

UNIVERSITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**ANALÝZA ANORGANICKÝCH LÁTEK PLYNOVOU
CHROMATOGRÁFIÍ – STANOVENÍ DUSIČNANŮ VE VÍNECH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. David Plech

UNIVERSITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**ANALÝZA ANORGANICKÝCH LÁTEK PLYNOVOU
CHROMATOGRAPHIÍ – STANOVENÍ DUSIČNANŮ VE VÍNECH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. David Plech

Studijní obor

Analytická chemie

Vedoucí bakalářské práce

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Vlastnoruční podpis

Moc děkuji doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za spoustu užitečných rad, připomínek a doporučení při psaní práce.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2018_027 a IGA_PrF_2019_028).

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o analýze dusičnanů ve vínech s využitím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Ke vzorkům vín byla přidána kyselina amidosulfonová, která odstranila ze vzorku dusitanové anionty. V práci bylo použito derivatizační (alkylační) činidlo triethyloxonium tetrafluoroborát $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$. Došlo k O-alkylaci dusičnanového aniontu. Připravený derivát byl dostatečně těkavý pro headspace analýzu. Bez chemické derivatizace by nedošlo k převedení dusičnanového aniontu do plynné fáze. V práci byly optimalizovány jak kroky související s úpravou vzorku, tak parametry samotné analýzy GC/MS. Kvantifikace byla provedena pomocí metody vnějšího standardu, metody vnitřního standardu a metody standardního přídávku. Koncentrace dusičnanů v reálných vzorcích vín se pohybovala v rozmezí 2,851 – 11,029 mg/kg NO_3^- .

SUMMARY

The thesis is focused on the analysis of the nitrates in the selected samples of wine by gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS). The sample of wine was mixed with sulfamic acid to remove the nitrites. Triethyloxonium tetrafluoroborate $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$ was chosen as derivatization (O – alkylation) reagent. The prepared derivate was sufficiently volatile for headspace analysis. The determination of the nitrate would not be possible without the chemical derivatization. The thesis is also focused on the optimization of particular steps in sample preparation procedure and parameters of GC/MS analysis. The results were evaluated by the method of external standard and the method of standard addition and then they were compared by using the method of internal standard. The final concentration of the nitrates in the wine was from 2,851 mg/kg to 11,029 mg/kg NO_3^- .

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 2 |
| 2.1. Víno..... | 2 |
| 2.2. Koloběh dusíku | 4 |
| 2.3. Dusičnany a dusitany | 6 |
| 2.3.1. Methemoglobinémie | 7 |
| 2.4. Dusičnany ve vodě | 8 |
| 2.5. Dusičnany v potravinách..... | 9 |
| 2.6. Metody analýzy dusičnanů..... | 10 |
| 2.6.1. Spektrofotometrické stanovení | 11 |
| 2.6.2. Stanovení dusičnanů a dusitanů průtokovou injekční analýzou (FIA) | 13 |
| 2.6.3. Stanovení dusičnanů a dusitanů pomocí kapilární elektroforézy..... | 14 |
| 2.6.4. Fluorescenční senzor na dusičnany a dusitany na bázi oxidu grafenu..... | 14 |
| 2.6.5. Stanovení pomocí dusičnanové iontové selektivní elektrody | 15 |
| 2.6.6. Stanovení dusičnanů pomocí biosenzoru a cyklické voltametrie | 15 |
| 2.6.7. Stanovení dusičnanů a dusitanů chromatografií na iontoměničích..... | 16 |
| 2.7. Plynová chromatografie anorganických iontů | 17 |
| 2.7.1. Analýza oxidu uhličitého a uhličitánů plynovou chromatografií | 17 |
| 2.7.2. Analýza bromidů v krvi plynovou chromatografií | 18 |
| 2.7.3. Stanovení fluoridů pomocí headspace GC/MS..... | 19 |
| 2.8. Stanovení dusičnanů plynovou chromatografií | 19 |
| 2.8.1. Derivatizační činidlo $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$ | 20 |
| 2.8.2. Stanovení dusičnanů pomocí $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$ | 20 |
| 3. PRAKTICKÁ ČÁST | 22 |
| 3.1. Použité chemikálie | 22 |
| 3.2. Přístrojové vybavení | 22 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.3. | Vzorky vín | 23 |
| 3.4. | Pracovní postupy | 23 |
| 3.4.1. | Příprava standardních roztoků | 23 |
| 3.4.1.1. | Příprava standardního roztoku KNO_3 | 23 |
| 3.4.1.2. | Příprava standardního roztoku K^{15}NO_3 | 23 |
| 3.4.2. | Příprava derivatizačních činidel..... | 24 |
| 3.4.3. | Příprava vzorků | 24 |
| 3.4.4. | Parametry analýzy..... | 24 |
| 4. | VÝSLEDKY A DISKUZE | 25 |
| 4.1. | Hmotnostní spektrum ethyl–nitrátu | 25 |
| 4.2. | Derivatizace analytu..... | 26 |
| 4.2.1. | Vliv teploty inkubace na derivatizaci..... | 26 |
| 4.2.2. | Vliv doby inkubace na derivatizaci..... | 28 |
| 4.3. | Vliv děliče toku na chromatografické vlastnosti..... | 29 |
| 4.4. | Opakované dávkování ze stejné vialky | 30 |
| 4.5. | Vysolení derivátu analytu | 31 |
| 4.6. | Kvantitativní vyhodnocení..... | 32 |
| 4.6.1. | Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody vnějšího standardu..... | 32 |
| 4.6.2. | Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody přídavku standardu | 33 |
| 4.6.3. | Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody vnitřního standardu..... | 34 |
| 4.7. | Kvantitativní vyhodnocení vzorků reálných vín..... | 34 |
| 5. | ZÁVĚR..... | 35 |
| 6. | POUŽITÁ LITERATURA..... | 36 |
| 7. | PŘÍLOHY..... | 1 |
| 8. | SEZNAM ZKRATEK..... | 3 |

1. ÚVOD

*„Ohrada, viniční je nejkrásnější
odměna, jakou může vlast poskytnout
vítěznému bojovníkovi.“*

Homér[1]

Jen málo kulturních plodin upoutalo na sebe tak mnoho pozornosti, jako réva vinná. Po mnoho staletí malíři zachycují jedinečnou atmosféru vinařského prostředí. Básníci a hudebníci zpívají o víně. Réva vinná mění pohled na životní prostředí. S vinohrady se budují i kulturní hodnoty, které jsou výsledkem práce a vůle obyvatel vinařských oblastí.

Víno působí na naše smysly velice komplexně. Víno obsahuje vodu, alkohol, kyseliny a stovky aromatických látek v různých koncentracích. Těkavé látky tvoří s vodnou a alkoholovou složkou nezaměnitelnou chuť a vůni daných vín.

V bakalářské kvalifikační práci jsem se zabýval třemi těkajícími aldehydy, které by se mohly ve víně tvořit zráním, nebo odlišnou technologií zpracování hroznů.

Cílem této kvalifikační práce je další analýza vína. Konkrétně analýza dusičnanů plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií pomocí derivatizace analytu. [1, 2]

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Víno

„Nápoj bohů,“ tak se nazývá víno od dávných dob.[3] Archeologové odhadují, že se víno pěstuje přibližně 7,5 tisíce let. Nejstarší dokázané zmínky pochází z poloviny 5. tisíciletí př. n. l., konkrétně se jedná o archeologické naleziště Hajji Firuz Tepe v severozápadní části Iránu v pohoří Zagros, podobně staré zmínky pochází i z archeologického naleziště z Gruzie. Z gruzínštiny pochází i slovo „ghvino“. Víno nebylo jediný kvašený nápoj, našly se důkazy o výrobě a konzumaci nápojů z rýže, medu a ovoce, včetně hroznů. Víno bylo archeology dokázáno podle přítomnosti stop kyseliny vinné a tříslovin. [4] Víno, vyrobené z jiné rostliny, než je réva vinná, se označuje jako „ovocné víno“.

Víno je alkoholický nápoj, který se vyrábí kvašením drcených bobulí, nebo moštu révy vinné. Bobule jsou plodem révy vinné. Ty jsou zdrojem anorganických látek, cukrů, vitamínů, barviv, kyselin a organických látek. Vzájemný poměr a kombinace látek ovlivňují organoleptické vlastnosti bobulí a následně vína. Říká se, že víno se nedělá ve sklepě, nýbrž na vinici. Víno bylo a je používáno k rituálním účelům. [2, 5]

V období římské kolonizace Evropy (276 – 282) začaly vznikat vinice v Rakousku. Posádka římských legií z Vindobony vysadila na Pálavě první vinice. Při vykopávkách u bývalé obce Mušov v roce 1926 se našel vinařský nůž v celkové délce 28 cm. Tento nůž je jeden z pěti nejstarších nálezů ve vinohradnických oblastech. Historikové se shodují, že počátek vinaření na Moravě je spojený s Velkomoravskou říší. Vinice vlastnila církev a šlechta.

Ve 13. století víno sloužilo především k liturgickým obřadům. V té době odevzdávali desátky vína obyvatelé z Pavlovice a Zaječí žďárskému klášteru. Biskup Bruno ze Shauenburgu v okolí Kroměříže osvobodil od poplatků a desátků ty, kteří vysazovali vinohrady. Tento čin velmi přispěl k rozšíření vinařství v této oblasti. Zmínky o vinicích z konce 13. století pochází z Velkých Pavlovic, Znojma, Brna a Kroměříže.

V 14. století se víno dostávalo více měšťanům a běžnému lidu. Šlechta vlastnila většinu vinic a výhodně je pronajímala. Museli odvádět pravidelné desátky z úrody. Vinice obhospodařovala chudina. První organizační řád do vinařství přinesl až Karel IV, ten vydal královský mandát v roce 1358, jenž nařizoval rozšíření a vysazování vinic na nových místech, zakladatelé byli osvobozeni od daně na 12 let. Vína z Moravy ovšem nebyla jediná na Moravě. Importovalo se víno z Rakouska, které bylo kvalitnější a levnější. Konzumace cizích vín se

omezovala nařízenými. Vesnice a oblasti si stanovili vlastní právo ohledně vína a zlodějů. Zloději mohli dostat peněžité tresty, při vysoké škodě useknutí ruky, nebo dokonce hrdelní trest.

V 15. století se začaly dovážet vybrané odrůdy vína. Byl taky povolen tzv. volný výčep. Na znaku domu byl věnec z listí révy vinné.

16. století bylo ve znaku rozvoje moravského vinařství. Probíhalo slučování panství. Vinice zaznamenal na své mapě i Jan Ámos Komenský. Vína z Moravy byla konkurenceschopná k vínům z Čech, Rakouska a Uherska.

V 17. století měli povinnost majitelé vinic zajišťovat a pečovat o odvodové příkopy na dešťovou vodu. V některých oblastech byl zrušen hrdelní trest. Třicetiletá válka zasáhla i vinařství. Plochy vinohradů se zmenšily na jednu třetinu, mnohé se přeměnily na pole, některé byly ladem. Chyběli zkušené lidi. Šlechta podporovala obnovu vinic. Poddaní spláceli dluh šlechtě často pouze vínem. Šlechta se snažila omezit prodej vína přímo od vinaře, tzv. volné nalévání, to se jí ale nepodařilo. Začínají vznikat velké sklepy a sudy.[5] Největší sud na Moravě je aktuálně v Regionálním muzeu v Mikulově. Pochází z roku 1643. Pojme až 101 400 litrů vína a jeho hmotnost je 26,1 tuny.[6]

V 18. století docházelo k obnově zničených vinic. V této době začínala stavba panských a městských pivovarů, které způsobily omezení vinařství v českých krajích. Marie Terezie zavedla nápojovou daň. Nový vinařský řád zavedl Josef II. na podporu moravského vinohradnictví. Nakonec Morava zažívala rozmach vinařství.

V 19. století se moravským vinařům dařilo. Vína byla exportována i za hranice a budovala si svoje postavení na trhu. Nové vinice se vysazovaly v oblastech, kde v minulosti již vinice byly. Od poloviny 19. století docházelo k urbanizaci a vinohradnictví začínalo upadat. Zemědělství se přeorientovalo na pěstování plodin, jako je cukrová řepa.

Za začátku 20. století byla réva vinná zničená révokazem. Došlo k úplné obnově vinic. Ve vinicích se pěstovala jen jedna odrůda. V druhé polovině století začínaly vznikat vinařské školy, neboť německé rody vinařů opustily pohraničí.

Jedno z nejstarších vín na Moravě vlastní Znovín Znojmo a. s. – Šatov, je to Portugalské modré z roku 1945. Dnes se odrůda nazývá Modrý Portugal. Celkem se jich dochovalo 6 lahví, cena jedné lahve je okolo 100 tisíc korun českých.[5]

Vinice podléhají územnímu dělení, které je posloupné. Nejmenší jednotkou je vinařská trať. Více tratí spadá do katastru vinařských obcí. Následuje podoblast a nejvyšším stupněm posloupnosti je vinařská oblast. V dané vinařské obci se pěstuje omezený počet odrůd révy vinné. V ČR se může moštovat 56 odrůd, z nichž největší produkce se nachází ve vinařské oblasti Morava. Z Čech pochází přibližně dvacetina produkce.

Bílé odrůdy révy vinné mají bobule zbarveny do světlých barev, žlutá, zelená, nazlátlá, například Veltlínské zelené. Výjimkou není barva růžová až červená. Důkazem může být odrůda Tramín červený, jehož bobule mají sice načervenalou barvu, ale vyrábí se z nich bílé víno.

Červené a růžové víno se vyrábí z modrých odrůd. Bobule mají modré až černé zbarvení. Je to dáno tím, že slupka bobulí obsahuje antokyanová červená barviva, které se uvolňují do vína. Podle délky macerace pak lze vyrobit růžové, nebo červené víno, příkladem může být odrůda Modrý Portugal. Dokonce lze vyrobit z modrých bobulí i bílé víno. Těmto vínům se říká Clairet, nebo Klaret. Odrůdy nemají obsahovat moc modrých barviv, příkladem může být Rulandské modré. Vylisovaný mošt se zpracovává stejnou technologií, jako se vyrábí bílé víno. Na druhou stranu existují odrůdy révy vinné, kterým se říká barvíčky. Z těchto odrůd nelze dělat bílé víno, neboť obsahují anthokyanová barviva i v dužnině.

Novošlechtěním vybraných odrůd vznikají nové odrůdy, které mohou mít například vyšší odolnost vůči houbovým onemocněním, lepší přizpůsobivost na chladnější podmínky, vyšší obsahy vybraných látek atd. Nejrozšířenější novošlechtěná odrůda je Müller Thurgau (1882), jejímž autorem je prof. Dr. Dr. h. c. Hermann Müller, který pocházel z Thurgau. České nové odrůdy jsou především Pálava, André a Cabernet Moravia.

