

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Dominika Vavrová

STANOVENÍ NETĚKAVÝCH N-NITROSAMINŮ VE SLADU

Determination of non-volatile N-nitrosamines in malt

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2016

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Tato práce ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Som si vedomá toho, že prípadné využitie výsledkov, získaných v tejto práci, mimo Univerzitu Karlovu v Prahe je možné len po písomnom súhlase tejto univerzity.

V Prahe dňa 20. mája 2016.

Abstrakt:

V rámci diplomovej práce bola vyvinutá a optimalizovaná metóda stanovenia N-nitrozoprolínu a N-nitrososarkosínu v slade plynovou chromatografiou s chemiluminiscenčným detektorom. Optimalizácia extrakčnej metódy bola uskutočnená pomocou metódy odezvových plôch. Na kvantifikáciu bola použitá metóda interného štandardu (N-nitrosopipekolová kyselina), v rámci ktorej bolo potrebné overiť vplyv matricových efektov. Tie boli potvrdené v mníchovskom a plzeňskom slade, preto bolo pre kvantifikáciu nutné zostrojiť matricovú kalibračnú krivku. Vyvinutá metóda bola aplikovaná na pšeničný, mníchovský a plzeňský slad. N-nitrozoprolín bol detekovaný len v mníchovských sladoch a v ostatných prípadoch bol pod limitom detekcie (LOD=4,0 µg/kg). N-nitrososarkosín bol vo všetkých prípadoch pod limitom detekcie (LOD=3,7 µg/kg). Matricová kalibračná krivka bola zostrojená pre experimentálny mníchovský slad, kde bola koncentrácia NPRO $13,2 \pm 2,9$ µg/kg.

Kľúčové slová:

Neprchavé N-nitrozamíny, N-nitrosoprolín, N-nitrososarkosín, N-nitrosopipekolová kyselina, slad, plynová chromatografia, chemiluminiscenční detector

Abstract:

The aim of diploma thesis has been development and optimization of method determination of N-nitrososarcosine and N-nitrosoproline in malt by gas chromatography with chemiluminiscence detector. Optimization of extraction method has been performed by response surface method. Quantification has been performed by internal standard method (N-nitrosopipecolic acid, in which matrix effects has been studied. These has been verified in münchen and pilsen malt, therefore matrix-matched calibration has been constructed. The developed method has been aplicated on wheat, münchen and pilsen malt. N-nitrosoproline was detected only in münchen malt and in other cases has been under limit of detection (LOD=4,0 µg/kg). N-nitrososarcosine was in all cases under limit of detection (LOD=3,7 µg/kg). The matrix-matched calibration has been constructed for experimental münchen malt with N-nitrosoproline concentration at $13,2 \pm 2,9$ µg/kg.

Key words

Non-volatile N-nitrosamines, N-nitrosoproline, N-nitrososarcosine, N-nitrosopipecolic acid, malt, gas chromatogramy, chemiluminiscence detector

Pod'akovanie

Rada by som touto cestou poďakovala všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomáhali pri spracovávaní tejto práce. Špeciálne poďakovanie patrí Mgr. Tomášovi Vrzalovi, za odborné vedenie, pomoc pri riešení danej problematiky a trpezlivosť. Ďakujem RNDr. Jane Olšovskej, PhD. a RNDr. Jane Sobotníkovéj, Ph.D. za pomoc a poskytnutie príležitosti vykonávať diplomovú prácu vo Výskumnom ústave pivovarskom a sladařskom v Prahe.

Súčasne by som rada poďakovala mojej rodine za podporu počas celého štúdia na vysokej škole.

Obsah

1 Úvod	9
1.1 N- Nitrozozlúčeniny	10
1.2 Fyzikálno-chemické vlastnosti N-nitrozamínov	10
1.2 Vznik N-nitrozamínov	14
1.2.1 Exogénne faktory ovplyvňujúce vznik N-nitrozamínov	14
1.2.2 Endogénne faktory ovplyvňujúce vznik N-nitrozamínov	15
1.3 Slad	17
1.3.1 Druhy sladov	18
1.4 Stanovenie N-nitrozamínov	19
1.4.1 Koncentrácia zdanlivých celkových N-nitrozozlúčenín (ATNC)	21
1.5 Metódy optimalizácie	22
1.5.1 Empirické modely	23
1.5.2 Druhy experimentálnych dizajnov	24
1.6 Kvantitatívne metódy plynovej chromatografie	27
2 Experimentálna časť	29
2.1 Použité chemikálie	29
2.2 Prístrojové vybavenie	29
2.3 Príprava roztokov	30
2.4 Úprava vzorky	30
2.5 Analýza GC-TEA	31
3 Výsledky a diskusia	32
3.1 Optimalizácia podmienok GC	32
3.2 Vývoj metódy	38
3.3 Optimalizácia extrakčného postupu	43
3.2.1 Voľba dizajnu	44
3.2.2 Vyhodnotenie optimalizácie	46
3.4 Matricové efekty	56
3.5 Analýza reálnych vzoriek sladu	60
4 Záver	63
5 Zoznam bibliografických citácií	64

Zoznam skratiek a symbolov

GC –plynová chromatografia
TEA – chemiluminiscenční detektor
NDMA – N- nitrozodimetylamín
NPRO – N-nitrozoprolín
NSAR – N-nitrososarkosín
ATNC –zdanlivé celkové N-nitrozo zlúčeniny
NDEA – N-nitrozodietylamín
NPIP – N-nitrozopiperidín
NMOR – N-nitrozomorfolín
NHPRO – N-nitrozohydroxyprolín
NPIC – N-nitrozopipekolová kyselina
NTCA – N-nitrozo tiazolidín-4-karboxylová kyselina
DMA – dimetylamín
ME – matricové efekty
MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria
HPLC – vysoko účinná kvapalinová chromatografia
LC – kapalinová chromatografia
SPE - extrakcia na tuhej fáze
LLE – extrakcia kvapalina-kvapalina
SPME – mikro extrakcia na tuhej fáze
MAE – mikrovlná extrakcia
APCI – chemická ionizácia za atmosferického tlaku
ESI – ionizácia elektrosprejom
BSTFA – bis(trimetylsilyl) trifluoroacetamid
LOD – limit detekcie
LOQ – limit kvantifikácie
OFAT – one factor at time
RSM – metóda odozvovej plochy
N – počet meraní
k – počet faktorov

c_p – centrálny bod

CCD – central composite design

α – vzdialenosť centrálného bodu od axiálnych bodov

DCM – dichlórmetán

EtAc -etylacetát

1 Úvod

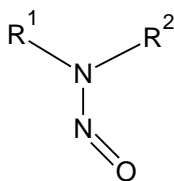
N- nitrozozlúčeniny, konkrétne N-nitrozamíny patria do skupiny látok, ktoré majú mutagénne a karcinogénne účinky [1]. Tieto účinky boli skúmané na laboratórnych zvieratách s tvrdením, že obdobné môžu byť aj u ľudí [2]. Výskyt N-nitrozamínov bol zaznamenaný v rôznych typoch potravín, najmä v konzervovanom a údenom mäse, vo vode [2], v alkoholických nápojoch napr. vo víne [3], v pive a vo whisky [2]. Do piva sa N-nitrozamíny môžu dostať rôznymi cestami, buď prostredníctvom pivovarských surovín [4] alebo bakteriálnou kontamináciou [2].

Stanovenie N-nitrozamínov závisí na ich fyzikálno-chemických vlastnostiach, podľa ktorých sa delia na prchavé a neprchavé látky. V súčasnosti je stanovenie obsahu prchavých N-nitrozamínov v potravinách a v pive (resp. v slade) rutinnou záležitosťou. Prevádza sa na základe vákuovej destilácie a následnej separácie a detekcie pomocou plynovej chromatografie (GC) v kombinácii s chemiluminiscenčným detektorom (TEA, z ang. thermal energy analyzer). Medzi hlavných zástupcov prchavých N-nitrozamínov patrí N-nitrozodimetylamín (NDMA). Druhou skupinou látok sú neprchavé N-nitrozamíny, ktorých najbežnejšími zástupcami sú N-nitroso aminokyseliny, konkrétne N-nitrozoprolín (NPRO) a N-nitrososarkozín (NSAR) [2]. Metódy na stanovenie NPRO, NSAR v pive a v slade, nie sú doposiaľ dostatočne vyvinuté na to, aby stanovenie týchto látok bolo rutinné, spoľahlivé a jednoduché. Keďže z pivovarských surovín najvyšší obsah N- nitrozamínov vykazuje slad [4] je vysoká pravdepodobnosť kontaminácie týchto látok aj v pive. Vzhľadom k vysokej konzumácii piva v Českej republike, kde na jedného človeka pripadá spotreba 144 l piva za rok [5], je potrebné vyvinúť analytickú metódu na stanovenie NPRO a NSAR v slade. V súčasnosti sa neprchavé N-nitrozamíny stanovujú spolu s prchavými ako koncentrácia zdanlivých celkových N-nitroso zlúčenín s označením ATNC (z ang. Apparent Total N-nitroso Compounds) [6].

Cieľom diplomovej práce je vývoj a optimalizácia analytickej metódy na stanovenie NPRO a NSAR v slade. V rámci vývoja analytickej metódy je potrebné vyvinúť extrakčný a čistiaci krok, a zistiť vplyv matricových efektov. Následne je potrebné optimalizovať podmienky merania GC-TEA. Poslednou fázou je aplikácia na reálne vzorky.

1.1 N- Nitrozolúčeniny

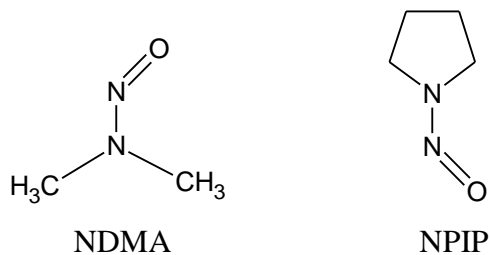
Nitrozolúčeniny patria do skupiny chemických zlúčenín, ktoré vo svojej molekule obsahujú atóm dusíka, na ktorý je kovalentne viazaná funkčná nitrózo skupina (-NO) a zároveň sú naň naviazané ďalšie organické substituenty (R_1 a R_2) napr. acyly [7], aromatické cykly alebo heterocykly [2]. Atóm dusíka môže byť nahradený atómom síry, uhlíka alebo kyslíka a na základe toho je vytvorená S-, C-, O- nitrozolúčenina. Najrozšírenejšou skupinou sú N-nitrozolúčeniny, ktoré vo všeobecnosti delíme na N-nitrozamíny (obr. 1.1) a N-nitrozamidy. Tieto látky sa prirodzene nevyskytujú ale ľahko sa vytvárajú. Konkrétnym príkladom sú N-nitrozamíny, ktorých vznik je podmienený prítomnosťou sekundárnych amínov alebo ich prekursorov v rôznych typoch matric (mäso, voda, slad). N-nitrozamíny môžu byť zdrojom karcinogenity [2] a experimentálne štúdiá poskytujú dôkazy o ich biologickej aktivite u ľudí [1]. Vzhľadom na tieto zistenie sú látky podrobne sledované. Celkovo sa N-nitrozamíny vyskytujú v matriciach v stopových množstvách a v súčasnosti sú detekované na úrovni parts per billion (ppb, $\mu\text{g}/\text{kg}$) [2].



Obr. 1.1.: Chemická štruktúra N-nitrozamínov [7]

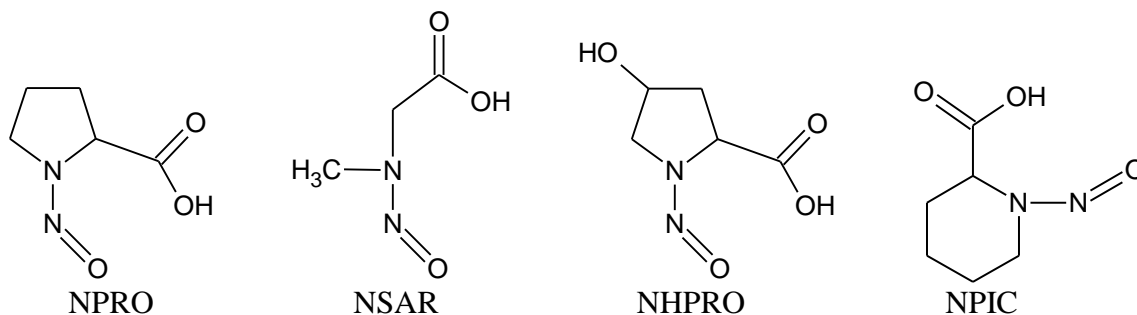
1.2 Fyzikálno-chemické vlastnosti N-nitrozamínov

N-nitrozamíny delíme na prchavé a neprchavé, a podľa toho, aký typ substituentu je naviazaný na atóme dusíka sa odvíjajú ich fyzikálno-chemické vlastnosti. Prchavé N-nitrozamíny majú na atóme dusíka naviazaní buď krátky uhlíkový reťazec (napr. N-nitrozodimetylamin –NDMA (obr.1.2), N- nitrozodietylamin – NDEA) alebo jednoduchý heterocyklus (napr. N-nitrozopiperidín – NPIP (obr.1.2), N-nitrozomorfolín- NMOR) [2]. Vo väčšine prípadov sú to žlté kryštalické látky, s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú prevažne rozpustné v polárnych organických rozpúšťadlách [8].



Obr. 1.2.: Chemická štruktúra N-nitrozodimethylamínu (NDMA) a N-nitrozopiperidínu (NPIP)

Typickými zástupcami neprchavých N-nitrozamínov sú N-nitrozoaminokyseliny, N-nitrozoprolín (NPRO), N-nitrososarkosín (NSAR), N-nitrozohydroxyprolín (NHPRO) a N-nitrozopipekolová kyselina (NPIC) (obr. 1.3) [2,9]. Veľkú časť zástupcov tvoria N-nitrozo heterocyklické karboxylové kyseliny, ktoré sú výsledkom kondenzácie aminokyselín (cysteín, serín, treonín, tryptofán) s jednoduchými aldehydmi (formaldehyd, acetaldehyd). Najfrekvencovanejšou reakciou, ktorá vedie k vzniku N-nitrozo heterocyklických karboxylových kyselín je kondenzácia cysteínu a formaldehydu, kde vzniká tiazolidín-4-karboxylová kyselina, ktorá sa môže nitrozovať na N-nitrozotiazolidín-4-karboxylovej kyseliny (NTCA) [2]. Okrem nich patria do tejto skupiny látky, ktoré sú substituované rôznymi hydroxylovými skupinami [2,9].



Obr. 1.3.: Chemická štruktúra N-nitrozoprolínu (NPRO), N-nitrososarkosínu (NSAR), N-nitrozohydroxyprolínu [2], N-nitrosopipekolovej kyseliny (NPIC)

N-nitrozoaminokyseliny, konkrétne NSAR, NPRO, NHPRO a NPIP sú bezfarebné kryštalické pevné látky, ktoré sú rozpustné vo vode a vo väčšine polárnych organických rozpúšťadiel [10]. Tieto látky sú citlivé na svetlo a v prítomnosti ultrafialového svetla sa

rozkladajú na príslušné oxidy dusíka alebo amíny (závisí od vlnovej dĺžky), preto je potrebné ich uchovávať v tme pri nízkych teplotách [7]. Základné predpovedané fyzikálno-chemické vlastnosti N-nitrozamínov (molekulová hmotnosť, hustota, teplota varu, tlak pár, pK_A) sú popísané v tabuľke 1.1.

Tab. 1.1: Základné fyzikálno-chemické vlastnosti vybraných N-nitrozamínov predpovedané v programe ACD/I-Lab v5.0.0184

analyt	NDMA	NSAR	NPRO	NHPRO	NPIC
fyzikálno-chemické parametre					
molekulová hmotnosť [g.mol ⁻¹]	74,08	118,09	144,13	160,13	158,15
hustota [g.cm ⁻³]	0,98 ± 0,1	1,35 ± 0,1	1,57 ± 0,1	1,79 ± 0,1	1,46 ± 0,1
teplota varu [°C]* ¹	152,00 ± 0,00	353,13 ± 25,00	391,69 ± 35,00	482,68 ± 45,00	390,68 ± 35,00
tlak pár [mm Hg]* ²	4,56	6,18.10 ⁻⁶	3,16.10 ⁻⁷	0,00	3,42.10 ⁻⁷
pK _A	-	2,8 ± 0,4	2,8 ± 0,4	2,6 ± 0,4* ³	2,8 ± 0,4

*¹teplota varu [°C], pri tlaku 760 mm Hg

*²tlak pár [mm Hg] pri teplote 25 °C

*³ uvedená hodnota je pre skupinu – COOH v molekule (pre hydroxylovú skupinu v molekule je pK_A 14,2 ± 0,8)

1.2 Vznik N-nitrozamínov

Na základe experimentov bolo potvrdené že N-nitrozamíny vznikajú v slade počas sladovacieho procesu. Systematické štúdiá potvrdzujú že obsah N-nitrozamínov v jačmeni a v zelenom slade je nízky a z pivovarských surovín najväčší obsah NDMA obsahuje slad. Vo všeobecnosti môže byť ich vznik podmienený dvomi skupinami faktorov. Prvou skupinou sú exogénne vplyvy, kam zaraďujeme typ použitého horáku a použitie priameho alebo nepriameho spaľovania. Druhou skupinou sú faktory endogénne kam zaraďujeme látky, ktoré môžu byť prekursorami N-nitrozamínov (napr. obsah prirodzených amínov) [4]. Priebeh reakcií závisí od koncentrácie reaktantov, pH prostredia, teploty, katalyzátorov/inhibítorov a konkurenčných reakcií [11,12].

1.2.1 Exogénne faktory ovplyvňujúce vznik N-nitrozamínov

N-nitrozamíny vznikajú v slade počas hvozdenia naklíčeného jačmeňa v sušiacom vzduchu reakciou nitrosačného činidla s príslušným amínom [12]. Oxidy dusíka (NO_x) sú formované v spaľovacích reakciách. Kyslík z oxidov dusíka je z prítomného vzduchu a zdrojom dusíka môže byť okolitý vzduch alebo dusíkaté zlúčeniny, ktoré sú obsiahnuté v palive. Dusík zo vzduchu sa podieľa na vzniku NO_x len za určitých podmienok, t.j. ak sú použité určité typy olejov a plyny paliva [13]. Kompozícia oxidov dusíka je rozmanitá a zahrňuje rôzne formy oxidačných stupňov dusíka, z ktorých sú niektoré viac a iné menej efektívnymi nitrosačnými činidlami, napr. oxid dusný, oxid dusnatý, oxid dusičnatý, oxid dusitý, oxid dusičitý [12,13]. Efektívnosť nitrosačných činidiel závisí od pH prostredia. Ak je pH v rozmedzí 2-5 tak sú prítomné tieto dve formy oxidov dusíka: oxid dusitý a oxid dusičitý. Pri pH =3 je prevládajúcou formou oxid dusitý a spôsobuje nitrosáciu sekundárnych amínov. V nízkom pH (menšie ako 2) je dominantným činidlom protonizovaná kyselina dusitá a nitrozuje slabé zásadité amíny a amidy. Medzi najúčinnšie nitrosačné činidlá patrí oxid dusitý a oxid dusičitý. [2]. Na druhej strane oxid dusný nespôsobuje priamo nitrosáciu a podobne je na tom aj oxid dusnatý, ktorý nepatrí medzi priame nitrosačné činidlá ale v kyslom roztoku (vo vode) môže reagovať s kyselinou dusitou a vytvárať efektívnejšie oxidy dusíka [12]. Povolené množstvo dusitanov v pitnej vode je 0,5 mg/l, z čoho vyplýva že tieto

hodnoty sú kontrolované a je potrebné ich minimalizovať. Vo všeobecnosti dusičnany predstavujú väčšie nebezpečenstvo, pretože ich povolený obsah v pitnej vode je až 50 mg/l a z pivovarských surovín môže byť ich zdrojom aj chmeľ [14]. Aby sa minimalizovala formácia N-nitrozamínov počas sladovacieho procesu je potrebné znížiť prítomnosť oxidov dusíka a to je možné prostredníctvom použitia horákom s nepriamo vytápanými hvozdami [13].

