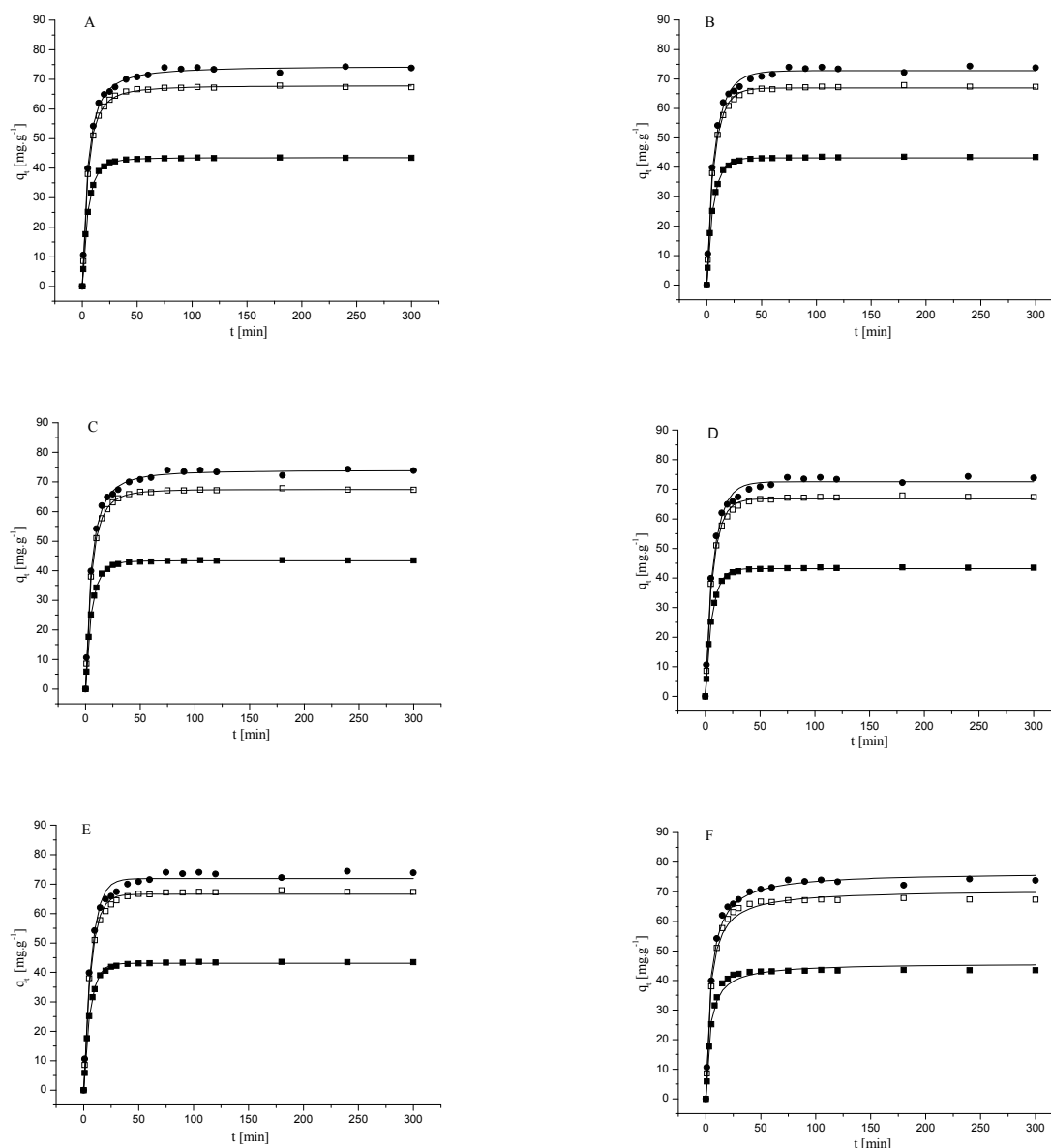
*,**štatisticky nevýznamné parametre na hladine významnosti 0,05 (* $P = 0,07$; ** $P = 0,20$)

s menšou afinitou. Toto potvrdzuje aj skutočnosť, že pri znižovaní koncentrácie SAF sa poriadok reakcie blíži k jednej. Necelistvý poriadok sorpcie SAF na biomasu *A. bisporus* poukazuje na komplexný charakter biosorpcie, ktorú nie je možné interpretovať ako jednoduchú elementárnu reakciu²¹. Zaujímavá je skutočnosť, že z fraktálovej kinetiky vyplýva vyšší poriadok reakcie ako z kinetiky pseudo- n -tého poriadku. Vzhľadom k tomu, že táto problematika je v súčasnosti ešte málo preskúmaná i vzhľadom k tomu, že táto práca predstavuje len úvod do tejto problematiky, nevieme v súčasnosti tento jav interpretovať. Pri snahe vysvetliť tento jav môžeme vychádzať z predpokladov na základe ktorých boli rovnice (11) a (12) zostavené. Kinetika pseudo- n -tého poriadku je založená na efektívnej koncentrácii dostupných miest na povrchu sorbentu, pričom neberie do úvahy heterogénnosť povrchu. Fraktálová kinetika berie do úvahy energetickú heterogénnosť povrchu a jeho „fraktálnosť“, pričom predpokladá, že

nie všetky reaktívne miesta na povrchu sorbentu majú schopnosť podieľať sa na sorpcii¹⁴. Tieto okolnosti majú pravdepodobne vplyv na odhad reakčného poriadku.