Každá bobule si s sebou nese primární a sekundární sloučeniny – metabolity. Mezi primární metabolity patří především kyseliny a cukry. Sekundární metabolity zastupují fenolické a aromatické látky, které výrazně ovlivňují organoleptické vlastnosti vína. Tyto látky mohou být pro určité odrůdy typické. V této kvalifikační práci se věnovala pozornost dusičnanům, ty mohou být jak primární, tak sekundární metabolity. [7]

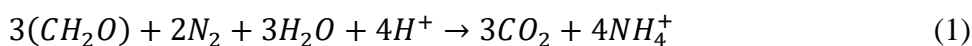
2.2. Koloběh dusíku

Dusík jako prvek je nezbytný pro výživu, ale jeho formy mohou být hlavním zdrojem znečištění nejen v zemědělství.[8] V potravinách a v životním prostředí se mohou nacházet látky, které mají špatný vliv na zdraví člověka. Označují se termínem kontaminanty. Tyto látky

vznikají buď v rostlině, nebo do ní mohou pronikat. Dusičnany jsou řazeny do zmíněných kontaminantů. [9]

Dusík se nachází v organické hmotě všech živých organismů. Odumřelé organismy v přírodě tvoří humus. Ten napadají další mikroorganismy a rozkládají ho nejprve na amoniak, ze kterého vznikají amonné soli. Dusík je dále oxidován přes dusitany až na dusičnany.[10]

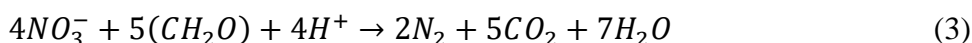
Rostliny musí přijímat dusík ve formě amonných solí a dusičnanů, i když je ve vzduchu asi 78 % dusíku. Existují rostliny, které získávají dusík v symbióze s bakteriemi, například rostliny rodu Frankia a Rhizobium. Bakterie získávají z kořenového systému fotosyntetizované sacharidy a rostlina získává potřebný dusík.[11] Dusík dokáže fixovat ze vzduchu také cyanobakterie, modrozelené řasy. Organický uhlík, který do reakcí vstupuje ve formě sacharidů, je v rovnicích (1, 2, 3) označen jako (CH₂O). Rovnice (1) vyjadřuje sumární fixaci dusíku. [12]



V procesu nitrifikace dochází k bakteriální oxidaci amoniakálního na dusičnanový dusík. Nitrifikace je velice významná ve vodách a v půdách. Rovnice (2) popisuje sumárně nitrifikaci. [12] K přeměně 1 g amoniakálního dusíku je v reálném prostředí potřeba 4,33 g kyslíku.



Dusičnanů se organismus může zbavit třemi způsoby, v závislosti na podmínkách. Asimilací organismy redukují dusičnanový anion až na oxidační stupeň -3 (amoniakální dusík), aby je dokázaly použít na syntézu proteinů a dalších látek. Druhým způsobem je redukce dusičnanů na dusitany. Dusitany jsou ovšem pro mnoho mikroorganismů poměrně toxické. Třetí způsob je denitrifikace. Dochází k redukci dusičnanů na plynný dusík. Denitrifikaci využívají bakterie používané v technologii čištění odpadní vody, při tzv. vyhnívání, které probíhá za anoxických podmínek. Denitrifikace je sumárně popsána rovnicí (3). [12]



Každý obyvatel vyprodukuje přibližně 12 g celkového dusíku za 1 den, tato hodnota se označuje jako specifická produkce dusíku.[13]

2.3. Dusičnany a dusitany

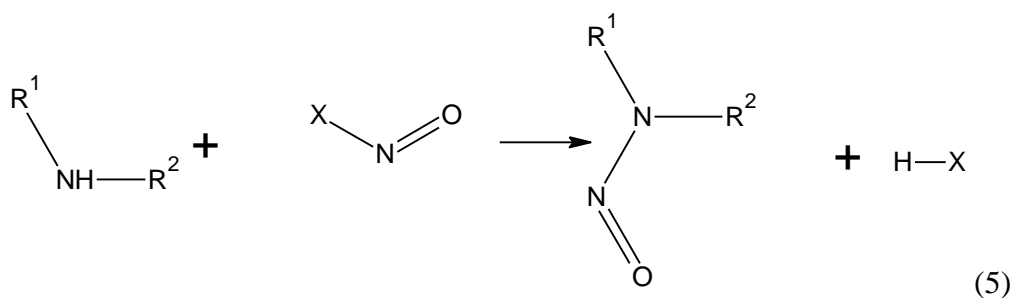
Dusičnany, nitráty, jsou soli kyseliny dusičné (HNO_3), ta disociuje podle rovnice (4).



V přírodě se dusičnany v minerálech nacházejí jen ojediněle. V lokalitách mimo Evropu se nachází dusičnan sodný, chilský ledek. Dusičnany v přírodě vznikají v procesu nitrifikace. Jsou konečným produktem rozkladu organických látek, obsahujících dusík, za přístupu kyslíku. [9, 13]

Mnoho zemí čelí výzvám na ochranu životního prostředí a potravinové bezpečnosti. Vliv a chování člověka výrazně mění koloběh dusíku v pedosféře, atmosféře a hydrosféře již od dob průmyslové revoluce. Moderní zemědělství se potýká se ztrátou dusičnanů v půdách. Dochází k vyplavování dusičnanů do podzemních vod a k následné eutrofizaci ekosystémů. Bylo zjištěno, že přibližně 30 % aplikovaných dusičnanových hnojiv přechází do podzemní vody. [8]

Dusitany mohou vznikat redukcí dusičnanů exogenně i endogenně. Exogenní původ dusitanů může souviset se skladováním, transportem a zpracováním potravin a zemědělských produktů. Tento vliv se uplatňuje například při skladování zeleninových produktů, bohatých na dusičnany, jsou-li udržovány delší čas v teplém stavu. Kontaminanty se mohou dostat do potravin i v procesu sušení, který je realizován pomocí kouře, ve kterém se nachází oxidy dusíku. Endogenně vznikají dusitany v těle člověka, v trávicím traktu. Při dlouhodobé expozici dusičnany a dusitany dochází ke vzniku N-nitrososloučenin. U nich byly v roce 1956 prokázány karcinogenní účinky, mohou se podílet na vytváření zhoubných nádorů. Vznik N-nitrososloučenin podporují kyselé podmínky a některé druhy bakterií. Rovnice 5 vyjadřuje vznik N-nitrososloučeniny ze sekundárního aminu a nitrosačního činidla. R_1 a R_2 mohou být aryly, heterocyklické substituenty, nebo alkyly. [14]



N-nitrososloučeniny jsou považovány za karcinogenní a mohou vyvolávat rakovinné bujení po celém těle, mimo opěrného aparátu. Velké koncentrace nitrosaminů způsobují onemocnění jater. Někteří zástupci mají teratogenní účinky na zárodek, konkrétně N-nitrosomethylmočovina a N-nitrosoethylmočovina. Reakce dusitanů na N-nitrososloučeniny probíhá při kyselém pH, reakci mohou katalyzovat i halogenidové ionty a rhodanid, ten se nachází například ve slinách. Zajímavé je, že kuřáci mají až čtyřnásobně větší koncentraci rhodanidu než nekuřáci. Vitamín C (kyselina L-askorbová) a vitamín E (tokoferol) brání reakci přeměny dusitanů na N-nitrososloučeniny. Dlouhodobá expozice N-nitrososloučenin je mnohem nebezpečnější než ojedinělé expozice. [14]

Dusičnany se vstřebávají do krve při perorálním podání v tenkém střevě, kinetika reakce je velmi rychlá a biologická dostupnost je přibližně 92 %. Asi po 40 minutách je hladina dusičnanů v krevní plasmě na maximu. Člověk přibližně 25 % z přijímaných dusičnanů vylučuje do slin, kde je přibližně 20 % dusičnanů přeměněno bakteriemi na dusitany. Odpovídá to 5-8 % z celkového příjmu dusičnanů. Návrat na fyziologickou hladinu dusičnanu trvá 24-48 hodin. [15, 16]

2.3.1. Methemoglobinémie

I přes to že jsou dusičnany v organismu chemicky nereaktivní, mohou být mikrobiálně redukovány na reaktivní dusitany. Dusitany mohou způsobovat inaktivaci hemoglobinu v těle, tzv. methemoglobinémií. Dochází k oxidaci železnatého iontu Fe^{2+} na ion železitý Fe^{3+} , který se nachází v hemoglobinu, nebo v myoglobinu. Oxidovaná forma Fe^{3+} není přenašeč kyslíku. Z červeného barviva hemoglobin se stane methemoglobin, který je tmavohnědý. Mezi příznaky onemocnění patří modrošedivá nebo hnědošedá barva pleti, podrážděnost. Fyziologická hladina methemoglobinu je menší než 2 %. U dětí s mírně zvýšenými koncentracemi se projevuje onemocnění nadměrným pláčem, při vyšších koncentracích ospalostí a letargií. Methemoglobin je redukován enzymem MetHb-reduktázou na hemoglobin. Zvýšený výskyt této nemoci je u kojenců. Ovlivňuje to kombinace různých faktorů. Žaludek má vyšší pH, a tudíž se v něm nachází více mikroorganismů. Poměr přijatých tekutin a hmotnosti kojence je vyšší. Kojenci mají vyšší koncentrace fetálního (plodového) hemoglobinu, který se oxiduje rychleji na methemoglobin. Kojenci mají nižší aktivitu enzymu MetHb-reduktázy. [14, 16-18]

2.4. Dusičnany ve vodě

Dusičnany a dusitany se přirozeně nachází v přírodě. Dusičnany jsou velice dobře rozpustné ve vodě, a tudíž jsou zřejmě nejrozšířenějším kontaminantem podzemních vod na světě. Mají zanedbatelné komplexační vlastnosti. Ve vodách se nachází pouze jednoduchý anion NO_3^- . Jejich vysoká koncentrace představuje nebezpečí pro lidské zdraví.

Dusičnany jsou přítomny ve všech vodách, jsou mezi čtyřmi hlavními anionty. V čistých vodách jsou většinou zastoupeny v malých množstvích, v jednotkách mg/l iontu NO_3^- . Voda ze zemědělských oblastí je znečištěná hnojivý, a proto se koncentrace dusičnanů pohybuje v dusítkách až stovkách mg/l NO_3^- . Výtok vody z čistírny odpadních vod (ČOV) a odpadní vody z průmyslu mohou mít podobné koncentrace dusičnanů jak voda ze zemědělství. Vysoká koncentrace dusičnanů může být důkazem fekálního znečištění vody. Dusičnany se do pitné vody mohou dostat z více zdrojů. Některé zdroje jsou přírodního, jiné antropogenního původu.

Přírodně se dusičnany do vody mohou dostat mnoha způsoby. Malé množství pochází z kyseliny dusičné, která vzniká z oxidu dusičného a vody. Nejvýznamnějším zdrojem jsou bakterie, ve kterých probíhá nitrifikace. Další možností je rozpouštění solí dusičnanů, které je převážně v zemích, kde se těží ledky.

Koncentrace dusičnanů se v přírodních vodách zvýšila intenzivnější zemědělskou činností a se vzrůstajícím počtem obyvatelstva. V řece Labe je nárůst patrný, v roce 1892 byla průměrná koncentrace 2,2 mg/l, vyjádřeno jako koncentrace dusičnanového aniontu, v roce 1976 byla 15,9 mg/l a v roce 1994 22,1 mg/l. Tento trend se zastavil na konci devadesátých let. [13]

Na koncentraci dusičnanů v podzemních vodách má velký vliv půdní a klimatický charakter a jejich hodnoty mohou být v širokém rozmezí. Vysoká koncentrace dusičnanů je v oblasti okolo Znojma 66 mg/l, ovšem nejsou výjimky i hodnoty okolo 100 mg/l. V oblasti jižních Čech koncentrace dusičnanů většinou nepřekračují hodnoty 45 mg/l. Vysoké koncentrace dusičnanů a dusitanů jsou charakteristické pro podzemní vody, které se nacházejí pod borovými lesy. Dobře provzdušněná písčité půda obsahuje bakterie, které jsou schopny zachytávat dusík a nitrifikovat ho. Na jižní Moravě se nachází akáty, na jejichž kořenech žijí bakterie rodu *Rhizobium*, které mohou zpracovávat i atmosférický dusík. Pod akáty tak vzniká humus, ve kterém je mnoho dusičnanů. Koncentrace dusičnanů v těchto podzemních vodách se může pohybovat okolo hodnoty 90 mg/l. V podzemních vodách se nejvyšší koncentrace

dusičnanů nachází v zimním období, neboť je rostliny tolik nevyužívají a jsou vyluhovány z půdy do vody. [13]

V minerálních vodách je dusičnanů malé množství, a proto často nejsou stanovovány. Nachází se tam dusičnany v koncentracích v jednotkách mg/l, nebo pouze stopové množství. Ovšem existují i výjimky, například Zaječická hořká. Ve druhém vydání publikace Hydrochemie z roku 1990 [19] je uvedená koncentrace dusičnanů 2600 mg/l. V dalším vydání publikace [20] není o Zaječické hořké ani zmínka. Ve čtvrtém [13] a pátém [21] vydání je uvedená koncentrace 2200 mg/l NO_3^- . V pátém vydání autor uvádí zdroj informace [22], analýza byla provedena v roce 1981 s výsledkem 2203 mg/l NO_3^- [22].

Průměrná koncentrace v pitných vodách podzemního původu byla 17,4 mg/l. Povrchové pitné vody obsahovaly průměrně 14,4 mg/l. V průměru v celé České republice je koncentrace dusičnanů ve vodovodním řádu 19,2 mg/l. [13]

Maximální množství přijatých dusičnanů za jeden den by nemělo překročit 100 mg. Koncentrace v pitné vodě by neměla překročit hodnotu 50 mg/l, bereme-li konzumaci 2 litrů vody denně. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., která pojednává o požadavcích na pitnou vodu, určuje nejvyšší mezní koncentraci dusičnanů na hodnotu 50 mg/l. [23] Maximální koncentrace v balené kojenecké vodě má být 10 mg/l a v pramenité balené vodě 25 mg/l. [13, 24]

Do vod se antropogenně dostávají dusičnany používáním průmyslových hnojiv, které mohou obsahovat ledek, ale taky amonný kation, který může být oxidován opět na dusičnany. Dusíkatá hnojiva se začala používat z důvodu nízké přirozené koncentrace dusíku v půdách při dnešním intenzivním zemědělstvím.

Oxidy dusíku vznikají při spalování fosilních paliv. Sluneční záření usnadňuje přeměnu na oxid dusičný a na kyselinu dusičnou. Ve velkých městech s velkou dopravní hustotou mohou zvyšovat koncentraci oxidů dusíku automobily. Továrny jsou zdrojem oxidů dusíku v průmyslových oblastech. Kyselá srážka kyseliny dusičné přispívají 2,5 % do celkové dusíkové bilance ve vodě.

2.5. Dusičnany v potravinách

Dusičnany se v potravinách nachází buď jako přídavné látky, lidově „éčka“, nebo jako kontaminanty, které se v přírodě v malé míře přirozeně nacházejí. Denní příjem dusičnanů je na celém světě odlišný. Potraviný rostlinného původu představují důležitý zdroj dusičnanů.

Koncentrace dusičnanů je především závislá na rozsahu použití průmyslových hnojiv, ale také na typu půdy a klimatických podmínkách. Na rostlinnou produkci navazuje produkce živočišná, která je dusičnany taky ovlivněna. Přibližně 80 % dusičnanů přijme člověk z rostlinné potravy.

