

FLEXIBLE SCOPE OF ACCREDITATION IN CLINICAL BIOCHEMISTRY AND IMMUNOCHEMISTRY

JÁN BALLA

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

Quality in medical laboratories

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

Medical laboratory accreditation

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

Accreditation scope development

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

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

Premises of flexible accreditation

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

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

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

Prerequisites of flexible accreditation

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

Discussion

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

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

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

Conclusion

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

REFERENCES

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

ELEKTROANALYTICKÉ METODY V KLINICKEJ ANALÝZE

JIRÍ BAREK

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

1. Úvod

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

2. Kontrola obsahu farmaceutických preparátů

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

3. Stanovení léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách

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

pinu na aromatickém systému, která je snadno elektrochemicky oxidovatelná.

4. Stanovení biomarkerů expozice, onemocnění či léčby

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

5. Vsádková a průtoková elektroanalytická stanovení

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

6. Elektrochemické biosenzory

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

7. Nové elektrodové materiály v klinické analýze

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

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

8. Využití supramolekulárních interakcí v klinické elektroanalýze

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

9. Závěr

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

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

LITERATURA

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

NETYPICKÉ ELEKTROANALYTICKÉ APLIKÁCIE

ERNEST BEINROHR a FRANTIŠEK ČACHO

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

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

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

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

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

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

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

VYSOKOCITLIVÉ BIOROZPOZNÁVANIE POMOCOU LEKTÍNŮVÝCH BIOSENZOROV A ICH BIOMEDICÍNSKE APLIKÁCIE

TOMÁŠ BERTÓK*, PETER GEMEINER,
a JÁN TKÁČ

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

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

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

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

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

LITERATÚRA

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

VYUŽITIE KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZY NA SEPARÁCIU LÁTOK V MNOHOZLOŽKOVÝCH VZORKÁCH

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

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

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

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

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

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

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

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

VYUŽITÍ UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD V ANALÝZE LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ

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

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

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

Uhlíkové pastové elektrody

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

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

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

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

Oxidovatelná léčiva

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

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

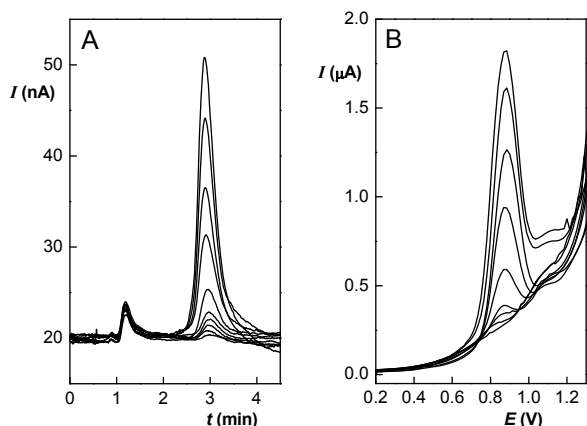
Zmíněné využitelné základní struktury jsou mezi léčivými relativně běžné a vyskytují se ve většině různých kategoriích léčiv. V některých případech jsou součástí charakteristické molekulové kostry, jako je tomu v případě katecholové struktury u katecholaminů a sympatomimetik, aromatické aminy běžné u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

změněny v průběhu jejich metabolické transformace.

Stanovení sulfamethizolu

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

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

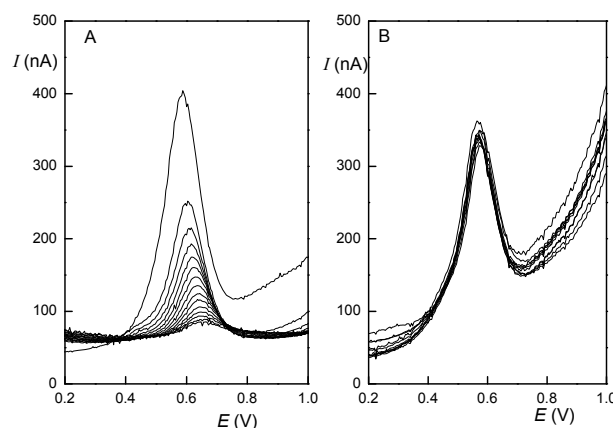


Obr. 1. Koncentrační závislosti sulfamethizolu, získané pomocí HPLC-ED (A) a DPV (B). (A) kolona LiChroCART 125-4, LiChrospher RP18 5 µm, mobilní fáze desetkrát zředěný BR pufr pH 3: methanol (70:30, V/V), detekční potenciál 1,3 V, $c = 4 \cdot 10^{-7}$; $6 \cdot 10^{-7}$; $8 \cdot 10^{-7}$; $1 \cdot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

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

Stanovení triclosanu

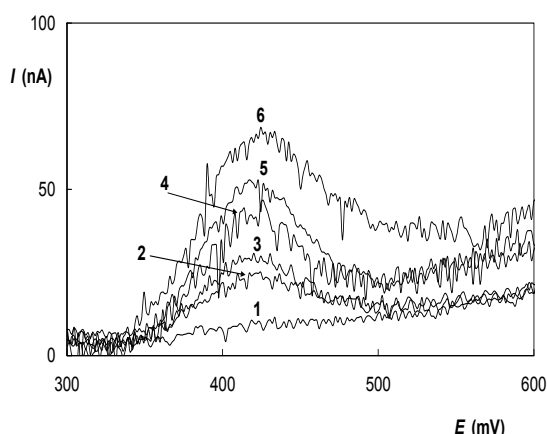
Hlavní myšlenkou při vývoji CPE byla možnost obnovitelnosti povrchu elektrody, odstraňující vliv historie elektrody na výsledky měření. Jeden z příkladů, využívající tuto výhodu, je metoda stanovení antibakteriálního činidla triclosanu pomocí DPV. Stanovení je prováděno v BR pufru pH 11, přičemž bylo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



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

Stanovení doxorubicinu

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



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

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

Stanovení epinefrinu

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

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

LITERATURA

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

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

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

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Experimental

Chemicals and columns

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

Polymers preparation

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

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

Columns preparation

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

Apparatus

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

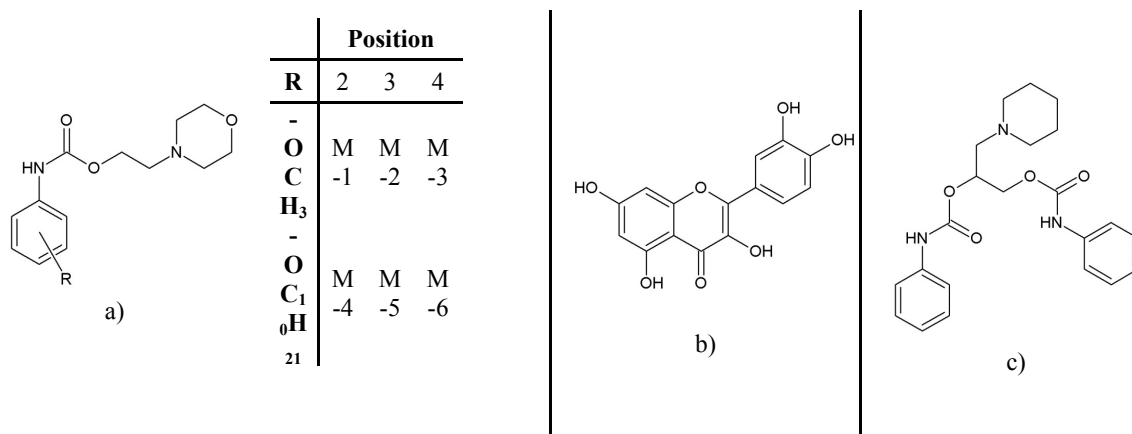


Fig. 1. Structures of analytes used in the study a) morpholinoethyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acid, b) quercetin, c) dipiperodon

Chromatographic experiments

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

Results and discussion

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

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

Table I

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

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

*Calculate at T = 293 K

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

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

Conclusions

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

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

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

REFERENCES

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

JEDNODUCHÁ ŘEŠENÍ PRO OBTÍŽNÉ HPLC SEPARACE

JINDŘIŠKA DOLINOVÁ

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

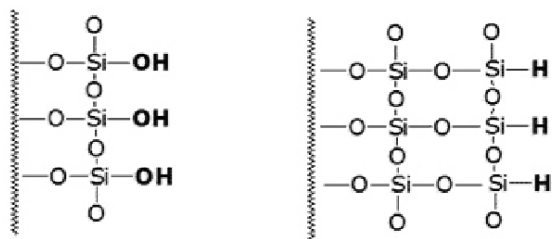
Separace v kapalinové chromatografii je výsledkem mnoha typů interakcí analytů se stacionární fází příp. složkami mobilní fáze. Výběr vhodné stacionární fáze významně ovlivní jak možnosti separace analytů, tak tvar a symetrii získaných chromatografických píků, ale i detekční limity analytů. Výběr vhodné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

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

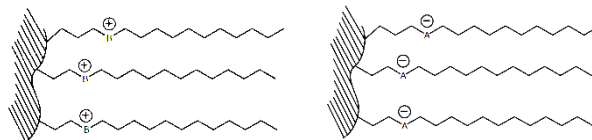
- silikagelem typu C,
- silikagelem typu B s modifikací alkylovým řetězcem s iontovou skupinou,
- neobvyklou modifikací silikagelu typu B odtadecylovými a propylfenylovými řetězci.

