

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

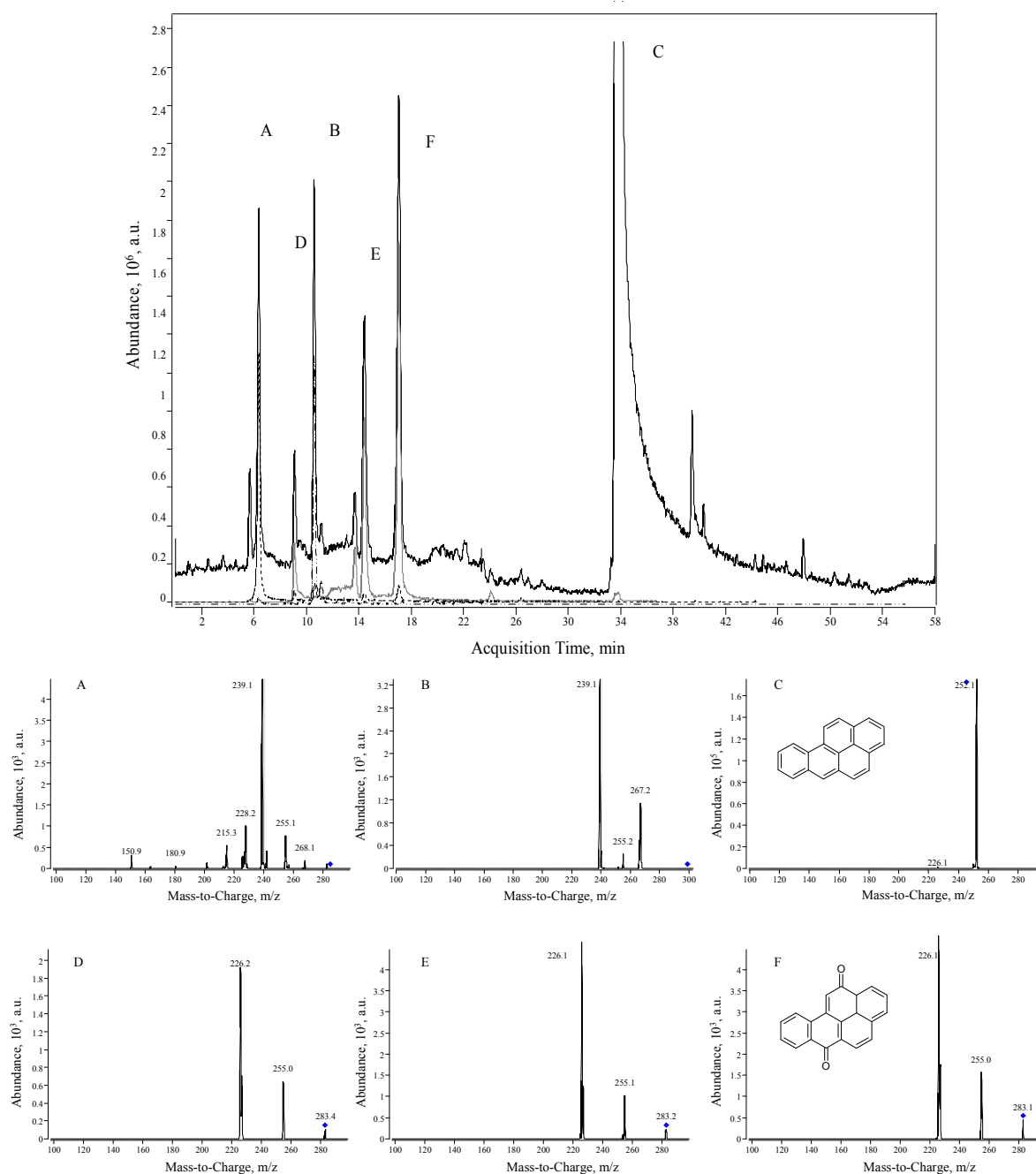


Fig. 1. Overlaid extracted ion chromatograms (m/z : 253, 283, 285, 299) of photolysed ethanolic solution of BaP ($c = 20 \text{ mg l}^{-1}$) with fragmentation pattern for most abundant peaks at collision energy 40 eV; (A) RT= 6.3 min, unknown, $m/z \sim 285$; (B) RT= 10.5 min, unknown, $m/z \sim 299$; (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 oxidised compounds were studied. The set of model representatives of potential oxidised 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

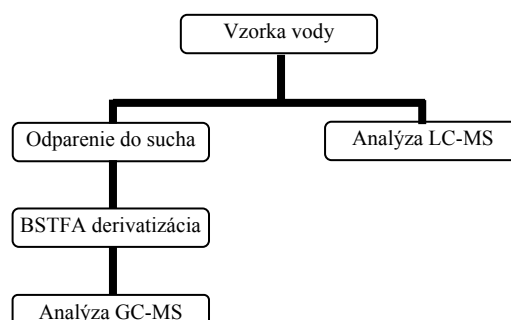
**MILAN BOŽOK, ŠTEFAN BOVA
a PAVEL PULIŠ**

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

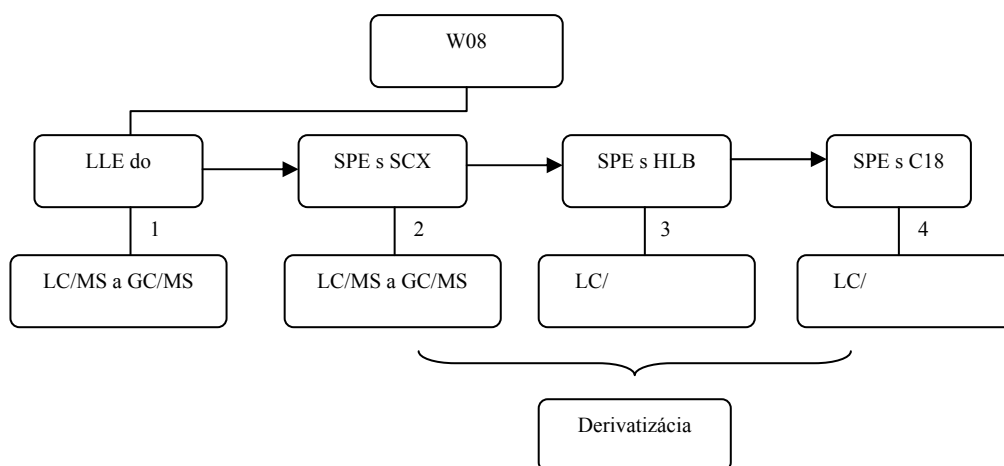
Na analýzu bolo použité 10 ml vzorky vody. V prvom poradí sa využila extrakcia do kvapaliny, LLE. Do 20 ml vialky bolo vložené 10 ml vzorky a 5 ml dichlórmetanu. Vialka po uzatvorení bola sonifikovaná po dobu 15 min, následne sa nechala 5 min odstáť. Príprava pokračovala vytrepávaním po dobu 15 min. 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

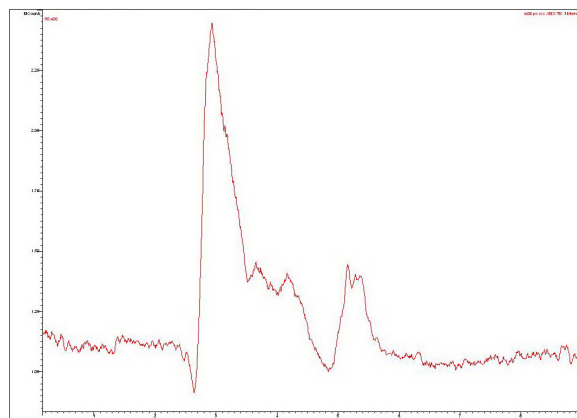


Obr. 2. Schéma analýzy vodnej vzorky pri kombinovanej kontaminácii

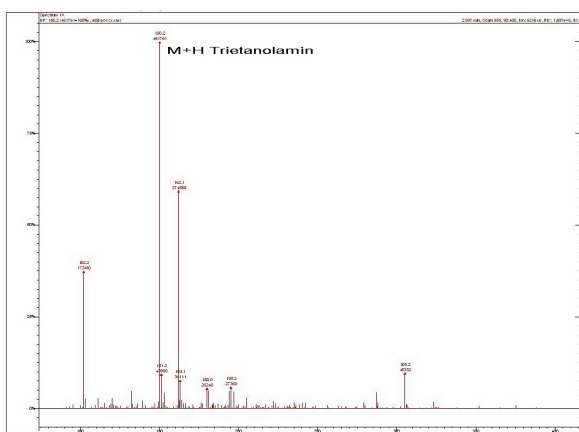
Výsledky a diskusia

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

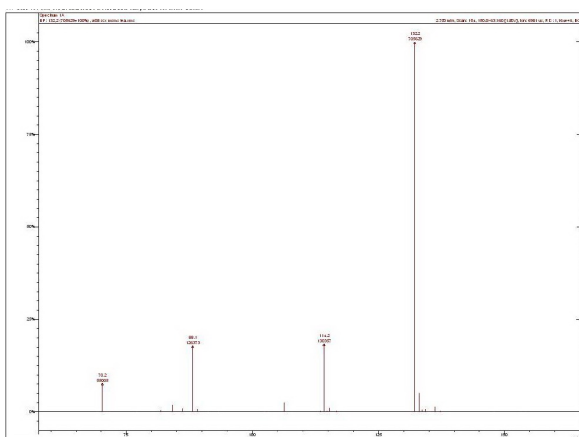
a porovnaním s knižnicou OPCW e-vgwd_2008. V oboch prípadoch bola prítomnosť analytu potvrdená s úplnou zhodou spektrálnych záznamov.



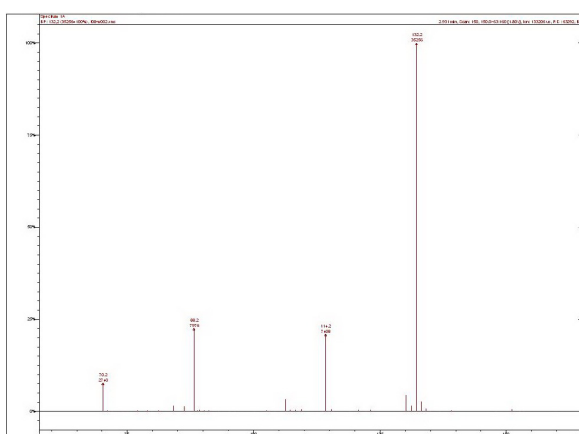
Obr. 3. LC-MS-ESI chromatogram extraktu z SCX



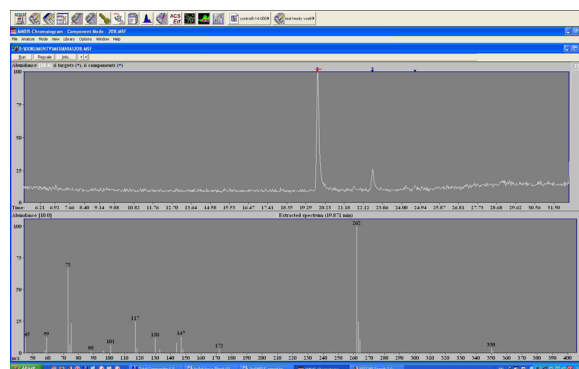
Obr. 4. Spektrum extraktu z SCX meraného pomocou LS-MS-ESI



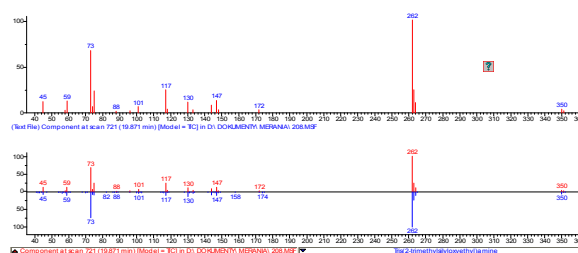
Obr. 5. MS-MS spektrum hmoty 150 vzorky po SCX meraného pomocou LS-MS-ESI



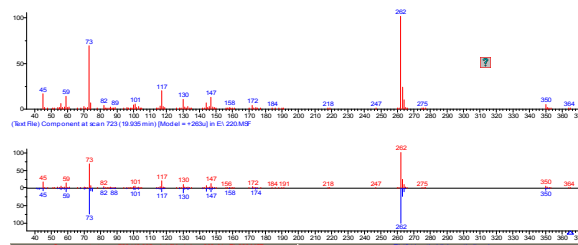
Obr. 6. MS-MS spektrum hmoty 150 štandardu trietanolamínu meraného pomocou LS-MS-ESI



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 DETEKCI

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 spektroskopická 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)

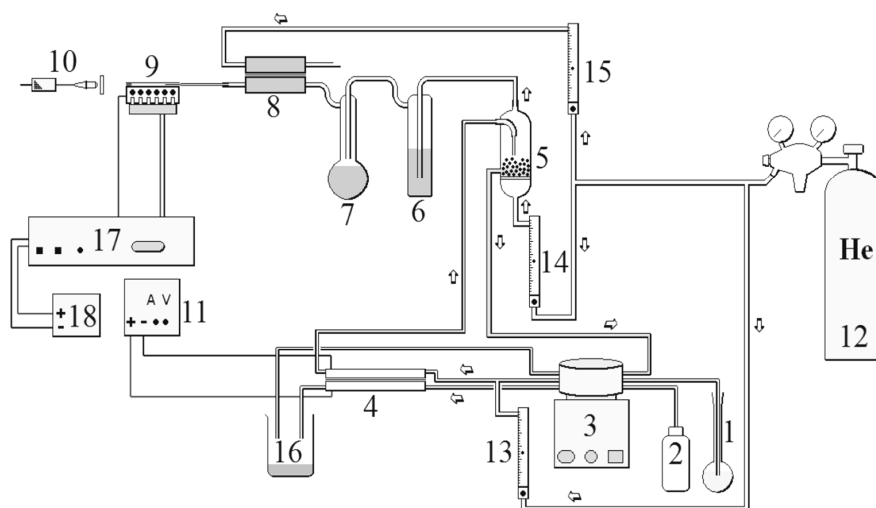
EcMCVG bylo realizováno v elektrochemickém generátoru popsaném v článku¹⁰. Tento generátor je vyroben z plexiskla (Řempe Net, Česká republika) a má dva elektrodové prostory o rozměrech $3 \times 3 \times 100$ mm. Ty byly navzájem odděleny iontově výměnnou membránou Nafion®117 (Aldrich, USA). Pt (99,999%, 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 plyné 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 plyných 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 plyné 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 bolo prokázáno pripojením druhého výstupu tohoto odstraňovače H₂ do MSP, pričomž žiadny 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 prvokově-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 napálena 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, pričomž 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

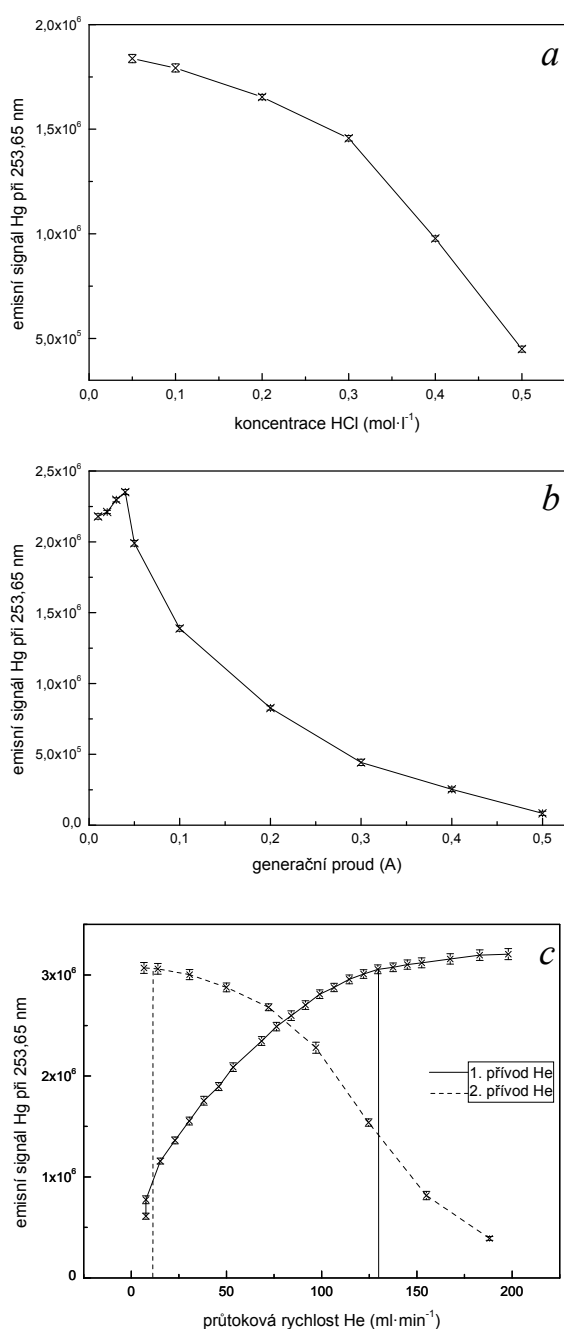
Tři přívody He na různých místech aparatury (obr. 1) mají různé funkce. Nejdůležitější z nich byl ten první, který ústí před generátor studené páry rtuti. He zde nemělo jen funkci nosného plynu, ale sloužilo také k desorpci Hg z povrchu katody. Jak je znázorněno na obr. 3c, byl optimální průtok 130 ml 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} .

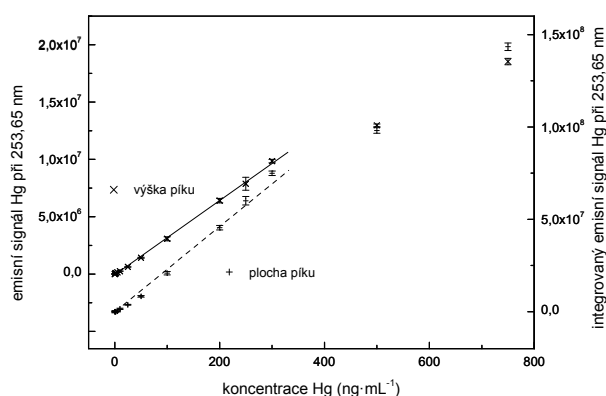
Závislost signálu na průtoku He třetím přívodem nebyla tak strmá. Bylo nutné zachovat v přívodní trubici malý přetlak, který ale musel být nižší než v plasmovém kanálu. Jako optimální byl zvolen průtok 20 ml min^{-1} , ale ne všechno He z tohoto kanálu procházelo membránou do plasmového kanálu.

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} ; $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ HCl v katodovém roztoku; integrační čas 200 ms; c) Vliv průtoku He; $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ 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} $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ 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 záhytu pomocí optické emisní detekce. Mez detekce navrhovaného stanovení ($1,1 \text{ ng ml}^{-1}$) je devětkrát lepší, ale lineární část kalibrační křivky ($3,7\text{--}300 \text{ ng ml}^{-1}$) je kratší než je uvedeno v článku se stejným budicím 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.

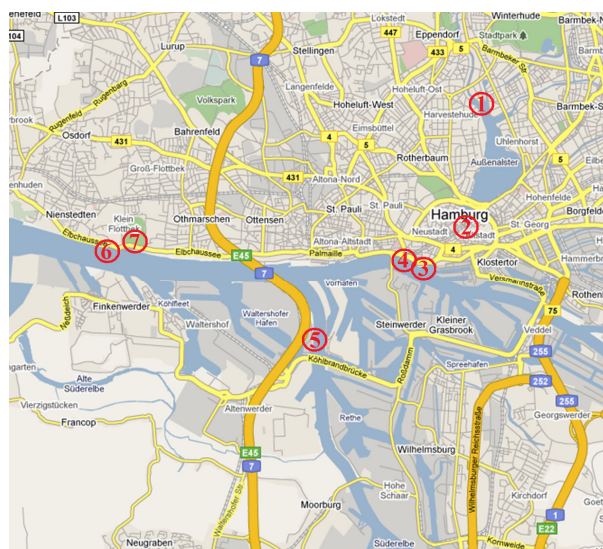
Studie ukazuje, že EcMCVG je více náchylná na interference než CMCVG při stejné použité detekční technice (MSP-OES).

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 NaBH_4 nebo SnCl_2 . 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 × 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

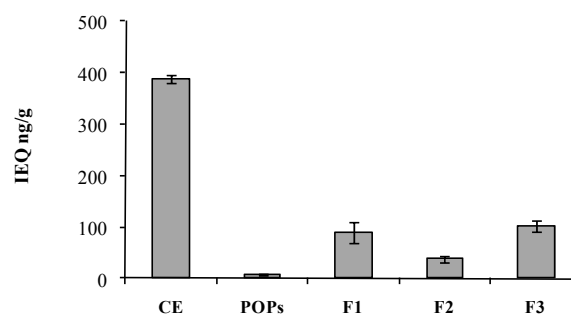


Fig. 1. Dioxin like toxicity of SRM 1650b expressed as their AhR activity

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. Švihálková-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., Švihálková-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., Čvihálková-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	$5.8 \cdot 10^{-6}$

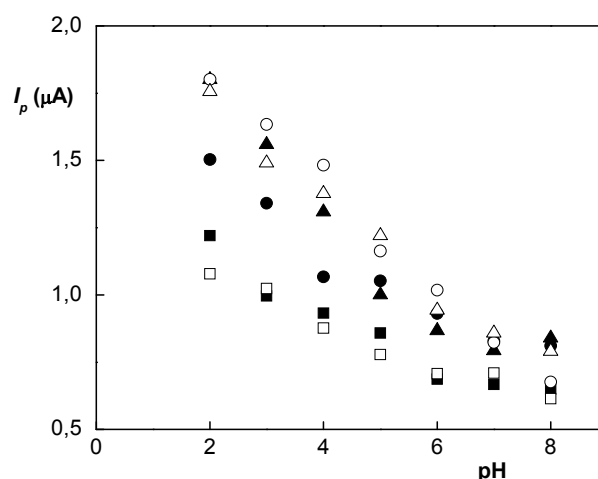


Fig. 1. Dependence of peak current on pH of the supporting electrolyte; ■ 2-NP, unmodified electrode; ▲ 2-NP, MMT-CPE; ● 2-NP, SEP-CPE; □ 4-NP, unmodified electrode; △ 4-NP, MMT-CPE; ○ 4-NP, SEP-CPE. DPV, supporting electrolyte B-R buffer, analyte concentration $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, scan 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.

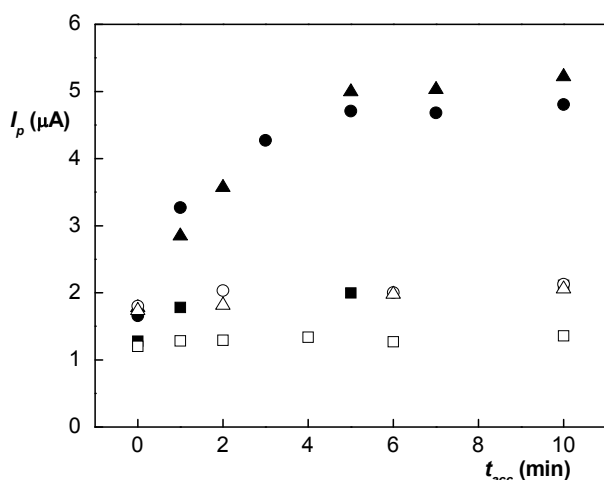


Fig. 2. Dependence of the peak current of 2-NP and 4-NP on the accumulation time; ■ 2-NP, unmodified electrode; ▲ 2-NP, MMT-CPE; ● 2-NP, SEP-CPE; □ 4-NP, unmodified electrode; △ 4-NP, MMT-CPE; ○ 4-NP, SEP-CPE. AdSV, supporting electrolyte B-R buffer pH 2, scan rate 20 mV s^{-1} , pulse amplitude 50 mV 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

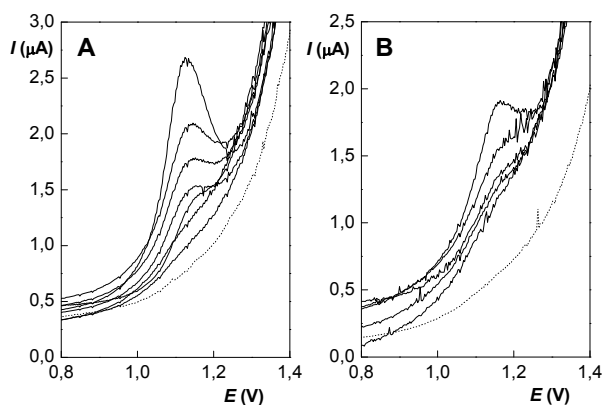


Fig. 3. Voltammograms of the lowest detectable concentrations of 2-NP (A) (AdSV, MMT-CPE, concentration 1; 2; 4; 6; 8; 10 and $20 \mu\text{mol L}^{-1}$) and 4-NP (B) (DPV, MMT-CPE, concentration 4; 6; 8; 10 and $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), dotted line corresponding to blank. Supporting electrolyte B-R 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 ČÍZMÁRIK^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-1and 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

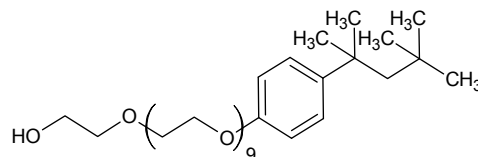
Úvod

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.