Čo sa týka odhadu rýchlostných konštánt biosorpcie SAF situácia je rozdielna v závislosti od kinetického modelu. Kinetické modely pseudo- n -tého poriadku (kde $n \geq 0$) umožňujú odhadnúť časovo nezávislú rýchlostnú konštantu, ktorá je však zložitou funkciou viacerých premenných ako je teplota, pH a počiatočná koncentrácia látok zúčastňujúcich sa sorpcie³. Ako vyplýva z rovnice (11), rozmer týchto konštánt bude závisieť od poriadku reakcie. Teória fraktálovej kinetiky predpokladá časovo závislý efektívny rýchlostný koeficient $K'_{n,\alpha}(t)$ ^{5,22}, ktorý je definovaný vzťahom

$$K'_{n,\alpha}(t) = \alpha \frac{t^{\alpha-1}}{\tau_{n,\alpha}^\alpha} (1 + (n-1)(t/\tau_{n,\alpha})^\alpha)^{-1} \quad (19)$$

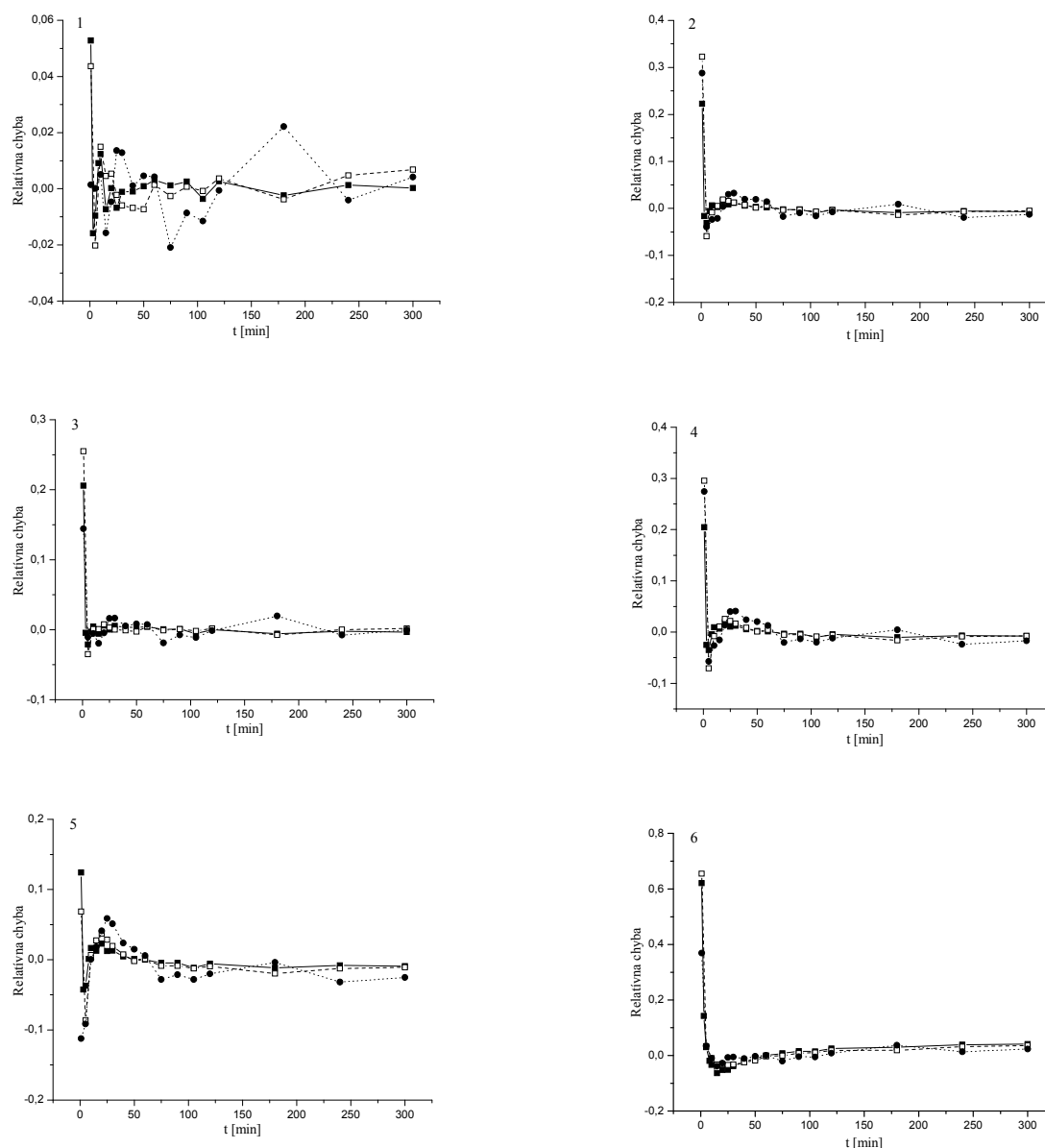


Obr. 1. Časové závislosti sorpcie SAF biomasou *A. bisporus* pri troch rôznych počiatkových koncentráciách SAF (■ 140 mg dm⁻³; □ 235 mg dm⁻³; ● 350 mg dm⁻³) opísané regresnými krivkami (—) šiestich kinetických modelov: A – fraktálová kinetika (n, α); B – fraktálová kinetika (1, α); C – pseudo- n -tý poriadok; D – modifikovaný pseudo- n -tý poriadok; E – pseudo-prvý poriadok; F – pseudo-druhý poriadok

Ako je vidieť z obr. 3. hodnota koeficientu $K'_{n,\alpha}$ exponenciálne klesá s časom, pričom najvyššie hodnoty dosahuje v prvých fázach sorpcie ($\sim 0,17 \text{ min}^{-1}$). Bez ohľadu na poriadok reakcie má koeficient $K'_{n,\alpha}$ rozmer inverzného času, v našom prípade min^{-1} , čo má veľmi praktický význam, pretože nám to dovoľuje porovnávať sorpčné systémy s rozdielnymi poriadkami.