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

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



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



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

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

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

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

LITERATURA

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

MONITORING REZIDUÍ PESTICÍDOV V POTRAVINÁCH NA SLOVENSKU

JARMILA ĎURČANSKÁ

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

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

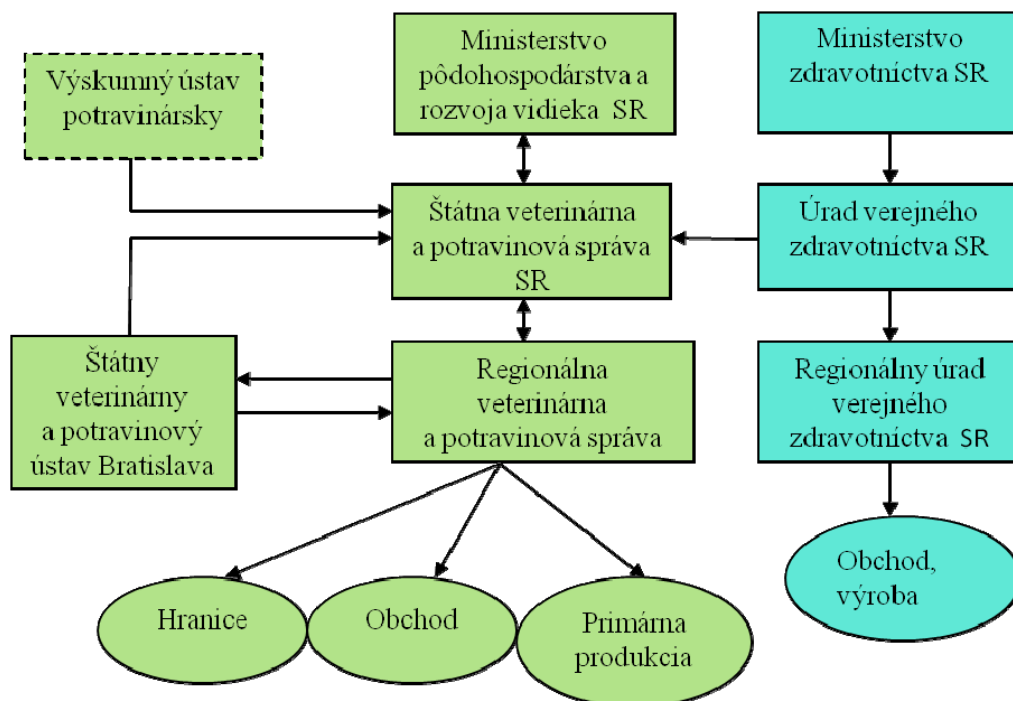
Kontrola, limity a výkon skúšok podliehajú rôznym európskym smerniciam a nariadeniam, z ktorých najdôležitejšie a najrozsiahlšie je Nariadenie EPar č. 396/2005 o maximálnych hladinách reziduí pesticídov v/na potravinách alebo krmivách rastlinného alebo živočíšneho pôvodu a o zmene a doplnení smernice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

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

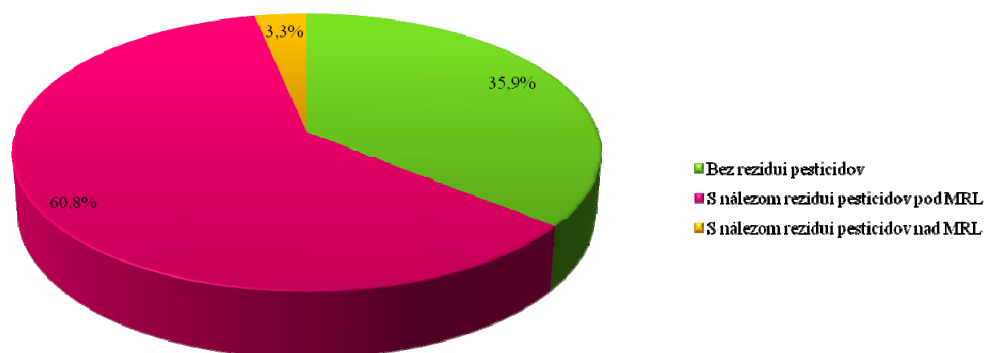
Kontrolu reziduí pesticídov zastrešuje ŠVPS SR, ale podieľa sa na nej viacero inštitúcií, ako vidno na obr. 1.

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

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



Obr. 1. Schéma kontroly reziduí pesticídov v SR



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

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

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

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

LITERATÚRA

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

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

ZUZANA FÁBEROVÁ* a EMÍLIA SEVČÍKOVÁ

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

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

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

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

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

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

MIROSLAV FIŠERA* and PAVEL VALÁŠEK

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

cal scavenging activity and FRAP reducing power.

Materials and methods

Instrumentation

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

Chemicals

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

Methods

Folin-Ciocalteu method

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

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

DPPH radical scavenging activity^{24, 25}

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

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

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

HPLC/MS analysis of phenolic composition

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

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

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

Discussion

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

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

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

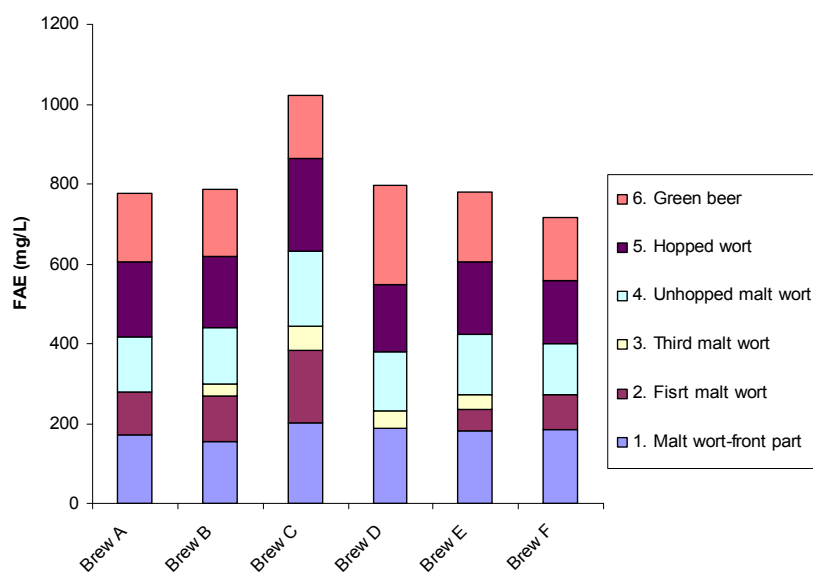


Fig. 1. Total phenolic content in all samples A-F from various stages during the brewing process (give the method used, experimental conditions etc.)