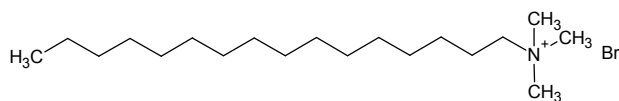
Cílem této práce bylo ověřit, jak ovlivňují povrchově aktivní látky elektroanalytickou odezvu 5-NBIA na pevně leštěné stříbrné amalgamové elektrodě (p-AgSAE) a merniskem modifikované pevně leštěné stříbrné amalgamové elektrodě (m-AgSAE). Tyto elektrody jsou na rozdíl od rtuťové kapkové elektrody, užívané 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.

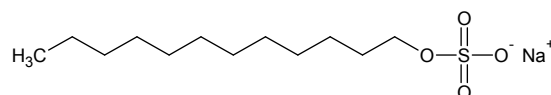
Dobrá rozpustnost, vysoká konduktivita, stálost, nízká toxicita a dobrá elektroanalytická stabilita činí tyto látky výhodnou variantou pro mnoho aplikací. V analytické chemii přítomnost povrchově aktivních látek ovlivňuje měřené parametry, což mnohdy vede k vypracování nových postupů a metod stanovení. 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 (dále BR-pufr) o pH 2–12 byl připraven obvyklým způsobem, tj. smísením kyselých složek obsahující kyselinu boritou, octovou a fosforečnou o koncentraci $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ a zásadité složky obsahující $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ 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 mol l^{-1} 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

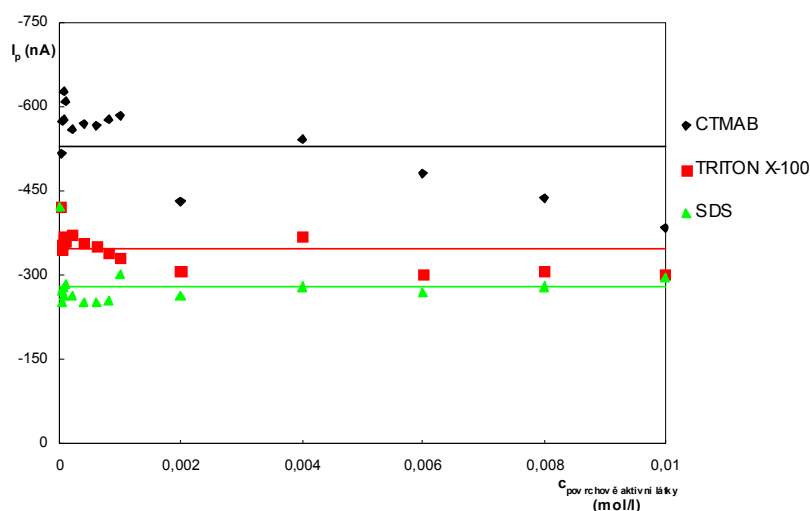
vytvořil meniskus (m-AgSAE). Před měřením byly elektrody elektrochemicky aktivovány v míchaném roztoku $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ KCl při potenciálu -2200 mV po dobu 300 s . Před každým měřením byl povrchu elektrody regenerován a to přepínáním potenciálu vždy po $0,1 \text{ s}$ mezi 0 mV a -1200 mV pro 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 uchovávána 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.

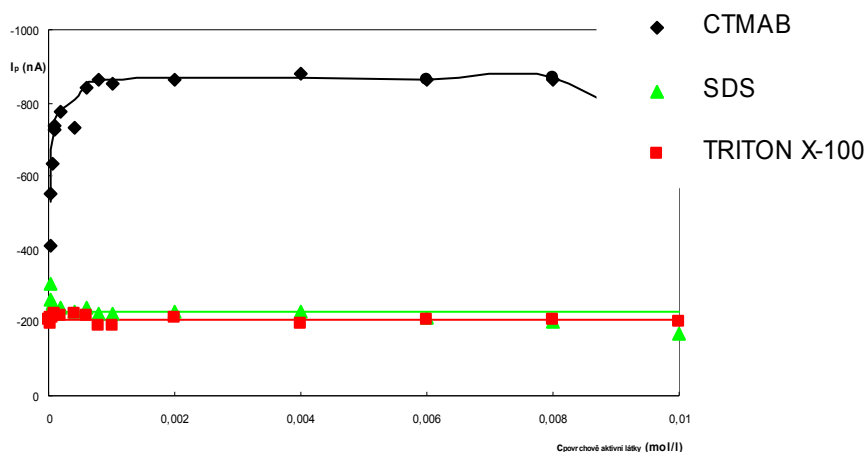
Výsledky a diskuse

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 voltamogramu pozorovatelný jen jeden nejvyšší, dobře vyvinutý pík 5-NBIA.

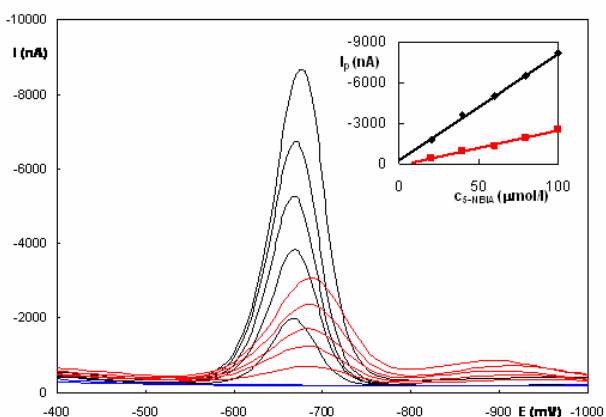
Dále bylo třeba zjistit, jestli má na výšku píku 5-NBIA vliv přidávek povrchově aktivních látek (obr. 4 a 5). U obou elektrod můžeme pozorovat pokles signálu při přidávku SDS a Tritonu X-100. Tento pokles není výrazný a s měnící se koncentrací povrchově aktivní látky se příliš nemění. Odlišně se chová CTMAB. Na m-AgSAE můžeme pozorovat vzrůst signálu 5-NBIA při nejnižších koncentracích a pak jeho následného pokles při vyšších kon-



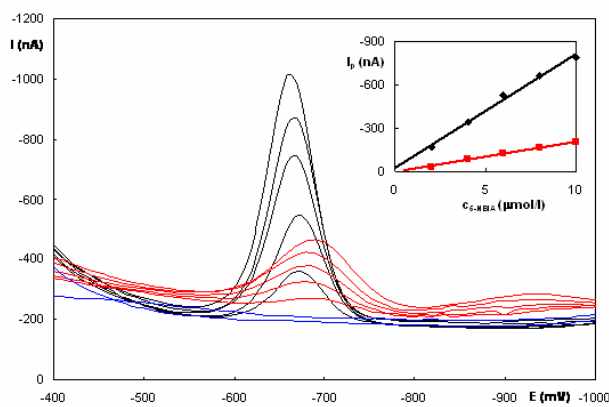
Obr. 4. Závislost výšky DPV píku 5-NBIA ($c=1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) na m-AgSAE v BR-pufu o pH 8 na koncentraci povrchově aktivní látky



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.

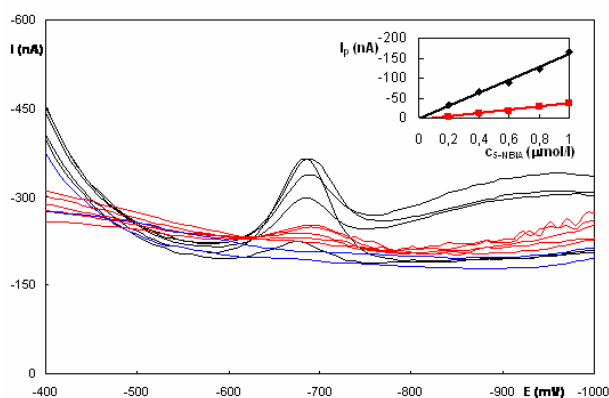
Závěr

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	$c_{5\text{-NBIA}} [\text{mol l}^{-1}]$	$c_{\text{CTMAB}} [\text{mol l}^{-1}]$	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 ($(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) v přítomnosti CTMAB ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) (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 $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ v přítomnosti CTMAB a $4,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ 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 koksovniach, u zlievačov hliníka a u pokrývačov striech sa dáva do súvislosti práve s expozíciou sadziám. 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 zaťažených 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-hydroxypyrene 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)pyrénu 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 časticách 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 dávkaný 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 zakoncentrováva 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 zlúčenín 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 vyhlásenia 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).
- Prousek 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 uhlíkovodíkov (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 uhlíkovodíkov 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 µl) 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 prodelphinidin (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 $30\,000 \text{ Bq cm}^{-2}$ 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 neprehavých 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 prehavých 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 prehavých 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

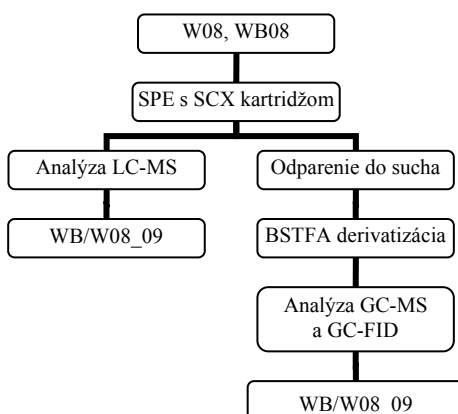
Acetonitril čistoty LC-MS, výrobca Merck, dichlórmetán čistoty LC-MS, výrobca Merck, kyselina trifluórotová (TFA), čistoty HPLC grade, výrobca Fischer Scientific, metanol čistoty LC-MS, výrobca Merck, derivatizačné činidlo N,O-Bis(trimetylsilyl)trifluoacetamid – BSTFA, čistoty na derivatizáciu, výrobca 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 inaktívovanej *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

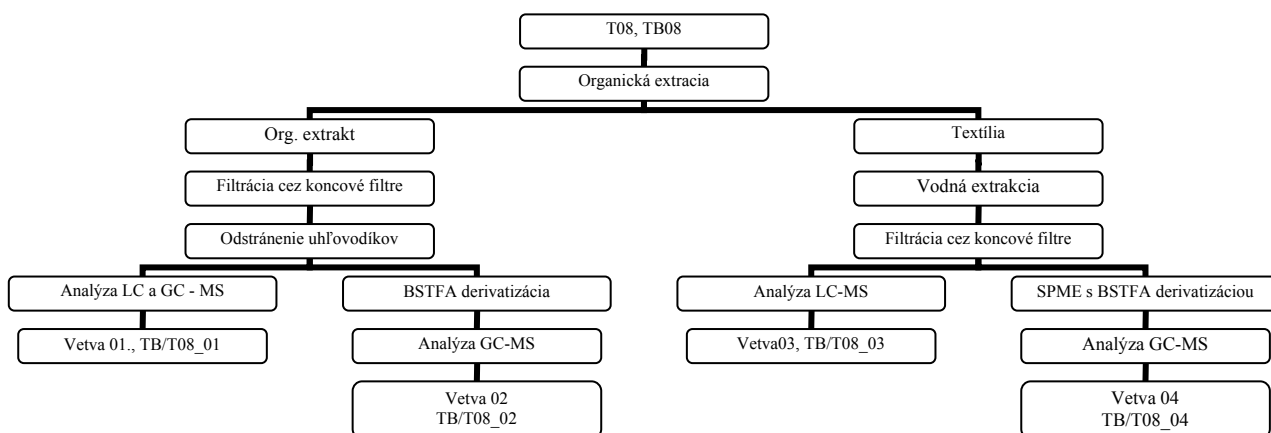
LC-MS-ESI údaje boli namerané na prístroji Varian 1200L Quadrupol MS. Vzorka bola injektovaná o objeme 20 µl. Mobilná fáza bola zložená z roztoku A – 0,01% roztok kyseliny trifluóroctovej v acetonitrile a roztoku B – 0,01% roztok kyseliny trifluóroctovej v ultračistej vode. Používala sa gradientová elúcia: 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-

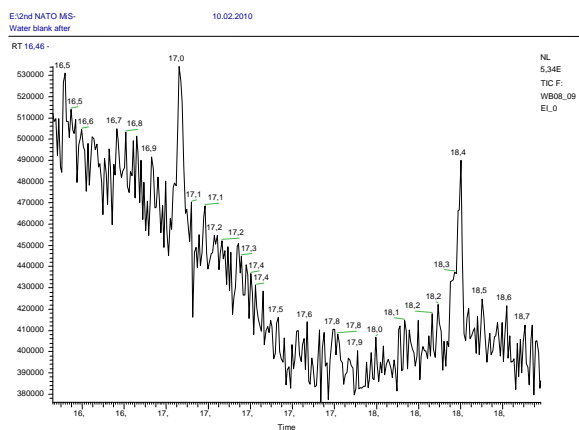
tomnosť neznámej látky označenej ako Chemical A (obr. 15) vo vodnej vzorke. Táto látka sa nenachádzala vo vodnej referenčnej vzorke (viď obr. 14). Molekulová hmotnosť Chemical A bola 149. MS spektrum neznámej látky Chemical A obsahuje jednoznačne dominantný MH⁺ ión *m/z* 150 a MNa⁺ ión *m/z* 172, ako 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).

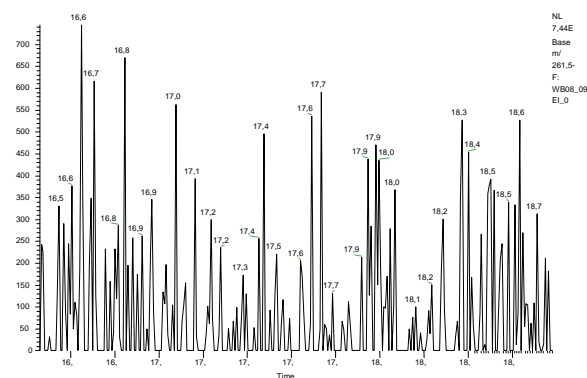
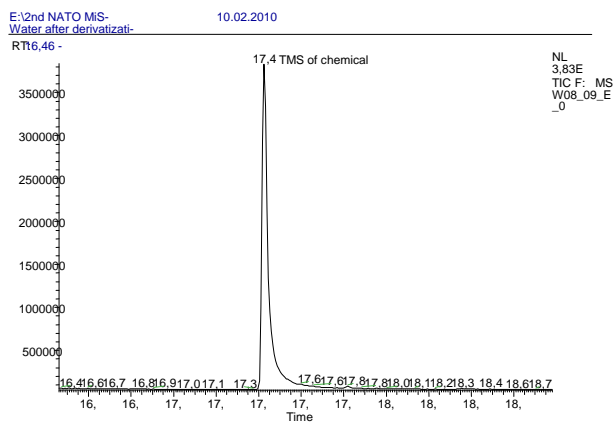
3.2. Textilná vzorka

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.

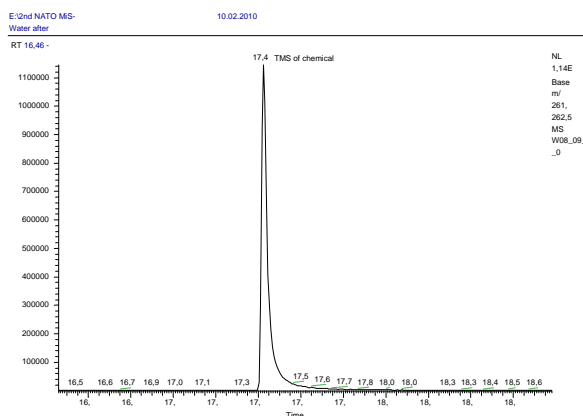
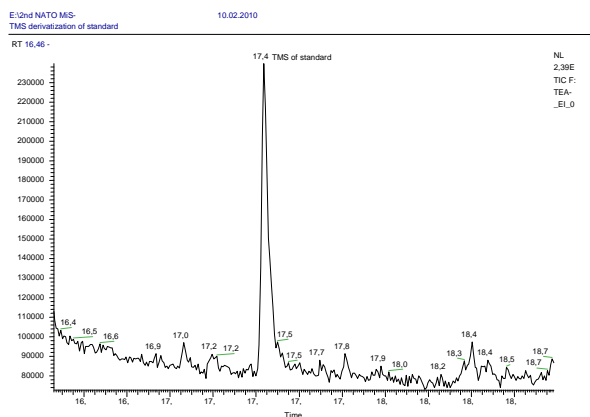
Až pri GC-MS-EI analýze vodného extraktu T08_04 pomocou polyakrylového bieleho fibra (SPME) a vykonaní derivatizácie bola nájdená neznáma látka označená ako Chemical B (obr. 20, 23) v derivatizovanej forme.



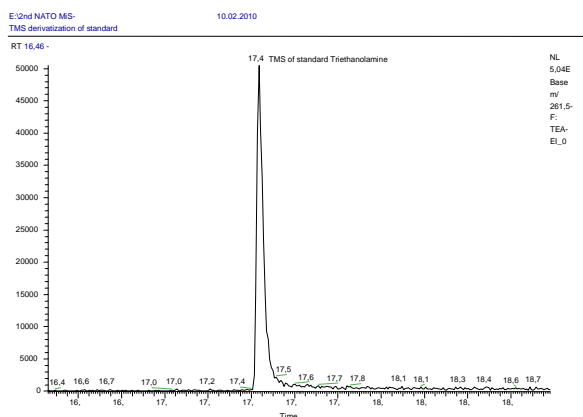
Obr. 3. TIC chromatogram vodnej referenčnej vzorky WB08_09 po BSTFA derivatizácii

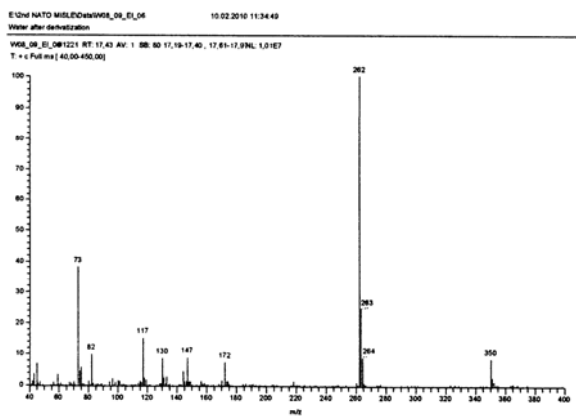
Obr. 6. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 262) vodnej referenčnej vzorky WB08_09 po BSTFA derivatizácii

Obr. 4. TIC chromatogram vodnej vzorky W08_09 po BSTFA derivatizácii

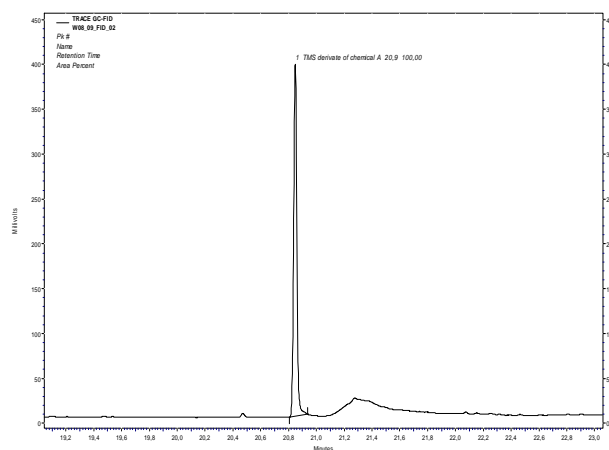
Obr. 7. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 262) vodnej vzorky W08_09 po BSTFA derivatizácii

Obr. 5. TIC chromatogram štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii

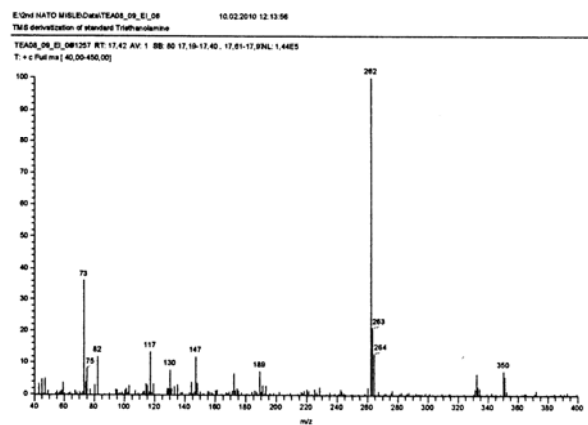
Obr. 8. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 262) štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii



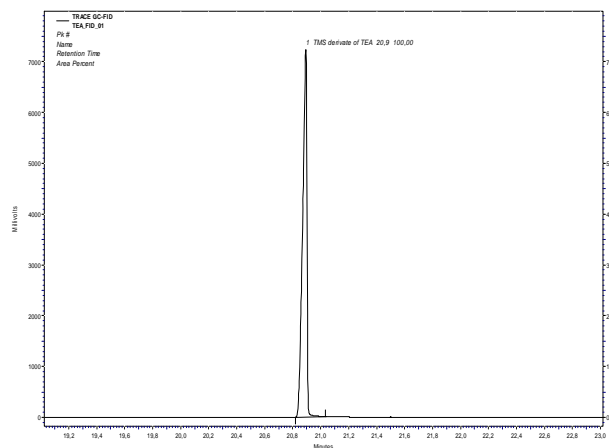
Obr. 9. EI hmotnostné spektrum Chemical A po BSTFA derivatizácii



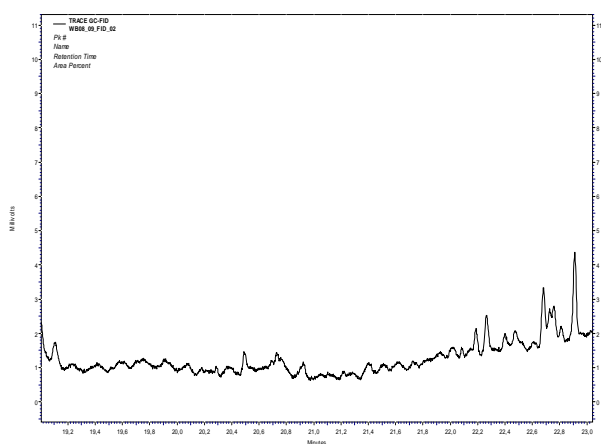
Obr. 12. GC-FID chromatogram vodnej vzorky W08_09 po BSTFA derivatizácii



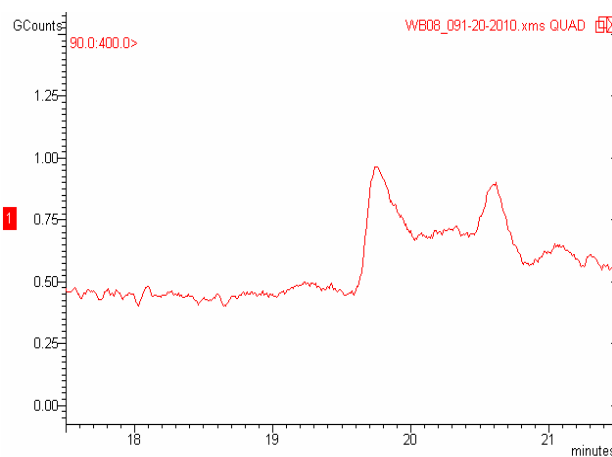
Obr. 10. EI hmotnostné spektrum štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii



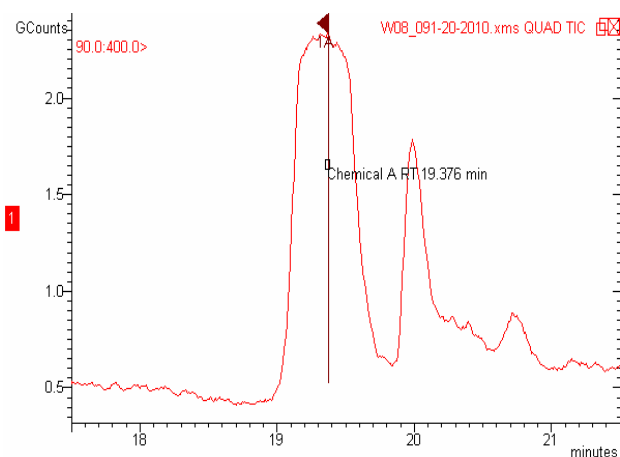
Obr. 13. GC-FID chromatogram štandardu trietanolamínu po BSTFA derivatizácii



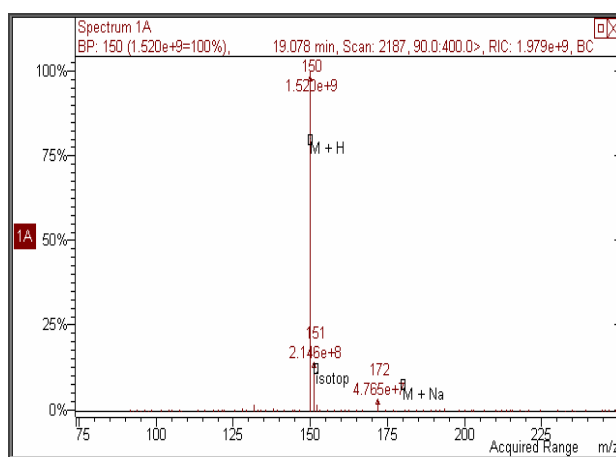
Obr. 11. GC-FID chromatogram vodnej referenčnej vzorky WB08_09 po BSTFA derivatizácii