Z dôvodu nemožnosti definovať časovo nezávislú

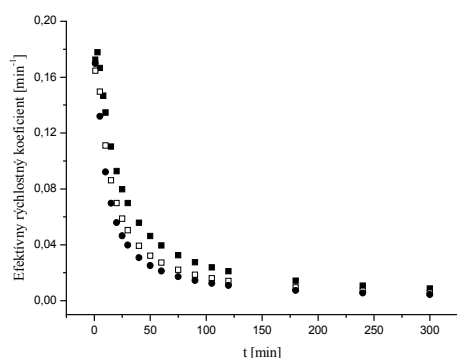
rýchlostnú konštantu z fraktálovej kinetiky, je relevantnou veličinou, ktorá charakterizuje časový vývoj sorpčného procesu, tzv. charakteristický čas $\tau_{n,\alpha}$ (pozri rov. 13). Charakteristický čas umožňuje vypočítať dôležitý parameter a to polčas reakcie $\tau_{1/2}$. Pretože kinetické rovnice pseudo- n -tého poriadku sú limitným prípadom fraktálovej kinetiky možno aj z nich vypočítať polčas reakcie. Ako je vidieť z tabuľky II hodnota polčasu reakcie rastie so zväčšujúcou



Obr. 2. Závislosť relatívnej chyby (RE) použitých kinetických modelov od času pri počiatkových koncentráciách SAF; 140 mg dm^{-3} (■); 235 mg dm^{-3} (○) a 350 mg dm^{-3} (●); kde 1 – fraktálová kinetika (n, α); 2 – fraktálová kinetika ($1, \alpha$); 3 – pseudo- n -tý poriadok; 4 – modifikovaný pseudo- n -tý poriadok; 5 – pseudo-prvý poriadok; 6 – pseudo-druhý poriadok

sa koncentráciou SAF pri všetkých kinetických modeloch. Pri fraktálovej kinetike sa hodnota polčasu reakcie pohybuje v rozmedzí 4,05 až 4,43 min. Tieto hodnoty sú menšie v porovnaní s hodnotami, ktoré zistili Gaspard a spol.²³ pri štúdiu kinetiky sorpcie fenolu, kyseliny tanínovej a melanoidínu na rôzne druhy aktívneho uhlia. Ich hodnoty polčasov reakcie sa pohybovali v rozmedzí 0,36 až 17,6 h. Ncibi a spol.¹⁴ študovali sorpciu chrómu (VI) morskou trávou *Posidonia oceanica* pričom z fraktálovej kinetiky

zistili polčas reakcie v rozmedzí 16,1 až 33,5 min v závislosti od počiatkovej koncentrácie chrómu. Uvedené údaje poukazujú na skutočnosť, že proces biosorpcie SAF na biomasu *A. bisporus* je rýchly a z tohto hľadiska je porovnateľný s inými typmi biosorbentov, ktoré uvádza literatúra ako potenciálne sorbenty využiteľné v separačných technológiách.



Obr. 3. Časová zmena efektívneho rýchlostného koeficientu $K'_{n,a}$ sorpcie safranínu O biomasou *A. bisporus* pri počiatkových koncentráciách safranínu O 140 mg dm^{-3} (■), 235 mg dm^{-3} (□) a 350 mg dm^{-3} (●)

Záver

Kinetická analýza sorpcie safranínu O biomasou *A. bisporus* poukázala na zložitosť biosorpčného procesu, ktorý nie je možné interpretovať v zmysle jednoduchšej elementárnej reakcie, ale treba ho interpretovať ako komplexný fyzikálno-chemický dej, ktorého priebeh bude závisieť od experimentálnych podmienok. Práca potvrdila schopnosť fraktálovej kinetiky opísať časové závislosti biosorpcie safranínu O biomasou *A. bisporus* lepšie ako bežne používané kinetické modely pseudo-prvého a pseudo-druhého poriadku, pričom sorpčná schopnosť biomasy *A. bisporus* je porovnateľná s inými typmi biosorbentov uvádzanými v literatúre.

LITERATÚRA

1. Chojnacka K.: Environ. Int. 36, 299 (2010).
2. Plazinski W., Rudzinski W., Plazinska A.: Adv. Colloid Interface Sci. 152, 2 (2009).
3. Azizian S.: J. Colloid. Interf. Sci. 276, 47 (2004).
4. Rudzinski W., Plazinski W.: Appl. Surf. Sci. 253, 5827 (2007).
5. Brouers F., Sotolongo-Costa O.: Physica A 368, 165 (2006).
6. Kopelman R.: Science 241, 1620 (1988).
7. Jurlewicz A., Weron K.: Cell. Mol. Biol. Lett. 4, 55 (1999).
8. Frauenfelder H., Wolynes P.G., Austin R.H.: Rev. Mod. Phys. 71, S419 (1999).
9. Brouers F., Sotolongo-Costa O.: Europhys. Lett. 62, 808 (2003).
10. Brouers F., Sotolongo-Costa O., Weron K.: Physica A 344, 409 (2004).
11. Brouers F., Sotolongo-Costa O.: Physica A 356, 359 (2005).
12. Giona M., Giustiniani M.: J. Phys. Chem. 100, 16690 (1996).
13. Altenor S., Carene B., Emmanuel E., Lambert J., Ehrhardt J.J., Gaspard S.: J. Hazard. Mater. 165, 1029 (2009).
14. Ncibi M. C., Mahjoub B., Seffen M., Brouers F., Gaspard S.: Biochem. Eng. J. 46, 141 (2009).
15. Figaro S., Avril J. P., Brouers F., Ouensanga A., Gaspard S.: J. Hazard. Mater. 161, 649 (2009).
16. Maurya N. S., Mittal A. K.: Natl. Acad. Sci. Lett. 29, 275 (2006).
17. Maurya N. S., Mittal A. K.: Natl. Acad. Sci. Lett. 31, 221 (2008).
18. Tsallis C.: Braz. J. Phys. 29, 1 (1999).
19. Azizian S., Fallah R.N.: Appl. Surf. Sci., in press (2010).
20. Akaike H.: IEEE T Automat. Contr. 19, 716 (1974).
21. Liu Y., Liu Y. J.: Sep. Purif. Technol. 61, 229 (2008).
22. Grima R., Schnell S.: ChemPhysChem 7, 1422 (2006).
23. Gaspard S., Altenor S., Passe-Coutrin N., Ouensanga A., Brouers F.: Water Res. 40, 3467 (2006).

