

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

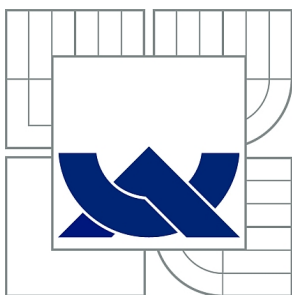
STANOVENÍ DUSIČNANŮ V ZELENINĚ METODOU KAPILÁRNÍ
IZOTACHOFORÉZY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

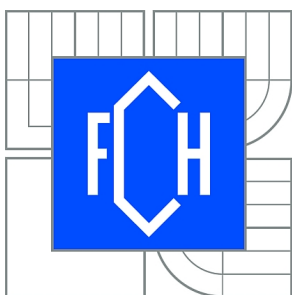
NIKOLA JANČOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ DUSIČNANŮ V ZELENINĚ METODOU KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY

DETERMINATION OF NITRATES IN VEGETABLES BY CAPILLARY IZOTACHOPHORESIS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

NIKOLA JANČOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VERONIKA ŘEZÁČOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0803/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Nikola Jančová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí práce **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Stanovení dusičnanů v zelenině metodou kapilární izotachoforézy

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma výskytu a vlastností dusičnanů a možností jejich stanovení.
2. Realizace experimentální práce zaměřené na stanovení dusičnanů v běžně dostupných druzích zeleniny metodou kapilární izotachoforézy, ověření výsledků screeningovými postupy.
3. Přehledné zpracování a zhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Nikola Jančová
Student(ka)

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením dusičnanů v zelenině metodou kapilární izotachofórey. V teoretické části se práce věnuje výskytu dusičnanů v zelenině, jejich zdravotním rizikům, vlivu zpracování, běžně používaným metodám stanovení, kapilární izotachofórey a jejímu praktickému využití. V praktické části jsou uvedeny podmínky pro stanovení dusičnanů kapilární izotachofórou a použité chemikálie. Zelenina s vyšším obsahem dusičnanů je srovnána se zeleninou v bio kvalitě. Dusičnany v zelenině jsou současně stanoveny pomocí diagnostických papírků.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with determination of nitrates in vegetables employing the capillary isotachopheresis technique. The literature review is devoted to occurrence of nitrates in vegetables, their health risks, the influence of food processing onto nitrate content, commonly used methods of determination as well as the capillary isotachopheresis and its practical application. Experimental part focuses on the application of capillary isotachopheresis for determination of nitrate content in vegetables obtained from conventional agriculture and organic farming.

KLÍČOVÁ SLOVA

kapilární izotachofórea, dusičnany, zelenina

KEYWORDS

capillary isotachopheresis, nitrate, vegetables

JANČOVÁ, N. *Stanovení dusičnanů v zelenině metodou kapilární izotachoforézy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Ing. Veronice Řezáčové, Ph.D. za cenné rady, konzultace a odborné vedení při zpracování této práce.

Dále bych poděkovala své rodině a blízkým za trpělivost a oporu, kterou mi během práce i celého studia poskytovali.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	Teoretická část	7
2.1	Zelenina.....	7
2.1.1	Výskyt dusičnanů v zelenině	8
2.2	Dusičnany.....	9
2.2.1	Dusičnany jako aditivní látky	9
2.2.2	Dusičnany v potravinách rostlinného původu.....	11
2.3	Zdravotní rizika dusičnanů	12
2.4	Faktory ovlivňující obsah dusičnanů v zelenině.....	13
2.5	Stanovení dusičnanů	14
2.6	Stanovení dusičnanů metodou kapilární izotachoforézy.....	18
2.6.1	Elektroforetická pohyblivost.....	19
2.6.2	Systém izotachoforetických zón a jeho vlastnosti	20
2.6.3	Jevy provádějící separaci	21
2.6.4	Kvalitativní analýza.....	23
2.6.5	Kvantitativní analýza	24
2.7	Praktické využití kapilární izotachoforézy	24
3	Experimentální část	25
3.1	Seznam chemikálií.....	25
3.2	Seznam přístrojů.....	26
3.3	Výběr vhodného koncového elektrolytu	27
3.4	Kalibrační křivka dusičnanů	28
3.5	Mez detekce a kvantifikace	28
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Příprava vzorků.....	29
4.2	Stanovení obsahu dusičnanů v zelenině	29
5	Závěr	33
6	Seznam použitých zdrojů	34
7	Seznam použitých zkratk	38
8	Přílohy.....	39

1 ÚVOD

Dusičnany (NO_3^-) se běžně vyskytují v přírodě, hlavně v půdách, vodách a potravinách. Za hlavní zdroj příjmu dusičnanů pro člověka je považována zelenina. Protože některé předchozí výzkumy nasvědčovaly tomu, že zelenina s vysokým obsahem NO_3^- ve stravě může způsobit vyšší riziko rakoviny v trávicím traktu či methemoglobinemii, je snaha minimalizovat jejich akumulaci v zelenině [1]. Podle vyhlášky 252/2004 Sb. je maximální přípustné množství dusičnanů v pitné vodě $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [2]. Přijatelná denní dávka dusičnanů ze zeleniny byla stanovena Evropskou komisí na $3,7 \text{ mg NO}_3^-$ na jeden kilogram hmotnosti člověka [3].

Od poloviny 19. století je známo, že se nabitě částice v roztoku pohybují vlivem elektrického pole. Rychlost migrace těchto částic závisí na různých parametrech, proto byl tento jev dlouhou dobu používán pro charakterizaci a separaci různých částic pro analytické a preparativní účely. Konstrukce elektroforetických přístrojů byla vyřešena až s rozvojem chromatografických separačních technik, které vyžadoval chemický průmysl po druhé světové válce a kdy byly objeveny izolační materiály a detekční systémy vhodné právě pro tyto přístroje.

Izotachoforéza patří mezi elektroforetické techniky, které jsou založené na migraci nabitých částic v elektrickém poli. Specifikem izotachoforézy je přítomnost ostrých zónových rozhraní oddělujících separované zóny jednotlivých složek vzorku, které migrují za sebou stejnou rychlostí. K rychlému rozvoji izotachoforézy došlo v šedesátých letech, kdy se také začal vyrábět komerční izotachoforegraf.

V sedmdesátých letech našla izotachoforéza uplatnění v analýze potravin zejména pro stanovení organických kyselin ve víně a konzervačních látek. Později se rozšířila i na další analyty (glutamová kyselina, anorganické anionty apod.) a stala se tak významnou analytickou separační metodou [4].

V této práci je kapilární izotachoforéza využívána pro stanovení dusičnanů v různých druzích zeleniny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Zelenina

Základní složkou rostlin je voda, která je potřebná k udržení struktury zeleniny a její funkci. Voda je rozpouštědlem, v němž je uskutečňován příjem, transport a metabolismus látek, má vysokou tepelnou stabilitu a soudržnost molekul. Listy obsahují vodu z 85 – 95 %, dužnaté plody z 90 – 99 % a dřevnaté části maximálně z 50 % [5]. Zelenina obsahuje nenahraditelné složky, jako jsou minerály, sacharidy, vitamíny, chuťové látky a silice (esenciální oleje) [6].

Pojmem čerstvá zelenina se rozumí jedlé části rostliny, zejména kořeny, bulvy, listy, nať, květenství a plody v syrovém stavu. Podle toho, jaká část zeleniny je konzumována, se dělí na zeleninu:

- Košťálovou – využívá nadzemní části rostlin. Patří sem například zelí, kapusta, kedlubna, květák, brokolice.
- Kořenovou – zahrnuje řadu čeledí:
 - mrkvovitá – mrkev, celer, petržel, pastinák,
 - brukvovitá – ředkev, ředkvička, tuřín, křen,
 - mečíkovitá – červená řepa,
 - hvězdíkovitá – černý kořen.
- Listovou – dělí se na:
 - salátovou – salát hlávkový, římský, řeřicha zahradní,
 - špenátovou – špenát, čínská hořčice,
 - řapíkovou – rebarbora, řapíkový celer, sladký fenykl.
- Luskovou zeleninu – hrachové lusky a fazolové lusky.
- Plodovou – dělí se na dvě skupiny:
 - lilkovitá – rajče, paprika, lilek,
 - tykvovitá – tykev, okurka, meloun.
- Cibulovou – patří do čeledi liliovitých. Vyznačují se vysokým obsahem silic brzdící růst bakterií. Patří sem cibule, česnek, pór, pažitka [7].

V roce 2012 byla provedena inspekce Státní zemědělské a potravinářské inspekce kontrola zaměřená na dodržování jakostních požadavků a správnosti označování čerstvé zeleniny u 252 kontrolovaných dodavatelů. Situace byla obdobná jako v předcházejících letech. V rámci toho bylo kontrolováno 1 633 šarží čerstvé zeleniny, z čehož 453 šarží nevyhovělo požadavkům na jakost a označování. U více než třetiny nevyhovujících vzorků byl původ z České republiky, a to hlavně u kořenové zeleniny, zejména mrkve, celeru a petržele, dále u cibulové zeleniny (cibule a česnek) a plodové zeleniny, především u rajčat a papriky. U této zeleniny byla zjištěna přítomnost plísní a hnilob na plodech, cibulová zelenina byla naklíčená, necelistvá a vyschlá, u listové zeleniny byly hlávky silně povadlé a nečisté. Nevyhovující označení bylo nalezeno u 122 případů, kdy nejčastěji na obalu chyběl údaj o zemi původu a nedeklarována třída jakosti. V roce 2013 nevyhovovala jakost zeleniny u 28,6 % pocházející z Evropské unie (EU) a u 74,0 % nevyhovující zeleniny nebyla uvedena země původu.

Celková produkce zeleniny v EU dosáhla v roce 2012 61,2 mil. tun. Meziroční pokles byl přibližně o 1 %, což bylo způsobeno zejména nižší sklizní cibule a hlávkového zelí. Více než polovina celkového objemu produkce se podíleli rajčata, cibule, mrkev a hlávkové zelí. Největšími producenty zeleniny v rámci EU je Španělsko, Itálie, Francie a Polsko. Naopak k poklesu sklizně došlo zejména v Německu, Nizozemsku a také v Polsku.

Rok 2013 byl z hlediska počasí velmi různorodý. Nízké teploty a vydatné srážky zpozdily výsadbu až na začátek dubna. Vegetace dále probíhala bez problémů až do příchodu povodní, které způsobily škody za 1,6 mil. korun. Další negativní dopad měli škůdci a razantní zvýšení teplot spojené se suchem.

Spotřeba zeleniny v roce 2011 výrazně vzrostla vlivem nárůstu spotřeby rajčat, cibule a hlávkového zelí. Obecně lze říci, že stoupá spotřeba zeleniny, která je málo náročná na kuchyňskou úpravu. Jedná se tedy o salát, kedlubnu, ředkvičky, papriku, chřest a cherry rajčata. Naopak se snižuje spotřeba hlávkového zelí, celeru, hlávkové kapusty, póru a červené řepy [8].

2.1.1 Výskyt dusičnanů v zelenině

Dusičnany jsou přirozenou složkou životního prostředí a podílejí se na koloběhu dusíku v přírodě. Na počátku jsou atmosférické výboje v ovzduší, které vedou ke vzniku oxidů dusíku. Důležitou roli hrají také bakterie, které fungují tak, že buď umožňují biochemickou oxidaci sloučenin (nitrifikační bakterie) anebo naopak způsobují jejich redukci (denitrifikační bakterie). Rostliny zabudovávají dusičnany do svých buněk jako organický dusík, čímž se koloběh uzavírá. Organický dusík se do půdy dostává zejména z posklizňových zbytků a hnojením. Rozkladem odumřelých rostlin a živočichů vznikají amonné ionty, které jsou oxidovány nitrifikačními bakteriemi na dusitany a dále na dusičnany. Na rozdíl od amonných iontů, které se v půdě dobře sorbují, dusičnany se mohou z půdy lehce uvolňovat do vody a rostlin [9, 10].