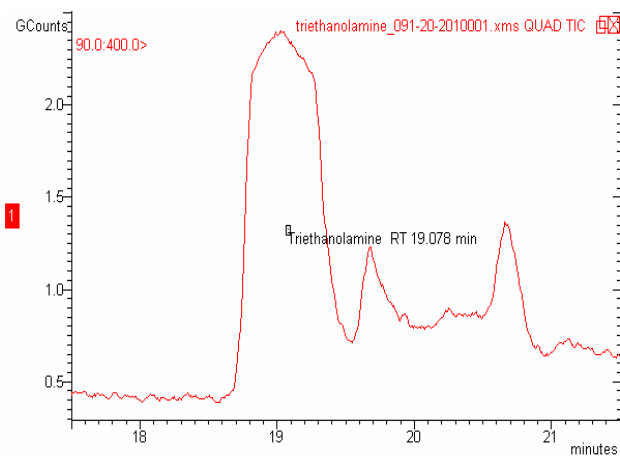
Obr. 14. LC-MS-ESI chromatogram vodnej referenčnej vzorky WB08_09



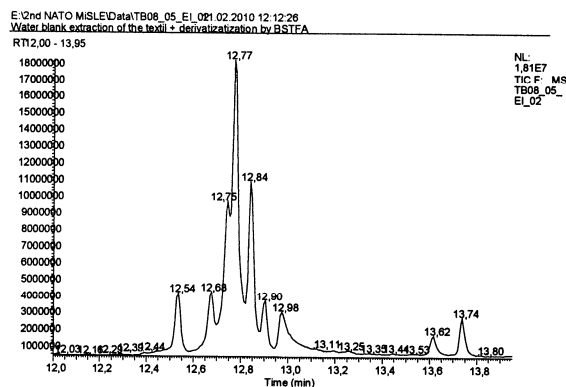
Obr. 15. LC-MS-ESI chromatogram vodnej vzorky W08_09 Chemical A



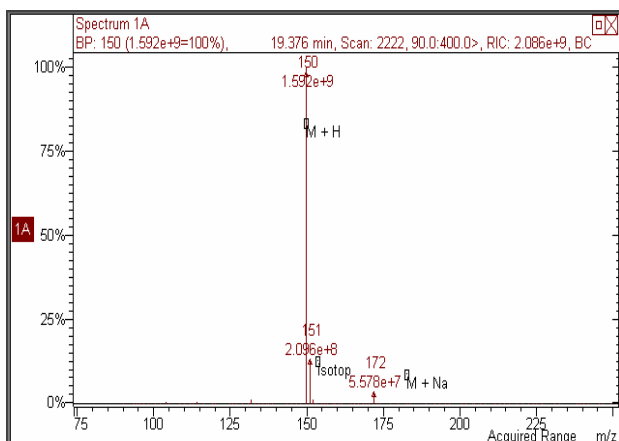
Obr. 18. Spektrum štandardu trietanolamínu meraného pomocou LS-MS-ESI



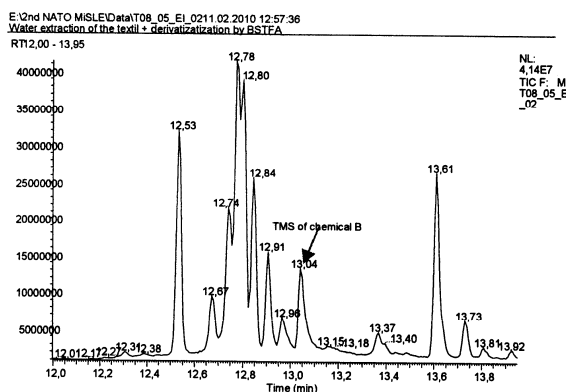
Obr. 16. LC-MS-ESI chromatogram štandardu trietanolamínu



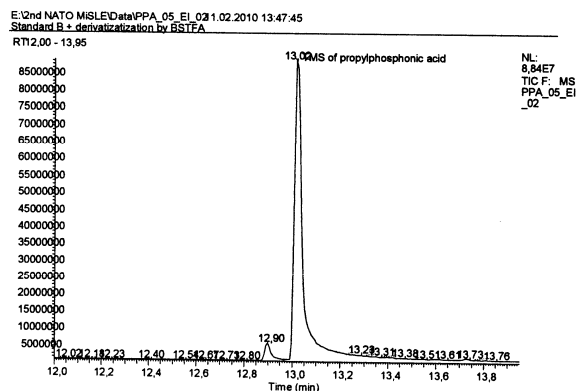
Obr. 19. TIC chromatogram textilnej referenčnej vzorky TB08_04 po BSTFA derivatizácii



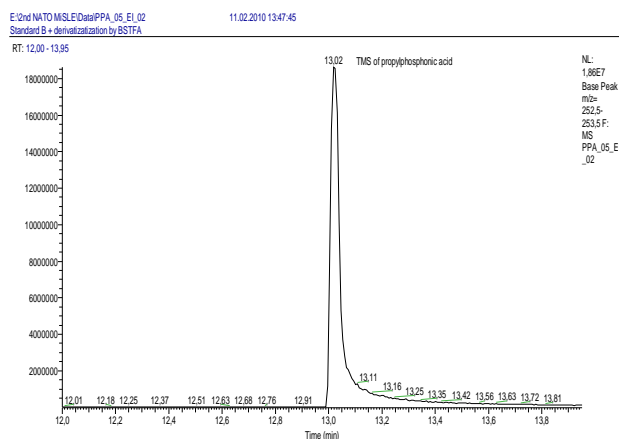
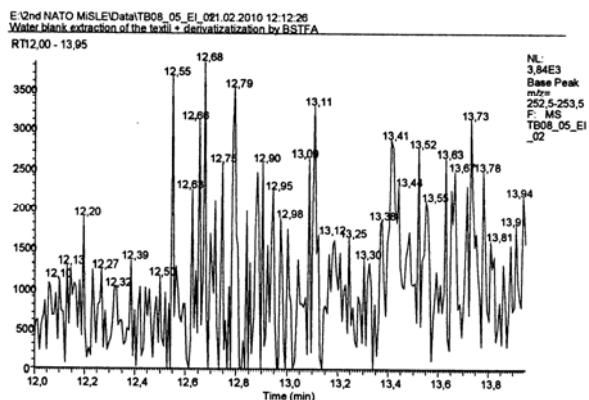
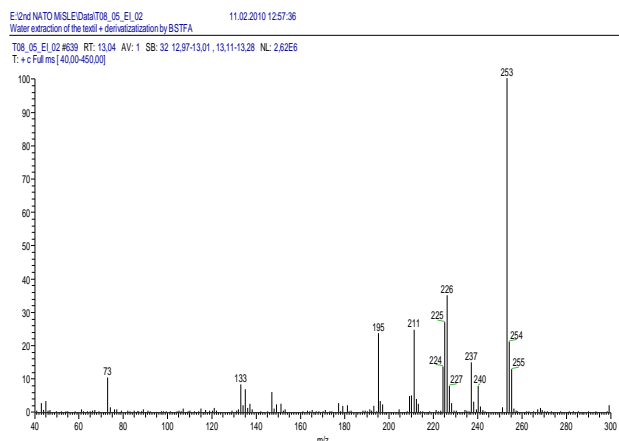
Obr. 17. Spektrum Chemical A nájdenej pomocou LS-MS-ESI vo vodnej vzorke



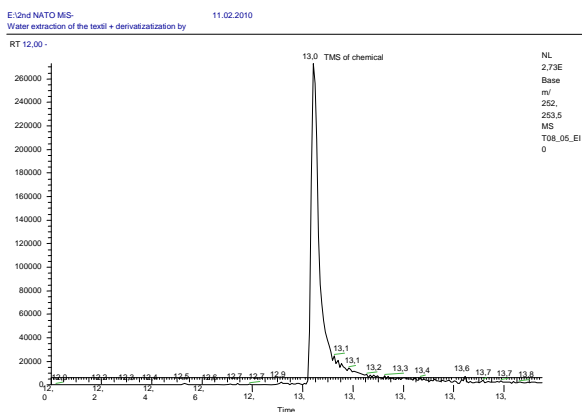
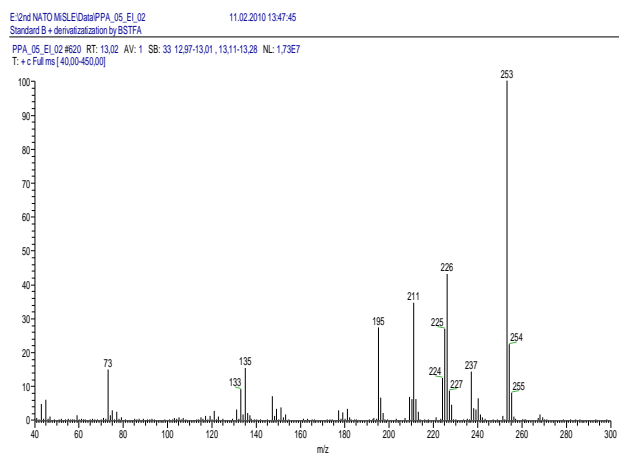
Obr. 20. TIC chromatogram textilnej vzorky T08_04 po BSTFA derivatizácii



Obr. 21. TIC chromatogram štandardu kyseliny propylfosforitej po BSTFA derivatizácii

Obr. 24. EI chromatogram extrahovaného iónu (m/z 253) štandardu kyseliny propylfosforitej po BSTFA derivatizáciiObr. 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 inaktívácie 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 skriningu, 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
havrletova@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 chromatography^{2–5} 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. Ehrendorfer, 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 μl blank sample extract + 25 μl TPP ($6 \mu\text{g ml}^{-1}$) + 25 μl HEPT ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) + 25 μl 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	<i>t_r</i> [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 hriwnak@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).

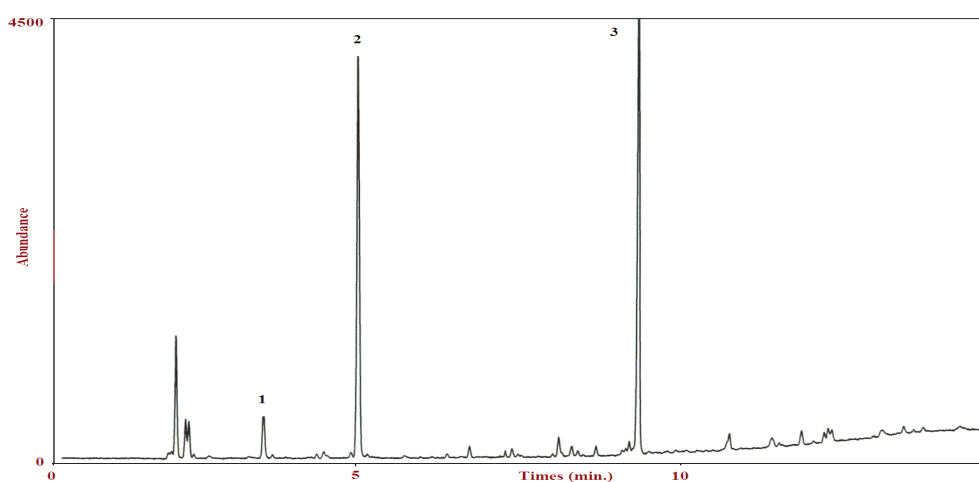


Fig. 1. Chromatogram of a planar leather sample. Peaks: (1) acetone, (2) methylisopropylketone, (3) isopropylbenzene

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.

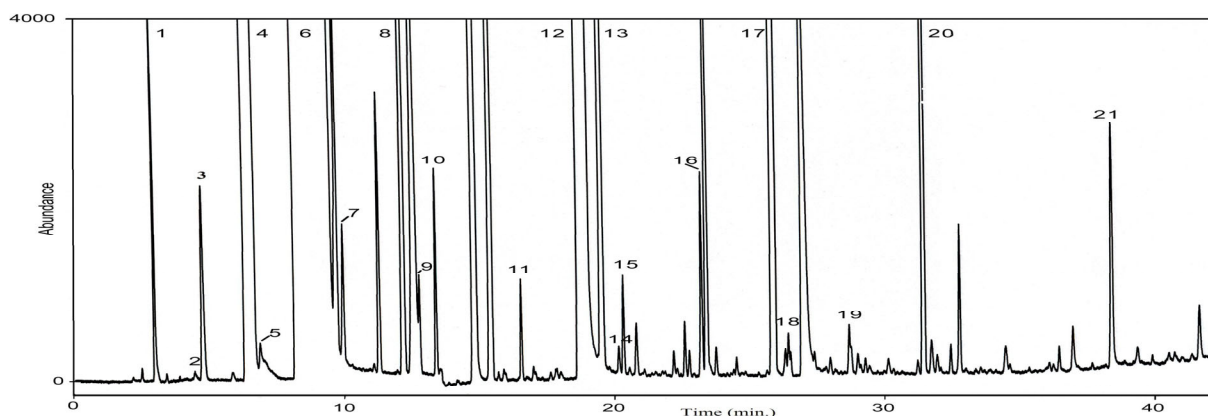


Fig. 1. **Chromatogram of wine aroma compounds** ('GrünerVeltliner', Slovak origin); Peaks: (1) acetaldehyde; (2) acetone; (3) methylacetate; (4) ethylacetate; (5) 2-butanon; (6) ethanol; (7) propylacetate; (8) i-butylacetate; (9) propanol; (10) butylacetate; (11) butanol; (12) i-amylalkohol; (13) ethylhexanoate; (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 4x 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 dvojrozmernou 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
katrlrik@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, glukamylázu (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.

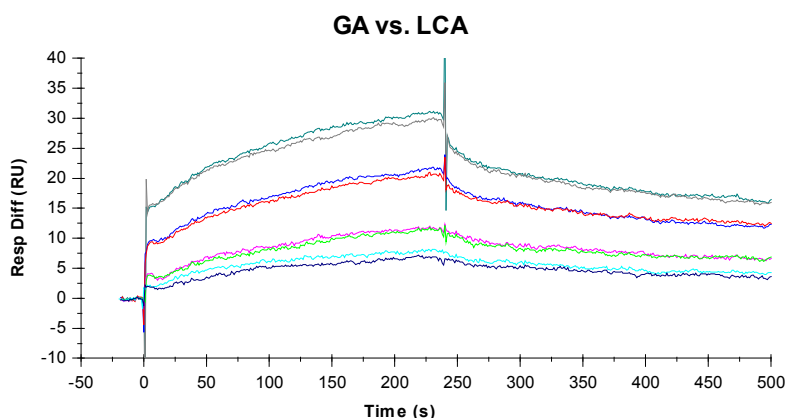
Samotné interakcie boli sledované pri prietokovej rýchlosti 50 $\mu\text{l min}^{-1}$, ako interakčný pufr bol použitý 10 mM HEPES (Sigma) pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,005 % detergent P-20 (GE Healthcare). Sériové riedenia glykoproteínov v interakčnom pufrí v rozsahu koncentrácií 22 až 1800 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 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.

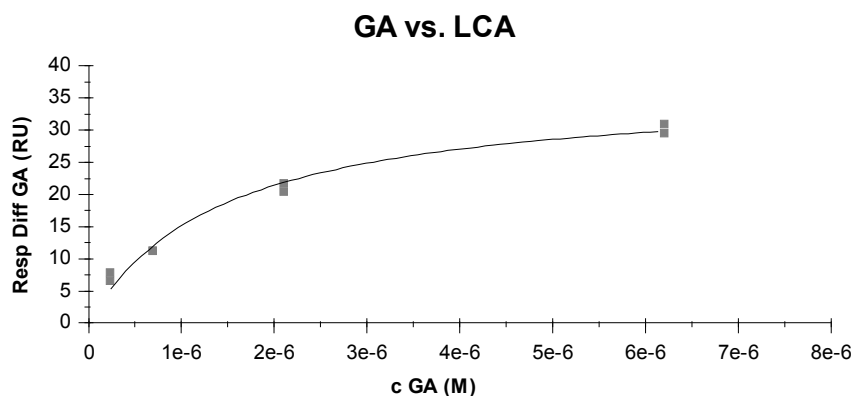
Podarilo sa pripraviť lektínové biočipy, najsť optimálne pracovné podmienky pre interakciu s glykoproteínmi a regeneráciu, a namerať disociačné konštanty K_D interakcií lektín – glykoproteín, ktoré boli v rozmedzí 10⁻⁵–10⁻⁷ M. Tieto hodnoty sú v súlade s už publikovanými hodnotami K_D pre interakciu 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-



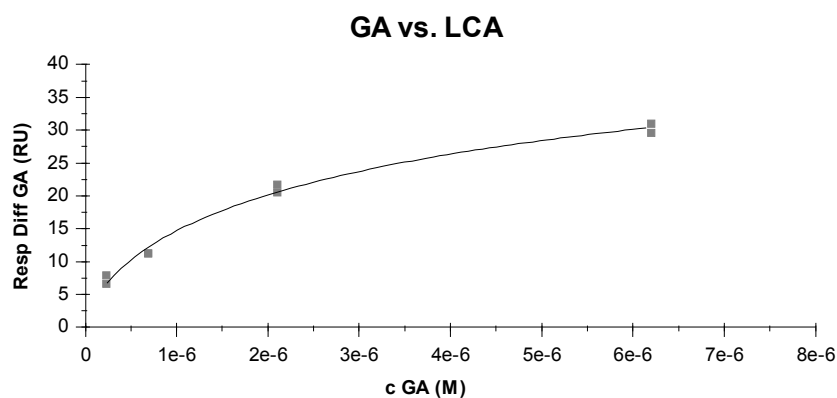
Obr. 1. Senzogram interakcie GA na LCA biočipe. Koncentrácie GA boli 6,2 μM , 2,1 μM , 0,69 μM a 0,23 μM , každá bola nastreknutá dvakrát. Najvyššej koncentrácii zodpovedá najvyššia odozva

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, glukozamyláza 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:

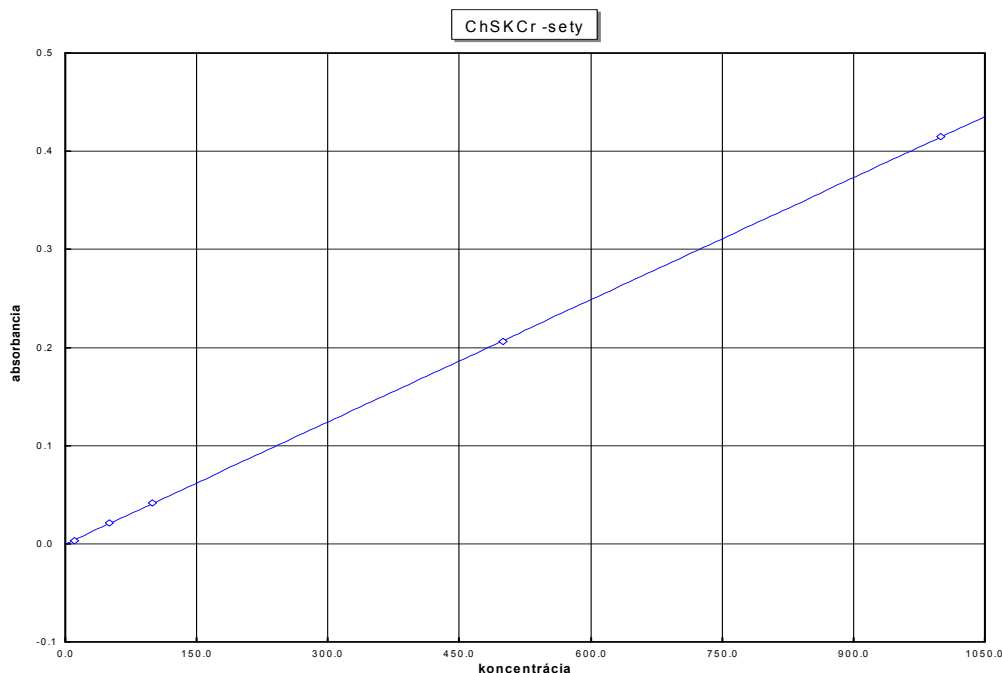
- rozsah a linearita,
- neistota merania,
- správnosť,



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.

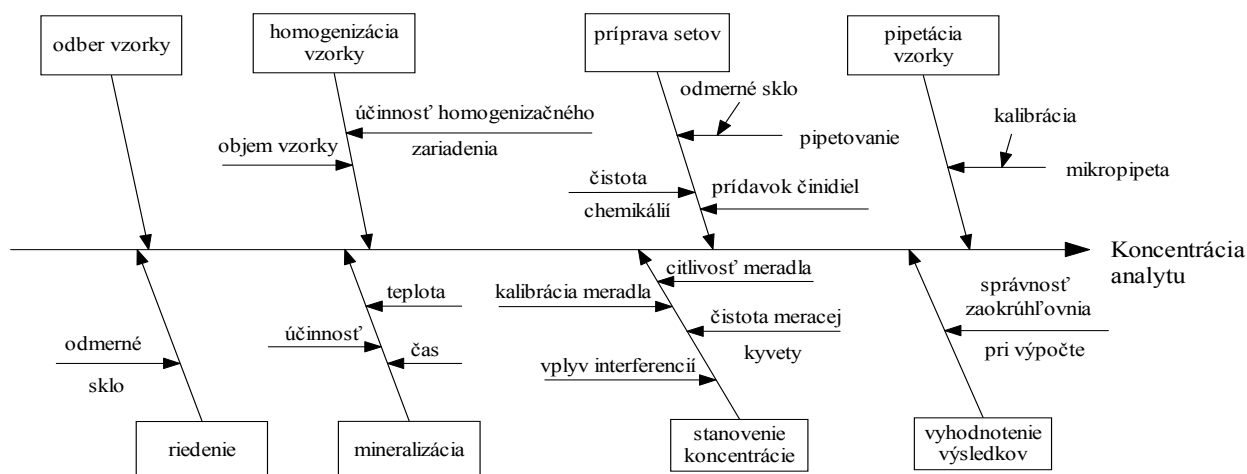
d) Limit detekcie (LOD)

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.



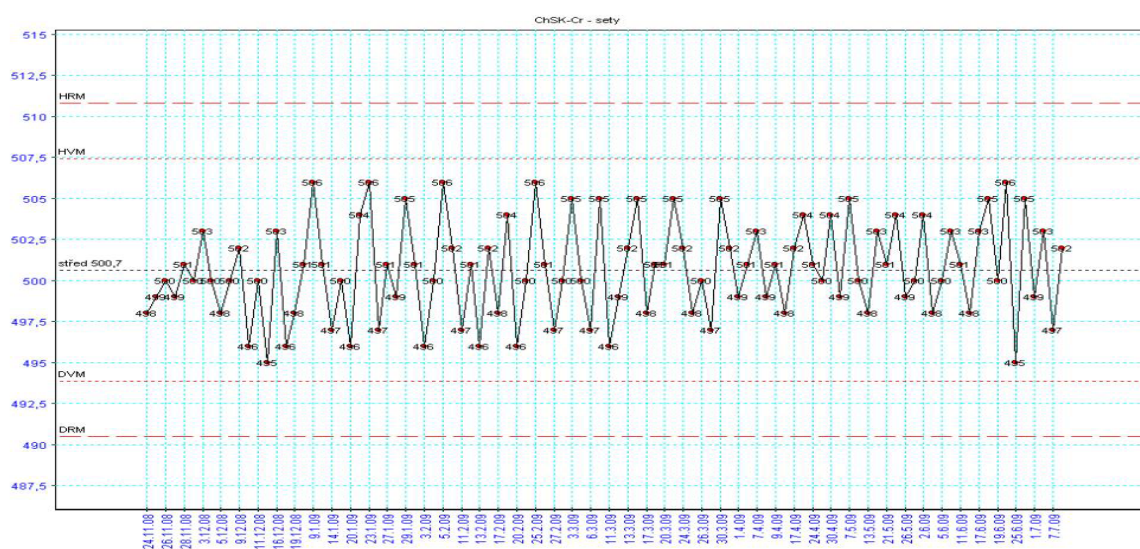
Obr. 3. Diagram príčin a následkov

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). Skúmvaková metóda pre malé objemy vzoriek.