1.2.2 Endogénne faktory ovplyvňujúce vznik N-nitrozamínov

Počas klíčenia sladu sa na tvorbe N-nitrozamínov podieľajú najmä amíny a podľa štruktúry ich delíme na primárne, sekundárne a terciárne [2]. Z primárnych amínov N-nitrozamíny nevnikajú priamo ale môžu byť z nich v niektorých prípadoch formované cyklické nitrozamíny, napríklad lysín je aminokyselina, ktorá vo svojej molekule obsahuje dve amínové skupiny a v slede reakcii poskytuje nitrózopipekolovú kyselinu [12].

Zo sekundárnych a terciárnych amínov vznikajú N-nitrozamíny priamo. Princíp nitrosácie spočíva v prítomnosti dusitanového iónu, ktorý v kyslom prostredí poskytuje kyselinu dusitú, z ktorej vzniká oxid dusitý [2]. Priebeh reakcií je závislý najmä na pH prostredia (povrch sladu má pH ~ 5,6 [4]) a od hodnoty pK_A príslušného amínu [2,4]. Amíny, ktoré majú vysoké pK_A sa nachádzajú na povrchu sladu prevažne v nereaktívnej forme a len malá časť môže reagovať s nitrosacným činidlom [4]. Medzi hlavných zástupcov sekundárnych amínov zaraďujeme dimetylamín (DMA) ktorý sa vyskytuje v klíčiacom jačmeni. Je prekursorom pre vznik NDMA, ktorý patrí medzi najrozšírejšie vznikajúce N-nitrozamíny a optimálne pH pre jeho vznik je v rozsahu 3-4 [12]. Pre morfolín a piperidín je pH 3 a pre prolín je nižšie t.j. pH 2-2,5 [2]. Ďalším sekundárnym amínom je sarkosín (N-metyl glycín) z ktorého vzniká nitrosáciou neprchavý NSAR a jeho dekarboxyláciou vzniká NDMA. Vznik sarkosínu môže byť podmienený aj prítomnosťou kreatinínu v obilných semenách [12].

Terciárne amíny môžu poskytovať viac variácií produktov, vrátane sekundárnych amínov, karbonylových zlúčenín a oxidačných produktov [12]. Tieto amíny obsahujú tri alkylové skupiny a v mnohých prípadoch sa nedá jednoznačne predpovedať, ktorá z týchto troch alkylových skupín bude substituovaná N-NO skupinou [2]. Najznámejšími prekursorami N-nitrozamínov v slade sú hordenín a gramín (oba sú terciárne amíny) [12]. Gramín sa

vytvára z tryptofánu v klíčkoch a po nitrosácii produkuje NDMA. Hordenín sa vytvára počas klíčenia jačmeňa a je prítomný v jeho koreňoch [4]. Reakciou oxidov dusíka s hordenínom vzniká nitroso-nitrohordenín, ktorý sa v slede reakcií rozkladá na NDMA. Zaujímavosťou je že prekursor hordenínu, N-metyltiramín, sa vyskytuje v jačmeni len určité časové obdobie, približne 20 dní [12].

Protonizované terciárne amíny nie sú nitróvané ale kvartérne amíny môžu byť a výsledkom ich nitrosácie je oxid trimetylamínu, ktorý je zdrojom NDMA. V slade by sa trimetylamín mal nachádzať ale jeho prítomnosť nie je jednoznačne potvrdená [12]. V podstate z väčšiny prítomných sekundárnych a terciárnych amínov v slade, ktoré reagujú s oxidom dusitým alebo oxidom dusičitým môžu vznikáť N-nitrozamíny.

Existujú skupiny látok, ktoré sú schopné katalyzovať alebo inhibovať vznik N-nitrozamínov počas úpravy sladu. Medzi katalyzátory prednostne zaraďujeme nukleofilné anióny (jodidy, bromidy, chloridy, tiokyanatany), slabé kyseliny a niektoré karbonylové zlúčeniny. Výsledok katalýzy karbonylových zlúčenín závisí na ich štruktúre. Formaldehyd, chloral a benzaldehyd sú výbornými katalyzátormi sekundárnych amínov, zatiaľ čo acetón je inaktívny [2]. Zabrániť alebo potlačiť vznik N-nitrozamínov je možné pomocou inhibítorov. Významnými inhibítormi v slade sú fenoly. Princíp spočíva v konkurenčnej reakcii, kde fenoly reagujú s nitrosočnými činidlami (oxidmi dusíka) za vzniku nitrofenolu a nitrozofenolu. Súčasne vzniká oxid dusnatý a voda. Obdobne sa môžu správať aj iné zlúčeniny, ktoré majú aromatický alebo heterocyklický charakter a reakciami s oxidmi dusíka formujú nitrozlučeniny. Hordenín, ktorý je hlavným prekursorom NDMA v slade je vo svojej podstate fenol a za určitých podmienok môže byť inhibítorom. V kyslom prostredí má protonizovaný dusík, tým pádom je v menej aktívnej forme a pri reakcii s oxidmi dusíka nevzniká N-nitrozamín [12]. Medzi ďalšie inhibítory môžeme zaradiť síru, ktorá je produkovaná pri pražení sladu z použitých palív. Síra, resp. oxid síričitý zabraňuje vzniku N-nitrozamínov znižovaním aktivity oxidov dusíka. V podstate redukuje oxidy dusíka na oxid dusnatý, prípadne oxid dusný. Používanie sírenia ako formy, ktorá zabraňuje vzniku N-nitrozamínov, nie je bežne používaná, pretože nie je šetrná k životnému prostrediu a napríklad vo Veľkej Británii používanie horákov s vysokým obsahom síry nie je z legálnych dôvodov možné [13]. Kyselina askorbová môžu byť tiež použitá ako inhibítor v slade [12].

1.3 Slad

Slad patrí medzi vstupné suroviny na výrobu piva [4]. Základnou surovinou na výrobu sladu je jačmeň siaty - dvojradový (*Hordeum vulgare* L.) [11]. Výroba sladu má tri hlavné fázy: máčanie, klíčenie a hvozdenie [15]. Prvým procesom, ktorým jačmeň prechádza je čistenie, kde sa zbavuje prachu, rôznych prímiesi a nečistôt [11]. Za najdôležitejšiu časť výroby sladu sa považuje máčanie, ktoré je dôležité pre jeho budúcu kvalitu. Princíp máčania spočíva v dodaní vody, ktorá je strategickou surovinou pre klíčenie a priebeh metabolických a enzymatických dejov [15]. Ďalšou časťou sladovacieho procesu je klíčenie, ktorého podstatou je aktivácia a syntéza enzýmov. Jedná sa o biochemické a fyziologické deje, ktoré rozkladajú škrob a vysokomolekulárne bielkoviny na jednoduché látky [15]. Doba klíčenia sladu je približne päť až šesť dní a výsledkom týchto procesov je zelený slad [11]. Zelený slad prechádza do poslednej časti sladovacieho procesu, ktorým je hvozdenie. Uskutočňuje sa na hvozdoch, kde je zelený slad najprv predsušený pri teplote 60°C a následne dosušený pri teplotách 80-105 °C. Cieľom tohto procesu je zbaviť zrna vody a zastaviť proces klíčenia. Dôležité je to, aby vzniknuté enzýmy zostali zachované. Zároveň sa vytvára typ sladu, ktorý má svoje charakteristické vlastnosti – chuť, vôňu a farbu [15]. Proces hvozdenia trvá približne jeden až dva dni [11]. Po hvozdení je potrebné aby slad prešiel procesom odklíčovania, kde sa odstraňuje sladový kvet, ktoré je vhodným krmivom pre zvieratá [15]. Po absolvovaní týchto procesov je slad pripravený na ďalšie spracovanie v rámci výroby piva.

Zo zdravotného hľadiska je potrebná kontrola surovín, ktoré sa používajú na výrobu piva. Kontrolujú sa najmä zdraviu škodlivé látky a látky, ktoré môžu ovplyvniť senzorické vlastnosti piva (príkladom je dimetylsulfid, kovy) [11]. N-nitrozamíny v slade môžu vzniknúť behom sladovacieho procesu vo fáze hvozdenia [12]. Vysoké koncentrácie N-nitrozamínov vykazujú najmä slady, ktoré sú vyrobené na priamo vyhrievaných hvozdoch. V súčasnosti, so zlepšujúcou sa technológiou výroby sa uprednostňujú hvozdy s nepriamym ohrevom a tým sa koncentrácia týchto látok do istej miery znižuje [2].

1.3.1 Druhy sladov

V rámci sladovania je možné jednotlivé kroky (máčanie, klíčenie, hvozdenie) upraviť tak, že sa získajú rôzne typy sladov s charakteristickými vlastnosťami [11].

Rozlišujú sa tri základne kategórie sladov:

1. Svetlý slad plzeňského typu

Svetlý slad plzeňského typu sa vyznačuje nízkou farbou a používa sa na výrobu ležiakov a špeciálnych pív, ktoré sa odlišujú koncentráciou pôvodnej mladiny.

2. Mníchovský slad bavorského typu

Bavorský slad sa používa na výrobu tmavých pív a v porovnaní so svetlým sladom sa vyznačuje vyššou farbou a arómou. Jačmeň klíči dlhšiu dobu a pri hvozdení sa používajú vyššie teploty.

3. Špeciálne slady

Špeciálne slady sa používajú na výrobu piva súčasne so svetlými a tmavými sladmi a patria k nim: diastický, karamelový, farebný a pšeničný slad. Cieľom ich použitia je zvýraznenie určitých charakteristík (chuti, arómy, farby a trvanlivosti peny). Príkladom je farebný slad, ktorý sa používa na výrobu tmavých pív s cieľom zvýšiť intenzitu farby. Pšeničnému pivu je veľká pozornosť venovaná najmä v Belgicku a Nemecku. Niektoré typy sladov, konkrétne „nakuřovaný“, sa používajú na výrobu whisky a špeciálnych pív [11].

Vo všeobecnosti je obsah N-nitrozamínov vyšší v mníchovskom slade v porovnaní s plzeňským, pretože pri výrobe mníchovského sladu sa používajú vyššie teploty pri hvozdení, s čím môže súvisieť vyšší obsah oxidov dusíka v sušiacom vzduchu. Podľa výsledkov, získaných z Výskumného ústavu pivovarského a sladařského v Prahe, je najrozšírenejším zástupcom prchavých N-nitrozamínov NDMA a v ojedinelých prípadoch je to NDEA a NPIP. V posledných 15. rokoch celkovo obsah N-nitrozamínov v slade a v pive klesá. Obsah NDMA v pive je vo väčšine prípadov pod limitom stanoviteľnosti (LOQ) pri použitej analytickej metóde, ktorého hodnota činí 0,2 µg/kg. Pre slad je stredná hodnota nameraných koncentrácií NDMA pomerne ustálená tj. okolo 0,8 µg/kg [14].

1.4 Stanovenie N-nitrozamínov

Stanovenie N-nitrozamínov je celosvetovou problematikou posledných päťdesiat rokov. Vzhľadom na to, že sa tieto látky vyskytujú na koncentračnej úrovni ug/kg (ppb) je potrebné vyvinúť a aplikovať niekoľko čistiacich a extrakčných krokov a zvoliť také separačné a detekčné techniky aby sa minimalizoval vplyv ostatných interferentov a matricových efektov (ME). Analytika prchavých N-nitrozamínov v rôznych typoch matric je v súčasnosti dobre prepracovaná, na rozdiel od analytiky neprchavých N-nitrozamínov kde spôsoby stanovenia sú v niektorých matriciach stále nejasné a sú predmetom mnohých výskumov.

V minulosti sa na stanovenie N-nitrozamínov využívali kolorimetrické metódy založené na Griessovej reakcii. Jej princíp spočíval v chemickej denitrosácii nitrozamínu za vzniku oxidu dusíka, ktorý následne reagoval s aromatickým amínom. Vytvorená diazonióva soľ reagovala s ďalším aromatickým amínom za vzniku farbiva, ktoré bolo detegované spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 540 nm. Kolorimetrické stanovenia boli možné len na koncentračnej úrovni mg/kg (ppm) a vyššie, pretože pri nižších koncentráciách sa prejavoval vplyv matricových interferentov a kvantifikácia nebola možná [7]. Jednou z ďalších metód bolo elektrochemické stanovenie N-nitrozamínov, konkrétne determinácia NDMA v slade [16]. Negatívom tejto metódy bola nízka výťažnosť analytov a zložité extrakčné postupy s vysokým obsahom chlorovaných uhlíkov. V súčasnosti sa na stanovenie N-nitrozamínov využívajú prevažne separačné techniky plynovej a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), v kombinácii s rôznymi typmi detektorov. So separačnou technikou HPLC bol vyskúšaný chemiluminiscenčný detektor [17], fluorescenčný [18] a tandemový hmotnostný detektor [19]. Elektrochemický detektor bol zapojený s klasickou kvapalinovou chromatografiou (LC) [20]. Plynový chromatograf bol zapojený v kombinácii s chemiluminiscenčným detektorom [21,22], s plameňovo-ionizačným detektorom [23], detektorom elektrónového záchytu [22], hmotnostným [24] a tandemovo-hmotnostným detektorom (MS/MS) [25]. Medzi najpoužívanejší detektor je jednoznačne zaradený chemiluminiscenčný detektor, ktorý je v porovnaní s inými detektormi veľmi selektívny a citlivý na stanovenie N-nitrozamínov. Jeho princíp spočíva v rozštiepení väzby N-NO v pyrolyzátoru. Po rozštiepení väzby vzniknuté nitrosylové radikály putujú do reakčnej komôrky, kde reaguje s ozónom za vzniku oxidu dusičitého. Excitovaný oxid dusičitý vyžiari pri prechode do základného stavu kvantum energie v oblasti blízkej infračerveného spektra.

Následne je intenzita emitovaného kvanta meraná fotonásobičom a je priamo úmerné koncentrácii N-nitrozamínov. Pri hodnotách menších ako 600 nm alebo väčších ako 800 nm môžu prebiehať interferencie s inými látkami, príkladom je vznik oxidu uhličitého alebo etylénu v oblasti modrého spektra [26]. Napriek tomu že tento typ detektoru podáva kvalitné stanovenie N-nitrozamínov, momentálne je snaha o jeho nahradenie za praktickejši hmotnostný detektor, pretože náklady na jeho prevádzku sú vysoké [14].

Na čistiaci a extrakčný krok v analýze N-nitrozamínov boli aplikované rozmanité úpravy vzorky a ich postup závisí na typu matrice. Často používané techniky extrakcie na tuhej fáze (SPE) [19,27] a extrakcii kvapalina – kvapalina (LLE) [28,29] sú časovo náročné a vyžadujú pomerne veľké objemy organických rozpúšťadiel. Aby sa eliminovalo množstvo organických činidiel bol vyskúšaný postup na báze mikro extrakcii na tuhej fáze (SPME) [30]. Taktiež bola vyskúšaná technika mikrovlnnej extrakcie (MAE) v spojení s disperznou SPME [24].

Neprchavé N-nitrozamíny sa podarilo stanoviť zároveň aj s prchavými vo vzorke mäsových produktov. Vybraným rozpúšťadlom bol acetonitril s prídavkom kyseliny mravčej. Kyselina mravčia zvyšuje extrakčnú účinnosť N- nitrozoaminokyselín, špeciálne NSAR a NHPRO. Čistiacim krokom od zvyšnej časti matrice (napr. nepolárne látky – lipidy) bola LLE heptánom. Výsledkom týchto experimentov bola validácia metódy na determináciu prchavých aj neprchavých N-nitrozamínov v mäsových produktoch metódou LC-(APCI/ESI)MS/MS. Validácia nebola uplatnená na NHPRO, pretože v testoch bol vždy pod limitom detekcie [29].

Jedna z ďalších vyvinutých metód na stanovenie neprchavých N-nitrozamínov bola aplikovaná na slad, kde k rozomletému sladu bola pridaná kyselina sírová s obsahom kyseliny amidosulfánovej, ktorá zabraňovala vzniku N-nitrozamínov počas úpravy vzorky. Na odstránenie lipidov bol použitý hexán. Táto vzorka bola upravená LLE na kolonkách Preptube a extrakčným rozpúšťadlom bol etylacetát. Vzorka bola analyzovaná systémom GC-TEA a preto bola potrebná derivatizácia. Na derivatizáciu bol použitý fluorid boritý v metanole, ktorá bola zakončená prídavkom destilovanej vody a analyty boli vytrepané do dichlórmetánu [28]. Napriek tomu že táto metóda má vysokú výťažnosť jej spracovanie bolo časovo náročné. Druhým negatívom je použitie veľkých objemov organických rozpúšťadiel, čo je z hľadiska analytickej chémie nešetrné k životnému prostrediu. Ďalšie pokusy o systematické stanovenie N-nitrozoaminokyselín v slade boli uskutočnené pomocou extrakcie etylacetátom a separované a detegované systémom GC-TEA. Tieto postupy sa líšili

najmä v spôsobe derivatizácie, kde boli použité rôzne derivatizačné činidlá (diazometán [31], silylačné činidlá bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) [32]). Vo výsledku ani jedna z použitých metód sa v praxi na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie NPRO a NSAR v slade neuplatnila, pretože výťažnosť cieľových analytov bola nízka.

1.4.1 Koncentrácia zdanlivých celkových N-nitrozolúčenín (ATNC)

ATNC (Apparent Total N-nitroso Compound) je koncentrácia zdanlivých celkových N-nitrozolúčenín, ktorá zahŕňa aj neprchavé N-nitrozamíny. Zastúpenie jednotlivých zložiek nie je doposiaľ presne známe ale na základe predchádzajúcich štúdií je zrejmé že 90 % ATNC je tvorené neprchavými N-nitrozamínmi. Ich stanovenie je dôležité, pretože z neprchavých N-nitrozamínov môžu vznikáť prchavé N-nitrozamíny, ktoré sú považované za silnejšie a významnejšie karcinogény [11]. Príkladom je termická dekarboxylácia N-nitrososarkosínu a N-nitrozoprolínu za vzniku N-nitrozodimetylamínu a N-nitrozopyrrolidínu [31]. Vyšší obsah ATNC v pive môže poukazovať na zvýšenú mikrobiologickú kontamináciu počas pivovarského procesu [33].