CONTENTS

Lectures

<i>J. Barek, K. Pecková</i>	Nové možnosti elektrochemického monitorování genotoxických a ekotoxických organických látok	s401
<i>E. Beinrohr</i>	Elektrochémiá v procesnej analytike	s405
<i>D. Berek</i>	Separation and molecular characterization of synthetic polymers by liquid chromatography	s406
<i>F. Čácho</i>	Elektrochemická úprava vzoriek pre ETAAS – stanovenie As, Sb, Se a Hg technikou ETAAS po on-line elektrochemickej prekoncepcii	s408
<i>R. Góra, M. Hutta, P. Rohárik</i>	Využitie kombinácii vysokoúčinných separačných metód na charakterizáciu humínových látok	s409
<i>A. Grambličková</i>	Problematika zabezpečenia kvality pri skúškach vody	s410
<i>R. Halko, M. Hutta</i>	Je IMAC metóda vhodná na frakcionáciu humínových látok?	s411
<i>K. Hroboňová, J. Lehotay, J. Čižmárik</i>	HPLC methods in quality control of propolis – analysis of organic acids and coumarins	s415
<i>E. Hroncová, J. Ladomerský</i>	Kalibračné modely zložitých zložiek životného prostredia pre ED XRF	s416
<i>S. Hrouzková, A. Hercegová, M. Andraščíková, E. Matisová</i>	Fast gas chromatography for endocrine disrupting chemicals determination	s420
<i>M. Hutta, M. Chalányová, R. Góra, R. Halko, J. Ráczová, P. Rohárik</i>	Prečo sú huminové látky zaujímavé aj pre analytického chemika ?	s421
<i>M. Chalányová, M. Hutta, M. Pagáč</i>	On-line spojenie úpravy podnej vzorky a stopovej RP-HPLC analýzy vybranej skupiny pyretroidov za použitia techniky prepájania kolón	s424
<i>J. Chovancová, B. Drobná, K. Čonka, A. Kočan, A. Fabišiková, Z. Stachová Sejková, M. Dömötörövä</i>	PCDDS, PCDFS and dioxine-like PCBS in breast milk and estimation of infant intake	s430
<i>A. Kočan, J. Chovancová, M. Dömötörövä, K. Čonka, A. Fabišiková, B. Drobná, Z. Stachová Sejková</i>	Stanovenie vybraných perzistentných organických polutantov pomocou izotopovej zriedovacej metódy využívajúcej plynovú chromatografiu a vysokorozlišovaciú hmotnostnú spektrometriu	s432
<i>L. Kouřimská, D. Chrpová, J. Pánek, L. Kolesárová, V. Legarová</i>	Analytické metódy hodnotení účinnosti antioxidantů ve vybraných druhích koření	s441
<i>F. Kraic, Z. Királyová, J. Mocák</i>	Chemometric characterization of air pollutants and influence of meteorological factors	s445
<i>J. Krupčík</i>	Komprehensívna dvojrozmerná plynová chromatografia	s449
<i>J. Labuda, P. Tarapčík, J. Garaj</i>	Aktuálny stav v jednotnosti používania metrologických pojmov v analytickej chémii	s450
<i>J. Laštincová, J. Kalaš</i>	Senzorické hodnotenie ako súčasť analýzy vína	s453

Chem. Listy 104, s796–s801 (2010)	ACP 2010 - Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<i>M. Machalec</i>	Nanotechnológie, súčasná situácia a budúcnosť v oblasti ochrany európskych spotrebiteľov	s455
<i>A. Manová, E. Beinrohr, R. Hudec</i>	Stanovenie hydrazínu v kotlových vodách coulometrickou titráciou	s457
<i>P. Matúš, I. Hagarová, M. Bujdoš, J. Kubová, P. Diviš</i>	Determination of dissolved cationic aluminium species after their extraction by nanometer-sized titanium dioxide using atomic spectrometry techniques	s461
<i>J. Mocák, E. Rábarová</i>	Recurrent relationships in chromatography and electrochemistry	s464
<i>M. Monošíková, M. Vítková, E. Piš, M. Horecká</i>	Analytika rezíduí pesticídov v detskej a dojčenskej výžive metódami LC/MS/MS a GC/MS/MS	s469
<i>P. Nemeček, J. Mocák, J. Lehotay, K. Waisser</i>	QSRR study of potential antituberculous agents	s470
<i>J. Obernauer</i>	Akreditácia skúšobných laboratórií v zmysle zákona o akreditácii č. 505/2009 z.z.	s475
<i>M. Pánik, J. Huba, P. Hrdý, O. Šmídová, R. Varga</i>	<i>Neobvyklé úmrtie automechanika</i>	s476
<i>M. Polovka, P. Šimko, E. Kolek, A. Bednáriková, B. Skláršová</i>	Characterisation of benzo [a] pyrene oxidation products	s480
<i>P. Rohárik, R. Góra, M. Hutta</i>	Analýza a charakterizácia humínových látok RP-HPLC metódou, kombináciou elúcie skokovým a lineárnym gradientom	s487
<i>I. Rovný, M. Horecká</i>	Analytická chémia vo verejnom zdravotníctve	s491
<i>D. Šimková, J. Labuda</i>	Prietokový systém s DNA biosenzorom pre hodnotenie poškodenia DNA chemickými látkami a účinku antioxidantov	s492
<i>E. Švorc, P. Májek, V. Vrábel, P. Olejníková, E. Tóthová, Š. Marchalín</i>	Štúdium vzťahov štruktúra – biologická aktivita derivátov indolizínu	s493
<i>G. Takácsová</i>	Využitie ICP/MS a LC-ICP/MS v súčasnej analytickej praxi	s494
<i>J. Tkáč, J. Šefčovičová, J. Filip, P. Gemeiner</i>	Využitie nanoštruktúr v bioanalytickej chémii	s496
<i>S. Tkáčiková, I. Kožárová, D. Máté</i>	Využitie techniky LC/M/MS pri stanovení rezíduí maduramycínu v tkanivách brojlerových kurčiat	s497
<i>P. Ulbrich, K. Jankovičová</i>	„Spice“ – nový fenomén na drogovej scéne	s503
<i>K. Ventura, M. Adam</i>	Aplikace extrakčních technik pro analýzu organických látek	s504
<i>Š. Vodný, S. Berek</i>	Skúsennosti z merania a monitorovanie produktivity skúšobných laboratórií	s514
<i>V. Vrábel</i>	Metódy štúdia povrchov a tenkých vrstiev	s515
<i>B. Vrana, K. Šilhárová, J. Makovinská</i>	Požiadavky na analytické metódy vo vzťahu k novému hodnoteniu povrchových vôd	s516
<i>S. Hlúbiková, M. Vrbová</i>	Správanie sa polymérov vo vode	s520
<i>V. Vyskočil, A. Daňhel, J. Fischer, M. Kotasová, A. Málek, J. Radová, K. Pecková, J. Barek</i>	Some practical applications of silver solid amalgam electrodes for voltammetric determination of modern pharmaceuticals	s521
<i>J. Zima, H. Dejmková, L. Němcová</i>	Praktické aplikace uhlíkových pastových elektrod	s528
<i>G. Ziyatdinova, E. Giniyatova, H. Budnikov</i>	Voltammetry of natural lipophilic antioxidants in surfactant media	s533