Tabuľka IV
Zhodnotenie MPS

MPS	Vzt'azná 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 laboratórných 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). Skúšavková 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 kazeínátov 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

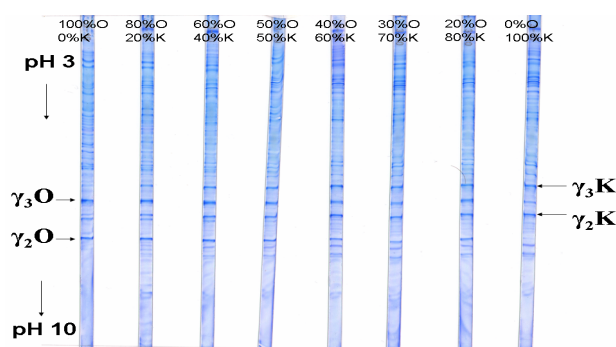
Kalibračné závislosti a regresná analýza boli urobené programom Microsoft® Office Excel 2003 (11.6355.6360). Program Q.C. Expert (Trilobyte-Q.C. Expert, v. 2.5) bol použitý na stanovenie detekčného a kvantifikačného limitu ovčej (kravskej) hrudky v bryndzi. Na vizualizáciu a štatistickú analýzu nameraných 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

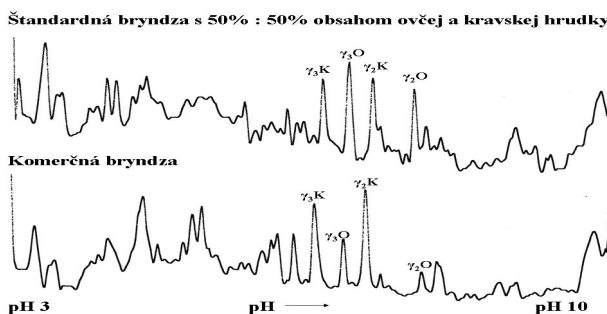


Obr. 1. Izoelektroforeogramy štandardných vzoriek letnej bryndze s rôznym pomerom ovčej (O) a kravskej hrudky (K) po plazminolyze

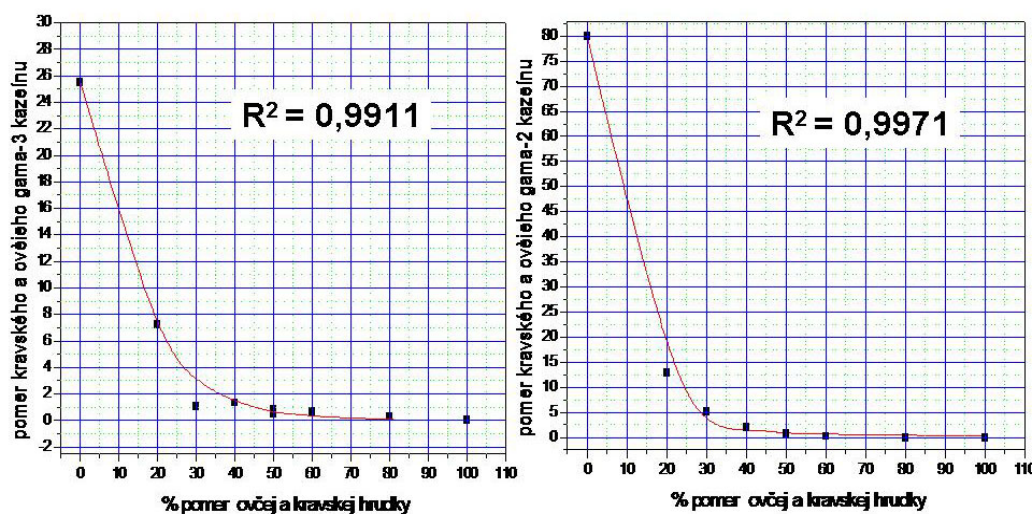
kazeínových frakcií boli využité aj v prácach iných autorov^{16,35}.

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 plazminované, resp. neplazminované kazeíny (údaje nie sú zobrazené).

Výsledky stanovenia obsahu ovčej a kravskej hrudky v komerčných vzorkách bryndze technikami s využitím plazminovania vzoriek a bez plazminovej úpravy, ako aj vo vzorkách letnej a zimnej bryndze sú uvedené v tab. I. Výsledky ukazujú, že technika s plazminovou úpravou rezultuje s nižšou výťažnosťou stanovenia ovčích kazeínov, pretože hovádzí plazmin intenzifikuje kreovanie najmä kravských gama kazeínov z beta-kazeínu. Keďže tento plazmin posilňuje aj tvorbu ovčích gama-kazeínov, odporúča sa použiť plazminovanie 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

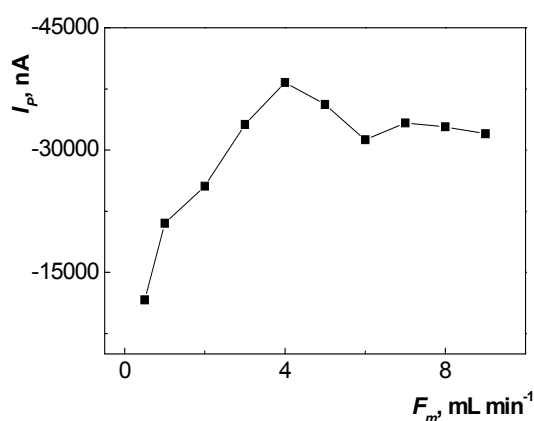


Fig. 1. Dependence of the peak heights I_p of 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) on flow rate F_m ($E_{\text{det}} = -1.6 \text{ V}$) for FIA-ED determination of 5-NQ. Run buffer 0.05 mol l^{-1} borate buffer, pH 9.0; injected volume $V_{\text{inj}} = 100 \mu\text{l}$. Evaluated from peak heights

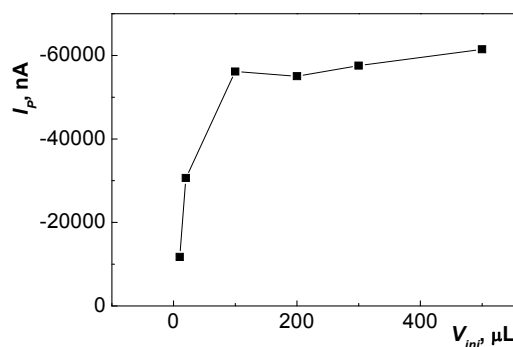


Fig. 2. Dependence of the peak heights I_p of 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) on injected volume V_{inj} ($E_{\text{det}} = -1.6 \text{ V}$) for FIA-ED determination of 5-NQ. Run buffer 0.05 mol l^{-1} borate buffer, pH 9.0, flow rate $F_m = 4 \text{ ml min}^{-1}$. Evaluated from peak 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

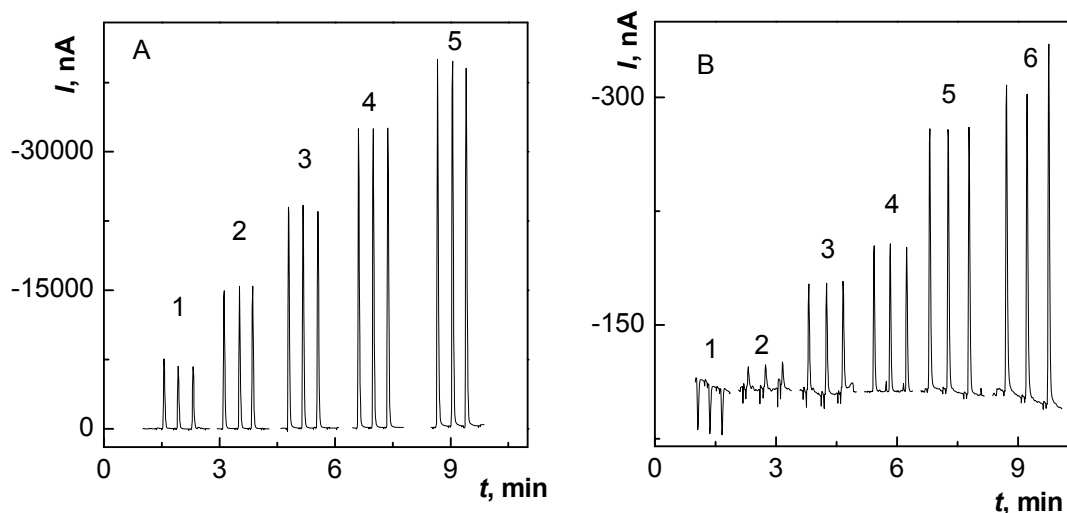


Fig. 3. Peaks of 5-NQ recorded with FIA-ED with m-AgSAE detector in “wall-jet” arrangement for 5-NQ concentration: (A): 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4) and 10 (5) $\cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} , and (B): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5) and 10 (6) $\cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} . Run electrolyte 0.05 mol l^{-1} borate buffer pH 9.0, $E_{det} = -1.6$ V, flow rate $F_m = 4$ ml min^{-1} , injected volume $V_{inj} = 100$ μ l

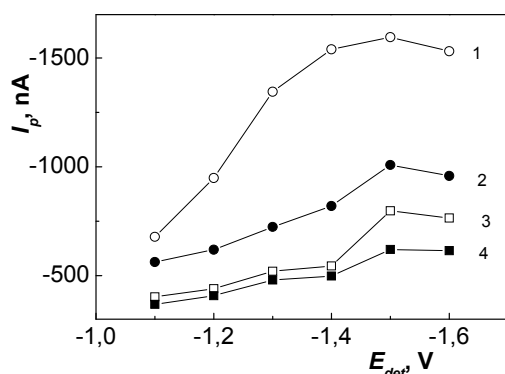


Fig. 4. Dependence of peak heights I_p of 5-NQ (1), 2-NF (2), 1-NP (3), and 3-NFt (4) on detection potential E_{det} in HPLC-ED. Concentration of each analyte $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Mobile phase 0.01 mol l^{-1} phosphate buffer pH 7.0 : methanol (15:85; v/v), $F_m = 1$ ml min^{-1} , $V_{inj} = 20$ μ l

always 3.3 times higher than L_D . The achieved L_{QS} (from $3.0 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} for 5-NQ to $1.0 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-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 l^{-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 l^{-1} for 5-NQ to $0.39 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} for 3-NFt) and for the compromise wavelength of $\lambda = 227$ (from $0.32 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} for 5-NQ to $0.59 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-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 l^{-1} phosphate buffer pH 7.0 : methanol (15:85; v/v), $F_m = 1$ ml min^{-1} , $V_{inj} = 20$ μ l, detection potential -1.5 V, evaluated from peak heights

Analyte	Concentration range [μ mol l^{-1}]	Slope [mA l mol $^{-1}$]	Correlation coefficient	L_D [μ mol l^{-1}]	L_Q [μ mol l^{-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

- WHO: *Selected Nitro- and Nitro-Oxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. WHO, Geneva 2003.
- Scheepers P. T. J., Bos R. P.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 64, 149 (1992).
- Atkinson R., Arey J.: *Environ. Health. Perspect.* 102, 117 (1994).
- Jacob J., Karcher W., Belliaro J. J., Dumler R., Boenke A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 340, 755 (1991).
- Moreira J. C., Berek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
- Netto A. D. P., Moreira J. C., Dias A., Arbilla G., Ferreira L. F. V., Oliveira A. S., Berek J.: *Quim. Nova* 23, 765 (2000).
- Zielinska B., Samy S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 883 (2006).
- Kuo C. T., Chen H. W., Lin S. T.: *Anal. Chim. Acta* 482, 219 (2003).
- Murayama M., Dasgupta K.: *Anal. Chem.* 68, 1226 (1996).
- MacCrehan W. A., May W. E., D. Y. S., Benner S. D.: *Anal. Chem.* 60, 194 (1988).
- Rosenkranz H. S.: *Mutat. Res.* 101, 1 (1982).
- Galceran M. T., Moyano E.: *Talanta* 40, 615 (1993).
- Jin Z., Rappaport S. M.: *Anal. Chem.* 55, 1778 (1983).
- Novotny L., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* 94, 1118 (2000).
- Mikkelsen O., Schroder K.: *Anal. Lett.* 33, 3253 (2000).
- Yosypchuk B., Novotny L.: *Electroanalysis* 14, 1733 (2002).
- Yosypchuk B., Novotny L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
- Berek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007).
- Yosypchuk B., Berek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
- Peckova K., Vrzalova L., Bencko V., Berek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1697 (2009).
- Danhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Berek 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 branched 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-

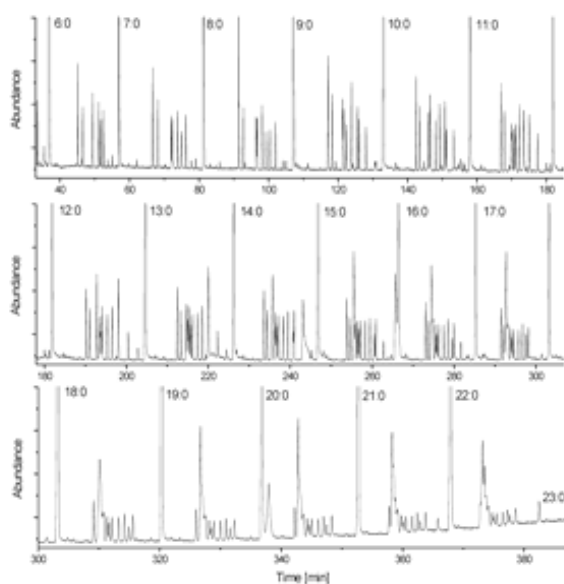


Fig. 1. The obtained chromatogram of GC separation of C₇–C₂₂ monomethyl-branched FAME from methylene insertion reaction to linear chain FAME with assigned peaks

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

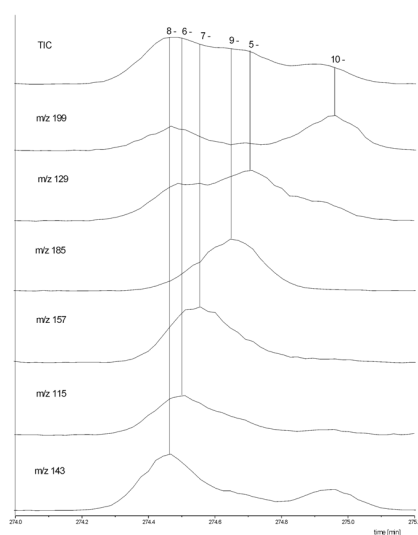


Fig. 2. The result of mass spectrometric deconvolution of the GC unseparated isomers 5-, 6-, 7-, 8-, 9- monomethyl-branched C₁₆ methyl ester

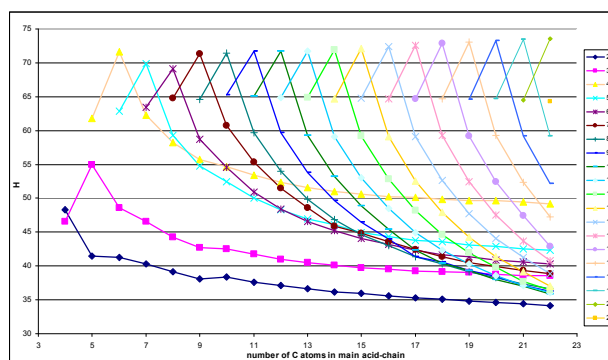


Fig. 3. Dependence of homomorphy factors on the number of carbon atoms of monomethyl-branched FAME homologous series

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 vyprášaných 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.

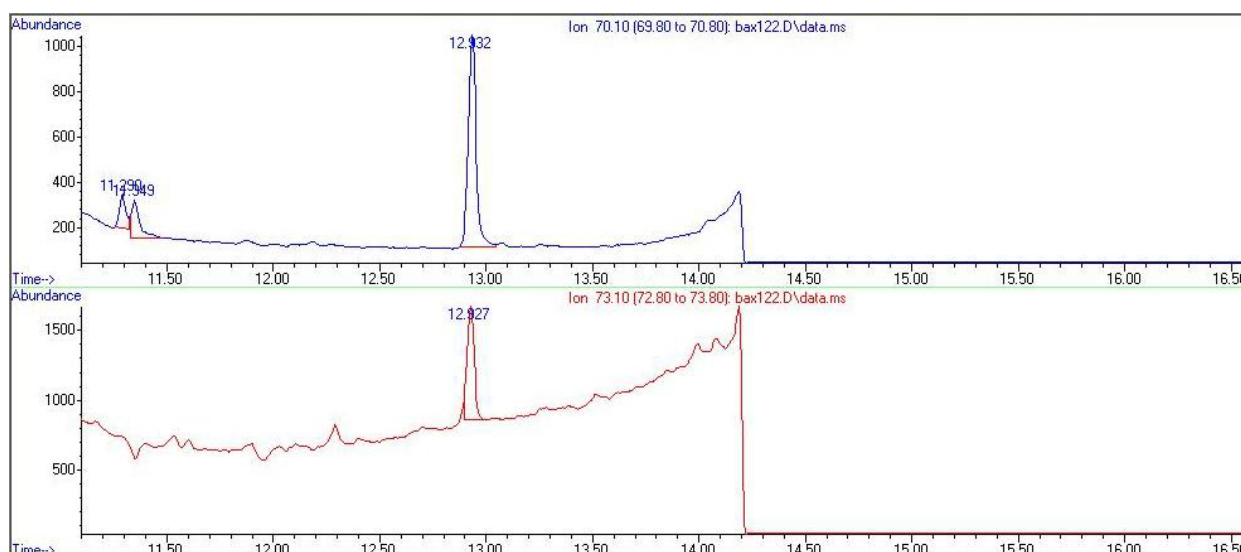
Výsledky a diskusia

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 rozbořem 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 $43 \text{ }^\circ\text{C}$ 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. vínné 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 prijíme 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 potenciální 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 citrónová, octan sodný	suchý kvas: bramborový škrob, regulátor kyselosti: kyselina mléčná, protihrudkující látka: síran vápenatý	suchý kvas: syrovátka, kukuřičná mouka, sojová mouka, regulátor kyselosti: kyselina citrónová, 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

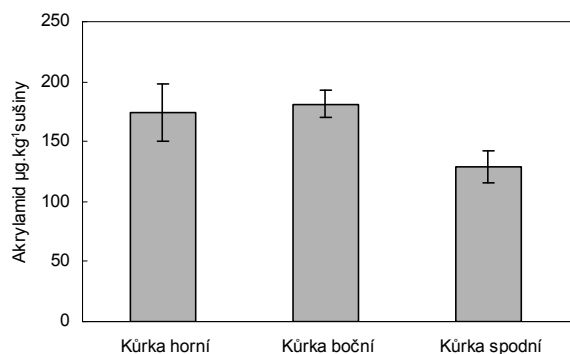
Cílem této práce bylo studium distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba (celý chléb, střídka, kůrka a frakce kůrky) umožňující nastavení vhodných podmínek přípravy vzorek pro stanovení obsahu akrylamidu v chlebu pro následné technologické úpravy, které by vedly k minimalizaci vzniku akrylamidu při domácí přípravě

chleba.

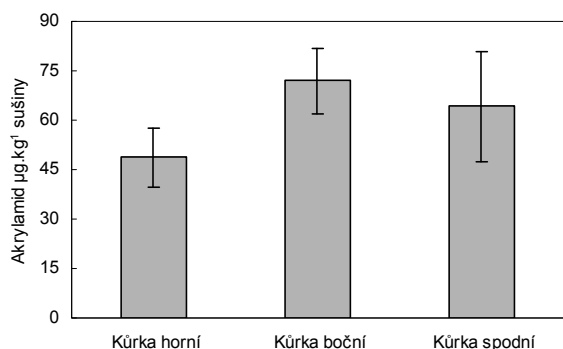
U chlebů z domácí pekárny se spodní a boční strany během pečení dotýkaly formy, v níž byl chléb připravován. Tyto strany měly drsnější povrch než kůrka na horní straně chleba. Také zbarvení povrchu nebylo rovnoměrné. Kůrka na bočních stranách chleba byla tmavší než kůrka na horní a spodní straně, což 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 distribuci akrylamidu v daném chlebu i mezi jednotlivými chleby zaměřit pouze na celkovou kůrku.

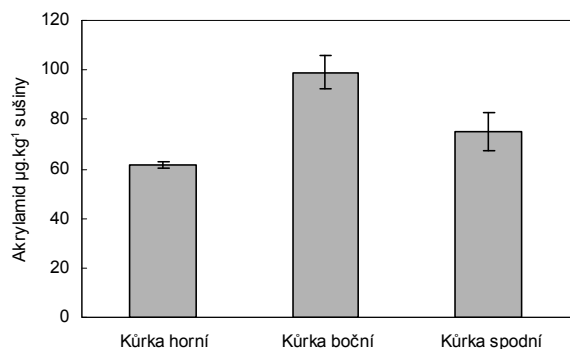
Z porovnání průměrného obsahu akrylamidu v kůrce mezi bramborovým, slunečnicovým a grahamovým chlebem (obr. 2) vyplývá, že bramborový chléb obsahuje v kůrce nejvíce akrylamidu z těchto tří chlebů. To je pravděpodobně způsobeno přítomností bramborové mouky ve směsi pro přípravu tohoto chleba, protože 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



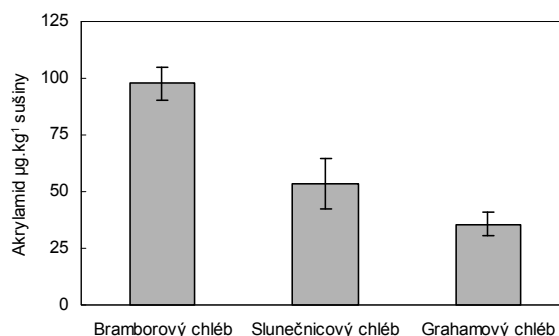
Obr. 1c. Porovnání obsahu akrylamidu v jednotlivých frakcích kůrky grahamového chleba

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 hrboletý. 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 navrhnutí vhodných technologických úprav vedoucí 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 přidávkem 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.

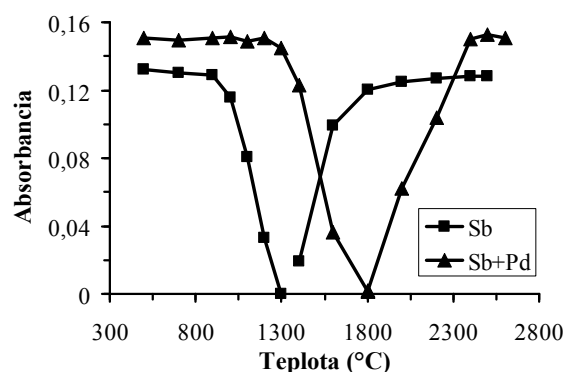
Pracovný postup

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

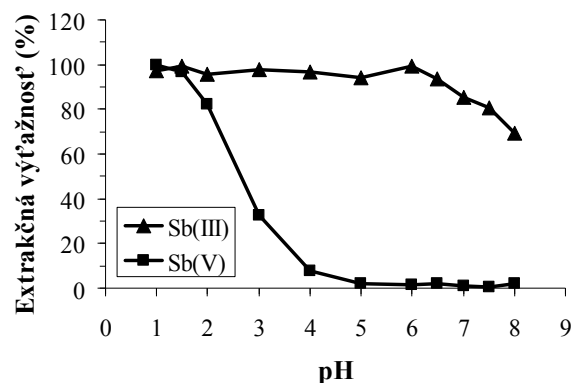
Teplotný program pre stanovenie Sb po CPE separácii a prekoncentracii metódou ETAAS

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,

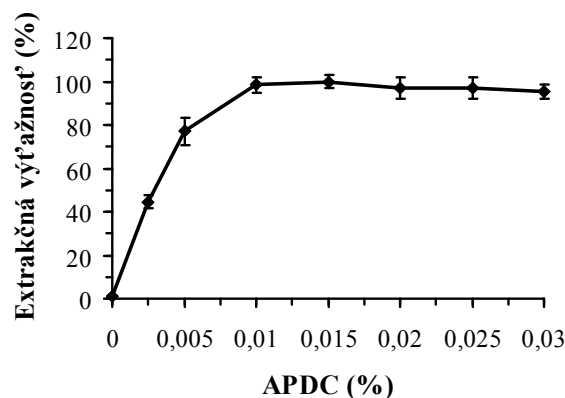


Obr. 2. Vplyv pH na extrakciu Sb(III), koncentrácia Sb(III): 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$; koncentrácia Sb(V): 0,40 $\mu\text{g l}^{-1}$; koncentrácia APDC: 0,10 % (m/v); koncentrácia TX-114: 0,20 % (m/v)

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 zväšť 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)

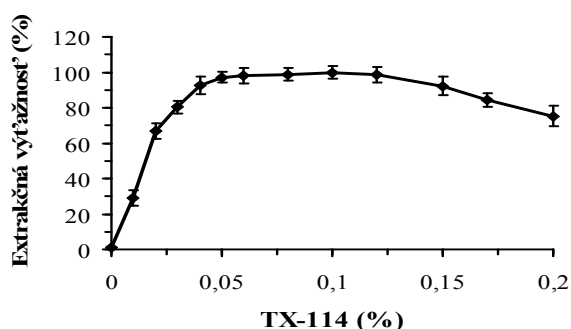
ce sa v prírodných vodách. V našom prípade bol APDC použitý ako chelatačné činidlo pre Sb(III). Pre voľbu vhodnej koncentrácie APDC bola zostrojená závislosť extrakčná výťažnosť vs. zvyšujúca sa koncentrácia APDC, ktorá je znázornená na obr. 3. Z nameranej závislosti je zrejmé, že ku kvantitatívnej extrakcii 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

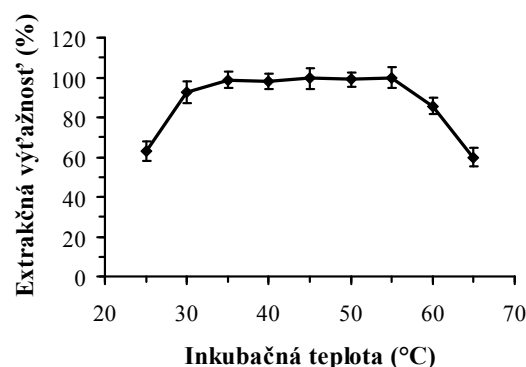
Z neiónových tenzidov, ktoré možno pre CPE postupu využiť bol zvolený Triton X-114 (TX-114), a to vďaka svojim optimálnym fyzikálno-chemickým vlastnostiam (nízka teplota potrebná na vytvorenie zákalu 23–25 °C, čo je zvlášť dôležité pri extrakcii termálne nestabilných kovových chelátov; vysoká hustota 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 zrejmé, 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 slepého 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 zrejmé, 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. Uďávajú, 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 plynovochemickú 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. Plynovochemické 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 plynovochemických 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.