Dusičnany a dusitany se přidávají do masných výrobků pro jejich konzervaci, stabilizaci barev nebo zvýraznění chutí. Příkladem může být uzené maso. Maso po tepelné úpravě má červenou barvu, protože byl s velkou pravděpodobností použit buď dusitan draselný (KNO_2), nebo dusičnan draselný (KNO_3), nebo oba uvedené ve vzájemném poměru. Kdyby tyto látky nebyly použity, tak by se růžovofialové hemové barvivo myoglobin přeměnil tepelnou úpravou na metmyoglobin, který má šedou barvu. Pomocí použitých dusičnanů a dusitanů se tepelnou úpravou přemění až na metmyochromogen, který má narůžovělé zbarvení. Metmyochromogen nelze už dále oxidovat vzdušným kyslíkem, a proto je barva masa stálá. Dusičnany a dusitany jsou přidávány i do nakládaných sýrů a ryb, neboť u nich byl prokázán antimikrobiální účinek. Usmrcují mikroorganismy, nebo potlačují důležité enzymové dráhy nebo pochody mikroorganismů. Slouží tak jako konzervační látky. Baktericidní účinky mají tehdy, pokud látky usmrtí veškeré mikroorganismy. Bakteriostatické účinky mají tehdy, když dojde k usmrcení jen části populace mikroorganismů a k omezení jejich růstu. Pomocí pokusů bylo zjištěno, že nejlepší účinky mají dusičnany a dusitany při $\text{pH} = 5,0 - 5,5$. V malých koncentracích jsou dusičnany neškodné. Dusičnany se ovšem mohou redukovat na dusitany. Ty už mohou způsobovat zdravotní potíže dětem a dospělým. [14-16]

Existují studie, které pojednávají o zdravotní prospěšnosti dusičnanů. Dusičnany a dusičnany v nízkých koncentracích mohou způsobovat snížení krevního tlaku a slouží jako prevence proti infarktu myokardu a selhání jater. Zatím byly vlivy zkoumány na pokusných laboratorních myších. Je možné, že se téma škodlivosti dusičnanů znovu otevře a budou publikovány nové studie, které už budou aplikovány na člověka. [14]

2.6. Metody analýzy dusičnanů

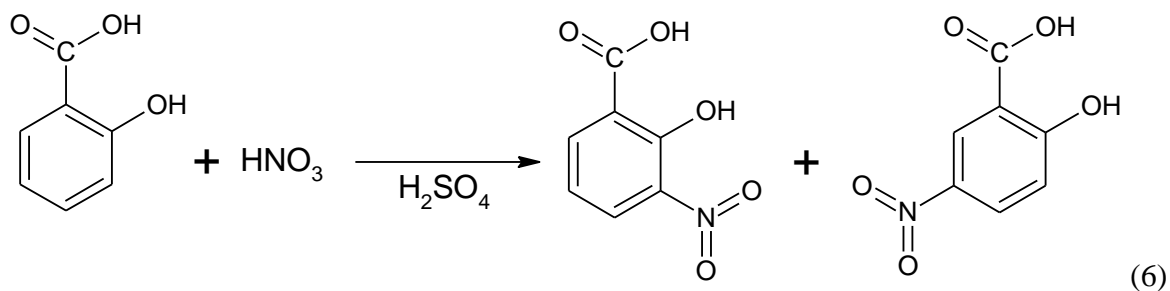
Od dob, kdy se začalo lidstvo zajímat o dusičnany, se vyvinula celá řada metod na jejich analýzu. Většina metod ještě dostala nějaké modifikace a existují řádově stovky doporučených postupů analýz. Žádnou metodu ovšem nelze označit jako univerzální a nejlepší. Každá metoda má odlišné limity kvantifikace a odlišnou citlivost.

Dusičnany se stanovují ve všech typech vod, od pitných po odpadní. Vzorky vody, která má být podrobena analýze na dusičnany, by se měly analyzovat v den odběru. Pokud to není možné, musí dojít ke konzervaci vzorku.

Většina metod na analýzu dusičnanů ve vodách je založená na absorpci záření o určité vlnové délce a následné spektrofotometrické detekci. Spektrofotometrické metody se dělí do dvou skupin. V přímých metodách stanovujeme dusičnany. V nepřímých metodách dochází k redukci dusičnanů na dusitany, nebo až na amoniakální dusík. Do spektrofotometrických metod patří i kolorimetrie, kdy se srovnává zbarvení vzorku se standardem. Dusičnany je také možno stanovit pomocí dusičnanové iontově selektivní elektrody [25] a cyklické voltametrie [26].

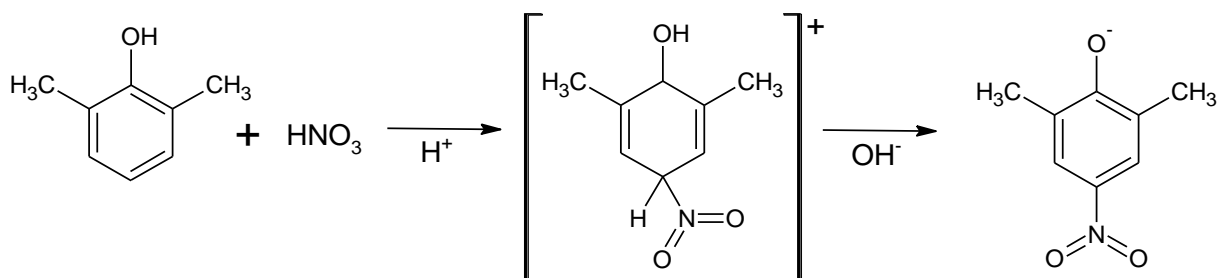
2.6.1. Spektrofotometrické stanovení

Existuje mnoho metod, které používají fotometrické a spektrofotometrické postupy. Nejběžnější přímé stanovení dusičnanů je pomocí metody s kyselinou sulfosalicylovou, která je upravována normou ČSN ISO 7890-3. Stanovení je založeno na reakci kyseliny sulfosalicylové s kyselinou dusičnou (HNO_3) za přídavku kyseliny sírové (H_2SO_4). Absorbance vzniklého žlutého zbarvení se měří při 415 nm. [27] Mnohdy se používá kyselina salicylová. Dochází k rozšíření konjugovaného systému, a tudíž se absorpční maximum posune do viditelné části spektra. Rovnice 6 popisuje vznik nitroderivátů. [10]



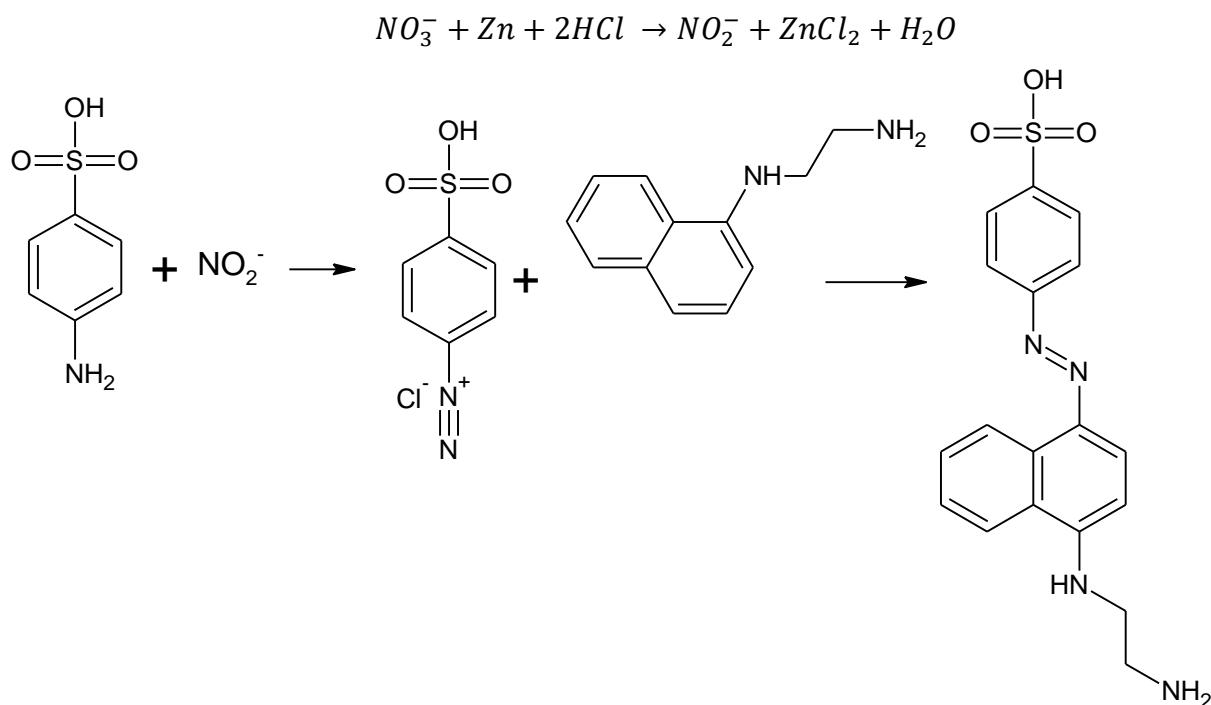
Reakce má své interferenty, které je potřeba oddělit. Například chloridy se odstraňují srážením se síranem stříbrným. Kovy je potřeba oddělit na iontoměničích. Vliv dusitanů se potlačí odpařením se síranem amonným. Interference mohou způsobovat i některé organické látky.

Jako další přímou spektrofotometrickou metodu lze uvést stanovení dusičnanů pomocí 2,6 – dimethylfenolu. V reakci dochází opět k zavádění nitroskupiny na aromatické jádro. Reakce je kyselě katalyzovaná, ale pro spektrofotometrické stanovení je nutné vzorek alkalizovat hydroxidem sodným. Absorpční maximum má žlutá sůl při 432 nm. Reakční schéma je na obrázku (Obr. 1). [10, 28]

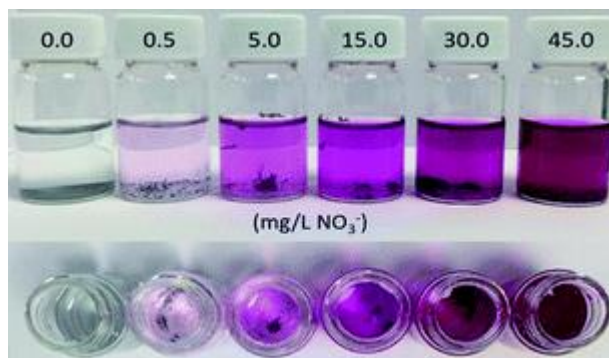


Obr. 1: Nitrace 2,6 – dimethylfenolu za vzniku žluté soli. [28]

Kolorimetrické stanovení dusičnanů ve vodě založené na redukci dusičnanů na dusitany a následné stanovení dusitanů patří mezi nepřímé metody. Je to velice jednoduchá metoda a v praxi hodně využívaná. Její velká výhoda je přenosnost. Analýzu je možné uskutečnit na místě odběru. Byla vyvinuta metoda, která využívá práškového zinku jako redukčního činidla ve spojení s používaným Griessovým testem. Lineární rozsah byl od 0,5 – 45 mg/l NO_3^- . Metoda byla validována a bylo provedeno srovnání s iontovýměnnou chromatografií v akreditovaných laboratořích. Metoda produkovala srovnatelné výsledky pro sladkou vodu. Dusičnanový anion byl nejdříve redukován zinkem v prostředí kyseliny chlorovodíkové na dusitanový anion. V roztoku se nacházelo i Griessovo činidlo, se kterým ihned vznikající dusitanový anion reagoval. Došlo k vzniku diazoniové soli s kyselinou sulfanilovou a následné kopulaci s N – (1 – naftyl) – ethylendiaminem. Po třepání a 10 minutách stání bylo porovnáno vzniklé růžovofialové zbarvení. Reakční schéma je na obrázku (Obr. 2). Kolorimetrické porovnání je na obrázku (Obr. 3). [29]



Obr. 2: Vznik kolorimetricky stanovitelného růžovofialového zbarvení. [29]



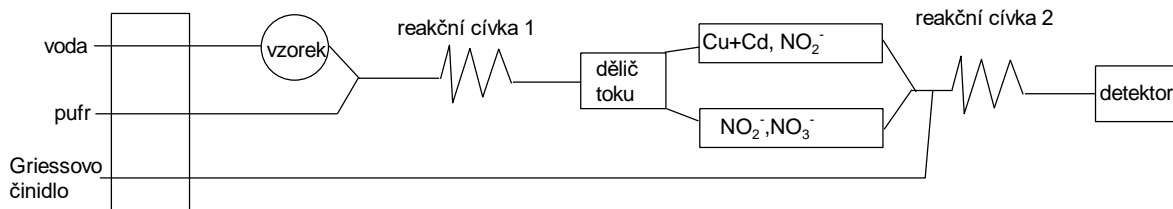
Obr. 3: Kolorimetrické stanovení dusičnanů. [29]

2.6.2. Stanovení dusičnanů a dusitanů průtokovou injekční analýzou (FIA)

Článek [30] pojednává o analýze dusičnanů a dusitanů v potravinách. Potraviny byly homogenizovány s vařící vodou a přefiltrovány. Následně bylo přidáno aktivní uhlí a Carrezovo činidlo 1 a 2 na vyčeření roztoku. Roztok byl míchán 30 minut, poté zfiltrován membránovým filtrem. Schéma chemické reakce se shoduje s kolorimetrickým stanovením dusičnanů s tím, že se dusičnany na dusitany redukovaly na kolonce s kadmíem a mědí. (2.6.1).

Přístroj na průtokovou injekční analýzu (FIA) se skládal z několika částí (Obr. 4). Do nosného média, vody, byl nadávkován vzorek automatickým dávkovačem. Po smíchání

s pufrům o pH = 8,5 následoval dělič toku. Pokud byl vzorek vpuštěn do kolonky s kadmíem a mědí, došlo k redukci dusičnanů na dusitany. Stanovovala se suma dusičnanů a dusitanů. Když byl vzorek vpuštěn do obtékač kolonky, stanovovaly se pouze dusitany. V reakční cívce došlo k reakci (Obr. 2), při které vzniklo růžovofialové zbarvení. UV-Vis detektor byl nastaven na 520 nm. [30]



Obr. 4: Schéma FIA analyzátoru dusičnanů a dusitanů. [30]

2.6.3. Stanovení dusičnanů a dusitanů pomocí kapilární elektroforézy

Článek [31] pochází z oboru forenzních věd. Dusičnany a dusitany se nachází v povýstřelových zplodinách. Osobě, která vystřelila ze zbraně, byly provedeny stěry pomocí vzorkovací hedvábné tyčinky. Ta byla pak vyluhována v ultrazvuku do vody. Vzorky byly analyzovány kapilární elektroforézou s DAD detektorem při 214 nm. Kapilára byla naplněna elektrolytem, který tvořil roztok fosfátového pufru o pH = 3,5. Vzorek byl hydrodynamicky nadávkován a na kapiláru bylo přivedeno 20 kV. Celková doba analýzy byla kratší než 30 minut, samotná separace trvala 5 minut. Elektroosmotický tok byl potlačen díky nízkému pH v kapiláře. Pomocí kapilární elektroforézy s DAD detektorem se podařilo zjistit, že osoba držela zbraň v levé ruce. Na levé ruce byla koncentrace dusičnanů vyšší. [31]