Posters

<i>M. Andraščíková, S. Hrouzková, M. Kršáková</i>	Determination of pesticide residues in fruit matrices by gas chromatography-mass spectrometry	s535
<i>P. Batelková, I. Borkovcová, L. Vorlová</i>	Zastoupení polycyklických aromatických uhlovodíků v masných výrobcích	s536
<i>A. Bednáriková, B. Skláršová, E. Kolek, P. Šimko</i>	Photolysis of benzo[<i>a</i>]pyrene in model systems and quest to identify some of oxidized products by HPLC-MS-MS	s537
<i>A. Bednáriková, B. Skláršová, E. Kolek, P. Šimko</i>	Comparison of different ionisation techniques for HPLC/MS assay of benzo(<i>a</i>)pyrene and some oxidised products	s541
<i>K. Beníková, A. Ferancová, J. Labuda</i>	The use of polymers in construction of electrochemical nucleic acids biosensors	s542
<i>J. Blaško, R. Kubinec, A. Szabóová, P. Podolec, I. Ostrovský, L. Soják, V. G. Berezkin, A. Amann</i>	Analysis of volatile organic compounds in exhaled breath using needle trap device	s546
<i>M. Božok, Š. Bova, P. Puliš</i>	Využitie SPE počas analýzy prítomnosti látok zo zoznamov OPCW vo vodnej vzorke, za prítomnosti rádioaktívnej kontaminácie vo vzorke v mobilnom identifikačnom chemickom laboratóriu počas 2 nd NATO mixed sample laboratory exercise	s547
<i>V. Červený, M. Horváth, M. Amberger, J. A. C. Broekaert</i>	Stanovení rtuti ve vzorcích vody z přístavu v Hamburku s použitím elektrochemického generování studené páry rtuti spojeného s miniaturním proužkovým mikrovlnně indukovaným heliovým plasmatem a OES detekcí	s552
<i>M. Cigánek, J. Neča, K. Pěňčíková, L. Vykopalová, M. Machala</i>	Complex method for chemical and toxicological characterization of environmental samples	s560
<i>H. Dejmková, Z. Hranická, Z. Navrátilová, J. Barek</i>	Voltametric determination of nitrophenols using clay-modified carbon paste electrodes	s563
<i>N. Denderz, J. Škubák, J. Čížmárik, J. Lehotay</i>	Using of imprinted polymers in analytical chemistry	s567
<i>D. Deýlová, J. Barek</i>	Vliv povrchově aktivních látek na voltametrické stanovení 5-nitrobenzimidazolu	s569
<i>J. Dubajová, Z. Klöšlová, A. Hegedúsová, Z. Vassányi, E. Krčmová</i>	Odhad expozície polycyklickým aromatickým uhľovodíkom v životnom prostredí a pracovnom ovzduší vybraného závodu v meste Nitra	s573
<i>G. Chunsriimyatav, P. Valasek, V. Kuban, I. Hoza</i>	Review of the HPLC methods used in the determination of polyphenols in beer	s580
<i>G. Chunsriimyatav, P. Valasek, V. Kuban, I. Hoza</i>	HPLC analyses used in the determination of phenolic acids in beer: review	s585
<i>I. Ostrovský, R. Čabala, R. Górová, Z. Vetríková, J. Kubincová, B. Meluchová, J. Višňovský, W. Lorenz</i>	Simple method for the determination of total phthalates in fatty food samples	s589
<i>K. Grolmusová, M. Tkáč</i>	Príprava vzoriek a analýza neznámych látok počas druhého NATO laboratórneho cvičenia s kombinovanými vzorkami (2 nd NATO mixed samples laboratory exercise)	s590
<i>M. Havrlentová, A. Hlinková, M. Bieliková, Š. Masár</i>	A rapid method of cell wall polysaccharides' determination and its application in cereal breeding	s599