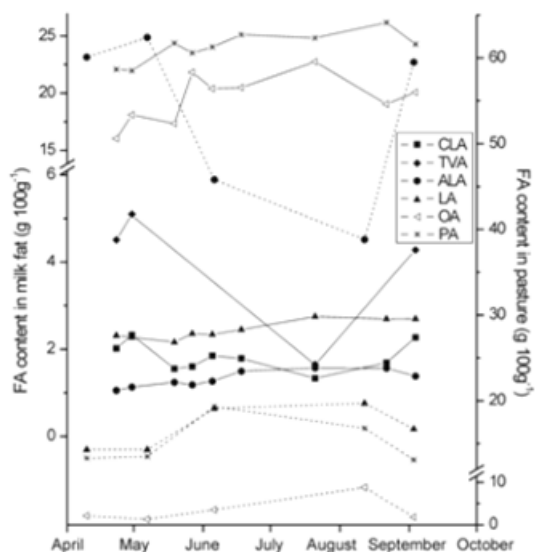
Priemerný obsah zloženia FA z troch experimentálnych miest v Trenčianskej Teplej v roku 2008 sa porovnal so zložením FA v pastve v roku 2007. Najväčšie rozdiely boli v obsahu ALA, ktorá sa počas sezóny v roku 2008 menila len minimálne (priemerný obsah 51,2 %) v porovnaní s rokom 2007, a obsah ALA v máji (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. Naš 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 bacherových 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.

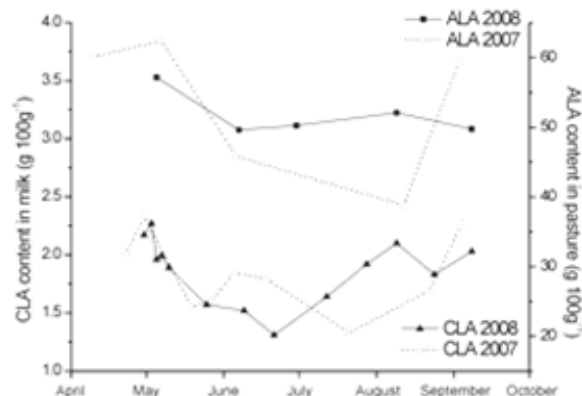
Pomer obsahu LA/ALA v poraste počas pasienkovej sezóny v Trenčianskej Teplej rástol v r. 2007 z 0,23 v máji na 0,42 v júni, na 0,51 v auguste, a v septembri klesol na

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 určené 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 bacherovom 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 určené 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

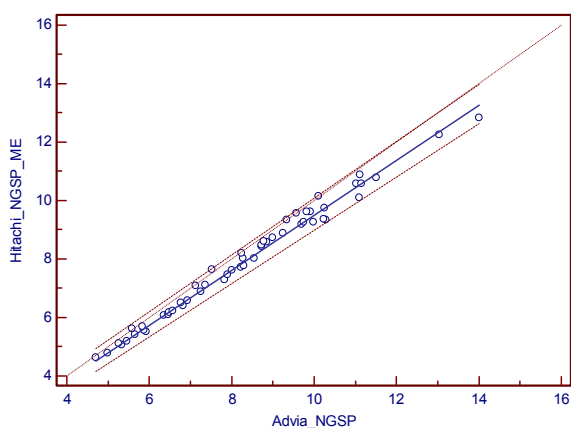


Fig. 1. Comparison of the IFCC-derived NGSP values (via Master Equation) and measured by Hitachi 912 and authentic NGSP values measured by Advia 1200 using Passing Bablok regression and MedCalc software

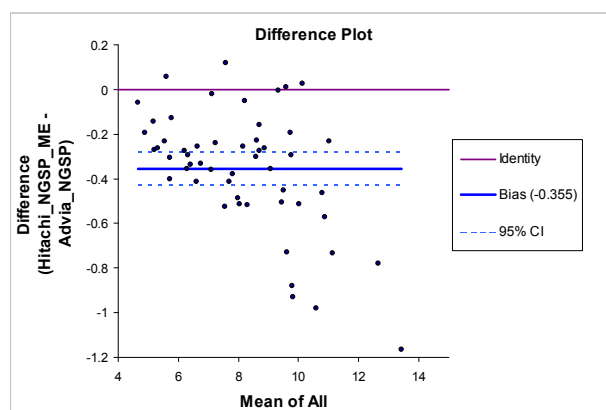


Fig. 2. Difference plot (Hitachi_NGSP_ME - Advia_NGSP) vs. the mean of both methods constructed by software Analyze-It

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 glycated 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, lirokonit 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 neprekračovali 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

1. Andráš P., Nagyová I., Melichová Z.: Chem. Listy 101, 100 (2007).
2. Kozáč J.: Mineralia Slovaca - Geovestník 28, 5 (1969).
3. Čurlík J.: *Pôdna reakcia a jej úprava*. Jaroslav Suchoň Publ., Bratislava 2003.
4. Missana T., Garcia-Gutierrez M., Alonso U.: Phys. Chem. Earth 33, 156 (2008).
5. 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.
6. Lin Z., Puls R. V.: Environ. Geol. 39, 753 (2000).
7. Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie prvků*. Informatorium, Praha 1993.
8. Manning B. A., Goldberg S.: Environ. Sci. Technol. 31, 2005 (1997).
9. Mohapatra D., Mishra D., Chaudhury G. R., Das R. P.: Korean J. Chem. Eng. 24, 256 (2007).
10. García-Sánchez A., Alvarez-Ayuso E., Rodríguez-Martin F.: Clay Miner. 37, 187 (2002).
11. Lombi E., Wenzel W. W., Sletten R. S.: J. Plant Nutr. Soil Sci. 162, 451 (2000).
12. Filella M., Belzile N., Chen Y. W.: Earth Sci. Rev. 59, 265 (2002).
13. Leus A. K., Mönch H., Johnson C. A.: Environ. Sci. Technol. 40, 7277 (2006).
14. Styblo M. et al.: *Metabolism and Toxicity of Arsenicals in Cultured Cells*, In: *Arsenic Exposure and Health Effects*. s. 311. Elsevier, Amsterdam (1999).
15. Nyng Y.R.: Desalination 3, 237 (2002).
16. Chen W. et al.: Water Res. 9 1851 (2007).
17. Vaughan L.R., Reed E.B.: Water Res. 6 1005 (2005).
18. Elizalde-González M.P. et al.: Chem. Eng. J. 1-3, 187 (2001).
19. Vaaramaa K., Letho J.: Desalination 2, 157 (2003).
20. Hagarová I., et al.: Chem. Listy 100, 901 (2006).
21. Farkašová I., Závadská M., Žemberyová M.: Chem. Listy 93, 173 (1999).
22. 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.
23. 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.
24. STN EN ISO 5667-3. Kvalita vody. Odber vzoriek, SÚTN, Bratislava, 2005.
25. Horwitz, W.: Anal. Chem. 54., 67 (1982).
26. Mocak, J., Bond, A. M., Mitchell, S., Schollary, G.: Pure & Appl. Chem. 69, 297 (1997).
27. 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.
28. 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

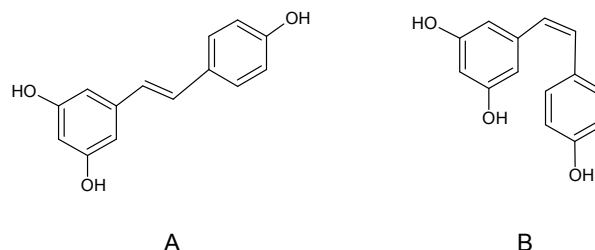


Fig. 1. Structure of *trans*-resveratrol (A) and *cis*-resveratrol (B)

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 (Prochrome, 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-

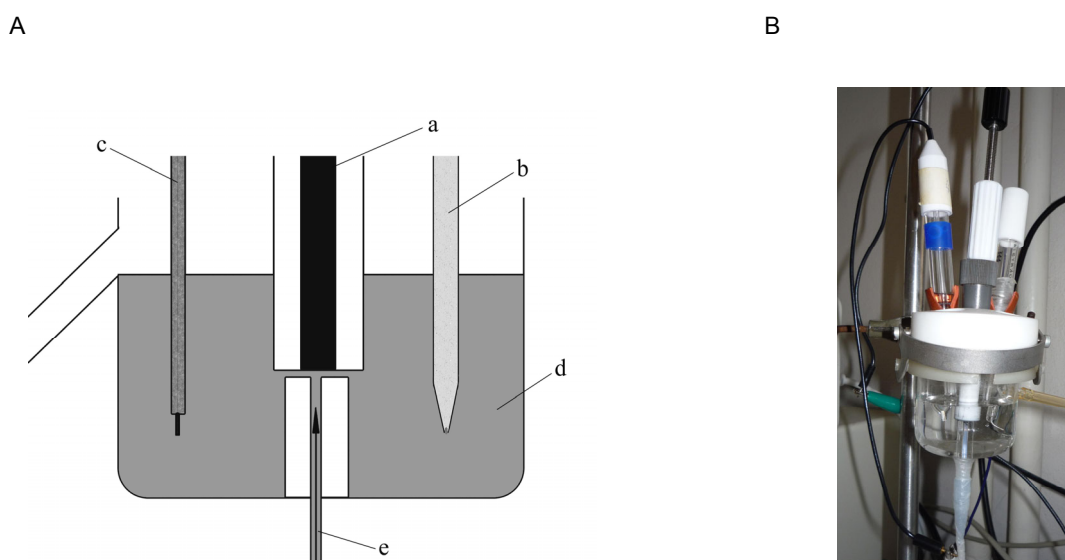


Fig. 2. Design of electrochemical cell (A) scheme: working CPE a, reference electrode b, auxiliary electrode c, mobile phase in an overflow vessel d, mobile phase inlet e; and (B) photograph of a complete system

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

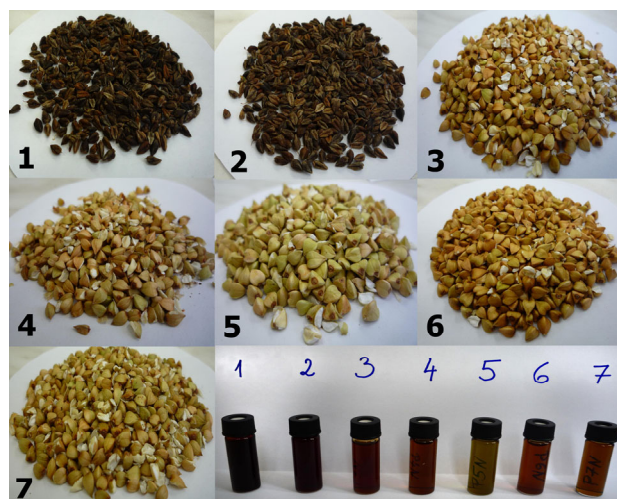


Fig. 3. Buckwheat samples and concentrated ethanolic extracts, numbers corresponds to NS (number of sample) from Table I

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

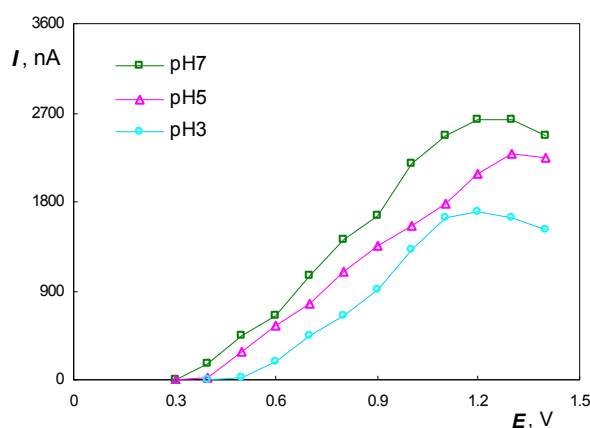


Fig. 4. Hydrodynamic voltammograms of *trans*-resveratrol (injected 20 μl of $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) on CPE in the mobile phase BR buffer : acetonitrile (1:1)

$1 \cdot 10^{-4}$ 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

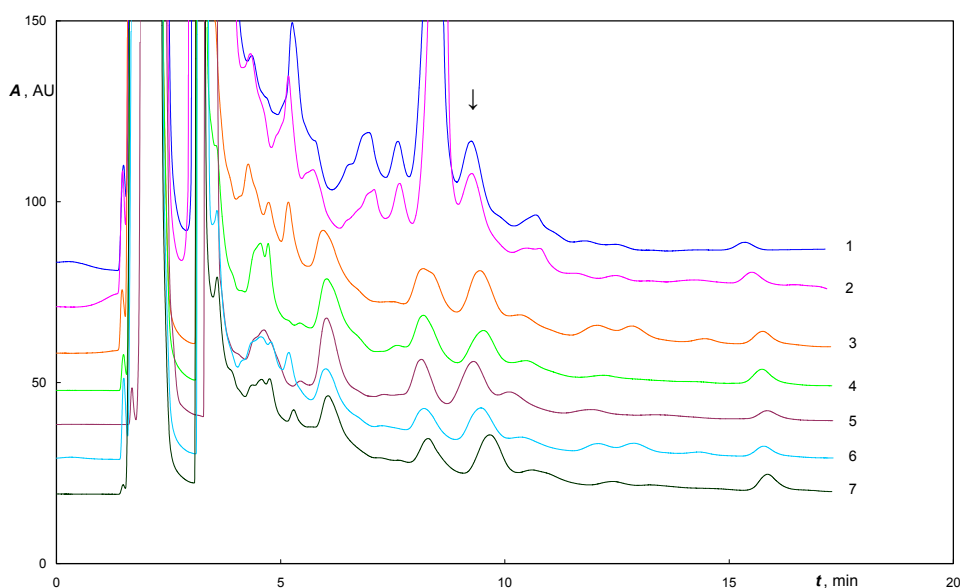


Fig. 5. HPLC chromatograms with spectrophotometric detection (306 nm) of concentrated ethanolic extracts of buckwheat samples, numbers of curves corresponds to NS (number of sample) from Table I, mobile phase acetonitrile : BR buffer pH 7 (30:70), flow rate 1 ml min^{-1}

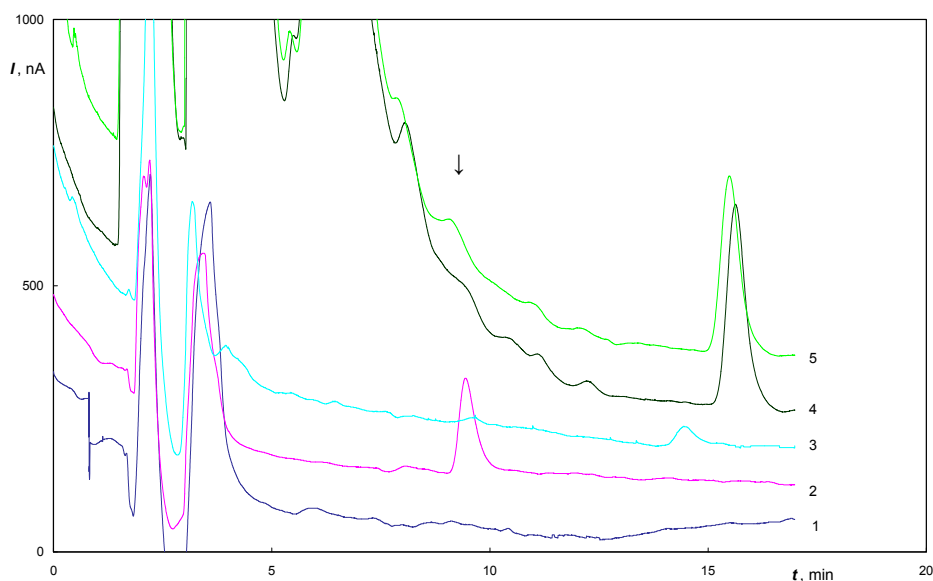


Fig. 6. HPLC chromatograms with electrochemical detection on CPE ($E = +1.2 \text{ V}$) of methanol (1), $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ of *trans*-resveratrol (2), $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ of *cis*-resveratrol (3), concentrated ethanolic extract of common buckwheat Zelenocvetkovaya 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., Bucukiová D., Křisa 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., Opipari 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,
ahgedusova@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 hüt, 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 arzenu, ktorý má nepriaznivé účinky na ľudský organizmus. Maximálne prípustné koncentrácie As v pitnej vode boli legislatívou mnohých krajín (vrátane Európskej únie) ustanovené na $10 \mu\text{g l}^{-1}$. Arzén sa v prírodných vodách vyskytuje v dvoch formách: redukovaný „trojmocný“ $\text{As}^{(III)}$, typický pre spodné vody s nedostatkom kyslíka a oxidovaný „päťmocný“ $\text{As}^{(V)}$, 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 arzenu 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 arzenu a antimónu⁷.

V prírode spolu s arzénom je často prítomný aj antimón. Maximálna prípustná koncentrácia antimónu v pitnej vode je stanovená na $0,005 \text{ mg l}^{-1}$ (cit.⁴). Antimón je toxický prvok, vyskytujúci sa väčšinou spolu so sírou a arzénom. Jeho koncentrácia v zemskej kôre sa odhaduje na $0,2\text{--}0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ (cit.⁸).

Najdôležitejšia zlúčenina antimónu vyskytujúca sa v prírode je Antimonit (Sb_2S_3), ktorá obsahuje 71 až 75 % čistého kovu a rýchlo oxiduje. Koncentrácia antimónu v pôdach sa pohybuje v rozmedzí $0,3\text{--}1,8 \text{ mg kg}^{-1}$. 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 $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$
- 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 $5 \mu\text{l}$.

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 $20 \mu\text{l}$. 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 zdrojoch 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. Hegedús 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. Hegedús^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). 0.1–0.5 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 phytochelatin due to metal stress. This detoxification mechanism utilizes complexation of phytochelatin 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

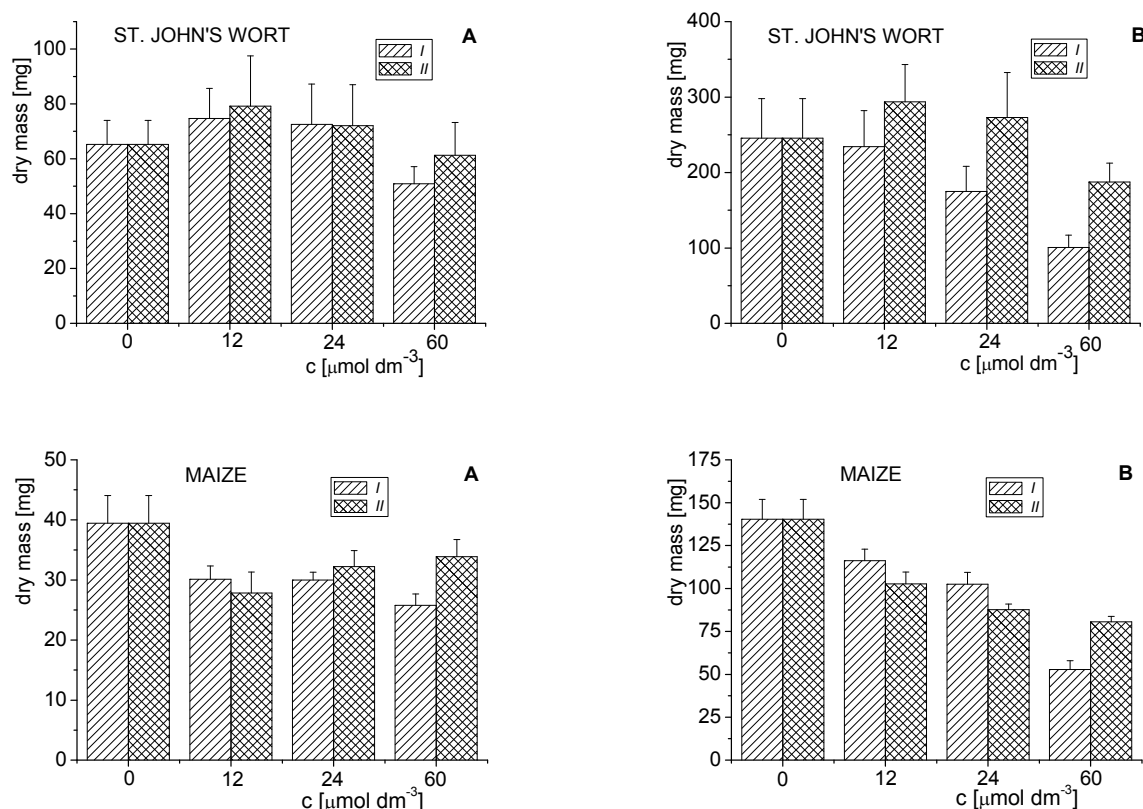


Fig. 1. Dependence of root (A) and shoot (B) dry mass of St. John's wort and maize plants on the concentration of CdSeO₄ (I) and CdSeO₃ (II). Mean \pm S.E; S.E.- standard error

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-

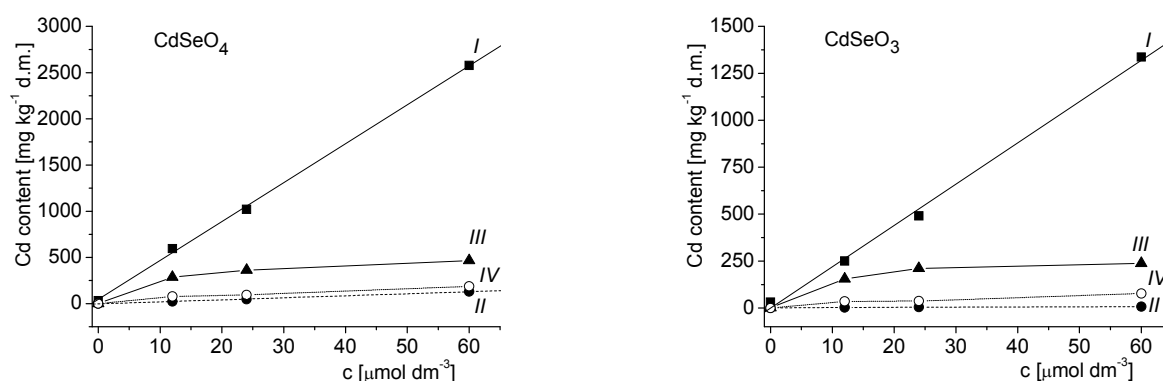


Fig. 2. Dependence of cadmium content in roots (I) and shoots (II) of St. John's wort as well as roots (III) and shoots (IV) of maize plants on CdSeO_4 and CdSeO_3 concentration; d.m.- dry mass

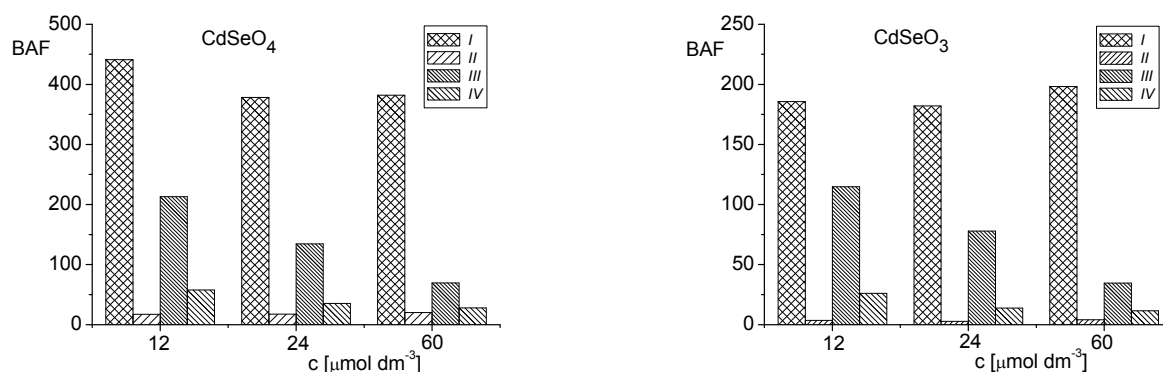


Fig. 3. Dependence of bioaccumulation factors (BAF) related to Cd determined for roots (I) and shoots (II) of St. John's wort as well as roots (III) and shoots (IV) of maize plants on the applied CdSeO_4 and CdSeO_3 concentration

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 %.