ATNC vzniká pri výrobe piva a na jeho vzniku môžu mať podiel vstupujúce pivovarské suroviny (napr. slad) alebo prítomné baktérie [11]. Predchádzajúce výskumy indikujú že N-nitrozamíny môžu vznikáť počas praženia sladu a podmienky praženia (obsah oxidov dusíka, priame/nepriame spaľovanie) majú vplyv na obsah ATNC. Ak sa pri pražení sladu použije nepriame spaľovanie obsah ATNC v slade je nižší, v niektorých prípadoch až pod limitom detekcie (LOD) [6]. Tieto vplyvy je možné minimalizovať s vývojom technológie hvozdenia [13]. V prípade bakteriálnej kontaminácie je situácia horšia, pretože jej súčasťou môžu byť biogénne amíny, ktoré sú považované za prekursor N-nitrozamínov [33]. Na vzniku ATNC sa môžu podieľať prítomné baktérie počas rmutovania a kvasenia [11]. Tieto baktérie spôsobujú redukciu dusičnanov (prítomné vo vode alebo v chmele), na dusitany [34], ktoré vytvárajú v kyslom prostredí kyselinu dusitú a tá je zdrojom oxidov dusíka tzn. nitrosačných činidiel [12]. V tomto prípade, zamedziť zvýšenie obsahu ATNC v pive je možné niekoľkými spôsobmi. Jednou z možností je obmedziť prítomnosť dusičnanových iónov vo vode, čomu sa dá predísť úpravou vody pomocou ionexou alebo reveznej osmózy [11]. Pre stanovenie ATNC sa najčastejšie využíva metóda spočívajúca v štiepení väzby N-NO pomocou kyseliny bromovodíkovej v ľadovej kyseline octovej. Vzniknutý oxid dusnatý

(alebo nitrosylový radikál) je detegovaný chemiluminiscenčným detektorom TEA [9]. Doporučený obsah ATNC v pive je 20 µg/kg [34].

1.5 Metódy optimalizácie

Cieľom optimalizácie je nájsť vhodné podmienky pre daný systém tak, aby sa dosiahla čo najlepšia odozva [35]. Toto je možné pomocou dvoch stratégií t.j. jednorozmernej a viacrozmernej analýzy. Pod pojmom jednorozmerná analýza rozumieme metódu, ktorej princíp je založený na tom, že sa mení jeden faktor a ostatné zostávajú konštantné. Táto metóda sa nazýva one factor at a time (OFAT). Opakom OFAT je viacrozmerná analýza v ktorej sa menia všetky faktory simultánne, zároveň sa skúmajú interakcie medzi jednotlivými parametrami a po prípade aj nelineárny vzťah medzi jednotlivými parametrami a odozvami. Zo získanej odozvy a faktorov sa pomocou vytvorených koeficientov zostrojí matematický model, ktorý predpovedá správanie sa odoziev v systéme za rôznych experimentálnych podmienok. V súčasnosti má praktickejšie využitie viacrozmerná analýza a to z viacerých dôvodov. OFAT neskúma vplyv interakcií medzi jednotlivými parametrami a na začiatku optimalizácie nepozná presný počet experimentov, pretože každé ďalšie meranie sa odvíja od výsledku toho predchádzajúceho, z čoho vyplýva veľký počet meraní, ktoré súvisí s vyššími nákladmi na chemikálie, prevádzku a čas. Vo výsledku nedostaneme absolútne optimum ale len lokálne maximum, ktoré závisí na počiatočných experimentálnych podmienkach [35,36].

Pri aplikácii viacrozmernej analýzy na analytickú metódu musíme postupovať podľa jednotlivých krokov. Prvým krokom je výber faktorov a ich experimentálnych oblastí. Vo všeobecnosti, rozsahy ktoré sú zvolené pre každý faktor na začiatku experimentálneho dizajnu odpovedajú minimálnej a maximálnej hodnote na zvolenej úrovni. Tieto hodnoty sú zvolené na základe praktických možností daného systému a sú kódované číslami +1 a -1. V ďalšom kroku je potrebné zistiť do akej miery majú vybrané parametre a ich hodnoty vplyv na daný systém, či ich vplyv na odozvu je významný alebo nevýznamný. Na zistenie týchto informácií sa používajú experimentálne screeningové dizajny [36]. Po určení významných faktorov sa väčšinou aplikuje viacrozmerná analýza napr. metodológia odozvovej plochy (response surface methodology, RSM), ktorá je schopná určiť optimálne podmienky a príslušnú odozvu v rámci polynomickej rovnice [35,36]. Faktory, ktoré boli určené ako nevýznamné sú

nastavené na hodnotu, ktorá je pre ne v študovanom systéme najvýhodnejšia.

1.5.1 Empirické modely

V experimentálnych dizajnoch sa predpokladá že výsledok závisí na experimentálnych podmienkach, ktorý môžeme opísať ako funkciu. Funkcia $f(x)$ je aproximáciou polynomickej funkcie a popisuje vzťah medzi odozvou systému a experimentálnymi podmienkami. V rámci dvoch premenných x_1 a x_2 rozdeľujeme tri základné typy polynomickej funkcie.

Najjednoduchším modelom je lineárny model, ktorý popisuje lineárny vzťah medzi faktormi a experimentálnymi podmienkami a je daný rovnicou [37]:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \quad (1)$$

kde, b_0 úsek na osi y (intercept), b_1 je koeficient reprezentujúci efekt faktoru x_1 a b_2 je koeficient reprezentujúci efekt faktoru x_2 [37]:

Druhý prípad zahŕňa aj vplyv interakcií medzi faktormi:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{1,2}x_1x_2 \quad (2)$$

kde, $b_{1,2}$ je koeficient reprezentujúci interakciu medzi faktormi x_1 a x_2 [37].

Prvé dva modely sa používajú na screeningové testy a určenie robustnosti. Na určenie optima (maxima a minima) bol zavedený kvadratický model, ktorý zahŕňa aj nelineárny vzťah medzi odozvou a experimentálnymi podmienkami systému a jeho rovnica je nasledujúca:

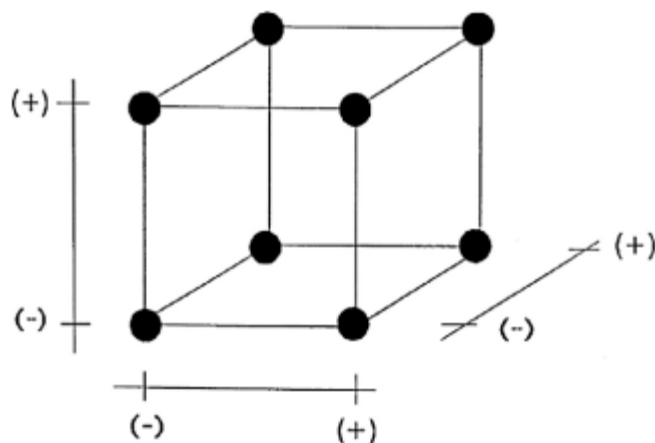
$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{12}x_2^2 + b_{1,2}x_1x_2 \quad (3)$$

kde, b_{11} a b_{22} sú koeficienty reprezentujúce kvadratickú interakciu medzi faktorom x_1 [37]:

1.5.2 Druhy experimentálnych dizajnov

Medzi základné experimentálne dizajny zaraďujeme faktorový dizajn, kompozitný, Box-Behnén, Doehlert a zmes dizajnov [38]. Výber dizajnu závisí od informácii aké sú požadované, od časovej a finančnej náročnosti. Dôležitými krokmi pri plánovaní experimentu je replikácia a randomizácia. Pod pojmom replikácia rozumieme opakovanie experimentov. Ak budú jednotlivé merania opakované je pravdepodobnosť získania menšej chyby a rozptylu, ktorý nám umožní predpokladať lepší odhad odozvy. Randomizácia znamená že poradie experimentov je náhodné a zabezpečuje vzájomnú nezávislosť medzi meraniami [39]

K najpoužívanejším experimentálnym technikám patrí dvojúrovňový faktorový dizajn, ktorý sa delí na plný a frakčný. Jeho podstata spočíva v naplánovaní 2^k experimentov, kde k je počet faktorov. Ak by sme mali tri faktory tak vo výsledku máme osem experimentov, ktoré sa graficky dajú znázorniť pomocou kocky (obr.1.4) a každý bod je znázornený v jej vrchole. V designe 2^3 vo výsledku dostaneme rovnicu, ktorá obsahuje definované konštanty, tri lineárne koeficienty, tri koeficienty pre interakcie medzi dvomi faktormi a jeden koeficient pre interakciu medzi tromi faktormi navzájom. V prípade že by sme mali viac premenných, dostali by sme hyperkocku, ktorej predstava je komplikovaná ale matematicky je tento model dobre popísaný [40].



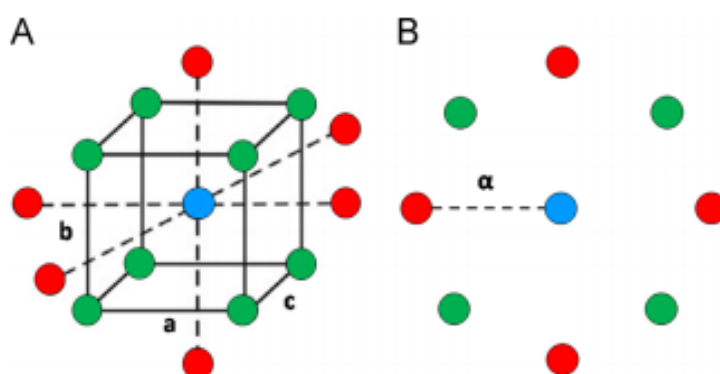
Obr.1.4.: Grafické znázornenie faktoriálneho designu 2^3 [40]

Frakčný faktorový dizajn je podnávrhom úplných dizajnov. Jeho cieľom je znížiť počet experimentov a uskutočniť len časť z úplného dizajnu, pretože ak máme vysoký počet

faktorov tak vo výsledku dostaneme veľký počet experimentov, z čoho opäť vyplývajú väčšie náklady na chemikálie, prevádzku a čas [39].

Medzi trojúrovňové faktorové dizajny zaradujeme Box-Behnen, central composite a Doehlert design. Box-Behnen experimentálny dizajn bol aplikovaný v rôznych chemicko-fyzikálnych procesoch ale jeho využívanie nie je rozsiahle. Všetky faktory sú študované na troch úrovniach (-1,0,+1) a intervaly medzi úrovňami sú rovnomerne rozložené. Počet meraní je $N = 2k(k-1) + c_p$, kde N je počet experimentov, k je počet premenných faktorov a c_p označuje počet replikácií centrálného bodu. Zaujímavým prípadom experimentálnych dizajnov je Doehlertov dizajn, ktorý umožňuje študovať jednotlivé faktory na rôznych úrovniach. Počet meraní, ktoré vyžaduje je $N = k^2 + k + c_p$. Spomenuté dva dizajny sa využívajú najmä na v chromatografii [35].

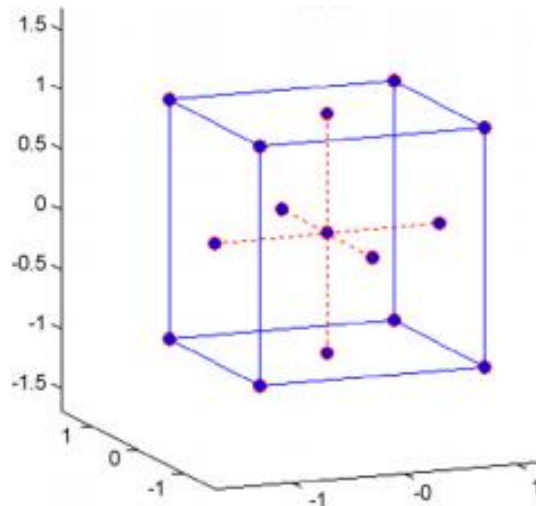
Central composite design (CCD) pozostáva troch hlavných zložiek (obr. 1.5) a jeho poradie merania experimentov má tri fázy [35,36].



Obr.1.5: Grafické znázornenie central composite design (CCD), zelené bodky znázorňujú faktoriálny design (plný alebo frakčný), červené bodky - axiálne alebo „star“ body, modrou farbou je označený centrálny bod [36]

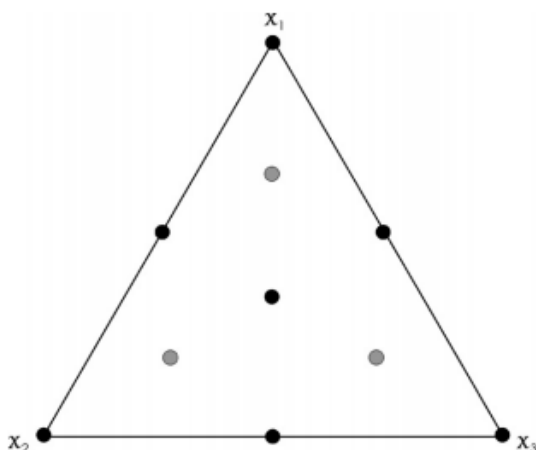
Najprv sa zmerajú experimenty z faktorového dizajnu (plného/frakčného) s naplánovanými 2^k meraniami. V ďalšej časti sú všetky experimenty merané v ich centrálnom bode. Poslednou sériou sú merania, ktoré sú nastavené v centrálnom bode okrem jedného, ktorý má hodnota α , resp. $-\alpha$, $+\alpha$ a nazývajú sa axiálnymi bodmi. Hodnota α je vzdialenosť axiálnych bodov od centra kocky a je závislá na počte premenných. Všetky faktory sú popísané v piatich úrovniach ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$). Počet meraní, ktoré je potrebné previesť je

$N = k^2 + 2k + c_p$ [35]. CCD umožňuje zo získanej rovnice odhadnúť konštanty, lineárne a kvadratické konštanty a interakcie medzi jednotlivými faktormi. Špeciálnym prípadom CCD je face centered design. Toto označenie je odvodené od faktu, že každá strana kocky obsahuje axiálny bod, ktorý je umiestnený v jej strede (obr. 1.6) [40].



Obr. 1.6: Grafické znázornenie face centered design s tromi premennými, vrcholy kocky obsahujú hodnoty pre faktoriálny design (plný, frakčný), v strede kocky je umiestnený centrálny bod, v strede každej strany je axiálny bod [40]

Podstata zmesi dizajnov je pomerne odlišná od ostatných. Jej zmysel spočíva v tom, že v zmesi nezáleží aká je hodnota jedného faktoru ale aký má tento faktor vzťah, resp. podiel k ostatným premenným. Vo výsledku súčet všetkých hodnôt parametrov je 1, resp. 100% [39]. Experimentálne návrhy môžu byť pre ľubovoľný počet faktorov. Jedným z typov zmesi dizajnov je simple centroid design s axiálnymi bodmi pre trojzložkovú zmes (obr. 1.7). Každý bod vo vrchole trojuholníka predstavuje čistú zložku alebo zmesi zložiek. Body v strede každej strany zobrazujú binárnu (1:1) zmes zložiek alebo zmes bodov susedných vrcholov. Bod v strede trojuholníka znázorňuje zmes troch čistých zložiek alebo zmesí, ktoré sú zastúpené vo vrcholoch. Zvyšné tri body sú axiálne [38].



Obr. 1.7: Simple centroid design s axiálnými bodmi pre trojzložkovú zmes [38]

1.6 Kvantitatívne metódy plynovej chromatografie

Látky separované plynovou chromatografiou sa kvantifikujú najčastejšie na základe jednotlivých plôch pík analytov vo výslednom chromatograme. Väčšina analytických stanovení je založená na metóde kalibračnej krivky, ktorá zobrazuje závislosť plochy píku od množstva resp. koncentrácie danej látky a nameraná závislosť by mala byť lineárna. Najčastejšími metódy na kvantifikáciu a zostrojenie odpovedajúcej kalibračnej krivky je metóda štandardného prídavku a metóda interného štandardu (ďalšími metódami sú metóda absolútnej kalibrácie, metóda vnútornej normalizácie) [41].

Princíp metódy štandardného prídavku spočíva v pridaní známeho množstva štandardu (identický s analytom) do vzorky. Štandardná látka je k vzorke pridaná na rôznych koncentračných úrovniach a na základe toho sa zostrojí príslušná priamka. Výsledná koncentrácia analytu v pôvodnom vzorku sa stanoví z regrenej rovnice, kde sa y-ová hodnota nastaví na nulu. Výhodou tejto metódy je kompenzácia ME vo vzorke [41].

Kvantifikácia prostredníctvom metódy vnútorného štandardu spočíva v pridaní známeho množstva vnútorného štandardu k analyzovanej látke. Následne sa vyhodnotia plochy analyzovanej látky a vnútorného štandardu, čím sa získa ich vzájomný pomer. Štandardná látka by mala byť svojou chemickou štruktúrou podobná analytu, nesmie s ním však interagovať a byť prítomná vo vzorke [41,42]. Táto metóda patrí medzi najpresnejšie kvantitatívne techniky, pretože je nezávislá na dávkovanom objeme. Medzi jej výhody patrí

kompensácia strát vzorky počas jej úpravy (extrakcia, čistenie vzorku, derivatizácia), pretože sa predpokladá že straty štandardu sú identické so stratami analytu [42].

Pri stopových analýzach môže byť získaná odozva plochy píku ovplyvnená maticou, v ktorej sa daný analyt nachádza. Vplyv ME je jedným z hlavných problémov v kvantitatívnej analýze, pretože ich významný účinok môže spôsobiť zmenu signálu vo forme falošne pozitívnych, resp. negatívnych výsledkov, zvýšenie LOD a zníženie robustnosti metódy. Vplyv ME vo vzorke je možné potvrdiť prostredníctvom nasledujúceho vzťahu:

$$ME = \left(\frac{B - D}{A} - 1 \right) \times 100 \quad (4)$$

kde, A je odozva analytu v čistom rozpúšťadle, B je odozva analytu vo vzorke s prídavkom štandardu, D je odozva pôvodného analytu vo vzorke [43].

Ideálne je ak sa $ME = 0$ [47] ale v praxi sa zvyčajne používa tolerovateľná hranica do 20%.

Veľkosť ME závisí aj na príslušnej separačnej metóde a konkrétne v plynovej chromatografii môže byť výsledna odozva ovplyvnená viacerými spôsobmi. Vo väčšine prípadov časti matrice súťažia s analytmi o prístup na aktívne miesto v lineri a tým zabraňujú retencii a termálnej degradácii analytov. V mnohých stanoveniach nie je možné úplne odstrániť vplyv ME ale určitými spôsobmi je im možné predísť [44]. Kompensácia ME je možná zostrojením matricovej kalibračnej krivky. Prvým krokom je porovnanie odozvy analytu v čistom rozpúšťadle s odozvou rovnakého množstva analytu v matici a vo výsledku môžu nastať tri situácie: (1) signál nemusí byť ovplyvňovaný množstvom analytu v matici (2) zmena signálu môže byť variabilná (3) kombinácia oboch predchádzajúcich typov [41]. Eliminovať vplyv matrice je možné zavedením čistiaceho kroku pred separáciou ale táto možnosť je časovo náročnejšia, zvyšuje možnosť straty analytov a ich kontamináciu. Jednou z ďalších možností je použitie inej injekčnej techniky (pulzovaný splitless, programovaný teplotný odparovač – PTV), ktorá môže znížiť vplyv matrice na odozvu systému. V prípade plynovej chromatografie je možná redukcia matricových efektov prostredníctvom prídania látky (do extraktu vzorky a zároveň aj do štandardných roztokov kalibračnej krivky), ktorá interaguje s aktívnymi miestami v lineri alebo na kolóne v GC [44].