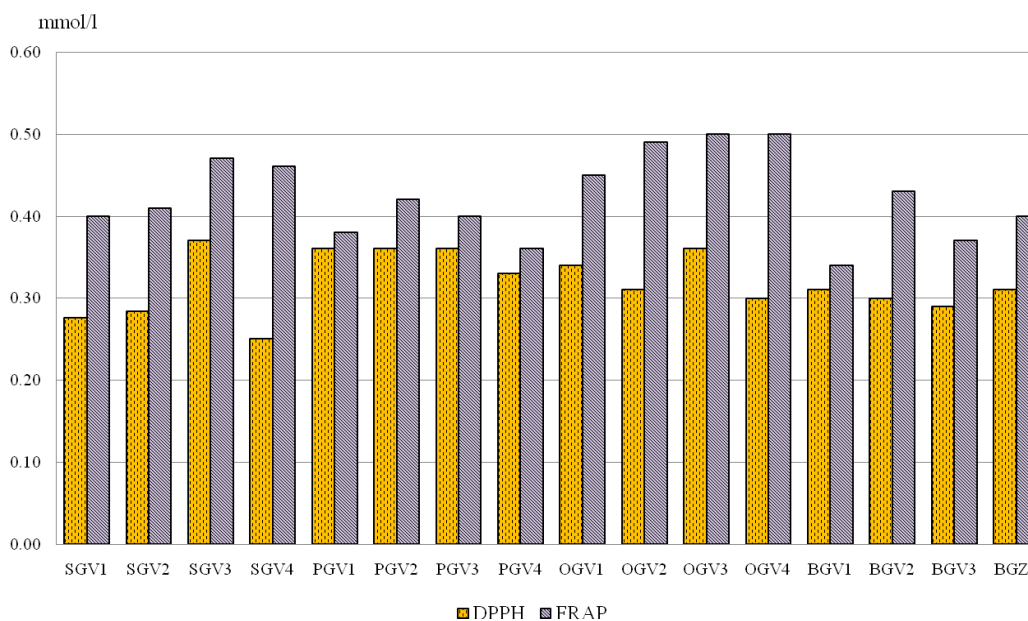


Fig. 2. Total antioxidant activities in white wine samples determined by the DPPH and FRAP methods (GAE mmol L⁻¹)

Total contents of phenolics

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

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

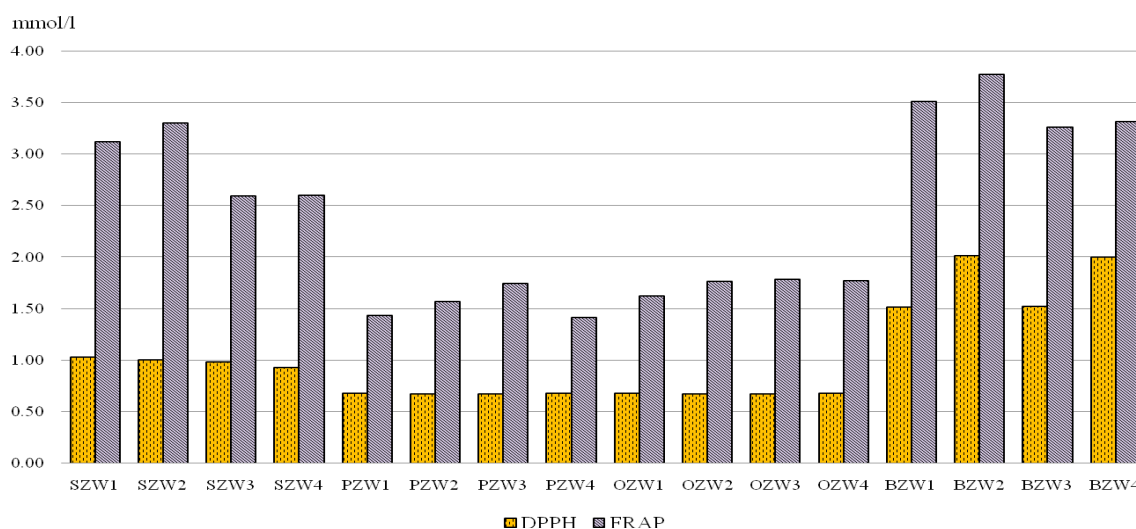


Fig. 3. Total antioxidant activities in red wine samples determined by the DPPH and FRAP methods (GAE mmol L⁻¹)

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

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

Conclusions

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

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

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

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

REFERENCES

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

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

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

JAN FISCHER* a JIŘÍ BAREK

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

Úvod

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

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

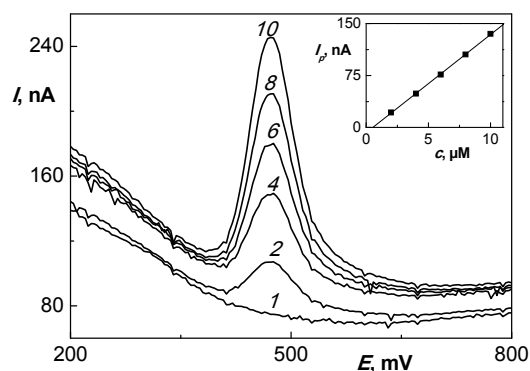
Aplikace amalgamových elektrod

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

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

Modifikace uhlíkovým inkoustem

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



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

movou elektrodou.

Typickým príkladom elektrochemicky aktívneho analgetika je paracetamol (*N*-acetyl-*p*-aminofenol alebo Acetaminophen), ktorý patrí k najbežnejším voľne prodejným liečivám (Paralen atd.). Díky modifikácii tuhej amalgamovej elektrody uhlíkovým filmom lze sledovať elektrochemickou oxidáciou hydroxyskupiny na aromatické jadro⁷. Táto reakcia bola využitá pre voltametrické stanovenie paracetamolu ako v moči pacientov tak v moči pacientov. Výše uvedená metóda je dostatočne selektívna k tomu, aby dokázala odlišiť tiež paracetamol od 4-aminofenolu, ktorý je primárnym degradačným produktom Paracetamolu. Díky tomu lze sledovať kvalitu a stálosť prípravkov obsahujúcich paracetamol.

Záver

Stříbrná amalgamová elektroda je senzorem, ktorý je vhodný pre stanovenie elektrochemicky aktívnych liečiv, môže byť v rade prípadov použitý ako plnohodnotná náhrada klasických rtuťových elektrod a jejich modifikácie zejména uhlíkovými filmami umožňuje rozšíriť jejich použití i nad rámec pracovného potenciálového okna rtuťových elektrod. Preto se jeví amalgamové elektrody jako vhodné pro použití v klinické analýze, kde mohou v mnoha případech úspěšně nahradit elektrody rtuťové.

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

LITERATURA

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

ANALÝZA A CHARAKTERIZÁCIA HUMÍNŮVÝCH KYSELÍN KOMBINÁCIU METÓD KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

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

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

Úvod

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

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

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

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

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

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

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

Experimentálna časť

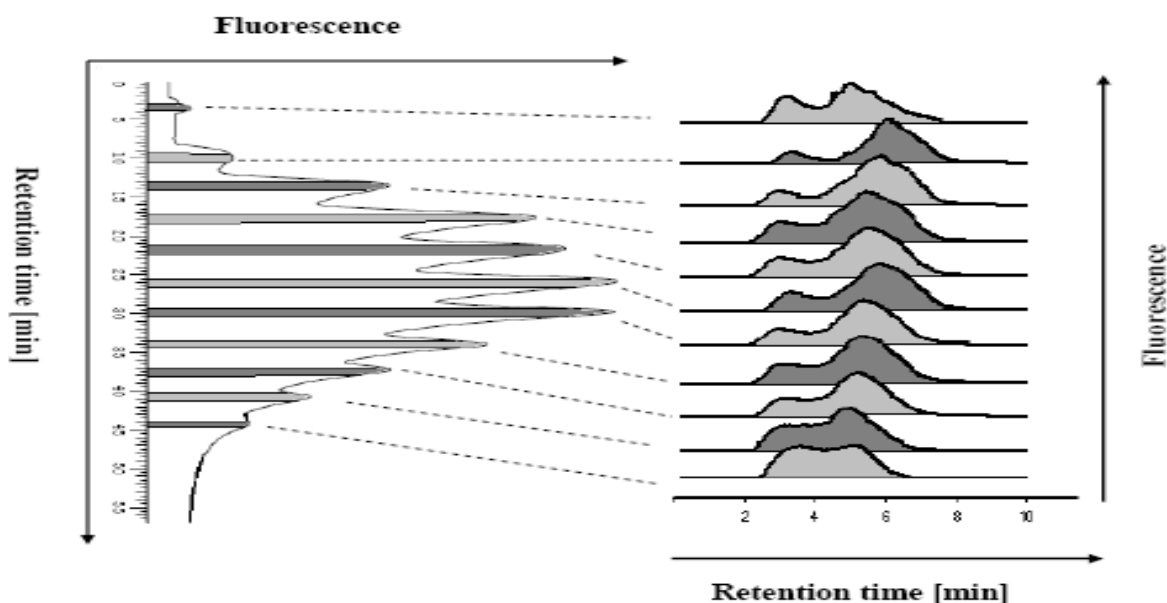
Všetky chromatografické experimenty sme uskutočnili použitím chromatografického systému LaChrom Merck – Hitachi (Merck, Darmstadt, Nemecko), ktorý sa skladal z nasledujúcich modulov: zo štvorkanálovej pumpy L-7100 on-line spojeným s vakuovým odplyňovačom L-7612, z automatického dávkovača L-7200, z kolónového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