2.6.4. Fluorescenční senzor na dusičnany a dusitany na bázi oxidu grafenu.

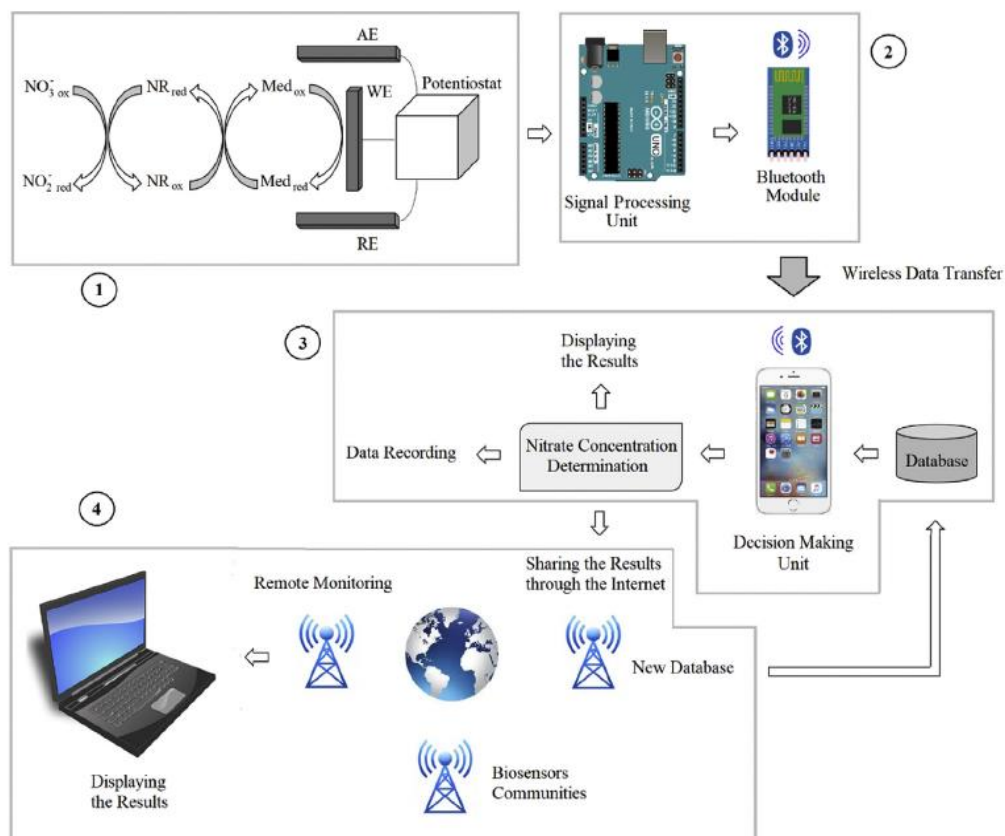
V článku [32] sloužil oxid grafenu (GO) jako nový fluorescenční senzor pro stanovení dusičnanů a dusitanů. GO byl syntetizován modifikovanou Hummersonovou metodou a byl charakterizován pokročilými instrumentálními metodami. GO měl dvoudimenzionální strukturu. Připravený práškový GO byl dispergován do vody a přidaly se dusičnany a dusitany. Excitační vlnová délka byla 367 nm a emisní vlnová délka byla 567 nm. GO senzor byl více citlivý k dusitanům než k dusičnanům. Dusitanový anion je menší a má také vyšší polaritu než dusičnanový anion. To způsobovalo, že dusitanový anion měl větší interakce s kyslíkem v GO. Analyzované koncentrace byly 1-10 mM. [32]

2.6.5. Stanovení pomocí dusičnanové iontové selektivní elektrody

Článek [25] pojednává o analýze dusičnanů a dusitanů v masě pomocí dusičnanové iontové selektivní elektrody. Větší množství masa bylo homogenizováno. Poté byl odebrán reprezentativní vzorek masa do celulózové extrakční patrony. Extrakce probíhala borátovým pufrům o $\text{pH} = 9$ v Soxhletově extraktoru 3 hodiny. Při hodnotě $\text{pH} = 9$ bylo dosaženo optimálních výtěžků extrakce. Extrakt byl kvantitativně převeden do odměrné baňky, kde byl doplněn vodou. Pro analýzu dusičnanů byl pipetován podíl do kádinky, ke kterému byla přidána směs síranu hlinitého, kyseliny amidosulfonové, síranu stříbrného a síranu amonného. Koncentrovanou kyselinou sírovou byla upravena kyselost na $\text{pH} = 3,3$. Bylo provedeno měření pomocí ISE. Pro stanovení dusitanů se k odpipetovanému podílu přidala směs chemikálií, jen místo kyseliny amidosulfonové byl přidán roztok manganistanu draselného. Došlo k oxidaci dusitanů na dusičnany. Nadbytek manganistanu byl odstraněn přidáním peroxidu vodíku. Pomocí ISE se stanovila suma dusičnanů a dusitanů. [25]

2.6.6. Stanovení dusičnanů pomocí biosenzoru a cyklické voltametrie

V posledních dvou dekadách byly vyvinuty analytické biosenzory, které vykazují dostatečnou citlivost a ekonomickou výhodnost při stanovení dusičnanů. Funkčnost biosenzoru byla založena na biokatalyzované redukci dusičnanů na dusitany. Aktivita enzymu, zakotveného na pracovní elektrodě, se v průběhu času snižuje. V klasických měřeních byl enzym obměňován vždy po malém počtu analýz, a proto tato metoda nenašla většího komerčního využití. V článku [26] vědci pracovali s inteligentním přenosným senzorem, který nevyžaduje tak častou obměnu enzymu. Bylo možné korigovat výsledky na aktivitu enzymu v čase a na počet analýz. Lze tedy odhadnout koncentraci dusičnanů s malou odchylkou. Připravená elektroda se zakotveným enzymem pracovala nejméně 10 dní a analyzovala 400 vzorků. Instrumentální část se skládala ze 4 hlavních částí (Obr. 5). Tříelektrodový elektrochemický systém (1), zařízení na zpracování signálu s bezdrátovou technologií (2), aplikace pro platformu iOS firmy Apple (3) a sdílení výsledků na vzdálený server (4). Vzdálené pozorování umožňovalo monitoring z více míst. [26]



Obr. 5: Schéma biosenzoru. [26]

2.6.7. Stanovení dusičnanů a dusitanů chromatografií na iontoměničích

Článek [33] pojednává o stanovení dusičnanů a dusitanů pomocí ionexové chromatografie v cukrovarnickém průmyslu. Jednalo se především o cukrovou řepu, melasu, surovou cukernou šťávu a řepnou buničinu. Chromatografie na iontoměničích využívala vodivostní detekce. Separace probíhala na kapilární koloně, naplněné anexem, který poskytoval retenci pro anionty a pro organické kyseliny. Vzorky cukrové řepy byly vařeny ve vodě a následně ochlazeny. Po filtraci a ředění byly dávkovány do chromatografu. Probíhala gradientová eluce, kdy s dobou analýzy vzrůstala koncentrace hydroxidu sodného ve vodě. Retenční časy obou stanovovaných aniontů byly odlišné přibližně o 5 minut. Dusičnany se nacházely ve všech analyzovaných vzorcích. Velmi vysoké byly koncentrace v melase, hodnoty se pohybovaly v rozmezí 126 – 8900 mg/kg (vztaženo na koncentraci dusičnanového aniontu) v sušině, průměrná hodnota byla 2376 mg/kg v sušině. V surové cukerné šťávě byla průměrná hodnota 527 mg/kg, v řepné buničině pak 34,33 mg/kg v sušině. Dusičnany a dusitany nejsou

odstraněny v čistících procesech uhličitánem vápenatým. Prochází tak dále a shromažďují se v melase. [33]

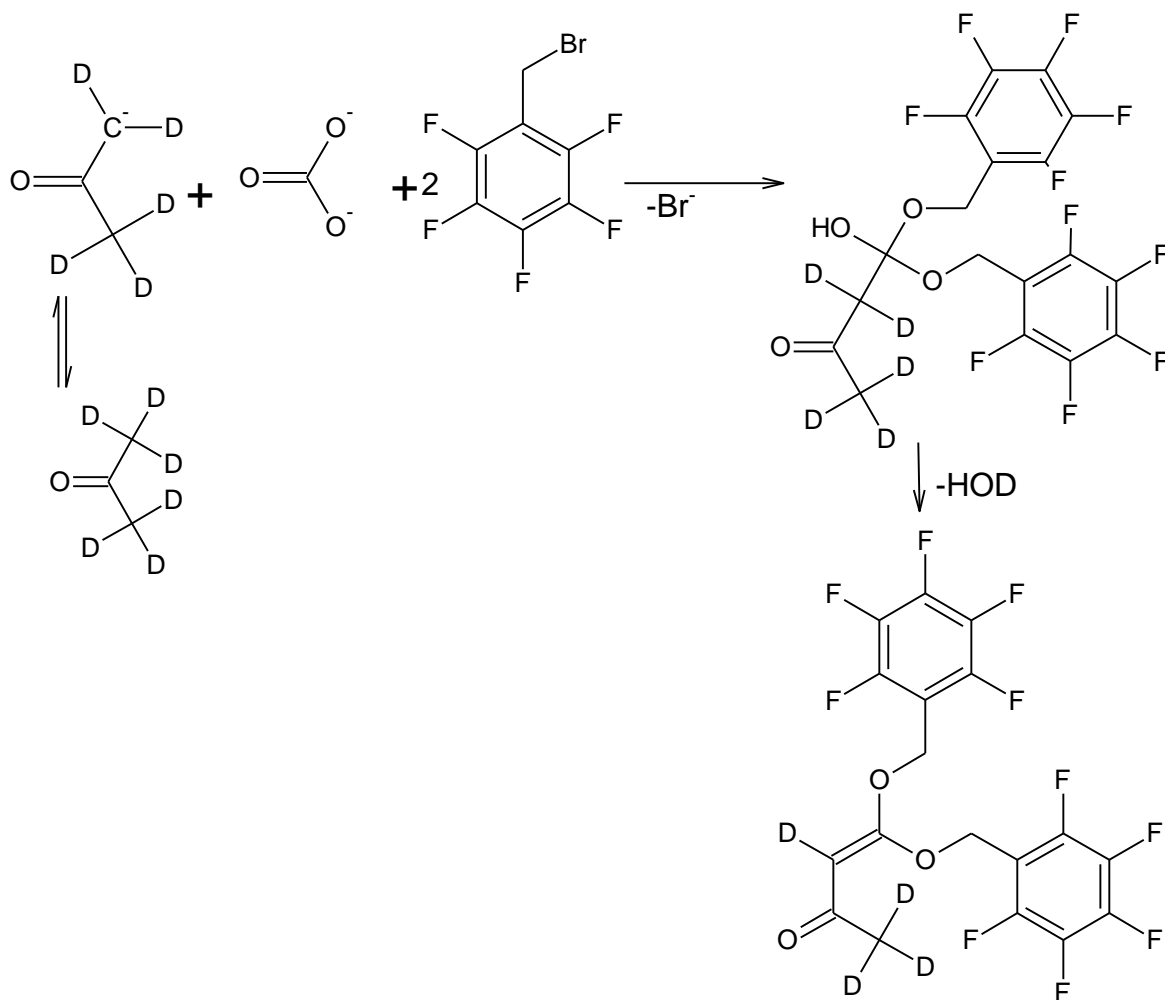
2.7. Plynová chromatografie anorganických iontů

Plynová chromatografie anorganických iontů není nová záležitost. Například články o analýzách křemičitanů a bromidů byly publikovány roku 1978 [34], resp. 1972 [35]. Analýza anorganických iontů není pro plynovou chromatografii typická. Nabité částice nejsou těkavé, a proto je nelze převést do plynné fáze. Ionty se proto obvykle analyzují jinými technikami. Postupy analýz anorganických iontů plynovou chromatografií mohou mít verifikační charakter ke klasickým metodám, které jsou založené na jiných chemických a fyzikálních principech.

Plynová chromatografie využívá chemické derivatizace. Cílem je umožnění nebo vylepšení zplynění, separace, nebo detekce analytu. Určité skupině iontů vyhovují jen některé derivatizační techniky. Hlavním cílem je snížit polaritu původní látky. Látky s polárními skupinami jsou hůře převeditelné do plynného stavu, mají obvykle vyšší teplotu varu. V případě analýz anorganických látek se chemická derivatizace provádí před chromatografickým dělením. Optimální derivatizační reakce by měla být kvantitativní a rychlá. [2]

2.7.1. Analýza oxidu uhličitého a uhličitanů plynovou chromatografií

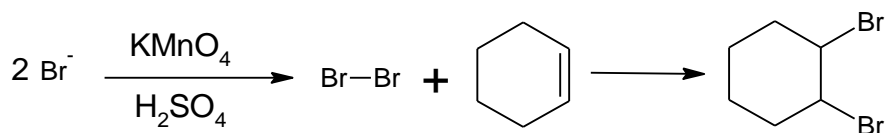
V práci [36] se pojednává o analýze oxidu uhličitého a uhličitanů plynovou chromatografií. Oxid uhličitý a uhličitany byly zachyceny v alkalickém roztoku. K uhličitanům byl přidán izotopově značený standard $\text{Na}^{13}\text{CO}_3$ (vnitřní standard), vodný roztok deuterovaného acetonu (deuterium v (Obr. 8) značeno písmenem D) a derivatizační činidlo pentafluorobenzyl bromid (PFB–Br). Vzorky byly inkubovány. Schéma derivatizace je na obrázku (Obr. 6). Po ochlazení na laboratorní teplotu byly vzorky odpařeny do sucha proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v acetonu. Roztok byl analyzován GC/MS. Byla použita jak ionizace elektronem, tak chemická ionizace v negativním módu. [36]



Obr. 6:Derivatizace uhličitánového aniontu.[36]

2.7.2. Analýza bromidů v krvi plynovou chromatografií

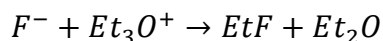
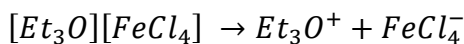
Článek [35] se věnuje analýze bromidů v krvi plynovou chromatografií, kterou lze analyzovat i krev zemřelých na rozdíl od kolorimetrické metody. Ke vzorku byl přidán roztok kyseliny trichloroctové, aby byly vysráženy bílkoviny, a voda. Po chvíli třepání byla část odebrána do vialky se zátkou a byl přidán roztok kyseliny sírové, manganistan draselný a cyklohexen jako reakční činidlo. Se vzorkem se třepalo a poté byl přidán siřičitan sodný. Třepalo se do odbarvení roztoku. Po chvíli stání se oddělily vrstvy. Do plynového chromatografu se dávkovalo z horní fáze. Plamenoionizačním detektorem (FID) byly detekovány vzniklé dva produkty, které byly v článku identifikovány jako 1,2 – dibromocyklohexan (Obr. 7) a 1,6 – dibromohexan. [35]



Obr. 7: Vznik 1,2-dibromcyklohexanu.