V rostlinách jsou dusičnany redukovány na amonné soli potřebné pro asimilaci aminokyselin a následně bílkovin. Za nepříznivých teplotních, vlhkostních a světelných podmínek, kdy v rostlinách není dostatek uhlíkatých sloučenin nezbytných pro asimilaci, dochází k akumulaci dusičnanů.

Podle schopnosti akumulovat dusičnany se zelenina a okopaniny dělí na tři skupiny:

- Vysoký obsah NO_3^- (nad $1\,000\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), např.: salát, špenát, čínské zelí, ředkev, ředkvička, celer, kukuřice cukrová.
- Střední obsah NO_3^- ($250 - 1\,000\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), např.: zelí, kapusta, květák, petržel, mrkev, brokolice, česnek, brambory.
- Nízký obsah NO_3^- (pod $250\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), např.: růžičková kapusta, cibule, rajčata, hrách, okurky.

Obsah NO_3^- v jednotlivých plodinách kolísá v širokém rozmezí v závislosti na intenzitě hnojení, osvětlení a množství srážek během vegetace [10].

2.2 Dusičnany

Dusičnany jsou přirozenou součástí půd, a tím také rostlin, které jsou schopné je přijímat svými kořeny přímo z půdy. Díky dusičnanům je rostlina schopná růstu. Z tohoto důvodu se často používají hnojiva obsahující právě dusík, který podporuje růst rostliny. Pokud má ale rostlina více dusičnanů, než spotřebuje pro svůj růst, začnou se v ní shromažďovat. Množství NO_3^- vyskytující se v zelenině může být v rozmezí od 1 do 10 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [11]. Se vzrůstajícím používáním dusíkatých hnojiv obsahuje zelenina více dusičnanů než v minulosti. V čerstvé zelenině je obsah dusitanů nepatrný. Pokud je ale zelenina špatně skladována, může se množství dusitanů zvýšit přeměnou z dusičnanů bakteriemi [12]. Umění zemědělce proto spočívá v tom, že dochází k mineralizaci organických látek tak, že vzniká potřebné množství dusičnanů pro výživu rostlin, aniž by docházelo k jejich nadbytku. Množství dusičnanů závisí také na druhu půdy, zda se jedná o písčitou, hlinitou či jílovitou. Písčité půdy mají vysoký podíl hrubých pórů, které jsou zaplněny vzduchem. Ten podporuje přeměnu organické hmoty na dusičnany [13].

Některé studie dokládají, že dusičnany mohou být lidskému tělu prospěšné, například chráněním střeva před bakteriálními infekcemi. Navíc, po jejich redukci na oxid dusnatý je tato molekula schopna regulovat některé fyziologické funkce v těle nebo slouží jako ochrana proti patogenům [1].

2.2.1 Dusičnany jako aditivní látky

Potravinová aditiva neboli přídatné látky jsou sloučeniny nebo jejich směsi, které se záměrně přidávají k potravinám při výrobě, zpracování, skladování nebo balení za účelem zvýšení jejich kvality. Mohou být i přirozenou součástí potravin. Jako potravina se nepoužívají samostatně, ale mohou mít určitou výživovou hodnotu.

Přítomnost přídatných látek musí být vždy uvedena na obalu názvem nebo číslem (kódem E systému Evropské unie), v některých případech i s údaji o možnosti nepříznivého ovlivnění zdraví člověka.

Druh a množství aditivních látek, které se mohou v potravině vyskytovat, stanovují příslušné legislativní materiály.

Podle účelu používání se aditivní látky dělí do šesti skupin:

- Látky prodlužující údržnost.
- Látky upravující aroma.
- Látky upravující barvu.
- Látky upravující texturu.
- Látky zvyšující biologickou hodnotu.
- Další aditivní látky.

U látek prodlužujících údržnost se rozlišují 2 základní druhy: antioxidanty, které chrání některé složky potravin před oxidací, a antimikrobní látky neboli konzervanty. Konzervanty jsou sloučeniny prodlužující údržnost potravin tím, že je chrání před nežádoucími mikroorganismy. Tyto účinky má velké množství potravinářských materiálů, z anorganických látek jsou to například dusitany a dusičnany, viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Seznam dusitanů a dusičnanů používaných jako konzervanty [14]

Číslo E	Název
E249	dusitan draselný (KNO_2)
E250	dusitan sodný (NaNO_2)
E251	dusičnan sodný (NaNO_3)
E252	dusičnan draselný (KNO_3)

Dusitany jako stabilizátory masa mají také antimikrobní účinky, a to zvláště při použití spolu se solí. U nesterilizovaných masných výrobků inhibují růst bakterií *Clostridium botulinum*. Účinnost, která je úměrná koncentraci kyseliny dusité, závisí na pH prostředí. Jako stabilizátory se používají také dusičnany [14].

Clostridium botulinum jsou bakterie, které produkují toxin způsobující botulismus. Tento toxin blokuje průchod nervového vzruchu na nervová zakončení a způsobuje nervosvalovou slabost. Obvyklou příčinou smrti je respirační selhání [15].

Výhodou používání aditivních látek jsou toxikologicky bezpečnější a výživově hodnotnější potraviny. Používání konzervantů je prevencí intoxikací bakteriálního a plísňového původu. Používání antioxidantů zabraňuje vzniku potenciálně toxických produktů autooxidace a vzniku příchutí a pachutí. Používání konzervantů, náhradních sladidel, stabilizátorů a emulgátorů, barviv a aromatických látek umožňuje vyrábět nízkoenergetické potraviny se sníženým obsahem cukrů a tuků, náhražky mléčných a masových výrobků a trvanlivé nealkoholické nápoje.

Přídavné látky však mohou přinášet i některá rizika. Krátkodobé akutní účinky těchto látek se mohou projevovat u více citlivých jedinců dermatitidami nebo alergiemi. Rizika spojená s dlouhodobým používáním aditivních látek nejsou doložena, přesto je používání některých aditiv potenciálně problematické a hledají se způsoby jejich náhrady.

2.2.2 Dusičnany v potravinách rostlinného původu

Obsah dusičnanů v rostlinách je silně ovlivňován prostředím. Dusičnany jsou v rostlinách akumulovány v době, kdy dusík nemůže být rostlinou využíván, tedy za nepříznivých teplotních, vlhkostních a světelných podmínek, kdy rostlina neredukuje dusičnany na amonné soli. Příčinou těchto podmínek je nedostatek uhlíkatých sloučenin nezbytných pro přeměnu nahromaděných dusičnanů na aminokyseliny a bílkoviny [14]. Limity pro obsah dusičnanů v některých běžných druzích zeleniny sumarizuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Limity pro obsah dusičnanů v zelenině [14]

Zelenina	Obsah NO ₃ ⁻ v mg · kg ⁻¹	
	minimální	maximální
brambory	0	2 795
celer	0	3 640
cibule	0	1 435
česnek	44	2 400
hrách	10	58
kapusta růžičková	0	2 500
kedlubna	80	4 380
květák	0	2 685
mrkev	0	3 337
okurka	0	490
paprika	4	330
petržel	0	5 400
rajčata	0	136
ředkev	300	3 770
ředkvička	390	5 200
salát hlávkový	60	6 600
špenát	20	4 500
zelí hlávkové	0	3 230

2.3 Zdravotní rizika dusičnanů

Dusičnany jsou primárně pro člověka málo závadné. Sekundárně, po bakteriální redukci v gastrointestinálním traktu jako dusitany, mohou být příčinou dusičnanové alimentární methemoglobinémie [16]. Toto onemocnění se nejčastěji objevuje u kojenců s umělou výživou a v 8 – 10 % končí smrtí [17]. Dusitany reagují s hemoglobinem na methemoglobin, který nemá schopnost přenášet kyslík. Krev kojenců obsahuje také tzv. fetální hemoglobin (hemoglobin F), který se přeměňuje snadněji na methemoglobin než hemoglobin A. Také enzymový oxidačně-redukční systém katalyzující zpětnou redukci na hemoglobin má u kojenců menší aktivitu. Přirozená hladina methemoglobinu v krvi nepřesahuje 1 % z celkového množství krevního barviva. Při zvýšení jeho obsahu (do množství 20 %) vzniká lehká klinická forma onemocnění, která se projevuje cyanózou a tachykardií. Při cyanóze se kůže kolem úst a konečcích prstů zbarvuje šedomodře. Tachykardie se projevuje zrychlenou srdeční činností. Při obsahu methemoglobinu (MHb) nad 20 % jsou tyto nemoci doprovázené průjmem a křečemi, může se připojit i poškození myokardu. Obsah methemoglobinu nad 50 % může být letální [18]. Tabulka 3 uvádí příznaky spojené s koncentrací MHb v krvi dospělého člověka.

Tabulka 3: Příznaky spojené s koncentrací MHb v krvi [19]

Koncentrace methemoglobinu	Celkový MHb	Příznaky
$<1,5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$	$<10 \%$	žádné
$1,5 - 3,0 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$	$10 - 20 \%$	cyanotická změna barvy kůže
$3,0 - 4,5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$	$20 - 30 \%$	úzkost, závratě, bolest hlavy, tachykardie
$4,5 - 7,5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$	$30 - 50 \%$	únava, zmatenost, nevolnost, zrychlené dýchání, zvýšená tachykardie
$7,05 - 10,5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$	$50 - 70 \%$	kóma, křeče, srdeční arytmie, acidóza
$>10,5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$	$>70 \%$	smrt

V roce 2010 proběhla studie, jejímž cílem bylo stanovit hladiny methemoglobinu a zkoumat, jak různé faktory ovlivňují tyto hladiny během těhotenství. Dále se zkoumalo, zda existuje rozdíl mezi vlastní vodou ze studny a vodou dodávanou. V závěru publikovaných výsledků bylo uvedeno, že u žen, které pily vodu s nižším množstvím dusičnanů, než je jejich mezní hodnota pro pitnou vodu ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), byly zjištěny vyšší hladiny methemoglobinu ve srovnání s přirozenou hladinou. Nicméně s pokročilejším těhotenstvím klesá hladina methemoglobinu v krvi a obsahuje méně než 3 % [20].

Případy methemoglobinémie zaznamenané ve Španělsku a Číně u kojenců ve věku 7 – 13 měsíců byly způsobeny konzumací zeleniny. Je také známo několik případů onemocnění u dospělého člověka v důsledku konzumace velkého množství zeleniny bohaté na dusičnany [12].

Dalším negativním rysem dusičnanů je jejich nepřímá toxicita spočívající v reakci vzniklých dusitanů s aminy za vzniku *N*-nitrosoaminů, z nichž jsou některé považovány za karcinogeny [18]. Největší obava je tedy z rakoviny žaludku, kde zvýšení pH žaludečních šťáv (>5,5) vede k rozmnožování bakterií, které následně přeměňují dusičnany na dusitany. NO_2^- jsou nestabilní a mohou se snadno přeměnit na *N*-nitroso sloučeniny. Vyšší množství dusitanů zvyšuje pravděpodobnost výskytu rakoviny [11].

Na druhou stranu se v posledních letech začínají objevovat odborné články, ve kterých se uvádí, že konzumace zeleniny obsahující vitamíny, minerály, vlákninu a sekundární metabolity rostlin, jako jsou fenoly, polyfenoly a taniny, prospívá kardiovaskulárnímu systému. Zejména listová zelenina je spojována s ochranou proti koronárnímu srdečnímu onemocnění a mozkové mrtvici. Strava bohatá na zeleninu (8 – 10 porcí denně) a nízkotučné mléčné výrobky snižují krevní tlak do takové míry, jako se dosáhne s hypotenzními léky. Bylo prokázáno, že dusičnany obsažené v některých druzích zeleniny se mohou redukovat na dusitany a následně na oxid dusnatý, nitrosothioly a mastné kyseliny obsahující nitro skupinu, souhrnně nazývané „NOx“ [21]. Po pozření zeleniny se NO_3^- rychle absorbují do tenkého střeva a následně jsou rozeslány po celém těle díky cirkulaci. Zatím z neznámých důvodů se asi 25 % dusičnanů z krve vylučuje slinami. Z toho je značná část dále redukována na dusitany pomocí bakterií přítomných v ústní dutině. Bez cirkulace a mikrobioty obsažené v ústech by byly dusičnany vyloučeny z těla beze změny jako chemicky stabilní anion [22].