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

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

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

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



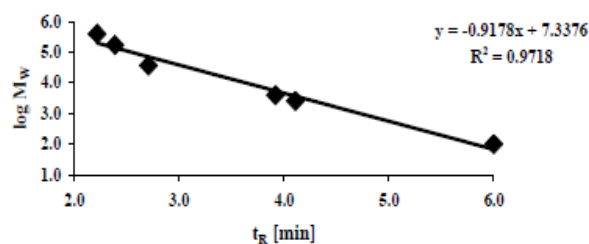
Obr. 1. Multichromatogram vzorky HK DS I, získaný aplikáciou metód RP-HPLC (vertikálne umiestnený záznam) a SEC (horizontálne umiestnený záznam). Obidva chromatografické záznamy vzorky HA DS I ($3,02 \text{ mg ml}^{-1}$) sme získali použitím FLD detekcie ($\lambda_{\text{ex.}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}}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

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

Výsledky a diskusia

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

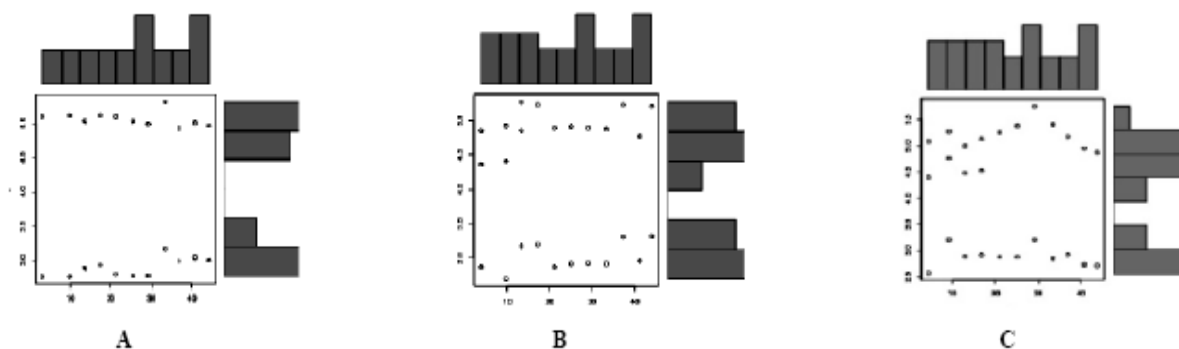
Pre druhý separačný stupeň sme si zvolili chromatografickú metódu, ktorá pracuje na základe rozdielných separačných princípov ako v prvom stupni používaná RP-HPLC. Vybrali sme rozmerovo vylučovaciu chromatogra-



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

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

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



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

Tabuľka I

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

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

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

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

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

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

Záver

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

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

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

LITERATÚRA

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

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

ALEŠ HORNA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LITERATURA

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

USE OF DERIVATIZED CYCLOFRUCTANS AS CHIRAL SELECTORS IN HPLC

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

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

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

katarina.hrobonova@stuba.sk

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

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

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

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

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

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCES

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

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

HUMÍNOVÉ LÁTKY – ANALYTY A INTERFERENTY CHEMICKEJ ANALÝZY VÝZNAMNÝCH SKUPÍN LÁTOK

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

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

Úvod

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

Teoretická časť

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

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

Diskusia

Diskusia problematiky kombinovania separačných techník využívajúcich kvapalnú prostredie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Záver

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

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

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

Material and methods

Sample collection

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

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

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

HRGC/HRMS analysis

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

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



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

Results and discussion

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

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

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

Table I

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

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

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

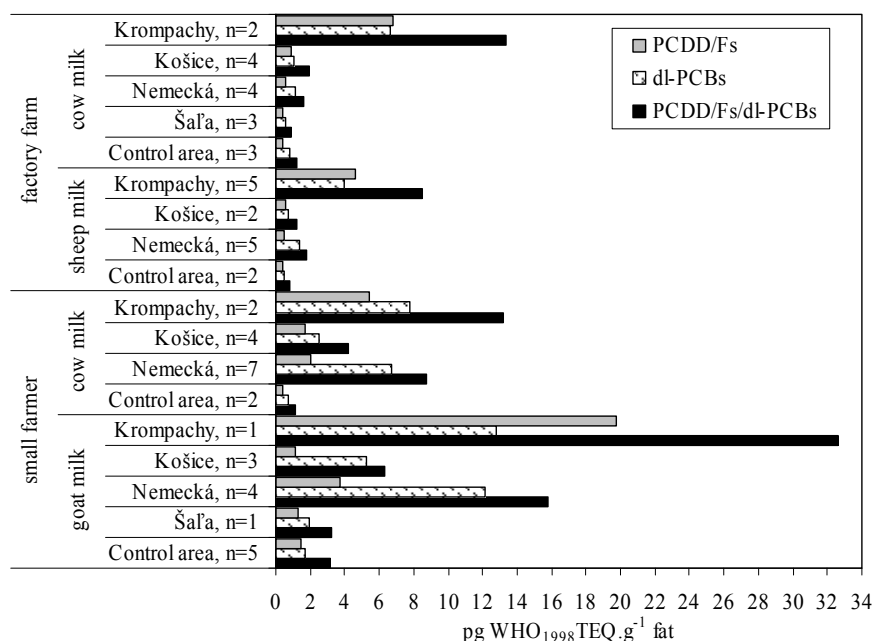


Fig. 2. PCDD/Fs, dl-PCBs and PCDD/Fs/dl-PCBs in milk samples by studied areas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCES

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

MEDICÍNSKE LABORATÓRIÁ A SYSTÉMY MANAŽERSTVA KVALITY

KATARÍNA JURÍKOVÁ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ODHAD NEISTOTY VÝSLEDKOV MERANIA VYPLÝVAJÚCI Z ODBERU VZORKY

JOSEF KALAŠ

josef.kalas.post@gmail.com

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

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

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

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

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

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

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

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

Na základe uvedeného bude pravdepodobne potrebné vážne sa zamyslieť nad:

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

Tabuľka I

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

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

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

LITERATÚRA

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

VODA OVPLYVNILA MOJE CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENIE?!

PETRA KOTIANOVÁ* a ZUZANA CEJPKOVÁ

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

Úvod

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

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

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

Kontaminanty vody a spôsoby ich odstránenia

Voda môže byť kontaminovaná:

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

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

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

Parametre vody pre chromatografiu

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

Tabuľka I

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

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

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

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

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

Zariadenie vhodné na prípravu ultračistej vody pre HPLC

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

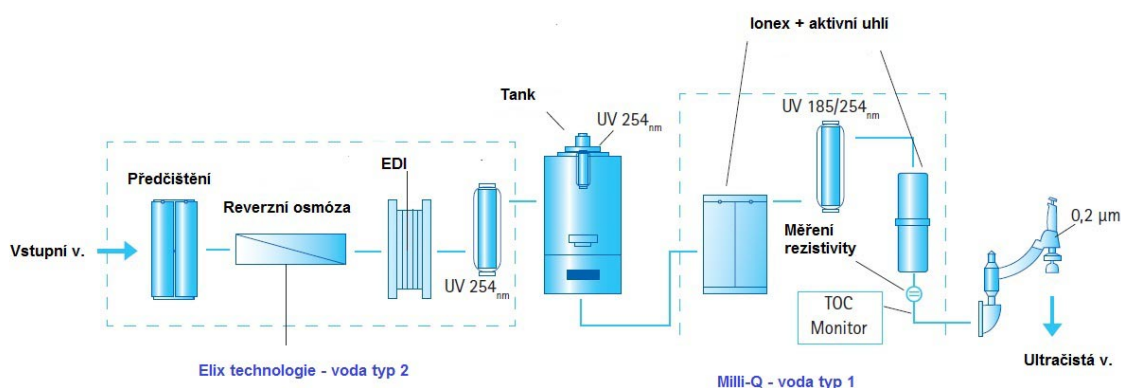
Voda typu 1 by sa mala používať vždy čerstvá, aby bolo zaručené, že parametre sa od odberu ultračistej vody z purifikačného zariadenia po jej použitie nezmenia. Príklad usporiadania systému Merck Millipore určeného na výrobu ultračistej vody pre chromatografické účely², ktoré rešpektuje túto zásadu je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