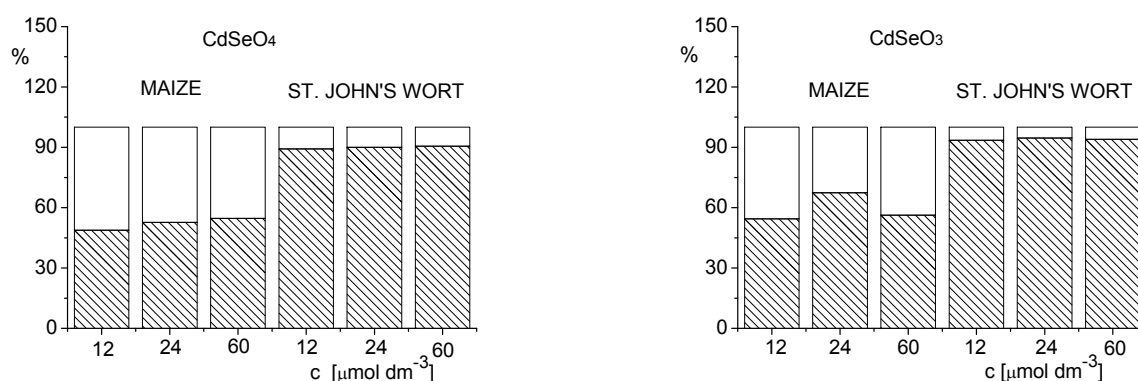


Fig. 4. Comparison of Cd portion of Cd occurring in roots (shaded) and shoots (white) of St. John's wort and maize plants treated with CdSeO₄ and CdSeO₃

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 senzorických 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 homogeneity 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 stanoven 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 nejvhodnější 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. Forschung.* 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 pivu 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 pivu 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 pivovarů 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 senzorickými 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 pětkrát 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).

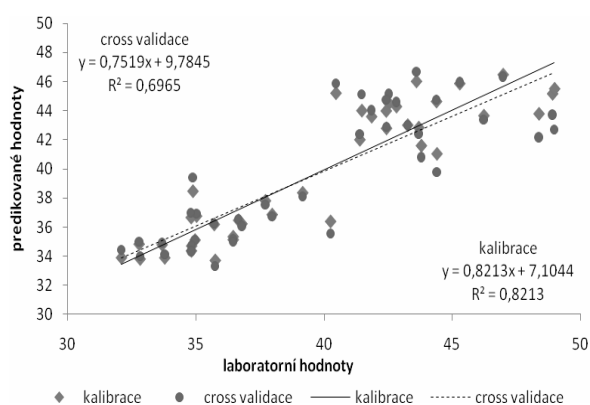
Pro účely měření na FT-NIR spektrometru byly vzorky salámu homogenizovány rozmixováním. Každý vzorek byl změřen třikrát, pro kalibraci bylo použito průměrné spektrum. Vzorky byly proměřeny na spektrometru NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, Madison, USA) ve spektrálním rozsahu 10 000–4000 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 vypočteny souhrnné statistické charakteristiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum).

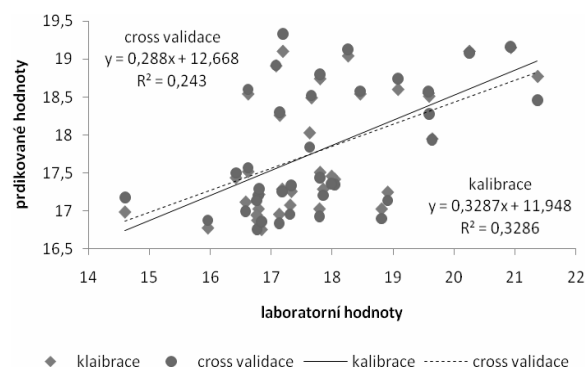
Výsledky a diskuse

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 sytylost 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 sytylost barvy (1 faktor).

Na obr. 1 a 2 můžeme posoudit kalibrační a validační výsledky pro stanovení světlosti a sytylosti 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 sytylost 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 HUMÍNŔOVÝCH 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.

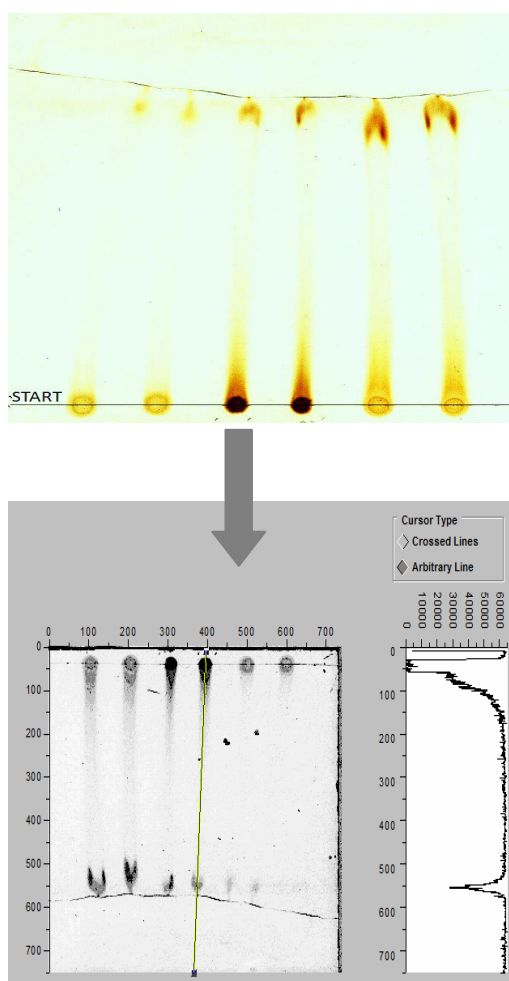
Schopnosť viazať prechodné kovy je jednou z najvýznamnejších vlastností humínových látok. V prírodných systémoch tieto látky môžu viazať znečisťujúce kovy, a následne tak významným spôsobom ovplyvňovať také procesy ako sú transportné javy, toxicita, regeneračné a čistiace procesy týchto systémov a podobne^{3,4}. 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 skupiny^{6–8}. 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

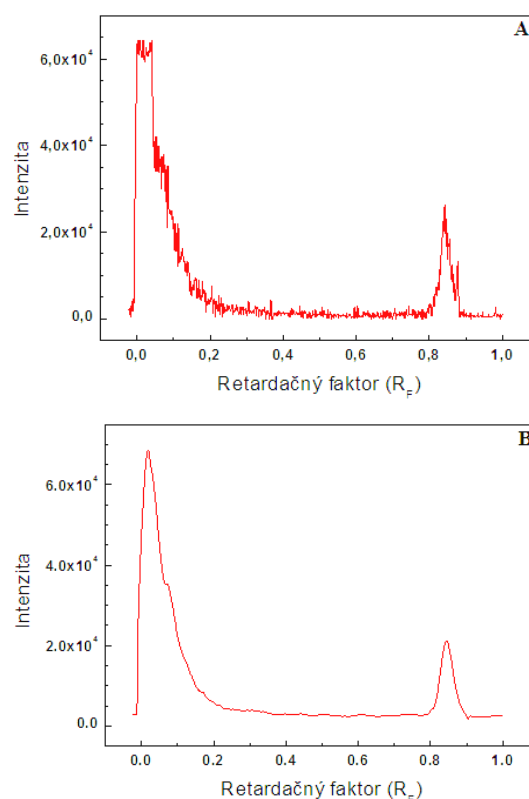
Pri tomto štúdiu sme používali dva druhy tenkovrstvových platní: prvou platňou bol FIXION 50X 8 (Reanal,



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).



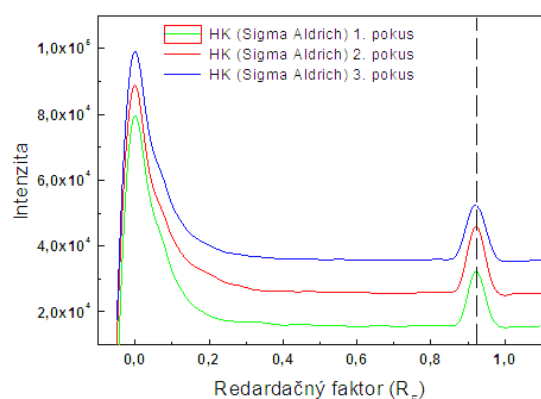
Obr. 2. Signál získaný spracovaním TLC platne použitím programu Microcal® ORIGIN® Pro 8, humínová kyselina pochádzala od firmy Sigma Aldrich a jej koncentrácia bola 12 mg ml^{-1} ; A) bez vyhladenia B) s vyhladením (Savitzky-Golay algoritmus 50 bodov)

Výsledky a diskusia

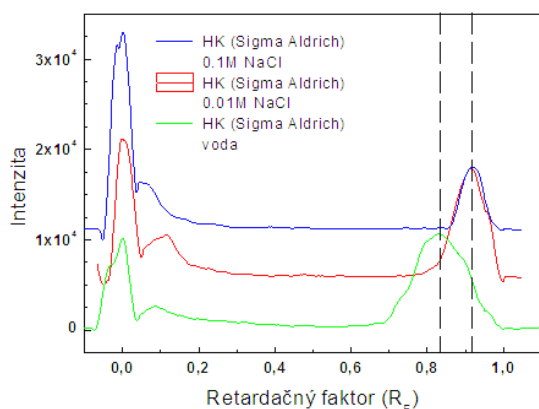
Na zistenie reprodukovateľnosti retardačných faktorov humínovej kyseliny (od firmy Sigma Aldrich) sme $3\times$ nanášali na mokré TLC platňu FIXION 50 X8 príslušnú humínovú kyselinu (o koncentrácii 12 mg ml^{-1}), pričom sme následne túto platňu nechali vyvíjať v uzavretej komore vo vode alebo v NaCl , 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 zosrojení 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

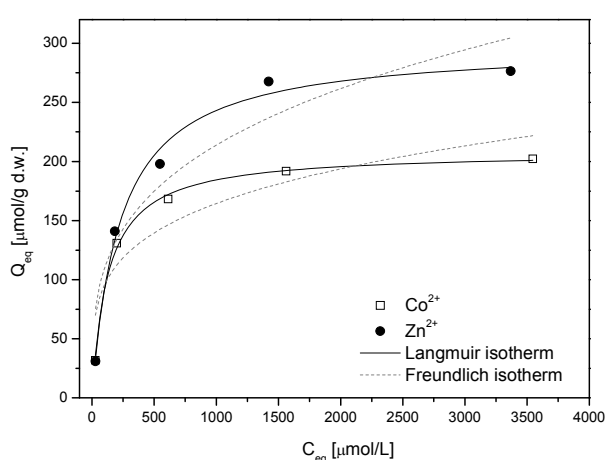


Fig. 1. Fit of the Langmuir and Freundlich isotherms of Co^{2+} and Zn^{2+} sorption by moss biosorbent (2.5 g l^{-1} , d.w.) from single metal solutions after 4 h interaction at 20°C and initial pH 6.0

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

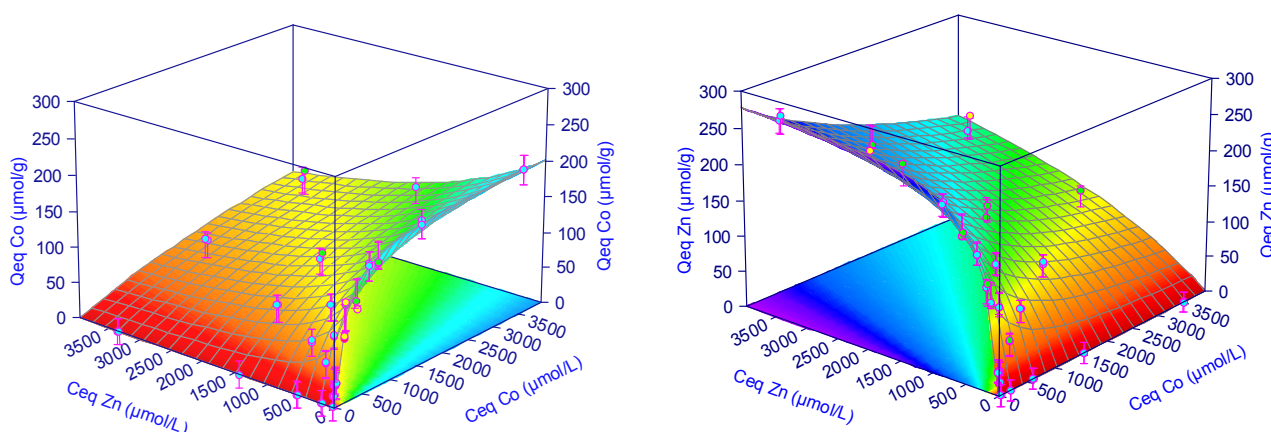


Fig. 2. Three-dimensional sorption isotherm surfaces of Co^{2+} - Zn^{2+} binary system: (A) Co^{2+} sorption ($\mu\text{mol g}^{-1}$) and (B) Zn^{2+} sorption ($\mu\text{mol g}^{-1}$). The surfaces are predicted by the competitive Langmuir model (eq 3) and the symbols are experimental data obtained 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 *Rhizidiadelphus 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-

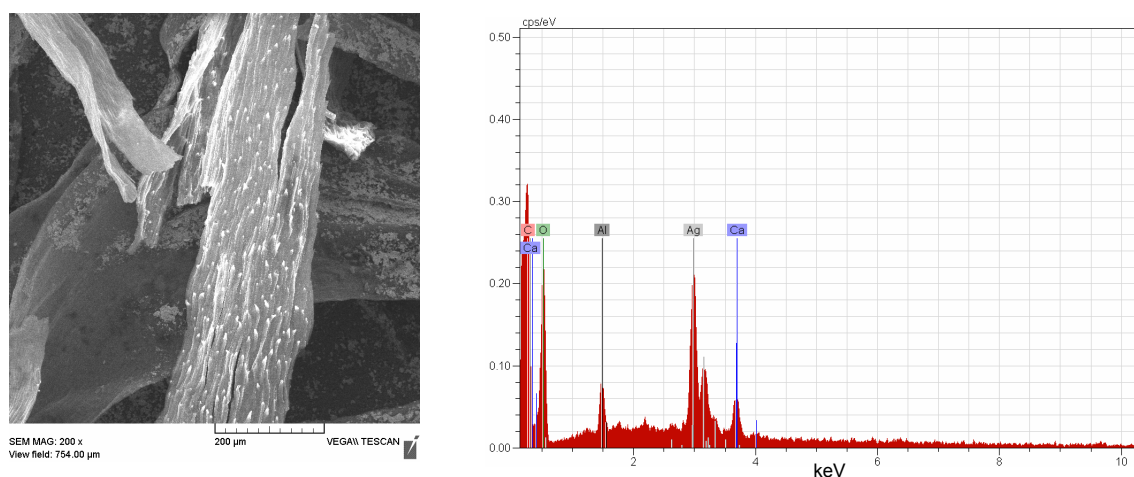


Fig. 3. SEM picture (A) and the EDX elemental spectra of the native biosorbent pretreated with 0.5 M CaCl_2 before Co and Zn uptake. Al peak comes from sample holder, Ag peak from sample fixation

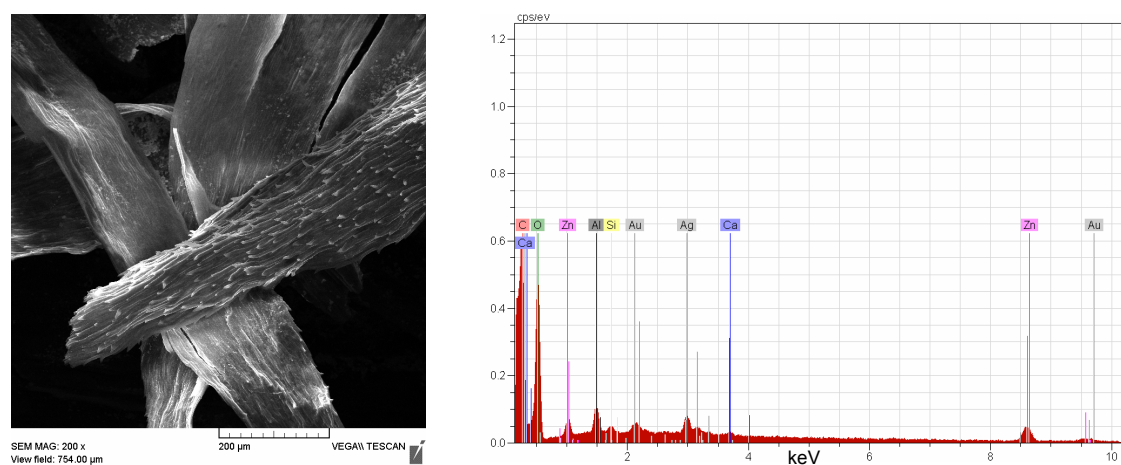


Fig. 4. SEM picture of biosorbent (A) and the EDX elemental spectra after Zn^{2+} (0.5 M ZnCl_2) sorption from single system. Al peak comes from sample holder, Ag and Au peaks from sample fixation and coating, respectively

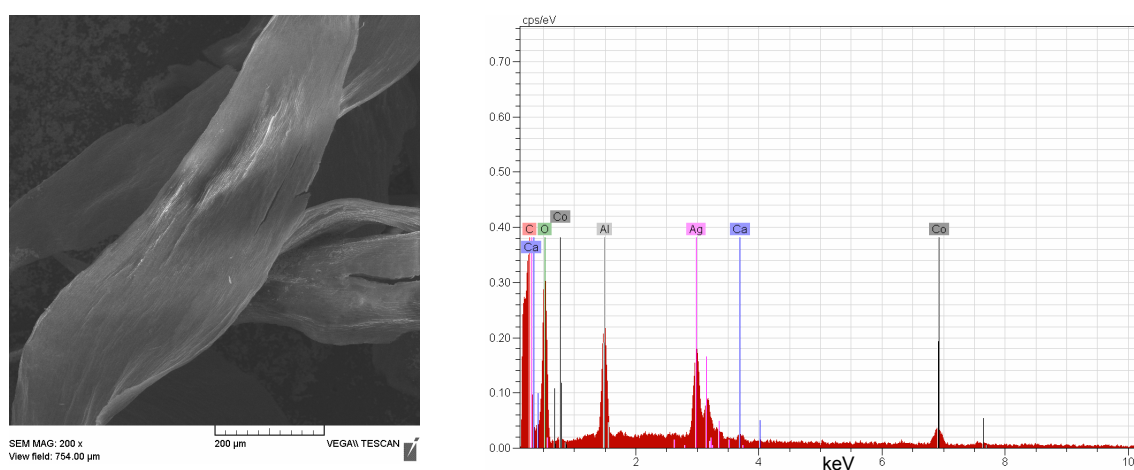


Fig. 5. SEM picture of biosorbent (A) and the EDX elemental spectra after Co^{2+} (0.5 M CoCl_2) sorption from single system. Al peak comes from sample holder, Ag peak from sample fixation

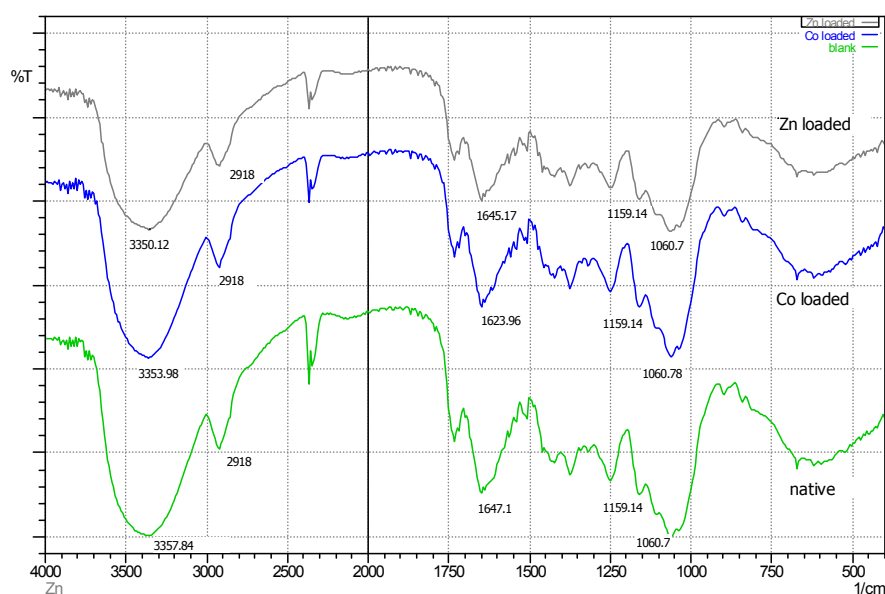


Fig. 6. FTIR spectra of unloaded, Zn^{2+} loaded ($C_0 = 0.5 \text{ M ZnCl}_2$) and Co^{2+} loaded ($C_0 = 0.5 \text{ M ZnCl}_2$) moss biosorbent

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, $-NH_2$ 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 *Rhytidadelphus* 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., González 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 Vicente 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 rozanalyzoval 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.

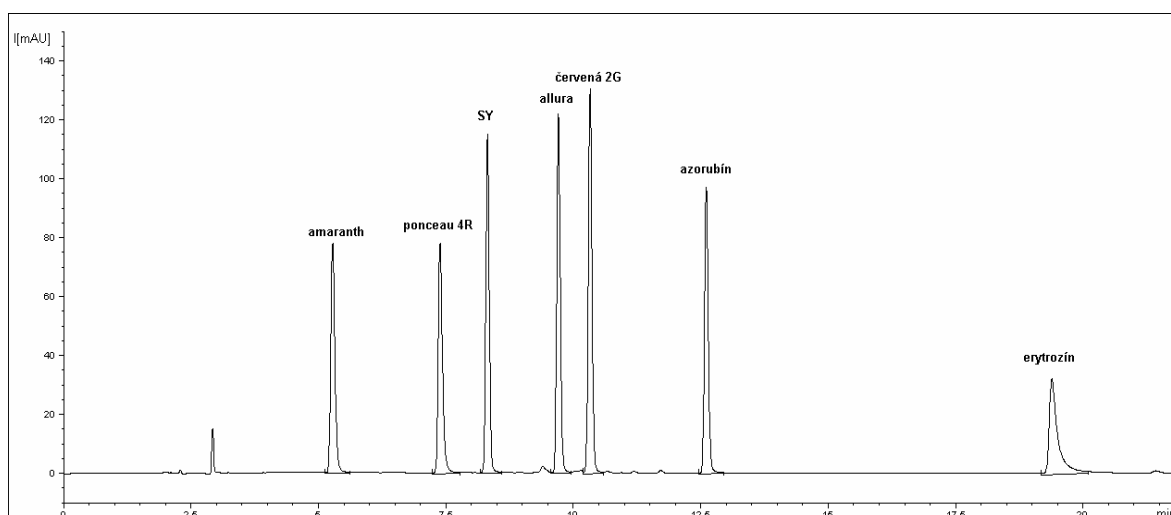
Jednou skupinou metód dokazovania farbív sú orientačné, ktoré dokazujú iba to, či potravina bola prifarbovaná. Medzi ďalšie analytické metódy, ktoré sú už kvantitatívne, patria chromatografické a spektrometrické metódy³⁻⁵. Farbivá sa používajú na prifarbenie skoro všetkých potravín s výnimkou použitia 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

1. Rosival L. , Szokolay A. a kol.: *Cudzorodé látky v požívatinách*, p. 286–406. Osveta, Martin 1983.
2. Macrae R.: *HPLC in food analysis*, Chap. 7, p. 259–273. Academic Press, Cambridge 1988.
3. Davídek J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, p. 78. Alfa, Bratislava 1981.
4. Gilhooley R.A., Hoodless M.: J. Chromatogr. 72, 325 (1972).
5. Nollet L.M.L.: *Food analysis by HPLC*, Chap. 13., p. 523–574. Marcel Dekker, Inc., New York 2000.
6. 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.
7. 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).
8. Nariadenie Európskeho parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 zo 16. decembra 2008 o prídavných látkach v potravinách.
9. 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_2 -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

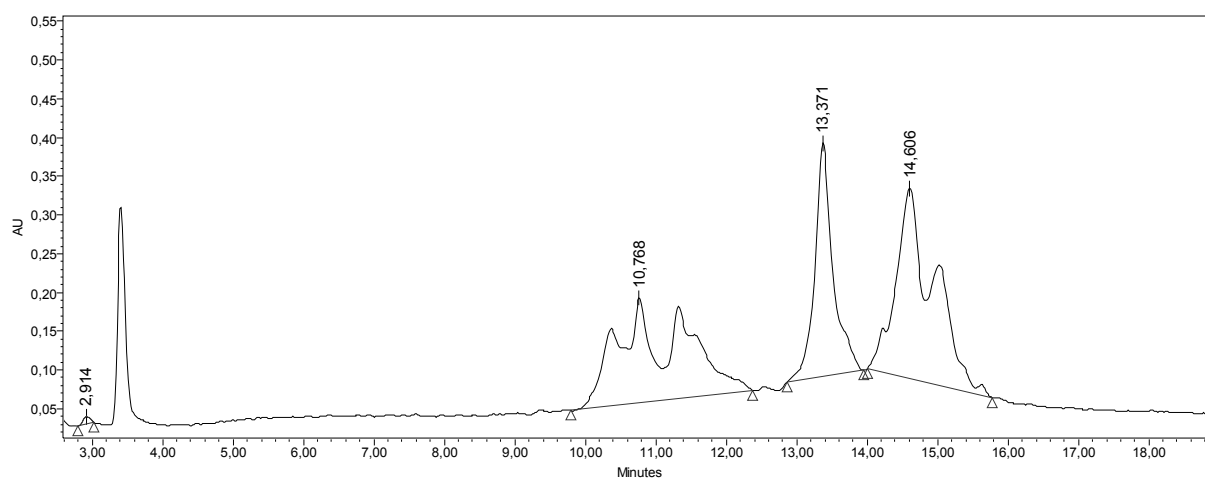
Optimalizace HPLC analýzy byla provedena pomocí standardních roztoků α -, β - a κ -kaseinu. Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnějšího standardu a kvantifikace byla provedena metodou časových skupin (timed groups). Individuální píky byly seskupeny do skupiny a zpracovány jako jeden pík. V případě κ -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.