2.4 Faktory ovlivňující obsah dusičnanů v zelenině

Smažení, pečení, vaření a zamrazení zeleniny může také ovlivnit množství dusičnanů. S. Prasad se zabýval stanovením dusičnanů v listové zelenině, jak čerstvé, tak uvařené, usmažené, upečené a zamražené. Zelenina byla upravena následně:

- Vaření – zelenina prošla 10 minut varem
- Pečení – při 180 °C po dobu 25 minut
- Smažení – na sojovém oleji 12 minut
- Mrazení – při – 20 °C po dobu 7 dní

Po následném stanovení obsahu dusičnanů bylo zjištěno, že vařením zeleniny se množství dusičnanů snížilo přibližně o 50 %, pečením zůstalo množství dusičnanů relativně nezměněné a smažením se množství dusičnanů zvýšilo 1,6 – 3 krát. Velký nárůst dusičnanů byl způsoben právě olejem, který byl použit při smažení. Sója obsahuje speciální bakterie, které jsou schopné přeměnit elementární dusík na amonný ion. Ten je dále nitrifikací přeměněn na dusičnanový ion. Výrazné zvýšení množství dusičnanů lze přiřadit této skutečnosti, avšak jsou potřebné ještě další výzkumy v této oblasti.

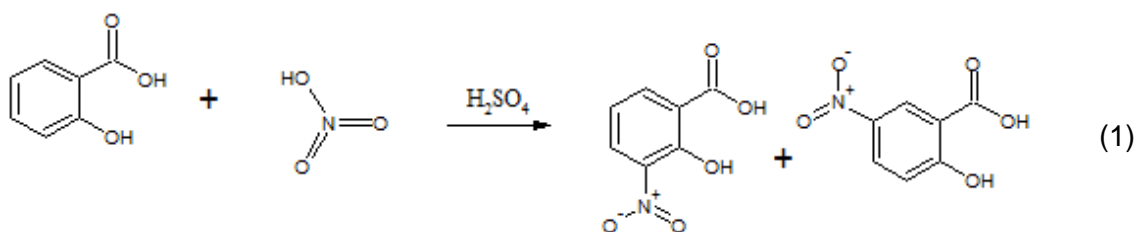
Pokud je zelenina uchovávána v chladničce, dochází k mikrobiologické redukci dusičnanů na dusitany. Při uchovávání zeleniny v mrazáku k redukci nedochází. Z tohoto důvodu se množství dusičnanů po stanovení jen nepatrně lišilo (< 11 %) od jejich obsahu v čerstvé zelenině [11].

2.5 Stanovení dusičnanů

Pro stanovení dusičnanů existují desítky metod. Žádnou z metod nelze označit za nejsprávnější a univerzální. U každé metody se uplatňují různé rušivé složky. Největší skupinou používaných metod stanovení dusičnanů tvoří spektrofotometrické metody.

Spektrofotometrické stanovení dusičnanů kyselinou sulfosalicylovou

Principem stanovení je spektrometrické stanovení žlutě zbarvených nitroderivátů kyseliny salicylové, které se vybarvují po zalkalizování roztoku. Kyselina dusičná uvolněná kyselinou sírovou z dusičnanů obsažených v roztoku nitruje kyselinou salicylovou dle rovnice 1. Intenzita zbarvení roztoku vzniklých produktů je úměrná obsahu dusičnanů ve vzorku [23]. Hlavní rušivé složky jsou chloridy, fosforečnany, hořčík a dvojmocný mangan [24]. Obrázek 1 ukazuje příklad spektrofotometru pro stanovení dusičnanů touto metodou.



Obrázek 1: Spektrofotometr RD 3900 od firmy HACH LANGE [25]

Spektrofotometrické stanovení dusičnanů s 2,6-dimethylfenolem

Dusičnany reagují s 2,6-dimethylfenolem v přítomnosti kyseliny sírové a kyseliny fosforečné za vzniku cihlově červeného 2,6-dimethyl-4-nitrofenolu. Tato metoda využívá zkumavek. Dusičnany lze stanovit do koncentrace $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Mezi rušivé vlivy patří chloridy, nerozpuštěné látky, vlastní zbarvení vzorku. Pozitivní chybu způsobují dusitany, které tvoří s 2,6-dimethylfenolem červený produkt 2,6-dimethyl-4-nitrosofenol. Eliminace této chyby se zajišťuje amidosírovou kyselinou [26].

Stanovení dusitanového dusíku a dusičnanového dusíku a sumy obou průtokovou analýzou (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí

V průtokové injekční analýze (FIA) je vzorek přiváděn do plynule protékajícího tlumivého roztoku vstřikovacím ventilem. V kontinuální průtokové analýze (CFA) je vzorek nepřetržitě směřován s tlumivým roztokem. Dusičnany jsou v roztoku redukovány na dusitany kovovým kadmíem. Nato se přimíchává rovněž plynule protékající roztok činidla v kyselině fosforečné. Původně přítomné dusitany a dusitany, vzniklé po redukcí dusičnanů, diazotují sulfanilamid v kyselém roztoku na diazoniovou sůl, která je následně kopulována s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem za vzniku červeného barviva. Dusitanový dusík se stanoví s vynecháním redukce kadmíem. Hmotnostní koncentrace dusičnanového dusíku je dána rozdílem dusitanového a dusičnanového (N) minus dusitanový (N). Rušivými vlivy jsou nerozpuštěné látky a organické matrice. pH vzorku po smísení s tlumivým roztokem musí být v rozmezí 6,5 – 7,5 [27].

Stanovení rozpuštěných aniontů metodou kapalinové chromatografie iontů

Vzorek se upraví tak, aby se odstranily nerozpuštěné látky a ionty kovů. Sledované ionty jsou separovány kapalinovou chromatografií. Jako stacionární fáze se používá měnič aniontů a jako mobilní fáze pro izokratickou nebo gradientovou eluci se používají vodné roztoky solí slabých jedno- nebo dvojsytných kyselin (hydrogenuhličitany, uhličitany) a roztoky hydroxidů. K detekci se používá vodivostní detektor. Rušivými vlivy jsou organické kyseliny a kovy [28].

Stanovení dusičnanů spektrofotometrií v ultrafialové oblasti spektra

Stanovení je založeno na přímém měření absorbance dusičnanů v ultrafialové oblasti spektra při vlnové délce $\lambda = 220 \text{ nm}$. Mezi rušivé vlivy patří zákal, barva vzorku, organické látky, chrom [16].

Nepřímé stanovení dusičnanů po redukcí na amoniakální dusík Devarovou slitinou

Stanovení je založeno na redukcí dusičnanů na amoniakální dusík vodíkem ve stavu zrodu, který vzniká při reakci Devarovy slitiny (slitina Cu-Zn-Al) s hydroxidem sodným. Amoniak se oddestiluje z reakční směsi a stanoví se spektrofotometricky nebo odměrně. Rušivý vliv má amoniakální dusík, organické látky a dusitany, které způsobují pozitivní chybu stanovení [16].

Stanovení dusičnanů polarograficky

Tato metoda je založena na redukci dusičnanů na oxid dusnatý. Ten dále v roztoku reaguje s dvojmocným kobaltem a thiokyanatany za vzniku elektroaktivního komplexu. Vzniklý komplex je redukován na rtuťové kapkové elektrodě při napětí 0,5 V [29].

Stanovení dusičnanů iontově selektivní elektrodou

Membrána elektrody je tvořena inertní polyvinylchloridovým (PVC) rozpouštědlem s dusičnanovým iontoměničem. Ionově selektivní elektroda (Obrázek 2) obsahuje ve vnitřním roztoku srovnávací argentochloridovou elektrodu, která má stálý potenciál. Na iontově selektivní membráně dochází k zachycení dusičnanových iontů ze vzorku, což vytváří potenciál, který je dán rozdílnými potenciály na vnitřní a vnější straně membrány. Potenciál je přímo úměrný koncentraci dusičnanů ve vzorku. Rušivý vliv mají chloristany, jodidy, dusitany, bromidy a chloridy [30].

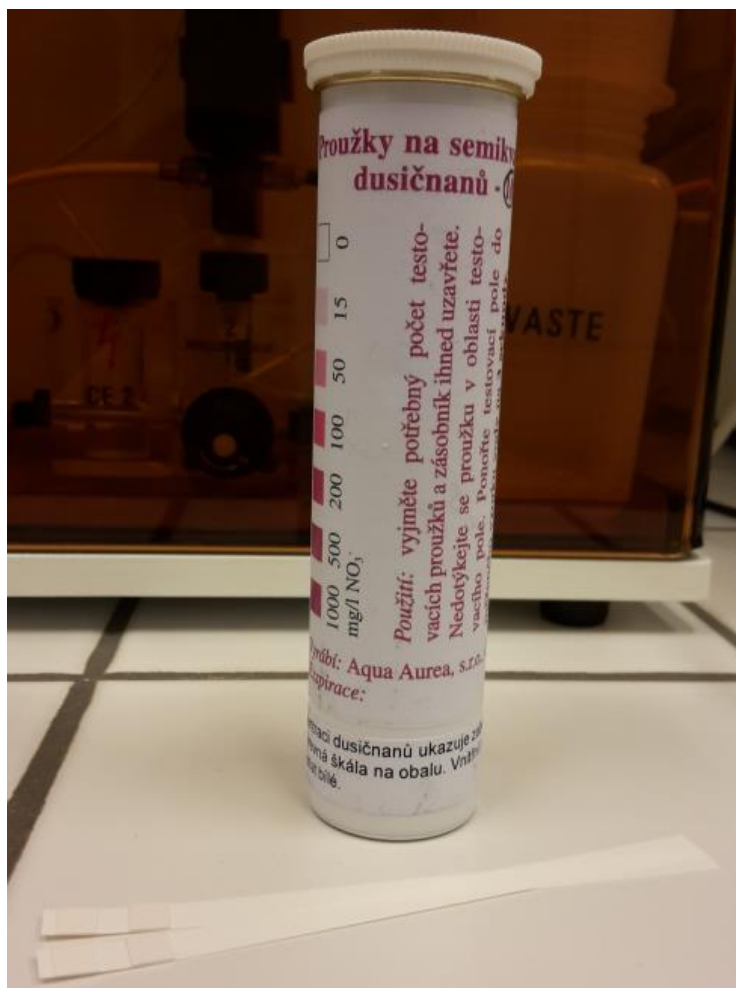


Obrázek 2: Dusičnanová iontově selektivní elektroda od firmy METTLER TOLEDO [31]

Diagnostické papírky

Diagnostické papírky (Obrázek 3) se používají k rychlému a orientačnímu stanovení dusičnanů.

Testovací proužek se ponoří na 3 sekundy do měřeného vzorku rozmixované zeleniny, vytáhne se, odstraní se přebytečné množství zeleniny ulpěné na proužku a dá se na podložku testovacím polem nahoru. Po uplynutí 2 minut se porovná zbarvení testovacího pole s barevnou stupnicí na lahvičce [32].