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

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



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



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

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

Záver

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

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

LITERATÚRA

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

VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

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

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

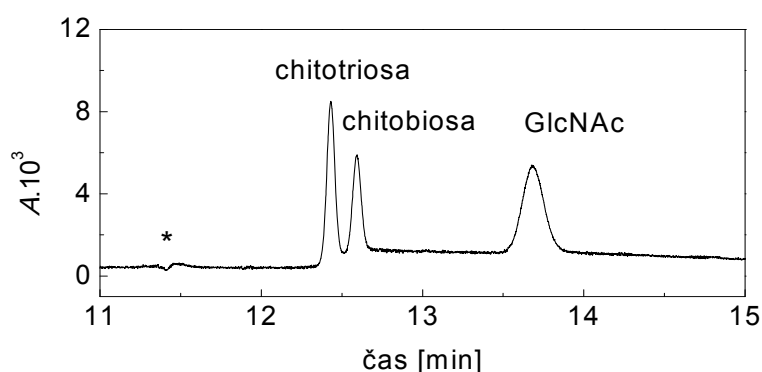
^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Česká republika
krizek@natur.cuni.cz

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

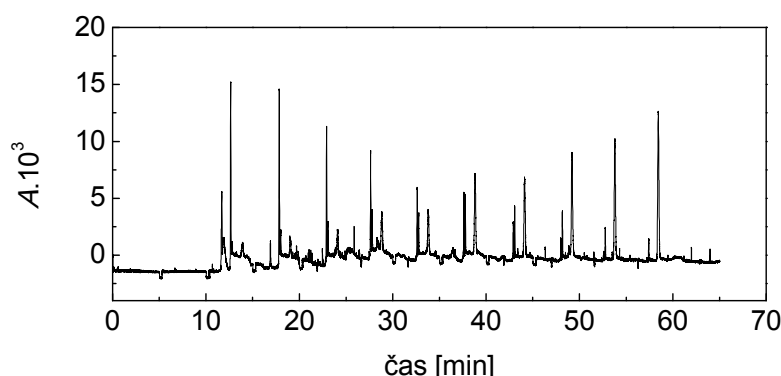
Pro stanovení enzymové aktivity se v praxi nejčastěji používá absorpční nebo fluorescenční spektrometrie ve viditelné a UV oblasti spektra. Pro tyto metody existují komerční čtečky schopné zpracovat až 1536 vzorků v jednom běhu. Spektrometrický přístup je výhodný hlavně díky své jednoduchosti a rychlosti.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

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

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



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



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

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

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

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

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

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

LITERATURA

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

KONTROLA ČISTOTY KONTRASTNÍCH LÁTEK PRO ZOBRAZOVÁNÍ MAGNETICKOU REZONANCÍ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

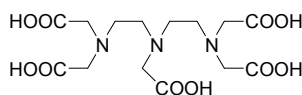
**ANNA KUBÍČKOVÁ* a PAVEL
COUFAL**

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

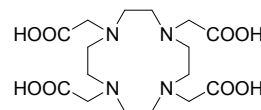
anna.kubickova@natur.cuni.cz

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

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



Obr. 1. Struktura DTPA



Obr. 2. Struktura DOTA

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

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

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

LITERATURA

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

CHEMICKÁ ANALÝZA CYANOTOXÍNOV VO VODÁRENSKÝCH NÁDRŽIACH A V PRÍRODNÝCH KÚPALISKÁCH

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

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

Abstrakt

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

Úvod

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

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

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

Metódy stanovenia

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

Príprava vzoriek

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

Chromatografická analýza

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

190–600 nm.

Podmienky chromatografickej analýzy

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

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

B – redestilovaná voda s 0,05 % obsahom

TFA (v : v)

prietok: 1,0 ml min⁻¹

teplota kolóny: 20 °C

objem nástreku: 100 ml

trvanie analýzy: 40 min

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

Analýza cylindrospermopsínu metódou LC/MS/MS

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

Podmienky chromatografickej analýzy:

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

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

B – redestilovaná voda s 0,05 % obsahom

TFA (v : v)

prietok: 0,2 ml min⁻¹

teplota nástreku vzorky: 300 °C

teplota kolóny: 20 °C

objem nástreku: 10 μl

trvanie analýzy: 30 min

ELISA test

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

Výsledky

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

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

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

Linearita – korelačný koeficient R > 0,995.

Opakovateľnosť – smerodajná odchýlka < 5 %.

Reprodukovateľnosť – smerodajná odchýlka < 10 %.

Správnosť – výťažnosť procesu úpravy vzorky ± 20 %.

Úspešnosť pri účasti na medzilaboratórnych porovnávacích testoch organizovaných SZÚ Praha.

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

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

Tabuľka I

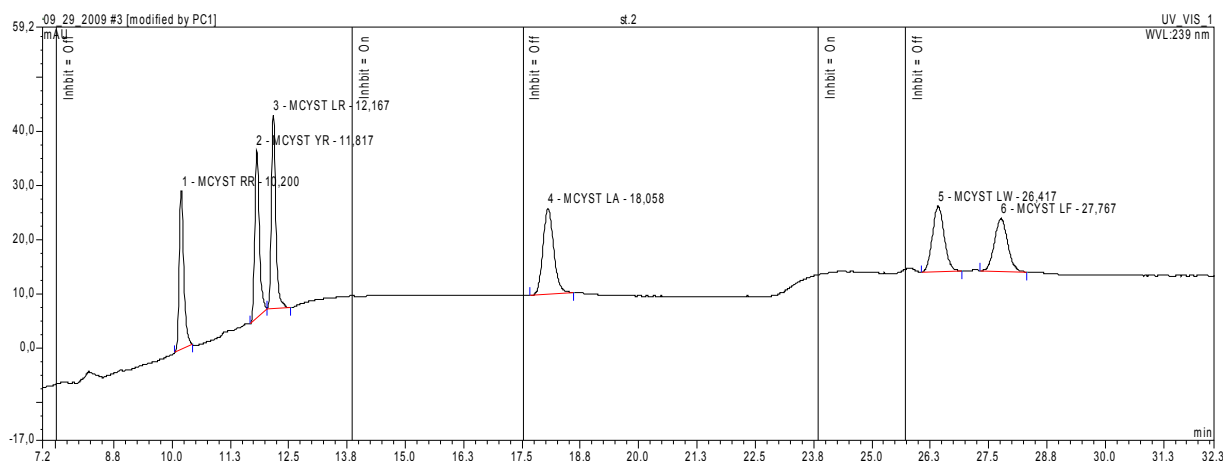
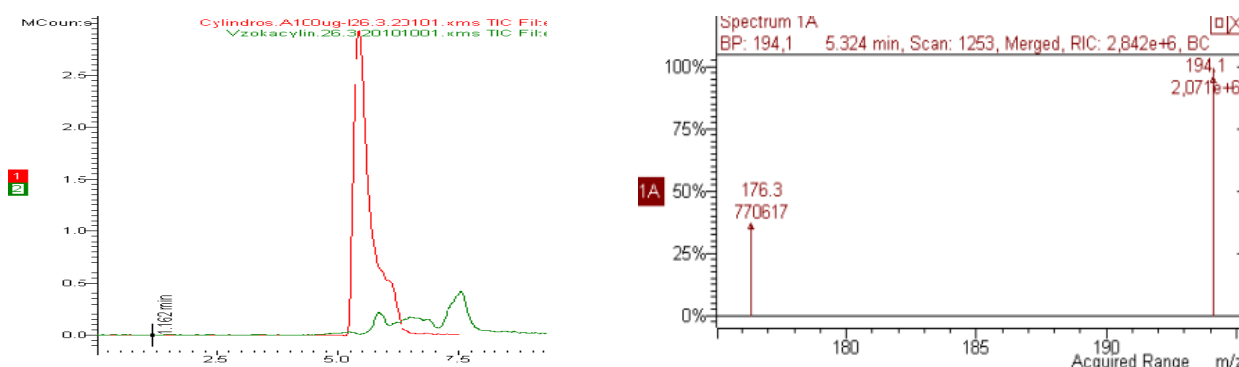
Maximálne hodnoty obsahu mikrocytínov (MCST) v lyofilizáte sinicových vodných kvetov a vo vodách v sledovaných lokalitách. Výsledky boli namerané v časovom intervale rokov 2008–2011

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

Tabuľka II

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

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

Obr. 1. Chromatogram štandardu mikrocystínov $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ Obr. 2. LC/MS/MS analýza štandardu cylindrospermopsínu $100 \mu\text{g l}^{-1}$ a vzorky z rekreačnej vodnej nádrže

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

Záver

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

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

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

LITERATÚRA

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

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

CONCEPTS OF CONSTRUCTION AND DETECTION WITH DNA-BASED BIOSENSORS

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCES

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

ŠTÚDIUM ROZKLADU NIEKTORÝCH LOKÁLNYCH ANESTETÍK V BIOLOGICKÝCH VZORKÁCH METÓDOU HPLC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