Chem. Listy 104, s796–s801 (2010)	ACP 2010 - Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<i>A. Hercegová, M. Andraščíková, S. Hrouzková</i>	SPE based sample preparation in combination with fast gas chromatography for determination of pesticides in water	s604
<i>E. Kráľovičová, J. Lakatošová, J. Hrivňák</i>	Simple method for leather emission measurements	s609
<i>J. Hrivňák, J. Lakatošová, V. Repka, J. Kaňuchová-Pátková</i>	Analysis of wine aroma compounds by solid-phase microcolumn extraction	s611
<i>A. Janáčová, A. Štecová, S. Cifrová, P. Májek, L. Čírka, I. Špánik</i>	Určenie pôvodu slovenských destilátov pomocou SNIF-NMR	s613
<i>S. Pysarevska, A. Janáčová, I. Špánik</i>	Identification of volatile organic compounds in distillate obtained from sorbus domestica (service tree)	s614
<i>A. Janáčová, I. Špánik, Z. Šusterová</i>	Porovnanie vybraných extrakčných techník v GC-MS analýze prchavých zlúčenín vo vzorkách medov	s615
<i>H. Vasarabová, I. Špánik, A. Janáčová, T. Jakubík</i>	Porovnanie extrakcie VOC zo slivovice pomocou rozdielnych sorpčných techník s PDMS sorbentom	s618
<i>J. Katrlík, R. Škrabana, D. Mislovičová, P. Gemeiner</i>	Štúdium interakcie lektín - glykokoproteín na lektínových biočipoch metódou povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR)	s619
<i>M. Klincová</i>	Stanovenie chemickej spotreby kyslíka (CHSK _{Cr}) – skúmvková metóda pre malé objemy vzoriek	s623
<i>M. Suhaj, M. Stankovská, E. Kolek</i>	Stanovenie podielu ovčej a kravskej hrudky v bryndzi izoelektrickou fokusáciou	s627
<i>Š. Koudelka, J. Mašek, P. Turánek-Knötigová, J. Neuzil, J. Turánek</i>	Direct high-performance liquid chromatographic analysis of lyophilised liposomal entrapped alpha-tocopheryl succinate	s631
<i>Z. Kráľová, J. Barek, K. Pecková</i>	Utilization of amalgam electrodes for amperometric detection of nitro derivatives of aromatic compounds in HPLC and flow injection analysis	s634
<i>L. Soják, R. Kubinec, J. Blaško, G. Addová, I. Ostrovský, W. Lorenz, A. Amann</i>	Linear retention indices of all C4-C23 monomethyl-branched methyl esters of saturated fatty acids on polydimethylsiloxane stationary phase	s640
<i>K. Kukuřová, A. Bednářiková, E. Kolek, L. Marková, R. Belková, Z. Ciesarová</i>	Porovnanie GC/MS a LC/MS na stanovenie obsahu akrylamidu v cereálnych výrobkoch	s649
<i>V. Legarová, L. Kouřimská, J. Hájková</i>	Laktosa a její změny během fermentace syrovátky a mléka termofilními bakterie mléčného kvašení	s653
<i>P. Májek, J. Sádecká, L. Piš</i>	Porovnanie rôznych techník skenovania fluorescenčných spektier v analýze vínnych destilátov	s657
<i>K. Maráková, P. Mikuš, I. Nemeč, I. Valášková, E. Havránek</i>	Enantiomeric purity control of antihistamines in pharmaceuticals using capillary electrophoresis with cyclodextrin pseudostationary phases	s658
<i>J. Marešová, M. Horník, M. Pipiška, J. Augustín</i>	Vstup ⁶⁵ Zn a ¹³⁷ Cs cez povrch listov a ich distribúcia v pletivách cievnatých rastlín	s659
<i>L. Marková, K. Kukuřová, Z. Ciesarová, A. Bednářiková, P. Šimko, T. Behan, J. Kravec</i>	Distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba	s660
<i>I. Hagarová, P. Matuš, M. Bujdoš, J. Kubová</i>	Optimalizácia CPE metódy pre selektívne stanovenie (ultra)stopových koncentrácií Sb(III) v prírodných vodách	s665
<i>B. Meľuchová, J. Blaško, R. Kubinec, R. Górová, M. Michalec, V. Vargová, Z. Kováčiková, M. Margetín, L. Soják</i>	Profil mastných kyselín v rastlinách pasienka a v ovčom mliečnom tuku počas pastevnej sezóny	s671