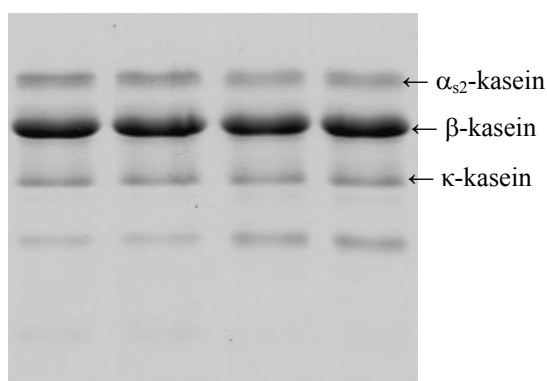
Validace a optimalizace metody SDS-PAGE

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 koziho mléka.

V tab. I jsou uvedeny obsahy kaseinů ve vzorcích koziho mléka. Literatura uvádí obsah kaseinových frakcí v koziho 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 uvedeným 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 odbyt 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}. Navyiac 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 ožiarovania 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 ožiarovania 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 ožiarovania 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 ochrannnej 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 kyselý 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

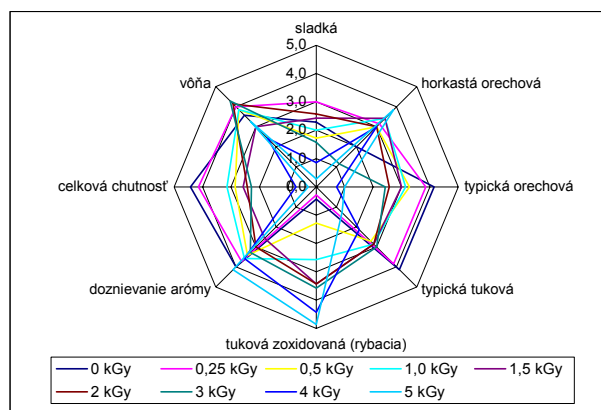
Výsledky senzorickej analýzy realizovanej panelom hodnotiteľov sú vizualizované v hviezdicových diagramoch (obr. 1 a 2). Najmä obr. 2 jasne demonštruje vplyv ionizujúceho žiarenia na pokles pozitívnych kvalitatívnych senzorickejch deskriptorov (celková chutnosť, sladká chuť, vôňa).

Tabulka I

Mikrobiologická analýza radiačne ošetrených vlašských orechov okamžite po ožarení

Vlašský orech dávka ožarovania	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.

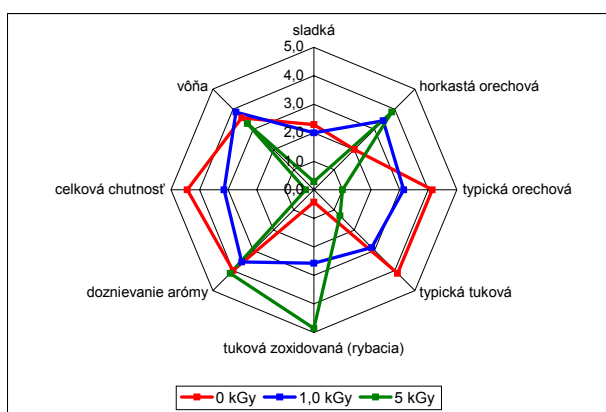
^a KTJ – kolóniotvorná jednotka



Obr. 1. Hviezdicový diagram senzorickej hodnotenia vlašských orechov pred a po ožarení 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 senzorickejch deskriptory: zoxidovaná chuť, celková chutnosť a vôňa, v 2. DF zoxidovaná chuť, vôňa a tuková aróma a v 3. DF horkastá chuť, tuková aróma a doznievanie arómy.



Obr. 2. Hviezdicový diagram senzoričného 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 senzoričného hodnotenia podľa významnosti vplyvu na diferenciáciu v nasledovnom klesajúcom poradí: zoxidovaná chuť, celková chuťnosť, vôňa a horkastá chuť. Pri senzoričnom 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 senzoričného hodnotenia ožiarených vlašských orechov pri predmetných šetrných a súčasne veľmi blízkych hladinách radiačného ošetrenia 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.

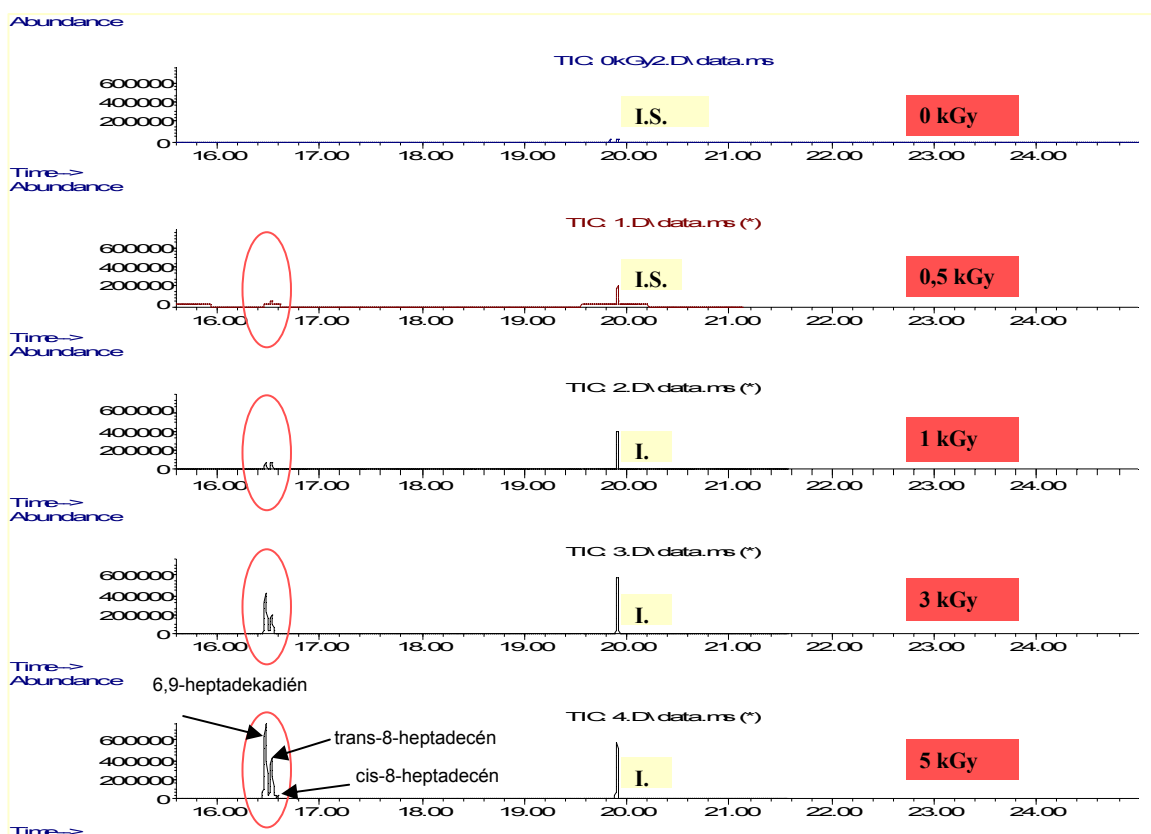
Čo sa týka relatívneho zastúpenia nenasýtenej MK s jednou dvojitou väzbou (kyselina olejová), s aplikovanou dávkou žiarenia narastá jej relatívny obsah rôznou mierou, nie proporčne. Naopak, so zvyšujúcou sa hladinou ožiarenia je jasný trend v poklese obsahu kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej, 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 ošetrenia vlašských orechov, získané z GC/MS analýz realizovaných

Tabuľka III
Kvantifikácia markerov radiačného ošetrenia 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 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.

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“

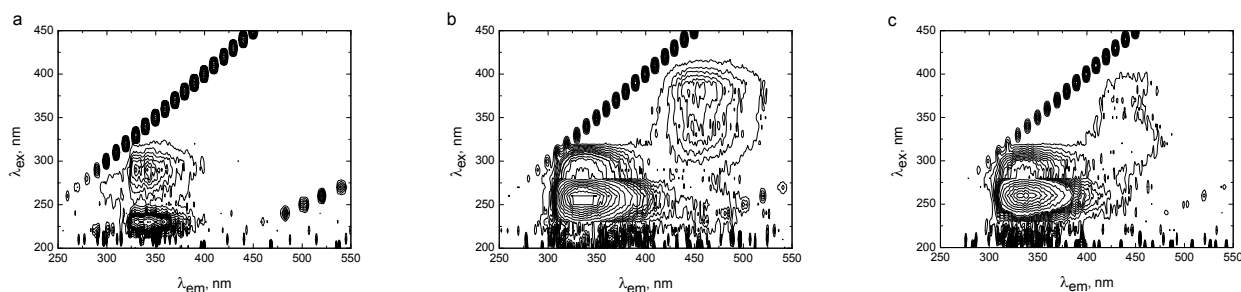
borovička, druhá borovička obsahovala vetvičku a v tretej vzorke sa nachádzali bobule borievky.

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

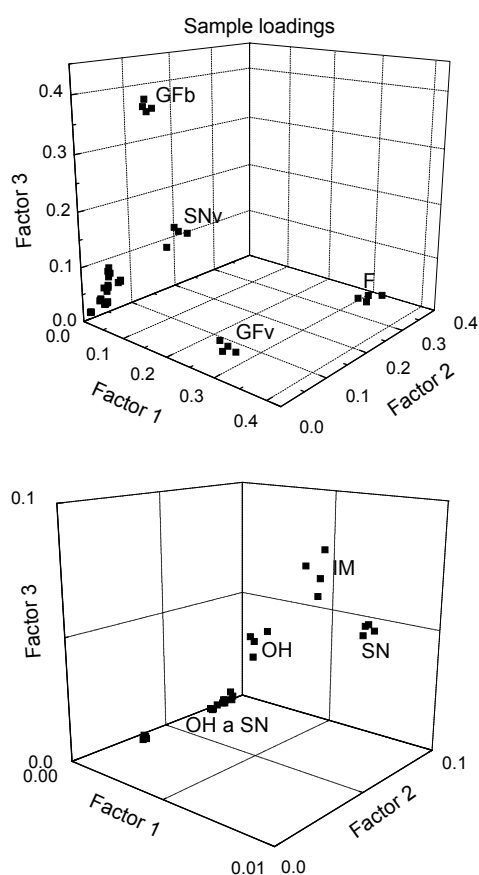
PARAFAC model sa riešil pre EEM namerané v intervale $\lambda_{ex} = 230–300$ nm a $\lambda_{em} = 310–450$ nm. Pre každú vzorku sa vytvorila EEM rozmerov 41×15 (počet $\lambda_{em} \times$ počet λ_{ex}) a z týchto matíc sa potom vytvorilo pole s rozmermi $44 \times 41 \times 15$ (počet vzoriek \times 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 Família) (obsahuje vetvičku), c) Original Spišská borovička (GAS Família) (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.

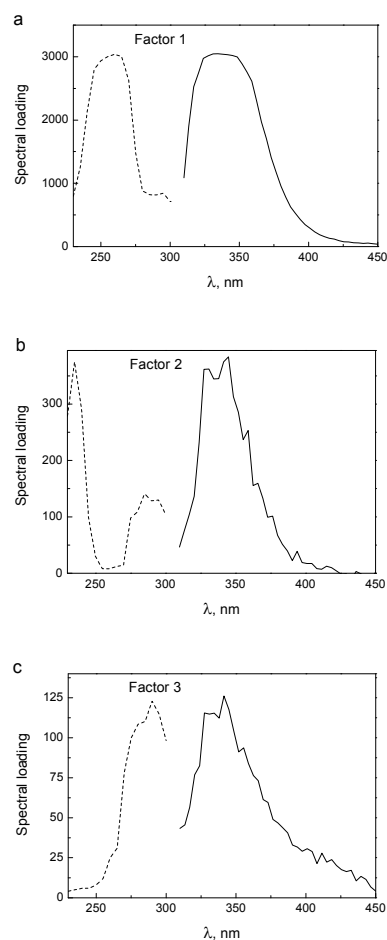
Obr. 2 znázorňuje hodnoty skóre (sample loadings) jednotlivých faktorov rôznych vzoriek vynesené navzájom proti sebe. Tento obrázok ukazuje možnosti modelu PARAFAC v klasifikácii slovenských borovičiek. Hodnoty skóre $> 0,5$ poskytujú produkty označené výrobcom ako



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 špécii 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 špécii Hg optimalizova-

nou metodikou bol celkový obsah Hg vo vzorkách stanovený amalgamačnou technikou na prístroji AMA 254.

Samotná úprava vzorky venóznej krvi pred stanovením špécii Hg bola založená na extrakcii so zmesou 6M HCl s NaCl, úprave pH extraktu a následnej derivatizácii s $\text{NaB}(\text{Ph})_4$ so súčasou extrakciou produktov do hexánu.

Pre GC separáciu špécii 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 kadmiu ($r = -0,203$, 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:

$$IU = [1(\Sigma\% \text{ monenas.MK}) + 2(\Sigma\% \text{ dinenas.MK}) + 3(\Sigma\% \text{ trinenas.MK}) + \dots]/100.$$

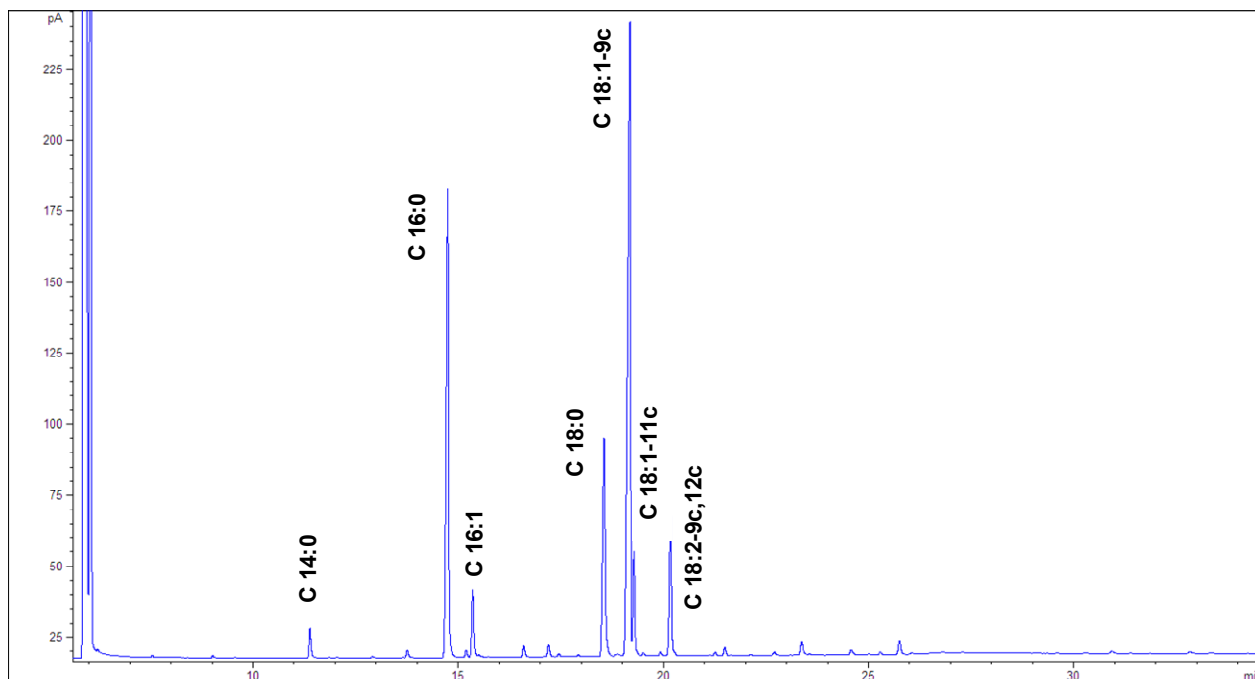
Výsledky a diskusia

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 dokozahehexaénová (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 prsí. 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., Juršíková, 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

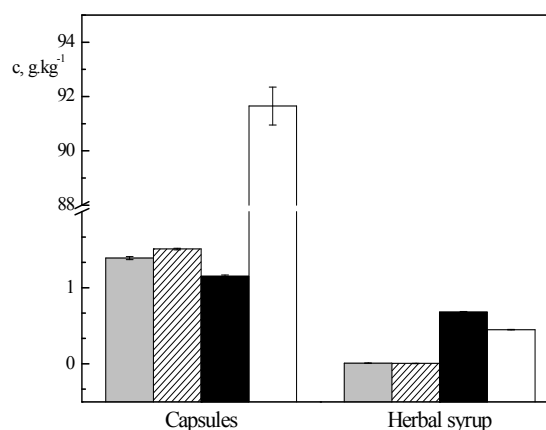


Fig. 1. Concentration of selected macroelements (□ Na, ▨ Mg, ■ K, □ Ca) determined in dietary supplements by ICP-MS

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.

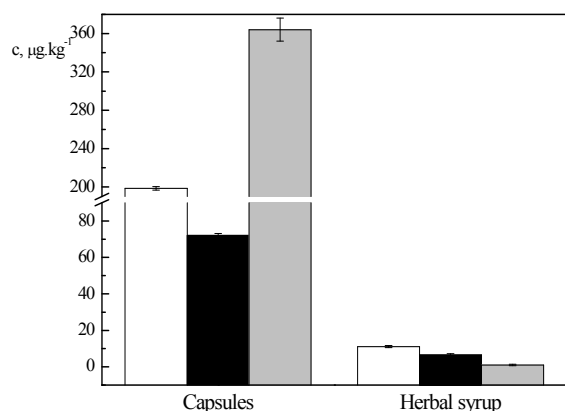


Fig. 2. Concentration of heavy metals (□ As, ■ Cd, ▒ Pb) determined in capsules' content and herbal syrups by ICP-MS

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 jídelníčku)*. 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 zrejmé, 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 nešpecifickej 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 Charakterická 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 zaisťovanie 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.

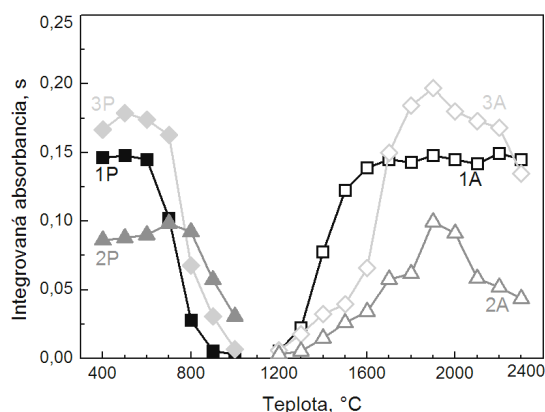
Výsledky a diskusia

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.

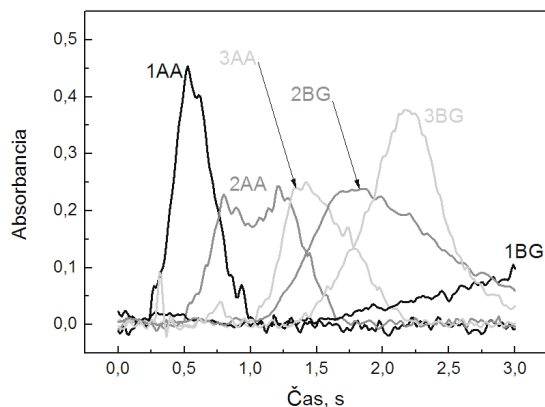
Z nameraných kriviek pyrolýzy (obr. 1.) je zrejmé, že bez prídavku modifikátora je analyt stabilný vo vodnom roztoku do 600 °C a v pevných vzorkách do 650 až 700 °C. Pre pevné vzorky je optimálna teplota atomizácie približne o 300 °C vyššia ako pre vodný štandard. Pravdepodobne tento jav súvisí s obtiažnejším 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-

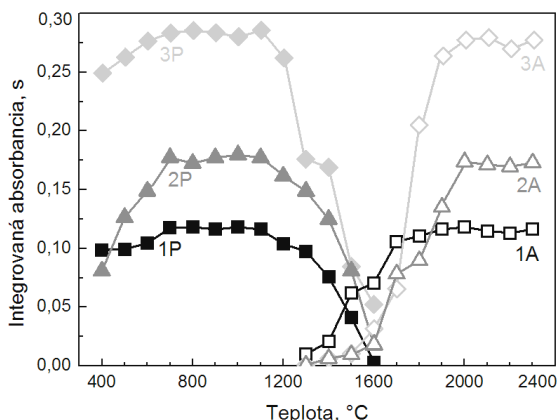


Obr. 2. Signály atómovej absorpcie (AA) a nešpecifickej absorpcie pri atomizácii Bi zo štandardného roztoku (krivky 1AA a 1BG, 0,5ng Bi v 10 μl roztoku), z kалу WT-H (krivky 2AA a 2BG, 0,455 mg vzorky) a z pôdy S-SP (krivky 3AA a 3BG, 0,341 mg vzorky) bez prídavku modifikátora (teplota pyrolýzy 600 °C 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 rozdielnú 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 pôdy 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



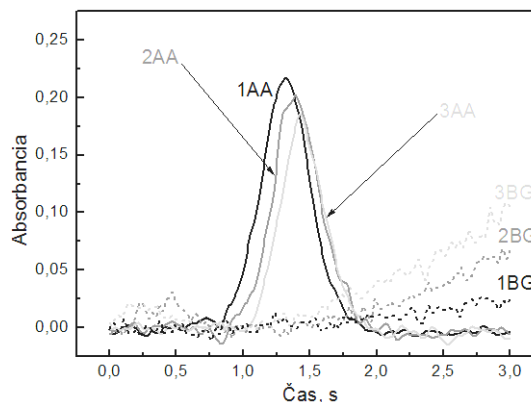
Obr. 3. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A; 2,0 ng Bi v 10 μl roztoku), pôde S-SP (krivky 2P a 2A; 1,00 mg vzorky) a kale WT-H (krivky 3P a 3A, 1,00 mg vzorky) v prítomnosti zmesného modifikátora obsahujúceho 10 μg Pd a 5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 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.

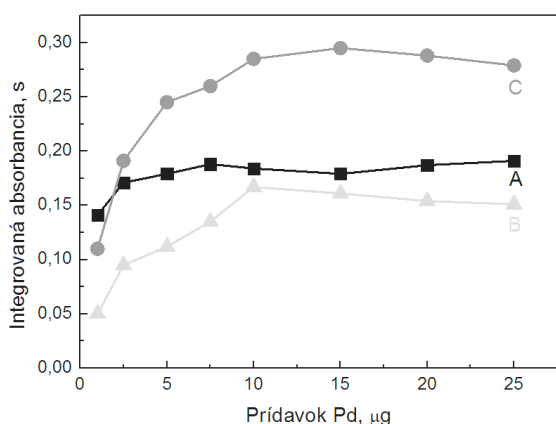
Pri komplikovaných vzorkách sa odporúča použitie tepelnej úpravy vzoriek vo viacerých krokoch³³ a preto sme sa rozhodli aplikovať tento postup aj pre nami analyzované vzorky. Najprv sa vzorky pyrolyzovali pri 500 $^\circ\text{C}$ a následne pri 1100 $^\circ\text{C}$. Pri použití dvojkrokovej pyrolýzy 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 pôdy 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-

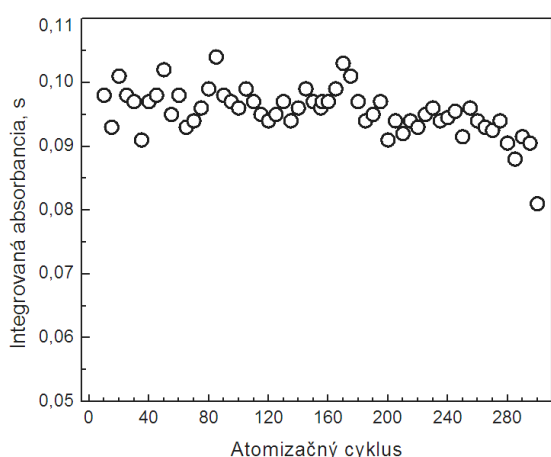


Obr. 4. Signály atómovej absorpcie (AA) a nešpecifickej absorpcie pri atomizácii Bi zo štandardného roztoku (krivky 1AA a 1BG, 0,5 ng Bi v 10 μl roztoku), z kalu WT-H (krivky 2AA a 2BG, 0,455 mg vzorky) a z pôdy S-SP (krivky 3AA a 3BG, 0,341 mg vzorky) s prídavkom zmesného modifikátora 10 μg Pd a 5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$



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 rekaliбраciu premeraním jedného bodu kalibračnej krivky. Pomocou rekaliбраcie 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 rekaliбраcií (každé piate meranie bolo rekaliбраcia) a sú graficky spracované na obr. 6. Pomerne častá rekaliбраcia 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.