2.7.3. Stanovení fluoridů pomocí headspace GC/MS

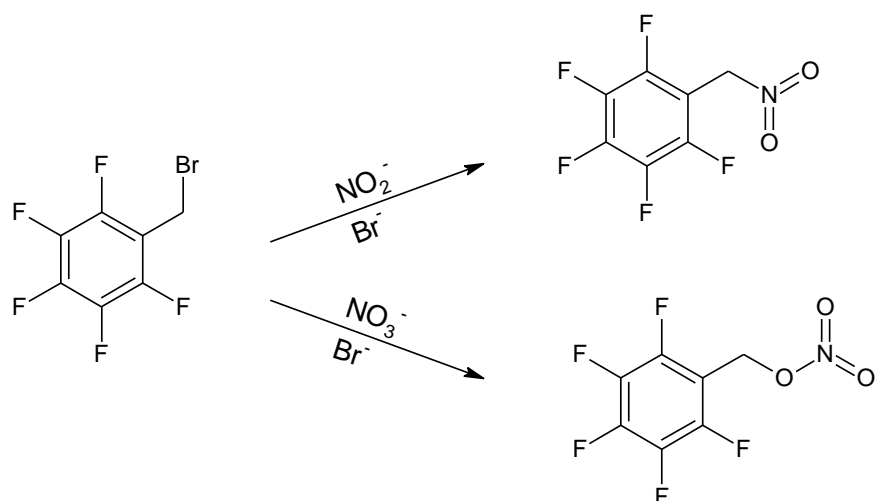
Dříve bylo stanovení fluoridů plynovou chromatografií založeno na tvorbě fluorsilanů, kterým předcházela extrakce do organického rozpouštědla, nebo byla použita SPME technika. Vazba Si-F není stabilní ve vodných prostředích a při vysokém pH. V článku [37] bylo proto použito alkylační činidlo $[\text{Et}_3\text{O}][\text{FeCl}_4]$. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí metody přidavku standardu. Do vybraných headspace vialek byly ke vzorkům vody přidány standardy fluoridů. Poté byl přidán roztok amoniaku a následně i čerstvě připravené alkylační činidlo. Reakce probíhala za laboratorní teploty tři hodiny. Reakční schéma je na obrázku (Obr. 8). Poté byly vzorky dávkovány ručně plynotěsnou stříkačkou do plynového chromatografu. [37]



Obr. 8: Alkylační reakce $[\text{Et}_3\text{O}][\text{FeCl}_4]$. [37]

2.8. Stanovení dusičnanů plynovou chromatografií

Pro stanovení dusičnanů plynovou chromatografií bylo vyvinuto mnoho metod. Používalo se alkylační (derivatizační) činidlo pentafluorobenzyl bromid (PFB-Br). Toto činidlo reagovalo jak s dusičnanovým, tak dusitanovým aniontem. S dusitanovým aniontem tvoří α -nitro-pentafluortoluen a s dusičnanovým aniontem tvoří příslušný ester (Obr. 9). Ester vzniká pomaleji. Za zvýšené teploty a za delší doby reakce se výtěžek esteru dusičnanu zvýšil, nicméně derivatizovaný dusitan se začal rozkládat. Byl zvolen kompromis v podobě 1 hodiny. Pro kvantifikaci byl použit izotopově značený dusičnan a dusitan. [38, 39].



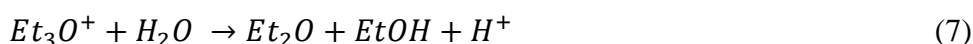
Obr. 9: Derivatizační reakce PFB-Br s NO_3^- a NO_2^- . [39]

V praktické části této kvalifikační práce bylo využito derivatizační činidlo triethyloxonium tetrafluoroborát.

2.8.1. Derivatizační činidlo $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$

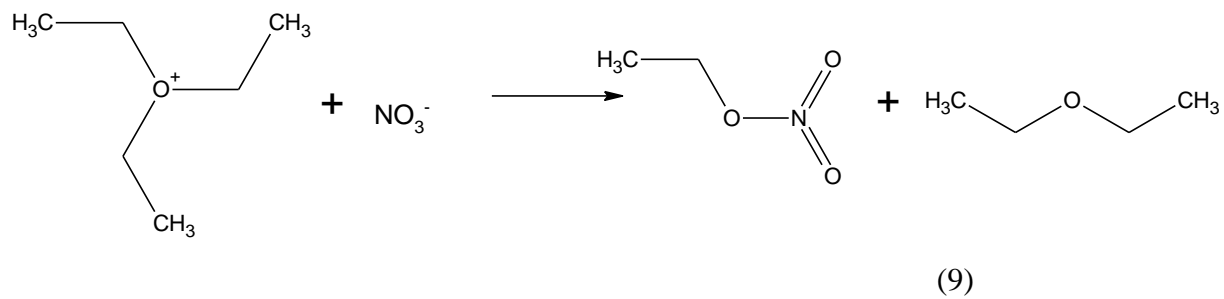
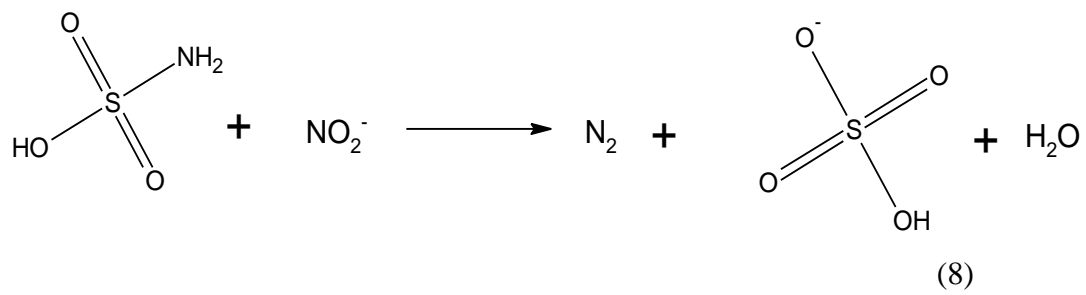
Derivatizační alkylační činidlo triethyloxonium tetrafluoroborát je vědci v poslední době používáno pro chemickou tvorbu par (chemical vapor generation – CVG). Pomocí tohoto alkylačního činidla je možno analyzovat chloridy, bromidy, iodidy, kyanidy, thiokyanáty, sulfidy, dusitany a dusičnany. Činidlo je taky známo pod názvem Meerweinova sůl, syntetizoval ji Hans Meerwein a jeho tým v roce 1937. Ta prokázala schopnost provést alkylaci ve vodném roztoku u zmíněných anorganických aniontů, umožňuje separaci těkavých látek od matrice. CVG může mít i prekoncentrační úlohu. Derivatizační činidlo provádí O-alkylaci dusičnanového aniontu, vzniká příslušný ethylester.

Derivatizační činidlo $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$ je pevná látka krystalické struktury. Práce s ní vyžaduje obezřetnost. Hydrolyzou vznikají těkavé a hořlavé produkty, diethylether a ethanol (rovnice 7). Zásobní nádoba se uchovává v mrazícím boxu. [40, 41]



2.8.2. Stanovení dusičnanů pomocí $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$

Vodný vzorek obsahující dusičnany mohl také obsahovat dusitany. Pro odstranění dusitanů byla ke vzorku do headspace vialky přidána kyselina amidosulfonová. Ta reaguje s dusitany dle rovnice 8. [42] Ke vzorku bylo přidáno derivatizační činidlo $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$ a vialka byla zakrimpována. Derivatizační reakce vyjadřuje rovnice 9. Vialky byla inkubovaná před headspace dávkováním při 60°C po dobu 5 minut. [40]



3. PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem kvalifikační práce je optimalizovat metodu na analýzu dusičnanů ve víně pomocí derivatizace analytu s následnou analýzou plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Dusičnany spadají spíše do anorganické analýzy, a tudíž nejsou obvyklým analytem pro GC/MS. V předchozích pracích se autoři zabývali zeleninou, ve které očekávali velké koncentrace dusičnanů. Víno tímto způsobem nebylo analyzováno. Optimalizovaná metoda byla aplikována na vzorky různých vín.

3.1. Použité chemikálie

Amidosulfonová kyselina – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

Triethyloxonium tetrafluoroborát, $\geq 97,0\%$ – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

Dusičnan draselný ^{15}N , 98 % atomů ^{15}N – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

Dusičnan draselný, p. a. – Penta, Praha, ČR.

Chlorid sodný, p. a. – Lachema, Neratovice, ČR

3.2. Přístrojové vybavení

Automatické pipety Eppendorf, Hamburk, Německo.

Analytické váhy Mettler Toledo, XSE205DU, Švýcarsko.

Blokový termostat, Stuart SBH130, Staffordshire, Velká Británie.

Hmotnostní spektrometr Agilent Technologies 5973N, Santa Clara, Kalifornie, USA.

Kapilární chromatografická kolona Optima 5 MS – 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Macherey – Nagel, Düren, Německo.

Nosný plyn He 5.5, Siad, Bergamo, Itálie.

Plynový chromatograf Hewlett Packard HP 6890 series, Santa Clara, Kalifornie, USA

Plynotěsná stříkačka

Headspace vialky, 22,5 x 75 mm, objem 20 ml

Běžné laboratorní sklo

3.3. Vzorky vín

Víno, které bylo analyzováno, bylo zakoupeno v 1. Olomoucké vinotéce v Olomouci. Analyzovaná vína byla jak lahvová, tak stáčená. Bobule stáčených vín nepocházely z České republiky, ale vína byla vyrobena na území ČR. Vzorky pokryly základní spektrum vín, která jsou na trhu. Jedno analyzované víno pocházelo ze Slovenska, vzorek č. 6, Tab. I.

| Číslo vzorku | Druh vína | Ročník | Barva vína | Výrobce | Původ hroznů |
|--------------|---------------------|--------|------------|--|---------------------|
| 1 | Rulandské šedé | 2018 | bílé | Vinný dům, Bzenec | Maďarsko |
| 2 | Iršaj Oliver | 2017 | bílé | Vinný dům, Bzenec | Maďarsko |
| 3 | Müller Thurgau | 2018 | bílé | Vinný dům, Bzenec | Maďarsko |
| 4 | Veltlínské zelené | 2018 | bílé | Vinný dům, Bzenec | Maďarsko |
| 5 | Savinon | 2015 | bílé | Vinařství Krist, Milotice | Česká republika |
| 6 | Rizling vlašský | 2015 | bílé | Lokální vinař, Pezinský vinohradnický region | Slovenská republika |
| 7 | Svatovavřínecké | 2018 | rosé | Vinný dům, Bzenec | Česká republika |
| 8 | Merlot - polosladké | 2018 | červené | Vinný dům, Bzenec | Maďarsko |
| 9 | Merlot - suché | 2017 | červené | Vinný dům, Bzenec | Francie |
| 10 | Modrý portugal | 2017 | červené | Vinařství Kovacs, Novosedly | Česká republika |

Tab. I: Přehled analyzovaných reálných vzorků vín.

3.4. Pracovní postupy

3.4.1. Příprava standardních roztoků

3.4.1.1. Příprava standardního roztoku KNO_3

Na analytických vahách bylo do mikrozkuřavky naváženo 1,63 mg KNO_3 ($M = 101,11 \text{ g/mol}$) a přidáno pomocí automatické pipety 1 ml destilované vody. Toto množství odpovídá koncentraci 1 mg/ml dusičnanového aniontu NO_3^- . Pro odlišnou navážku byl přepočítán objem přidávané vody pomocí přímé úměry.

3.4.1.2. Příprava standardního roztoku K^{15}NO_3

Na analytických vahách bylo naváženo do mikrozkuřavky 1,62 mg izotopově značeného K^{15}NO_3 ($M = 102,10 \text{ g/mol}$). Pomocí automatické pipety bylo přidáno 1 ml destilované vody. Koncentrace $^{15}\text{NO}_3^-$ odpovídá 1 mg/ml. Pro odlišnou navážku lze vypočítat množství přidávané vody přímou úměrou.

3.4.2. Příprava derivatizačních činidel

3.4.2.1. Příprava roztoku amidosulfonové kyseliny

Na analytických vahách bylo naváženo do mikrozkušavky 10 mg kyseliny amidosulfonové. Automatickou pipetou byl přidán 1 ml destilované vody. Výsledný roztok obsahoval 1 % (m/v) kyseliny amidosulfonové.

3.4.2.2. Příprava roztoku triethyloxonium tetrafluoroborátu [Et₃O][BF₄]

Na analytických vahách bylo do mikrozkušavky naváženo 150 mg [Et₃O][BF₄]. Pomocí automatické pipety bylo přidáno 150 µl acetonitrilu. Vzniklý roztok obsahoval 50 % (m/v) derivatizačního činidla. V acetonitrilu má být derivatizační činidlo stabilnější po delší dobu než v destilované vodě. [40]

3.4.3. Příprava vzorků

Víno bylo sonifikováno 10 minut na ultrazvukové lázni, aby se zbavilo rozpuštěných plynů. Do skleněné headspace vialky bylo odpipetováno 2 ml sonifikovaného vína pomocí automatické pipety. Do vína bylo přidáno 100 µl standardního roztoku K¹⁵NO₃. Poté 100 µl roztoku kyseliny amidosulfonové a nakonec 50 µl roztoku [Et₃O][BF₄] v acetonitrilu. Ihned po přidání [Et₃O][BF₄] došlo k zakrimpování headspace vialky. Vialka byla vložena do blokového termostatu, který byl předem vyhřátý na 60 °C. Vialka byla v blokovém termostatu 30 minut. Po této době bylo septum propíchnuto a plynotěsnou dávkovací stříkačkou bylo nadávkováno 2,5 ml do nástřiku plynového chromatografu.

3.4.4. Parametry analýzy

Plynotěsnou dávkovací stříkačkou byla plynná fáze nadávkována do nástřiku, který byl vyhříváný na 270 °C. Dělič toku byl nastavený na poměr 10:1. Teplota termostatu kolony byla za začátku analýzy 50 °C po dobu 3 minut. Poté nastal nárůst teploty s gradientem 20 °C/min do teploty 250 °C. Při finální teplotě byl termostat další 4 minuty. Průtok nosného plynu byl udržován na 0,9 ml/min. Délka analýzy byla 17 minut.

Hmotnostní spektrometr pracoval v módu SIM (Selected Ion Monitoring) po celou dobu analýzy. Byl naprogramován na sběr informací o iontech $m/z = 46$ a $m/z = 76$, které patří fragmentu s dusíkem ¹⁴N, tedy přírodního dusíku. Sbíral informace i o iontech $m/z = 47$ a $m/z = 77$, které náleží izotopově značenému dusíku ¹⁵N.

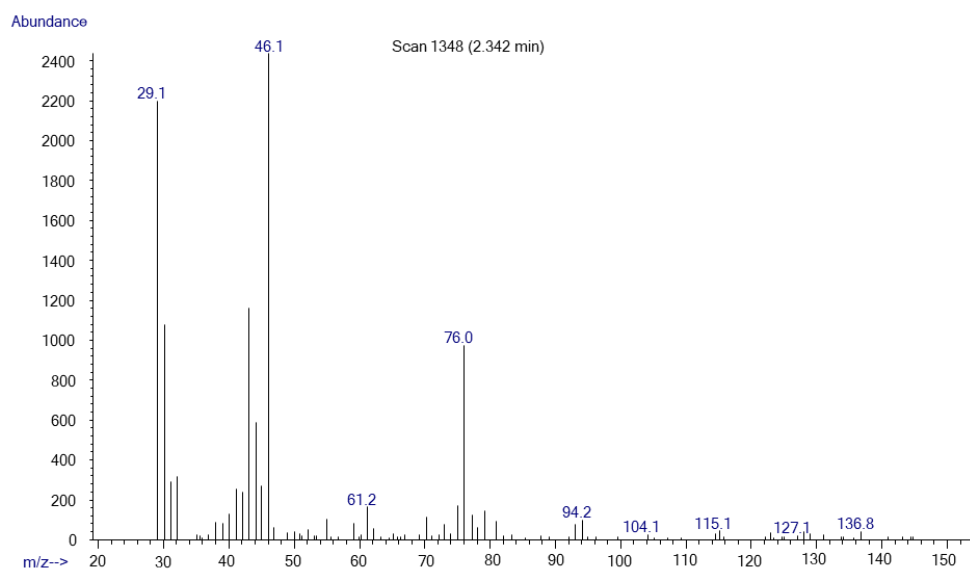
Hmotnostní spektrometr v módu TIC (Total Ion Current) pracoval od začátku analýzy. Rozpětí měřených m/z bylo 29,0 – 150,0.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

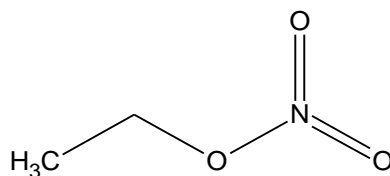
Na začátku praktické části bylo ověřeno, že reakce derivatizace dusičnanů (Rovnice 9) probíhá a je možné separovat a detekovat derivát analytu pomocí GC/MS. Ke 2 ml vína bylo do headspace vialky přidáno 1 ml standardního roztoku dusičnanu draselného. Po přidání 100 μ l amidosulfonové kyseliny a 50 μ l derivatizačního činidla byla vialka zakrimpována a umístěna do blokového termostatu na 30 minut při 60 °C. Z plynné fáze bylo dávkováno 0,5 ml do plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektrometr pracoval v módu TIC. Bylo získáno spektrum ethyl–nitrátu (Obr. 10).

