

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace přípravy vzorku před stanovením
N-nitrosaminů pomocí GC-MS

Bc. Petr Brůha

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Petr Brůha**
Osobní číslo: **C20501**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Optimalizace přípravy vzorku před stanovením N-nitrosaminů pomocí GC-MS**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši na téma stanovení N-nitrosaminů v potravinách. Nejprve tyto látky charakterizujte a následně se zabývejte jejich analýzou. Zaměřte se zejména na postupy úpravy vzorku před vlastní analýzou.
2. V experimentální části optimalizujte GC-MS metodu separace směsi standardů N-nitrosaminů.
3. Dále se zaměřte se na postup přípravy vzorku před analýzou. Použijte metodu mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) a optimalizujte všechny příslušné parametry. Dále testujte postup QUEChERS a optimalizujte jeho jednotlivé kroky tak, aby bylo dosaženo maximálních výtěžků analytů.
4. Oba optimalizované postupy přípravy vzorku aplikujte na reálné vzorky např. uzených masných výrobků.
5. Dosažené výsledky řádně a přehledně zpracujte v diskusní části a odpovídajícím způsobem je diskutujte a porovnejte s doposud publikovanou literaturou týkající se tohoto tématu.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Blanka Švecová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 5. 2022

Petr Brůha

Poděkování:

Mé poděkování patří Ing. Blance Švecové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za cenné rady, trpělivost a konzultace při zpracování této práce. Dále také děkuji své rodině a blízkým za podporu během mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci přípravy vzorků před analýzou N-nitrosaminů metodami QuEChERS a SPME pomocí analytické techniky GC-MS. V teoretické části jsou charakterizovány N-nitrosaminy, jsou popsány principy metod SPME a QuEChERS. Rovněž jsou v rešerši popsány principy plynové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a jejich spojení. V experimentální části práce byly optimalizovány podmínky přípravy vzorků před analýzou N-nitrosaminů a také vlastní chromatografická analýza. Po nalezení vhodných podmínek byly analyzovány čtyři reálné vzorky (losos, grilované kachní prso, uzená makrela a ostravská klobása).

KLÍČOVÁ SLOVA

N-nitrosaminy, QuEChERS, SPME, GC-MS

TITLE

Optimization of sample preparation before determination of N-nitrosamines by GC-MS

ANOTATION

This diploma thesis is focused on the optimization of sample preparation before the analysis of N-nitrosamines by QuEChERS and SPME methods using GC-MS analytical technique. The theoretical part characterizes N-nitrosamines, describes the principles of SPME and QuEChERS methods. The research also describes the principles of gas chromatography, mass spectrometry and their connections. In the experimental part of the work, the conditions of sample preparation before the analysis of N-nitrosamines and also the chromatographic analysis were optimized. After finding suitable conditions, four real samples were analyzed (salmon, grilled duck breast, smoked mackerel and Ostrava sausage).

KEYWORDS

N-nitrosamines, QuEChERS, SPME, GC-MS

Obsah

1	Teoretická část	12
1.1	N-Nitrosaminy	12
1.2	Dusitany	13
1.3	Nejvýznamnější N-nitrosaminy	13
1.4	Legislativa N-nitrosaminů a dusitanů	15
1.5	Zpracování a úprava vzorku před analýzou N-nitrosaminů.....	15
1.5.1	Mikroextrakce na pevnou fázi	15
1.5.2	Kinetika SPME	17
1.5.3	Optimalizace podmínek pro SPME	17
1.5.4	Vzorkování na SPME	18
1.5.5	Vliv teploty na extrakci.....	18
1.5.6	Doba extrakce	19
1.5.7	Příklady využití metody SPME pro N-nitrosaminy.....	19
1.6	Metoda QuEChERS	22
1.6.1	Historie.....	24
1.6.2	Modifikace klasického postupu pro metodu QuEChERS.....	24
1.6.3	Příklady využití metody QuEChERS pro N-nitrosaminy	26
1.7	Plynová chromatografie	27
1.7.1	Hmotnostní spektrometrie.....	28
1.7.1.1	Iontový zdroj.....	29
1.7.1.2	Hmotnostní analyzátor	30
1.7.1.3	Detektor	30
1.7.2	Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	31
1.7.3	Příklady optimalizace metod GC-MS pro stanovení N-nitrosaminů.....	32
2	Experimentální část.....	33
2.1	Přístroje a zařízení	33

2.1.1	Plynový chromatograf.....	33
2.1.2	Další zařízení	33
2.2	Chemikálie a standardní látky.....	33
2.2.1	Chemikálie	33
2.2.2	Standardní látky	34
2.3	Vzorky	34
2.4	Pracovní postupy.....	34
2.4.1	Chromatografické podmínky	34
2.4.2	Metoda SPME.....	35
2.4.3	Metoda QuEChERS	36
3	Výsledky a diskuse	37
3.1	Chromatografická analýza N-nitrosaminů.....	37
3.1.1	Optimalizace chromatografické metody	37
3.1.2	Meze detekce a stanovitelnosti N-nitrosaminů.....	43
3.2	Optimalizace podmínek metody SPME.....	43
3.3	Aplikace metody SPME na přípravu vzorků	47
3.4	Optimalizace metody QuEChERS.....	50
3.5	Aplikace metody QuEChERS na přípravu vzorků	54
4	Závěr	56
	Literatura.....	57

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1: Chemické struktury N-nitrosaminových sloučenin.....	12
Obrázek 2: Závislost doby extrakce na množství analytu	19
Obrázek 3: Optimalizace teplot extrakce.....	21
Obrázek 4: Tradiční postup metody QuEChERS	22
Obrázek 5: Schéma plynového chromatografu.....	28
Obrázek 6: Princip elektronové ionizace	29
Obrázek 7: Kvadrupólový analyzátor	30
Obrázek 8: Schéma elektronového násobiče	31
Obrázek 9: Vliv teplotních gradientů na separaci N-nitrosaminů	38
Obrázek 10: Různé splitovací poměry	39
Obrázek 11: Optimalizace nástřiku.....	40
Obrázek 12: Výsledný záznam N-nitrosaminů v režimu SIM.....	42
Obrázek 13: Porovnání sorpce analytů na šedé a černé vlákno	44
Obrázek 14: Porovnání různých teplot extrakce.....	45
Obrázek 15: Porovnání různých extrakčních dob.....	46
Obrázek 16: Porovnání množství přídavku soli.....	46
Obrázek 17: TIC chromatogram spikovaného vzorku lososa připraveného metodou SPME ..	48
Obrázek 18: SIM chromatogramy spikovaného vzorku lososa připraveného metodou SPME	49
Obrázek 19: Odezva N-nitrosaminů při použití acetonitrilu jako extrakčního činidla.....	51
Obrázek 20: Odezva N-nitrosaminů při použití ethylesteru kyseliny octové jako extrakčního činidla.....	52
Obrázek 21: Odezva N-nitrosaminů při použití 50% acetonitrilu jako extrakčního činidla	52
Obrázek 22: TIC chromatogram spikovaného vzorku lososa připraveného metodou QuEChERS	54
Obrázek 23: SIM chromatogramy spikovaného vzorku lososa připraveného metodou QuEChERS	55
Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků	34
Tabulka 2: Podmínky chromatografické analýzy N-nitrosaminů.....	35
Tabulka 3: Teplotní gradienty při optimalizaci teplotního programu.....	37
Tabulka 4: Meze detekce a stanovitelnosti pro N-nitrosaminy v roztoku	43
Tabulka 5: Meze detekce a stanovitelnosti N-nitrosaminů pro metodu SPME.....	50

Seznam zkratk

CI	chemická ionizace
DI	přímé ponoření
EI	elektronová ionizace
GC	plynová chromatografie
HS	v horním prostoru
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
ISTD	standard
QuEChERS	rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní, bezpečná metoda
MS	hmotnostní spektrometrie
NA	N-nitrosaminy
NDBA	N-nitrosodi-n-butylamin
NDEA	N-nitrosodiethylamin
NDPA	N-nitrosodi-n-propylamin
NIST	knihovna spekter
NPIP	N-nitrosopiperidin
NPYR	N-Nitrosopyrrolidin
NMOR	N-nitrosomorpholin
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPME	mikroextrakce na pevnou fázi
SIM	monitorování vybraných iontů
TIC	celkový iontový chromatogram

Úvod

Dusitany a dusičnany bývají součástí směsi na solení masa při jeho úpravě v potravinářském průmyslu. Jejich použití vede k zachování růžové barvy masa v uzeninách, přispívá také k jeho chuti a slouží i jako ochrana proti některým patogenním mikroorganismům. Dusičnany se u dospělých poměrně rychle vylučují močí a jejich potenciální nebezpečnost spočívá v přeměně na dusitany. Ty jsou schopné v krvi poškozovat hemoglobin v červených krvinkách. Vzniká tzv. methemoglobin, který není schopen plnit svou funkci a přenášet kyslík. Největší znepokojení ale vyvolává možnost reakce dusitanů s aminokyselinami za vzniku tzv. N-nitrosaminů. Jde o skupinu látek, z nichž některé jsou známé také například z cigaretového kouře a některé z nich jsou považovány za karcinogeny.

Mikroextrakce tuhou fází je progresivní “solvent free” metoda přípravy vzorků, která je rychlá, ekonomická a univerzální pro mnoho aplikací. Vlákno, na které se adsorbují sledované analyty, je potaženo polymerním materiálem, v některých případech ve směsi s pevným adsorbentem. Zachytí těkavé i netěkavé sloučeniny z plyných, kapalných a pevných vzorků. Podle povahy vrstvy jsou složky vzorku na vlákno buď absorbovány (polymerní vrstva) nebo adsorbovány (vrstva pevné fáze). Analyty jsou poté desorbovány přímo do plynového chromatografu nebo pomocí interface do kapalinového chromatografu. Metoda významně redukuje čas potřebný pro přípravu vzorků, minimalizuje použití rozpouštědel, vlákna jsou opakovatelně použitelná a univerzální pro jakýkoliv typ plynového nebo kapalinového chromatografu. Lze ji aplikovat i při stanovení N-nitrosaminů.

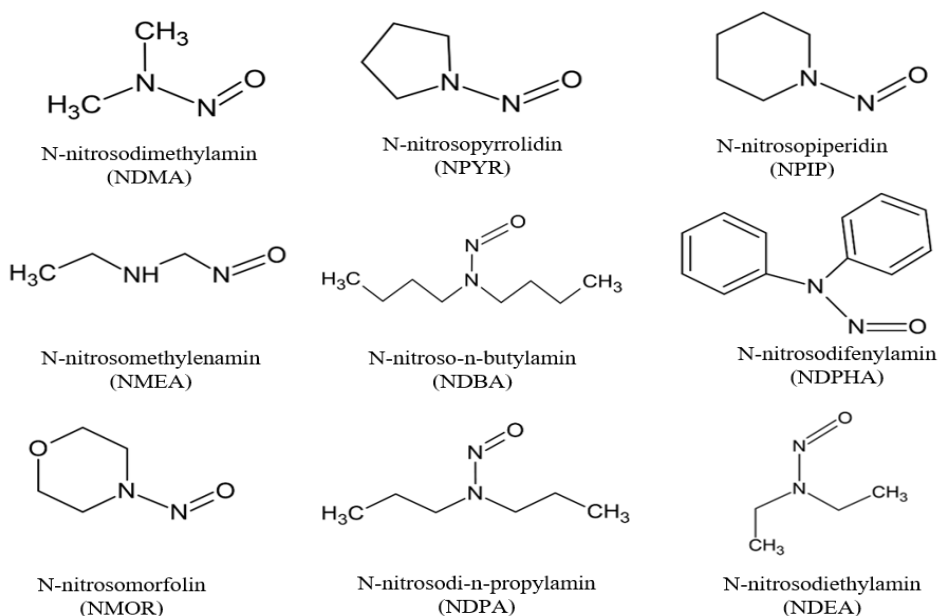
Metoda přípravy vzorků QuEChERS je robustní a reprodukovatelná metoda, vhodná pro analýzu N-nitrosaminů a dalších kontaminantů v potravinách v komplexních maticích. Běžně se používá před analýzou pomocí GC-MS nebo LC-MS.

1 Teoretická část

1.1 N-Nitrosaminy

N-Nitrosaminy (NA), v těkavé nebo netěkavé formě, jsou skupinou organických sloučenin. Vzhledem k mutagenním a karcinogenním účinkům mnoha NA se přítomnost těchto sloučenin v potravinách stala významným rizikem pro zdraví lidí. Ve srovnání s netěkavými N-nitrosaminy jsou těkavé N-nitrosaminy toxickejší [1]. N-nitrosaminy jsou sloučeniny vznikající v určitých potravinách reakcí nitrosačního činidla odvozeného buď od dusitanových solí nebo oxidu dusíku s látkou s aminoskupinou. Mohou se tvořit i endogenně v lidském těle, zejména intragastricky. Karcinogenita N-nitrosaminů byla prokázána u několika druhů laboratorních zvířat. Kromě toho jsou tyto sloučeniny toxické, mutagenní, teratogenní a působí transplacentárně. N-nitrosaminy se dělí na těkavé a netěkavé. Těkavé N-nitrosaminy jsou skupinou relativně nepolárních sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, lze je oddělit destilací [2].

N-nitrosaminy, které se mohou vyskytovat v životním prostředí a v široké škále potravin, jsou ve většině případů považovány za zdraví ohrožující. N-nitrosaminy jsou velmi škodlivé a mohou ohrozit lidské tělo ve velmi nízkých koncentracích [3]. Struktury devíti významných N-nitrosaminů jsou zobrazeny na Obr. 1.



Obrázek 1: Chemické struktury N-nitrosaminových sloučenin

1.2 Dusitany

Dusitany neboli nitrily, jsou solemi kyseliny dusité. Reakcí dusitanů s aminokyselinami mohou za určitých podmínek vznikat N-nitrosaminy. Do potravin živočišného původu se přidávají jako potravinářská aditiva, zejména při výrobě uzenin a sýrů. Mezi nejčastěji používané dusitany patří např. dusitan sodný (E 250) a dusitan draselný (E249). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) v červnu roku 2017 stanovil přijatelný denní příjem dusitanů na 0,07 miligramu na kilogram tělesné hmotnosti [4]. Vysokou dávkou dusitanů může být navozena dusitanová intoxikace, mezi jejíž příznaky patří vasodilatace, šok, kolaps a obrna. Dávka 0,5 g dusitanů navozuje u člověka akutní otravu. Jestliže dojde ke vstřebání dusitanů do krve, může nastat methemoglobinémie. Dvojmocné železo hemu je oxidováno na trojmocné. Krevní barvivo hemoglobin tedy ztrácí schopnost přenášet kyslík. Jedná se o nejčastější formu otravy dusičnany a dusitany. Nastává hypoxie až anoxie, která se navenek projevuje modrošedým zbarvením kůže a rtů, nápadně připomíná cyanózu. Přítomnost 20% methemoglobinu v krvi vyvolává toxické příznaky, 60 % ohrožuje život. Objevují se křeče, obrna, dušnost a bezvědomí s následnou smrtí. Methemoglobinémií jsou ohroženi především kojenci do 6 měsíců. Fetální hemoglobin je více citlivý k přeměně na methemoglobin. Důvodem je nedostatečně rozvinutý enzymový systém NADH-methemoglobinreduktáza v erythrocytech přeměňující methemoglobin zpět na hemoglobin. Kojené děti nejsou ohroženy otravou dusičnany z mateřského mléka, neboť do něj významně nevstupují. Nejvýznamnějším zdrojem dusičnanů pro kojence je pitná voda. Do rizikové skupiny patří dále těhotné ženy a lidé s deficitem enzymů glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy nebo NADH-methemoglobinreduktázy [5].

1.3 Nejvýznamnější N-nitrosaminy

Jeden z nejvýznamnějších N-nitrosaminů je N-Nitrosodimethylamin (NDMA). N-Nitrosodimethylamin se může objevit pitné vodě, a to degradací dimethylhydrazinu (složka raketového paliva) a také vlivem průmyslových procesů. Je kontaminantem některých pesticidů používaných v zemědělství. Z půdy se pak může dostat do spodních vod. NDMA byl identifikován jako vedlejší produkt dezinfekce chloraminace (reakcí monochloraminu s dimethylaminem) a chlorace. NDMA se vyskytuje v nízkých koncentracích v mnoha položkách lidské spotřeby, včetně uzeného masa, ryb, piva, stejně jako při užívání tabákových

výrobků a vdechování tabákového kouře [6,7]. Existují nezvratné důkazy, že NDMA je silným karcinogenem zvířat. Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) byl klasifikován jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka. Mechanismus, kterým NDMA způsobuje rakovinu, zahrnuje biotransformaci jaterními mikrosomálními enzymy, generujícími methyldiazoniový ion. Tento reaktivní metabolit tvoří adukty DNA, přičemž většina důkazů ukazuje na 6-methylguanin jako pravděpodobné proximální karcinogenní činidlo [8].

Většina N-nitrosaminů se za laboratorní teploty vyskytuje jako žluté olejovité kapaliny. Jsou rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech a lipidech. N-nitrosaminy jsou stabilní v prostředí bez přístupu světla. Při vystavení UV světlu dochází k jejich rozkladu.

Dalším významným zástupcem N-nitrosaminů je N-nitrosodiethylamin (NDEA). Má aminový nebo aromatický zápach. Používá se jako přísada do benzínu a maziva, antioxidant a stabilizátor pro průmyslové materiály. Při zahřátí na rozklad N-nitrosodiethylamin uvolňuje toxické výpary oxidů dusíku. N-nitrosodiethylamin ovlivňuje integritu DNA, pravděpodobně alkylací, a používá se v experimentálním výzkumu při rakovině jater [9]. Je mutagenní a Světová zdravotnická organizace jej klasifikovala jako karcinogen skupiny 2A (pravděpodobný lidský karcinogen) [10,11]. Bylo také zjištěno, že NDEA narušuje biosyntézu aminokyselin včetně argininu, stejně jako opravu poškozené DNA a udržování mitochondriálního genomu v kvasinkách [12]. Nachází se v tabákovém kouři [13,14].

N-nitrosodi-n-propylamin (NDPA) je na základě dostatečných důkazů karcinogenity ze studií na pokusných zvířatech brán jako lidský karcinogen [15].

Mezi N-nitrosaminy se také řadí N-nitrosodibutylamin (NDBA). K lidské expozici N-nitrosodibutylaminu dochází požitím, inhalací a dermálním kontaktem. N-nitrosodibutylamin byl detekován v řadě produktů jako výsledek nitrosace aminů přítomných v těchto produktech. N-Nitrosodi-n-butylamin může vzniknout ze sekundárních nebo terciárních n-butylaminů a kvartérních amoniových solí reakcí s nitrosačními činidly, (např. jako dusitany), během vaření nebo v žaludku. Byl také zjištěn v tabákovém kouři. N-nitrosaminy se často tvoří při zpracování pryže a mohou být přítomny jako kontaminanty v konečném pryžovém produktu. Potenciální expozice závisí na schopnosti N-nitrosaminu migrovat z produktu do těla. N-nitrosaminy přítomné v dudlíku a kojeneckých lahvích, se mohou dostat do slin, což může vést k jejich požití [16,11].

N-nitrosopiperidin (NPIP) je dalším zástupcem N-nitrosaminů. Protože se ale pro výzkum vyrábí pouze malá množství N-nitrosopiperidinu, potenciální expozice se zdá být omezená. Populace může být vystavena nízkým koncentracím N-nitrosopiperidinu

z cigaretového kouře a určitých potravin. Stopová množství N-nitrosopiperidinu byla nalezena v cigaretách, ale nebyla nalezena u všech značek testovaných cigaret. N-Nitrosopiperidin byl nalezen v masných a rybích výrobcích, jako je slanina, boloňská klobása a uzená treska [13]. Přítomnost N-nitrosopiperidinu v mase, sýrech a koření je důsledkem konzervačního použití dusitanu sodného, který reaguje s aminy přítomnými v mase a sýrech.

N-Nitrosopyrrolidin (NPYR) vzniká v konzervovaných potravinách nebo u potravin kontaminovaných dusitany, když se připravují zahříváním. Jedná se zejména o tučná jídla. K expozici může dojít vdechováním výparů uvolněných během vaření nebo konzumací jídla [17].