2 Experimentálna časť

2.1 Použité chemikálie

N-nitrozoprolín, N-nitrozosarkosín, N-nitrozopipekolová kyselina (100 µg/ml v etanole, Isconlab, Heidelberg, Nemecko), n-hexán (≥ 99,5 %), dichlórmetán, (≥ 99,9 %), etylacetát (≥ 99%), butylacetát (≥ 99%), kyselina mravčia (≥ 98% všetko od Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko), etanol (≥ 96%), acetón (≥ 99%) a kyselina sírová (96%, všetko od Lachner, Neratovice, Česká Republika), kyselina sulfanilová (≥ 99%, Merck, Darmstadt, Nemecko), 10 % trifluorid boritý v metanole (Fluka, Steinheim, Nemecko), deionizovaná voda produkovaná Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), argón a kyslík (>99 % obe od firmy Messer, Praha, Česká republika). Použitými SPE kolónkami boli: Strata C18, 500 mg/6 ml (Phenomenex, Torrance, Kalifornia, USA), Supelclean Envi-carb 500 mg/6 ml (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemecko), Bond Elut SAX , 500 mg/3 ml a Bond Elut NH₂ LRC, 500 mg/10 ml (obe od firmy Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Na LLE bola použitá kolónka Extretut NT 20 (Merck, Darmstadt, Nemecko).

2.2 Prístrojové vybavenie

K všetkým analýzám bol použitý plynový chromatogram GC 8000^{TOP} s typom kolóny TR-WAX (30m, 0,32mm ID, hrúbka filmu stacionárnej fáze 1µm a s typ stacionárnej fáze polyetylénglykol, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Bola použitá predkolóna (0,530 mm x 1,5 m) a restriktor (0,25 mm x 1,5 m, obe od firmy Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Nosným plynom bol argón. Na detekciu bol použitý chemiluminescenčný detektor 800 Series TEA (Ellutia, Kassel, Germany).

Všetky vzorky boli rozomleté na mlynčeku MKM 6003 (Bosch, Gerlingen, Nemecko) a vážené na predvážkach (Sartorius Extend, Göttingen, Nemecko). Extrakcia vzorky v organickom rozpúšťadle sa uskutočnila pomocou trepačky KS 15 A (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Nemecko). Odparenie extrakčného rozpúšťadla a vody bolo prevedené na vákuovej rotačnej odparke G3 (Heidolph, Schwabach, Nemecko). K premiešaniu vodnej a organickej fázy bol použitý vortex Zx³ (Velp Scientifica, Usmate Velate, Taliansko). Vzorky boli derivatizované v sušiarňi typu WiseWen (Verkon, Praha, Česká republika). Na

extrakciu za zvýšenej teploty bol použitý extraktor na fluidným lôži KHS 1 (IKA, Staufen, Nemecko).

Výsledné chromatogramy boli spracované programom CSW 1.7. Na návrh experimentálneho dizajnu a na štatistické vyhodnotenie získaných dát bol použitý program Minitab 16.1 (Minitab, Inc., USA). Grafy a tabuľky boli spracované v programe Microsoft Office Excell 2007. Dáta boli štatisticky spracované na hladine významnosti 95 %.

2.3 Príprava roztokov

Použitý štandardné roztoky boli upravené nasledujúcim postupom: zmes 1 ml štandardného roztoku NSAR a NPRO v etanole ($c = 100 \mu\text{g/l}$) a 200 μl ($c = 100 \mu\text{g/l}$) interného štandardu NPIC bolo odparené do sucha pomocou vákuovej rotačnej odparky. Do rezidua bol pridaný 1 ml derivatizačného činidla t.j. 10 % trifluorid boritý v metanole a derivatizácia prebiehala 40 min pri teplote 65 °C. Derivatizácia bola ukončená prídavkom 4 ml deionizovanej vody. Vzniknuté metylestery N-nitrozoaminokyselín boli vytrepané do 1 ml dichlórmetánu (DCM).

Roztoky kalibračnej rady boli pripravené v koncentračnom rozsahu 0-100 $\mu\text{g/l}$ vhodným nariadením štandardného roztoku. Vnútorý štandard mal vo všetkých roztokoch rovnakú koncentráciu 100 $\mu\text{g/l}$.

2.4 Úprava vzorky

Jemne rozomletá vzorka sladu bola zmiešaná s kremelinou. K zmesi bol pridaný určitý objem vodného roztoku kyseliny sírovej s percentuálnym obsahom kyseliny sulfanilovej, ktorý pôsobil 15 minút. Po ukončení extrakcie bol do roztoku pridaný interný štandard. Následne bola zmes extrahovaná etylacetátom. Extrakt rozpúšťadla bol odparený na vákuovej rotačnej odparke s počiatočným tlakom 240 mbar, ktorý bol v priebehu odparovania znižovaný na 110 mbar pri teplote vodného kúpeľa 45 °C. Hodnoty ostatných parametrov boli optimalizované a sú uvedené v kapitole 3.3 Reziduum sa rozpustilo v 2 ml vody a prípadne nečistoty, nepolárne zvyšky a interferenty z matrice boli vyextrahované hexánom (1x20 ml, 1x10 ml). Extrakt vody bol následne odparený do sucha na vákuovej rotačnej odparke pri tlaku 37 mbar a teplote vodného kúpeľa bola 45 °C. Do upravenej vzorky bol pridaný 1ml

derivatizačného činidla BF_3 v MeOH a derivatizácia prebiehala 40 min pri teplote $65\text{ }^\circ\text{C}$. Derivatizácia bola ukončená prídavkom 4 ml deionizovanej vody a získané analyty boli vyextrahované do 1 ml DCM. Nasledovala analýza pomocou GC-TEA.

2.5 Analýza GC-TEA

Podmienky analýzy GC-TEA boli nastavené rovnako pre všetky vzorky s nasledujúcimi hodnotami: objem vzorky $8,9\ \mu\text{l}$ technikou splitless, doba splitlessu 60 s, teplota injektoru $250\text{ }^\circ\text{C}$ a konštantný prietok bol nastavený na 2 ml/min . Nosným plynom bol argón. Teplotný program pece bol nasledujúci: počiatočná teplota bola $35\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min izotermicky, nárast s gradientom $20\text{ }^\circ\text{C/min}$ na teplotu $210\text{ }^\circ\text{C}$, ktorá sa držala 3 min a opäť vzrástla s gradientom $20\text{ }^\circ\text{C/min}$ na teplotu $230\text{ }^\circ\text{C}$, kde bola držaná 3 min. Celkový čas analýzy bol $16,75\text{ min}$.

Teplota pyrolýznej pece chemiluminescenčného detektora bola nastavené na $500\text{ }^\circ\text{C}$ a prietok kyslíka $3,2\text{ ml/min}$. Chladienie reakčnej komôrky bolo približne $-17\text{ }^\circ\text{C}$ s tlakom v reakčnej komôrke približne $0,81\text{ torr}$. Tieto hodnoty sa udávajú ako približné, pretože závisia na vonkajších podmienkach.

3 Výsledky a diskusia

3.1 Optimalizácia podmienok GC

Cieľom optimalizácie podmienok GC bolo nájsť optimálne podmienky pre separáciu analytov (NPRO, NSAR) a interného štandardu (NPIC), pri ktorých dostaneme najväčšiu odozvu plôch píkov. Sledovanou odozvou bola plocha píkov analytov, v niektorých prípadoch (konkrétne pri optimalizácii konštantného prietoku a tlaku) sa pozorovala aj výška píkov, šírka píku v polovici jeho výšky a retenčný čas analytov.

Optimalizované boli nasledujúce parametre:

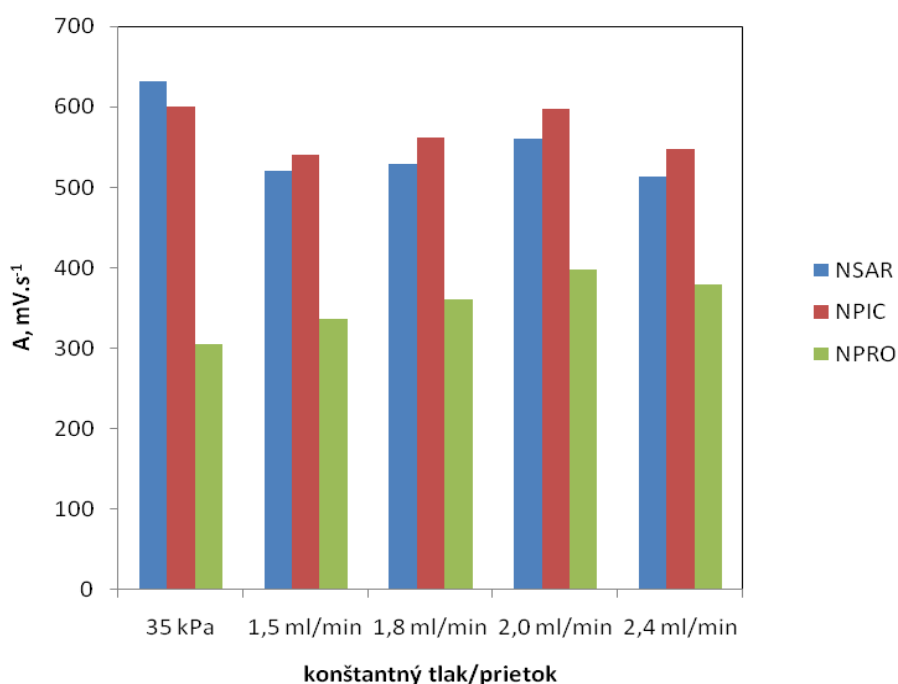
- Prietok mobilnej fázy
- Teplotný program
- Teplotu injektoru
- Doba splitlessu (doba nástreku)
- Dávkovaný objem

Vzorka použitá na optimalizáciu GC bol štandardný roztok NPRO a NSAR v etanole, s koncentráciou 100 ug/l. Interný štandard bola NPIC, s koncentráciou 100 ug/l (príprava a úprava vzorky – kapitola 2.3).

Prvým optimalizovaným parametrom bol prietok mobilnej fázy, ktorý musí byť zvolený tak, aby sa dosiahlo čo najlepšie rozdelenie látok na kolóne a najmenšie rozšírenie separovaných zón. Pre najlepšiu účinnosť separácie sa volí taká lineárna prietoková rýchlosť, pri ktorej získame najvyšší počet teoretických patier na kolóne. Hodnotu pre optimálnu prietokovú rýchlosť je možné zistiť z minima van Deemterovej krivky, ktorá vyjadruje závislosť výšky teoretických patier od lineárnej prietokovej rýchlosti a je charakteristická pre každý nosný plyn. Vzhľadom na použitý detektor (TEA), je táto hodnota pre argón veľmi nízka a dokonca v niektorých prípadoch ju nie je možné ani prakticky dosiahnuť. Preto bola zvolená najbližšia prakticky možná hodnota lineárnej prietokovej rýchlosti argónu, ktorú sme vypočítali pomocou kalkulátora (Hewlett-Packard FlowCalc 2.0).

V plynovej chromatografii je možné zvoliť konštantný tlak alebo konštantný prietok

mobilnej fáze. Voľba, ktorá z týchto dvoch typov je výhodnejšia sa odvíja od typu použitého detektora. V našom prípade je použitý chemiluminiscenčný detektor, ktorý patrí do kategórie tzv. mass flow sensitive detektorov, pre tento typ sa uprednostňuje použitie konštantného prietoku než konštantného tlaku. V rámci optimalizácie GC boli aplikované a porovnané obe techniky. Pri konštantnom tlaku bol nastavená hodnota 35 kPa, ktorá bola zvolená na základe predchádzajúcich experimentov. Pri voľbe konštantného prietoku sa za pomoci kalkulátora vypočítala hodnota pre konštantný prietok, ktorá bola 1,8 ml/min. Od tejto hodnoty boli odvíjané ďalšie merania s nasledujúcimi hodnotami: 1,5; 1,8; 2,0 a 2,4 ml/min. Výsledky týchto meraní sú zosumarizované v obr. 3.1, odkiaľ je vidieť že najväčšie odozvy plôch pre NSAR a NPIC boli získané pri konštantnom tlaku 35 kPa a konštantnom prietoku 2 ml/min. Najväčšia plocha pre NPRO bola nameraná pri konštantnom prietoku 2 ml/min. Rozlíšenie všetkých píkovo bolo vyššie ako 3.



Obr. 3.1: Optimalizácia konštantného prietoku nosného plynu; RSD (NSAR) = 4,53 %, RSD (NPIC) = 4,50 %, RSD (NPRO) = 6,97 %

V nasledujúcej tabuľke 3.1 sú uvedené získané hodnoty pre tie podmienky pri ktorých sú plochy píkovo najväčšie, t.j. konštantný tlak 35 kPa a konštantný prietok 2 ml/min. Tu

môžeme pozorovať že nastavenie konštantného prietoku je výhodnejšie, pretože retenčné časy analytov sú kratšie, tzn. že aj celkový čas analýzy sa skrúti. Plochy a výšky píkov pre NSAR sú porovnateľné ale u NPIC a NPRO je vidieť rozdiel a v porovnaní s konštantným tlakom sú väčšie. Z hľadiska použitého detektora a získaných výsledkov je zvolený pre všetky analýzy konštantný prietok s hodnotou 2 ml/min.

Tab. 3.1: Získané parametre píkov pre zvolený konštantný tlak 35 kPa a konštantný prietok 2 ml/min – t_r [min] – retenčný čas, A [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$] – plocha píku, h [mV] – výška píku, $w_{0,5}$ [min] – šírka píku v polovici jeho výšky, ΣA_i [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$] – suma plôch píkov NSAR, NPIC, NPRO

podmienky a analyt		t_r min	A $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$	h mV	$w_{0,5}$ Min	ΣA_i $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$
35 kPa	NSAR	12,27	631,027	129,721	0,073	1536,749
	NPIC	16,96	600,705	79,863	0,113	
	NPRO	17,98	305,018	40,961	0,115	
2 ml/min	NSAR	11,07	559,656	122,380	0,068	1555,486
	NPIC	14,63	597,760	94,792	0,093	
	NPRO	15,30	398,071	60,540	0,098	

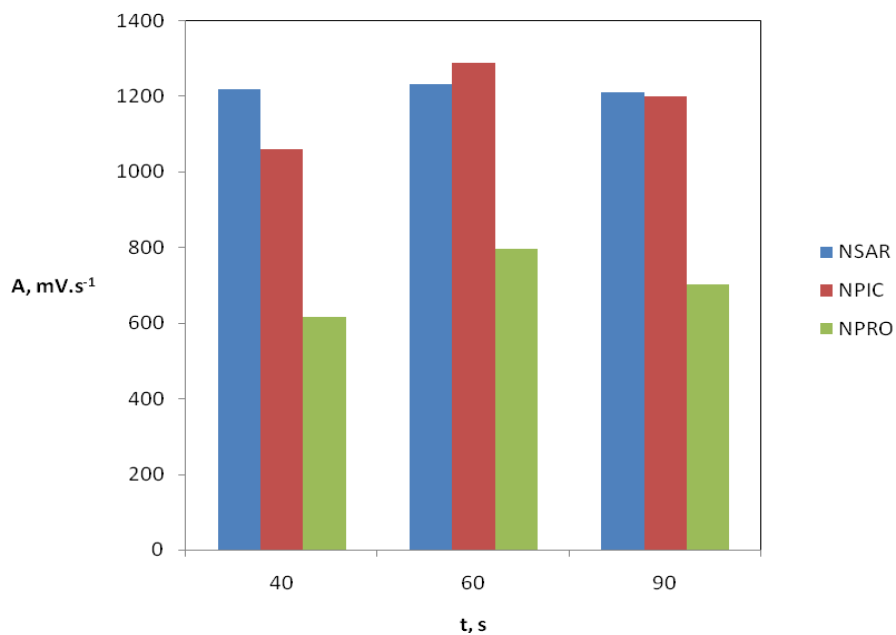
Druhým krokom bola optimalizácia teplotného programu. Prvotný teplotný program bol nastavený nasledovne: počiatková teplota bola 50 °C, 1 min izotermicky, nárast s gradientom 20 °C/min na teplotu 210 °C, držaná po dobu 3 min a opäť vzrástla s gradientom 20 °C/min na teplotu 230 °C, kde bola držaná 7 min. Vzhľadom na to, že vzorka je v dichlórmetáne, jeho teplota varu (39 °C) a typ nástreku (splitless) bolo nutné upraviť počiatkovú teplotu teplotného programu. Na získanie úzkej zóny vzorky na začiatku kolóny bolo potrebné zvoliť počiatkovú teplotu o 20-30 °C nižšiu ako je teplota kolóny. Konkrétne u dichlórmetánu bola táto teplota najprv nastavená na 30 °C, lenže plynový chromatograf nebolo možné na túto teplotu vychladiť. Najnižšia dosiahnuteľná teplota sa podarila nastaviť na 35 °C. Vo výsledku v podstate celý teplotný program zostal zachovaný až na počiatkovú teplotu a čas pri finálnej teplote 230 °C, ktorý bol skrútený o 2 min.

Pre optimalizáciu dávkovaného objemu, teploty injektora a doby splitlessu bolo pre každý parameter zvolených päť hodnôt a merania prebehli podľa tabuľky 3.2. Napriek tomu, že bolo naplánovaných 15 experimentov, nie všetky sa uskutočnili.