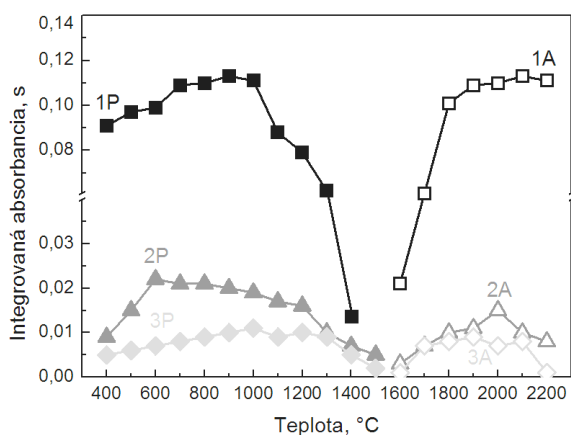
V prítomnosti modifikátora obsah bizmutu v analyzovaných vzorkách pôd a kalov sme vyhodnocovali kalibráciou na vodné štandardy (zarobené v 1% v/v HNO₃) a metódou prídavku štandardu. Pomerne nízky obsah analytu nám dovoľoval zvýšiť návažky vzorky pre jednotlivé analýzy, čo znamená podstatné zvýšenie reprezentatívnosti výsledkov analýz.

Stanovenie Bi v pôdach a kaloch s využitím ETAAS z roztokov

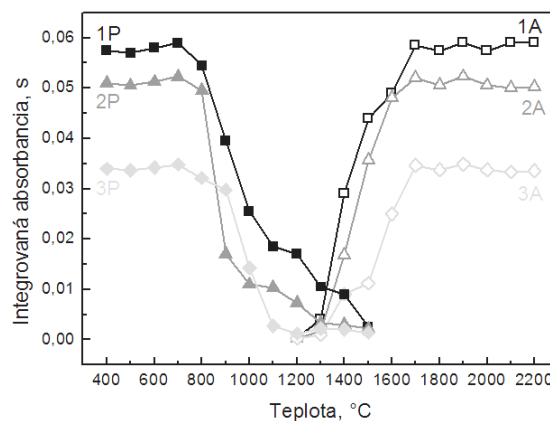
Nakoľko väčšina analyzovaných vzoriek nemala certifikovaný obsah bizmutu, a preto bolo nutné výsledky získané SS-ETAAS porovnať s výsledkami roztokovej analýzy ETAAS využívajúcej rozklad vzoriek. Pre rozklad vzoriek sme zvolili celkový rozklad s postupným použitím koncentrovanej HNO₃, HClO₄, HF za atmosferického 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 matricu. 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 matricu. 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 zmieneneho zmesného modifikátora sa analyt a matrica 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.

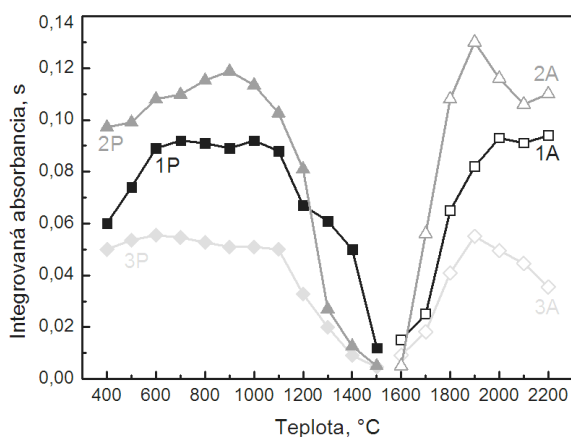
Preto bolo nutné nájsť taký modifikátor analytu, ktorý by zabránil stratám Bi počas tepelnej úpravy vzorky, a naopak na stabilitu zložiek matrice by mal zanedbateľný vplyv. Z tohto pohľadu neprichádzajú do úvahy žiadne z konvenčných stabilizátorov analytu na báze platinových kovov alebo karbidotvorných 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



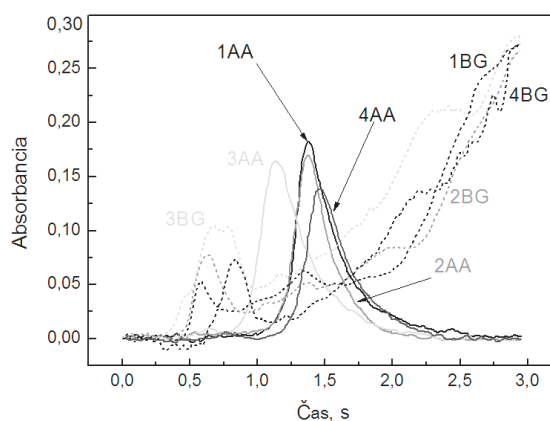
Obr. 7. Krivky termického rozkladu (P) a atomizácie (A) bizmutu v štandardnom roztoku (krivky 1P a 1A, 1,0 ng Bi v 20 µl roztoku), výluh lúčavkou kráľovskou kalu WT-H (krivky 2P a 2A) a výluh lúčavkou kráľovskou pôdy S-SP (krivky 3P a 3A) v prítomnosti zmesného modifikátora obsahujúceho 5 µg Pd a 3 µg $Mg(NO_3)_2$ 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 dovolila 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., Jones 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. Zápch 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 zápchu mikrobiologická aktivita. Oxidácia extraktívnych látok je najdôležitejším zdrojom zápchu pri výrobe mechanickej buničiny alebo pri sulfítovom spôsobe výroby buničiny. Prídavné látky do papiera a ich degradácia môžu byť takisto zdrojom zápchu¹⁻³.

Problémom pri analýze zapáchajúcich látok sú rozdielne výsledky pri chemických analýzach a pri senzorkom hodnotení úrovne zápchu. 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 zápchu 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 zápchu.

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 vnútrajšok, 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, metylmerkaptán, 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 plynná 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 čínidlá 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 činidlá. 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 šalvěže 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 něžž 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}

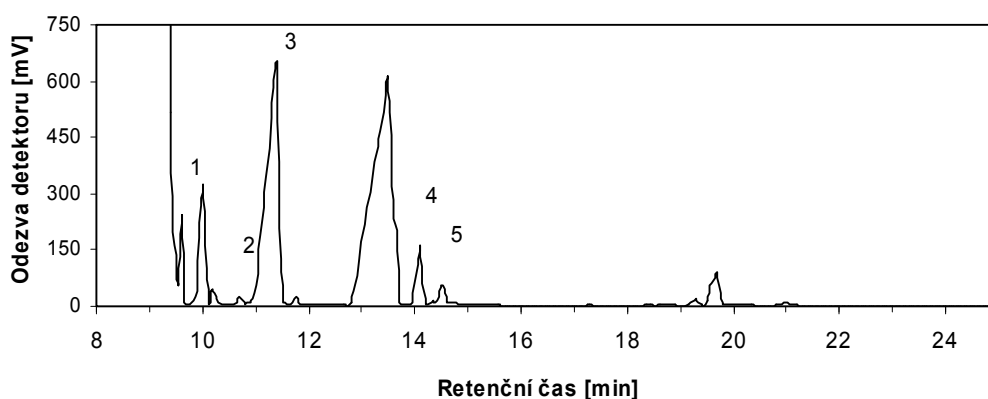
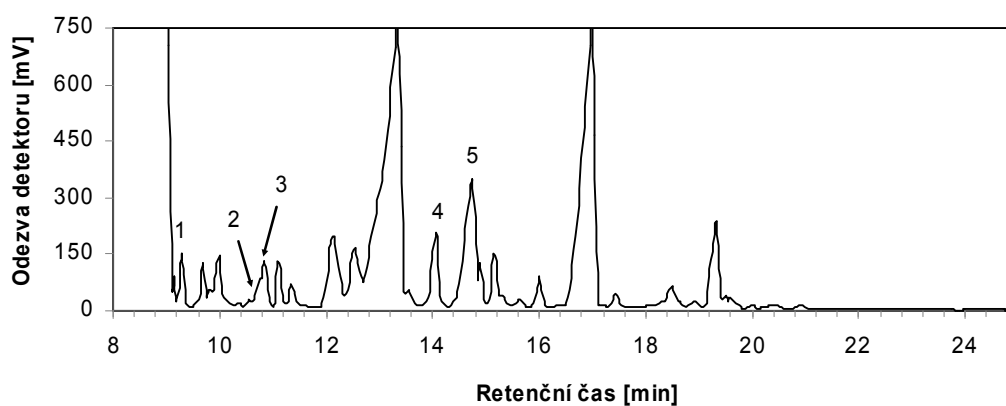
Jako dostačující množství vzorku pro analýzu bylo zvoleno 0,2 g sušené byliny do 10 ml nádoby. Toto relativně malé množství vzorku bylo vzhledem k předpokládané citlivosti metody shledáno jako dostatečné, avšak je třeba předpokládat, že se snižujícím se množstvím vzorku je třeba věnovat větší pozornost 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*-xylyny 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 šalvěže 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 reprodukovatelností 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 šalvěže lékařské byl největší obsah zjištěn u eukalyptolu, a to pro obě použité metody. Dále byly v listech šalvěže 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

- Velíšek J.: in: *Chemie potravin 2*. Osssiss, Tábor 2002.
- Hálková J., Rumišková M., Riedlová J., v: *Analýza potravin*. Vydavatel RNDr. Ivan Straka, Újezd u Brna 2000.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: *Food Chem. Toxicol.* 46, 446 (2008).
- Fakhari A.R., Salehi P., Heydari R., Ebrahimi S.N., Haddad P.R.: *J. Chromatogr., A* 1098, 14 (2005).
- Jeannot M.A., Cantwell F.F.: *Anal. Chem.* 68, 2236 (1996).
- Jeannot M.A., Cantwell F.F.: *Anal. Chem.* 69, 235 (1997).
- ČSN ISO 6571: *Stanovení obsahu těkavých olejů (silic)*, (červen 1995).
- Adam M., Dobiáš P., Eisner A., Ventura K.: *J. Sep. Sci.* 31, 356 (2008).
- 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@svpu.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 hydrolýza 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 vákuovej 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.

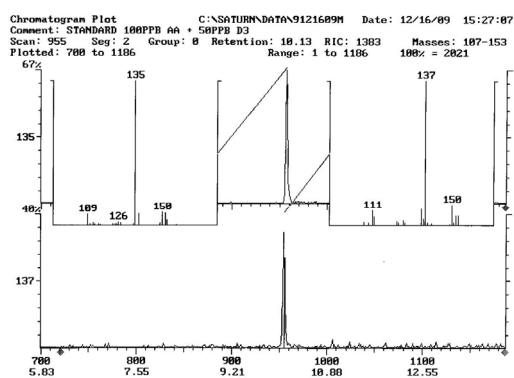
Výsledky a diskusia

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

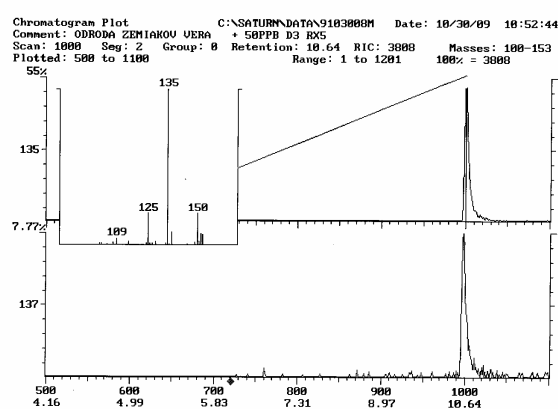
štandard akrylamidu D₃ (koncentrácia 50 µg l⁻¹) je na obr. 1 a vzorky zemiakových hranoliek odrody VERA je na obr. 2.

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 kg⁻¹

Tabuľka IV
Namerané hodnoty akrylamidu v jednotlivých odrodách zemiakov

Odroda zemiakov	ROSARA	AGRIA	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).

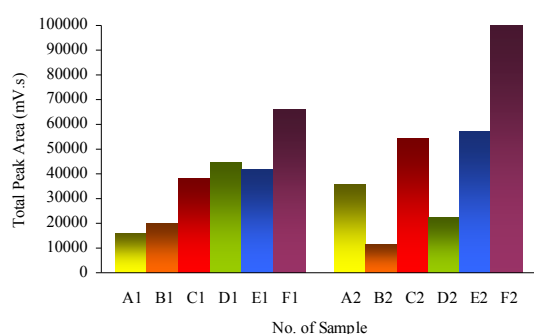


Fig. 1. Comparison of a Total Compounds Content in PSE Extracts

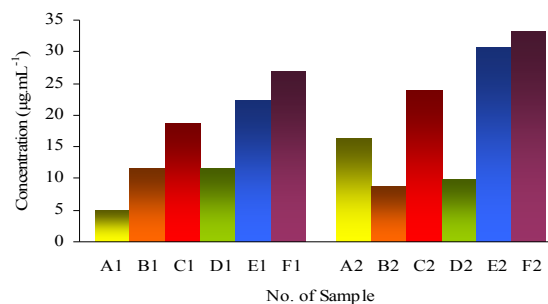
The opposite situation happened at 60 °C, when more alcoholic solvent was better for root extraction (B1, B2, Fig. 1), but not for extraction of leaves and blooms (E1, E2, Fig. 1).

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 [µg 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)

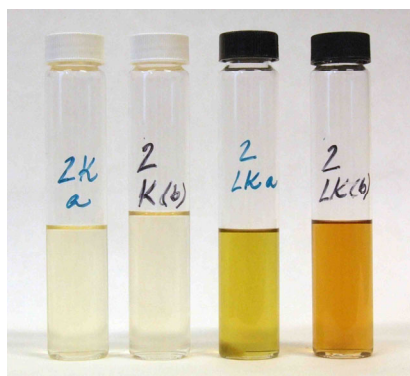


Fig. 4. **Echinacea extracts** (60 °C; K = roots; LK = leaves, blooms; a = EtOH/water = 60/40; b = EtOH/water = 40/60)

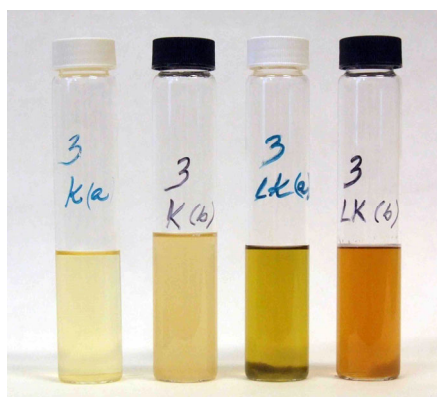


Fig. 5. **Echinacea extracts** (80 °C; K = roots; LK = leaves, blooms; a = EtOH/water = 60/40; b = EtOH/water = 40/60)

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 sušíně 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 nejrozsáhlejší změně 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 sušíně) 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 JŮZOVÁ

*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 záchvatové 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

Porovnaním 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 (R²)

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (q_{i,\text{mod}} - q)^2}{\sum_{i=1}^m (q_{i,\text{exp}} - q)^2} \quad (2)$$

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 $1/\alpha$ 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 $n = 1$, $\alpha = 1$, 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 $n = 2$, $\alpha = 1$, 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 $n = 1$, $\alpha \neq 1$, dostávame rovnicu fraktálovej kinetiky typu (1, α) (t.j. rovnicu Weibullovhovho 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 $n \neq 1$, $\alpha = 1$, 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 ($1, \alpha$)	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	$q_e = 74,4 \pm 0,6$ $n = 1,88 \pm 0,20$ $\tau_{n,\alpha} = 4,61 \pm 0,35$ $\alpha = 1,18 \pm 0,09$ $\tau_{1/2} = 4,43$	$q_e = 72,8 \pm 0,6$ $\tau_\alpha = 7,22 \pm 0,33$ $\alpha = 0,79 \pm 0,04$ $\tau_{1/2} = 4,54$	$q_e = 73,9 \pm 0,5$ $K_n = 0,020 \pm 0,005$ $n = 1,53 \pm 0,07$ $\tau_{1/2} = 4,35$	$q_e = 72,5 \pm 0,6$ $k_n = 0,016 \pm 0,010^{**}$ $n = 1,37 \pm 0,12$ $\tau_{1/2} = 4,57$	$q_e = 71,9 \pm 0,7$ $K_1 = 0,140 \pm 0,008$ $\tau_{1/2} = 4,95$	$q_e = 76,6 \pm 0,7$ $K_2 = 0,0031 \pm 0,0002$ $\tau_{1/2} = 4,21$

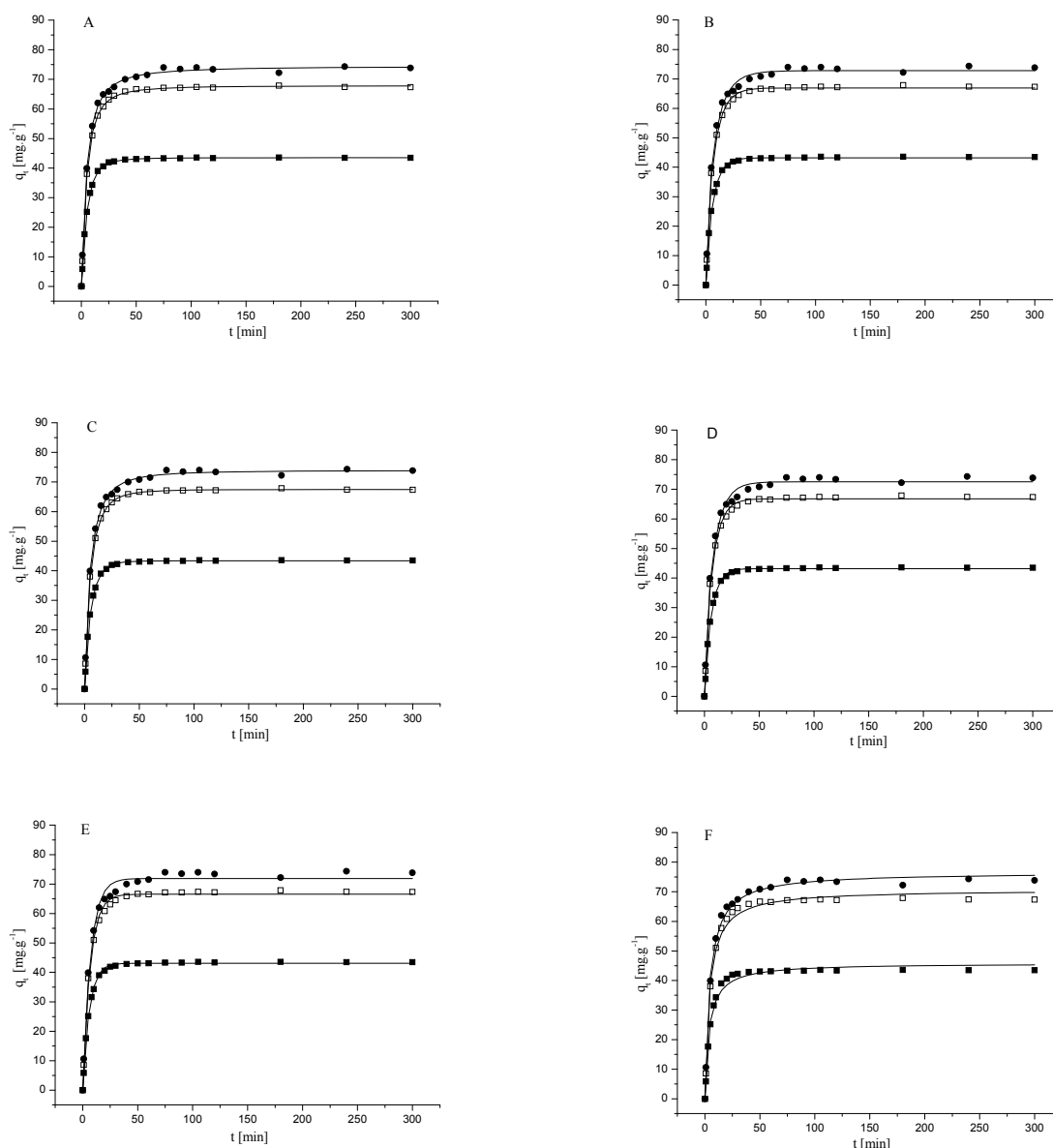
*,**štatisticky nevýznamné parametre na hladine významnosti 0,05 (* $P = 0,07$; ** $P = 0,20$)

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

$$K'_{n,\alpha}(t) = \alpha \frac{t^{\alpha-1}}{\tau_{n,\alpha}^\alpha} (1 + (n-1)(t/\tau_{n,\alpha})^\alpha)^{-1} \quad (19)$$

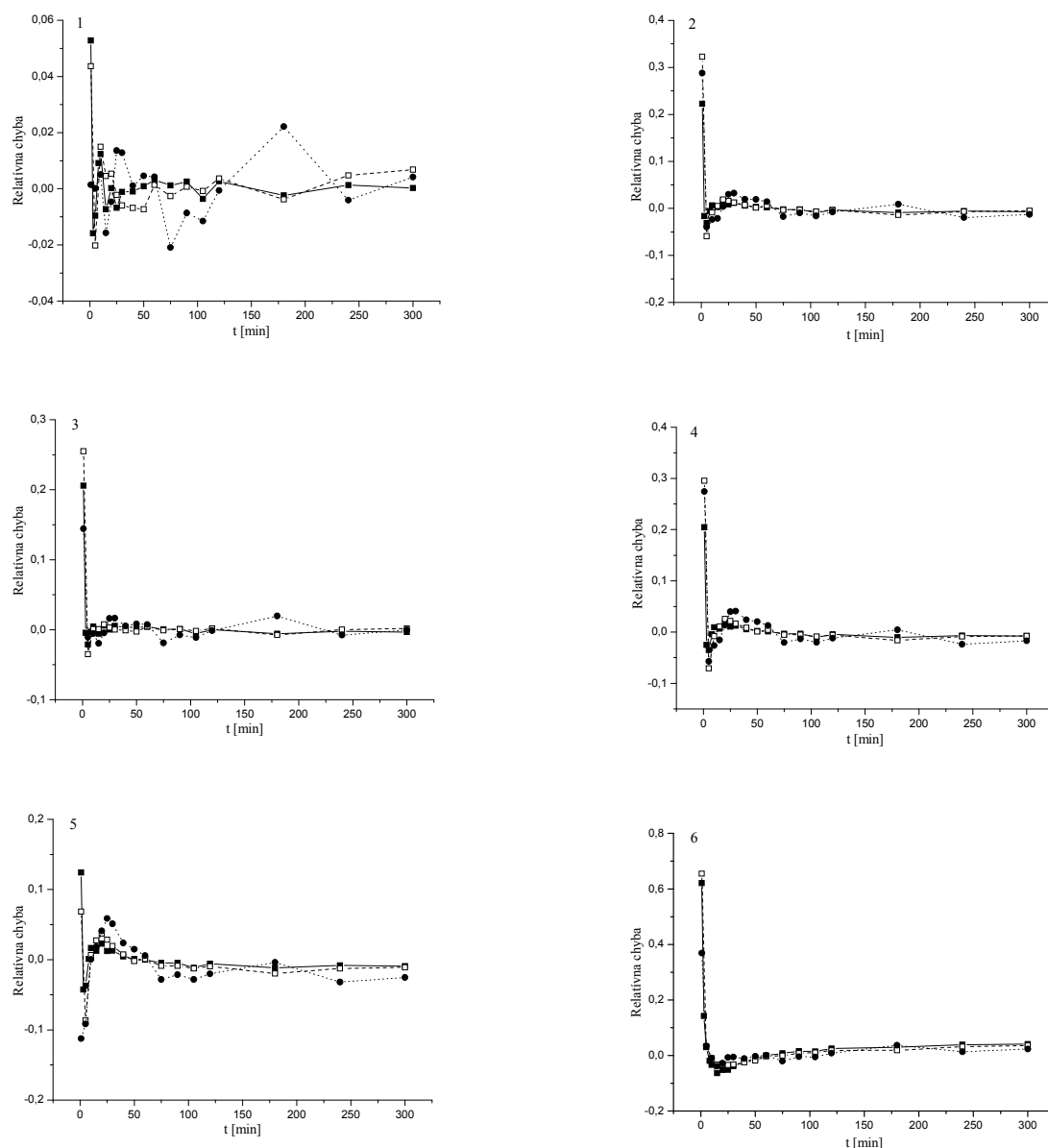


Obr. 1. Časové závislosti sorpcie SAF biomasou *A. bisporus* pri troch rôznych počiatkových koncentráciách SAF (■ 140 mg dm⁻³; □ 235 mg dm⁻³; ● 350 mg dm⁻³) opísané regresnými krivkami (—) šiestich kinetických modelov: A – fraktálová kinetika (n, α); B – fraktálová kinetika ($1, \alpha$); C – pseudo- 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

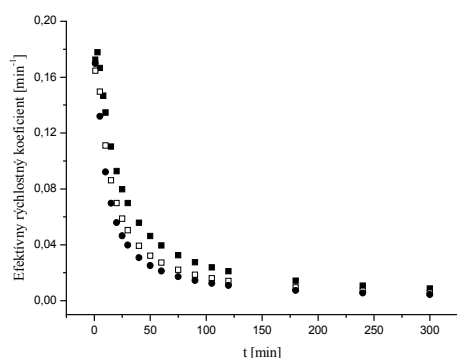
rýchlostnú konštantu z fraktálovej kinetiky, je relevantnou veličinou, ktorá charakterizuje časový vývoj sorpčného procesu, tzv. charakteristický čas $\tau_{n,\alpha}$ (pozri rov. 13). Charakteristický čas umožňuje vypočítať dôležitý parameter a to polčas reakcie $\tau_{1/2}$. Pretože kinetické rovnice 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 počiatočných 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 počiatočnej 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).