N-nitrosomorpholin (NMOR) je účinný jako antimikrobiální činidlo a používá se jako rozpouštědlo pro polyakrylonitril a jako meziprodukt při výrobě N-aminomorfolinu. N-Nitrosomorfolin byl nalezen ve šňupacím tabáku a v pryžových kojeneckých lahvích [14].

1.4 Legislativa N-nitrosaminů a dusitanů

Česká vyhláška č. 304/2004 Sb. o aditivech reguluje vznik N-nitrosaminů omezením přídavku dusitanů do masných a dalších výrobků a stanovením jejich zbytkového množství (50 až 250 mg/kg jako NaNO_2). Při často prováděných kontrolách dusitanů v masných výrobcích nedochází k výskytu nadlimitních hodnot. Doporučuje se omezit konzumaci uzených a nakládaných mas a masných výrobků, vyhnout se pečení a grilování nakládaných mas. [18]. Podle české vyhlášky o aditivech č. 304/2004 je reziduální obsah dusitanu sodného limitován hodnotou 50 mg/kg (jako NaNO_2) u tepelně neopracovaných, uzených nebo sušených masných výrobků, nebo 100 mg/kg (u ostatních uzených a masných výrobků a masných výrobků v konzervách) a 175 mg/kg u anglické slaniny. [19].

1.5 Zpracování a úprava vzorku před analýzou N-nitrosaminů

1.5.1 Mikroextrakce na pevnou fázi

Cílem většiny používaných metod přípravy vzorků před analýzou je získání analytu v dostatečném, detekovatelném množství, bez nežádoucích příměsí. Z tohoto důvodu byla vyvinuta technika, která by měla usnadnit přípravu a analýzu vzorku. Technika se nazývá Solid Phase Micro Extraction (SPME). Mikroextrakce tuhou fází, je sorpčně/desorpční technika extrakce a zakoncentrování analytu. Základním principem techniky je expozice malého množství sorbentu, tj. extrakční stacionární fáze, do vzorku. V případě SPME jsou analyty

sorbovány na vlákno, dokud není dosaženo rovnováhy mezi koncentrací analytu na vlákne a koncentrací analytu v roztoku, nebo dokud nejsou zaplněna všechna absorpční místa sorbentu [20].

Mikroextrakci na pevnou fázi poprvé popsal Pawliszyn a jeho spolupracovníci v roce 1990 [2]. Mikroextrakce na pevnou fázi využívá nosič potažený tenkou vrstvou polymerního materiálu k extrakci a koncentraci analytů. Toto vlákno je vystaveno vzorku roztoku, buď přímým ponořením do vodných vzorků, nebo v prostoru nad vzorkem. Během adsorpční doby se cílové analyty dostanou do rovnováhy mezi přítomnými fázemi. Rovnováhu lze posunout zahřátím nebo přidáním soli pro zvýšení sorpce na vlákno. Po sorpci je vlákno umístěno do injekčního portu separačních přístrojů, jako je např. plynový chromatograf s hmotnostním detektorem, kde dochází k desorpci analytu a analýze [21-24]. Tato metoda je žádaná, protože nejsou potřeba žádná rozpouštědla, což snižuje náklady a vytváří méně odpadu. Extrakce a koncentrace probíhají současně, což zkracuje dobu potřebnou k postupu a náklady na vybavení a sklo. Navíc lze SPME automatizovat, což dále zkracuje čas potřebný k analýze. Hlavní výhoda SPME spočívá v tom, že extrakce je rychlá, jednoduchá a lze ji provádět obvykle bez rozpouštědel. SPME má také velký potenciál pro aplikace v terénu; odběr vzorků na místě nemusí provádět pouze odborníci. Při správném skladování mohou být vzorky analyzovány o několik dní později v laboratoři bez významné ztráty těkavých látek. Sorbent na vláknu může být zvolen tak, aby se zlepšila citlivost pro konkrétní sledované analyty; v ideálním případě bude mít vrstva sorbentu vysokou afinitu k cílovým analytům [25,26]. Existuje mnoho komerčně dostupných sorbentů vláken, které jsou kombinacemi polydimethylsiloxanu, divinylbenzenu, carboxenu, polyakrylátu a polyethylenglykolu [27,28]. Jednou nevýhodou mnoha komerčně dostupných vláken je však to, že mají tendenci být fyzicky křehké kvůli svému složení [26]. V závislosti na charakteristikách cílových analytů zlepšují určité vlastnosti sorbentu extrakci, jako je polarita, tloušťka a povrch [25-29]. Matrice vzorku může ovlivnit výběr sorbentu vlákna [28].

Mezi hlavní výhody techniky SPME by měla patřit rychlost této techniky ve srovnání s klasickými laboratorními technikami extrakce a přípravy vzorku pro analýzu. Snížením počtu operací nutných k přípravě vzorku by také mělo dojít ke zvýšení citlivosti, především tím, že celý proces trvá mnohem kratší dobu a nedochází ke ztrátám, například těkavých analytů, vypařením do ovzduší. Další z výhod techniky SPME by měla být její cena ve srovnání s klasickými technikami. Cena jednotlivých analýz je především dána jejich náročností na laboratorní vybavení. Náročnost na laboratorní vybavení je v případě SPME malá.

Nezanedbatelným důvodem pro využití SPME techniky je používání velmi malého množství rozpouštědel [21].

1.5.2 Kinetika SPME

Základem techniky je rozdělení analytu mezi kapalnou nebo plynou fází a tenkou vrstvou pevného sorbentu, který je vázán na křemenném vlákne. Analyty zachycené v sorbentu jsou poté transportovány do plynového chromatografu, kde dochází k jejich desorpci a separaci. Hodnoty rozdělovacích koeficientů pro komerčně dostupná vlákna se pohybují v rozmezí 10^3 - 10^5 . Nicméně sorbenty s velkými rozdělovacími koeficienty mohou být rychle nasyceny i při relativně nízkých koncentracích analytu v matrici [25].

Extrakce pomocí vlákna je velmi odlišná od klasických extrakcí. Při velkých koncentracích analytu, schopných navázat se na všechna vazebná místa na sorbentu, čas nutný k dosažení rovnováhy mezi volným analytem a analytem sorbovaným na vlákne závisí na koncentraci analytu v roztoku vzhledem k tomu, že jen část celkového množství se může sorbovat na sorbent. Ze stejného důvodu celkové množství analytu schopného zachytit se na vlákne nezávisí na koncentraci analytu v roztoku ale jenom na sorpční kapacitě sorbentu. Zadruhé, pomalý nebo omezený přestup analytu přes sorpční vrstvu může vést ke zpomalení difúze. Dalším důležitým faktorem sorpce na vlákno jsou podmínky provedení. Především teplota, vliv míchání, pH roztoku a přidavek NaCl pro zvýšení iontové síly roztoku. V průběhu sorbce na sorbent může současně docházet k desorpci analytu ze sorbentu. Z tohoto důvodu mohou být v sorbentu během extrakce nahrazovány molekuly, které snadněji unikají do prostředí molekulami, které jsou pevněji vázány na sorbent [21].

1.5.3 Optimalizace podmínek pro SPME

Optimalizace podmínek provedení SPME je obtížný proces. Při výběru nejvhodnějších podmínek pro provedení SPME je třeba brát v úvahu mnohé fyzikálně-chemické vlastnosti použitého SPME vlákna a analytů, které jsou předmětem analýzy. Mezi základní parametry, které je nutné optimalizovat patří druh použitého vlákna, teplota, způsob extrakce, délka sorpce, vliv míchání, pH a iontová síla roztoku.

Jedním z nejdůležitějších parametrů optimalizace SPME je volba vhodné stacionární fáze zakotvené na vlákne. Při výběru stacionární fáze je nutné přihlídnout k několika kritériím. Jedním z kritérií je, zdali je stacionární fáze na vlákno vázaná nebo nevázaná. Tento parametr rozhoduje především o možnosti použití vlákna pro různé druhy rozpouštědel. Zatím co vázané

fáze jsou stabilní ve většině organických rozpouštědel. V některých nepolárních rozpouštědlech mohou slabě bobtnat. Na vlákne jsou navázány chemicky. Nevázané fáze jsou stabilní v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, ve kterých mohou slabě bobtnat. Nikdy nesmí být čištěny nepolárními organickými rozpouštědly [30].

1.5.4 Vzorkování na SPME

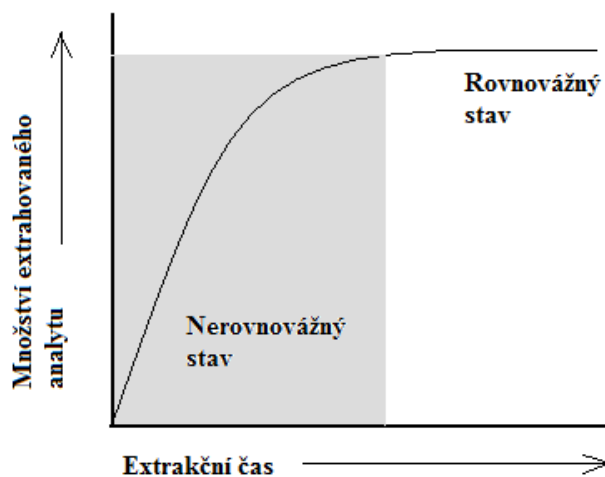
Extrakce analytu ze vzorku pomocí vlákna je možná dvěma způsoby, metodou DI (Direct-immersing) a metodou HS (Head-space). DI metoda spočívá v přímém zasunutí vlákna pokrytého sorbentem do roztoku analytů nebo vzorku. DI vzorkování se uplatňuje při vzorkování kapalných matric. V případě, že matrice obsahuje makromolekulární látky anebo hrubé nečistoty je nutné vlákno chránit membránou nebo vzorek pře samotným stanovením upravit pomocí filtrace nebo centrifugace [31]. Tato metoda je vhodná pro extrakci málo těkavých a netěkavých látek. Metoda HS je vhodná k extrakci z plynných, kapalných a pevných matric. Při této metodě je analyzovaná látka umístěna v uzavřené nádobě a vlákno pokryté sorbentem je umístěno do prostoru nad analyzovanou látkou. Při HS metodě dochází také rychleji k ustavení rovnováhy, protože pohyb molekul v plynné fázi je rychlejší než pohyb v kapalně fázi [31].

1.5.5 Vliv teploty na extrakci

Teplota je jedním z kritických parametrů extrakce. Extrakční teplota hraje důležitou roli v extrakčním procesu. Na teplotě závisí rychlost přestupu analytů mezi maticí vzorku a sorpční vrstvou na SPME vlákne a také hodnota rozdělovacího koeficientu mezi vláknem a analytem. Vliv teploty se může vysvětlit dvěma procesy, a to kinetickým a termodynamickým. Z pohledu kinetiky se s rostoucí teplotou zvětšuje i rychlost difúze analytů směrem k sorpční vrstvě. To může mít za následek rychlejší ustavení rovnováhy. Z pohledu termodynamického zase v důsledku toho, že sorpce na vlákno je většinou exotermní proces, dochází se vzrůstající teplotou k poklesu množství analytu zachyceného na vlákne [20,32].

1.5.6 Doba extrakce

Jedním z nejdůležitějších kroků při SPME je stanovení doby nutné pro dosažení rovnováhy mezi analytem ve vzorku a analytem zachyceným na sorpční vrstvě vlákna. V případě, že analyt není v roztoku v množství schopném nasycit vlákno, je rovnovážný extrakční čas především určen hodnotou rozdělovacího koeficientu analyt/SPME vlákno (K_{fs}). V případě, že roztok obsahuje takové množství analytu, které je schopné nasycit všechna aktivní místa sorbentu vlákna dochází k tomu, že i přes vysokou koncentraci analytu v prostředí nedochází již k sorpci na vlákno. V případě směsí více analytů může docházet i ke zpětné desorpci některých analytů z vlákna zpět do roztoku. Analyty, které snáze unikají z vlákna jsou poté na vlákne nahrazeny analyty jejichž afinita k vláknu je vyšší [30]. Technika SPME má maximální účinnost v bodě ekvivalence. To znamená, že dojde k ustavení rovnováhy mezi analytem v okolním prostředí a analytem zachyceným na vlákne. Nicméně vzhledem k tomu, že v nerovnovážném stavu existuje lineární závislost mezi množstvím analytu zachyceným na vlákne a koncentrací analytu v matrici vzorku, není pro přesné stanovení nezbytně nutné dosáhnout rovnováhy. V některých případech může být dosažení rovnováhy časově velmi náročné. Z praktických důvodů se tedy pro extrakci volí časový interval kratší s ohledem na praktické využití extrakce [33]. Vliv délky extrakce na množství analytu je vidět na Obr.2.



Obrázek 2: Závislost doby extrakce na množství analytu [33]

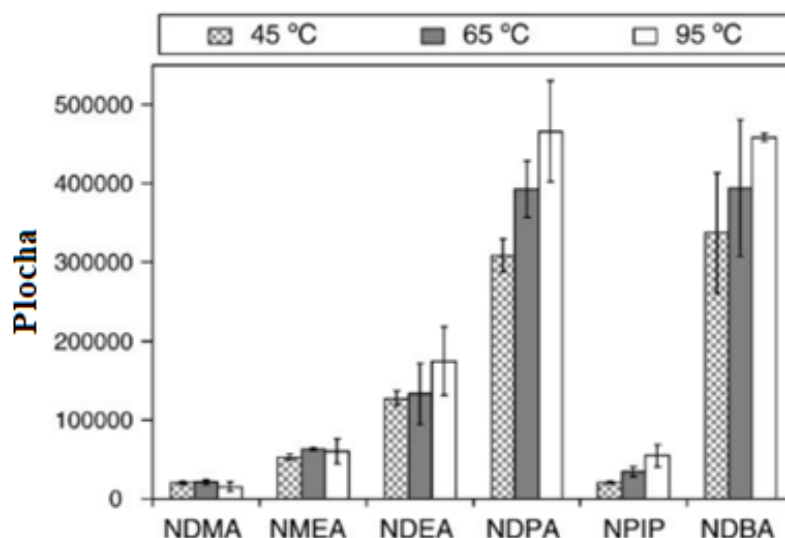
1.5.7 Příklady využití metody SPME pro N-nitrosaminy

Andrara a kol. [2] použili metodu SPME pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v jídle. Pro HS-SPME zvolili použití dvou křemičitanových vláken, potažených polydimethylsiloxan-divinylbenzenem (PDMS-DVB) a polyakrylátem (PA). Pro analýzu použili 2,5 g vzorku

homogenizovaných klobás, ke kterému bylo přidáno 360 ng standardního přídatku (spikování) směsi N-nitrosaminů. Vzorke ve vialce byly umístěny do termostatu vyhřátého na 45 °C. Extrakce na vlákno trvala 25 minut. Poté byla provedena desorpce látek v nástřikovém prostoru plynového chromatografu při teplotě (doplňte) a vlastní analýza. Vlákno PA je více polární, a proto mělo vyšší účinnost při extrakci polárních N-nitrosaminů NPIP a NPYR. V uzeninách se běžněji vyskytují NDMA a NDEA N-nitrosaminy, pro které má lepší výsledky vlákno potažené PDMS-DVB a které ve výsledku bylo zvoleno jako vhodnější pro tuto analýzu. Metoda se ukázala jako jednoduchá, umožňující rychlou analýzu bez použití rozpouštědel a bez matricových interferencí.

Grebel a kol. [21] zkoumali využití metody SPME pro extrakci N-nitrosaminů. Nejvíce sledovaným N-nitrosaminem ve vodě je NDMA, proto byla optimalizace podmínek extrakce zaměřena zejména na NDMA. Byla testována 4 vlákna: CAR/PDMS, CW/DVB, PA a PDMS/DVB, u kterých byla hodnocena účinnost extrakce NDMA. U všech vláken byly porovnávány dva způsoby extrakce, DI a HS. Očekávalo se, že extrakce DI metodou bude mít vyšší výtěžnost, díky polaritě NDMA. Byl však vidět pravý opak. U tří použitých vláken byla výtěžnost vyšší při použití metody HS. Procentuální rozdíly v extrakci NDMA (vzhledem k výsledkům extrakce headspace) byly +42 %, +45 % a +33 % pro PA, CAR/PDMS a CW/DVB. PDMS/DVB bylo jediné vlákno vykazující sníženou účinnost pro extrakci HS oproti extrakci DI (-31 %). Vlákno potažené CAR/PDMS vykazovalo nejvyšší účinnost extrakce NDMA a bylo zvoleno pro další experimenty. Byl také zkoumán vliv NaCl na účinnost extrakce. Byly zkoumány tři koncentrace: 25 %, 50 % a 100% nasycený roztok NaCl. Nejlepší výsledky ukázalo použití 100 % nasyceného roztoku NaCl. Těkavost analytů se zvyšuje zvýšením teploty extrakce. Byly testovány tři teploty extrakce: 45, 65 a 95 °C. Mezi 45 a 65 °C všechny sloučeniny vykazovaly zvýšení účinnosti extrakce. Teplota 95 °C nebyla vyhovující pro extrakci NDMA, účinnost byla malá. Mohlo to být způsobeno přítomností vodní páry, která se objevuje při této teplotě. Jako optimální se ukázala teplota 65 °C. Výsledky provedené optimalizace teplot je možné vidět na Obr.3.

Doba extrakce činila 45 minut. Vyvinutá metoda SPME se ukázala jako spolehlivá pro analýzu odpadních vod a sledování NDMA s dalšími šesti N-nitrosaminy. Detekční limit NDMA byl stanoven na 30 ng/l.



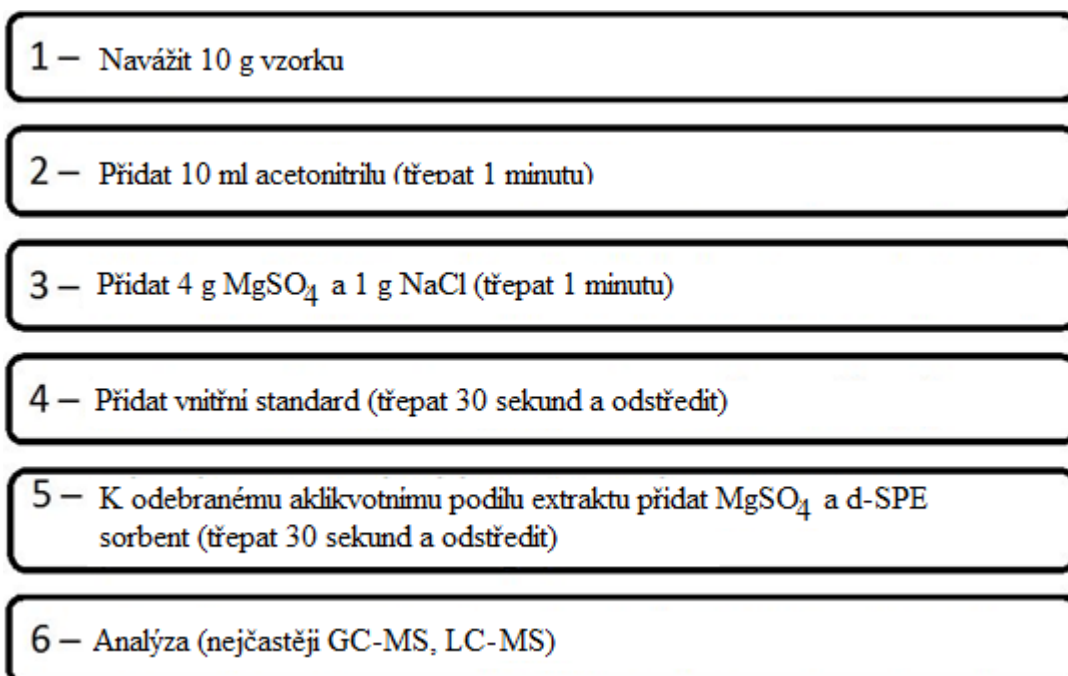
Obrázek 3: Optimalizace teplot extrakce [21]

Sun a kol. [34] využili metodu SPME pro stanovení N-nitrosaminů v syrovém mase. 2 g masové pasty byly smíchány s 10 ml roztoku soli a vloženy do 15 ml lahvičky z jantarového skla. Pro extrakci byla použita tři různá vlákna se sorbenty: divinylbenzen (DVB), carboxen (CAR) a polydimethylsiloxan (PDMS). Lahvička byla umístěna na magnetické míchadlo a roztok byl míchán při 400 otáčkách za minutu. Extrakční teplota 50 °C byla udržována pomocí topného bloku. Vlákno bylo umístěno do HS prostoru a extrakce probíhala po dobu 30 minut. Po 30 minutách extrakce bylo vlákno umístěno do plynového chromatografu na 5 minut, kde se desorbowały zachycené analyty.