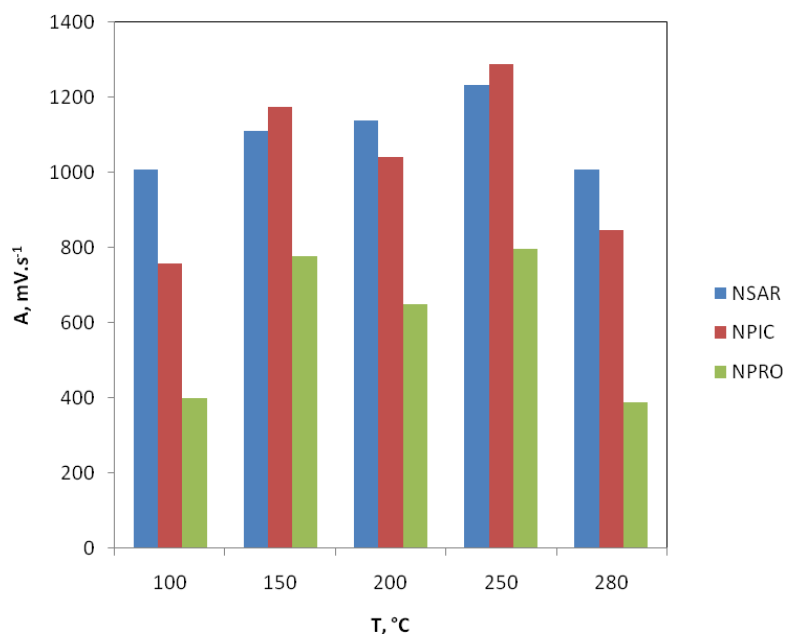
Tab.3.2: Poradie experimentov optimalizácie teploty injektora [°C], objemu nástreku [μ l], a doba splitlessu [s]

Experiment	teplota injektora °C	objem nástreku μ l	doba splitlessu s
1	100		
2	150		
3	200	10	60
4	250		
5	280		
6			
7		5	
8	250	8,9	60
9			
10			
11			20
12			40
13	250	8,9	60
14			90
15			120

Objem nástreku bol vypočítaný pomocou backflush kalkulátora (Hewlett-Packard FlowCalc 2.0) na základe najvyššej teploty injektora na hodnotu 10 μ l. Lenže pri jej aplikácii nastal problém v nemožnosti nadávkovať autosamplérom 10 μ l ale podarilo sa len 8,9 μ l. Napriek tomu, že je dávkovaný objem pomerne vysoký tak vo výsledku boli píky symetrické, vzhľadom na fakty použitia predkolóny a hrubej stacionárnej fázy. Pri menších objemoch boli píky malé, preto sa viac hodnôt neskúšalo a zvolil sa objem nástreku 8,9 μ l. Pre dobu splitlessu bolo vybraných päť hodnôt v rozpätí 20-120 s. Z týchto meraní sa vo výsledku uskutočnili len tri t.j. pre 40 s, 60 s a 90 s, pretože odozvy plôch píkov analytov pri 40 s a 90 s boli menšie ako pri 60 s (obr.3.2), preto sme predpokladali že táto tendencia bude pokračovať aj pri 20 s a 120 s. Pre dobu splitlessu bola optimalizovaná hodnota 60 s. Z obrázku 3.3 je zrejmé že najvyššie odozvy plôch analytov (NSAR, NPIC, NPRO) boli pri teplote injektora 250 °C.



Obr. 3.2: Optimalizácia doby spiltlessu; RSD (NSAR) = 2,36 %, RSD (NPIC) = 13,61 %, RSD (NPRO) = 15,91 %

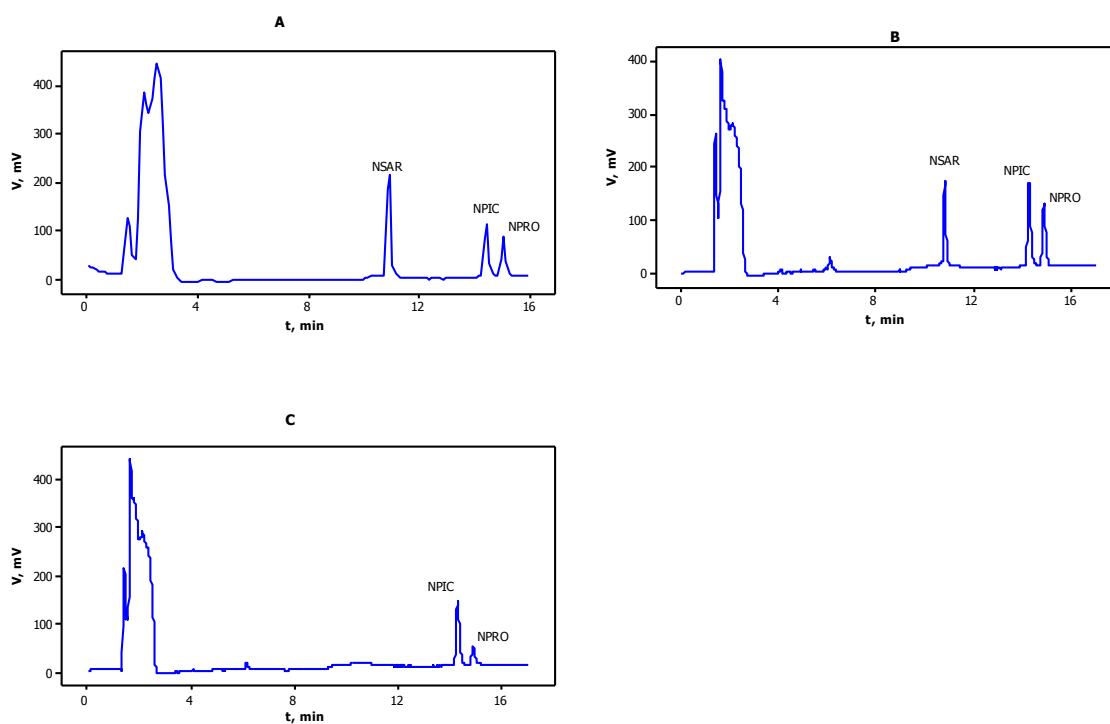


Obr. 3.3: Optimalizácia teploty injektoru; RSD (NSAR) = 4,53 %, RSD (NPIC) = 4,50 %, RSD (NPRO) = 6,97 %

Nájdené optimálne podmienky pre neprchavé N- nitrosamíny metódou GC-TEA:

- Konštantný prietok mobilnej fázy argónu 2 ml/min
- Teplotný program = 35 °C (1 min), 20 °C/min, 210 °C (3 min), 20 °C/min, 230 ° (5 min)
- Teplota injektoru = 250 °C
- Doba splitlessu = 60 s
- Dávkovaný objem = 8,9 µl

Na nasledujúcom obrázku 3.4 sú znázornené chromatogramy analytov NPRO, NSAR a interného štandardu NPIC.



Obr. 3.4: Chromatogramy analytov NPRO, NSAR a interného štandardu NPIC: A – odozvy analytov v čistom rozpúšťadle, B- odozvy analytov vo vzorke s prídavko štandardu, C – odozva pôvodného analytu vo vzorku.

3.2 Vývoj metódy

V rámci vývoja analytickej metódy na stanovenie NPRO a NSAR v slade bolo v prvom rade potrebné vyvinúť vhodný čistiaci a extrakčný krok. Tieto látky sa vyznačujú určitými charakteristickými vlastnosťami, napríklad patria medzi polárne látky dobre rozpustné v polárnych organických rozpúšťadlách, sú citlivé na svetlo a pri zvýšenej teplote dekarboxylujú na iné formy N-nitrozamínov. Vzhľadom na kombináciu ich vlastností bolo potrebné sa vyhnúť určitým typom čistiacich a extrakčných krokov (napr. extrakcia za zvýšenej teploty). Na základe predchádzajúcich výskumov sa predpokladá že obsah NPRO a NSAR v slade je na koncentračnej úrovni $\mu\text{g}/\text{kg}$ [2,4]. Behom vývoja a optimalizácie bol použitý experimentálny mníchovsky slad, ktorý bol pripravený s vyšším obsahom N-nitrozamínov. Počas rôznych foriem úpravy vzoriek bola derivatizácia (kapitola 2.4), separácia a detekcia zachovaná, tak ako je opísaná v kapitole 2.5.

Počiatky vývoja úpravy vzorky v slade vychádzali z publikovanej práce [6]. Z experimentálneho sladu bola pripravená kongresná sladina, ktorej čistiacim krokom bola LLE na kolónkach Extrelut NT 20, kde extrakčným činidlom bol butylacetát. Následne bola vzorka odparená na vákuovej rotačnej odparke a derivatizovaná. Po zhodnotení celej práce bol aplikovaný postup zdravý a boli použité veľké objemy organických rozpúšťadiel.

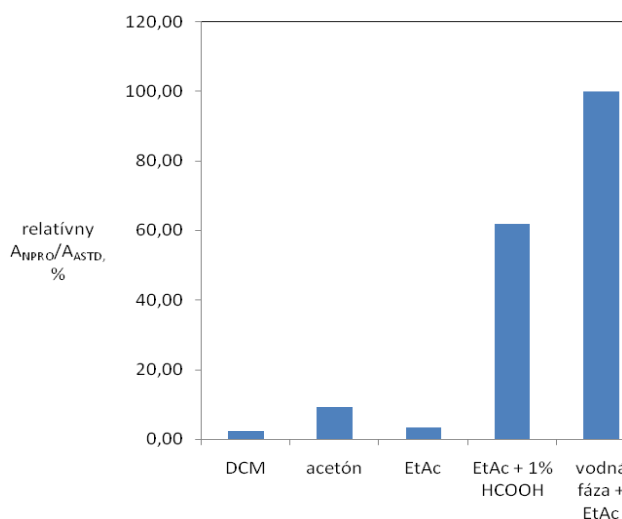
Redukcia objemu organických rozpúšťadiel bola možná prostredníctvom extrakcii na tuhej fáze (SPE). Pri tomto type extrakcie bolo nutné nájsť vhodný sorbent na ktorom by sa analyty sorbovali. Na tieto experimenty boli použité modelové roztoky zložené zo štandardných roztokov NPRO a NSAR v destilovanej vode (viď kapitola 2.3). Testovanými kolónkami bol silný a slabý aniónový menič, aktívne uhlie a oktadecilový siloxánový sorbent (C-18). Silný anionový menič obsahoval chloridové ióny ako protiionty. Problém tejto extrakcie spočíval v selektivite aniónov, pretože chloridový anión má väčšiu selektivitu voči ionomeniču v porovnaní s aniónom karboxylovej kyseliny, ktorý je obsiahnutý v analytoch. Pri aplikácii modelového roztoku, bolo nutné vymeniť chloridové ióny za hydroxylové ióny (menšia selektivita voči karboxylovému aniónu), lenže po ich výmene kolónka hydrolyzovala. Ďalším použitým sorbentom bolo aktívne uhlie, ktoré má dobrú schopnosť sorbovať polárne látky. Analyty (NPRO, NSAR) sa na sorbente sorbovali ale problém nastal v elučnom kroku, kedy sa ich nepodarilo vyeluovať z kolónky na 100 %. Na elúciu boli vyskúšané rôzne druhy

polárnych organických rozpúšťadiel: metanol, acetonitril, etylacetát (EtAc), ich vzájomné zmesi v rôznych pomeroch (metanol:acetonitril) aj ich kombinácie s organickými kyselinami (acetonitril+kyselina mravčia, metanol+ kyselina mravčia). Aktívne uhlie nebolo vo výsledku úspešné, pretože ak by bol na kolónku aplikovaný extrakt sladu, tak polárne časti matrice by sa sorbovali na aktívne miesta sorbentu a tým by zabraňovali naviazaniu cieľových analytov. Obdobný problém s matricou nastal pri použití kolónky so slabom anionovým meničom. Použitou kolónkou bola aj C-18 v ktorej sa NPRO a NSAR vôbec nezachytil. Napriek tomu, že SPE nebolo možné použiť ako extrakčný krok, mohlo by byť využité pri úprave vzorku ako čistiaci krok od nečistôt a interferentov.

Extrakcia pomocou SPE nebola vo výsledku úspešná, preto bol navrhnutý ďalší postup, spočívajúci v extrakcii sladu organickým rozpúšťadlom po dobu 24 hodín. Testovanými rozpúšťadlami boli metanol, etanol, dichlórmetán, acetón a roztok etylacetátu s rôznym percentuálnym zastúpením kyseliny mravčej (1 a 3 % objemu). Extrakt bol následne prefiltrovaný a odparený na vákuovej rotačnej odparke. Získané reziduum bolo rozpustené v deionizovanej vode. Vyextrahované zložky matrice boli zo vzorky odstránené extrakciou hexánom a voda bola následne odparená do sucha na vákuovej rotačnej odparke. Analyty vo vzorke boli derivatizované na ich príslušné metylestery. Vo výsledku metanol a etanol neboli vhodnými rozpúšťadlami na extrakciu analytov zo sladu, pretože pri čistiacom kroku vznikla medzi hexánom a vodou emulzia, vďaka ktorej nebolo možné pokračovať v ďalšej úprave vzorku. Výťažnosť extrakcie pre dichlórmetán, acetón a etylacetát bola nízka (obr. 3.1). Najväčšiu odozvu vykazovala extrakcia etylacetátu s 1% a 3% zastúpením kyseliny mravčej (obr. 3.1). Problém tohto postupu spočíval v účinkoch kyseliny mravčej, pretože pri jej vyššom percentuálnom zastúpení sa okrem cieľových analytov do nej vyextrahovali aj iné polárne časti matrice. Výsledná vzorka obsahovala množstvo koextrahovaných zložiek zo sladu a získané reziduum nebolo možné odpariť do sucha na vákuovej rotačnej odparke.

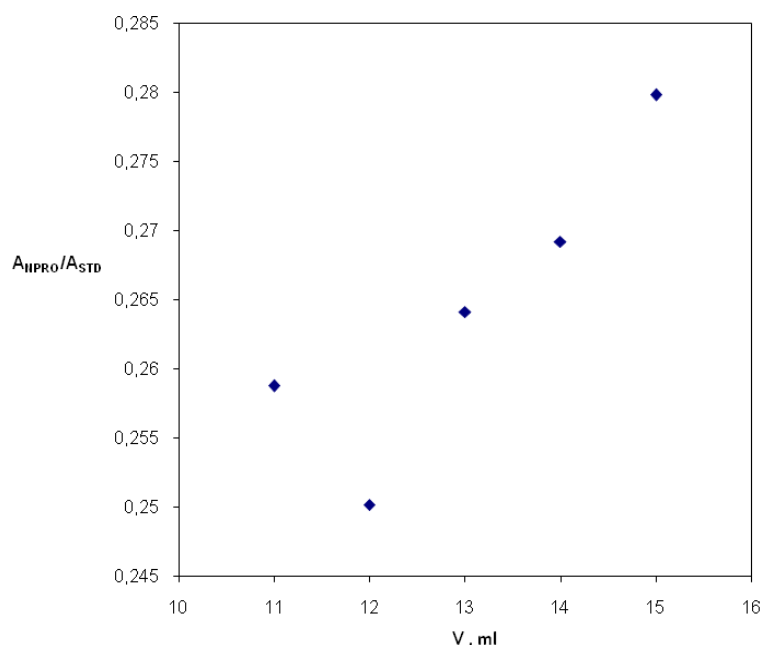
Jedným z ďalších navrhnutých postupov bola extrakcia s použitím extraktora na fluidným lôži. Vývoj tejto bol od počiatku diskutabilný, pretože bolo potrebné nájsť vhodné rozpúšťadlo, vzhľadom na to že analyty pri vyšších teplotách dekarboxylujú na príslušné N-nitrozamíny. Testovanými rozpúšťadlami boli etylacetát (teplota varu 77,1°C), acetón (teplota varu 56 °C) a dichlórmetán (teplota varu 39 °C) ale nakoniec ani jedna z možností sa nepreukázala ako vhodná.

Cieľom ďalšej série pokusov bola snaha o zvýšenie účinnosti extrakcie analytov zo sladu. Pracovný postup v nasledujúcich experimentoch bol navrhnutý konzultantom diplomovej práce Mgr. Tomášom Vrzalom. Princíp spočíval vo vytvorení zmesi sladu s kremelinou (sorbet kolónky Extrelut 20). Do tejto zmesi bol pridaný vodný roztok kyseliny sírovej (1 M) s jednopercentným zastúpením kyseliny sulfanilovej. Kyselina sírová dokáže desorbovať analyty, ktoré sú naviazané na povrchu sladu a prídavok kyseliny sulfanilovej je dôležitý, pretože inhibuje vznik N-nitrozamínov počas úpravy vzorky. Ďalšou časťou postupu bol prídavok organického rozpúšťadla, ktorým bol etylacetát. Napriek tomu, že v predchádzajúcich experimentoch nepatrilo medzi účinné extrakčné rozpúšťadla, v tomto prípade je situácia odlišná. Muselo sa brať do úvahy že v prvom kroku úpravy vzorky nastáva extrakcia analytov zo sladu do vodnej fázy a preto bolo nutné zvoliť s vodou nemiešateľné rozpúšťadlo a vzájomný rozdeľovací koeficient analytov medzi organickým rozpúšťadlom a vodou mal byť vysoký. Vzorka bola extrahovaná etylacetátom 1 hodinu a 45 minút a následne bola dekantovaná. Extrakt sladu bol odparený na vákuovej rotačnej odparke a vzniknuté rezíduum bola rozpustené v destilovanej vode. Interferenty z matrice boli odstránené pomocou extrakcii hexánom a voda bola následne odparená do sucha na vákuovej rotačnej odparke. Analyty zo vzorky boli derivatizované na ich príslušné metylestery. Účinnosť extrakcie bola v porovnaní s predchádzajúcimi experimentmi vysoká a je znázornená na obr 3.1. Vo všetkých experimentoch bola detekovaný len NPRO, pretože NSAR bol vo väčšine prípadov pod limitom detekcie danej analytickej metódy.



Obr. 3.5 Percentuálne vyjadrenie odozvy (pomer plôch analytu a interného štandardu vztiahnuté na 1 g sladu) voči najlepšiemu postupu (vodná fáza + EtAc)

V počiatkoch vývoja metódy sa pracovalo s navážkou sladu 5 g a na základe toho bol určený pomer medzi sladom a kremelinou. Bolo vyskúšaných viacero variácií ale najvhodnejším pomerom bol 1,4, pretože pri tomto zastúpení slad nevytváral s kremelinou „zhluky“. Prvým extrakčným krokom je extrakcia vodnou fázou, ktorá obsahuje kyselinu sírovú a kyselinu sulfanilovú. Pri voľbe koncentrácie kyseliny sírovej vo vodnom roztoku a percentuálneho zastúpenia kyseliny sulfanilovej sa vychádzalo z publikovanej práce, ktorá bola venovaná na stanovenie NPRO a NSAR v slade a v pive [31]. Objem vodnej fázy bol určený pomocou sady experimentov, kde bolo testovaných päť objemov, výsledok je znázornený v obrázku 3.6.



Obr. 3.6. Testované objemy vodnej fázy, ktorá je zložená z 1,5 M kyseliny sírovej s 1% zastúpením kyseliny sulfanilovej, použité na extrakciu analytov zo sladu

Z obrázku 3.6 je očividné že pri použitom objeme 12 ml je výrazný pokles pomeru plôch pík, čo môžu byť spôsobené vplyvom matricových efektov alebo chybou merania. Najvyšší pomer plôch pík bol dosiahnutý pri objemoch 14 a 15 ml. Voľba, ktorý z optimalizovaných objemov bude účinnejší bolo overené v ďalšej sérii experimentov. V tomto prípade sa znížila navážka sladu na hodnotu 2,5 g a odpovedajúce objemy vodnej

fázy boli 7 a 7,5 ml. Po vyhodnotení odoziev plôch píkov prepočítaných na navážku sladu boli získané nasledujúce údaje: $(A_{\text{NPRO}}/A_{\text{STD}})/2,5 \text{ g sladu (7 ml)} = 0,112 \text{ g}^{-1}$ a $(A_{\text{NPRO}}/A_{\text{STD}})/2,5 \text{ g (7,5 ml)} = 0,097 \text{ g}^{-1}$, z čoho vyplýva že používaným objemom vodnej fáze bolo 7 ml. Doba extrakcie vodnou fázou bola 15 minút. Druhá fáza extrakcie spočívala v prídavku organického rozpúšťadla – etylacetátu a jej počiatočný objem bol 50 ml. Doba extrakcie bola skrátaná z pôvodnej 1 hodiny a 45 minút na 40 minút, pretože pri dlhšej extrakcii dochádza k hydrolýze analytov i etylacetátu a časť vodnej fáze prechádza do organickej časti. V nasledujúcich krokoch úpravy vzorky boli objemy rozpúšťadiel stanovené experimentálne, t.j. voda ($V=2\text{ml}$) potrebná na rozpustenie rezidua po odparovaní etylacetátu a hexán ($1 \times 20\text{ml}$, $1 \times 10\text{ml}$) potrebný na čistenie vzorky od koextrahovaných zložiek matrice. Objem vody je pomerne nízky, pretože voda nepatrí medzi prchavé látky a odparovanie na vákuovej rotačnej odparke pri vyšších objemoch vody bolo zdĺhavé a komplikované.