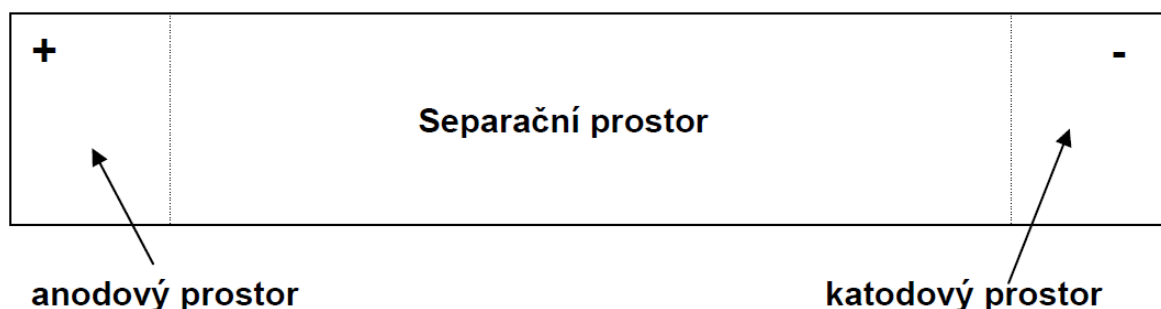


Obrázek 3: Diagnostické papírky pro stanovení dusičnanů

2.6 Stanovení dusičnanů metodou kapilární izotachoforézy

Kapilární izotachoforéza (CITP) je jednou z nejstarších kapilárních elektromigračních metod. Je založena na migraci iontů v elektrickém poli. Umožňuje získat v krátké době snadno vyhodnotitelné údaje o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku. CITP používá dva separační elektrolyty, které se nazývají vedoucí (*leading*) a koncový (*terminating*). V jednom izotachoforetickém experimentu mohou být separovány pouze ionty jediného znaménka, buďto anionty nebo kationty. Metoda tedy není použitelná pro separaci neutrálních molekul. Analyzovaný vzorek se dávkuje mezi vedoucí a koncový elektrolyt a vytváří mezi nimi rozhraní. Vedoucí elektrolyt obsahuje ion daného náboje s největší pohyblivostí. Naopak koncový elektrolyt obsahuje ion s nejmenší pohyblivostí. Po spuštění separačního napětí, začnou putovat analyty ze vzorku i ionty z vedoucího a koncového elektrolytu stejnou elektroforetickou rychlostí separační kapilárou směrem k detektoru. Během tohoto migračního pohybu se ionty ze vzorku začnou řadit za iontem vedoucího elektrolytu podle klesající elektroforetické pohyblivosti a vytváří tak oddělené, na sebe navazující zóny [33, 34, 35, 36]. Záznam CITP separace (izotachoforeogram) má charakteristický stupňovitý průběh, ve kterém výška stupně odpovídá kvalitě separované látky a délka stupně je přímo úměrná její kvantitě [37].

Zařízení, ve kterém probíhá dělení, je rozděleno na tři části, a to separační, katodový a anodový prostor (Obrázek 4). Při separaci je anodový a separační prostor vyplněn vedoucím elektrolytem, který kromě vedoucího aniontu obsahuje i kation, tzv. protiion, (*counterion*) a vytvářejí spolu pH tlumící směs. Katodová část je vyplněna roztokem zakončujícího elektrolytu [4].



Obrázek 4: Obecné schéma zařízení pro izotachoforetickou separaci [4]

Kapilární izotachoforéza používá separační kapiláry, které negenerují osmotický tok. Separace se provádí v kapilárách o vnitřím průměru několik desítek mikrometrů, zhotovených zpravidla z taveného křemene nebo polytetrafluorethylenu (PTFE). PTFE-kapiláry nenesou na svém vnitřním povrchu žádné disociovatelné funkční skupiny. U křemenných kapilár je vnitřní stěna pokryta např. vrstvičkou hydroxyethylcelulose [34]. Konce kapilár jsou spojeny elektrodovými komůrkami, které obsahují odpovídající elektrolyty a platinové elektrody ke spojení se zdrojem vysokého napětí. Mezi komůrkou s vedoucím elektrolytem a kapilárou je umístěna semipermeabilní membrána, která zabraňuje hydrodynamickému toku elektrolytu [38].

Všechny kapilární elektromigrační metody vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, velkou účinností separace, vysokou rychlostí analýzy a krátkou dobou potřebnou na optimalizaci separačních podmínek. Naopak hlavní nevýhodou této separační techniky je menší reprodukovatelnost a nižší citlivost [34].

2.6.1 Elektroforetická pohyblivost

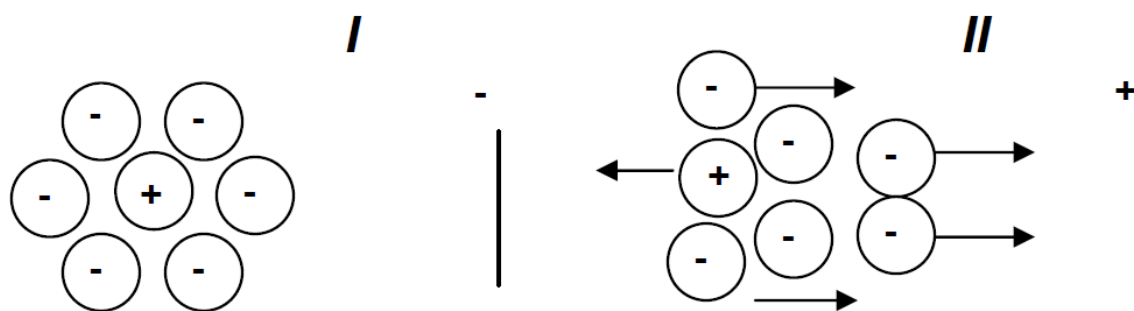
Aby byly ionty úspěšně separovány, je potřeba znát iontovou pohyblivost látek. Pokud nelze hodnotu iontové pohyblivosti získat z literárních zdrojů, lze ji odhadnout ze srovnání se známými pohyblivostmi podobných iontů. Pohyblivost iontu roste úměrně jeho náboji a klesá s jeho hmotností [35].

Elektroforetická pohyblivost (mobilita), μ , je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$\mu = \frac{v}{E} \left(\frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} \right) \quad (2)$$

kde v je rychlost pohybu v elektrickém poli o intenzitě E . Hodnotě pohyblivosti se přisuzuje znaménko odpovídající náboji příslušného iontu.

Nabitá částice se vlivem elektrického pole pohybuje ve směru daném znaménkem náboje a orientací elektrického pole. Proti této elektrické síle působí frikční odpor kladený rozpouštědlem, který je přímo úměrný viskozitě rozpouštědla. Ion je v klidové poloze obklopen opačně nabitými ionty. Při pohybu se ion snaží táhnout opačně nabité ionty s sebou. Ty se ale vlivem setrvačnosti nemohou přizpůsobit nové poloze středového iontu. Za iontem se vytváří přebytek opačného náboje, který způsobuje elektrostatické brzdění, a zpomaluje tak pohyb ve směru elektrického pole. Tento efekt se nazývá asymetrický a znázorňuje jej Obrázek 5. Čím vyšší je koncentrace iontů, tím více se uplatňuje. Další efekt snižující pohyblivost se nazývá elektrostatický. Ionty obklopující středový ion se také pohybují, a to opačným směrem. Jsou solvatovány, takže se snaží unášet molekuly rozpouštědla s sebou, a tím dochází k toku rozpouštědla v opačném směru.



Obrázek 5: Asymetrický efekt; (I) ion v klidové poloze; (II) ion pohybující se v elektrickém poli

Efektivní pohyblivost

U slabých elektrolytů, které obsahují jak ionty, tak neionizované molekuly, se zavádí pojem efektivní pohyblivost. Látka přítomná v roztoku ve více formách, které jsou v dynamické rovnováze, migruje elektrickým polem jako jediná látka o určité efektivní pohyblivosti:

$$\overline{\mu}_A = \frac{1}{c_A} \sum_{i=0}^k c_i \cdot \mu_i = \sum_{i=0}^k x_i \cdot \mu_i \quad (3)$$

kde c_i jsou koncentrace jednotlivé formy látky A v roztoku o celkové koncentraci \overline{c}_A a x_i jsou molární zlomky jednotlivých forem látky A.

Rozdíly v efektivních pohyblivostech způsobují rozdíly v rychlosti pohybu, díky němuž jsou nabitě částice separovány [4].

2.6.2 Systém izotachforetických zón a jeho vlastnosti

Vedle rovnice 2 musí být v každém místě separačního prostoru splněny čtyři podmínky:

1. Ohmův zákon

$$i = E \cdot \kappa \quad (4)$$

kde κ je specifická vodivost elektrolytu a i proudová hustota, která je konstantní pro daný separační prostor o průřezu S a hnacím proudem I .

2. Podmínka elektroneutality

$$\sum_{i=1}^n z_i \cdot c_i = 0 \quad (5)$$

Tato podmínka říká, že součet nábojů kationtů a aniontů musí být v každém makroskopickém objemu stejný.

3. Rovnice kontinuity

$$\frac{\partial c_i}{\partial t_i} = \text{sign} \cdot z \cdot \mu_i \cdot E \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (6)$$

popisující časové změny koncentrace jednotlivých iontů v daném místě separační trasy.

4. Kohlrauschova regulační ω -funkce

$$\omega(x) = \sum_{i=1}^n \frac{c_i(x) \cdot z_i}{\mu_i} \quad (7)$$

Rovnice je platná pro silné jedno- i vícesytné elektrolyty a pro slabé jednomocné elektrolyty. Vyjadřuje, že v každé části zařízení naplněné daným elektrolytem má ω -funkce v závislosti na složení a koncentraci konstantní hodnotu v místě souřadnice x .

Na počátku izotachforetické analýzy jsou přítomny tři zóny s různou hodnotou regulační funkce (zóna vedoucího elektrolytu, vzorku a zakončujícího elektrolytu). V průběhu separace se musí migrující zóny vzorku a zakončujícího elektrolytu koncentračně přizpůsobit původní hodnotě ω -funkce v zóně vedoucího elektrolytu. Po určité době se dosáhne tzv. ustáleného stavu, kdy dojde k rozdělení zón, které jdou těsně za sebou a pohybují se stejnou rychlostí. Pro tento stav je charakteristické, že:

- Každá ze zón obsahuje pouze jeden druh iontů.
- Ve všech zónách je přítomen stejný protiion shodný s protiionem vedoucího elektrolytu.
- Koncentrace příslušného iontu je podél zóny konstantní a mimo ni nulová.
- Zóny jsou uspořádány podle klesající efektivní pohyblivosti od vedoucího k zakončujícímu iontu
- Fyzikální vlastnosti (koncentrace, elektrická vodivost, intenzita elektrického pole, pH, teplota) se mění od zóny k zóně skokem. Díky tomu můžeme použít fyzikálně-chemických metod detekce pro vyhodnocení separace.

2.6.3 Jevy provádějící separaci

Elektroosmóza

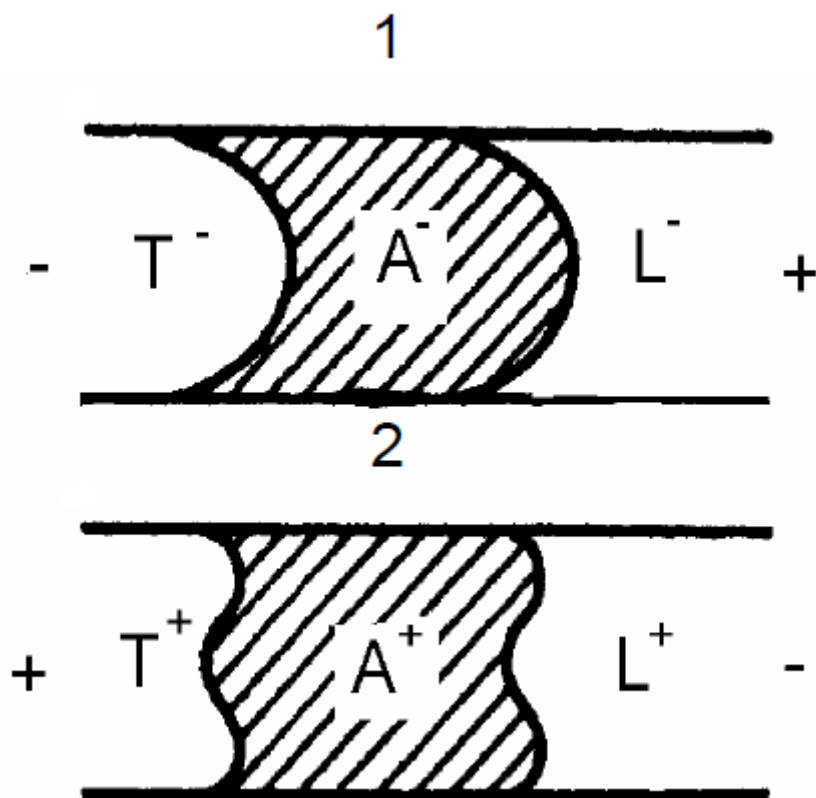
Při naplnění kapiláry roztokem dochází v závislosti na pH tohoto roztoku k ionizaci funkčních skupin, které jsou vázány na vnitřní stěnu kapiláry. Kapilára tak získá náboj a elektrostaticky přitahuje opačné ionty v roztoku ke stěně za vzniku elektrické dvojvrstvy. Ta se skládá z tzv. Sternovy vrstvy a pohyblivé vrstvy. Sternova vrstva je tvořena ionty, které jsou pevněji elektrostaticky vázané na stěnu kapiláry. Pohyblivá neboli difúzní vrstva je vnější část tvořená ionty, které jsou již slaběji vázané a difúzně vyměňované s roztokem. Po vložení napětí na kapiláru začne roztokem procházet elektrický proud a docházet k hydrodynamickému toku kapaliny.