Ventanas a kol. [35] aplikovali metodu SPME pro analýzu N-nitrosaminů v potravinách. N-nitrosaminy byly extrahovány z masových kuliček. Vzorčky byly udržovány v termostátové lázni při teplotě 25 °C. Při této teplotě byly udržovány 15 minut. K extrakci N-nitrosaminů byla použita vlákna s různými stacionárními fázemi: CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS a DVB/PDMS. Nejlepší výtěžnost byla zjištěna u vlákna CAR/PDMS a které bylo následně použito k analýze. Metoda se prokázala jako uspokojivá pro extrakci těkavých N-nitrosaminů. Proto by mohla být použita jako screeningová metoda pro předběžné hodnocení přítomnosti toxických sloučenin v potravinách, aniž by došlo k poškození produktu. Přesto by měla být studována přítomnost dalších složek v matici, jako je tuk nebo sůl, a vliv různých faktorů ovlivňujících extrakci.

1.6 Metoda QuEChERS

Jedním z moderních trendů v přípravě vzorku k multireziduální analýze je použití metody QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) neboli rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní a bezpečná metoda. Je to postup, který se stal populární zejména při analýze multireziduí pesticidů v různých matricích potravin, i když lze tuto metodu také úspěšně použít i pro extrakci různých sloučenin z různých matric. QuEChERS je technika přípravy vzorku, která zahrnuje extrakci acetonitrilem a rozdělení síranem hořečnatým samotným nebo v kombinaci s jinými solemi s následným čištěním pomocí disperzní extrakce na pevné fázi (d-SPE). Tento poslední krok se provádí přidáním malých množství sypkých sorbentů. Postup pro QuEChERS metodu je zobrazen na Obr. 4.



Obrázek 4: Tradiční postup metody QuEChERS

První dva kroky metody QuEChERS spočívají ve zvážení vhodného množství předem zpracovaného a homogenizovaného vzorku (například 10 g) v 50ml zkumavce (**krok 1**) a přidání rozpouštědla pro extrakci (**krok 2**), nejčastěji acetonitril, ačkoli bylo popsáno použití i jiných organických rozpouštědel, jako je aceton, tetrahydrofuran nebo ethylacetát [36,37]. Potom se přidá čistý síran hořečnatý nebo v kombinaci s jinými solemi, nejčastěji s chloridem sodným (**krok 3**). Doporučeným rozpouštědlem pro QuEChERS je acetonitril, protože po přidání solí se lépe odděluje od vody než například aceton. Ethylacetát má výhodu částečné mísitelnosti s vodou, ale může také koextrahovat lipidy a poskytuje nižší výtěžky během

disperzní SPE. Přidání solí v kroku 3 pomáhá k lepší separaci fází. Tento efekt vysolování také ovlivňuje rozdělení analytu, které samozřejmě také závisí na rozpouštědle použitém pro extrakci. Koncentrace soli může také ovlivnit procento vody v organické fázi a může hrát důležitou roli při úpravě její polaritu. Síran hořečnatý působí jako sušící sůl, která redukuje vodní fázi, čímž pomáhá zlepšit separaci N-nitrosaminů (nebo jiných cílových sloučenin) do organické vrstvy, zatímco chlorid sodný pomáhá kontrolovat polaritu extrakčního rozpouštědla. Krok separace se provádí intenzivním protřepáváním po dobu několika minut. V tomto okamžiku mohou být přidány standardy, pokud je to nutné (**krok 4**), následuje opětovné protřepání roztoku a krok odstředění, které napomáhají k oddělení solí. Použití vnitřních standardů může minimalizovat chyby generované ve více krocích metody QuEChERS. Někdy se doporučuje použití více než jednoho vnitřního standardu, zvláště u vzorků s vysokým obsahem tuku, protože přebytečný tuk může tvořit další vrstvu, do které se mohou také rozdělit analyty. Další výhodou postupu QuEChERS je skutečnost, že jakmile je proveden krok dělení, alikvotní část extraktu se použije pro další kroky, čímž se minimalizuje také separace nebo přenos celých extraktů často používaných v jiných multireziduálních metodách. Poté se provede čištění extraktu pomocí d-SPE s podílem (například 1 ml) extraktu, který se umístí do centrifugační zkumavky obsahující opět síran hořečnatý a malé množství sypkých sorbentů určených pro přečištění analytů. (**Krok 5**). Centrifugační zkumavka se poté silně protřepe nebo promíchá na vortexovém mixéru, aby se materiál distribuoval a usnadnil se proces čištění. [38,39]. Používá se malé množství sorbentů, protože pouze malá část extraktu je podrobena čisticí proceduře a ve srovnání s konvenčními metodami čištění SPE je d-SPE méně pracný a časově náročný. Síran hořečnatý se v tomto kroku opět používá jako sušící činidlo k odstranění vody a zlepšení rozdělování analytu pro zajištění lepšího čištění. Primární sekundární amin (PSA) je nejběžnějším sorbentem d-SPE používaným v postupu QuEChERS pro analýzu N-nitrosaminů. Cílem je použít sorbent schopný zadržet složky matrice, ale ne analyty, které jsou předmětem zájmu. V závislosti na matrici vzorku však mohou být použity i jiné sorbenty samostatně nebo v kombinaci s PSA, jako je např. C18 a grafitizované sorbenty sazí. Například pro vzorky s vysokým obsahem tuku se doporučuje PSA smíchaný s C18 [40], zatímco pro vzorky se středním nebo vysokým obsahem chlorofylu a karotenoidů (například mrkev) se často používá PSA smíchaný s grafitizovanými sazemi [41,42]. Po vyčištění se extrakt odstředí a alikvotní část supernatantu se může dále zakonzentrovat nebo přímo analyzovat obvykle pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS, GC-MS) (**krok 6**).

1.6.1 Historie

Metoda QuEChERS byla poprvé použita pro sledování pesticidů. Později byla aplikována i na pro analýzu jiných látek, např. N-nitrosaminů. Následující text pojednává o historii původní metody QuEChERS.

Monitorovací programy pro sledování pesticidů byly často kritizovány pro jejich vysoké náklady a neschopnost provedení rychlých analýz s kvalitními výsledky pro široké spektrum pesticidů v různých typech matric. Tento problém vznikal v důsledku velkého množství práce a času potřebného k přípravě vzorků. Zpoždění vyplývající z časově náročné analýzy omezovalo efektivitu donucovacích opatření, a tím pádem mělo špatný dopad na obchod a negativně ovlivňovalo schopnosti regulačních agentur k zajištění bezpečnosti potravin. Společná potřeba všestranné metody pro monitorování daných pesticidů byla proto velmi žádaná [42]. Anastasiades a jeho spolupracovníci rozvinuli v letech 2001 a 2002 novou multireziduální metodu, která byla schopna dosahovat vysoké kvality analytických výsledků a zároveň byla jednoduchá, rychlá a efektivní. Od svého vývoje a zveřejnění metoda získala velkou popularitu. Je to metoda vhodná pro analýzu potravin, protože v sobě spojuje několik kroků a rozšiřuje rozsah výtěžnosti pesticidů v porovnání se staršími, více zdlouhavými technikami přípravy vzorku k analýze [43,44].

1.6.2 Modifikace klasického postupu pro metodu QuEChERS

I když je postup metody poměrně jednoduchý, v mnoha případech jsou navrhovány určité modifikace nutné v závislosti na různých parametrech (matrice potraviny, analyzované sloučeniny, použitá instrumentace, přesnost atd.). V konečném důsledku jsou nutné kompromisy, aby byla zajištěna jednoduchost, rychlost, široká použitelnost, vysoká výtěžnost a selektivita metody [43].

Použitím vnitřního standardu (ISTD – Internal Standard) lze minimalizovat chyby vzniklé v jednotlivých krocích [43]. Díky přidání vnitřního standardu před prvním odebráním alikvotního podílu je manipulace se vzorky přesnější a jednodušší a také jsou minimalizovány náhodné a systematické chyby spojené s převodem kapaliny.

Kontrola pH při extrakci je významný faktor při analýze N-nitrosaminů s cílem zajistit efektivní extrakci pH-dependentních sloučenin [45,46].

Odstranění tuků - použití metody schopné analýzy různě polárních látek je potřeba pro ty potraviny, které obsahují do 20 % tuku, neboť potraviny s obsahem od 2 % do 20 % tuku,

můžou obsahovat zbytky lipofilních i hydrofilních látek (mléko, vejce, ořechy, kukuřice, sójové boby, obiloviny, ryby, mořské plody, ledviny, játra, drůbež, vepřové a hovězí maso, avokádo) [44,46]. Přestože se tuk v acetonitrilu moc ochotně nerozpouští, určité množství může být ko-extrahováno, tudíž by se měl odstranit před konečnou analýzou. Tyto látky (triacylglyceroly, fosfolipidy) se za normálních okolností nedostávají do kolony, ale nashromažďují se v injektoru, což má za následek chybnou analýzu. K přečištění extraktu lze použít grafitizované saze, které velmi účinně odstraňují interferující látky. Pro analýzu se vzorek přečišťuje pomocí d-SPE s PSA a C18. Typicky 50 mg sorbentu na jeden ml extraktu je největší množství C18 potřebné ke snížení lipidů. Také SPE může někdy odstranit více interferujících látek matrice než d-SPE. Některé metody používají jinou extrakci kapalinou než QuEChERS anebo dělení mezi dvěma kapalinami s organickými rozpouštědly a poté d-SPE přečištění [44-46].

Ředění vzorku – především u mnoha potravin s vysokým obsahem tuku je běžný nízký obsah vody. To se může jednoduše vyřešit snížením množství navážky a přidáním vody k dané komoditě [46].

Použití analytových protektantů (analyte protectants) je často používaný volitelný krok, který předchází plynové chromatografii především pro ty sloučeniny, které poškozují nebo blokují vnitřní povrch kapilární kolony nebo nástřikový prostor. Tato část samozřejmě není nutná, pokud se provádí analýza pomocí kapalinové chromatografie [44]. Častým problémem v GC jsou ztráty analytu a také tzv. chvostující pík v důsledku nežádoucích interakcí s aktivními místy na inletu a koloně. Analyty, které poskytují nižší nebo degradované tvary píků, mají vyšší detekční limity, je mnohem těžší je identifikovat i integrovat a jsou také náchylnější na interference než stabilní analyty, které poskytují ostřejší píky. Pro tyto náchylné analyty, dochází k výraznému zlepšení kvality píku, když jsou přítomny komponenty matrice, protože blokují aktivní místa, čímž se sníží interakce analytů. Tento jev se nazývá matricí indukované zvýšení chromatografické odezvy (matrix-induced chromatographic response enhancement). Analytické protektanty přidáním do extraktu a standardů neobsahujících matrici dokážou poskytnout lepší chromatografickou odezvu pro většinu citlivých analytů, a to i při větším stupni kontaminace GC systému. Jedním z nejdůležitějších faktorů při interakcích analytu s aktivními místy je vodíková vazba, proto je vhodné použít látku se silnými vazebnými schopnostmi vodíku.

1.6.3 Příklady využití metody QuEChERS pro N-nitrosaminy

Dong a kol. [47] použili metodu QuEChERS při stanovení N-nitrosaminů v uzené makrele. Ke 2 g vzorku v centrifugační zkumavce bylo přidáno 5 ml acetonitrilu a promícháno pomocí vortexu. Kromě acetonitrilu, který se ukázal být nejvhodnějším rozpouštědlem, byla zkoumána ještě rozpouštědla s různou polaritou: ethylacetát, aceton a n-hexan. Poté byly k vzorku s acetonitrem přidány 2 g chloridu sodného a 2 g síranu sodného. Zkumavka byla po dobu 4 minut vortexována. Na závěr byla směs odstředěna po dobu 3 minut. Vyvinutá extrakční metoda spojená s GC-MS je časově úsporná, má vysokou citlivost a přesnost pro stanovení N-nitrosaminů v uzené makrele. Ve srovnání s jinými metodami byla prokázána kratší doba extrakce. Bylo ovšem zajímavé, že obsah N-nitrosaminů v uzené makrele možná souvisel s dobou sušení. Na zodpovězení této otázky je potřeba dalších výzkumů.

Lehotay a kol. [6] využili metodu QuEChERS pro analýzu N-nitrosaminů ve vzorcích slaniny. 5 g vzorku slaniny bylo převedeno do centrifugační zkumavky. Jako rozpouštědlo byl použit 50% acetonitril. Do zkumavky byly přidány 4 g HCO_2NH_4 . Zkumavka se směsí byla po dobu 60 minut intenzivně protřepávána na vortexové třepačce. Následně byla zkumavka odstředěna po dobu 3 minut. K supernatantu bylo přidáno 300 mg MgSO_4 a 100 mg sorbentu PSA a C18. Acetonitril je téměř ideální extrakční rozpouštědlo pro polární analyty, jako jsou N-nitrosaminy v přítomné v mase. Bylo zjištěno, že použití 1:1 acetonitril/voda je v podstatě stejné, jako když se do vzorku přidá voda a acetonitril odděleně. N-nitrosaminy jsou v acetonitrilu velmi stabilní. Extrakce trvala 60 minut, ale 10 minut by bylo dle pozorovaných výsledků dostačujících. Acetonitril, v kombinaci s vodou nebo samostatně, extrahuje ze vzorku velmi málo tuku nebo bílkovin, což snižuje rozsah extrakce interferujících látek. Pro GC analýzu je třeba oddělit vodu od acetonitrilu. K tomuto účelu se ke směsi přidává sůl. Bylo zkoumáno několik druhů solí: 5 g 4:1 (w/w) $\text{MgSO}_4/\text{NaCl}$ nebo 7,5 g NH_4Cl , HCO_2NH_4 , NH_4OAc a HCO_3NH_4 . Všechny soli fungovaly velmi podobně, při rozdělování N-nitrosaminů v acetonitrilu. V konečné metodě byl nakonec použit mravenčan amonný, protože poskytoval přijatelnou výtěžnost (>70 %). Byl také zkoumán rozdíl výskytu N-nitrosaminů u slaniny smažené a ohřívané v mikrovlnné troubě. Větší množství N-nitrosaminů se objevilo u smažené slaniny.

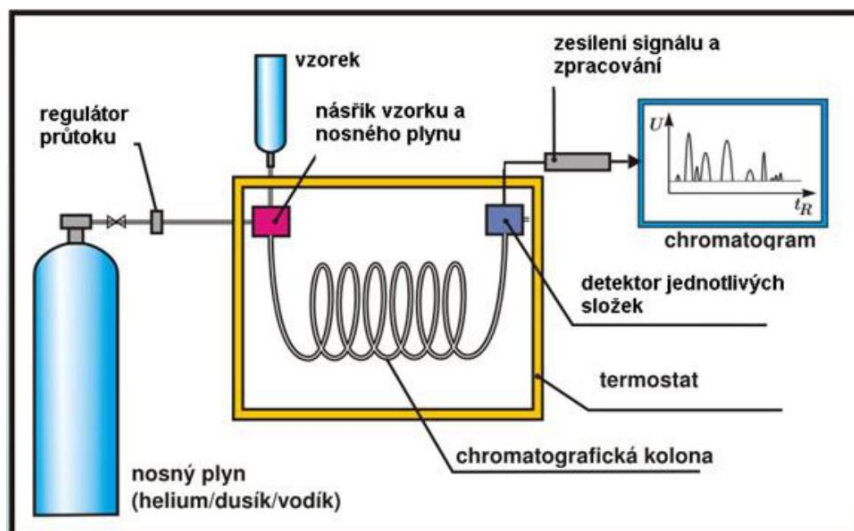
Qiu a kol. [1] použili metodu QuEChERS při studiu kontaminace čínských solených ryb N-nitrosaminy. Ke vzorku ve zkumavce byly přidány dva standardy, 30 ng NDMA- d_6 a 30 ng NDPA- d_4 a 15 ml acetonitrilu. Směs byla homogenizována na vortexovém mixéru po dobu 3 minut a poté ponechána při 20 °C po dobu 30 minut. Směs byla poté odstředěna při 0 °C po dobu 10 minut. 6 ml supernatantu bylo přeneseno do 15 ml zkumavky obsahující

QuEChERS d-SPE. Tato směs byla třepána po dobu 1 minuty a znovu odstředována při 0 °C po dobu 10 minut. Po oddělení se odebralo 5 ml supernatantu a odpařil se na 1 ml pod jemným proudem dusíku. Zakoncentrovaný vzorek byl poté před analýzou přefiltrován přes nylonový filtr. Analýza ukázala, že N-nitrosaminy byly přítomny v alarmujících množstvích v čínských solených rybách odebraných z různých provincií Číny. Vyšší koncentrace N-nitrosaminů byla zjištěna u mořských solených ryb než u ryb sladkovodních.

Zeng a kol. [48] aplikovali metodu QuEChers při stanovení N-nitrosaminů obsažených v sójové omáčce. Zkoumali použití nejvhodnějšího rozpouštědla s 2 g vzorku. Mezi zkoumanými rozpouštědly byly dichlormethan, hexan, ethylacetát a acetonitril. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití acetonitrilu. Výtěžnost dosahovala 90 %. Dále byla zkoumána výtěžnost u různých typů sorbentů, použitých k přečištění. Pro výzkum bylo použito 200 mg PSA, 100 mg C18 a 10 mg GCB. Nejlepší výtěžnosti bylo dosaženo při použití PSA, a to 85 %. Při tomto výzkumu nebyly použity soli MgSO₄ ani NaCl, jak je to při metodě QuEChERS jinak běžné.

1.7 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas Chromatography-GC) je separační metoda, která se používá ke stanovení plynů, kapalin i tuhých látek. Je založena na rozdělování složek mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze je pohyblivá a nazývá se tzv. nosný plyn. Stacionární fáze je zakotvena v chromatografické koloně. Touto fází může být pevná látka (polymerní sorbenty atd.) nebo vysoko vroucí kapalina nanesená na inertním nosiči. V dnešní době se nejčastěji používají kolony kapilární, kde je stacionární fáze nanesena na vnitřní stěnu speciálně upravené křemenné kapiláry. Princip plynové chromatografie je následující: Vzorek se vstříkne do vyhřívané nástřikové komory, kde dojde k jeho odpaření a následně je ve formě par unášen do kolony pomocí nosného plynu. V koloně se jednotlivé složky vzorku separují na základě schopnosti poutat se na stacionární fázi, což je závislé na distribuční konstantě každé složky. Separované látky vycházejí z kolony jedna za druhou dle rostoucích distribučních konstant a následně vstupují do detektoru, který zaznamená okamžitou koncentraci látky v nosném plynu. Výsledný grafický záznam se nazývá chromatogram a představuje závislost odezvy detektoru na čase [49]. Schéma plynového chromatografu je zobrazeno na Obr.5.



Obrázek 5: Schéma plynového chromatografu [58]

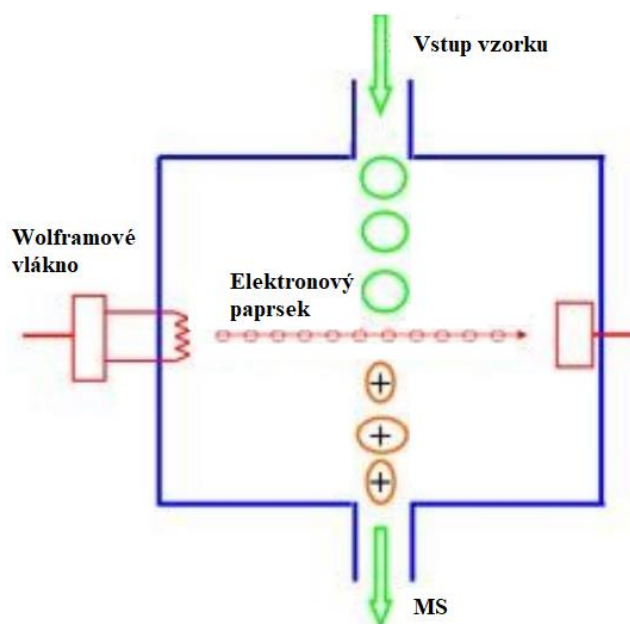
Chování látky v daném systému charakterizují její retenční (eluční) parametry a jejich shoda se standardy je základem pro kvalitativní analýzu látek. Kvantitativní množství látky vystupující z kolony se zjišťuje detektory, které indikují její okamžitou koncentraci. Celkové množství stanovené látky je pak úměrné ploše zaznamenaného píku [50].