Vzhľadom na skutočnosti, že pri niektorých parametroch nie je vôbec jednoznačné či zvolená hodnota je správna a nie sú známe interakcie medzi jednotlivými faktormi bola potrebná optimalizácia pomocou experimentálneho dizajnu.

3.3 Optimalizácia extrakčného postupu

Optimalizácia extrakčného postupu bola uskutočnená podľa navrhnutého experimentálneho dizajnu v rámci ktorého bolo potrebné najprv zvoliť parametre na optimalizáciu a rozsahy experimentálnych podmienok. V rámci experimentálnych dizajnov sa volí pre daný parameter vyšší a nižší rozsah (tab.3.3). Parametre, ktoré sa optimalizovali boli vybraté na základe predchádzajúcich experimentov a patrí k nim:

- pomer hmotností kremelina:slad
- koncentrácia kyseliny sírovej vo vodnej fáze
- percentuálne zastúpenie kyseliny sulfanilovej vo vodnej fáze
- objem etylacetátu
- doba extrakcie

Vzhľadom na prechádzajúce merania bola sledovanou odozvou pomer plochy píkov NPRO a NPIC.

Pri vývoji extrakčnej metódy bol pôvodne experimentálne stanovený pomer kremenila:slad 1,4; tzn. že hmotnosť sladu je 2,5 g a k nemu prislúcha hmotnosť kremeliny 3,5 g. Pri optimalizácii zostáva navážka pre slad zachovaná, pretože v rámci vyskúšaného sladu bola táto navážka dostačujúca, ale mení sa hmotnosť extraktu. Rozsah pre pomer kremenila:slad bol 0,8 až 2.

Kyselina sírová a kyselina sulfanilová sú zložkami vodnej fáze. V predchádzajúcich experimentoch bola koncentrácia kyseliny sírovej vo vode 1 mol/dm^{-3} s 1% zastúpením kyseliny sulfanilovej. V experimentálnom dizajne bol pre obe zložky zvolený rozsah 0,5 až $1,5 \text{ (mol/dm}^{-3} \text{ resp. \%)}$.

Vyššia úroveň objemu etylacetátu (100ml) bol zvolený najmä z časových dôvodov pri odparovaní rozpúšťadla a z ekonomického hľadiska. Minimálny čas pre extrakciu bol desať minút, pretože sa predpokladalo že pri nižšej hodnote by nebola extrakcia dostačujúca. Naopak horná hranica bola stanovená na 60 minút, lebo pri dlhšej extrakcii môže dochádzať k hydrolýze analytov a etylacetátu.

Tab. 3.3: Testované parametre a ich príslušné zvolené hodnoty na nižšej a vyššej úrovni

Parameter	nižšia úroveň (-1)	vyššia úroveň (1)
pomer extrelut:slad	0,8	2
koncentrácia kyseliny sírovej [mol/dm ⁻³]	0,5	1,5
% zastúpenie AMK	0,5	1,5
objem etylacetátu [ml]	40	100
doba extrakcie [min]	10	60

3.2.1 Voľba dizajnu

V rámci experimentálneho dizajnu bolo optimalizovaných päť faktorov. Ak by na optimalizáciu bol zvolený najjednoduchší typ experimentálneho dizajnu – plný faktorový dizajn, tak vo výsledku je potrebné uskutočniť 32 experimentov. V týchto experimentoch nie sú zahrnuté replikácie meraní, centrálny bod ani prípadné axiálne body a ich zahrnutie by tvorilo vo výsledku 76 experimentov. Uskutočniť toľko experimentov by bolo z časového a ekonomického hľadiska náročné, preto bol zvolený frakčný faktorový dizajn rozdelený do dvoch blokov, v každom bloku bol vygenerovaný jeden centrálny bod a každý experiment bol opakovaný dvakrát. Program Minitab 16.1 navrhol 34 experimentov (tabuľka 3.4 – body 1-34), ktorých poradie bolo znáhodnené. Po ich prevedení a vyhodnotení dizajnu bolo zistené významné zakrivenie plochy a preto bolo programom Minitab 16.1 vygenerovaných ďalších 10 axiálnych bodov (tabuľka 3.4 – body 35-44). Na základe všetkých navrhnutých experimentov bol spracovaný central composite design, konkrétne face centered design.

Tab. 3.4: Face centered design zložený z frakčného faktorového dizajnu, axiálnych a centrálnych bodov: A-pomer hmotností kremelina:slad, B-koncentrácia kyseliny sírovej [mol/dm⁻³], C- zastúpenie kyseliny sulfanilovej [%], D-objem etylacetátu [ml], E- doba extrakcie [min], odozva – pomer plôch píkovo NPRO a NPIC vzťahnuté na navážku sladu [g⁻¹]

Číslo merania	A	B	C	D	E	odozva
1	0,8	1,5	0,5	100	60	0,124
2	2	0,5	1,5	40	60	0,096
3	0,8	0,5	1,5	40	10	0,079
4	0,8	1,5	1,5	100	10	0,094
5	2	1,5	1,5	40	10	0,107
6	2	1,5	1,5	100	60	0,120
7	2	0,5	0,5	40	10	0,089
8	2	1,5	0,5	40	60	0,100
9	2	1,5	0,5	100	10	0,105
10	1,4	1	1	70	35	0,117
11	2	0,5	0,5	100	60	0,091
12	0,8	1,5	1,5	40	60	0,103
13	0,8	0,5	1,5	100	60	0,100
14	0,8	0,5	0,5	40	60	0,097
15	0,8	0,5	0,5	100	10	0,107
16	2	0,5	1,5	100	10	0,119
17	0,8	1,5	0,5	40	10	0,098
18	0,8	0,5	1,5	100	60	0,101
19	2	1,5	1,5	40	10	0,106
20	2	0,5	1,5	100	10	0,108
21	0,8	0,5	0,5	40	60	0,091
22	2	1,5	0,5	100	10	0,117
23	0,8	1,5	0,5	100	60	0,123
24	0,8	0,5	1,5	40	10	0,078
25	0,8	1,5	1,5	40	60	0,098
26	1,4	1	1	70	35	0,111
27	2	1,5	1,5	100	60	0,120
28	2	0,5	0,5	100	60	0,101
29	0,8	1,5	0,5	40	10	0,086
30	2	1,5	0,5	40	60	0,103
31	2	0,5	0,5	40	10	0,086
32	0,8	1,5	1,5	100	10	0,089
33	0,8	0,5	0,5	100	10	0,116
34	2	0,5	1,5	40	60	0,086

Tab. 3.4: pokračovanie

Číslo merania	A	B	C	D	E	odozva
35	0,8	1,0	1,0	70	35	0,084
36	2,0	1,0	1,0	70	35	0,100
37	1,4	0,5	1,0	70	35	0,091
38	1,4	1,5	1,0	70	35	0,100
39	1,4	1,0	0,5	70	35	0,098
40	1,4	1,0	1,5	70	35	0,090
41	1,4	1,0	1,0	40	35	0,104
42	1,4	1,0	1,0	100	35	0,099
43	1,4	1,0	1,0	70	10	0,074
44	1,4	1,0	1,0	70	60	0,099

3.2.2 Vyhodnotenie optimalizácie

Prvým krokom vyhodnotenia optimalizácie bolo zistiť, ktoré faktory a interakcie medzi faktormi majú významný vplyv na odozvu. Tieto údaje je možné zistiť z p-hodnôt, ktoré sú dané pre každý parameter (tab.3.3). Po určení faktorov, ktoré majú vplyv na danú odozvu bolo potrebné vytvoriť polynomicke rovnicu, ktorá bola získaná na základe experimentálneho dizajnu metódy odozvovej plochy, ktorá reprezentuje vzťah medzi získanou odozvou a faktormi, prípadne interakciami medzi faktormi. Na jej zostrojenie boli použité koeficienty, ktoré sú charakteristické pre každú premennú a sú zhrnuté v tabuľke 3.5.

Tab. 3.5: Kódované koeficienty významných parametrov, koeficienty vzájomných interakcií medzi faktormi, ich štvorce v polynomickej rovnici a príslušná smerodajná odchýlka (význam jednotlivých parametrov vid'. tabuľka 3.3)

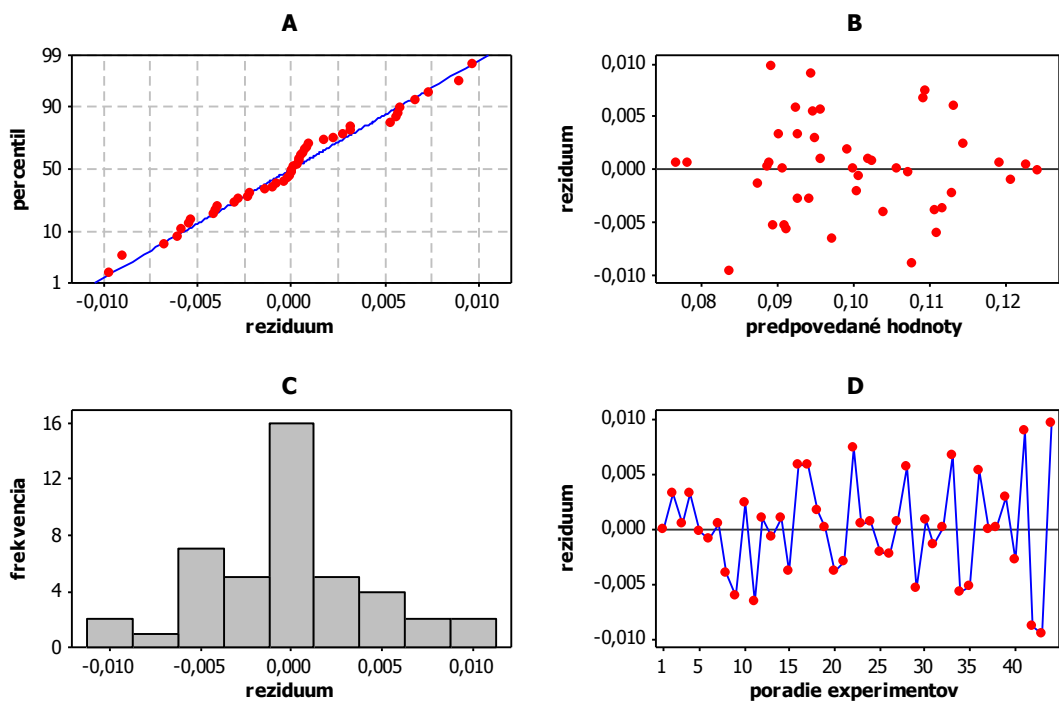
Parametre a ich interakcie	Koeficient	s	p- hodnota
Konštanta	0,108	0,003	0,000
A	0,003	0,001	0,030
B	0,005	0,001	0,000
D	0,007	0,001	0,000
C	-0,001	0,001	0,304
E	0,003	0,001	0,018
A*A	-0,004	0,004	0,319
B*B	-0,001	0,004	0,832
C*C	-0,002	0,004	0,559
D*D	0,005	0,004	0,262
E*E	-0,010	0,004	0,028
A*B	0,002	0,001	0,150
A*C	0,005	0,001	0,000
A*D	0,000	0,001	0,666
A*E	0,666	0,001	0,005
B*C	0,000	0,001	0,827
B*D	-0,002	0,001	0,173
B*E	0,003	0,001	0,007
C*D	-0,001	0,001	0,347
C*E	0,001	0,001	0,001
D*E	-0,001	0,001	0,584

Študovaný model je možné zhodnotiť na základe štatistických koeficientov, ktoré sú zobrazené v tabuľke 3.4. Predikčná schopnosť modelu i popis experimentálnych dát sú nízke.

Tab. 3.6 : Štatistické vyhodnotenie študovaného modelu: S - štandardná chyba regresie [g^{-1}], PRESS – predikcia sumy štvorcov [g^{-1}]², R² – koeficient determinácie [%], R-SQ (PRED) – predpovedaný koeficient determinácie [%], R-sq (adj) – upravený koeficient determinácie [g^{-1}]

koeficient	hodnota
s	0,006
press	0,004
R ²	86,84
R ² (pred)	41,72
R ² (adj)	73,06

Na nasledujúcom obrázku 3.7 sú znázornené diagnostické grafy pre daný model. Grafy A a C vyjadrujú normálne rozdelenie reziduí. Test normality bol uskutočnení Anderson-Darlingovým testom, kde $p > 0,05$, tzn. že reziduá majú normálne rozdelenie. V grafe A je dôležité aby jednotlivé body nevykazovali odchýlky od priamky. V grafoch B a D je podstatné aby body nevykazovali žiadny trend, či sa neformovali do tvaru lievika. V grafe B sú znázornené predpovedané hodnoty a ich príslušné reziduá, ktoré by mali vytvárať súvislý homogénny mrak. V tomto prípade je zrejma tvorba lieviku. V grafe D je zobrazená závislosť poradia experimentov a ich reziduí. Celkovo predpokladaný model je zo štatistického pohľadu nedostatočný.



Obr. 3.7: Diagnostické grafy reziduí pre daný model

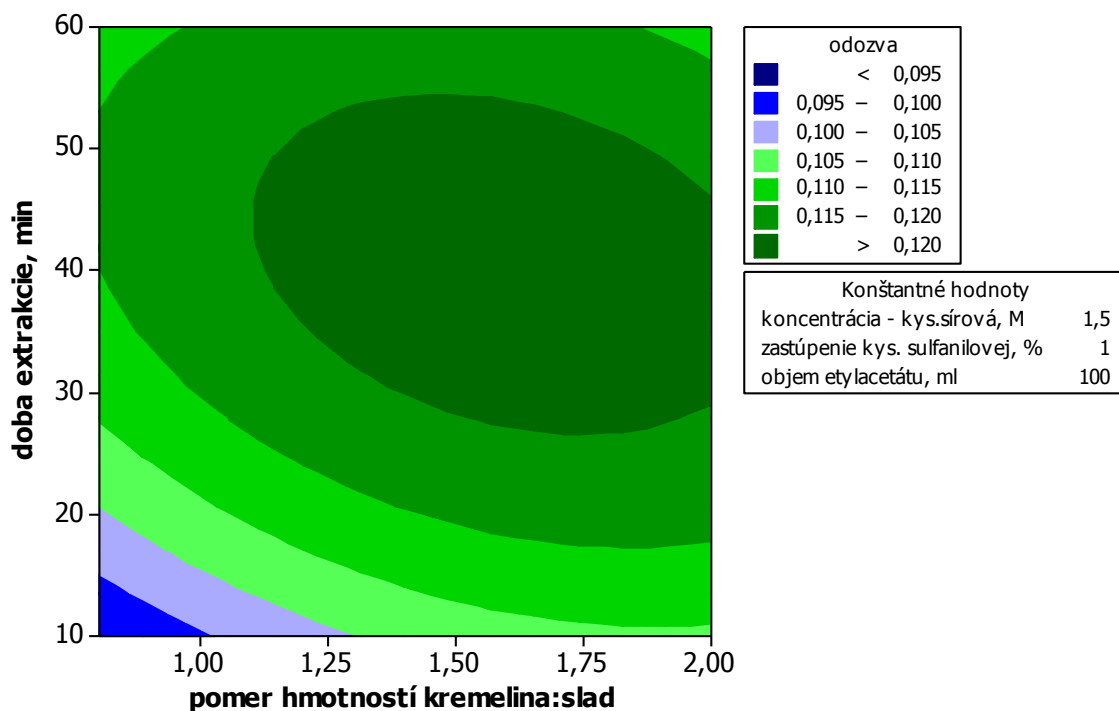
V nasledujúcej tabuľke 3.7 sú zaznamenané optimálne hodnoty pre jednotlivé parametre, vygenerované programom Minitab 16.1, po spracovaní experimentálneho dizajnu metódou odozvovej plochy. Predpovedaná optimálna hodnota pre odozvu pomeru plôch NPRO a NPIC vzťahnutú na gram sladu je $0,122 \pm 0,011 \text{ g}^{-1}$.

Tab. 3.7: Optimálne hodnoty jednotlivých parametrov získané pomocou funkcie vhodnosti v programe Minitab 16.1

Parameter	Hodnota
pomer kremenilaslad	1,4
koncentrácia kyseliny sírovej [mol/dm ³]	1,5
zastúpenie kyseliny sulfanilovej [%]	1
objem etylacetátu [ml]	100
doba extrakcie [min]	40

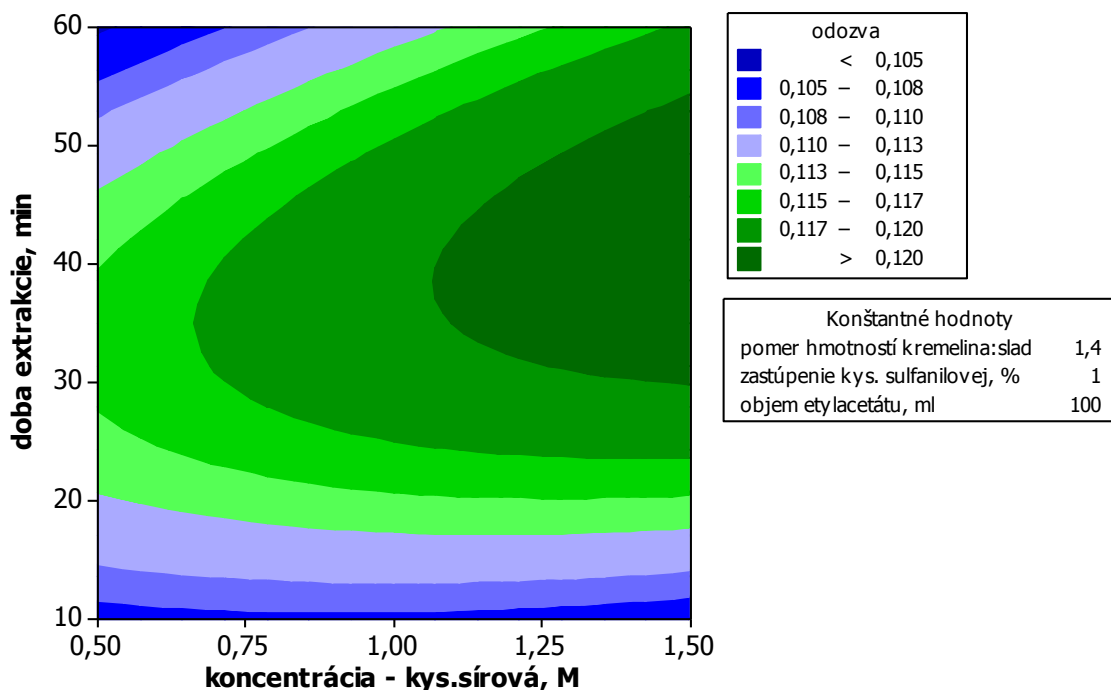
Grafické znázornenie nájdeného modelu je možné prostredníctvom metódy odozvovej plochy. Grafy (kontúrový a trojrozmerný povrchový graf) znázorňujú skúmanú odozvu systému v závislosti na dvoch parametroch a ostatné parametre sú konštantné, najčastejšie na optimálnych hodnotách (tab.3.7).