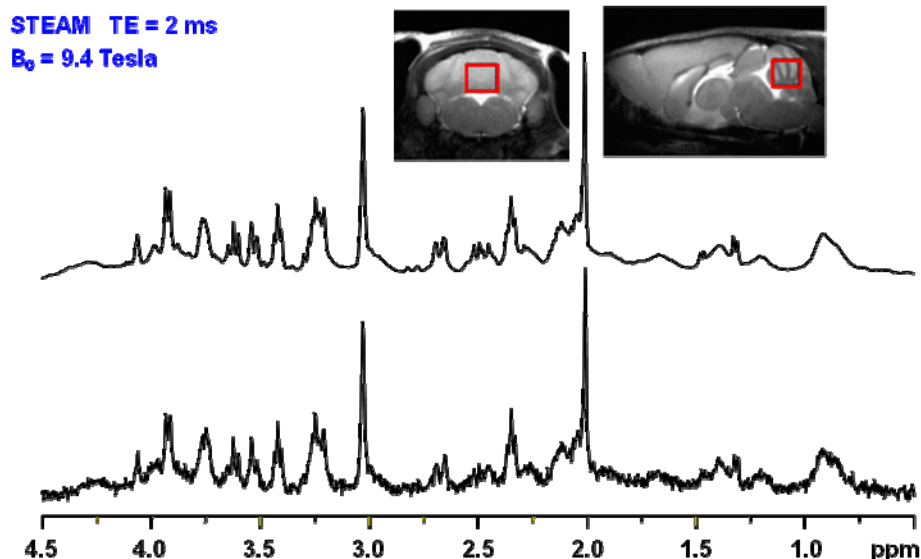
IN VIVO KVANTITATÍVNA ANALÝZA METABOLITOV V MOZGU**LADISLAV BAČIAK, SVATAVA KAŠPAROVÁ A TIBOR LIPTAJ****Chemickotechnologická fakulta STU, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
tibur.liptaj@stuba.sk*

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

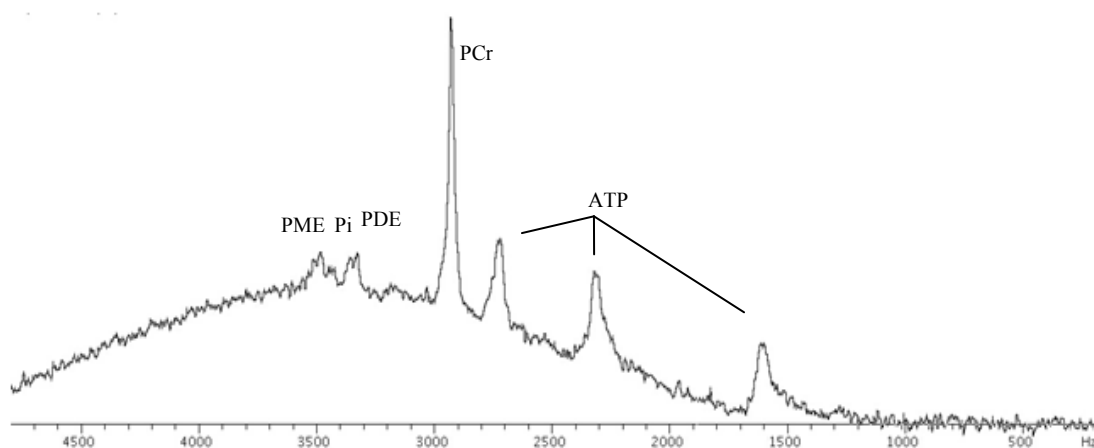
vzoriek žijúcich objektov a to od úrovni mikroorganizmov, cez tkanivá, orgány až po experimentálne zvieratá a ľudí. Z hľadiska technického usporiadania, možno *in-vivo* NMR experimenty rozdeliť na:

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

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



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



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

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

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

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

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

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

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

LITERATÚRA

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

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

DANIELA MACKOVÝCH, AUGUSTÍN MAJCHRÁK, JARMILA NOVÁKOVÁ a KATARÍNA UHRINOVÁ

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

Úvod

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

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

Experimentálna časť

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

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

Úprava vzoriek

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

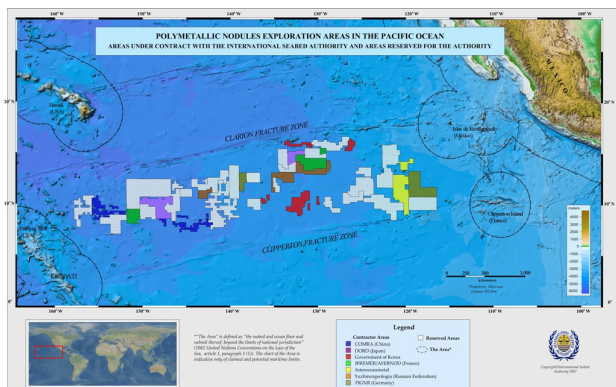
Chemikálie

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

Analytické metódy a prístroje

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

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



Obr. 1. Oblasť výskytu polymetalických konkrécií v Tichom oceáne



Obr. 2. Vzorky polymetalických konkrécií

Tabuľka I
Vlnové dĺžky prvkov meraných na AES-ICP

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

Tabuľka II
Pracovné podmienky merania na RFS

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

Rozsah prvkov	Na (11) – U (92)
Rtg lampa	Pd s Be okienkom P _{max} =300 W
Rtg generátor	U=1–60 kV, I= 1–80 mA, P= do 3,5 kW
Detektor	polovodičový Si(Li) chladený N ₂ (l),
Rozlíšenie	150 keV na čiare K _α Mn
Rozptylové terčiky	Mo, Co, Al ₂ O ₃ , B ₄ C, Al, HOPG-kryštál
Výveva	kapacita 5 m ³ h ⁻¹
Lis	hydraulický HERZOG HTP 40
Indukčné taviace zariadenie	ITZ-1

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

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

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

Tabuľka III

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

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

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

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

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

Tabuľka IV

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

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

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

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

Výsledky a diskusia

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

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

Výsledky analýz sú uvedené v tab. III.

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

Záver

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

LITERATÚRA

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

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

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

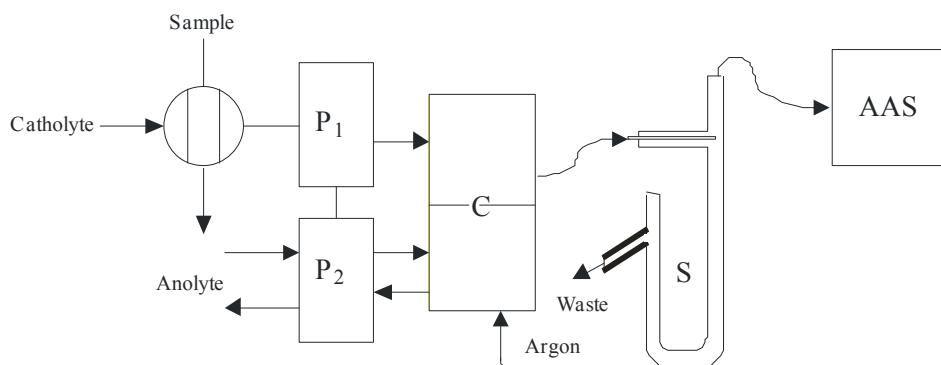


Fig. 1. Schematic diagram of the electrochemical HG system; P1, P2 – peristaltic pumps, C – electrochemical flow-through cell, S – gas-liquid separator, AAS – atomic absorption spectrometry

Experimental

Instrumentation

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

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

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

Reagents and standard solutions

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

Sample preparation

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

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

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

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

Procedure

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

Results and discussion

Composition of the carrier-electrolytic solution

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

Electrolytic current

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

Carrier stream flow rate

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

Interferences in the determination of Se

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

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

Detection limits, characteristic concentrations and precisions

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

Analysis of real samples

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

Conclusion

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

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

Table II
Detection limit, characteristic concentration and relative standard deviation

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

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

Table III
Analyses of real samples (Se)

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

^a value in ng g^{-1}

REFERENCES

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

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

DAVID MILDE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LITERATURA

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

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

UTILIZING MOLECULAR EVOLUTIONARY PATTERNS FOR MASS SPECTRA INTERPRETATION

ROBERT MISTRÍK

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

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

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

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

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

PREHLAD APLIKÁCIÍ CHEMOMETRIE V MEDICÍNE

JÁN MOCÁK a VIERA MRÁZOVÁ*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LITERATÚRA