1.7.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) je analytická metoda založená na měření hmotnosti molekul nebo jejich fragmentů. Principem metody je interakce nabitých částic s magnetickým nebo elektrickým polem. Využívá se převedení molekul na ionty a rozlišení iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Vzniklé nabitě částice se po separaci zaznamenávají a výsledkem je hmotnostní spektrum – závislost četnosti iontů na hodnotách m/z . Hmotnostní spektrometrie se řadí mezi metody s vysokou citlivostí a používá se pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. V současnosti se používá velká řada technických provedení MS, avšak všechny spektrometry se skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor [51].

1.7.1.1 Iontový zdroj

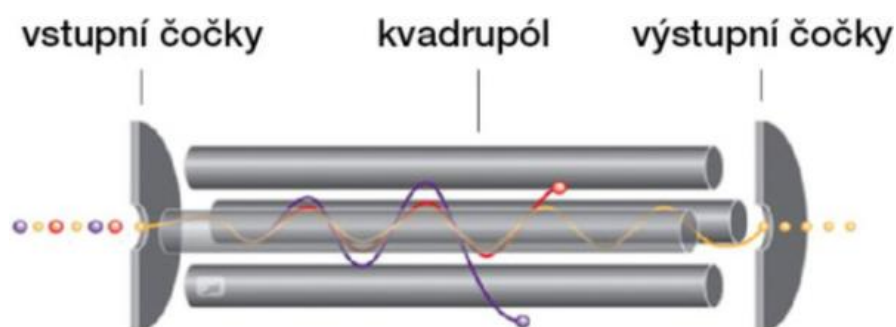
V iontovém zdroji dochází k ionizaci vzorku a vzniku iontů v plynné fázi, u kterých může po jejich vzniku dojít k rozpadu – fragmentaci a vznikají tak kladné nebo záporné ionty molekulární, aduktové nebo i fragmenty ionizované molekuly u některých méně stabilních látek. Obecně se iontové zdroje dělí do dvou skupin na základě množství energie působící při ionizaci na molekulu na tzv. „měkké“ a „tvrdé“ ionizační techniky. Nejstarší a nejčastěji využívanou tvrdou ionizační technikou je elektronová ionizace (EI), kde dochází k předání energie molekulám analytu od letících elektronů. Tato technika ionizace je často používaná pro spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií. Výhodou je možnost porovnání získaných spekter s knihovnou, která je nepostradatelnou součástí vyhodnocení. Mezi „měkké“ ionizační techniky patří chemická ionizace (CI). Elektrony nejprve ionizují reakční plyn (např. methan) a teprve poté dojde k ionizaci molekul analytu. Při této technice ionizace nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci jako u EI, jelikož je v tomto případě molekulám analytu předáváno méně energie. Volba iontového zdroje závisí především na typu analyzovatelné látky a požadavcích na konkrétní analýzu [52,53]. Princip elektronové ionizace vzorku je zobrazen na Obr.6.



Obrázek 6: Princip elektronové ionizace [56]

1.7.1.2 Hmotnostní analyzátor

Analyzátor je umístěn za zdrojem iontů a využívá se k rozdělení iontů za vysokého vakua podle jejich tzv. efektivní hmotnosti – poměru m/z . Existuje několik druhů hmotnostních analyzátorů, které pracují na různých fyzikálních principech. Každý analyzátor má jinou rozlišovací schopnost, hmotnostní a dynamický rozsah, rychlost záznamu spekter a míru správnosti určení hodnoty m/z . Mezi nejznámější a nejvíce využívané hmotnostní analyzátoři patří například kvadrupólový analyzátor, iontová past, průletový analyzátor, orbitrap a další [53]. Kvadrupólový analyzátor je zobrazen na Obr.7.

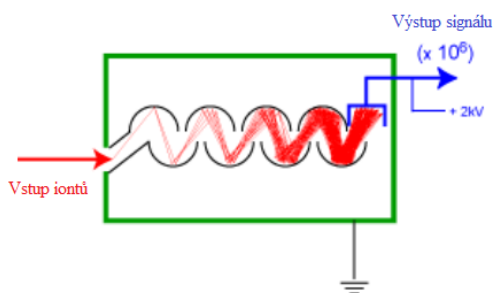


Obrázek 7: Kvadrupólový analyzátor [57]

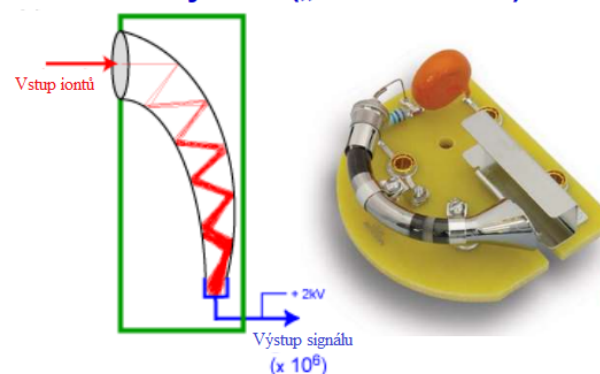
1.7.1.3 Detektor

Ionty po rozdělení v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor iontů, který generuje signál z dopadajících iontů a převádí proud nabitých částic na elektrický proud. Detektory iontů používají všechny analyzátoři kromě hmotnostního analyzátoru s vysokou rozlišovací schopností (FTICR) a Orbitrap, kde je v analyzátoru prováděna zároveň i detekce. Nejčastěji se k detekci iontů používá elektronový násobič. Ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí elektrony. Ty jsou dále zesíleny systémem dynod nebo opakovanými kolizemi na průběžné zakřivené dynodě. Dynoda je elektroda, která slouží jako elektronový násobič prostřednictvím sekundární emise. Schéma elektronové násobiče je vyobrazeno na Obr.8.

Systém diskretních dynod



Zakřivená dynoda („channeltron“)



Obrázek 8: Schéma elektronového násobiče [53]

Dalším typem detektoru je scilatační fotonásobičový detektor, který převede ionty na elektrický signál pomocí scilatační vrstvy, ta při dopadu iontů vydává světelné záření, tzv. fotony. Tento typ záření je převeden na elektrický proud a dále zesílen. Faradayův pohár je typ detektoru, u kterého dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje elektrony a indukuje se proud, který je následně zesílen a zaznamenán. Faradayův pohár je málo citlivý, robustní, ale velmi přesný na izotopické měření. Měří se vybíjecí proud, který souvisí s odevzdáním náboje [53].

1.7.2 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Plynová chromatografie dokáže s velmi vysokou rozlišovací schopností rozdělit těkavé sloučeniny, ale nemůže je identifikovat. Hmotnostní spektrometrie poskytuje podrobné strukturální informace o většině sloučenin tak, že mohou být přesně identifikovány, ale nedokáže je snadno oddělit. Proto nebylo překvapující navržení kombinace těchto dvou technik krátce po vývoji GC. Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie jsou v mnoha ohledech vysoce kompatibilními technikami. U obou metod je vzorek v plynné fázi a obě techniky pracují s přibližně stejným množstvím vzorku. Bohužel se mezi těmito technikami nachází zásadní neslučitelnost, a to rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje o 8 až 9 řádů. Tento problém byl však vyřešen několika způsoby pomocí tzv. „interface“ zařízení a spojení GC s MS je v dnešní době zcela rutinní záležitostí. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je jedním z nejdůležitějších nástrojů pro identifikaci a kvantifikaci těkavých organických sloučenin v komplexních směsích. Je velmi užitečné pro stanovení molekulových hmotností a někdy i elementárních kompozic neznámých organických sloučenin ve vzorku. Mezi aplikace

GC-MS patří stanovení znečišťujících látek v pitné a odpadní vodě, používá se také ke stanovení léků a jejich metabolitů v krvi a moči. Dále jsou významné i farmakologické a forenzní aplikace. Identifikace reakčních produktů syntetických organických chemikálií je další rutinní aplikací, stejně jako analýza průmyslových výrobků pro kontrolu jejich kvality [54].

1.7.3 Příklady optimalizace metod GC-MS pro stanovení N-nitrosaminů

Xian a kol. [55] ve své studii, kdy zkoumali přítomnost N-nitrosaminů v rýžovém vínu a pivu, optimalizovali podmínky pro GC-MS s následujícím výsledkem. Pro chromatografickou separaci byla použita kapilární plynová chromatografická kolona typu (křemenná kapilární kolona 0,25 mm, ID × 30 m, tloušťka filmu 0,25 μm). Teplota injektoru byla 220 °C. Teplotní gradient byl udržován na 50 °C po dobu 1 minuty, zvyšován rychlostí 10 °C/min na 90 °C a byl udržován po dobu 4 minut, poté zvýšen rychlostí 7 °C/min na 130 °C a byl udržován po dobu 5 a zvyšovala se rychlostí 15 °C/min na 250 °C a nakonec se udržovala po dobu 10 minut. Objem nástřiku byl 1,0 μl. Teplota iontového zdroje byla 250 °C a energie dopadu elektronů (EI) byla 70 eV. Teplota kvadrupólu byla 150 °C a teplota přenosové linky byla nastavena na 250 °C.

Dong a kol. [3] zvolil pro analýzu N-nitrosaminů v uzené makrele následující podmínky. Teplota termostatu byla naprogramována následovně: 50 °C, udržována po dobu 1 minuty, zvýšena na 100 °C rychlostí 11 °C/min a udržována po dobu 3 minut, poté zvýšena na 150 °C rychlostí 6 °C/min a udržována po dobu 4 minut, nakonec zvýšena na 240 °C rychlostí 16 °C a udržována po dobu 8 minut. Vstřikovací port byl nastaven na 220 °C. Nástřik byl proveden v splitless režimu s injekčním objemem 1,0 μl. Doba zpoždění rozpouštědla byla nastavena na 6 minut. Teplota kvadrupólu byla 150 °C. Přenosová linka do tandemové MS byla udržována na 250 °C.

Qiu a kol. [1] použili následující podmínky pro analýzu N-nitrosaminů v solených rybách. Chromatografická separace byla provedena pomocí kapilární kolony DB-WAXETR s teplotním programem: 50 °C, udržována 1 min, 50–110 °C při 10 °C/min, 110–200 °C při 15 °C/min., poté 250 °C při 10 °C/min, nakonec 1 min. Celková doba analýzy byla 19 minut. Teplota nástřiku byla nastavena na 250 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium s konstantním průtokem 1,2 ml/min. MS/MS byl provozován v režimu monitorování více reakcí (MRM) s energií elektronů 70 eV se dvěma přechody hmoty pro každý těkavý N-nitrosamin. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 230 °C. Dávkovaný objem byl 2 μl.

2 Experimentální část

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Plynový chromatograf

K analýzám N-nitrosaminů byl použit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A, který byl vybaven hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 5977A MSD (vše Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s elektronovou ionizací a jednoduchým kvadrupólovým analyzátozem.

Pro separaci a optimalizaci analýzy N-nitrosaminů byla použita kapilární kolona SLBTM– 5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

2.1.2 Další zařízení

- analytické váhy KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 52 (Bandelin, Berlín, Německo)
- minitřepačka VORTEX 1 (IKA, Staufen, Německo)
- odstředivka NF 400 (Nuve, Ankara, Turecko)
- automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- stříkačkové filtry, PTFE, průměr 13 mm, pórovitost 0,22 μm (Labicom, Olomouc, ČR)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky
- magnetická míchačka s ohřevem (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Německo)
- SPME vlákno šedé, DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm, stableflex, 24Ga, manual holder, (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- SPME vlákno černé, CAR/PDMS, 75 μm, fused silica, 24Ga, manual holder, (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

2.2 Chemikálie a standardní látky

2.2.1 Chemikálie

- helium 5.0 (Linde Gas, Praha, Česká republika)
- destilovaná voda filtrovaná (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
- chlorid sodný, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- síran hořečnatý, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- acetonitril > 99 % (Honeywell, Seelze, Německo)

- ethylester kyseliny octové, p.a. (Penta, Praha, ČR)

2.2.2 Standardní látky

Ke stanovení a optimalizaci analýzy N-nitrosamů byl použit směsný standard 48489 EPA 8270 N-nitrosoamines Mix 2000 µg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), který obsahoval těchto 6 N-nitrosoaminů: N-Nitrosodibutylamin, N-Nitrosodiethylamin, N-Nitrosomethylethylamin, Nitrosomorpholin, 1-Nitrosopiperidin, 1-Nitrosopyrrolidin.

2.3 Vzorky

V této práci byly analyzovány 4 vzorky potravin (viz. Tab.1), u kterých se dal předpokládat výskyt N-nitrosaminů. Vzorky byly připraveny metodami QuEChERS a SPME a následně analyzovány pomocí GC.

Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků

č.	Vzorek	Země původu
1	Losos	Norsko
2	Grilované kachní prso	ČR
3	Uzená makrela	Norsko
4	Ostravská klobása	ČR

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Chromatografické podmínky

Před analýzou N-nitrosaminů ve vzorcích byla provedena optimalizace metody. Optimální podmínky pro chromatografickou analýzu N-nitrosaminů jsou uvedeny v Tab.2.

Tabulka 2: Podmínky chromatografické analýzy N-nitrosaminů

Kolona	SLB TM – 5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm)		
Mobilní fáze a její průtok	Helium; 1 ml/min		
Objem nástřiku a splitovací poměr	1 μl, 3:1		
Teplota nástřiku	220 °C		
Teplotní program	Nárůst [°C/min]:	Teplota [°C]:	Zdržení [min]:
		70	0
	4	110	1
	40	220	3
Podmínky MS s EI ionizací	Skenovací rozsah: m/z 50 – 200 EI: 70 eV Gain factor: 5,00 Izolační šířka: m/z 0,1 Frekvence skenování: 14,7 skenů/s Teplota převodníku GC-MS: 235 °C Teplota EI zdroje: 300 °C Teplota kvadrupólu: 150 °C		

2.4.2 Metoda SPME

Příprava nasyceného roztoku NaCl

36 g chloridu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.

Příprava roztoku standardů

Z komerčně dostupné směsi standardů N-nitrosaminů o koncentraci 2000 μg/ml byl připraven pracovní roztok o koncentraci 100 mg/l. Tento roztok byl následně použit pro standardní přídavek při analýze N-nitrosaminů.

Příprava vzorků

1 g vzorku byl navážen do lahvičky pro SMPE extrakci. Ke vzorku bylo přidáno 200 μl nasyceného roztoku NaCl. Směs byla umístěna na magnetickou míchačku s ohřevem, kde po 30 minut probíhala sorpce na šedé vlákno (sorbent DVB/CAR/PDMS) při teplotě 65 °C. Po uplynutí doby sorpce bylo vlákno umístěno do nástřikové části GC, kde bylo ponecháno po dobu 5 minut k provedení desorpce. Každý vzorek byl zpracován 3x, aby se eliminovalo riziko chybné analýzy. Jelikož se předpokládalo, že vzorky obsahují minimální množství N-nitrosaminů, byly provedeny další 3 analýzy pro každý vzorek spřídavkem standardu 100 μl o koncentraci 100 mg/l. tzv. spikování.

2.4.3 Metoda QuEChERS

Příprava roztoků standardů

Z komerčně dostupného standardu směsi N-nitrosaminů 2000 µg/ml byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mg/l. Z tohoto zásobního roztoku se dále připravovaly roztoky s nižší koncentrací 50, 10, 5, 1 mg/l, které se dále použily k stanovení optimálních podmínek pro analýzu N-nitrosaminů.

Příprava vzorků

Do centrifugační zkumavky byl navážen 1 g vzorku. Ke vzorku se následně přidalo 0,5 g NaCl, 0,5 g MgSO₄ a 4 ml 50% acetonitrilu. Směs se 3 minuty třepala na vortexovém mixéru a poté byla odstředěna (3000 ot./min, 4 min.). Supernatant ze zkumavky byl odebrán, přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr do vialky a analyzován pomocí GC-MS. Každý vzorek byl takto připraven 3x, aby se eliminovalo riziko chybné analýzy. Byly provedeny i další 3 analýzy se všemi vzorky spikovanými, ke kterým se přidalo 100 µl roztoku standardů o koncentraci 10 mg/l.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Chromatografická analýza N-nitrosaminů

Plynová chromatografie je nejčastěji využívanou technikou pro stanovení N-nitrosaminů. Plamenově-ionizační detektor ve spojení s plynovou chromatografií je běžně využívaným pro detekci N-nitrosaminů. Jeho nevýhodou však je nedostatek informací o struktuře analyzované látky. Proto je značně výhodnější využít hmotnostního spektrometru, který kromě retenčních časů nabízí hmotnostní spektra, která po správné interpretaci slouží k identifikaci N-nitrosaminů ve vzorku. V této práci byly nejprve optimalizovány chromatografické podmínky, které následně byly použity při analýze připravených vzorků potravin metodami SPME a QuEChERS.

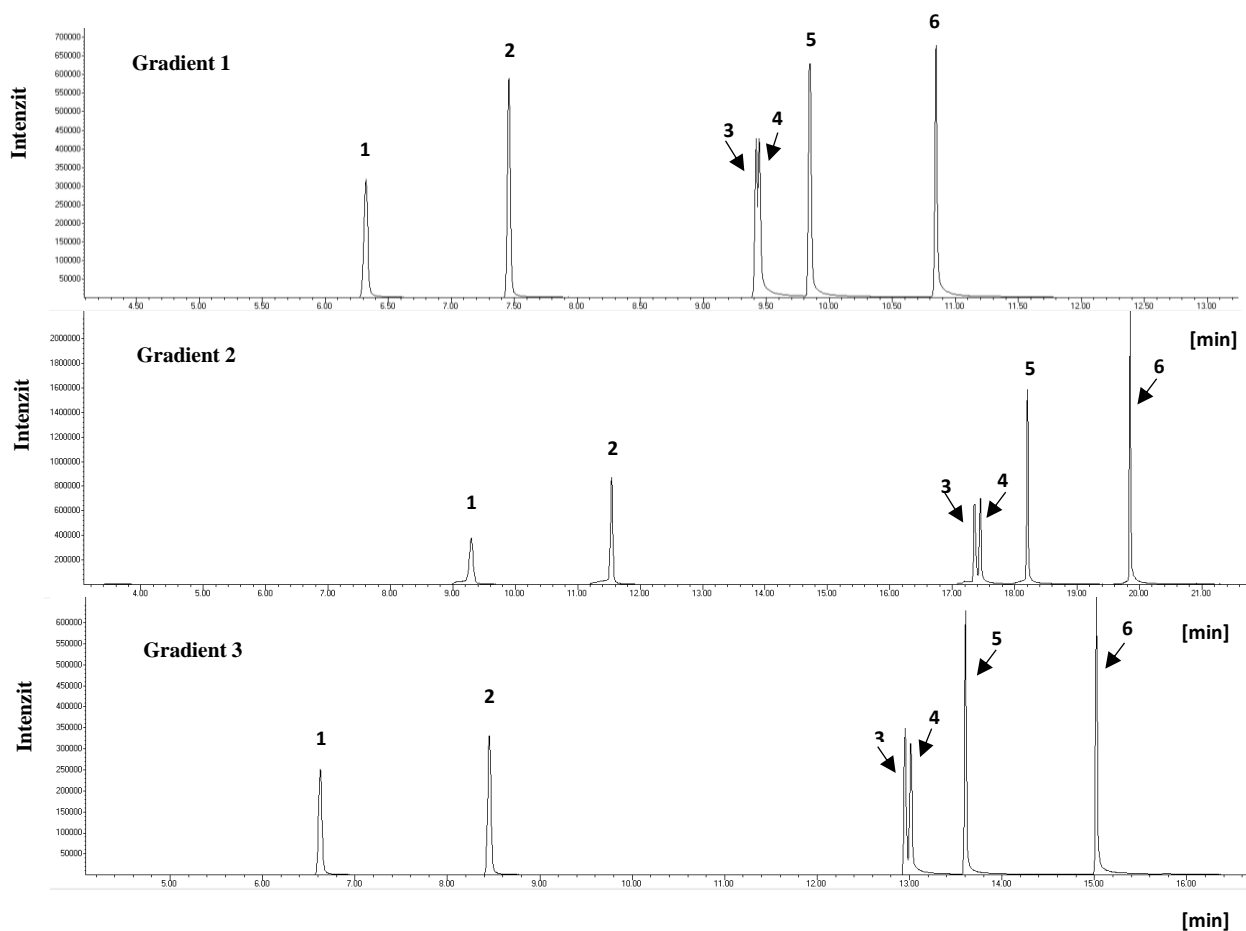
3.1.1 Optimalizace chromatografické metody

Optimalizace podmínek GC-MS metody pro stanovení N-nitrosaminů byla provedena se standardem směsi N-nitrosaminů o koncentraci 10 mg/l. Tato směs obsahovala 6 N-nitrosaminů: N-Nitrosodibutylamin, N-Nitrosodiethylamin, N-Nitrosomethylethylamin, Nitrosomorpholin, 1-Nitrosopiperidin, 1-Nitrosopyrrolidin. Byl optimalizován teplotní program separace, splitovací poměr a objem nástřiku.