4.1. Hmotnostní spektrum ethyl–nitrátu

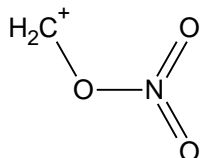
V hmotnostním spektru ethyl–nitrátu (ethylesteru kyseliny dusičné, Obr. 11) se nenalézá molekulární ion, neboť jeho signál by byl na $m/z = 91$. Na molekulární ion, kation radikál, by bylo možné aplikovat dusíkové pravidlo. Na fragmenty se dusíkové pravidlo neaplikuje. Fragment s $m/z = 76$ odpovídá ztrátě methylu z molekulárního iontu, předpokládaná struktura fragmentu je na obrázku (Obr. 12). Základní ion ve spektru je s $m/z = 46$. Tento fragment odpovídá ztrátě ethoxyly. Jeho předpokládaná struktura je na obrázku (Obr. 13). Ion s $m/z = 29$ odpovídá ethylu. Tento ion má druhou největší intenzitu a jeho struktura je na obrázku (Obr. 14).



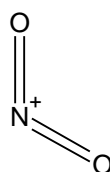
Obr. 10: Hmotnostní spektrum derivátu dusičnanu.



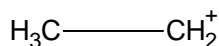
Obr. 11: Ethyl–nitrát



Obr. 12: Fragment m/z = 76



Obr. 13: Fragment m/z = 46



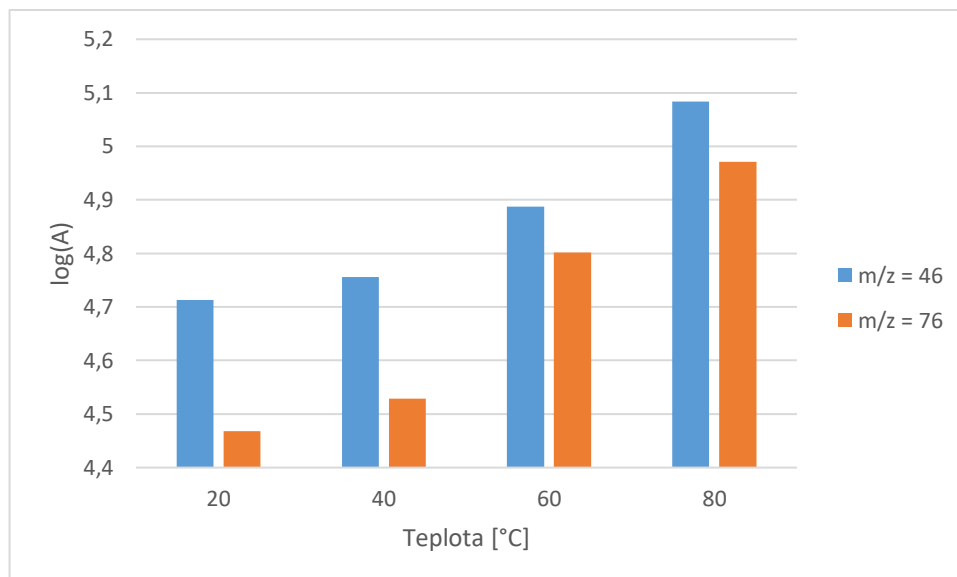
Obr. 14: Fragment m/z = 29

4.2. Derivatizace analytu

Reakce $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$ s dusičnanovým aniontem má ethylační charakter. Z činidla se uvolní reaktivní ethyl a vznikne ethylovaný derivát dusičnanu, ethyl–nitrát. Vedlejším produktem je diethylether. Derivarizace – ethylace probíhá za zvýšené teploty.

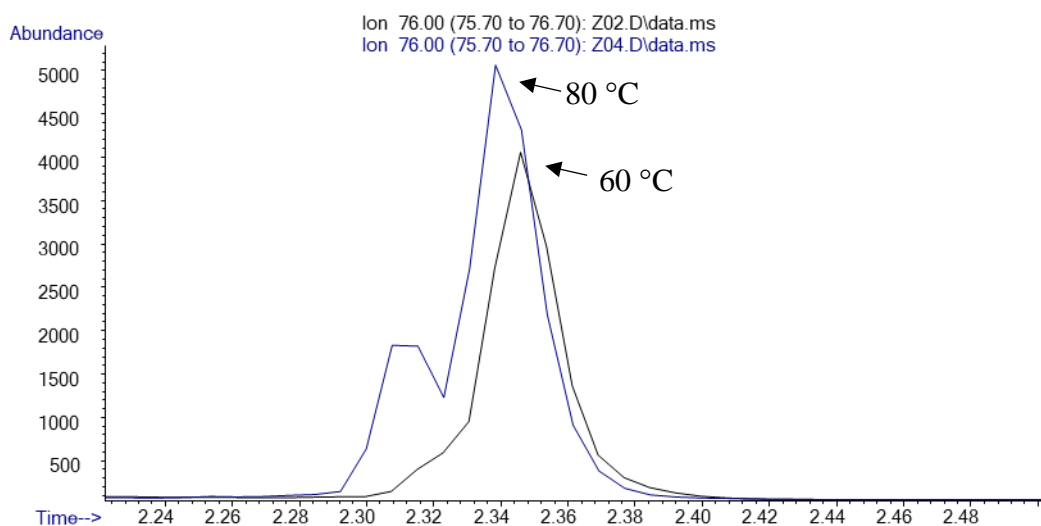
4.2.1. Vliv teploty inkubace na derivatizaci

Byla zaměřena pozornost na teplotu inkubace v blokovém termostatu. Do 4 headspace vialek bylo odpipetováno po 2 ml vína, vzorku č. 1. (Tab. I). Do vína bylo přidáno 200 μl standardního roztoku KNO_3 , aby signál byl lépe rozpoznatelný. Před inkubací bylo do každé vialky přidáno 100 μl kyseliny amidosulfonové a 50 μl derivatizačního činidla $[\text{Et}_3\text{O}][\text{BF}_4]$. Ihned po přidání činidla byla vialka zakrimpována a vložena do termostatu, nastaveného na teplotu 20, 40, 60 a 80 $^\circ\text{C}$. Po inkubaci byly vialky vytaženy a zchlazeny na laboratorní teplotu.



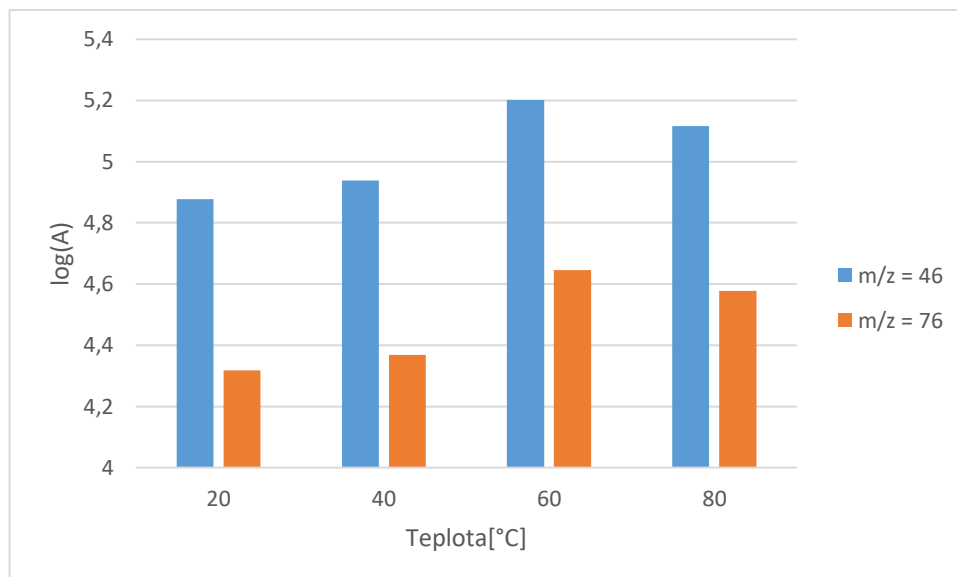
Obr. 15: Vliv teploty inkubace na derivatizaci.

Z uvedených ploch píků v logaritmické stupnici (Obr. 15) jde vidět, že reakce probíhá optimálně při 60 °C a 80 °C. U vzorku, který byl inkubován na 80 °C se objevovaly interference, které zvyšují chemický šum. Na obrázku (Obr. 16) odpovídá černá barva inkubaci na 60 °C, modrá barva inkubaci na 80 °C. Pro ion $m/z = 46$ je chromatogram v Příloze 1.



Obr. 16: Vliv teploty inkubace na derivatizaci pro ion $m/z = 76$.

Byla provedena další soustava měření, kdy byl vzorek dávkován po uplynutí 30 minut přímo z blokového termostatu bez ochlazení. Vzorky byly připraveny stejným způsobem, jako v předchozí analýze.



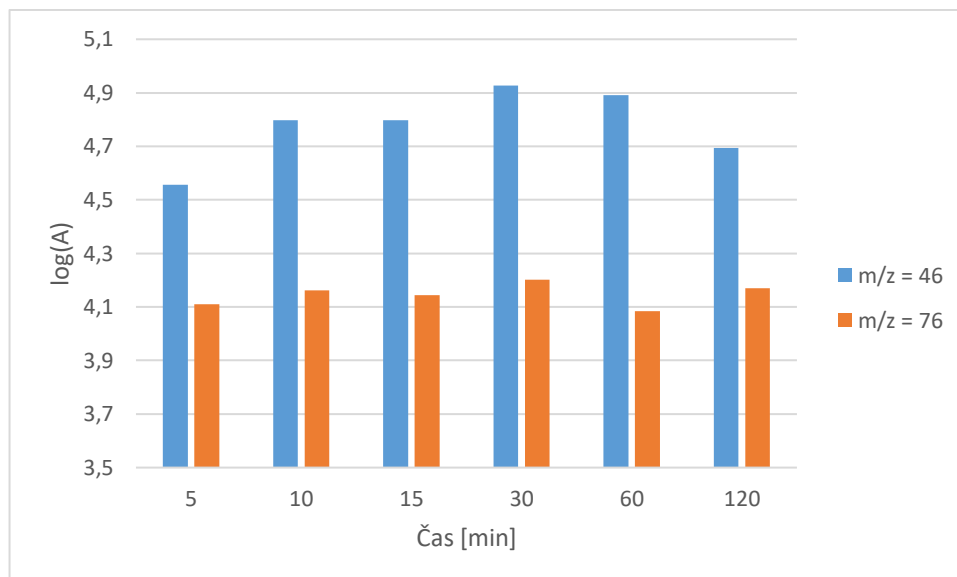
Obr. 17: Vliv teploty inkubace a dávkování na derivatizaci.

Z uvedeného obrázku (Obr. 17) lze odvodit, že největší odezva byla u vzorku, který byl inkubován při 60 °C. Při 80 °C mohlo docházet k rozkladům derivátu analytu a kondenzaci analytu na stěnách stříkačky. Pro další optimalizaci byla vybrána teplota 60 °C.

4.2.2. Vliv doby inkubace na derivatizaci

V dalším kroku byla sledována doba derivatizace. Při krátké době by derivatizace nemusela být kvantitativní. Dlouhá doba reakce není analyticky výhodná, neboť se za časový úsek zpracuje méně vzorků.

Do 6 headspace vialek bylo odpipetováno 2 ml vína, vzorek 1. Do vína bylo přidáno 200 µl standardního roztoku KNO₃, poté 100 µl roztoku kyseliny amidosulfonové. Po přidání 50 µl derivatizačního činidla byly vialky zakrimpovány. Vialky byly ponechány v blokovém termostatu při 60 °C vždy jinou dobu. Poté byla plynná fáze nastříknuta do plynového chromatografu.

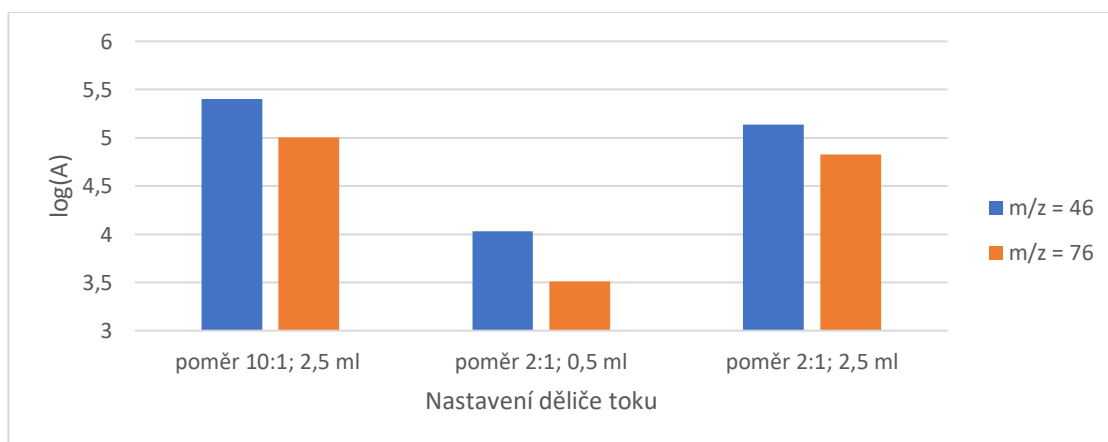


Obr. 18: Vliv doby reakce na derivatizaci.

Z obrázku (Obr. 18) je patrné, že optimální doba derivatizace je 30 minut při teplotě blokového termostatu 60 °C. Při kratších dobách zřejmě reakce neprobíhala kvantitativně. Při delších časech mohlo docházet k rozkladu produktů derivatizace. Delší čas derivatizace, než je 120 minut, nebyl zkoušen.