Rychlost toku kapaliny v kapiláře v_{EOF} lze určit pomocí tzv. Smoluchowského rovnice:

$$v_{EOF} = -\frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \cdot E \quad (8)$$

kde ε je permitivita roztoku, ζ elektrokinetický potenciál (zeta-potenciál) a η je viskozita roztoku.

V CIP je elektroosmóza potlačována, protože jejím vlivem dochází k deformaci izotachforetických zón (Obrázek 6), a tím k jejich rozostření. Obrázek 6 ukazuje, že tento negativní vliv je markantnější při aniontové analýze. Elektroosmózu lze redukovat buďto zvýšením viskozity roztoku přidáním vhodného aditiva (různé druhy celulózy), nebo snížením elektrokinetického potenciálu přidáním neionogenního smáčedla (poly(vinylalkohol), poly(ethylenglykol), Triton), či modifikací vnitřního povrchu kapiláry [4].



Obrázek 6: Deformace rozhraní mezi zónami vlivem elektroosmózy při aniontové (1) a kationtové (2) ITP analýze (L je vedoucí ion, T je zakončující ion a A je ion analytu) [4]

Joulovo teplo

Průchodem elektrického proudu roztokem v kapiláře dochází k ohřevu roztoku, a tím ke vzniku Joulova tepla. Joulovo teplo P produkované jednotkovým objemem za sekundu se vyjadřuje jako

$$P = \frac{EI}{S} = \frac{I^2}{\kappa S^2} \quad (9)$$

Zvyšující se teplota uvnitř kapiláry způsobuje změny veličin závislých na teplotě (aktuální pohyblivost, ionizační rovnováhy). Může také způsobit destrukci termolabilních látek. Vliv ohřevu je omezován odváděním vzniklého tepla termostátováním či úpravou tlakových podmínek [4]. Teplota uvnitř kapiláry je rozdílná s teplotou na vnitřní stěně. Ztráta tepla v kapiláře závisí na celkovém teple transportovaném skrz stěnu kapiláry. Toto teplo se může lišit v různých částech kapiláry kvůli rozdílným tepelným vodivostem a součiniteli přestupu tepla. Také rozdílná elektrická vodivost v různých místech roztoku způsobuje rozdílné Joulovo teplo a tím různé teploty v zónách. Pokud putuje mezi vedoucí a koncovou zónou krátká zóna analytu, bude její teplota ovlivněna teplotami vedoucí a koncové zóny a nebude odpovídat ustálené hodnotě, jakou by měla dostatečně dlouhá zóna analytu [4,39].

Gravitace

Vlivem neideálního chlazení se objevují v zónách rozdílné hustoty a vlivem gravitačního působení dochází k proudění kapaliny, které vede k deformaci rozhraní zón. Separční kapilára může být orientována jak horizontálně, tak vertikálně. Jestliže má analyzovaný vzorek při vertikálním uspořádání kapiláry větší hustotu než vedoucí elektrolyt, dochází vlivem gravitace k „propadávání“ vzorku kapilárou, a tím k jeho znehodnocení. Gravitaci lze potlačit separací vzorku v inertních nosičích a gelech, v tenké kapiláře, v hustotním gradientu neionogenní látky, v podmínkách nulové gravitace, stabilizací zón rotací.

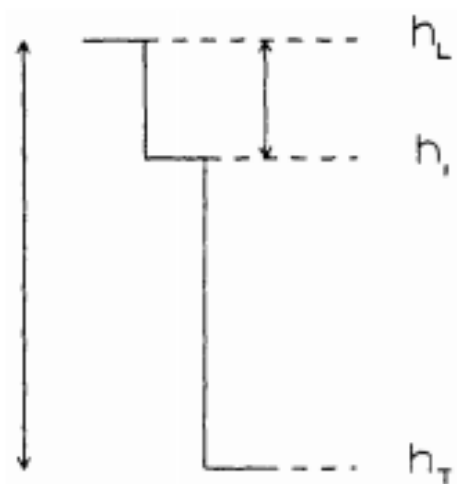
Difúze

Na rozhraní mezi izotachoforetickými zónami se koncentrace látek mění skokem. Ve svých vlastních zónách mají látky adjustované koncentrace a v sousedních zónách mají koncentraci nulovou. Výsledkem je difúzní tok ve směru klesající koncentrace. Proti tomuto toku působí samozaostřovací efekt. Když ion difunduje do předcházející zóny, poklesne jeho rychlosti migrace v důsledku nižší intenzity elektrického pole v této zóně. Poklesem rychlosti migrace se ion vrátí do příslušné zóny. Výsledkem těchto protichůdných dějů má rozhraní mezi izotachoforetickými zónami reálný podélný rozměr nazývaný šířka rozhraní [35].

2.6.4 Kvalitativní analýza

Při kvalitativní analýze se určuje relativní poloha neboli výška schodu (Obrázek 7) vzhledem k poloze vedoucího a koncového elektrolytu. Tato poloha se vypočítá dle rovnice 10.

$$h_{rel} = \frac{h_L - h_I}{h_L - h_T} \quad (10)$$



Obrázek 7: Znázornění izotachoforeogramu

Tato relativní výška je následně porovnávána s relativními výškami zón látek, jejichž přítomnost se ve vzorku předpokládá. Potvrzení stanovované látky je možné přidavkem standardu do vzorku a další měření. Délka zóny stanovované látky se vzhledem k ostatním zónám prodlouží [36].

2.6.5 Kvantitativní analýza

Délka zón se po dosažení ustáleného stavu s časem nemění a je úměrná množství látky v analyzovaném vzorku. Koncentrace látky je určena koncentrací vedoucího iontu a je konstantní po celé délce zóny podle Kohlrauschovy regulační ω -funkce. Díky konstantní rychlosti zóny je čas, po který je zóna v detektoru, úměrný její délce [4].

Nejjednodušší způsob při kvantitativní analýze je sestavení kalibrační přímky, kdy se získá grafická závislost délky zóny na koncentraci látky. Tento způsob se používá hlavně u sériových analýz. U jednotlivých analýz se také používá metoda standardního přidavku, kdy se délka zóny původního vzorku srovnává s délkou zóny vzorku s přidavkem standardu [36].

2.7 Praktické využití kapilární izotachoforézy

Jako jedna z možností využití kapilární izotachoforézy je stanovení organických i anorganických polutantů ve všech typech vod. Stanovují se například organické kyseliny, fenoly, nitrofenoly, aldehydy, kvartérní amoniové sloučeniny, herbicidy a insekticidy [40]. Anorganické ionty se mohou stanovit nejen ve vodě, ale i v potravinách a krmivech [41]. Další možností je stanovení dusičnanů a dusitanů v mastných výrobcích, kam se tyto ionty přidávají jako inhibitory růstu bakterií [42]. Kluska nedávno publikoval nový postup úspěšného stanovení rtuťnatých iontů ve vodním prostředí kapilární izotachoforézou [43].

V posledních letech se stále více využívá kapilární izotachoforézy na čipu. Těsnicí deska mikročipu je z polymethylmethakrylátu (PMMA) a obsahuje vodivostní detektor. Tato deska obsahuje 2 páry platinových elektrod, oba v kontaktu s vodivostním detektorem a napájením. Kanálový systém je vybaven dvěma dávkovacími smyčkami různých objemů a dvěma separačními kapilárami, které umožňují dvojdimenzionální (ITP – ITP) stanovení. Po testování tohoto zařízení se ukázalo, že tento čipový návrh může být velmi reprodukovatelně provozován za předpokladu, že systém je hydrodynamicky uzavřen a elektroosmotický tok je potlačován přítomností vhodné povrchově aktivní látky. ITP v mikro měřítku je moderní alternativa, která nabízí mnohem větší flexibilitu v nastavení, než je možné u klasických kapilárních systémů. Nevýhodou naopak je nižší citlivost a výkon. Tato technika se využívá například ve farmaceutickém průmyslu, v analýze potravin, lipoproteinů a nukleových kyselin [44, 45, 46, 47].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro izotachoforetické stanovení dusičnanů v zelenině je možno využít postupu doporučeného v Aplikačním listu (Příloha 1).

Pro analýzu je třeba nejprve vzorek upravit. Jednou z možností je homogenizování vzorku nastroháním či rozmixováním. Do 100 ml širokohrdlé odměrné baňky se odváží 10 g zhomogenizovaného vzorku. K navážce se přidá asi 50 ml destilované vody a směs se extrahuje 5 minut na ultrazvukové lázni. Po doplnění odměrné baňky po značku destilovanou vodou a filtraci se roztok analyzuje.

Stanovení probíhá v systému vedoucího elektrolytu, kterým je směs $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové, $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan (BTP) a 0,1% (hydroxypropyl)methyl celuloza (HPMC), a koncového elektrolytu – $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ mravenčanu amonného.

Předpokládaná doba analýzy je 15 minut [48].