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

CHARAKTERIZACE MIKRO A NANO OBJEKTŮ PRO MEDICÍNU POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

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

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

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

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

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

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

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

LITERATURA

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

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

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

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

Summary

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

Experimental

Samples

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

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

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

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

Basic characteristics of solid flours

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

Extracts preparation

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

HPLC-MS, UV-VIS and EPR spectral characteristics

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

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

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

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

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

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

Results and discussion

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

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

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

Table III

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

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

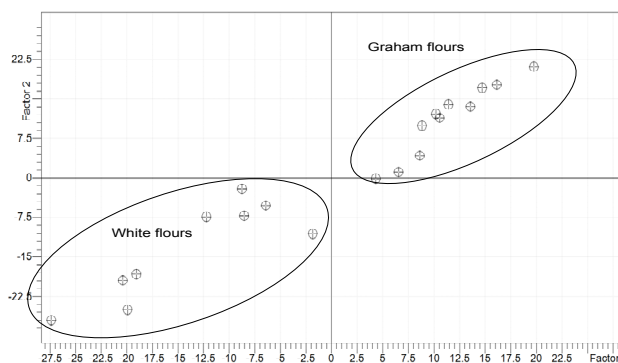


Fig. 1. Wheat, rye and spelt flours spectral reflection data projection by principal component factoring (each point represents a reflection spectrum of sample in VIS spectral region). For the differentiation purposes, flour samples were classified into two sub-groups as graham (whole meal) and white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

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

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

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

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

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

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

Table IV

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

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

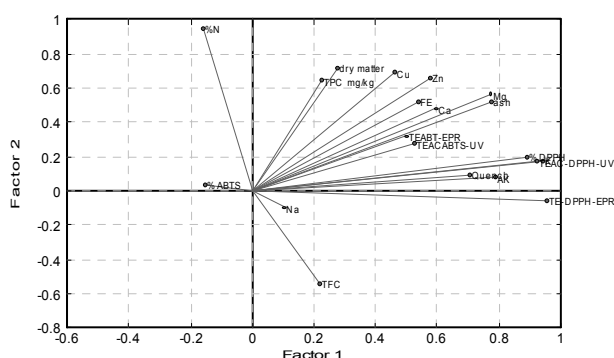


Fig. 2. Plot of factors (Varimax rotation) indicating the importance of individual experimental characteristics of flour samples and their extracts for the purposes of samples differentiation according to chosen criteria

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

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

Conclusion

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

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



Building partnership



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

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LITERATÚRA

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

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

LUBICA ŠTULLEROVÁ
a **OLGA KOVÁROVÁ**

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

Stručná charakteristika organizácie

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

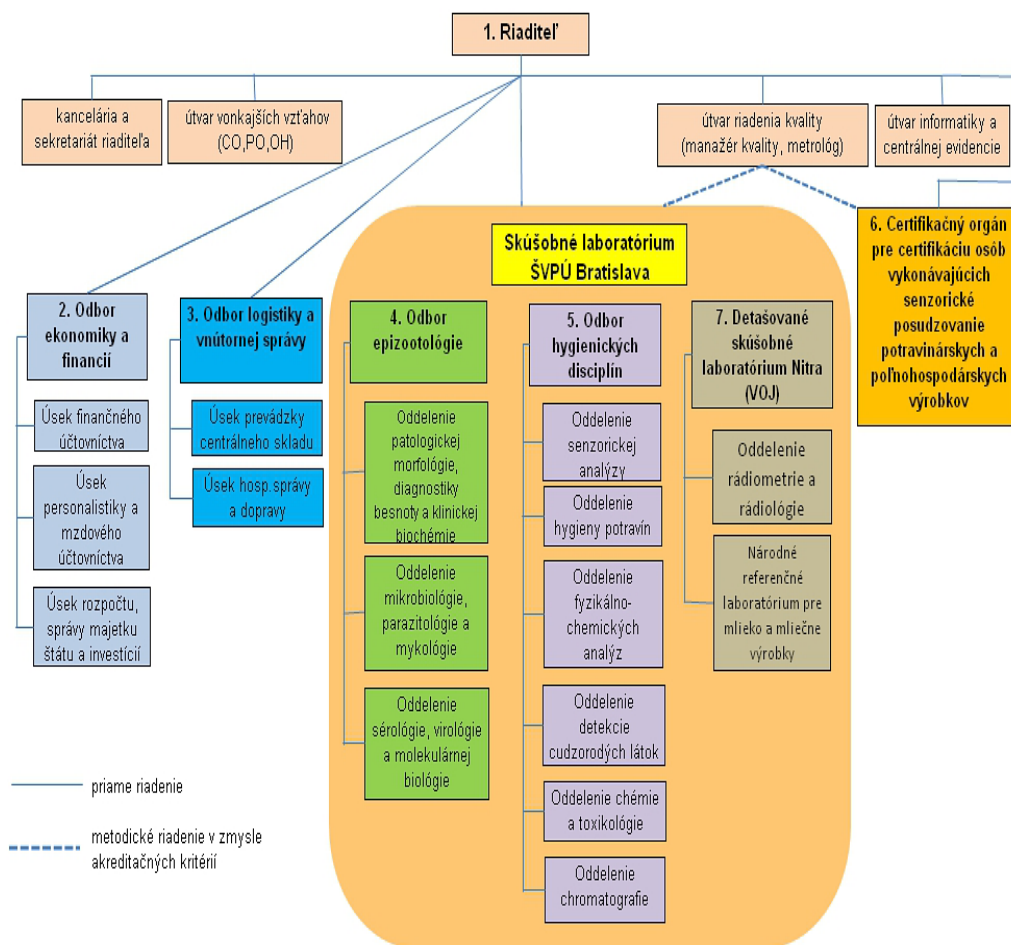
SPPI) v roku 2002 a v roku 2007 zlúčenie so Štátnym veterinárnym a potravinovým ústavom Nitra.

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

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

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

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



Obr. 1. Organizačná štruktúra ŠVPÚ Bratislava

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

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

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

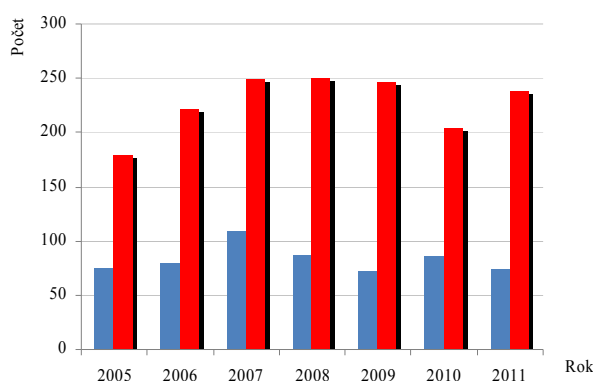
Ako vidieť z organizačnej štruktúry nášho ústavu, okrem laboratórnej diagnostiky (skúšobných laboratórií), ktorá tvorí prevažnú väčšinu činnosti ústavu, ŠVPÚ Bratislava má aj akreditovaný Certifikačný orgán pre certifikáciu pracovníkov vykonávajúcich senzorické posudzovanie potravinárskych a poľnohospodárskych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

- Potravinárske a poľnohospodárske výrobky,
- vína.

podľa požiadaviek ISO/IEC 17024:2003.

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

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



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

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

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

Pravidlá účasti SL ŠVPÚ v medzilaboratórnych porovnávaníach v súčasnosti

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

Postup bol nasledovný:

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

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

Čo v prípade neúspešnej účasti v medzilaboratórnych porovnávaníach

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

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

Záver

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

Použitie skratky

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

LITERATÚRA

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

SIMULTÁNNE STANOVENIE VYBRANÝCH LIEČIV VYUŽITÍM BÓROM DOPOVANEJ DIAMANTOVEJ ELEKTRÓDY

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

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

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

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

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

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

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

VERIFICATION OF WINES ORIGIN BY MEANS OF SPECTROSCOPIC TECHNIQUES

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

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

Summary

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

Experimental

Samples

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

UV-VIS experiments

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

EPR experiments

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

Table I
List of representative wine samples and their characteristics

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

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

Statistical analysis

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

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

Results and discussion

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

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

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

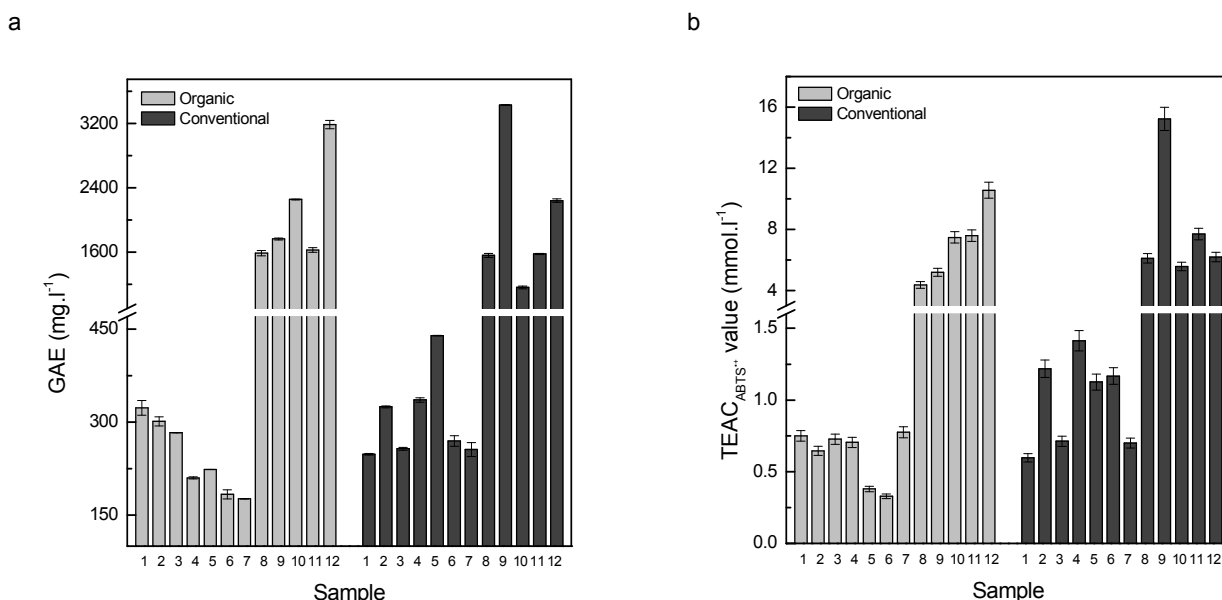


Fig. 1. a: Averaged content of total polyphenolic compounds determined in organic and conventional wine samples, expressed as Gallic acid equivalents (GAE, mg l⁻¹). b: ABTS^{•+} radical-scavenging ability of organic and conventional wine samples characterised by UV-VIS spectroscopy expressed as Trolox-equivalent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

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

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

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

Processing of experimental data set by the methods of multivariate statistics

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

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

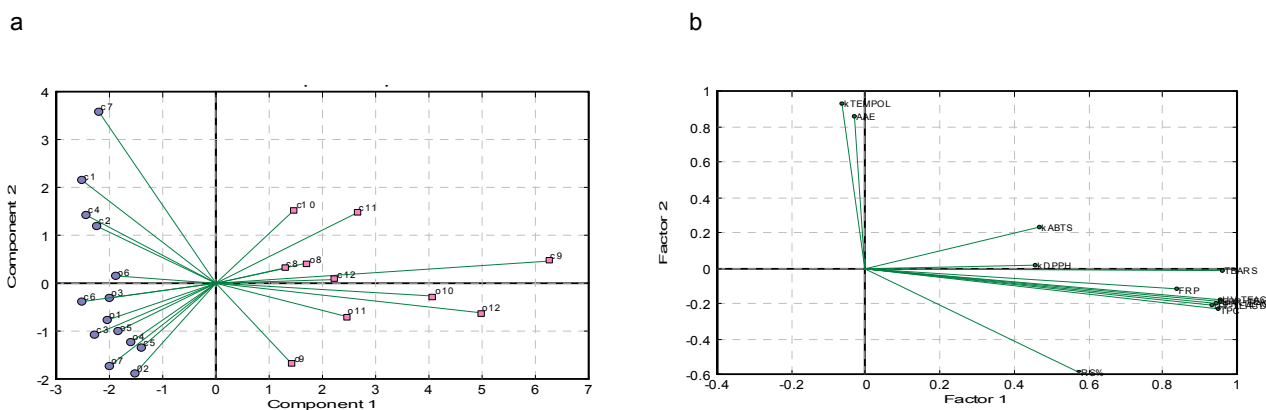


Fig. 2: **a: Differentiation of Slovak organic and conventional red & white wines on the basis principal component analysis of 12 descriptors of antioxidant and radical-scavenging activity** (O – organic wines, C – conventional wines). Both, red and white wines were subjected to differentiation altogether.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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

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

REFERENCES

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

METÓDY SKÚMANIA KRIMINALISTICKEJ CHÉMIE

PAVOL ULBRICH

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

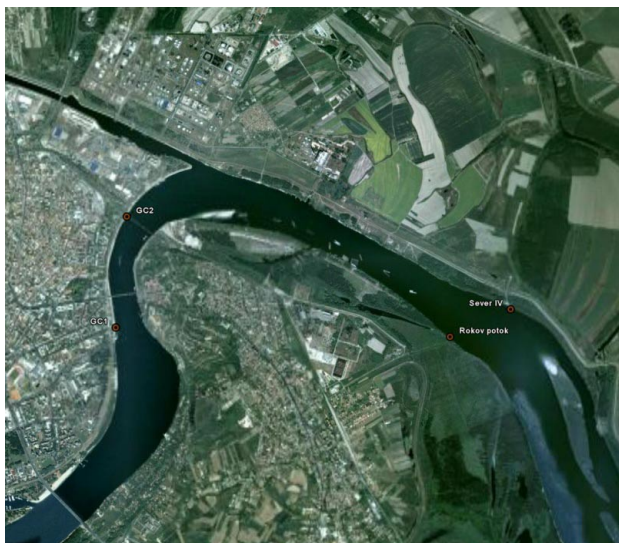


Fig. 1. **Surface water sampling locations** (100m downstream of the discharges)

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

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

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

REFERENCES

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

VÝSKYT MYKOTOXÍNOV V POTRAVINÁCH RASTLINNÉHO A ŽIVOČÍŠNEHO PÔVODU A V KRMIVÁCH

IVETA VOJSOVÁ a ALEXANDRA SLEZÁROVÁ

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

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

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

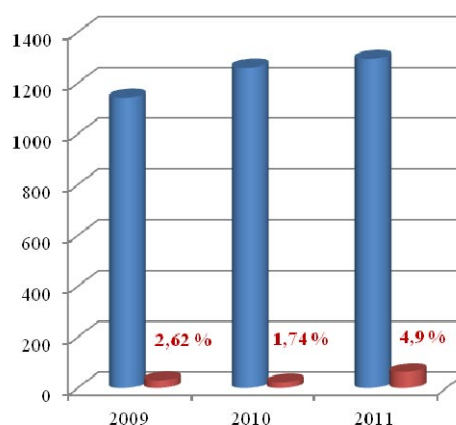
Princípy stanovenia jednotlivých mykotoxínov vychádzajú z aktuálne dostupných STN EN ISO noriem platných pre úradnú kontrolu potravín a krmív a spočívajú v precistení vzorky na imunoafinitnej kolóne a následnom stanovení kvapalinovou chromatografiou s využitím fluorescenčného detektora, príp. UV detektora.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

vané a validované v zmysle platnej európskej legislatívy.

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

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

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



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

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

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

VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH BIOSENZORŮ V KLINICKÉ ANALÝZE

VLASTIMIL VYSKOČIL* a JIŘÍ BAREK

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

vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

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

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

V současnosti existuje mnoho navržených a rovněž i komerčně dostupných zařízení založených na principu biosenzoru (např. pro detekci patogenů a toxinů), některé z nich pracují i ve vícekanálovém uspořádání^{4,5}. Nejběžnější součástí elektrochemických biosenzorů je vhodný enzym přítomný v biorozpoznávací vrstvě vytvářející elektroaktivní systém pro detekci prostřednictvím fyzikálně-chemického převodníku poskytujícího měřitelný signál. Nativní enzym může být použit jako biorozpoznávací komponenta; v tomto případě je analyt zároveň substrát enzymu, popř. může sloužit jako jeho inhibitor. Kromě toho mohou být enzymy použity jako značky navázané na protilátky, antigeny či oligonukleotidy se specifickými sekvencemi (tzv. afinitní biosenzory)⁶. I když moderní biotechnologie nabízí poměrně širokou škálu dostupných enzymatických systémů, pouze poměrně omezený počet enzymů byl zatím využit pro monitorování klinických metabolitů. Jednalo se především o enzymy ze skupiny oxidoreduktáz: glukosa oxidasa⁷ a glukosa dehydrogenasa⁸ při detekci glukosy, alkohol oxidasa při detekci ethanolu⁹, NADH dependentní laktátdehydrogenasa¹⁰ a laktátcytochrom c oxidoreduktasa při detekci laktátu^{11–13}, ureasa při detekci močoviny¹⁴ a cholesterol oxidasa imobilizova-

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

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

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

LITERATURA

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