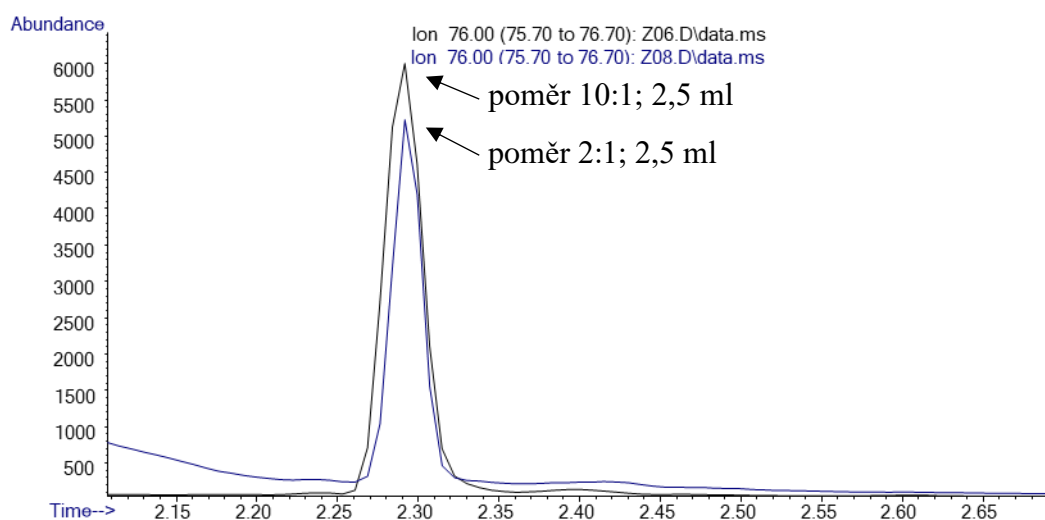
4.3. Vliv děliče toku na chromatografické vlastnosti

Pro zlepšení chromatografických vlastností se pozornost zaměřila také na dělič toku, tzv. splitter, který se nachází v nástřikové části plynového chromatografu, a jeho dělicí poměr. Byly vyzkoušeny metody, kdy bylo dávkováno 2,5 ml plynné fáze vzorku s dělicím poměrem 10:1. Na kolonu se tedy dostalo 0,23 ml plynné fáze vzorku. Poté byl dělicí poměr přenastaven na 2:1 a bylo dávkováno 0,5 ml a 2,5 ml, na kolonu se dostalo 0,17 ml a 0,83 ml plynné fáze vzorku.



Obr. 19: Vliv děliče toku na chromatografické vlastnosti.

Z obrázku (Obr. 19) lze poznat, že nejlepší plochu píku v logaritmickém měřítku má vzorek, kde byl nastavený dělicí poměr 10:1 a dávkovalo se 2,5 ml. Výhoda splitteru je, že separace probíhá s větší účinností (Obr. 20) a v důsledku dávkování menšího množství je menší chemický šum. Modrý chromatogram odpovídá dělicímu poměru 2:1 a dávkování 2,5 ml, černý chromatogram odpovídá poměru 10:1 a dávkování 2,5 ml. Chromatogram iontu $m/z = 46$ se nachází v Příloze 2. Proto se dále pracovalo s dělicím poměrem 10:1 a dávkovalo se 2,5 ml plynné fáze vzorku.

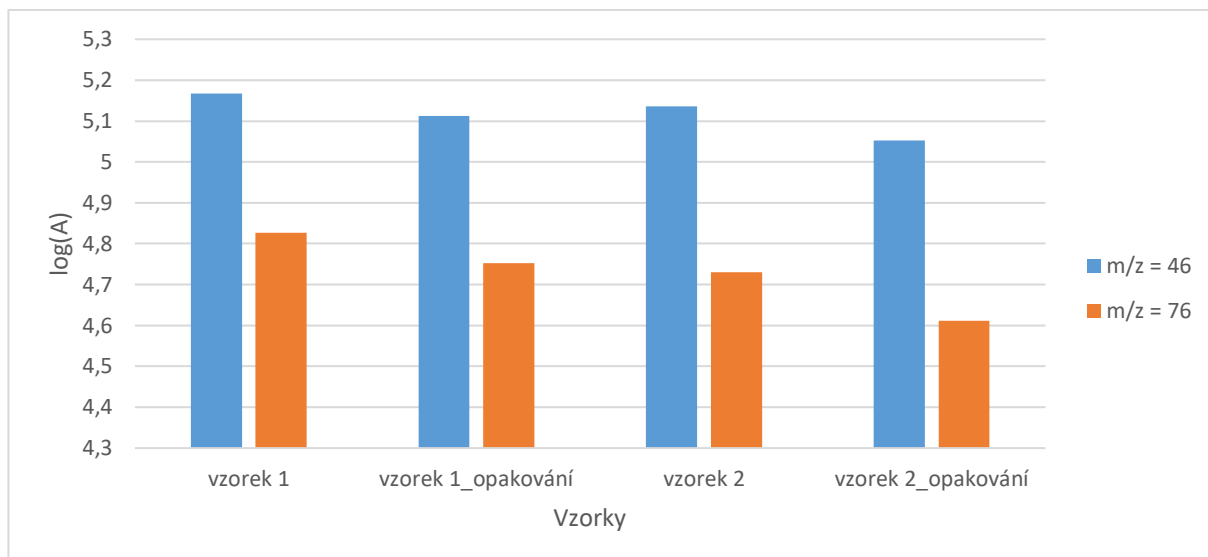


Obr. 20: Lepší chromatografické vlastnosti iontu 76.

4.4. Opakované dávkování ze stejné vialky

Opakované dávkování z headspace se využívá, pokud je dodáno pouze malé množství vzorku k analýze. Pomocí opakovaného dávkování lze kontrolovat těsnost zakrimpaných vialek, nebo průběh reakce. Odebráním prvního podílu plynné fáze dojde k narušení rovnováhy mezi kapalnou a plynnou fází, neboť je odebrána část analytu.

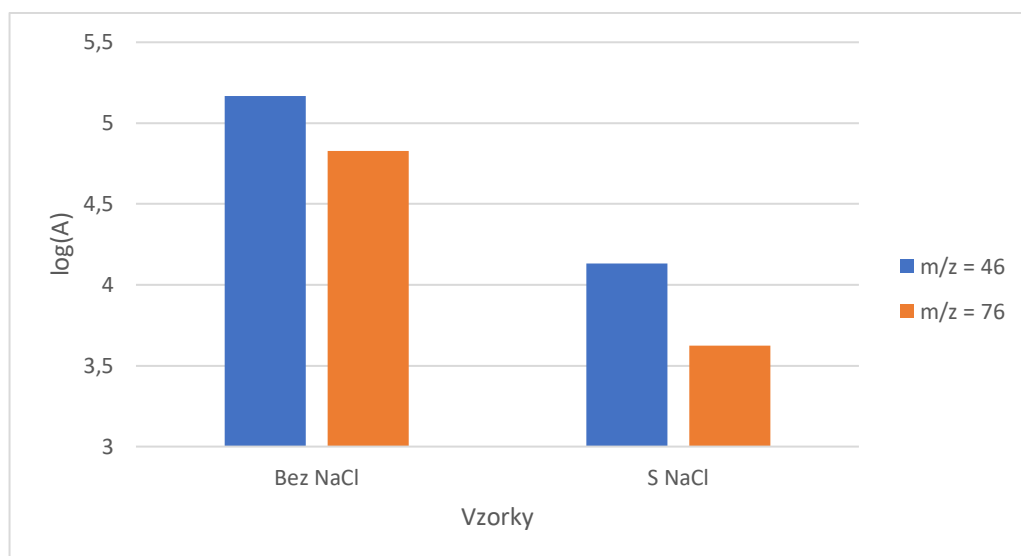
Vzorek byl připraven stejně jako v oddílu 4.2.2., doba, kterou vzorek strávil v blokovém termostatu, byla 30 minut. Z plochy píků v logaritmickém měřítku na obrázku (Obr. 21) můžeme určit, že opakované dávkování má vždy menší plochu píků než první dávkování. Druhé dávkování dosahuje průměrně 85 % oproti prvnímu dávkování u iontu $m/z = 46$, resp. 80 % u iontu $m/z = 76$. Opakované dávkování by mohlo být použito pro tuto analýzu dusičnanů, neboť derivatizace již neprobíhala. Pro dostatečné množství vzorků nebylo opakované dávkování využíváno.



Obr. 21: Opakované dávkování ze stejné vialky.

4.5. Vysolení derivátu analytu

Byla vyzkoušena metoda vysolení organického derivátu analytu do plynné fáze z polární vody. Zvýšením iontové síly dochází ke snížení rozpustnosti a nepolární látky by měly přejít ve větším množství do plynné fáze. Byl připraven nasycený roztok NaCl (35 g NaCl v 100 ml destilované vody). Do vzorku k 2 ml vína bylo přidáno 2,5 ml nasyceného roztoku NaCl. Poté bylo přidáno 100 μ l standardního roztoku KNO₃ a 100 μ l kyseliny amidosulfonové. Po přidání 50 μ l derivatizačního činidla [Et₃O][BF₄] byla vialka zakrimpována a umístěna do blokového termostatu při 60 °C na 30 minut. Plochy píků, odpovídající analýze bez přídavku NaCl a s přídavkem NaCl, jsou porovnány v logaritmicím měřítku na obrázku (Obr. 22). Z obrázku (Obr. 22) lze vyvodit, že s NaCl dosahuje derivatizace výrazně horších výtěžků. Sůl derivatizační reakci vadí, proto metoda vysolení nebyla použita pro reálné vzorky.



Obr. 22: Vysolení derivátu analytu.

4.6. Kvantitativní vyhodnocení

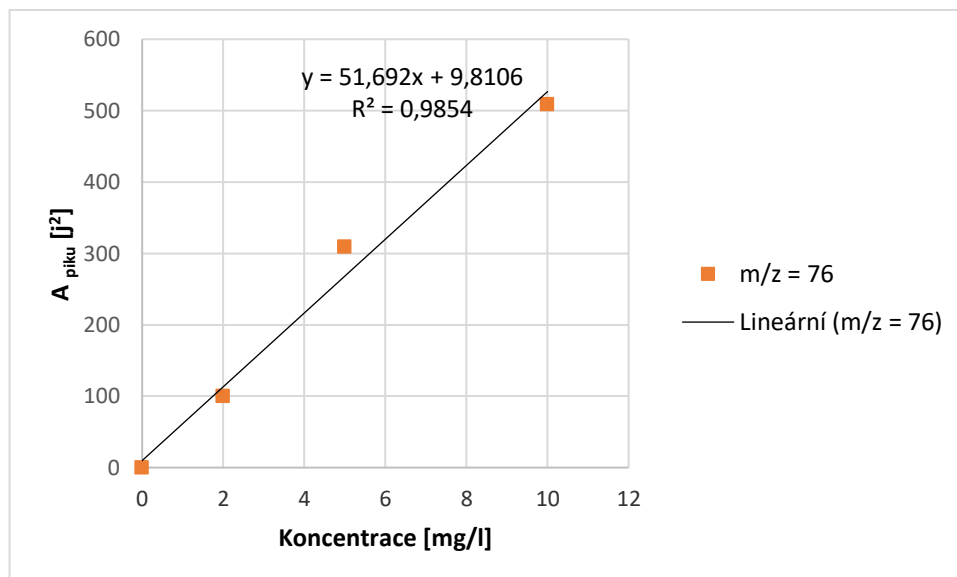
Pro optimalizaci metody byly vyzkoušeny metody vnitřního standardu, metoda přidavku standardu a metoda vnějšího standardu (Tab. II). Vše bylo testováno na vzorku č. 1 – Rulandské šedé (Tab. I).

| Metoda kvantifikace | NO ₃ [mg/l] |
|-------------------------------------|------------------------|
| Vnější standard – kalibrační křivka | 69,811 |
| Standardní přidavek | 4,590 |
| Vnitřní standard | 4,156 |

Tab. II: Srovnání metod kvantifikace.

4.6.1. Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody vnějšího standardu

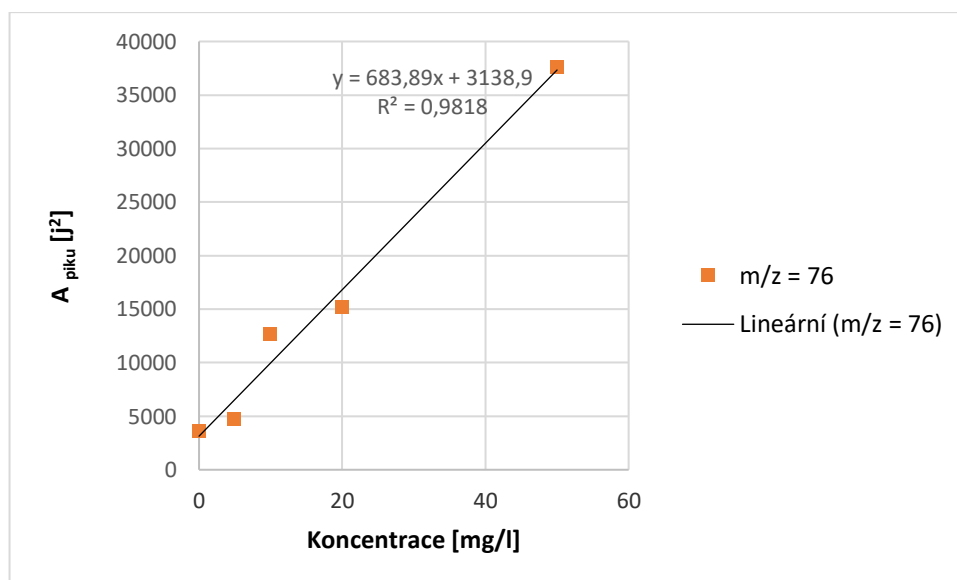
Pro metodu vnějšího standardu byla vybrána metoda kalibrační křivky. Matrice pro tuto metodu byl 10 % roztok ethanolu, denaturovaného methanolem, v destilované vodě. Byly připraveny vzorky o koncentraci NO₃⁻ 0 – 10 mg/l. Plochy píků byly vyneseny do grafu a proloženy lineární regresí. Kalibrační křivka pro ion m/z = 76 je na obrázku (Obr. 23). Pro ion m/z = 46 je kalibrační křivka v příloze 3. I když má ion m/z = 46 větší pravděpodobnost vzniku, byl použit k odhadu kvantifikace ion m/z = 76 kvůli lepšímu odstupu detekovaného signálu od šumu. Tato metoda poskytla hodnotu 69,811 mg/l. Hodnota se výrazně liší od ostatních metod kvantifikace (Tab. II). Výsledky mohlo ovlivnit například pH vína, nebo další přítomné látky ve víně.



Obr. 23: Metoda vnějšího standardu.

4.6.2. Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody přidavku standardu

Tato metoda lépe eliminuje efekty, způsobené maticí než metoda vnějšího standardu. Touto metodou byl analyzován pouze vzorek 1 (Tab. I), neboť je metoda pracná a náročná na strojový čas. V metodě jsou porovnávány plochy píků s přidavkem standardu a bez přidavku. Byly provedeny celkem 4 přidavky standardu, výsledky byly analyzovány graficky v obrázku (Obr. 24). [43]



Obr. 24: Metoda přidavku standardu.

4.6.3. Kvantitativní vyhodnocení pomocí metody vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu zohledňuje veškerou práci se vzorkem, nezávisí například na dávkovaném objemu do GC/MS. Vnitřní standard by měl mít definovanou odezvu vůči analytu, mnohdy se určují korekční faktory.

Jako vnitřní standard byl použit izotopově značený $K^{15}NO_3$. Do vialky bylo k 2 ml 10 % ethanolu přidáno 100 μ l standardního roztoku $K^{15}NO_3$ a 100 μ l standardního roztoku KNO_3 . Na pozorovaných hodnotách m/z existuje odlišný šum a pozadí, a proto byly určeny odezvové faktory (Tab. III) Průměrem A_s/A_i byly násobeny hodnoty ploch píků iontu $m/z = 76$. K reálným vzorkům vín se přidávalo 100 μ l standardního roztoku $K^{15}NO_3$. Množství odpovídá koncentraci 50 mg/l. Bylo zjištěno, že víno přirozeně obsahuje neměřitelné množství $^{15}NO_3^-$ iontů.

| Číslo vzorku | A_s/A_i |
|------------------------------------|--------------|
| 1 | 0,927 |
| 2 | 0,953 |
| 3 | 0,932 |
| Průměr A_s/A_i | 0,937 |
| Směrodatná odchylka | 0,011 |

Tab. III: Odezvové faktory.