Nejprve bylo nutné zvolit optimální teplotní program separace. Hodnoty pro jednotlivé teplotní gradienty jsou uvedeny v Tab.3 a porovnání vlivu teplotních gradientů na separaci N-nitrosaminů je zobrazeno na Obr. 9.

Tabulka 3: Teplotní gradienty při optimalizaci teplotního programu

	Nárůst [°C/min]	Teplota [°C]	Zdržení [min]
Gradient č.1	0	55	0
	10	110	1
	40	220	4
Gradient č.2	0	50	1
	10	90	4
	15	250	4
Gradient č.3	0	70	0
	4	110	1
	40	220	3



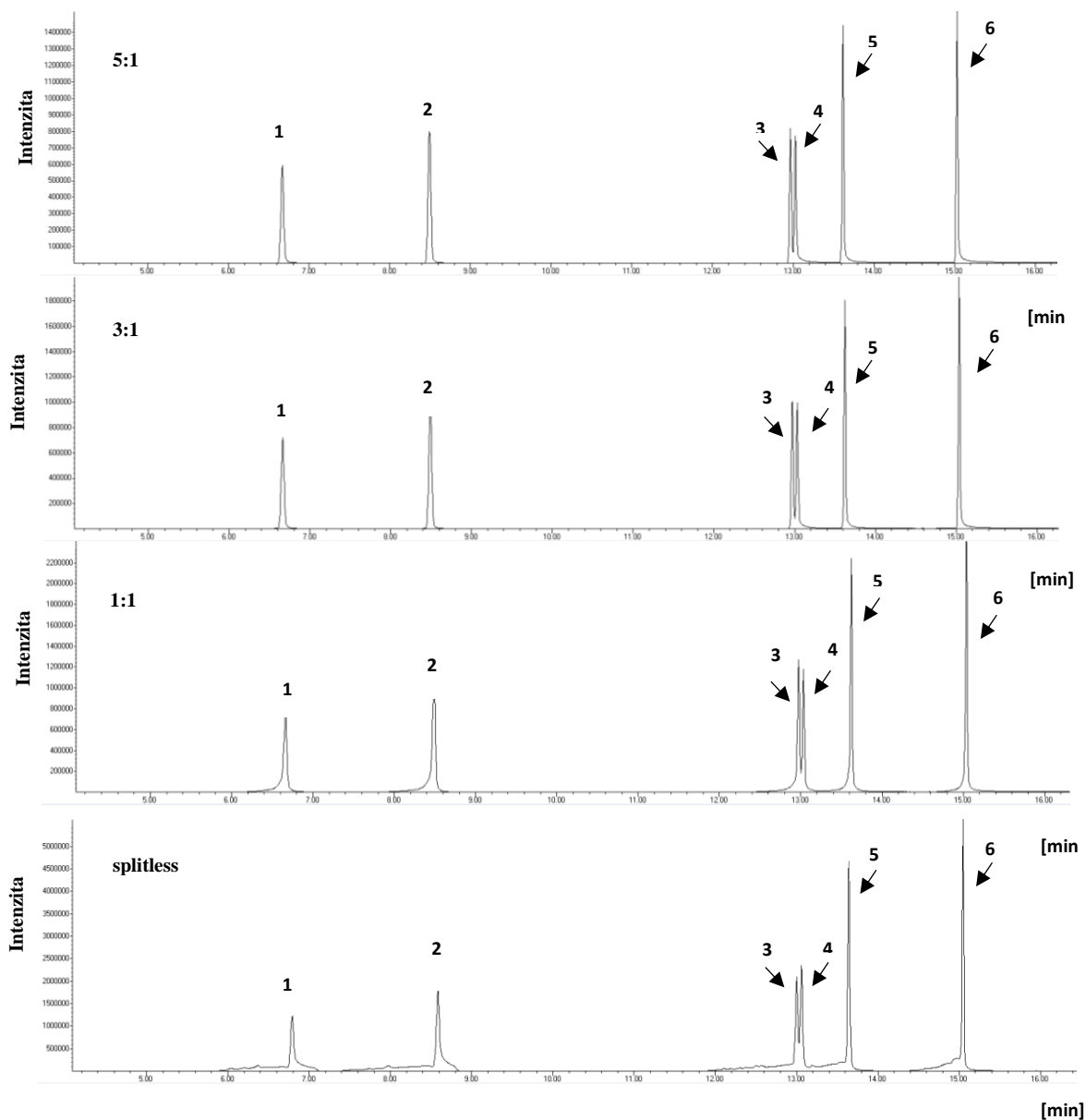
Obrázek 9: Vliv teplotních gradientů na separaci N-nitrosaminů, 1-NMEA, 2-NDEA, 3-NPYR, 4-NMOR, 5-NPIP, 6-NDBA

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: Gradient 1: 55 – 220 °C, Gradient 2: 50 – 250 °C, Gradient 3: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C

Při optimalizaci teplotního programu separace byl nejprve zvolen teplotní program (gradient č. 1), který zvolil ve své studii Dong a kol. [3]. Avšak aplikace tohoto gradientu nebyla nejvhodnější. Nebyla zajištěna úplná separace všech N-nitrosaminů. Porovnáním získaných hmotnostních spekter analyzovaných látek s knihovnou spekter NIST (National Institute of Standards and Technology) bylo zjištěno, že nedokonalá je separace u N-nitrosaminů NPYR a NMOR. Byl tedy zvolen teplotní gradient (gradient č. 2), u kterého byla změněna počáteční na 50 °C a konečná teplota na 250 °C. Při aplikaci tohoto gradientu sice došlo k lepší separaci N-nitrosaminů, ale analýza byla stále příliš dlouhá. Pro urychlení separace byl nakonec ještě vyzkoušen teplotní program (gradient č. 3) se třemi kroky. Tento program se z hlediska doby

analýzy jevil nejlépe, a proto byl zvolen pro analýzu standardů i vzorků metodami QuEChERS a SPME.

Pro optimalizaci dávkování byly vyzkoušeny různé splitovací poměry, a to konkrétně 5:1, 3:1 a 1:1. Bylo také vyzkoušeno dávkování v splitless režimu. Srovnání chromatogramů je zobrazeno na Obr. 10.

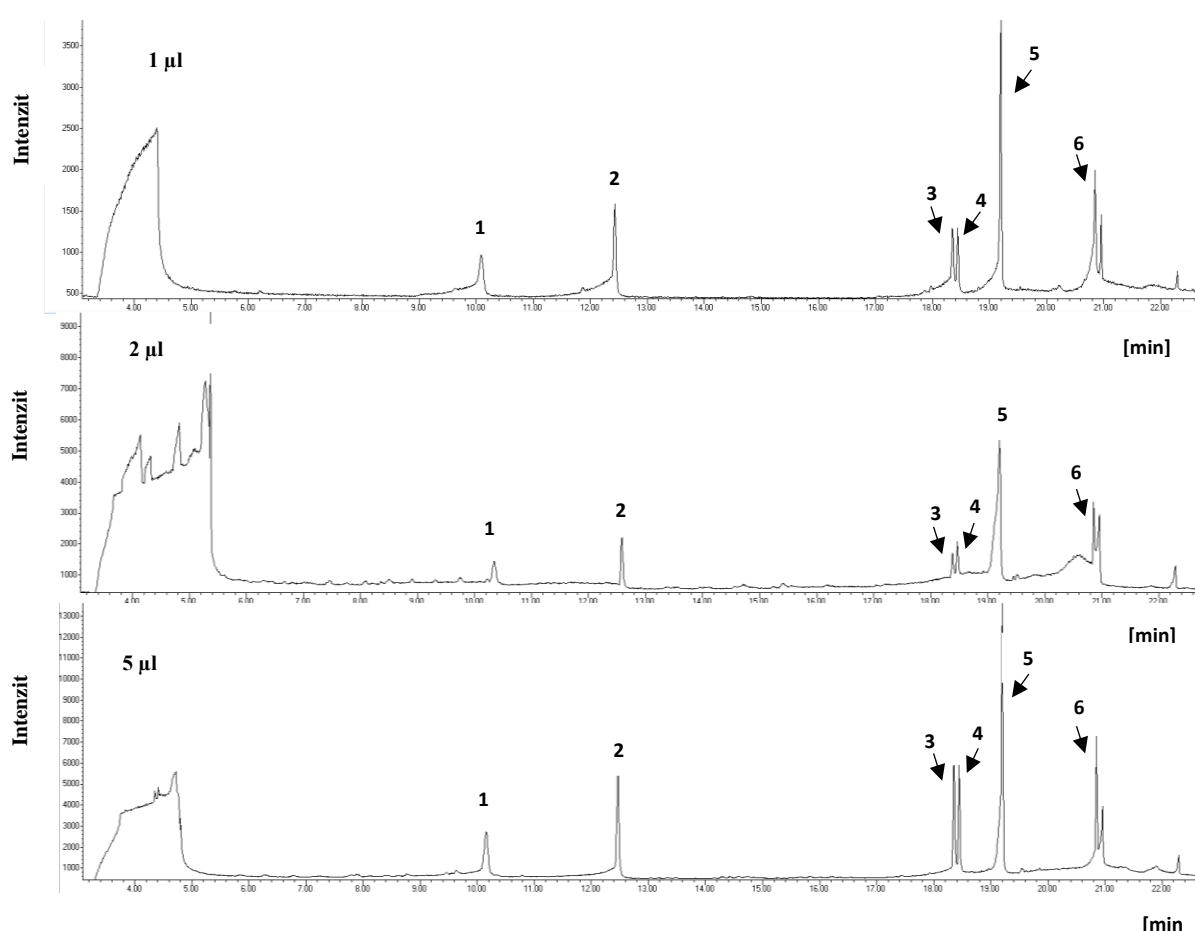


Obrázek 10: Různé splitovací poměry, 1-NMEA, 2-NDEA, 3-NPYR, 4-NMOR, 5-NPIP, 6-NDBA

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr 5:1, 3:1, 1:1, splitless, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C

U všech splitovacích poměrů byl použit nástřik 1 μl směsi standardů o koncentraci 100 mg/l. Snižováním splitovacího poměru dochází logicky ke zvětšení píků. Režim splitless byl vyhodnocen jako nevhodný. Píky byly deformované, pravděpodobně přetížením kolony a detektoru. Testovaný poměr 1:1 zase ukazoval frontování píků a byl takové vyhodnocen jako nevhodný pro analýzu N-nitrosaminů. Mezi poměry 5:1 a 3:1 byl nejmenší rozdíl. Píky u poměru 3:1 byly nepatrně vyšší než píky 5:1. Jako nejvhodnější proto byl zvolen poměr 3:1, u kterého byly píky ostré a vysoké. Tento poměr byl následně použit při všech dalších analýzách.

Posledním optimalizovaným parametrem byl objem nástřiku. Porovnání vlivu objemu nástřiku je zobrazeno na Obr.11.

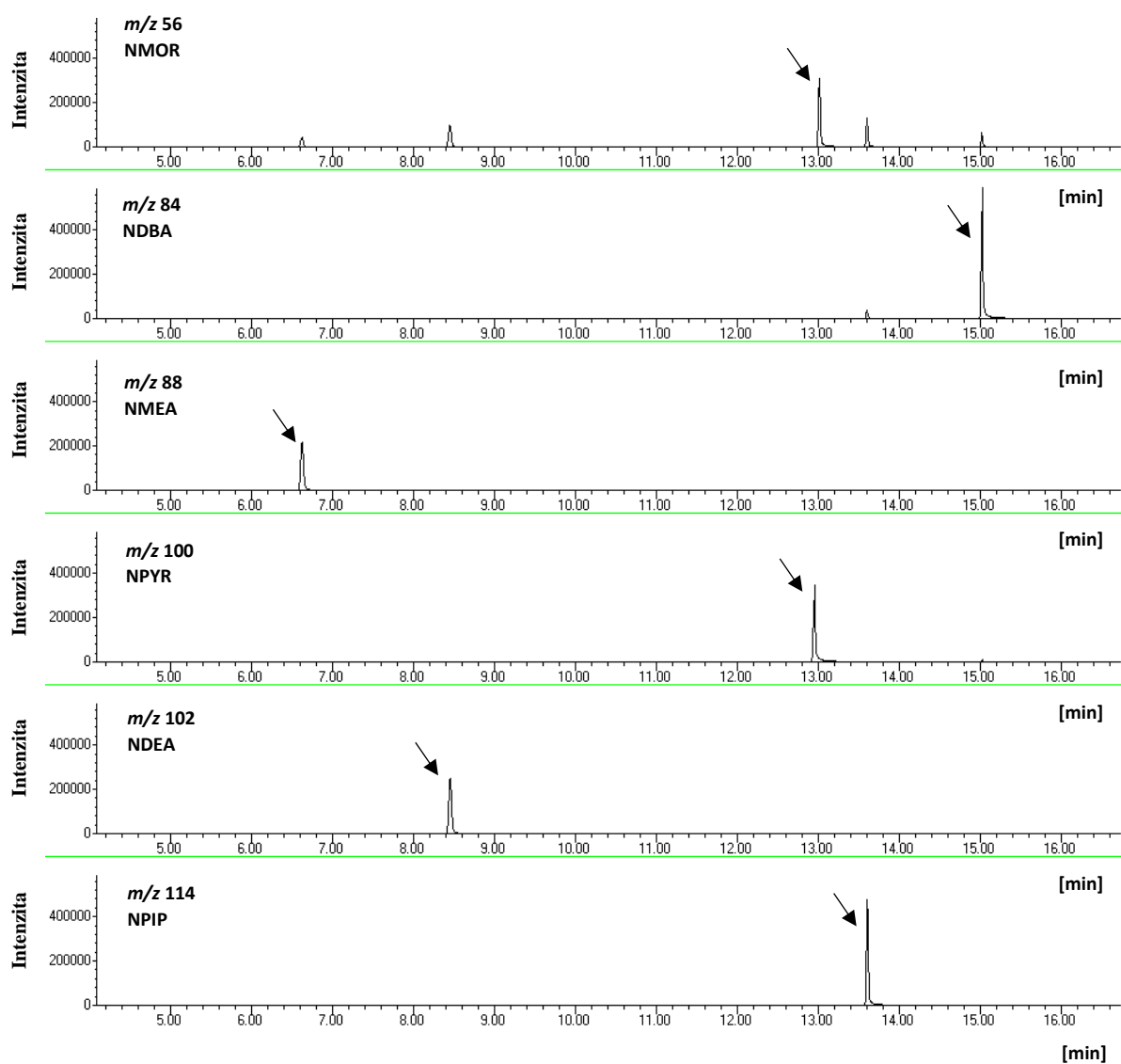


Obrázek 11: Optimalizace nástřiku, 1-NMEA, 2-NDEA, 3-NPYR, 4-NMOR, 5-NPIP, 6-NDBA

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m \times 0,25 mm \times 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástřik: 1, 2, 5 μl , splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 $^{\circ}\text{C}$, teplotní program: 50 – 250 $^{\circ}\text{C}$, teplota EI zdroje: 300 $^{\circ}\text{C}$, teplota převodníku GC-MS: 235 $^{\circ}\text{C}$, teplota kvadrupólu: 150 $^{\circ}\text{C}$

Optimalizace nástřiku probíhala při teplotním gradientu č.2, výsledky ale byly použitelné i pro gradient č.3. Pozoroval se vliv objemu nástřiku na velikost a vzhled píku. Byly testovány objemy 1 μl , 2 μl a 5 μl . U objemu 5 μl byly píky sice nejvyšší, ale objevovalo se u nich velké frontování. Testovaný objem 2 μl je sice úspornější, ale píky byly menší a také se u nich objevovalo frontování. Jako optimální se jevílo použití objemu 1 μl . Píky byly nejmenší ze všech testovaných objemů, ale frontování zde bylo minimální.

Nejlepší podmínky separaci a analýzu N-nitrosaminů jsou následující. Separace probíhala na kapilární koloně SLBTM – 5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,5 μm), mobilní fází bylo helium s průtokem 1 ml/min. Teplota nástřiku byla 220 $^{\circ}\text{C}$ a dávkován byl objem 1 μl ve splitovacím poměru 3:1. Teplotní program se pohyboval od 70 do 220 $^{\circ}\text{C}$ a celková doba analýzy byla 17 minut. Teploty pro hmotnostní detektor byly nastaveny následovně: pro EI zdroj byla teplota 300 $^{\circ}\text{C}$, pro převodník GC-MS 235 $^{\circ}\text{C}$ a pro kvadrupól 150 $^{\circ}\text{C}$. Píky byly sledované v rozsahu m/z 50–200. Prvním N-nitrosaminem je NMEA (pík č.1). Pík rozpouštědla (acetonitril) zobrazen není, protože byla použita funkce solvent delay (4 min), která chrání vlákno (katodu) před účinky vysokých koncentrací par rozpouštědla v iontovém zdroji. Výsledný záznam pro N-nitrosaminy analyzované za těchto podmínek je zobrazen na Obr 12. N-nitrosaminy byly vyhodnoceny v režimu SIM (selected ion monitoring). Hodnoty sledovaných m/z byly 56, 84, 88, 100, 102 a 114.