3.1 Seznam chemikálií

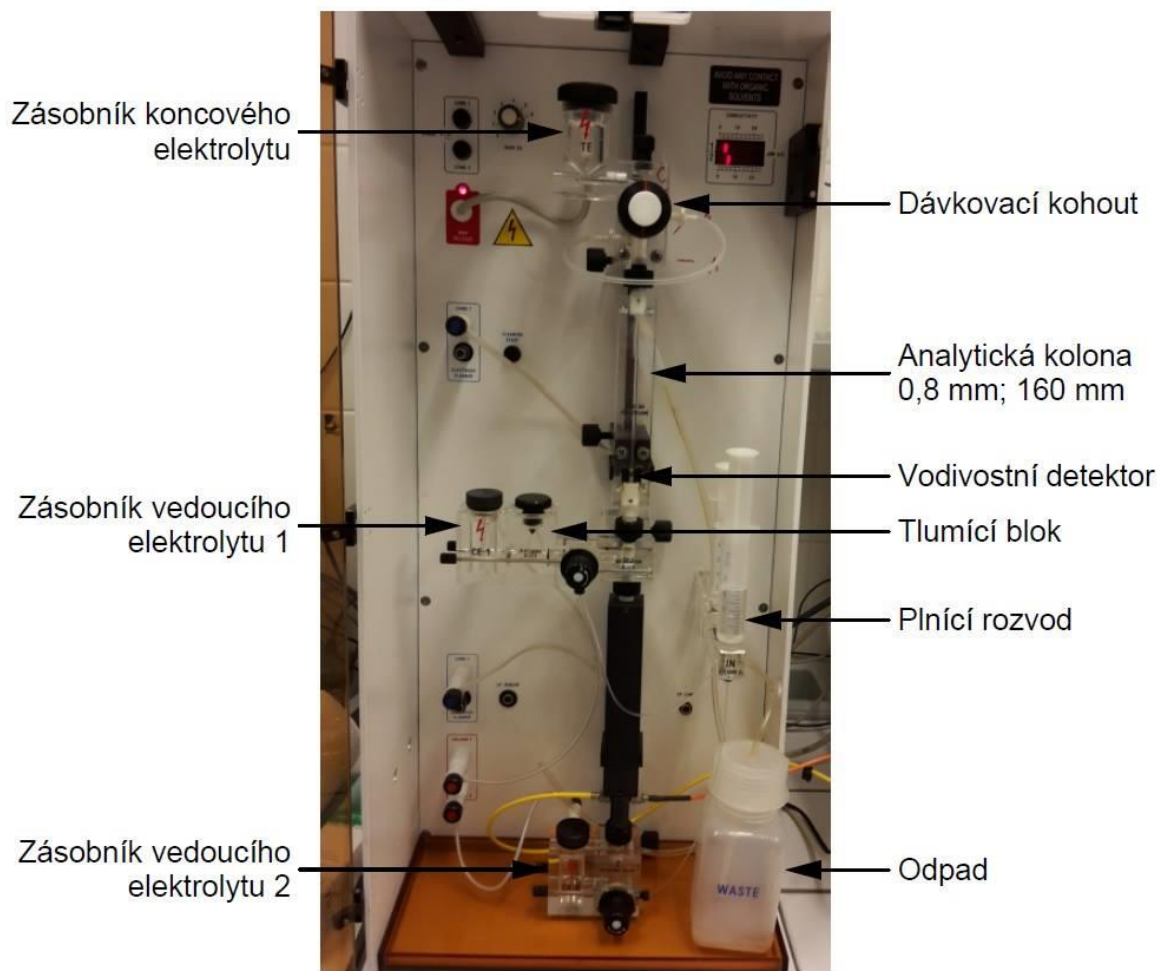
Bylo potřeba připravit roztoky vedoucího a koncového elektrolytu, na které byly použity níže vypsane látky. Na vytvoření kalibrační křivky byl použit roztok dusičnanu draselného (KNO_3).

- Vedoucí elektrolyt
 - $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselina chlorovodíková (HCl); p.a., PENTA
 - $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ BTP; >99%, Fluka
 - 0,1% HPMC; n.a., ALDRICH

- Koncový elektrolyt
 - $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselina citrónová monohydrát; p.a., PENTA

3.2 Seznam přístrojů

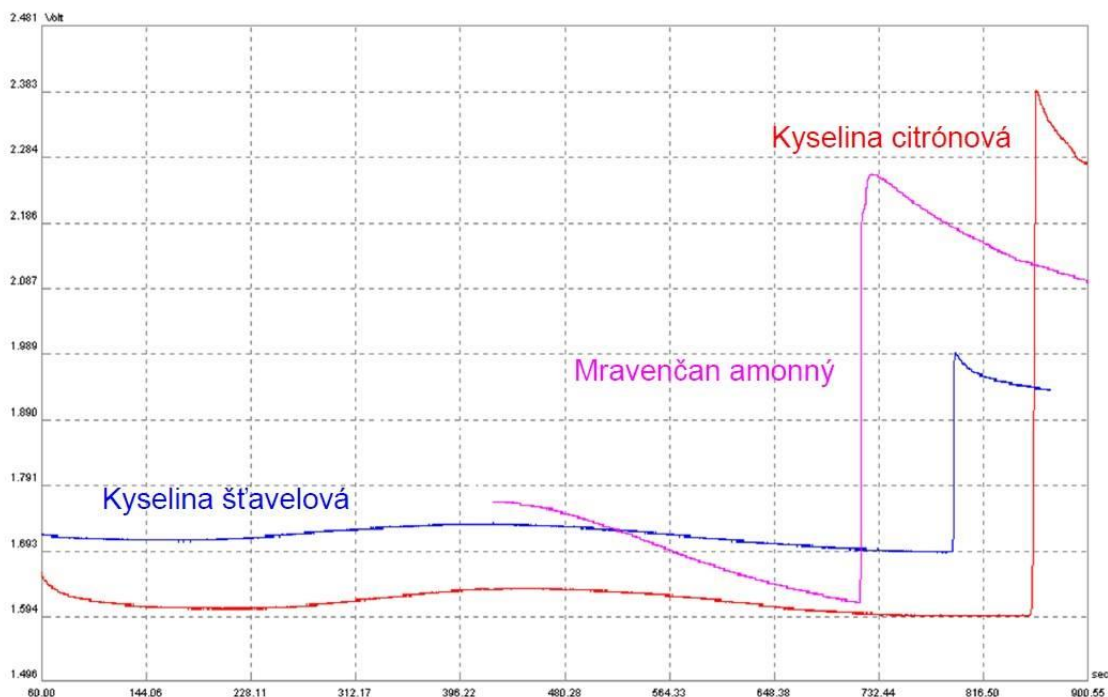
Při přípravě roztoků byly všechny látky v pevném skupenství zváženy na analytických vahách SCALTEC (max 210 g, d = 0,1 mg). Během úpravy zeleniny byly na odvážení použity předvážky DENVER INSTRUMENTS (max 2 000 g, d = 0,5 g). Směs byla extrahována v ultrazvukové lázni TESLA Teson 4. Stanovení množství dusičnanů bylo provedeno elektroforetickým analyzátelem Villa Labeco 100 (Obrázek 8).



Obrázek 8: Elektroforetický analyzátor Villa Labeco 100

3.3 Výběr vhodného koncového elektrolytu

Podle aplikačního listu pro stanovení dusičnanů v zelenině by měl být použit jako koncový elektrolyt $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ mravenčan amonný. Odezva tohoto koncového elektrolytu nebyla dle očekávání, proto bylo rozhodnuto o výměně elektrolytu za $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselinu šťavelovou. Odezva již byla vyšší. Nakonec byla vyzkoušena $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselina citrónová. Ta měla největší odezvu, proto byla vybrána jako nejvhodnější koncový elektrolyt. Obrázek 9 uvádí odezvy všech koncových elektrolytů.



Obrázek 9: Odezvy koncových elektrolytů

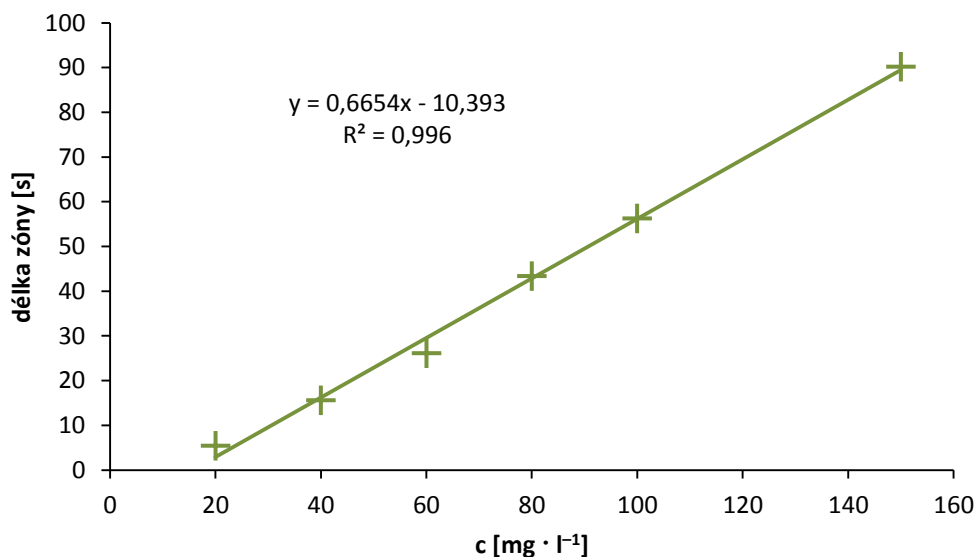
Měření bylo rozděleno do dvou kroků (viz Tabulka 4). V prvním kroku byl nastaven proud $250 \mu\text{A}$ po dobu 400 sekund. Poté byl až do konce analýzy proud $80 \mu\text{A}$. Při těchto podmínkách byly měřeny všechny roztoky vzorků zeleniny i kalibrační roztoky.

Tabulka 4: Parametry metody pro stanovení dusičnanů

Počet kroků	Čas [s]	Proud [μA]	Kolona	Detektor
1	400	250	horní	–
2	3 000	80	horní	vodivostní

3.4 Kalibrační křivka dusičnanů

Pro stanovení dusičnanů v zelenině bylo nejprve potřeba vytvořit kalibrační křivku. Byly připraveny roztoky o koncentracích 20, 40, 60, 80, 100 a 150 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledné grafické zpracování je uvádí Obrázek 10.



Obrázek 10: Kalibrační křivka dusičnanů

3.5 Mez detekce a kvantifikace

Mez detekce (*Limit Of Detection – LOD*) a mez kvantifikace (*Limit Of Quantification – LOQ*) byly vypočítány pomocí rovnice 11 a rovnice 12.

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{a} \quad (11)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{a} \quad (12)$$

kde h_n je šum na základní linii a a je směrnice kalibrační přímky. Výsledné hodnoty LOD a LOQ zobrazuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Hodnoty LOD a LOQ pro dusičnanový anion

Anion	LOD [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	LOQ [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
NO_3^-	17,98	59,93

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Příprava vzorků

Zelenina byla oloupána a nejmenší nastrohávána do kádinky. Bylo přidáno tolik destilované vody, aby zelenina byla desetkrát zředěna. Zelenina v bio kvalitě a zelenina z MY FOOD byla zředěna pouze dvakrát, protože u této zeleniny je předpokládán nižší obsah dusičnanů. Poté byl roztok ponechán 5 minut v ultrazvukové lázni. Nakonec byl roztok přefiltrován a zbaven tak kousků zeleniny (Obrázek 11).



Obrázek 11: Příprava vzorků pro analýzu

4.2 Stanovení obsahu dusičnanů v zelenině

Zelenina byla nakoupena jak ze supermarketů, kde byl brán ohled na zemi původu, tak z lokálních trhů (viz níže). Všechny hodnoty koncentrace dusičnanů stanovené kapilární izotachoforézou se vešly do limitních hodnot až na hlávkový salát z České republiky, který přesáhl hodnotu dusičnanů o 11 %. U tohoto salátu byly už na první pohled viditelné bílé skvrnky, takže se předpokládalo vyšší množství NO_3^- . Při stanovení obsahu dusičnanů v celeru, ledovém salátu a květáku nebyla nalezena žádná CITP odezva při analýze výluhu. U brambor, červené řepy a ředkviček bylo množství dusičnanů pod limitem kvantifikace. Množství dusičnanů obsažených v zelenině závisí na původu rostliny. Například u mrkve, která byla dovezena z Belgie a Velké Británie, se množství dusičnanů lišilo o 57 %. U každé zeleniny bylo také provedeno orientační stanovení dusičnanů pomocí diagnostických papírků. Výsledky stanovení znázorňuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Obsah dusičnanů v supermarketech

Zelenina	Země původu	Délka zóny [s]	Koncentrace [mg · kg ⁻¹]	Orientační stanovení z diagnostických papírků [mg · kg ⁻¹]
brambory (BILLA – 18. 3. 2015)	Česká republika	<LOQ	–	–
celer (LIDL – 9. 3. 2015)	Česká republika	<LOD	–	–
červená řepa (BILLA – 18. 3. 2015)	Česká republika	<LOQ	–	–
kedluben (BILLA – 18. 3. 2015)	Itálie	73,6	1 262,3	1 000
květák (LIDL – 15. 3. 2015)	Španělsko	<LOD	–	–
salát hlávkový (Židlochovice – 22. 3. 2015)	Česká republika	477,83	7 337,4	1 000
salát hlávkový (BILLA – 5. 5. 2015)	Belgie	149,68	2 405,7	1 000
salát ledový (LIDL – 15. 3. 2015)	Španělsko	<LOD	–	–
mrkev (LIDL – 15. 3. 2015)	Belgie	186,06	2 952,4	1 000
mrkev (TESCO – 24. 3. 2015)	Velká Británie	73,53	1 261,3	1 000
petržel (BILLA – 18. 3. 2015)	Slovenská republika	90,17	1 511,3	1 000
petržel (LIDL – 9. 3. 2015)	Česká republika	49,10	894,1	1 000
ředkev bílá (BILLA – 4. 5. 2015)	Itálie	114,37	1 875,0	1 000
ředkvičky (LIDL – 15. 3. 2015)	Itálie	<LOQ	–	–

Dále byla vybrána zelenina z trhu na Moravském náměstí v Brně od soukromých zemědělců (Tabulka 7). Brambory, celer a ředkvičky byly vypěstovány zemědělci, u kterých byla zelenina nakoupena. Kedlubna již byla dovozem z Německa a jako jediná obsahovala nižší množství dusičnanů, než kedlubna zakoupená v supermarketu. U brambor, celeru a kedlubně bylo množství dusičnanů pod limitem kvantifikace. Ředkvičky měly ve srovnání se zeleninou zakoupenou v supermarketech vyšší obsah NO_3^- .