Obrázok 3.8 popisuje odozvu systému v závislosti doby extrakcie od pomeru extrelut:slad. Tmavá plocha v strede grafu znázorňuje najvyššie hodnoty odozvy pre daný systém, t.j. doba extrakcie 40 minút a pomeru hmotností kremelina:slad 1,5. Ak by sme znižovali dobu extrakcie a pomer hmotností kremellina:slad systém by dosahoval nižšiu hodnotu odozvy. Ak by sme zvýšili čas extrakcie a pomer extrelut:slad v rámci experimentálnej oblasti na hodnoty ktoré by boli v súlade s tmavou plochou obrázku odozva by bola približne rovnaká ako pre optimálne hodnoty.



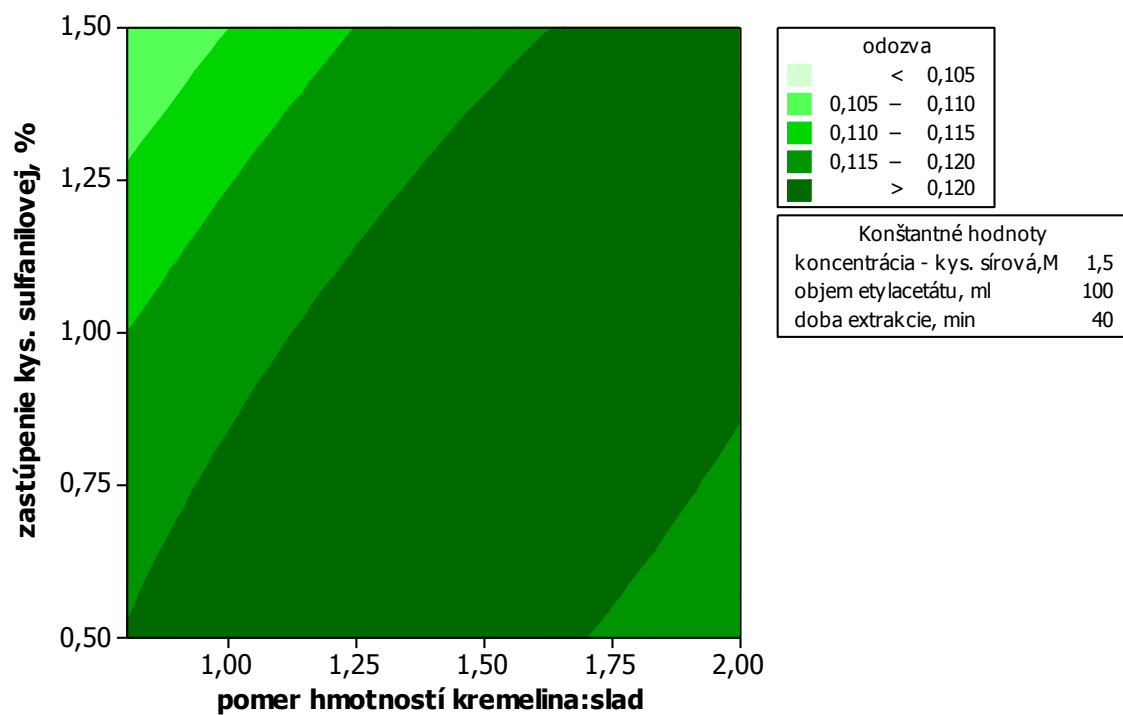
Obr. 3.8: Kontúrový graf, ktorý odpovedá odozve systému v závislosti doby extrakcie od pomeru kremelina:slad

Kontúrové grafy neurčujú len maximum resp. minimum získanej odozvy ale môžu slúžiť k získaniu smeru kam je možné rozšíriť experimentálnu oblasť. Táto situácia nastáva na obr. 3.9, kde optimálna hodnota koncentrácie kyseliny sírovej sa s veľkou pravdepodobnosťou nachádza mimo experimentálnu oblasť. Tým pádom zvýšenie jej koncentrácie v rámci testovania by mohla zvýšiť odozvu systému.



Obr. 3.9: Kontúrový graf, ktorý znázorňuje zmenu odozvy systému v závislosti od doby extrakcie a koncentrácie kyseliny sírovej

Nasledujúcim grafom (obr. 3.10) je závislosť odozvy od percentuálneho zastúpenia kyseliny sulfanilovej a pomeru hmotností kremelina:slad. Z tohto grafu je zrejماً interakcia medzi týmito dvomi parametrami.



Obr. 3.10: Kontúrový graf, ktorý znázorňuje zmenu odozvy systému v závislosti od percentuálneho zastúpenia kyseliny sulfanilovej a pomeru kremelina:slad

Prvý model bol zostrojený pomocou všetkých možných parametrov, interakcií a štvorcov, v rámci ktorého boli predpovedané optimálne hodnoty pre jednotlivé parametre. Nedostatočnosť modelu je zrejmá z tabuľky 3.6 a z obrázku 3.7, preto bol hľadaný najlepší model, ktorý sa dal nájsť v rámci experimentálnych dát. Výsledný model zahrňoval len významné parametre, vzájomné interakcie a štvorce. a príslušné kódované koeficienty a p-hodnoty sú uvedené v tabuľke 3.8. Štatistické hodnotenie nového modelu je uvedené v tabuľke 3.9. Predpovedaná optimálna hodnota pre odozvu bola $0,128 \pm 0,003$ a zistené optimálne hodnoty pre jednotlivé parametre sú v tabuľke 3.10.

Tab. 3.8: Kódované koeficienty významných parametrov, koeficienty vzájomných interakcií medzi faktormi, ich štvorce v polynomickej rovnici a príslušná smerodajná odchýlka (význam jednotlivých parametrov vid'. tabuľka 3.2)

Parametre a ich interakcie	Koeficient	s	p-hodnota
Konštanta	0,1080	0,0100	0,000
A	0,0026	0,0005	0,030
B	0,0046	0,0005	0,000
D	0,0067	0,0005	0,000
E	0,0028	0,0005	0,018
A*C	0,0053	0,0018	0,000
A*E	-0,0036	0,0004	0,005
B*E	0,0034	0,0004	0,007
D*D	-0,0150	0,0004	0,000

Tab. 3.9: Štatistické vyhodnotenie študovaného modelu: S - štandardná chyba regresie [g^{-1}] , PRESS – predikcia sumy štvorcov [g^{-1}]², R² – koeficient determinácie [%], R-SQ (PRED) – predpovedaný koeficient determinácie [%], R-sq (adj) – upravený koeficient determinácie [g^{-1}]

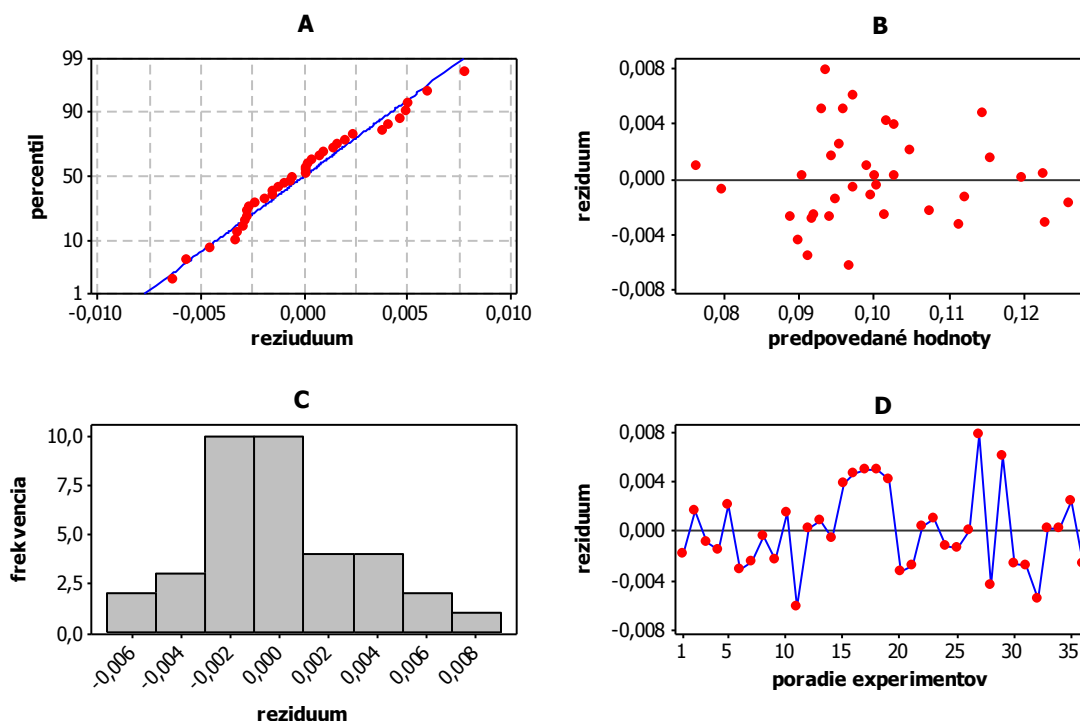
koeficient	hodnota
s	0,0020
press	0,0003
R-sq [%]	97,54
R-sq (pred) [%]	93,67
R-sq (adj) [%]	96,18

Z tabuľky 3.9. je zrejme že predikčná schopnosť i popis experimentálnych dát je v rámci štatistického spracovania nového modelu dostačujúca.

Tab. 3.10: Optimálne hodnoty jednotlivých parametrov získané pomocou funkcie vhodnosti v programe Minitab 16.1

Parameter	Hodnota
pomer extrakt:slad	0,8
koncentrácia kyseliny sírovej [mol/dm ³]	1,5
% zastúpenie kyseliny sulfanilovej	0,5
objem etylacetátu [ml]	75
doba extrakcie [min]	60

Diagnostické grafy pre nový model sú znázornené na obr. 3.11. Test normality bol zostrojený pomocou Anderson-Darlingovho testu, kde $p > 0,05$, tzn. že model má normálne rozdelenie. V grafe B nie je zrejmy lievik ani iný trend. Vo výsledku je tento model zo štatistického hľadiska správnejší a presnejší, než model predchádzajúci.



Obr. 3.11: Diagnostické grafy reziduí pre nový model

V rámci porovnania vytvorených modelov boli optimálne hodnoty z pôvodného modelu (tab. 3.7) vložené do nového modelu a predpokladaná odozva bola $0,105 \pm 0,002$. Napriek tomu, že nový model má štatisticky lepšie predpoklady, v skutočnosti sú dáta zhodnejšie s pôvodným modelom. Pre experimentálne overenie hodnôt bolo spracovaných sedem vzoriek experimentálneho mníchovského sladu podľa pôvodného modelu. Výsledky sú vyhodnotené ako pomer plôch píkovo NPRO a NPIC vzťahnuté na navážku sladu a sú zaznamenané v tabuľke 3.11. Vo všetkých prípadoch bol detekovaný len NPRO, NSAR bol pod LOD danej analytickej metódy.

Tab. 3.11: Štatistické vyhodnotenie vzoriek sladu, \bar{x} - medián pomeru plôch píkovo NPRO a NPIC vzťahnuté na navážku sladu [g^{-1}], $L_{1,2}$ - interval spoľahlivosti [g^{-1}], s - smerodajná odchýlka merania [g^{-1}], RSD - relatívna smerodajná odchýlka [%]

č. vzorku	$(A_{\text{NPRO}}/A_{\text{STD}})/2,5\text{g}$	$\bar{x} \pm L_{1,2}$ [g^{-1}]	s [g^{-1}]	RSD [%]
1	0,094			
2	0,111			
3	0,127			
4	0,119	$0,125 \pm 0,014$	0,015	12,22
5	0,125			
6	0,131			
7	0,141			

Podľa štatistického spracovania vzoriek experimentálneho mníchovského sladu z tabuľky 3.11 môžeme posúdiť že získaný medián pomeru plôch píkovo NPRO a NPIC vzťahnutý na navážku sladu ($0,125 \pm 0,014$) je v rámci intervalu predpovedanej hodnoty $0,122 \pm 0,011$.

3.4 Matricové efekty

Stanovované analyty (NSAR, NPRO) sa v slade nachádzajú na nízkej koncentračnej úrovni a vzhľadom na množstvo iných interferentov bolo nutné zistiť ovplyvnenie matricovými efektami. Ich vplyv bol overený na základe vzťahu 4, kde koncentrácia prídavku štandardu bola 40 µg/kg. Vplyv matricových efektov bol spracovaný v rámci dvoch rôznych typoch sladov – mníchovskom a plzeňskom slade (tab. 3.12).

Tab. 3.12: Matricové efekty na koncentračnej úrovni 40 µg/kg sladu

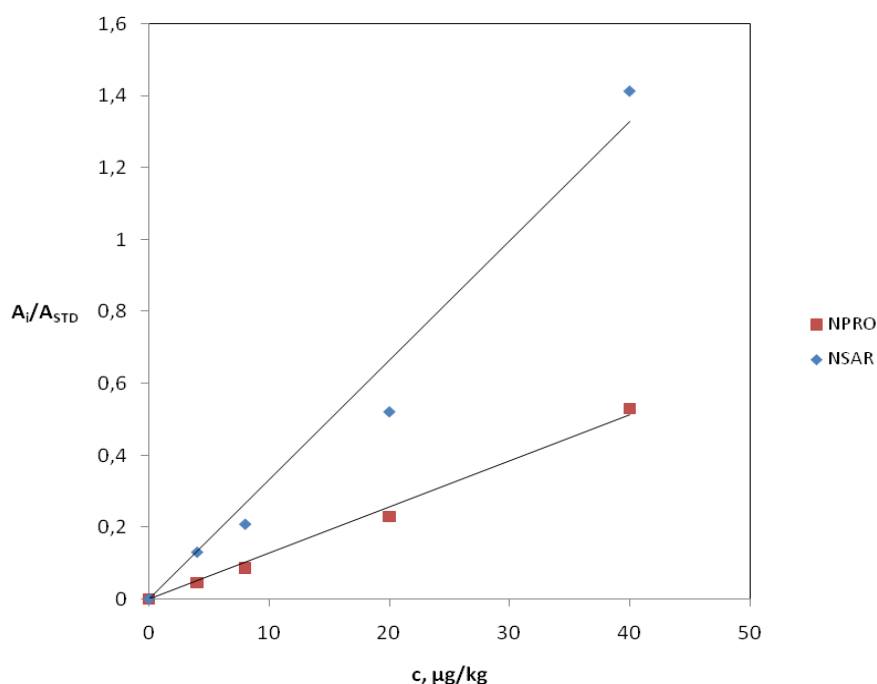
	mníchovský slad	svetlý slad
	ME	ME
	[%]	[%]
NSAR	6,19 ± 1,67	-3,23 ± 0,53
NPRO	-0,04 ± 0,02	8,30 ± 1,11

Z vyhodnotenia tabuľky 3.12 je zrejmé že, v oboch sladoch na zvolenej koncentračnej úrovni 40 µg/kg sú prejavované matricové efekty. Tieto hodnoty sú nízke a vzhľadom na tolerovanie matricových efektov do 20 %, je možné tento vplyv zanedbať. Na základe získaných výsledkov bolo potrebné zostrojiť matricovú kalibračnú krivku na overenie vplyvu matricových efektov na nižších koncentračných úrovniach aby bola možná prípadná kvantifikácia analytov v sladoch..

Prvá kalibračná závislosť (obr. 3.12) bola zostavená zo štandardných roztokov NPRO, NSAR (príprava vzorky vid' kapitola 2.3) v rozsahu koncentrácií 0-100 µg/l, odpovedajúce koncentrácie v slade sú 0-40 µg/kg. Kalibrácia zobrazuje závislosť pomeru plôch pík analytov a interného štandardu od koncentrácie analytov v slade. Z vyhodnotenej regresie vyplýva, že úsek na osi y je štatisticky nevýznamne odlišný od nuly. Limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) závisí od citlivosti metódy a bol vypočítaný zo smernice kalibračnej krivky príslušného analytu a chyby strednej hodnoty regresnej priamky. Tieto hodnoty sú uvedené v tabuľke 3.13.

Tab. 3.13: Regresné parametry kalibračnej krivky pre NPRO, NSAR z kalibračnej krivky

analyt	smernica [ug/kg] ⁻¹	chyba strednej hodnoty -	R ² -	LOD [ug/kg]	LOQ [ug/kg]
NSAR	0,035	0,092	0,9972	4,0	12,0
NPRO	0,013	0,017	0,9952	4,3	13,0



Obr. 3.12: Kalibračná závislosť pre NPRO a NSAR

Vzhľadom na overenie možných prítomných matricových efektov na nižších koncentračných úrovniach bola zostrojená matricová kalibračná krivka (obr.3.13), ktorá obsahovala maticu a k nej pridaný štandardný roztok NPRO, NSAR v etanole na rovnakej koncentračnej úrovni ako v predchádzajúcom prípade, tzn. v rozsahu koncentrácií 0-100 µg/l (odpovedajúce koncentrácií analytov v slade 0-40 µg/kg). Matricové efekty boli overené na základe výpočtu podľa vzťahu 4 a získané výsledky sú zhrnuté v tabuľke 3.14. Z časových dôvodov boli overené matricové efekty len pre experimentálny mníchovský slad.