Obrázek 12: Výsledný záznam N-nitrosaminů v režimu SIM

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástrík: 1 μl, splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C

3.1.2 Meze detekce a stanovitelnosti N-nitrosaminů

Pro jednotlivé N-nitrosaminy byly stanoveny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Tyto meze jsou závislé na citlivosti metody a především na chybě měření. Chyba měření může být reprezentována směrodatnou odchylkou nebo šumem, což je časová fluktuace měřeného signálu v nepřítomnosti analytu [59]. Mez detekce je taková koncentrace analytu, která způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku výšky šumu základní linie (h_{ξ}):

$$LOD = 3 \cdot h_{\xi}$$

Mez stanovitelnosti je taková koncentrace analytu, která způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu desetinásobku výšky šumu:

$$LOQ = 10 \cdot h_{\xi}$$

Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) analyzovaných N-nitrosaminů jsou spolu s retenčními časy uvedeny v Tab. 4. Poslední pík N-nitrosaminu NDBA eluoval v retenčním čase 15,02 min, celková doba analýzy byla 17 minut. Mez detekce byla nejvyšší pro NMOR, a to 0,91 $\mu\text{g/ml}$. Pro ostatní N-nitrosaminy se meze detekce pohybovaly mezi 0,37 do 0,21 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 4: Meze detekce a stanovitelnosti pro N-nitrosaminy v roztoku

č. píku	název	t_R [min]	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
1	NMEA	6,65	0,36	1,26
2	NDEA	8,47	0,37	1,24
3	NPYR	12,95	0,37	1,24
4	NMOR	13,01	0,91	3,10
5	NPIP	13,6	0,21	0,7
6	NDBA	15,02	0,35	1,19

3.2 Optimalizace podmínek metody SPME

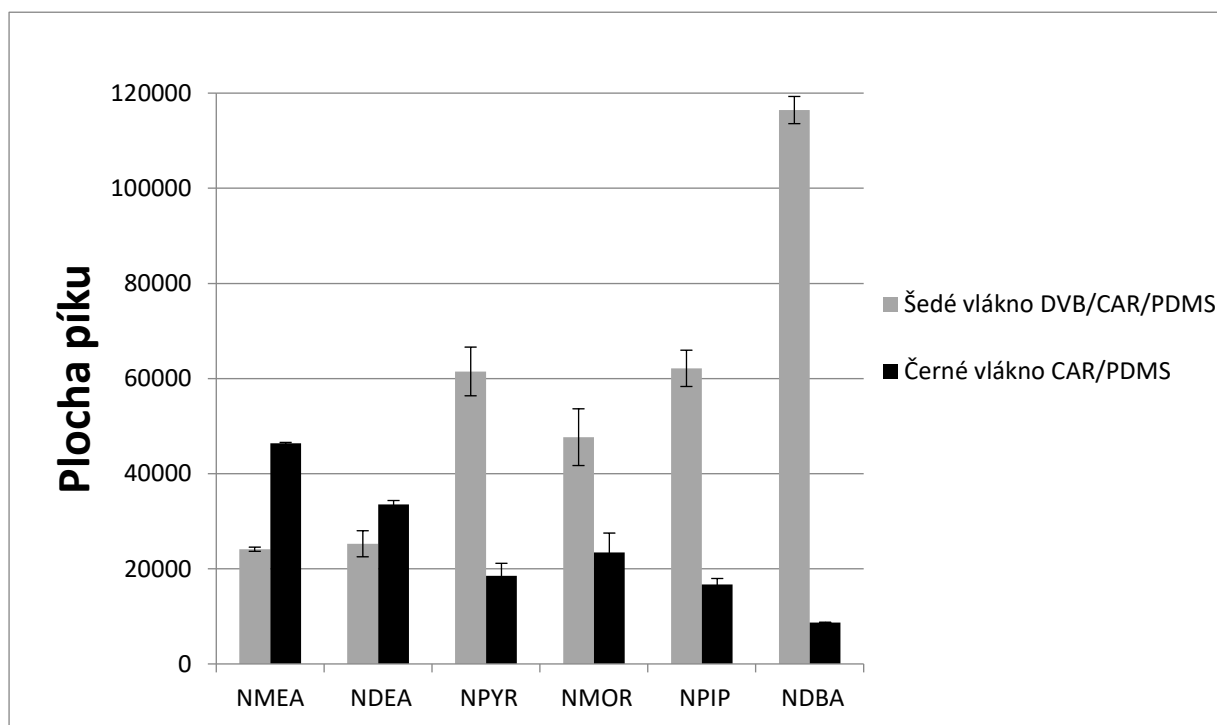
Mikroextrakce tuhou fází, je sorpčně/desorpční technika extrakce a zakoncentrování analytu. Základním principem techniky je expozice malého množství sorbentu, tj. extrakční stacionární fáze, do vzorku. V případě SPME jsou analyty sorbovány na vlákno, dokud není dosaženo rovnováhy mezi koncentrací analytu na vláknech a koncentrací analytu v roztoku, nebo

dokud nejsou zaplněna všechna absorpční místa sorbentu [20]. Metodu SPME lze aplikovat i při stanovení N-nitrosaminů.

Optimalizace metody SPME byla provedena se směsí standardů N-nitrosaminů o koncentraci 10 mg/l. Byla optimalizována teplota extrakce, extrakční doba a přídavek nasyceného roztoku chloridu sodného pro zlepšení výtěžnosti extrakce.

Při optimalizaci podmínek byly použity tři různé teploty extrakce: 65 °C, 80 °C a 95 °C. Pro všechny teploty byly vyzkoušeny dvě různé extrakční doby: 15 a 30 minut a byla použita dvě různá sorpční vlákna: vlákno šedé, se sorbentem DVB/CAR/PDMS a vlákno černé, se sorbentem CAR/PDMS.

Porovnání výtěžnosti obou vláken je zobrazeno na Obr. 13. Vlákna byla porovnávána při teplotě 65 °C, 30minutové době extrakce a s přídavkem 100 µl nasyceného roztoku chloridu sodného. Chybové úsečky na všech následujících grafech v této kapitole představují směrodatnou odchylku vypočtenou z ploch píků tří provedených analýz.

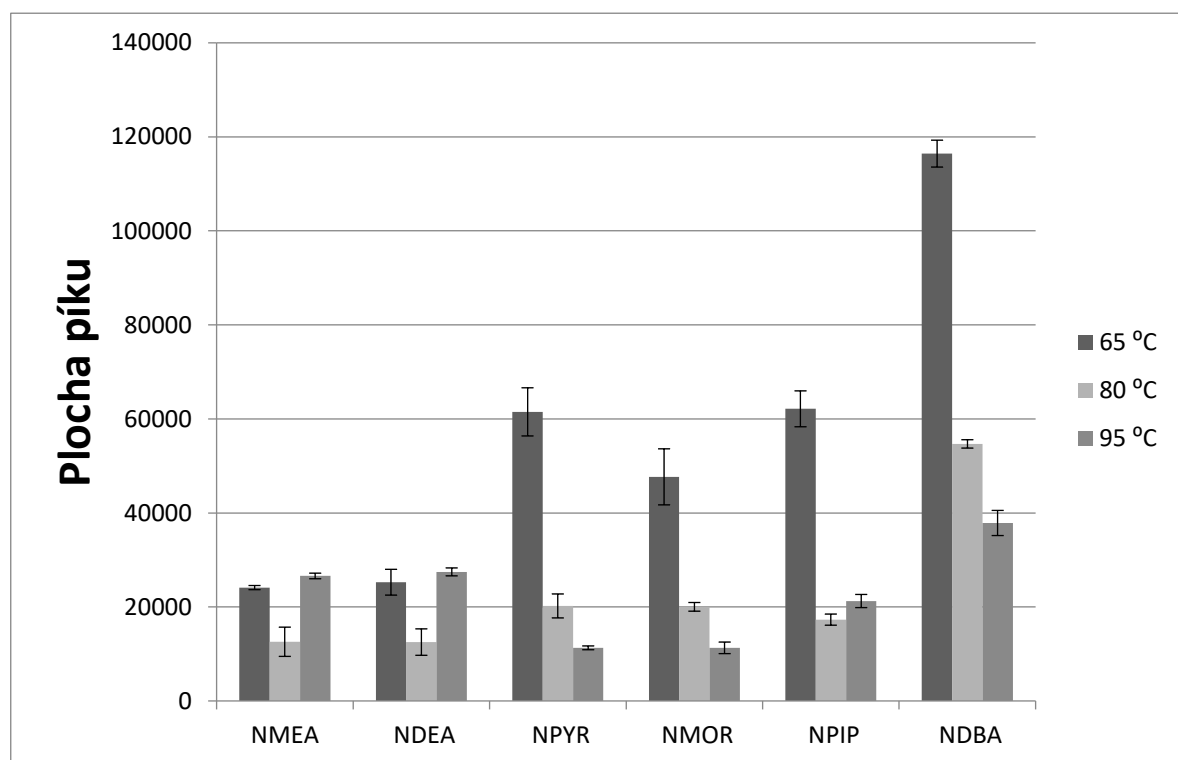


Obrázek 13: Porovnání sorpce analytů na šedé a černé vlákno

Jako vhodnější pro analýzu N-nitrosaminů se ukázalo vlákno šedé. V porovnání s černým vláknem docházelo na šedém vlákně k větší výtěžnosti u čtyř ze šesti sledovaných N-nitrosaminů, a to u NPYR, NMOR, NPIP a NDBA. Černé vlákno mělo sice vyšší výtěžnost

N-nitrosaminů NMEA a NDEA, ale výtěžnost ostatních N-nitrosaminů byla v porovnání s šedým vláknem mnohem nižší.

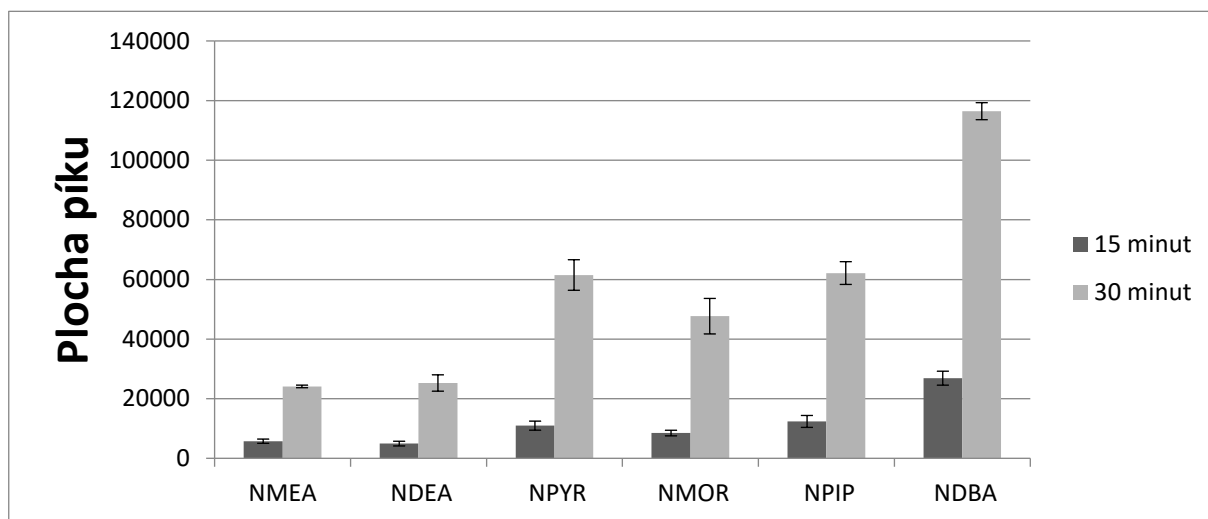
Dalším zkoumaným parametrem byla teplota extrakce. Porovnání tří testovaných teplot extrakce je zobrazeno na Obr. 14.



Obrázek 14: Porovnání různých teplot extrakce

Pro šedé vlákno a roztok směsi standardů o koncentraci 10 mg/l byly testovány tři různé teploty: 65 °C, 80 °C a 95 °C. Teplota 65 °C měla v porovnání s teplotami 80 a 95 °C nejlepší výsledky, a to dokonce výrazně. Naopak teplota 80 °C u většiny N-nitrosaminů vypadala jako nejméně vhodná. Měla nejnižší výtěžnost u tří N-nitrosaminů v porovnání s ostatními teplotami. Teplotu 65 °C zvolili ve své studii i Grebel a kol. [21]. U čtyř N-nitrosaminů, NPYR, NMOR, NPIP a NDBA je jevila jako ideální teplota pro analýzu. Byla tedy zvolena jako optimální teplota pro extrakci N-nitrosaminů ze vzorků potravin.

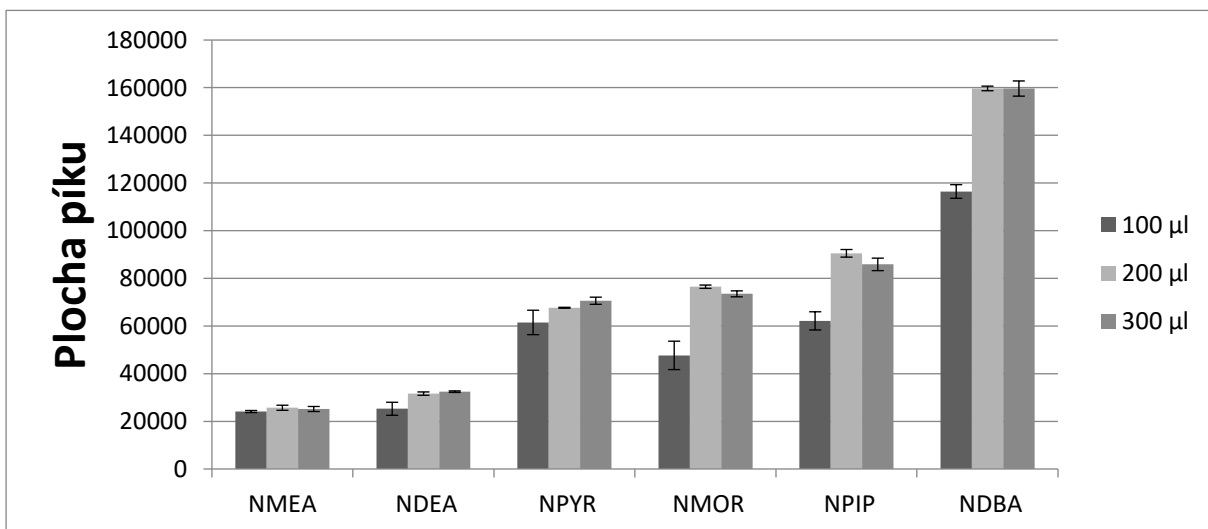
Pro zkoumané teploty byly testovány dvě různé doby extrakce, a to 15 a 30 minut. Jak je vidět na Obr. 15, během 15 minut nebyly N-nitrosaminy ještě dostatečně sorbované na vlákno. Bylo zapotřebí je nechat sorbovat po dobu 30 minut.



Obrázek 15: Porovnání různých extrakčních dob

V porovnání obou testovaných dob sorpce je vidět velký rozdíl ve výtěžnosti N-nitrosaminů a to několikanásobný. Pro další stanovení byla proto použita extrakční doba 30 minut, která lépe vyhovovala potřebám analýzy N-nitrosaminů.

Poslední parametr, který byl zkoumán pro optimalizaci metody SPME, byl objem použitého nasyceného roztoku chloridu sodného. Dong a kol. [47] ve své studii uvádí, že přidáním soli se zlepší extrakce N-nitrosaminů na vlákno. Proto byly vyzkoušeny tři různé objemy, a to 100, 200 a 300 μ l. Teplota extrakce byla 65 $^{\circ}$ C a extrakční doba 30 minut. Porovnání přídatku soli je zobrazeno na Obr. 16.



Obrázek 16: Porovnání množství přídatku soli

Jako nejméně vhodný se jeví objem 100 μl , u něhož je výtěžnost N-nitrosaminů nejmenší. Mezi objemy 200 a 300 μl byl mnohem menší rozdíl. Nepatrně větší výtěžnost byla ale stanovena pomocí objemu 200 μl . Pro další analýzy byl tedy vybrán objem 200 μl , protože se jevil jako nejvhodnější a úspornější.

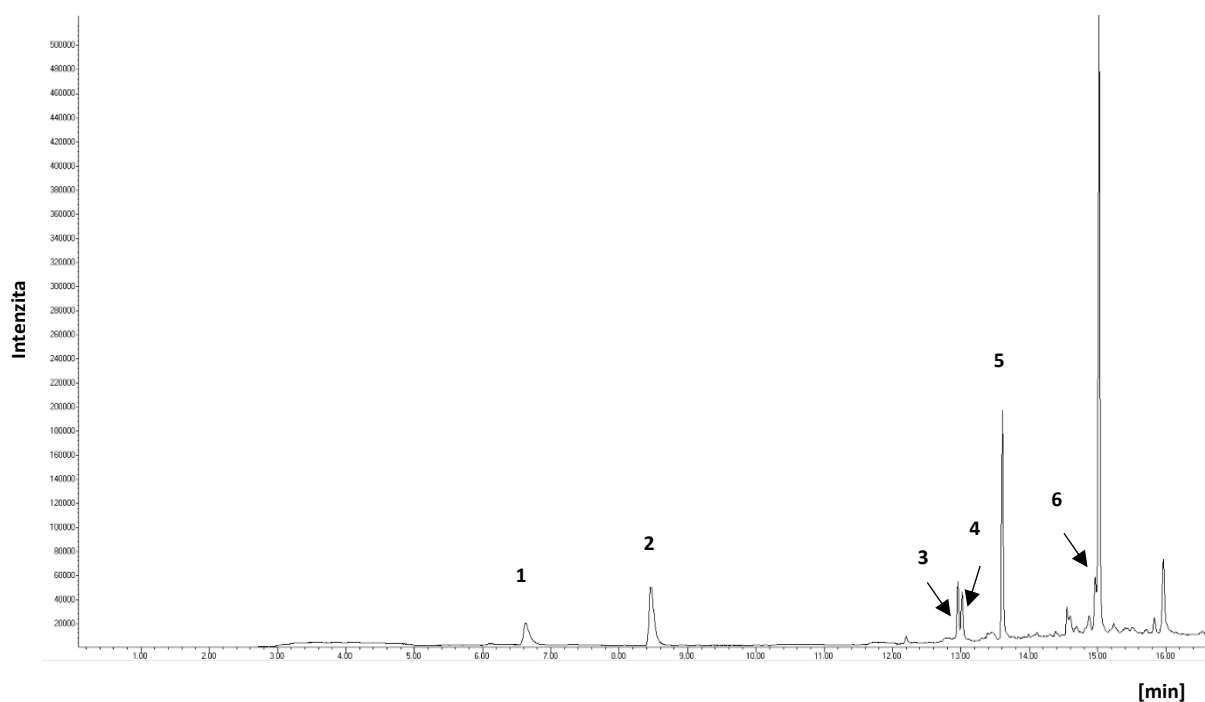
Optimální podmínky pro přípravu vzorku metodou SPME byly tedy stanoveny následovně. Nejlepší výtěžnost poskytuje šedé vlákno se sorbentem DVB/CAR/PDMS. Jako optimální byla zvolena teplota 65 °C. Větší výtěžnosti bylo dosaženo při 30minutové extrakci a s přídavkem 200 μl nasyceného roztoku chloridu sodného. Tyto podmínky byly aplikovány při přípravě reálných vzorků k analýze.

3.3 Aplikace metody SPME na přípravu vzorků

Metoda SPME byla použita při zpracování čtyř různých vzorků. Zjišťoval se obsah N-nitrosaminů ve vzorcích uzeného lososa, grilovaného kachního prsa, uzené makrely a ostravské klobásy. Jelikož jsou N-nitrosaminy v potravinách sledovanými látkami, předpokládalo se, že se ve vzorcích budou nacházet ve velmi malém množství nebo vůbec. Ke vzorkům byl tedy přidán standard N-nitrosaminů, aby bylo možné porovnat výsledky samotných vzorků a vzorků s přídavkem standardu.

Byla provedena tři měření se vzorkem a s přídavkem 200 μl nasyceného roztoku chloridu sodného a tři měření se vzorkem, chloridem sodným a s přídavkem 100 μl standardu N-nitrosaminů o koncentraci 10 mg/l. Vzorek se standardním přídavkem sloužil ke zjištění reprodukovatelnosti metody.