Tabulka 7: Obsah dusičnanů v zelenině z Moravského náměstí ze dne 23. 3. 2015

Zelenina	Délka zóny [s]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	Orientační stanovení z diagnostických papírků [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]
brambory	<LOQ	–	–
celer	<LOQ	–	–
kedluben	<LOQ	–	–
ředkvičky	140,31	2 264,9	1 000
ředkvičky	121,37	1 980,2	1 000

Zelenina s označením bio byla nalezena pouze ve farmářské prodejně Sklizeno v Brně. Zde byla vybrána mrkev a červená řepa. Výsledná koncentrace byla u obou druhů výrazně nižší než u zeleniny ze supermarketů. Další zelenina byla získána z prodejny MY FOOD, kde zelenina nebyla označena jako bio, ale dle strategie prodejny by měla být ve velmi vysoké kvalitě. Kedlubna a petržel obsahovaly nižší koncentraci dusičnanů, která byla pod limitem detekce. U celeru bylo množství dusičnanů pod limitem kvantifikace. Výsledné hodnoty dusičnanů znázorňují Tabulka 8 a Tabulka 9.

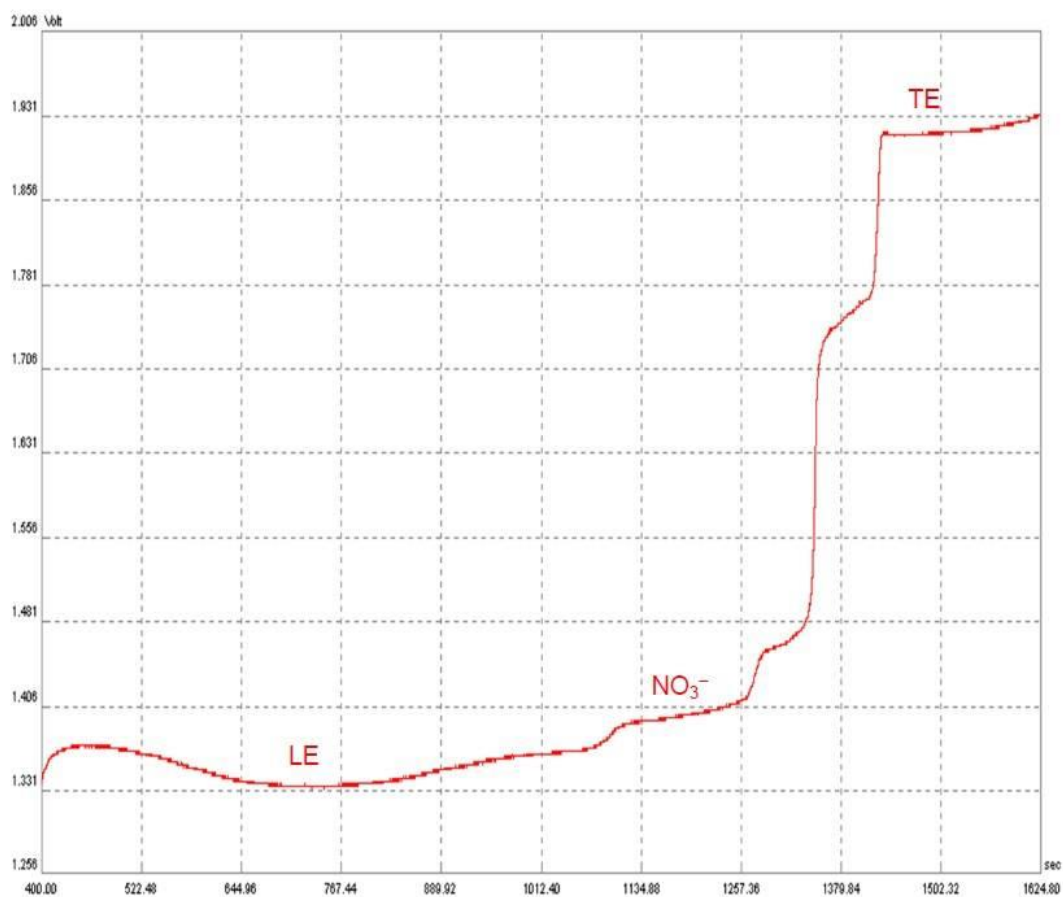
Tabulka 8: Bio zelenina z prodejny Sklizeno ze dne 23. 3. 2015

BIO zelenina	Délka zóny [s]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	Orientační stanovení z diagnostických papírků [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]
červená řepa	93,61	312,6	500
mrkev	61,11	214,9	200

Tabulka 9: Obsah dusičnanů v zelenině z MY FOOD ze dne 29. 3. 2015

Zelenina	Délka zóny [s]	Koncentrace [mg · kg ⁻¹]	Orientační stanovení z diagnostických papírků [mg · kg ⁻¹]
Brambory (Egypt)	154,92	496,9	500
celer (Rakousko)	<LOQ	–	–
kedluben (Česká republika)	<LOD	–	–
ledový salát (Česká republika)	84,05	283,9	500
petržel (Česká republika)	<LOD	–	–
šalotka (Francie)	143,42	462,3	500

Obrázek 12 představuje izotachforeogram při stanovení ředkvičky zakoupené na Moravském náměstí.



Obrázek 12: Analýza vzorku ředkvičky

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit množství dusičnanů v běžně dostupných druzích zeleniny metodou kapilární izotachoforézy a srovnat výsledky s orientačním stanovením pomocí diagnostických papírků. Téměř všechna zelenina vybraná pro stanovení splňovala povolené množství dusičnanů jim stanovené normou. Pouze u jednoho vzorku, hlávkového salátu ze Židlochovic, byl limit překročen o 11 %. Při stanovení v celeru, ledovém salátu, kedlubně, petrželi a květáku byl obsah dusičnanů pod limitem detekce. U brambor, celeru, červené řepy, kedlubně a ředkviček byl obsah dusičnanů pod limitem kvantifikace. Všechna zelenina zakoupena v bio kvalitě měla v porovnání se zeleninou v běžně dostupných supermarketech nižší množství přítomných dusičnanů. I všechna zelenina zakoupená na Moravském náměstí v Brně od soukromých zemědělců splňovala legislativně povolené množství dusičnanů.

Stanovení dusičnanů kapilární izotachoforézou je z hlediska časové náročnosti relativně rychlá metoda. Samotné stanovení trvá přibližně 20 až 25 minut. Také příprava vzorku trvá řádově minuty. Úprava zahrnuje oloupání a nastrouhání zeleniny, přidání určitého množství destilované vody, extrakci v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut a následné filtrace na odstranění kousků zeleniny v roztoku. Tato technika je nenáročná na provoz a relativně levná.

Orientační stanovení diagnostickými papírky hodně záleží na subjektivním vnímání barev. Zejména v rozhodování, zda se jedná o obsah $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ či $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dusičnanů byl jen nepatrný rozdíl barev. Stanovení bylo vždy provedeno ihned po nastrouhání zeleniny. Diagnostický papírek byl ponořen do vzorku po dobu 3 sekund a následně bylo porovnáno zbarvení na barevné stupnici. Toto stanovení je pouze orientační a s porovnáním výsledků získaných izotachoforézou lze říci, že přibližně odpovídalo skutečnému množství dusičnanů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DU, Shao-ting, Yong-song ZHANG a Xian-yong LIN. 2007. Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. *Agricultural Sciences in China* [online]. 6(10): 1246-1255 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/S1671-2927(07)60169-2. ISSN 16712927. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1671292707601692>
- [2] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb. kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. *Sbírka zákonů*, 2004.
- [3] REINIK, M., T. TAMME, M. ROASTO, K. JUHKAM, S. JURTSĚNKO, T. TENŇO a A. KIIS. Nitrites, nitrates and N-nitrosoamines in Estonian cured meat products: Intake by Estonian children and adolescents. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2005, vol. 22, issue 11, s. 1098-1105 [cit. 2015-03-27]. DOI: 10.1080/02652030500241827. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030500241827>
- [4] CITP v analýze potravin. 149 s. Dostupné z: http://old.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/cze_itp.pdf
- [5] *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003, xxii, 797 s. ISBN 80-718-3268-5.
- [6] VLČEK, František a Jiří MORAVEC. *Význam zeleniny*. Olomouc: Výzkumný ústav zelinářský, 1964, 14 s.
- [7] HRABĚ, Jan a Aleš KOMÁR. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin*. Vyškov: VVŠ PV, 2003, 163 s. ISBN 80-7231-107-7.
- [8] *Situační a výhledová zpráva*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, [199-]-. 1x ročně.
- [9] FOREJT, Martin. Dusičnany v potravinách. *MEDICÍNA PRO PRAXI* [online]. 2008, č. 9, [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/09/13.pdf>
- [10] Stanovení dusičnanů v zelenině. In: *Katedra analytické chemie -UP Olomouc* [online]. 2008, 2012-01-10 [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/files/02-dusicnany-v-zelenine.pdf>
- [11] PRASAD, Surendra a Adrian Avinesh CHETTY. Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry* [online]. 2008, vol. 106, issue 2, s. 772-780 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607005602>
- [12] CHAN, Thomas Y.K. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicology Letters* [online]. 2011, vol. 200, 1-2, s. 107-108 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.11.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427410017601>
- [13] KALINA, Miroslav. *Kompostování a péče o půdu*. 2. upr. vyd. Praha: Grada, 2004, 116 s. ISBN 80-247-0907-4.
- [14] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin* 3. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.