Chem. Listy 104, s796–s801 (2010)	ACP 2010 - Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<i>V. Mrázová, J. Mocák, J. Balla, A. Bednárová</i>	Comparison of analytical methods using various types of regression	s676
<i>D. Borošová, I. Nagyová, Z. Melichová</i>	Hodnotenie rizika kontaminácie vôd arzénom a antimónom v banskej oblasti Lúbietová	s680
<i>L. Němcová, J. Zima, J. Barek</i>	Determination of resveratrol in common buckwheat and tartary buckwheat using HPLC-ED with a carbon paste electrode	s687
<i>I. Nemeč, P. Mikuš, K. Maráková, I. Valášková, E. Havránek</i>	Direct enantioselective determination of drugs in biological samples by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis in column-coupling arrangement with capillary isotachopheresis	s693
<i>V. Pavlík, O. Hegedűs, A. Hegedűsová</i>	Výskyt arzénu a antimónu v zdrojoch podzemných vôd nitrianskeho kraja	s694
<i>M. Peško, K. Kráľová, I. Hagarová</i>	Monitoring of cadmium translocation within St. John's wort and maize plants treated with cadmium selenate and selenite	s698
<i>I. Poustková, L. Babička, L. Budín, A. Méhes, J. Mazáč, J. Poustka, L. Staruch</i>	Autenticita moravských vín	s704
<i>I. Poustková, L. Babička, L. Krejčí, T. Hosnedl, P. Havelc, J. Poustka, L. Staruch</i>	Analýza vedľajších produktů fermentace nápojů	s711
<i>Z. Procházková, M. Dračková, A. Saláková, L. Gallas, M. Pospiech, L. Vorlová, B. Tremlová, H. Buchtová</i>	Využití FT-NIR spektrometrie pro hodnocení barvy salámů	s716
<i>J. Ráczová, M. Hutta, J. Pessl</i>	Možnosti využitia TLC a IEC v kombinácii so skenovaním pre vývoj metód v HPLC analýze huminových látok	s719
<i>L. Remenárová, M. Pipiška, M. Horník, J. Augustín</i>	Mechanistic evaluation of Co and Zn sorption processes using equilibrium modeling, FTIR and SEM-EDX analysis	s722
<i>D. Rosinská</i>	Stanovenie syntetických farbív v mäsových výrobkoch	s729
<i>L. Ruprichová, M. Dračková, I. Borkovcová, B. Janštová, L. Vorlová</i>	Stanovení kaseinových frakcí v kozím mléce metodami HPLC a elektroforézou	s732
<i>J. Sádecká, E. Kolek</i>	Identifikácia markerov radiačného ošetrovania vlašských orechov ako potenciálnych komponentov pekárenských zmesí	s736
<i>J. Sádecká, P. Májek, D. Markechová</i>	Trojrozmerné fluorescenčné spektrá liehovín aromatizovaných borievkami	s742
<i>R. Serbin, M. Ursínyová, I. Uhnáková, Z. Hušeková</i>	Stanovenie foriem Hg v krvi systémom GC-ICP-MS	s746
<i>M. Ursínyová, I. Uhnáková, Z. Hušeková, R. Serbin, L. Wsólová</i>	Stanovenie Cd, Hg a Pb v krvi pre hodnotenie prenatálnej a postnatálnej expozície u detí	s747
<i>L. Staruch, M. Čertík, Z. Adamechová, S. Marcincák, I. Poustková</i>	Vplyv krmiva obohateného o ľanové semeno a klinček na profil mastných kyselín hydínového mäsa	s748
<i>B. Tobolková, J. Zemanová, P. Šimko</i>	The content of some elements in dietary supplements used for climacteric symptoms elimination	s752
<i>P. Török, M. Žemberyová</i>	Priame stanovenie bizmutu v pôdach a kaloch metódou ETAAS a jeho porovnanie s konvenčnými postupmi rozkladu vzoriek	s757
<i>F. Kačík, V. Veľková, L. Luštek, D. Kačíková</i>	Analýza zápachajúcich látok vznikajúcich pri výrobe buničín a papiera	s765

Chem. Listy 104, s796–s801 (2010)	ACP 2010 - Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi	Contents
<i>K. Ventura, P. Pavlíková, A. Eisner, M. Adam</i>	Aplikace dynamické mikroextrakce jednou kapkou pro analýzu bylinných silic	s771
<i>M. Vlčáková, M. Vieriková</i>	Analýza akrylamidu vo vybraných odrodách zemiakov metódou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou	s775
<i>J. Zemanová, J. Michalíček, E. Vítová</i>	Analysis of content compounds in extracts of <i>Echinacea purpurea</i>	s779
<i>E. Vítová, E. Hýsková, R. Mokáňová, J. Zemanová</i>	Změny chutnosti sýrů eidamského typu během zrání	s782
<i>A. Vránková, T. Škrámlíková, J. Widimský Jr., J. Škrha, Z. Jůzová</i>	Porovnání výsledků HPLC metod na stanovení metanefrinu a normetanefrinu z moče a z krevní plazmy vzhledem k diagnostice tumoru feochromocytomu	s784
<i>L. Vrtoch, M. Pipiška, M. Horník, J. Augustín</i>	Nové prístupy ku štúdiu kinetiky biosorpcie organických farbív	s788