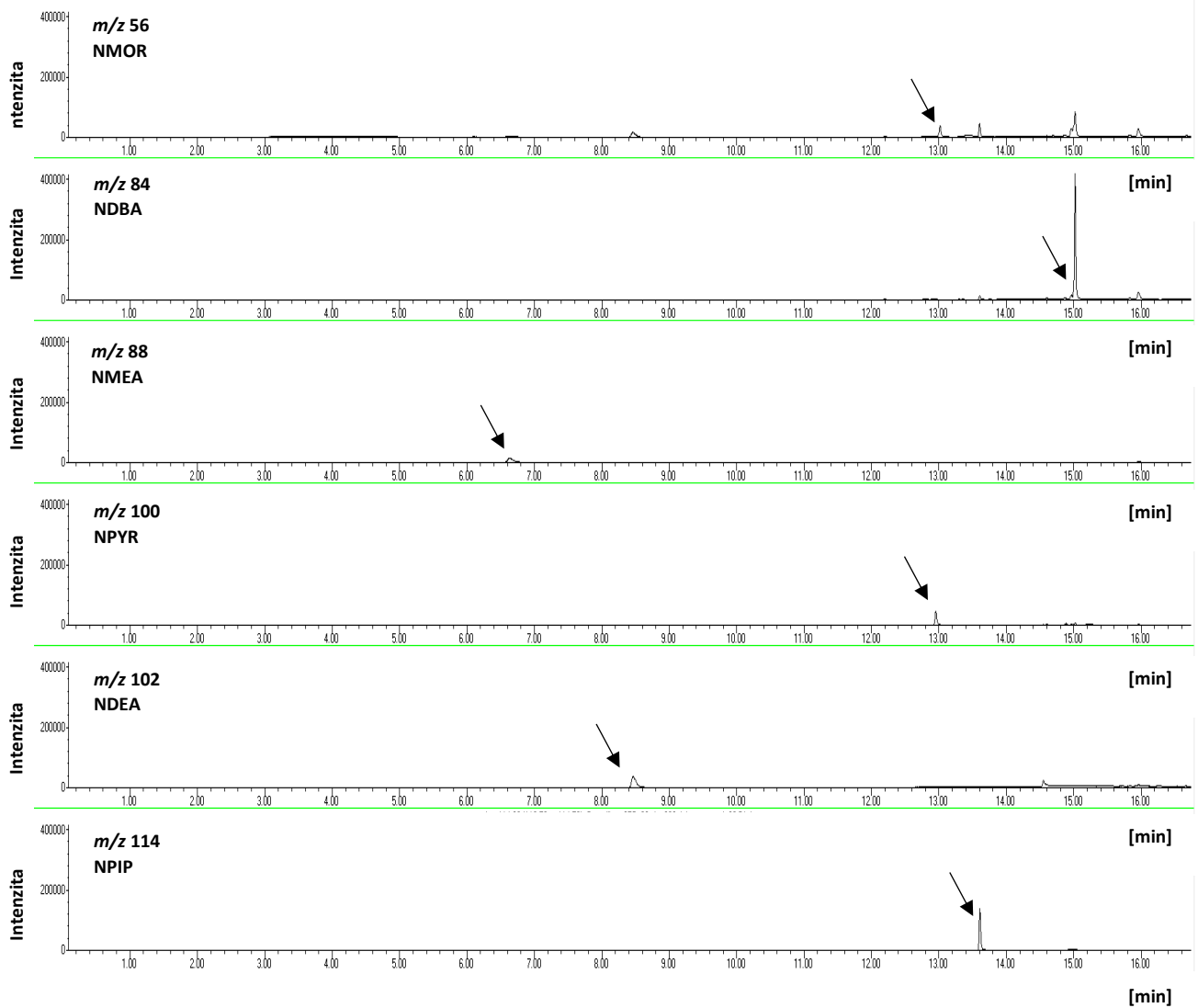
Na Obr. 17 je zobrazen záznam N-nitrosaminů ve vzorku lososa s přídavkem standardu vyhodnocený v režimu TIC (Total Ion Chromatogram) a na Obr. 18 v režimu SIM.



Obrázek 17: TIC chromatogram spikovaného vzorku lososa připraveného metodou SPME
1-NMEA, 2-NDEA, 3-NPYR, 4-NMOR, 5-NPIP, 6-NDBA

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C

Analýza vzorků připravených metodou SPME ukázala, že analyzované vzorky sledované N-nitrosaminy neobsahovaly. Tento výsledek byl předpokládáný, jelikož jsou N-nitrosaminy v potravinách sledovanými látkami. Na chromatogramech vzorků se začal objevovat velký pík, který koeluoval s NDBA v retenčním čase 15,02 minut. Knihovna spekter NIST látku vyhodnotila jako 1-(1'-pyridyl)-2-butanon. Tento pík se vyskytoval u všech testovaných vzorků. Při měření slepého pokusu se neobjevil. Je tedy pravděpodobné, že tato látka koelující s N-nitrosaminem NDBA, se vyskytovala ve všech testovaných vzorcích.



Obrázek 18: SIM chromatogramy spikovaného vzorku lososa připraveného metodou SPME

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C

V Tab. 5 jsou uvedeny meze detekce a stanovitelnosti a relativní směrodatná odchylka (RSD) N-nitrosaminů připravených metodou SPME.

Tabulka 5: Meze detekce a stanovitelnosti N-nitrosaminů pro metodu SPME

č. píku	název	t _R [min]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	RSD [%]
1	NMEA	6,65	2,72	9,12	1,2
2	NDEA	8,47	1,20	4,08	6,3
3	NPYR	12,95	0,96	3,26	25
4	NMOR	13,01	0,98	3,29	12,4
5	NPIP	13,6	1,36	4,64	8,1
6	NDBA	15,02	1,58	5,26	18,3

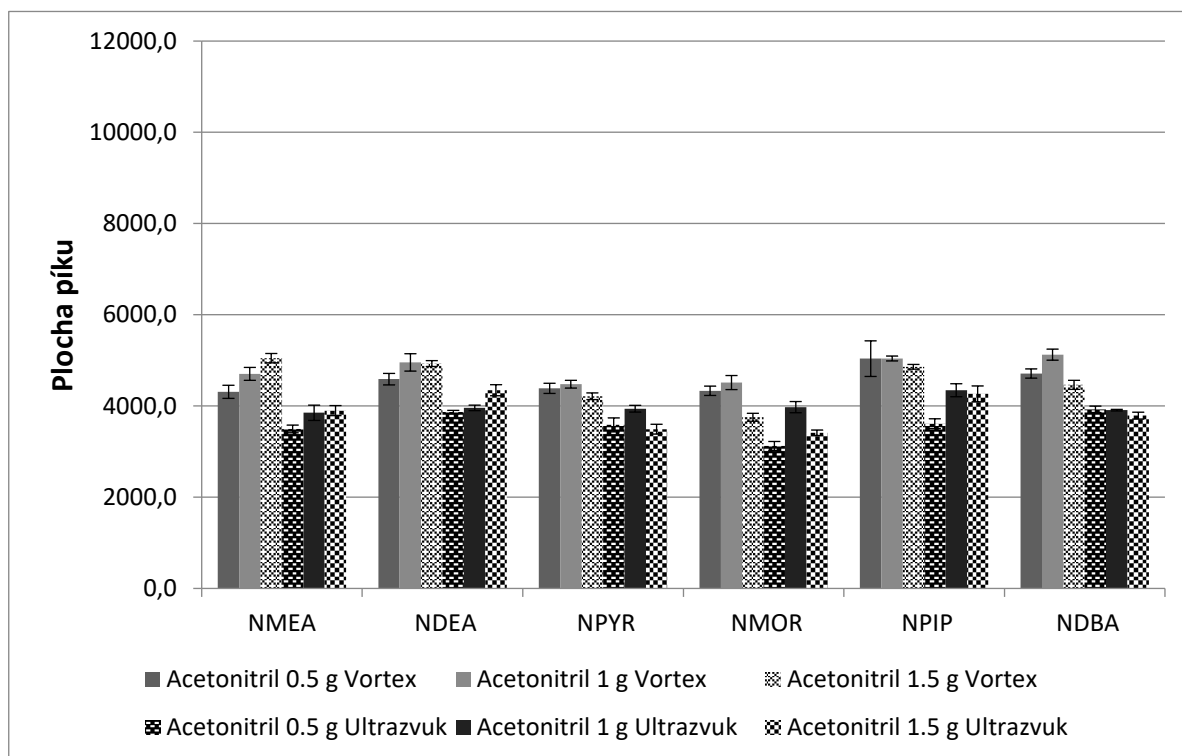
Mez detekce byla nejvyšší pro NMEA, a to 2,72 µg/ml. Pro ostatní N-nitrosaminy se meze detekce pohybovaly mezi 0,96 do 1,58 µg/ml. V porovnání s LOD a LOQ stanovenými v roztoku jsou meze N-nitrosaminů připravených metodou SPME vyšší. Lze to tedy komentovat tak, že aplikace metody SPME při stanovení N-nitrosaminů je méně citlivější, než analýza N-nitrosaminů z roztoku. Avšak doporučuji další studie na toto téma. Relativní směrodatná odchylka se pohybuje v širokém rozpětí od 1-25 %. Největší hodnoty nabývá u N-nitrosaminu NPYR, a to 25 %. Nejmenší má poté N-nitrosamin NMEA, u které její hodnota činí 1,2 %. Aplikování metody SPME pro stanovení N-nitrosaminů se nejeví jako dobře reprodukovatelné. Hodnota relativní směrodatné odchylky je pro některé testované N-nitrosaminy příliš velká.

3.4 Optimalizace metody QuEChERS

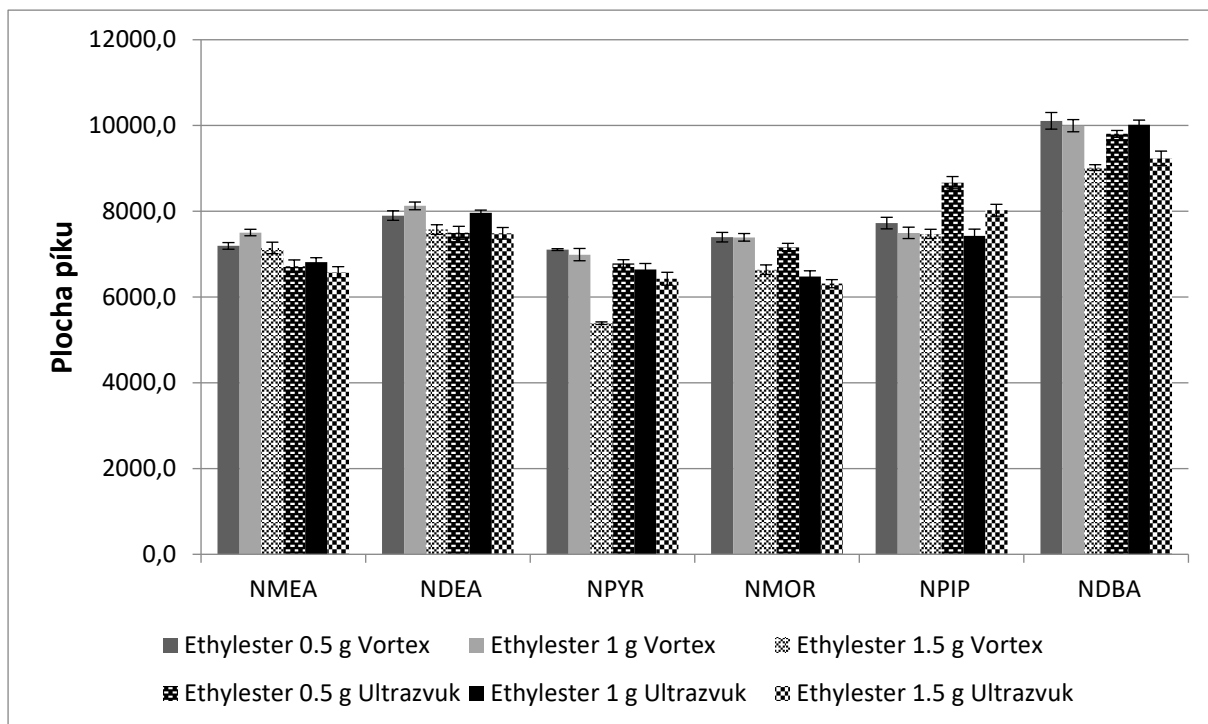
Metoda QuEChERS patří k moderním trendům v přípravě vzorku k analýze. Je to metoda rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní a bezpečná. QuEChERS je metoda přípravy vzorku, která zahrnuje extrakci acetonitrilem a rozdělení síranem hořečnatým samotným nebo v kombinaci s jinými solemi a poté následuje chromatografická analýza.

Optimalizace metody QuEChERS byla provedena se směsí standardů N-nitrosaminů o koncentraci 10 mg/l. Bylo optimalizováno množství použitých solí, různé druhy rozpouštědla a využití vortexového mixéru nebo ultrazvuku.

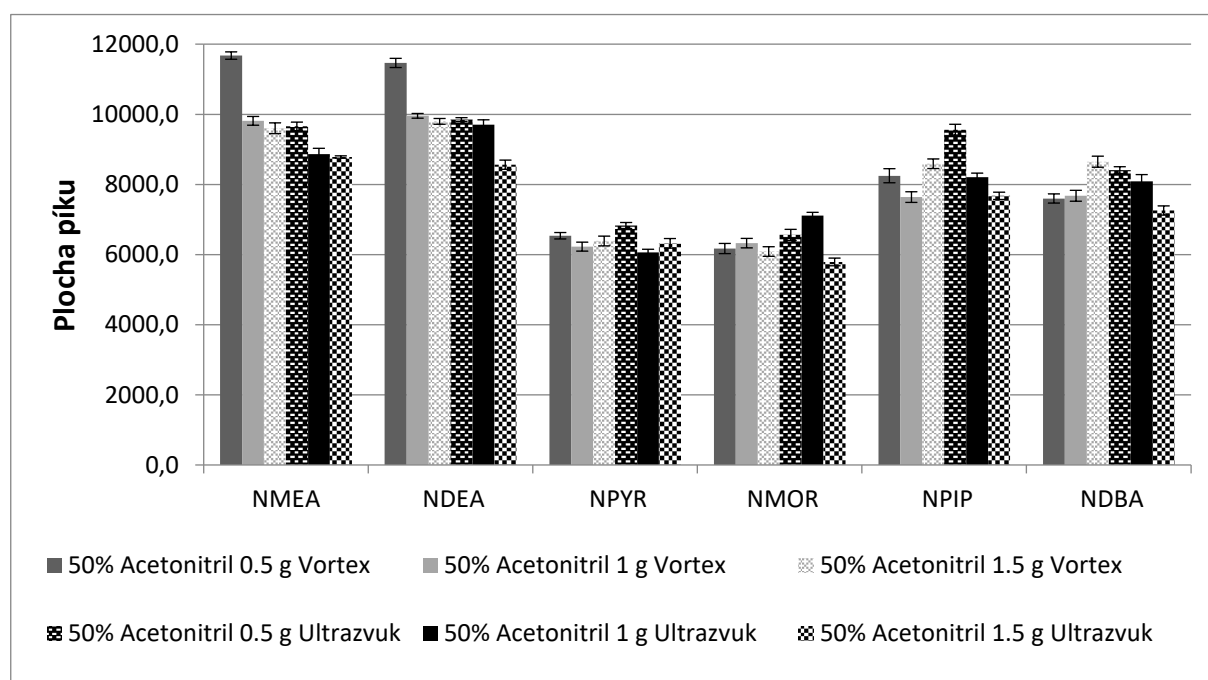
Pro optimalizaci byly použity tři různé druhy rozpouštědel, a to: acetonitril, 50% acetonitril a ethylester kyseliny octové. Pro všechna rozpouštědla bylo zároveň vyzkoušeno použití různého množství solí chloridu sodného a síranu hořečnatého. Použitá množství byla 0,5, 1 a 1,5 g. Poslední parametr, který se testoval, bylo použití vortexového mixéru nebo ultrazvuku. Porovnání všech podmínek optimalizace jsou zobrazeny na Obr.19-21. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, získanou ze tří stejných analýz.



Obrázek 19: Odezva N-nitrosaminů při použití acetonitrilu jako extrakčního činidla



Obrázek 20: Odezva N-nitrosaminů při použití ethylesteru kyseliny octové jako extrakčního činidla



Obrázek 21: Odezva N-nitrosaminů při použití 50% acetonitrilu jako extrakčního činidla

Při použití acetonitrilu se ukázalo, že odezva všech šesti sledovaných N-nitrosaminů byla podobně intenzivní, avšak v porovnání s ostatními testovanými rozpouštědly byla o poznání menší. U ethylesteru kyseliny octové byly odezvy N-nitrosaminů větší. Ethylester měl nejvyšší odezvu pro N-nitrosamin NDBA ze všech použitých rozpouštědel. Jako nejlepší

rozpouštědlo se ukázalo použitím 50% acetonitrilu, ten měl nejvyšší odezvu pro tři ze šesti zkoumaných N-nitrosaminů. Jedná se o N-nitrosaminy NMEA, NDEA a NPIP. Proto byl 50% acetonitril zvolen pro extrakci N-nitrosaminů z reálných vzorků.

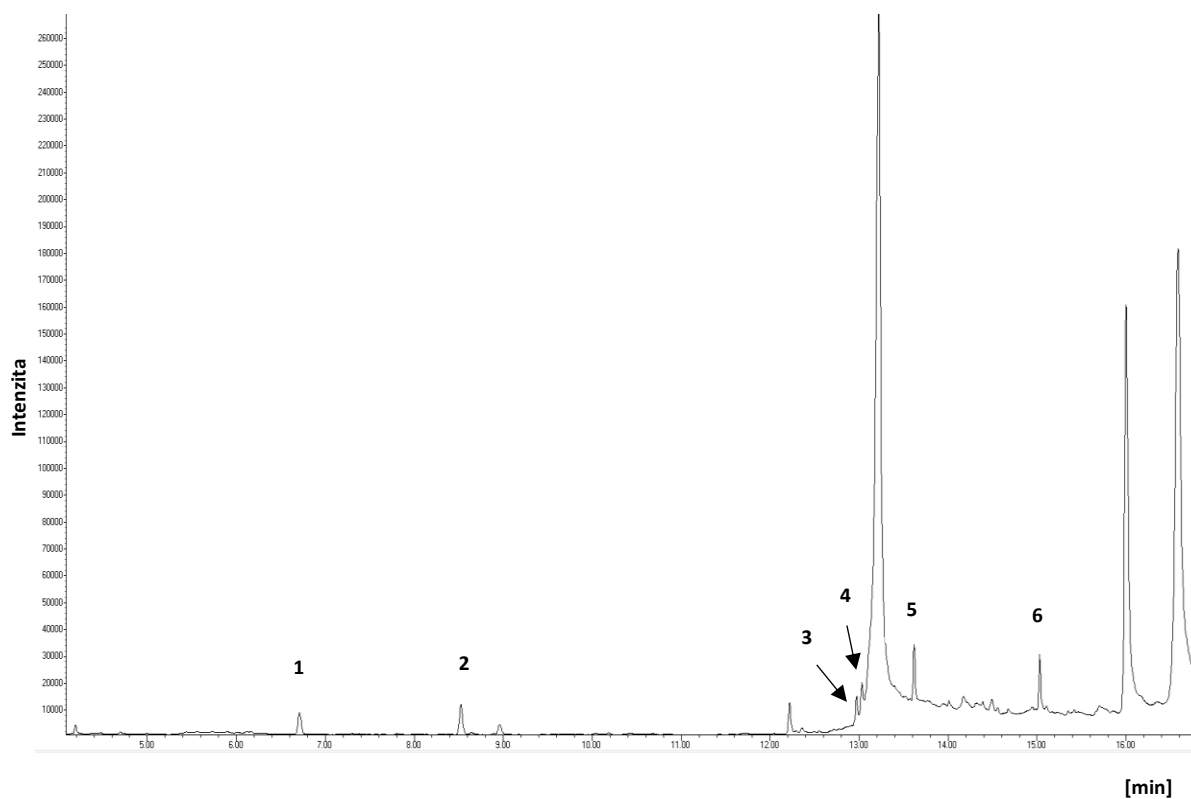
Jak ukazují Obr. 19-21, množství použitých solí způsobilo různou výtěžnost pro všechna tři zkoumaná rozpouštědla. U acetonitrilu měl největší výtěžnost použití 1 g solí, a to u pěti ze šesti zkoumaných N-nitrosaminů. To samé platí i pro použití ethylesteru kyseliny octové jako rozpouštědla. V tomto případě je ale výtěžnost nejvyšší pouze u tří z šesti N-nitrosaminů. Při použití 50 % acetonitrilu, dojde k velkému nárůstu výtěžnosti pro N-nitrosaminy NMEA a NDEA při použití 0,5 g solí. Jelikož byl 50% acetonitril vyhodnocen jako nejlepší rozpouštědlo pro analýzu N-nitrosaminů, bylo v kombinaci s tímto zjištěním rozhodnuto použít 0,5 g solí jako optimální množství i při analýze vzorků. Dalším důvod, který vedl k tomuto rozhodnutí, je nižší spotřeba solí.