-
- [15] HAUSCHILD, ANDREAS HW, et al. Clostridium botulinum. *Foodborne bacterial pathogens.*, 1989, 111-189.
- [16] HORÁKOVÁ, Marta. *Chemické a fyzikální metody analýzy vod.* 2. nezm. vyd. Praha: SNTL, 1989, 389 s. ISBN chemické a fyzikální metody analýzy vod.
- [17] MUSIL, Josef. *Experimentální methemoglobinémie.* 1. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1969, 110 s.
- [18] PITTER, Pavel. *Hydrochemie.* 4. aktualiz. vyd. Praha: VŠCHT, 2009, viii, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [19] WRIGHT, Robert O, William J LEWANDER a Alan D WOOLF. Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. *Annals of Emergency Medicine* [online]. 1999, vol. 34, issue 5, s. 646-656 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1016/S0196-0644(99)70167-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064499701678>
- [20] MANASSARAM, Deana M, Lorraine C BACKER, Rita MESSING, Lora E FLEMING, Barbara LUKE a Carolyn P MONTEILH. Nitrates in drinking water and methemoglobin levels in pregnancy: a longitudinal study. *Environmental Health* [online]. 2010, vol. 9, issue 1, s. 60- [cit. 2015-03-17]. DOI: 10.1186/1476-069X-9-60. Dostupné z: <http://www.ehjournal.net/content/9/1/60>
- [21] HORD, Norman G. Dietary Nitrates, Nitrites, and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Reports* [online]. 2011, vol. 13, issue 6, s. 484-492 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1007/s11883-011-0209-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11883-011-0209-9>
- [22] LUNDBERG, Jon O., Martin FEELISCH, Håkan BJÖRNE, Emmelie Å. JANSSON a Eddie WEITZBERG. Cardioprotective effects of vegetables: Is nitrate the answer?. *Nitric Oxide* [online]. 2006, vol. 15, issue 4, s. 646-656 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1016/j.niox.2006.01.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064499701678>
- [23] HORÁKOVÁ, Marta. *Analytika vody.* Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000, 238 s. ISBN 80-708-0391-6.
- [24] ČSN ISO 7890-3. STANOVENÍ DUSIČNANŮ: Část 3: Spektrometrická metoda s kyselinou sulfosalicylovou. Český normalizační institut, 1995.
- [25] DR 3900 spektrofotometr s technologií RFID. *HACH LANGE* [online]. 2015 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.hach-lange.cz/dr-3900-spektrofotometr-s-technologiei-rid/product?id=24821395630&callback=pfb>
- [26] ČSN 75 7455. Stanovení dusičnanů: Fotometrická metoda s 2,6-dimethylfenolem - Metoda ve zkumavkách. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009.
- [27] ČSN EN ISO 13395. Stanovení dusitanového dusíku a dusičnanového dusíku a sumy obou průtokovou analýzou (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí. Český normalizační institut, 1997.

-
- [28] ČSN EN ISO 10304-1. *Stanovení rozpuštěných iontů metodou kapalinové chromatografie iontů: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů a síranů*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009.
- [29] XIMENES, M. Polarographic determination of nitrate in vegetables. *Talanta* [online]. vol. 51, issue 1, s. 49-56 [cit. 2015-04-19]. DOI: 10.1016/S0039-9140(99)00248-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914099002489>
- [30] HACH LANGE. *Nitrate: Direct Measurement ISE Method*. 2015. Dostupné z: <http://www.hach-lange.cz/quick.search-quick.search.jsa?keywords=DOC316.53.01239>
- [31] PerfectiON™ comb NO3 Lemo kombinovaná elektroda. *METTLER TOLEDO* [online]. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://cs.mt.com/cz/cs/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/Product_Family_Browse_titrators_main/Product_Family_Titration_Sensors/Titration_Ion_Selective_sensors_Family/NO3_Lemo.html
- [32] AQUA AUREA [online]. 1998 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.aqua-aurea.cz/>
- [33] *Elektroanalytické metody: Sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2001, 316 s. ISBN 80-863-8007-6.
- [34] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [35] BOČEK, Petr. *Analytická kapilární izotachofóréza*. 1. vyd. Praha: Academia, 1987. POKROKY CHEMIE, 18. ISBN nevedeno.
- [36] PAZOUREK, Jiří. *Moderní elektroforetické analytické metody*. Brno, 2.6.2003.
- [37] KASIČKA, VÁCLAV. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*, 1997, 91: 320-329.
- [38] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy"* : modul K02-2014. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014, 430 s. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [39] GAŠ, Bohuslav. Axial temperature effects in electromigration. *Journal of Chromatography A*, 1993, 644.1: 161-174.
- [40] ONUSKA, Francis I., et al. Isotachopheresis: Trials, tribulations, and trends in trace analysis of organic and inorganic pollutants. *Journal of Microcolumn Separations*, 1998, 10.7: 567-579.
- [41] BLATNÝ, Pavel a František KVASNIČKA. Application of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, vol. 834, 1-2, s. 419-431 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00905-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398009054>
- [42] JASTRŽEBSKA, A. a František KVASNIČKA. Application of capillary isotachopheretic method to the determination of nitrate and nitrite ions in meat products. *Journal of Analytical*

Chemistry[online]. 2010, vol. 65, issue 11, s. 1170-1175 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1134/S1061934810110134. Dostupné

z:<http://link.springer.com/10.1134/S1061934810110134>

[43] KLUSKA, Mariusz, Magdalena KOMASIŃSKA a Anna MARCINIUK-KLUSKA. Successful New Methodology for Isotachophoretic Technique Determination of Mercury. *Journal of Liquid Chromatography* [online]. 2014-11-25, vol. 38, issue 4, s. 514-520 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1080/10826076.2014.917664. Dostupné z:<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2014.917664>

[44] GEBAUER, Petr a Petr BOČEK. Recent progress in capillary isotachophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. vol. 23, 22-23, s. 3858-3864 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200290006. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200290006>

[45] MALÁ, Zdena, Petr GEBAUER a Petr BOČEK. Recent progress in analytical capillary isotachophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2015, vol. 36, issue 1, s. 2-14 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1002/elps.201400337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400337>

[46] BORYSIK, Mark D., Kevin W. KIMURA a Jonathan D. POSNER. NAIL: Nucleic Acid detection using Isotachophoresis and Loop-mediated isothermal amplification. *Lab Chip* [online]. 2015, vol. 15, issue 7, s. 1697-1707 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1039/C4LC01479K. Dostupné z:<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4LC01479K>

[47] MALÁ, Zdena, Petr GEBAUER a Petr BOČEK. Recent progress in analytical capillary isotachophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2015, vol. 36, issue 1, s. 2-14 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1002/elps.201400337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400337>

[48] RECMAN. *Stanovení dusičnanu v zelenině*. Dostupné z: http://www.recman.cz/pdf/aplikacni_list_27.pdf

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADI	Acceptable Daily Intake
BTP	1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan
CFA	Kontinuální průtoková analýza
CITP	Capillary izotachophoresis
EU	Evropská unie
FIA	Průtokově injekční analýza
HCl	Kyselina chlorovodíková
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMC	(Hydroxypropyl)methyl celulosa
KNO ₃	Dusičnan draselný
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MHb	Methemoglobin
NO ₃ ⁻	Dusičnany
PMMA	Poly(methylmethakrylát)
PTFE	Poly(tetrafluorethylen)
PVC	Poly(vinylchlorid)

8 PŘÍLOHY

Stanovení dusičnanu v zelenině



Aplikační list č. 27

Obsah dusičnanu v zelenině je limitován normou. Vhodnou metodou pro jejich stanovení je isotachoforesa.

Předkládaná metoda stanovení je vhodná pro všechny druhy zeleniny.

Úprava vzorku:

Do 100ml širokohrdlé odměrné baňky se odváží 10 g zhomogenizovaného vzorku (nastrouhaného nebo rozmixovaného). K navážce se přidá asi 50 ml destilované vody a směs se extrahuje 5 minut na ultrazvukové lázni. Po doplnění po značku a filtraci se roztok analyzuje, případně se před analýzou ještě ředí.

Detekční limit pro stanovení neředěného roztoku je 10 mg/kg.

Podmínky analýzy:

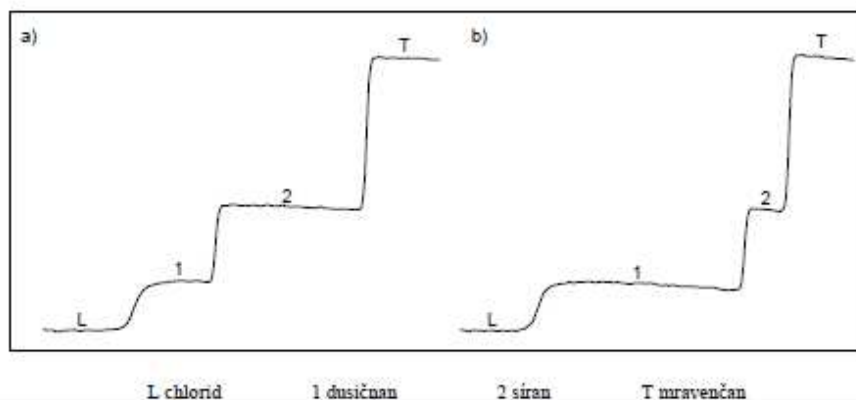
Vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + 5,5 mM BTP¹ + 0,1% HPMC² (pH 6,2)

Koncový elektrolyt: 10 mM mravenčan amonný

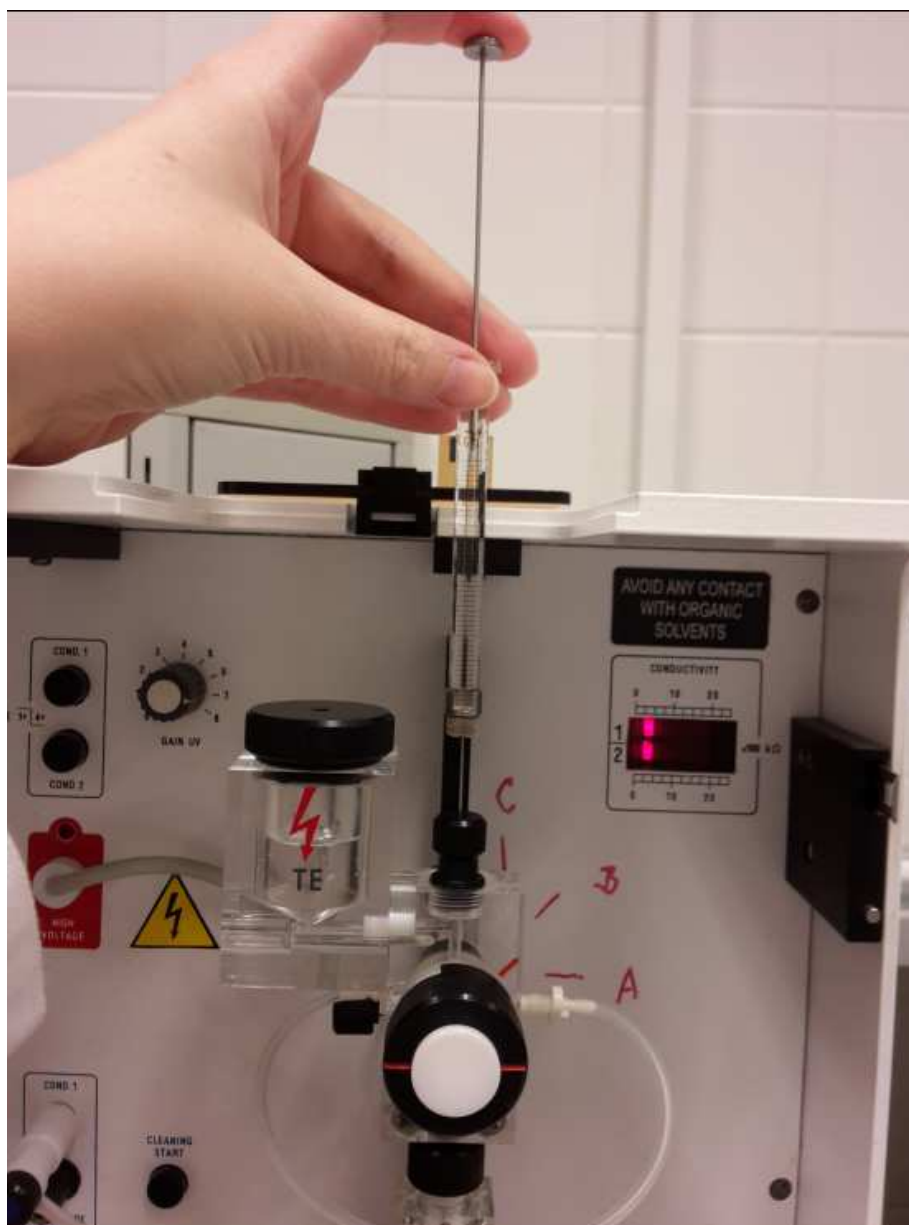
Hnací proud: počáteční 80 μ A, koncový 30 μ A

Doba analýzy: 15 minut

Analýza modelové směsi (a) a vzorku ředkvičky (b)



¹ 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan, bis-tris-propan
² hydroxypropylmethyl celuloza



Příloha 2: Dávkování vzorku