AUTHOR INDEX

- Adam M. s504, s771
Adamechová Z. s748
Addová G. s640
Amann A. s546, s640
Amberger M. s552
Andraščíková M. s420, s535, s604
Augustín J. s659, s722, s788
- Babička L. s704, s711
Balla J. s676
Barek J. s401, s521, s563, s569, s634, s687
Batelková P. s536
Bednáriková A. s480, s537, s541, s649, s660
Bednárová A. s676
Behan T. s660
Beinrohr E. s405, s457
Belková R. s649
Beníková K. s542
Berek D. s406
Berek S. s514
Berezkin V. G. s546
Bieliková M. s599
Blaško J. s546, s640, s671
Borkovcová I. s536, s732
Borošová D. s680
Bova Š. s547
Božok M. s547
Broekaert J. A. C. s552
Budín L. s704
Budnikov H. s533
Buchtová H. s716
Bujdoš M. s461, s665
- Ciesarová Z. s649, s660
Cifrová S. s613
Ciganek M. s560
- Čabala R. s589
Čacho F. s408
Čertík M. s748
Červený V. s552
Čírka Ľ. s613
Čižmárik J. s415, s567
Čonka K. s430, s432
- Daňhel A. s521
Dejmková H. s528, s563
Denderz N. s567
Deýlová D. s569
Diviš P. s461
Dömötörövá M. s430, s432
- Dračková M. s716, s732
Drobná B. s430, s432
Dubajová J. s573
- Eisner A. s771
- Fabišiková A. s430, s432
Ferancová A. s542
Filip J. s496
Fischer J. s521
- Gallas L. s716
Garaj J. s450
Gemeiner P. s496, s619
Giniyatova E. s533
Góra R. s409, s421, s487
Górová R. s589, s671
Grambličková A. s410
Grolmusová K. s590
- Hagarová I. s461, s665, s698
Hájková J. s653
Halko R. s411, s421
Havelec P. s711
Havránek E. s658, s693
Havrlentová M. s599
Hegedüs O. s694
Hegedúsová A. s573, s694
Hercegová A. s420, s604
Hlinková A. s599
Hlúbiková S. s520
Horecká M. s491, s469
Horník M. s659, s722, s788
Horváth M. s552
Hosnedl T. s711
Hoza I. s580, s585
Hranická Z. s563
Hrdý P. s476
Hrivňák J. s609, s611
Hroboňová K. s415
Hroncová E. s416
Hrouzková S. s420, s535, s604
Huba J. s476
Hudec R. s457
Hušeková Z. s746, s747
Hutta M. s411, s409, s421, s424, s487, s719
Hýsková E. s782
- Chalányová M. s421, s424
Chovancová J. s430, s432
Chrprová D. s441
Chunsiimiyatav G. s580, s585
- Jakubík T. s618
Janáčková A. s613, s614, s615, s618
Jankovičová K. s503
Janštová B. s732
Júzová Z. s784
- Kačík F. s765
Kačíková D. s765
Kalaš J. s453
Kaňuchová-Pátková J. s611
Katrlik J. s619
Királyová Z. s445
Klincová M. s623
Klőslová Z. s573
Kočan A. s430, s432
Kolek E. s480, s537, s541, s627, s649, s736
Kolesárová L. s441
Kotasová M. s521
Koudelka Š. s631
Kouřimská L. s441, s653
Kováčiková Z. s671
Kožárová I. s497
Kraic F. s445
Kráľová K. s698
Kráľová Z. s634
Kráľovičová E. s609
Kravec J. s660
Krčmová E. s573
Krejčí L. s711
Kršáková M. s535
Krupčík J. s449
Kuban V. s580, s585
Kubincová J. s589
Kubinec R. s546, s640, s671
Kubová J. s461, s665
Kukurová K. s649, s660
- Labuda J. s450, s492, s542
Ladomerský J. s416
Lakatošová J. s609, s611
Laštincová J. s453
Legarová V. s441, s653
Lehotay J. s415, s470, s567
Lorenz W. s589, s640
Luštek Ľ. s765
- Machala M. s560
Machalec M. s455
Májek P. s493, s613, s657, s742
Makovinská J. s516
Málek A. s521
Manová A. s457

- Maráková K. s658, s693
Marcinčák S. s748
Marešová J. s659
Margetín M. s671
Marchalín Š. s493
Markechová D. s742
Marková L. s649, s660
Masár Š. s599
Mašek J. s631
Máté D. s497
Matisová E. s420
Matúš P. s461, s665
Mazáč J. s704
Méhes A. s704
Melichová Z. s680
Meľuchová B. s589, s671
Michalec M. s671
Michalíček J. s779
Mikuš P. s658, s693
Mislovičová D. s619
Mocák J. s445, s464, s470, s676
Mokáňová R. s782
Monošíková M. s469
Mrázová V. s676
- Nagyová I. s680
Navrátilová Z. s563
Neča J. s560
Němcová L. s528, s687
Nemec I. s658, s693
Nemeček P. s470
Neuzil J. s631
- Obernauer J. s475
Olejníková P. s493
Ostrovský I. s546, s589, s640
- Pagáč M. s424
Pánek J. s441
Pánik M. s476
Pavlík V. s694
Pavlíková P. s771
Pecková K. s401, s521, s634
Pěničková K. s560
Pessl J. s719
Peško M. s698
Pipiška M. s659, s722, s788
Píš L. s469, s657
- Podolec P. s546
Polovka M. s480
Pospiech M. s716
Poustka J. s704, s711
Poustková I. s704, s711, s748
Procházková Z. s716
Puliš P. s547
Pysarevska S. s614
- Rábarová E. s464
Ráczová J. s421, s719
Radová J. s521
Remenárová L. s722
Repka V. s611
Rohárik P. s409, s421, s487
Rosinská D. s729
Rovný I. s491
Ruprichová L. s732
- Sádecká J. s657, s742
Sádecká J. s736
Saláková A. s716
Serbin R. s746, s747
Skláršová B. s480, s537, s541
Soják L. s546, s640, s671
Stachová Sejáková Z. s430, s432
Stankovská M. s627
Staruch L. s704, s711, s748
Suhaj M. s627
Szabóová A. s546
- Šefčovičová J. s496
Šilhárová K. s516
Šimko P. s480, s537, s541, s660, s752
Šimková D. s492
Škrabana R. s619
Škramlíková T. s784
Škrha J. s784
Škubák J. s567
Šmídová O. s476
Špánik I. s613, s614, s615, s618
Štecová A. s613
Šusterová Z. s615
Švorc L. s493
- Takácsová G. s494
Tarapčík P. s450
- Tkáč J. s496
Tkáč M. s590
Tkáčiková S. s497
Tobolková B. s752
Török P. s757
Tóthová E. s493
Tremlová B. s716
Turánek J. s631
Turánek-Knötigová P. s631
- Uhnáková I. s746, s747
Ulbrich P. s503
Ursinyová M. s746, s747
- Valasek P. s580, s585
Valášková I. s658, s693
Varga R. s476
Vargová V. s671
Vasarábová H. s618
Vassányi Z. s573
Veľková V. s765
Ventura K. s504, s771
Vetříková Z. s589
Vieriková M. s775
Višňovský J. s589
Vítková M. s469
Vítová E. s779, s782
Vlčáková M. s775
Vodný Š. s514
Vorlová L. s536, s716, s732
Vrábel V. s493, s515
Vrana B. s516
Vránková A. s784
Vrbová M. s520
Vrtoch L. s788
Vykopalová L. s560
Vyskočil V. s521
- Waisser K. s470
Widimský Jr. J. s784
Wsólová L. s747
- Zemanová J. s752, s779, s782
Zima J. s528, s687
Ziyatdinova G. s533
- Žemberyová M. s757