Posledním zkoumaným parametrem byla vhodnost použití vortexového mixéru nebo ultrazvuku při zpracování směsi se standardy a solemi. Centrifugační zkumavka byla vortexována i ponechána v ultrazvuku stejnou dobu, konkrétně 3 minuty. U acetonitrilu se ve všech případech ukázalo jako výhodnější, provádět úpravu směsi pomocí vortexového mixéru. Bylo dosaženo větší výtěžnosti u všech ze šesti zkoumaných N-nitrosaminů. Rozdíl výtěžnosti při použití vortexu a ultrazvuku se lišil u všech použitých rozpouštědel. Nejmenší rozdíl byl zjištěn u ethylesteru kyseliny octové, kdy se použití ultrazvuku téměř vyrovnalo použití vortexového mixéru ve třech případech. U N-nitrosaminu NPIP byla výtěžnost dokonce největší. U 50% acetonitrilu se objevily N-nitrosaminy, u kterých použití ultrazvuku předčilo vortexový mixér, ale kvůli vysoké výtěžnosti N-nitrosaminů NMEA a NDEA u vortexového mixéru, bylo vyhodnoceno, že pro nejvhodnější rozpouštědlo, tedy 50% acetonitril, bude v dalším postupu a analýze vzorků použit vortexový mixér.

Nejlepší podmínky pro extrakci nitrosoaminů ze vzorku metodou QuEChERS byly stanoveny následovně. Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl zvolen 50% acetonitril. Výtěžnost při jeho použití byla nejvyšší ze všech zkoumaných rozpouštědel. 0,5 g soli bylo vybráno jako optimální množství, zejména kvůli vysoké odezvě u N-nitrosaminů NMEA a NDEA. Jako lepší varianta se ukázalo použití vortexového mixéru, který dosahoval vyšší výtěžnosti ve většině případů. Tyto podmínky byly následně aplikovány při analýze vzorků.

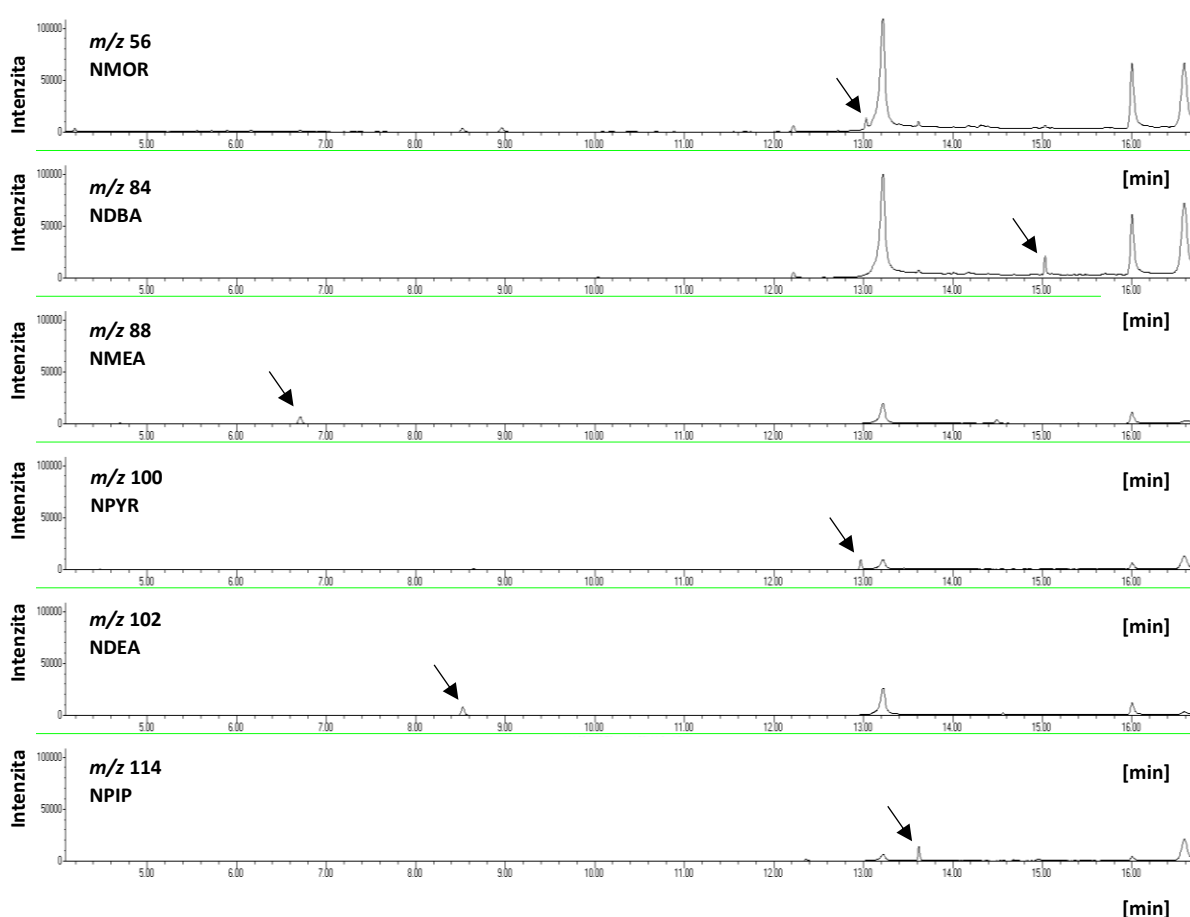
3.5 Aplikace metody QuEChERS na přípravu vzorků

N-nitrosaminy byly analyzovány ve stejných vzorcích, jako u metody SPME. Postup přípravy a zpracování vzorku je popsán v kapitole 2.4.3. Vzorky byly analyzovány za stejných chromatografických podmínek jako směs standardů. Na Obr. 22 je možné vidět záznam vybraného vzorku lososa se standardním přídatkem, vyhodnoceného v režimu TIC a na Obr. 23 v režimu SIM.



Obrázek 22: TIC chromatogram spikovaného vzorku lososa připraveného metodou QuEChERS
1-NMEA, 2-NDEA, 3-NPYR, 4-NMOR, 5-NPIP, 6-NDBA

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C



Obrázek 23: SIM chromatogramy spikovaného vzorku lososa připraveného metodou QuEChERS

Chromatografické podmínky: kolona SLBTM (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr 3:1, teplota nástřiku: 220 °C, teplotní program: 70 – 220 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C

Analýza ukázala, že ve všech zkoumaných vzorcích připravených metodou QuEChERS nebyly N-nitrosaminy prokázány. Mezi čtvrtým a pátým píkem N-nitrosaminů NMOR a NPIP se objevil výrazný pík, který knihovna spekter NIST identifikovala jako cyklopentanon. Na TIC záznamu tento pík svojí velikostí lehce zakrývá N-nitrosamin NMOR, ale v použití režimu SIM se již tento pík u N-nitrosaminu NMOR neobjeoval.

Relativní směrodatná odchylka se pohybuje v rozmezí od 1 do 10 %. Největší hodnotu má směrodatná odchylka u N-nitrosaminu NDBA, a to 10,1 %. U všech ostatních N-nitrosaminů je hodnota směrodatné odchylky mnohem menší. Pro N-nitrosaminy NMEA, NDEA a NPIP má hodnotu 1,2-1,6 % a pro NPYR a NMOR 2,4 a 2,8 %. Příprava vzorků N-nitrosaminů metodou QuEChERS se jeví jako lépe reprodukovatelná než metodou SPME.

4 Závěr

Cílem této práce bylo optimalizovat postup přípravy vzorků před analýzou N-nitrosaminů metodami SPME a QuEChERS a optimalizovat podmínky analýzy pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Po nalezení optimálních podmínek byly analyzovány čtyři vzorky, které by mohly potenciálně obsahovat N-nitrosaminy.

Při stanovení N-nitrosaminů byly nejprve optimalizovány chromatografické podmínky, konkrétně byl optimalizován teplotní program, splitovací poměr a dávkování. Nejlepší podmínky pro separaci a analýzu N-nitrosaminů jsou následující. Separace probíhala na kapilární koloně SLBTM – 5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fázi bylo helium s průtokem 1 ml/min. Teplota nástřiku byla 220 °C a dávkován byl objem 1 μl ve splitovacím poměru 3:1. Teplotní program se pohyboval od 70 do 220 °C a celková doba analýzy byla 17 minut. Teploty pro hmotnostní detektor byly nastaveny následovně: pro EI zdroj byla teplota 300 °C, pro převodník GC-MS 235 °C a pro kvadrupól 150 °C. Píky byly sledovány v rozsahu m/z 50–200.

U přípravy vzorků metodou SPME byly optimalizovány tyto parametry: vhodné sorpční vlákno, teplota a doba extrakce, objem nasyceného roztoku chloridu sodného. Nejlepší výtěžnost poskytovalo šedé vlákno se sorbentem DVB/CAR/PDMS. Optimální teplota sorpce byla 65 °C. Větší výtěžnosti bylo dosaženo při 30minutové extrakci a s přidavkem 200 μl nasyceného roztoku chloridu sodného. Při aplikaci tohoto postupu na vzorky potravin u nich nebyla zjištěna přítomnost N-nitrosaminů. Při zjišťování reprodukovatelnosti pomocí standardního přidavku se relativní směrodatná odchylka pohybovala mezi 1-25 %. Aplikace metody SPME pro stanovení N-nitrosaminů se tedy nejeví jako dobře reprodukovatelná.

Pro metodu QuEChERS bylo optimalizováno množství použitých solí, různé druhy rozpouštědla a využití vortexového mixéru nebo ultrazvuku. Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl zvolen 50% acetonitril. Výtěžnost při jeho použití byla nejvyšší ze všech zkoumaných rozpouštědel. 0,5 g soli bylo vybráno jako optimální množství pro analýzu N-nitrosaminů, zejména kvůli vysoké odezvě N-nitrosaminů NMEA a NDEA. Jako lepší varianta se ukázalo použití vortexového mixéru, který dosahoval vyšší výtěžnosti ve většině případů. Aplikací tohoto postupu na reálné vzorky nebyla zjištěna přítomnost N-nitrosaminů. Relativní směrodatná odchylka této metody se pohybovala od 1 do 10 %. Příprava vzorků N-nitrosaminů metodou QuEChERS se tedy jeví jako lépe reprodukovatelná než metoda SPME.

Literatura

- [1] QIU, Y., CHEN, J.-H., YU, W., WANG, P., RONG, M., DENG, H., Contamination of Chinese salted fish with volatile N-nitrosamines as determined by QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 2017, 763-769
- [2] ANDRADE, R., REYES F. G. R., RATH, S., A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA, *Food Chemistry*, 2005, 173-179
- [3] DONG, H., GUO, X., XIAN, Y., LUO, H., WANG, B., WU, Y., A salting out-acetonitrile homogeneous extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of thirteen N-nitrosamines in skin care cosmetics, *Journal of Chromatography*, 2015, 82-88
- [4] Bezpečnost potravin, „Dusitany a dusičnany“, Ministerstvo zemědělství, Dostupné online z <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76479.aspx>
- [5] BAGHERI, H., REZAEI, M., SHIRZADMEHR, A., Composite of Cu metal nanoparticles-multiwall carbon nanotubes-reduced graphene oxide as novel and high performance platform of the electrochemical sensor for simultaneous determination of nitrite and nitrate, *Journal of hazardous materials*, 2017, 762-772
- [6] LEHOTAY, S. J., SAPOZHNIKOVA, Y., HAN, L., JOHNSTON, J. J., Analysis of Nitrosamines in Cooked Bacon by QuEChERS Sample Preparation and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with Backflushing, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63, 10341-10351
- [7] HECHT, S. Biochemistry, Biology, and Carcinogenicity of Tobacco-Specific N-Nitrosamines. *Chemical Research in Toxicology*. 1998,11(6): 559–603
- [8] WORLD HEALTH ORGANISATION. N-Nitrosodimethylamine. 2002, Geneva, World Health Organization. *International Programme on Chemical Safety* (Concise International Chemical Assessment Document No. 38).--- WORLD HEALTH ORGANISATION. N-Nitrosodimethylamine in drinking-water. 2008, Background document for preparation of *WHO Guidelines for drinking-water quality*. Geneva, World Health Organization
- [9] PUBCHEM, N-Nitrosodiethylamine. *National Center for Biotechnology Information*. 2021, Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodiphenylamine>
- [10] OGBEDE, J.U., GIAEVER, G., NISLOW, C. A genome-wide portrait of pervasive drug contaminants. *Science Reports* 2021, 11, 12487. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91792-1>
- [11] WOLF, D. Staub - Reinhalt. *Luft* 1989, 49(6), 183-186
- [12] WORLD HEALTH ORGANISATION, Monographs on the Evaluation of Risk to Humans, *List of Classifications*, IARC International Agency for Research on Cancer. 2016, 1-115.
- [13] WORKS OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. N-Nitrosopyrrolidine. *14th Report on Carcinogens*. 2016, 396-397, Dostupné z <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0116Z2V2/14th-report-carcinogens/n-nitrosopyrrolidine>

- [14] WORKS OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. N-Nitrosomorpholine. *14th Report on Carcinogens*. 2016, 392-393 Dostupné z <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0116Z2S5/14th-report-carcinogens/n-nitrosomorpholine>
- [15] WORKS OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, N-Nitroso-N-ethylurea. *14th Report on Carcinogens*, 2016, 372-373. Dostupné z <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0116Z2OV/14th-report-carcinogens/n-nitroso-n-ethylurea>
- [16] WORKS OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. N-Nitrosodi-n-butylamine. *14th Report on Carcinogens* 2016, 377-378. Dostupné z <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0116Z2J4/14th-report-carcinogens/n-nitrosodi-n-butylamine>
- [17] WORKS OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. N-Nitrososarcosine. *14th Report on Carcinogens*, 2016, 397-398 Dostupné z <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0116Z2W6/14th-report-carcinogens/n-nitrososarcosine>
- [18] Bezpečnost potravin, „N-nitrosaminy“, Ministerstvo zemědělství dostupné z <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76678.aspx>
- [19] Bezpečnost potravin, „Dusitany v českých uzeninách“, Ministerstvo zemědělství dostupné z <https://www.bezpecnostpotravin.cz/dusitany-v-ceskych-uzeninach.aspx>
- [20] SIGMA-ALDRICH. Mikroextrakce na tuhou fázi SPME. 1998. [Citace: 10. 3 2022.] Dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf>].
- [21] GREBEL, J.E., YOUNG, C. C., SUFFET, I. H., Solid-phase microextraction of N-nitrosamines, *Journal of Chromatography*. 2006, 11-18
- [22] SPIETELUN, A.; PILARCZYK, M.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*. 2010, 39 (11): 4524–37.
- [23] MITRA, S., Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. *Wiley-Interscience*. 2003, 113
- [24] VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, 39 (3): 233–254.
- [25] SPIETELUN, A.; PILARCZYK, M.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*. 2010, 39 (11): 4524–37
- [26] SPIETELUN, A.; PILARCZYK, M.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. Understanding Solid-Phase Microextraction: Key Factors Influencing the Extraction Process and Trends in Improving the Technique. *Chemical Reviews*. 2012, 113 (3): 1667–1685
- [27] REYES-GARCÉS. N.; GINFRIDDO, E.; GÓMEZ-RÍOZ, G. A.; ALAM, N.; BOYACI, E.; BOJKO, B.; SINGH, V.; GRANDY, J.; PAWLISZYN, J., Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions, *National library of medicine*, 2017, 12-14
- [28] KUMAR, A.; GAURAY, M., ASHOK, K.; TEWARY, D. K.; SINGH, B. A review on development of solid phase microextraction fibers by sol–gel methods and their applications". *Analytica Chimica Acta*. 2008, 610 (1): 1–14.

- [29] WARDENSKI, W.; MICHULEC, M.; CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 2004, 39 (7): 703–717
- [30] KATAOKA, H., LORD, H.L. a PAWLISZIN, J. Application of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, 880, 35-62.
- [31] PROCHÁZKOVÁ, D. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení analytu. *Chemické listy*. 2002. 96, 829-833
- [32] TORRES, PADRÓN, M.E., SOSA, FERRERA, Z. a SANTANA, RODRÍGUEZ, J.J. Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC-UV for the determination of organochlorine pesticides and their metabolites in environmental liquid samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, 386, 332-340
- [33] SEMENOV, S. N., KOZIEL, J.A. a PAWLISZIN, J. Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *Journal of Chromatography A*. 2000, 873, 39-51
- [34] SUN, C., WANG, R., WANG, T., LI, Q., Primary evaluation of nine volatile N-nitrosamines in raw red meat from Tianjin, China, by HS-SPME-GC–MS, *Food chemistry* 310, 2020
- [35] VENTANAS, S., RUIZ, J., On-site analysis of volatile nitrosamines in food model systems by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device, *Science direct*, 2006, 1017-1023
- [36] BROSZAT, M., WELLE, C., ERNST, H., WOJNOWSKI M., SPANGENBERG, B., A versatile method for quantification of aflatoxins and ochratoxin A in dried figs, *Journal of planar chromatography*, 2010,
- [37] ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *National library of medicine*, 2003 86(2), 412-31
- [38] BARKER, S. A., Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis, *Journal of Chromatography*, 2000, 880(1-2) 63-68.
- [39] BARKERS, S. A., Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography*, 2000, 60-70.
- [40] JEONG, I. S., KWAB B.M., AHN, J. H., JEONG, S. H., Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology, *Food Chemistry*, 2012, doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.004
- [41] ANASTASSIADES, M., SCHERBAUM, E., TASDELEN, B., STAJNBAHER, D., 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis, *Pesticide Chemistry*, 2007.
- [42] LEE, J.M., PARK, J.W., JANG, G.C., HWANG, K. J., Comparative study of pesticide multi-residue extraction in tobacco for gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 2008
- [43] LUCCI, P., PACETTI, D., NÚÑEZ, O., FREGA, N. G. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Most Versatile Method of Chemical Analysis*. 2012, 127-164, Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>

- [44] WILKOWSKA, A. a BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 2011, 125(3), 803–812
- [45] NORLI, H. R., CHRISTIANSEN, A., DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 2011, 1218(44), 7234-7241.
- [46] KOWALSKI, J. a COCHRAN, J. QuEChERS: Beyond the Basics. *Separation Science*, 2017, 8-22. Dostupné z: <http://www.sepscience.com/Techniques/Sample-Prep/Articles/1863-/QuEChERS-Beyond-the-Basics>
- [47] DONG, H., LI, H., LIANG, M., LUO, D., LIU, G., ZENG, X., BAI, W., YANG, J., XIAN, Y., Rapid determination of nine N-nitrosamines in dry-cured mackerel (*Scomberomorus niphonius*) using salting out homogeneous phase extraction with acetonitrile followed by GC-MS/MS, *LWT- Food science and technology* 130, 2020
- [48] ZENG, X., BAI, W., XIAN, DONG, H., LUO, D., Application of QuEChers-based purification coupled with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of N-nitrosamines in soy sauce, *The royal society of chemistry*, 2016, 8, 5248-5258
- [49] Harvey, David. 2000. *Modern analytical chemistry*. 2.nd ed. Boston: Boston, Mass.: McGraw-Hill, 563-577
- [50] ZACHAŘ, P., SÝKORA, D., Plynová chromatografie [online]. VŠCHT Praha, 2008, 1-6 [cit. 2022-02-28].
- [51] JANDERA, P., Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [52] FRIDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20(41), 152-157.
- [53] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní analyzátoři. In: Michal Holčapek - Mass Spectrometry Group [online]. Univerzita Pardubice, 2017 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>].
- [54] HITES, R. SETTLE, F. Gas Chromatography Mass Spectrometry, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* [online], 1997, 609-626 [cit. 2022-02-28].
- [55] XIAN, Y., WU, Y., DONG, H., LIANG, M., WANG, B., WANG, L., BAI, W., ZENG, X., QIAN, M., ZHAO, X., Ice-bath assisted sodium hydroxide purification coupled with GC-MS/MS analysis for simultaneous quantification of ethyl carbamate and 12 N-nitrosoamines in yellow rice wine and beer, *Food chemistry* 300, 2019, 1-9
- [56] Obrázek 6, Dostupný z https://is.muni.cz/el/1411/podzim2018/KBOMII/um/MS_-_laboranti.pdf
- [57] Obrázek 7, Dostupný z <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2021/cislo-5/nenapadny-hrdina-20-stoleti.html#&gid=1&pid=1>
- [58] Obrázek 5, Dostupný z https://www.hgf.vsb.cz/export/sites/hgf/546/.content/galerie-souboru/Studijni-materialy/Navody_k_praktiku.pdf
- [59] POHANKA, M. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, 79(2), 60-63.