Tab. 3.14: Matricové efekty pre NSAR a NPRO v experimentálnom mníchovskom slade na rôznych koncentračných úrovniach

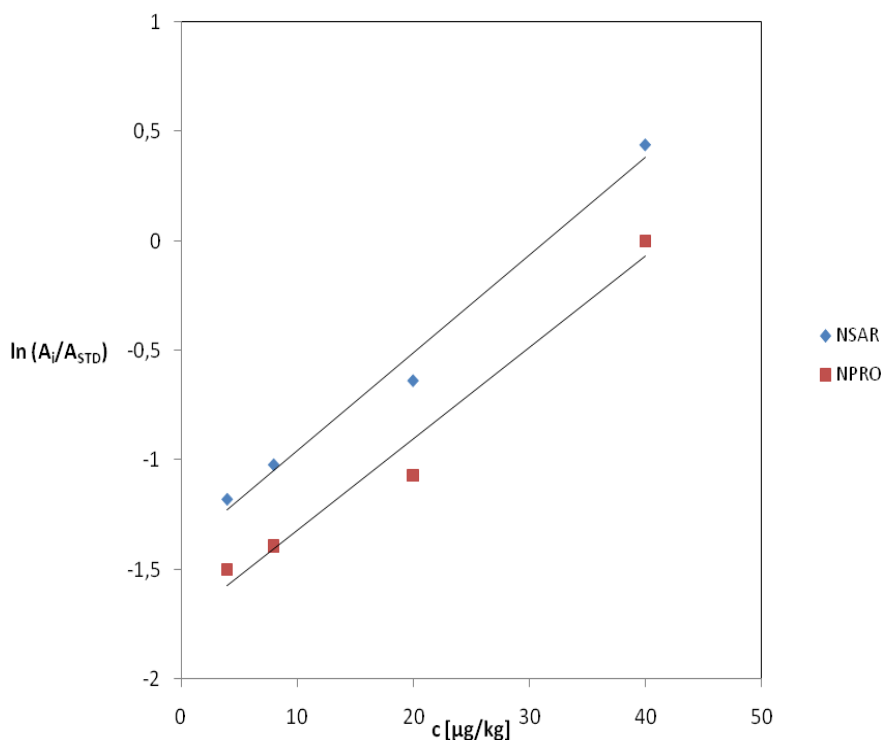
	4 $\mu\text{g/kg}$ ME [%]	8 $\mu\text{g/kg}$ ME [%]	40 $\mu\text{g/kg}$ ME [%]
NSAR	136,48 \pm 42,16	73,11 \pm 20,94	9,71 \pm 0,61
NPRO	393,28 \pm 103,10	190,85 \pm 27,96	88,91 \pm 6,90

Z tabuľky 3.14 sú evidentne vidieť prejavené matricové efekty na nižších koncentračných úrovniach pre NSAR aj NPRO. Koncentračná úroveň 20 $\mu\text{g/kg}$ nie je uvedená v tabuľke, pretože z časových dôvodov bolo uskutočnené len jedno meranie a nebolo možné vypočítať príslušnú kombinovanú neistotu. Matricový vplyv bol prejavý aj v tomto prípade a orientačná hodnota pre NSAR je 1,43 % a pre NPRO 49,27 %. Získané výsledky sú v rozpore z predchádzajúcim tvrdením, že na vyšších koncentračných úrovniach nie je prejavý matricový efekt v mníchovskom slade. Rozdielne hodnoty môžu byť spôsobené náhodnými chybami pri príprave vzorky alebo problém spočíva v opakovateľnosti daných experimentov.

Kvantifikácia analytov v experimentálnom mníchovskom slade bola možná po zostrojení matricovej kalibračnej krivky (obr.3.13). Vo výsledku krivka nebola lineárna, preto bolo nutná linearizácia prevedením odoziev plôch píkov na ich logaritmickú formu a vzhľadom na to je výsledna regresná rovnica v logaritmickej forme. Výsledky z vyhodnotenej regresie sú v tabuľke 3.15. Na obr. 3.13 je zobrazená matricová kalibračná krivka v závislosti logaritmu pomeru plôch NSAR, NPRO od koncentrácie prepočítanej na navážku sladu.

Tab. 3.15: Regresné parametry kalibračnej krivky pre NPRO, NSAR z matricovej kalibračnej krivky

analyt	smernica [ug/kg ¹]	úsek na osi y -	chyba strednej hodnoty -	R ² -	LOD [ug/kg]	LOQ [ug/kg]
NSAR	0,045	-1,408	0,105	0,9931	3,7	4,0
NPRO	0,042	-1,741	0,137	0,9866	4,0	4,3



Obr.3.13: Matricová kalibračná krivka pre NPRO a NSAR

3.5 Analýza reálnych vzoriek sladu

Vyvinutá metóda bola aplikovaná na pšeničný, mníchovský, svetlý a karamelový slad, ktorých výber spočíval na základe rôznych koncentrácií NDMA. Z každého typu sladu bolo spracovaných niekoľko vzoriek až na pšeničný, pri ktorom bol analyzovaný len jeden. Z časového hľadiska bola každá vzorka spracovaná dvakrát a štatistické vyhodnotenie jednotlivých sladov je uvedené v tabuľke 3.14. Vo všetkých sladoch bol detekovaný NPRO, na rozdiel od NSAR, ktorý bol väčšinou pod limitom detekcie. Výsledky odoziev jednotlivých druhov sladov sú reprezentované ako pomer plochy daného analytu a interného štandardu, prepočítané na navážku sladu. V rámci práce je možná kvantifikácia len pre ten typ mníchovského sladu (experimentálny mníchovský slad), pri ktorom boli definované matricové efekty a zostrejená príslušná matricová kalibračná krivka. V prípade kvantifikácie ostatných druhov sladu je potrebné overiť vplyv matricových efektov.

Tab.3.16: Štatistické vyhodnotenie analyzovaných vzoriek sladu, \bar{x} - medián pomeru plôch píkov NPRO a NPIC vzťahnuté na navážku sladu [g^{-1}], $L_{1,2}$ - interval spoľahlivosti [g^{-1}], s - smerodajná odchýlka merania [g^{-1}], RSD - relatívna smerodajná odchýlka [%]

slad	č. vzorku	$\bar{x} \pm L_{1,2}$	s	RSD [%]
pšeničný	1.	0,008 ± 0,001	0,00	12,62
mníchovský	1.	0,046 ± 0,004	0,00	6,52
	2.	0,270 ± 0,027	0,02	7,11
	3.	0,049 ± 0,008	0,01	11,29
svetlý	1.	0,049 ± 0,013	0,00	8,92
	2.	0,030 ± 0,005	0,00	5,41
	3.	0,020 ± 0,007	0,01	25,87

V tabuľke 3.16 nie sú uvedené výsledky pre karamelový slad. Tento slad nebolo možné analyzovať, pretože sa ho nepodarilo vyčistiť od koextrahovaných zložiek matrice. V prípade ďalšieho vývoja metódy by bolo možné zaviesť pre karamelový slad ešte jeden čistiaci krok, napríklad prečistenie pomocou extrakcii na tuhej fáze prostredníctvom sorbentu C-18. Cieľové analyty sa na tomto type kolónky nezachytia ale je vysoká pravdepodobnosť zachytenie nepoláňaných častí matrice, ktoré spôsobuje znešistenie vzorky. Z tabuľky 3.16

môžeme vidieť že najväčšie odozvy pomeru plôch NPRO/NPIC vzťahnuté na navážku sladu vykazoval mníchovský slad. Toto zistenie je v rámci predpokladaných teórii, pretože v procese výroby sladu sa pri hvozdení používajú vyššie teploty ako pri ostatných typoch sladu, čím sa podmieňuje vznik väčšieho množstvo N-nitrozamínov. Získané odozvy pre mníchovský a plzeňský slad boli navzájom porovnané dvojvýberovým t-tesom pre nerovnosť rozptylov, p-hodnota bola vyššia ako 0,05, tým pádom sa obsah NPRO v mníchovskom a plzeňskom slade štatisticky významne nelíši.

V nasledujúcej tabuľke 3.17 je spracovaná štatistika analýzy NPRO v experimentálnom mníchovskom slade, pri ktorom bola možná kvantifikácia na základe matricovej kalibračnej krivky. V rámci experimentov bolo pripravených a zmeraných sedem vzoriek.

Tab. 3.17: Štatistické vyhodnotenie experimentálneho mníchovského sladu pre NPRO, x- medián pomeru plôch píkov NPRO a NPIC, $L_{1,2}$ –interval spoľahlivosti, s – smerodajná odchýlka merania, RSD – relatívna smerodajná odchýlka [%], c – hmotnostná koncentrácia [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

č. vzorku	$(A_{\text{NPRO}}/A_{\text{STD}})$	$x \pm L_{1,2}$	s	RSD [%]	c_{NPRO} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	0,235				
2	0,278				
3	0,318				
4	0,297	$0,314 \pm 0,014$	0,04	12,22	$13,2 \pm 2,9$
5	0,314				
6	0,328				
7	0,353				

Z tabuľky 3.17 vyplýva že koncentrácia NPRO v experimentálnom mníchovskom slade je $13,2 \pm 2,9 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Na základe vyvinutej metódy bolo potrebné zistiť či je výťažnosť extrakcie analytov (NPRO, NSAR) zo sladu 100%. Pre overenie výťažnosti extrakcie analytov bol použitý experimentálny mníchovský slad a tri vzorky boli spracované trojnásobnou extrakciou etylacetátom. Vzhľadom na to že, NSAR bol pod LOD danej analytickej metódy, výsledky sú spracované len pre NPRO v tabuľke 3.18.

Tab. 3.18: Výťažnosť extrakcie NPRO z experimentálneho mníchovského sladu optimalizovaným postupom

č. vzorku	výt'aznosť 1.extrakcie [%]	$x \pm L_{1,2}$ [%]	s [%]	RSD [%]
1	92,69			
2	98,41	$95,45 \pm 7,12$	2,52	2,64
3	95,26			

Z tabuľky 3.18 môžeme vidieť že extrakcia NPRO z experimentálneho mníchovského sladu je takmer 100 %. V rámci stanovenie analytov v slade sa predpokladá že NSAR sa správa obdobne ako NPRO, pre jeho stanovenie je potrebné znížiť LOQ.

4 Záver

Cieľom diplomovej práce bol vývoj a optimalizácia metódy na stanovenie neprchavých N-nitrozamínov, konkrétne N-nitrozoprolínu a N-nitrososarkosínu v slade separačnou technikou plynovej chromatografie v kombinácii s chemiluminiscenčným detektorom. Vzhľadom na to, že N-nitrososarkosín bol takmer vo všetkých prípadoch pod limitom detekcie danej analytickej metódy, sledovanou odozvou v stanoveniach bola plocha píku N-nitrozoprolín. Na kvantifikáciu bola zvolená metóda interného štandardu (N-nitrozopipekolová kyselina) a na optimalizáciu extrakčného kroku analytov zo sladu bola použitá metóda odozvočných plôch. Optimalizované boli nasledujúce parametre: pomer hmotností kremelínat:slad, koncentrácia kyseliny sírovej, percentuálny obsah kyseliny sulfanilovej vo vodnej fáze, objem etylacetátu a doba extrakcie. Zistené optimálne podmienky pre jednotlivé faktory boli pomer hmotností kremelínat:slad 1,4; 1,5 M kyselina sírova, 1 % zastúpenie kyseliny sulfanilovej vo vodnej fáze, objem etylacetátu 100 ml a doba extrakcie 40 min.

V rámci vývoja metódy bolo potrebné overiť vplyv matricových efektov, ktoré boli testované v experimentálnom mníchovskom a v plzeňskom slade. Ich vplyv bol potvrdený v oboch prípadoch ale v plzeňskom slade bol v rámci tolerovateľnej hranice. Z hľadiska prejavovaných matricových efektov v experimentálnom mníchovskom slade bolo potrebné pre kvantifikáciu analytov zostrojiť matricovú kalibračnú krivku. Z cieľových analytov bol v experimentálnom mníchovskom slade stanovený len NPRO s koncentráciou $13,2 \pm 2,9 \mu\text{g/kg}$. Vyvinutá metóda bola aplikovaná na pšeničný, plzeňský a mníchovský slad. Vzhľadom na to, že pre ostatné slady neboli overené matricové efekty nebola ich kvantifikácia možná, preto boli získané výsledky vyhodnotené ako pomer plôch analytu a interného štandardu vzťahnuté na 1g sladu.

5 Zoznam bibliografických citácií

- [1] Bartsh, H.; Montesano R.: Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* 5, 1381-1393 (1984).
- [2] Francis, F.J.: *Encyclopedia of Food Science and Technology*. New York, Wiley 2000.
- [3] Stuff J.E.; Goh E.T.; Barrera S.L.; et al: Construction of an N-nitroso database for assessing dietary intake. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 42–47, (2009).
- [4] Kellner, V.; Čulík, J.; Basařová, G.: N-nitrosaminy ve sladu – vznik a odstraňování. *Kvasný Průmysl* 29, 28-31 (1983).
- [5] Výzkum ČSOB: Očekávání firem v indikativních oborech – pivovarnictví a prodej piva <<https://www.csob.cz/portal/documents/10710/124732/iof-4q-2015-pivovarnictvi.pdf>> [Cit. 19.5.2016].
- [6] Johnson, P.; Pfab, J.; Tricker, A.R.; Key, P.E.; Massey, R.C.: An investigation into the apparent Total N-nitroso compounds in malt. *J. Inst. Brew.* 93, 319-321 (1987).
- [7] Ikeda, K.; Migliorese, K.G.; Curtis, H.: Analysis of nitrosamines in cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41, 283-333 (1990).
- [8] U.S. Department of Health and Human Services: Report on Carcinogens. Dostupné u URL: <<http://www.iaff.org/HS/PDF/12th%20Report%20on%20Carcinogens%20-%202011.pdf>> [Cit. 13.5.2016]
- [9] Čulík, J.; Horák, T.; Čejka P.; Jurková, M.: Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství. Část I.- Vznik a metody stanovení. *Kvasný Průmysl* 58, 6-12 (2012).

- [10] Lijinsky, W.; Keefer, L.; Loo, J.: The preparation and properties of some nitrosamino acids. *Tetrahedron* 26, 5137-5153 (1970).
- [11] Basařová G. a kol.: *Sladařství. Teorie a praxe výroby sladu*. Praha, Havlíček Brain Team, 2015.
- [12] Wainright, T.: The chemistry of nitrosamine formation: Relevance to malting and brewing. *J. Inst. Brew.* 92, 49-64 (1986).
- [13] Wainright, T.: Nitrosamines in malt and beer. *J. Inst. Brew.*, 92, (73-80) 1986.
- [14] Vrzal, T.; Olšovská J.: N-nitrosaminy v 21. století. *Kvasný Průmysl* 1, 2-8 (2016).
- [15] Kosař K.; Procházka S. a kol.: *Technologie výroby sladu a piva*. Praha, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2000.
- [16] Pečenka, V.; Mejstřík, V.; Ságner, Z.: Popis vynálezu k autorskému osvědčení. Úřad pro vynálezy a objevy, vydané 27.5.1983.
- [17] Massey, R.C.; Crews, C.; McWeeny D.J.: Method for high-performance liquid chromatographic measurement of N-nitrosamines in food and beverages. *Journal of Chromatography* 241, 423-427 (1982).
- [18] Cardenes, L.; Ayala, J.H.; Gonzalez, V.; Afonso, A.M.: Fast microwave-assisted dansylation of N-nitrosamines Analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 946, 133–140 (2002).
- [19] Boyd, J.M.; Hrudey, S.E.; Richardson, S.D.; Li, X.-F.: Solid-phase extraction and high performance liquid chromatography analysis of nitrosamines in treated drinking water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry* 30, (2011).

- [20] Goicolea, M.A.; Balugera, Z.G.; et al.: Determination of N-nitrosopiperidine in beers by liquid chromatography with reductive amperometric detection at a hanging mercury drop electrode. *Analytica Chimica Acta* 305, 310-317 (1995).
- [21] Byuna, M.W.; Ahna, H.J.; Kima, J.H. et al.: Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *Journal of Chromatography A*, 1054, 403–407 (2004).
- [22] Cooper, S.F.; Lemoyne, Ch.; Gauvreau, D.: Identification and Quantitation of N-Nitrosamines in Human Postmortem Organs. *Journal of Analytical Toxicology* 11, 12-18 (1986)
- [23] Al-Kapeem M., Al-Assaf, Karabeet F.: Determination of Seven Volatile N-nitrosamines in Fast Food. *Pharmacology & Pharmacy* 5, 195 – 203 (2014).
- [24] Huang, M.C.; Chen, H.Ch.; et al.: Determination of volatile N-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – Chemical ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* 138, 227-233 (2013).
- [25] Sannino, A.; Bolzoni, L.: GC/CI-MS/MS method for the identification and quantification of volatile N-nitrosamines in meat product. *Food Chemistry* 141, 3925-3930 (2013).
- [26] Fine, D.H; Rufeh, F.; Lieb, D.; Rournbehler, D.P.: Description of the Thermal Energy Analyzer (TEA) for Trace Determination of Volatile and Nonvolatile N-nitroso Compounds. *Analytical Chemistry* 47, 1188-1191 (1975).

- [27] Ripollés, C.; Pitarch, E.; et al.: Determination of eight nitrosamines in water at the ngL-1 levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 702, 62-71 (2011).
- [28] Sen, N.P., Tessier, L.; et al.: Determination of N-nitrosoproline and N-nitrososarcosine in Malt and Beer. *J. Agric. Food Chem.* 31, 1033-1036 (1983).
- [29] Herrmann, S.S.; Duedahl-Olesen, L., Granby, K.: Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A* 1330, 20-29, (2014).
- [30] Grebel, J.E.; Young, C.C.; Suffet, I.H. (Mel): Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A* 1117, 11-18 (2006).
- [31] Pollock, J.R.A.: Aspect of nitrosation in malts and beers. I. Examination of malts for the presence of N-nitrosoproline, N-nitrososarcosine and N-nitrosopipicolinic acid. *J. Inst. Brew.* 87, 356-359 (1981).
- [32] Johnson, P.; Pfab, J.; Massey, R.C.: Development of methods for the characterisation of non-volatile N-nitroso compounds in malt. *J.Inst. Brew.* 94, 19-22 (1988a).
- [33] Olšovská, J.; Matoulková, D.; Čejka, P.; Jurková, M.: Pivo a zdraví. *Kvasný průmysl* 60, 7-8 (2014).
- [34] Calderbrank, J.; Hammond, J.R.M.: Influence of nitrate and bacterial contamination on the formation of apparent total N-nitroso compounds (ATNC) during fermentation. *J.Inst.Brew.*, 95, 277-281, (1989).

- [35] Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S.; Escaleira, L.A.: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965-977 (2008).
- [36] Candiotti, L.V.; De Zan, M.M.; Cámara, M.S.; Goicoechea, H.C: Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124, 123-138 (2014).
- [37] Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L. et. al.: Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42, 3-40 (1998).
- [38] Ferreira, S.L.C; Bruns, R.E.; Paranhos da Silva, E.G. et. al.: Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of chromatography A* 1158, 2-14 (2007).
- [39] Michálek, J.: Navrhování a vyhodnocování experimentů (DOE). Dostupné z URL: <http://www.crr.vutbr.cz/system/files/brozura_05_1012_2.pdf> [Cit. 7.5.2016]
- [40] Leardi, R.: Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 652, 161-172 (2009).
- [41] Cuadros-Rodríguez, L.; Bagur-González, M.G et al.: Principles of analytical calibration/quantification for the separation science. *Journal of Chromatography A*, 1158, 33-46 (2007).
- [42] Štulík, K. et. al.: *Analytické separační metody*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2004.

- [43] Caban, M.; Migowska, N.; Stepnowski, P.; Kwiatkowski, M.; Kumirska, J.: Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of β -blockers and β -agonists in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1258, 117-127 (2012)
- [44] Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M.; Moreno, J.L.F.; Romero-González, R.: Compensation for matrix effects in gas chromatography – tandem mass spectrometry using a single point standard addition. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4798-4808 (2009).