4.7. Kvantitativní vyhodnocení vzorků reálných vín

Výsledky analýzy vzorků reálných vín jsou uvedeny v tabulce (Tab. IV). Pro všechny vzorky byla použita metoda vnitřního standardu s korekcí na odezvové faktory.

| Číslo vzorku | Druh vína | Barva vína | Koncentrace NO_3^- [mg/l] |
|--------------|---------------------|------------|-----------------------------|
| 1 | Rulandské šedé | bílé | 4,156 |
| 2 | Iršaj Oliver | bílé | 11,029 |
| 3 | Müller Thurgau | bílé | 5,166 |
| 4 | Veltlínské zelené | bílé | 9,053 |
| 5 | Savinon | bílé | 4,994 |
| 6 | Rizling vlašský | bílé | 2,851 |
| 7 | Svatovavřínecké | růžové | 6,121 |
| 8 | Merlot - polosladké | červené | 4,057 |
| 9 | Merlot - suché | červené | 4,299 |
| 10 | Modrý portugal | červené | 5,277 |

Tab. IV: Koncentrace dusičnanu v reálných vzorcích vín.

5. ZÁVĚR

Cílem kvalifikační práce byla optimalizace postupů a parametrů na analýzu dusičnanů ve vínech. Připravený derivát dusičnanu (ethyl–nitrát) je těkavý a vytváří dostatečnou tenzi par pro techniku headspace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Ve vzorcích vín byla zjištěna koncentrace dusičnanů v rozmezí 2,851 mg/l až 11,029 mg/l. Výsledky byly stanoveny metodou vnitřního standardu – izotopově značeného $K^{15}NO_3$ za použití odezvových faktorů. Z výsledků je patrné, že obsah dusičnanů nezávisí na barvě vína. Nejméně dusičnanů obsahuje lahvové bílé víno Rizling vlašský, slovenské produkce. Nejvíce dusičnanů obsahuje sudové bílé víno Iršaj Oliver, vyrobené v České republice z hroznů z Maďarska. Bylo by zajímavé otestovat stejné odrůdy z různých vinařských obcí, oblastí, jestli by se našla nějaká korelace mezi nimi. V testovaných vzorcích se nachází Merlot polosladký a suchý. Koncentraci dusičnanů by mohla ovlivňovat odrůda révy vinné. Koncentrace dusičnanů jsou si blízké.

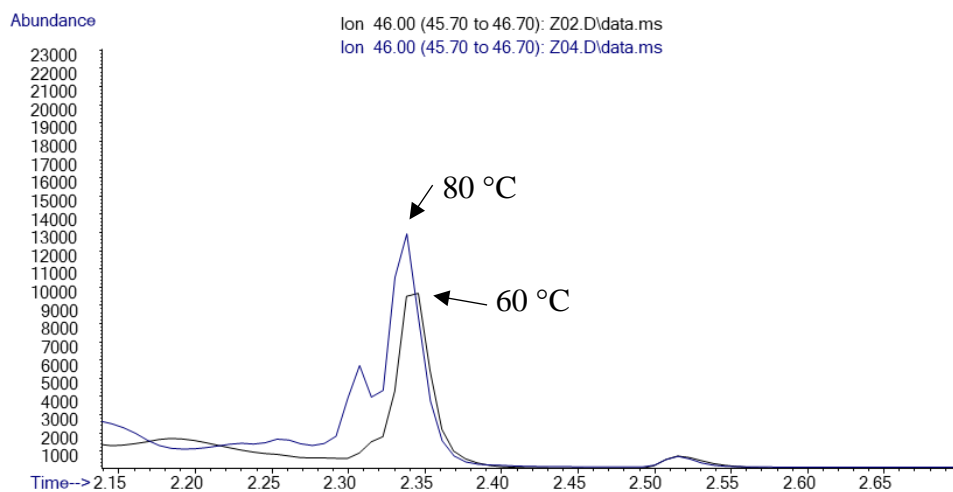
Všechny vzorky vín formálně splňují normu pro koncentraci dusičnanů ve vodě, ta je 50 mg/l. Jenom vzorek Iršaje Olivera nespĺňuje normu pro kojeneckou vodu, ta je nastavena na 10 mg/l.

6. POUŽITÁ LITERATURA

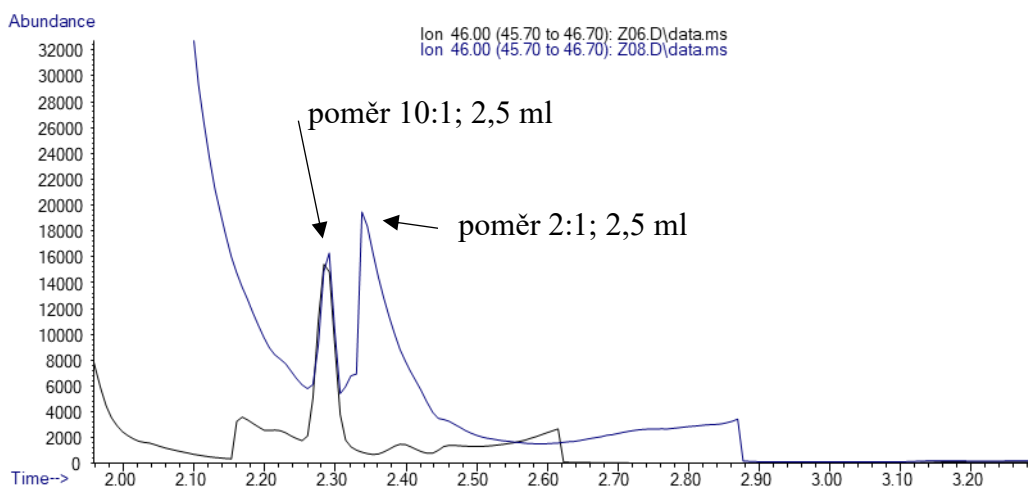
1. V. Frolec, Tradiční vinařství na Moravě, Universita J. E. Purkyně, Brno 1974.
2. D. Plech, Analýza furanových derivátů ve víně, in Katedra analytické chemie. 2017, Univerzita Palackého: Olomouc.
3. P. Javorková, Společenský význam vína ve vybraných kulturách, in Filosofická fakulta. 2017, Univerzita Palackého: Olomouc.
4. R.S. Jackson, Wine Science: Principles and Applications, 3rd Edition, Wine Science: Principles and Applications, 3rd Edition (2008) 1-770.
5. I. Geherová, Výroba vína, in Přírodovědecká fakulta. 2007, Masarykova univerzita: Brno.
6. Regionální muzeum v Mikulově. 17.2.2019]; Available from: <http://www.rmm.cz/czech/expozice.html#sud>.
7. P. Burešová, P. Pavloušek, Vše, co byste měli vědět o víně.....: ...a nemáte se koho zeptat, Grada Publishing a.s., 2014.
8. Y.C. Wang, et al., Estimating soil nitrate leaching of nitrogen fertilizer from global meta-analysis, Science of the Total Environment 657 (2019) 96-102.
9. D. Lisková, Dusičnany v zelenině, in Ústav technologie a mikrobiologie potravin. 2012, Univerzita Tomáše Bati: Zlín.
10. I. Parmová, Stanovení dusičnanů v pitné vodě, in Ústav technologie potravin. 2013, Univerzita Tomáše Bati: Zlín.
11. P. Alfrey. Nitrogen Fixing Plants & Microbes. Permaculture (2014) [cited 2014 25.8.]; Available from: <https://www.permaculture.co.uk/articles/nitrogen-fixing-plants-microbes>.
12. P. Kalač, Chemie životního prostředí, Jihočeská univerzita, České Budějovice 2010
13. P. Pitter, Hydrochemie, VŠCHT, Praha 2009.
14. M. Bártová, Obsah dusitanů a dusičnanů ve vybraných potravinách a jejich předpokládaný denní příjem v naší populaci, in Pedagogická fakulta. 2014, Západočeská univerzita: Plzeň.
15. V. Hlobilová, Dusitany a dusičnany ve stravě - jejich negativa a pozitiva, in Lékařská fakulta. 2013, Masarykova univerzita: Brno.
16. D. Salgovicova, S. Krizova, Exposure of the population of the Slovak Republic to nitrates, Journal of Food and Nutrition Research 45 (2006) 89-95.
17. L. Fewtrell, Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: A discussion, Environmental Health Perspectives 112 (2004) 1371-1374.
18. R.O. Wright, W.J. Lewander, A.D. Woolf, Methemoglobinemia: Etiology, pharmacology, and clinical management, Annals of Emergency Medicine 34 (1999) 646-656.
19. P. Pitter, Hydrochemie, Nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
20. P. Pitter, Hydrochemie, VŠCHT, 1999.
21. P. Pitter, Hydrochemie, VŠCHT, Praha 2015.
22. V. Nevorál, Nové komplexní analýzy minerálních vod ČSR r. 1979 - 1988, Mariánské Lázně 1989.
23. V. Mergl, J. Blažík, Limit pro dusičnany v pitné vodě a provoz iontoměniče,
24. M. Radfarda, et al., Health risk assessment to fluoride and nitrate in drinking water of rural residents living in the Bardaskan city, arid region, southeastern Iran, DESALINATION AND WATER TREATMENT 145 (2019) 249-256.
25. K. Choi, K. Fung, Determination of nitrate and nitrite in meat products by using a nitrate ion-selective electrode, Analyst 105 (1980) 241-245.

26. J. Massah, K.A. Vakilian, An intelligent portable biosensor for fast and accurate nitrate determination using cyclic voltammetry, *Biosystems Engineering* 177 (2019) 49-58.
27. R. Šelešovská, Testování metody stanovení dusičnanů s využitím přenosného fotometrického analyzátoru, *Chemické Listy* 110 (2016) 447-451.
28. A.M. Hartley, R.I. Asai, Spectrophotometric Determination of Nitrate with 2,6-Xylenol Reagent, *Analytical Chemistry* 35 (1963) 1207-1213.
29. E. Murray, et al., A colorimetric method for use within portable test kits for nitrate determination in various water matrices, *Analytical Methods* 9 (2017) 680-687.
30. A.A. Chetty, S. Prasad, Flow injection analysis of nitrate and nitrite in commercial baby foods, *Food Chemistry* 197 (2016) 503-508.
31. O.O. Erol, B.Y. Erdogan, A.N. Onar, Nitrate and Nitrite Determination in Gunshot Residue Samples by Capillary Electrophoresis in Acidic Run Buffer, *Journal of Forensic Sciences* 62 (2017) 423-427.
32. I.H. Tang, et al., Detection of nitrite and nitrate ions in water by graphene oxide as a potential fluorescence sensor, in 10th Joint Conference on Chemistry. 2016, Iop Publishing Ltd: Bristol.
33. A. Antczak-Chrobot, P. Bak, M. Wojtczak, The use of ionic chromatography in determining the contamination of sugar by-products by nitrite and nitrate, *Food Chemistry* 240 (2018) 648-654.
34. G. Garzo, et al., GAS-CHROMATOGRAPHY OF TRIMETHYLSILYLATED SILICATE ANIONS - SEPARATION WITH GLASS-CAPILLARY COLUMNS AND NEW ASPECTS IN DERIVATIZATION, *Journal of Chromatography* 167 (1978) 321-336.
35. A.W. Archer, A gas-chromatographic method for the determination of increased bromide concentrations in blood, *Analyst* 97 (1972) 428-432.
36. D. Tsikas, K. Chobanyan-Jurgens, Quantification of Carbonate by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 7897-7905.
37. E. Pagliano, et al., Novel Ethyl-Derivatization Approach for the Determination of Fluoride by Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 877-881.
38. E. Pagliano, et al., Quantification of nitrite and nitrate in seawater by triethyloxonium tetrafluoroborate derivatization-Headspace SPME GC-MS, *Talanta* 85 (2011) 2511-2516.
39. S.M. Helmke, M.W. Duncan, Measurement of the NO metabolites, nitrite and nitrate, in human biological fluids by GC-MS, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 851 (2007) 83-92.
40. B. Campanella, M. Onor, E. Pagliano, Rapid determination of nitrate in vegetables by gas chromatography mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 980 (2017) 33-40.
41. A. D'Ulivo, et al., Vapor Generation of Inorganic Anionic Species After Aqueous phase Alkylation with Trialkyloxonium Tetrafluoroborates, *Analytical Chemistry* 81 (2009) 6399-6406.
42. R.C. Brasted, Reaction of Sodium Nitrite and Sulfamic Acid, *Analytical Chemistry* 24 (1952) 1111-1114.
43. Nováková L., Douša M., kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, Europrint a.s., Praha 2013.

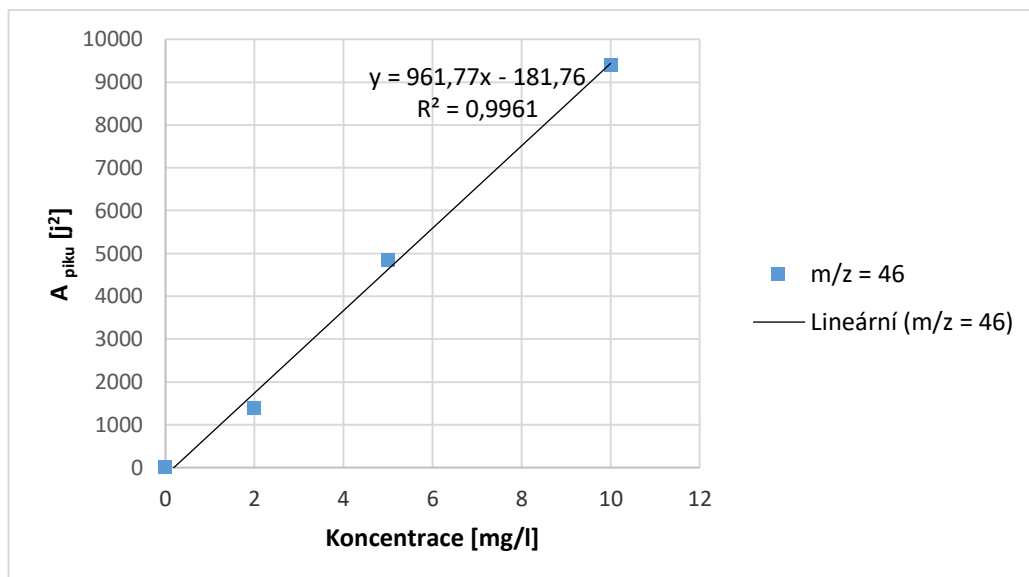
7. PŘÍLOHY



Příloha 1: Vliv teploty inkubace na derivatizaci pro ion $m/z = 76$.



Příloha 2: Lepší chromatografické vlastnosti iontu 46, dělič toku.



Příloha 3: Metoda vnějšího standardu, kalibrace NO_3^- , ion $m/z = 46$.

8. SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| A_i | Plocha píku vzorku |
| A_s | Plocha píku standardu |
| CVG | Chemická tvorba par |
| ČOV | Čistírna odpadních vod |
| DAD | Detektor s diodovým polem |
| FIA | Průtoková injekční analýza |
| FID | Plamenoionizační detektor |
| GC/MS | Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií |
| GO | Oxid grafenu |
| ISE | Iontově selektivní elektroda |
| PFB–Br | Pentafluorobenzyl bromid |
| SPME | Mikroextrakce tuhou fází |
| UV-VIS | Ultrafialovo-viditelná spektroskopie |