



# **TECHNIKI EKSTRAKЦИИ PRÓBEK STAŁYCH**

# ***Analiza śladowa:***

to dział analizy chemicznej stanowiący zbiór procedur i metod dotyczących sposobu pobierania i przygotowania próbek, stosowania metod oznaczania oraz techniki pracy laboratoryjnej, w której czystość pomieszczenia, odczynników i sprzętu odgrywają zasadniczą rolę, prowadzący do oznaczenia składników występujących w próbkach w stężeniu poniżej 100 ppm;

# ***Analiza śladowa:***

A decorative graphic consisting of several overlapping, curved, wavy lines in shades of light blue and teal, starting from the top right and curving towards the left, partially overlapping the title.

ma szczególne znaczenie w ochronie środowiska i zdrowia, w analizie materiałów biologicznych, przemyśle materiałów wysokiej czystości, energetyce jądrowej, elektronice, metalurgii, geologii, archeologii, ...

# ***Analiza specjacyjna:***

A decorative graphic consisting of several overlapping, wavy blue lines that curve from the top right towards the center of the slide.

proces identyfikacji i oznaczania różnych fizycznych i chemicznych form występowania danego pierwiastka w próbce rzeczywistej;

# ***Analiza specjacyjna:***

A decorative graphic consisting of several overlapping, wavy blue lines that curve from the top right towards the bottom right of the slide.

## 1. specjacja indywidualna

ma na celu rozróżnienie i oznaczenie wszystkich  
indywidualnych chemicznych zawierających w swoim  
składzie dany pierwiastek;

# ***Analiza specjacyjna:***



## 2. specjacja grupowa

oznaczanie sumy określonej formy wybranego pierwiastka, np. Cr(III) oraz Cr(VI);

# ***Analiza specjacyjna:***

A decorative graphic consisting of several overlapping, wavy blue lines that curve from the top right towards the bottom right of the slide.

## 3. specjacja fizyczna

oznaczanie różnych form fizycznych tego samego indywiduum chemicznego, np. formy: rozpuszczone, zaadsorbowane, skompleksowane.

# ***Analiza specjacyjna:***

## ***specjacja szczegółowa lub właściwa***

- prowadzi do oznaczenia konkretnych indywiduów chemicznych;

## ***specjacja dystrybucyjna***

- dotyczy głównie próbek biologicznych, np. oznaczanie zawartości metali w poszczególnych częściach roślin;

## ***specjacja funkcjonalna***

- oznaczenie pierwiastków o określonej aktywności chemicznej lub biologicznej;

## ***specjacja operacyjna***

- przeprowadzana, gdy chodzi o wydzielenie określonej grupy związków danego pierwiastka;

## ***specjacja cytologiczna***

- frakcjonowanie próbki na poziomie subkomórkowym i oznaczanie technikami mikroanalitycznymi o dużej rozdzielczości.



# ***Analiza specjacyjna:***

A decorative graphic consisting of several overlapping, wavy blue lines that curve from the top right towards the center of the slide.

formy specjacyjne występujące w próbkach stałych mogą ulegać/ulegają przemianie na inne podczas rozdzielania składników prowadzonego w celu przygotowania próbek do pomiaru .

## ***Frakcjonowanie:***

to określenie zawartości pewnych grup związków danego pierwiastka charakteryzujących się podobną funkcją lub właściwościami (np. rozpuszczalnością w określonych rozpuszczalnikach) bez określenia chemicznej natury składników poszczególnych grup;

frakcjonowanie chemiczne - zazwyczaj polega na kolejnych ekstrakcjach roztworami o wzrastającej sile ługowania;

## ***Frakcjonowanie:***

jest stosowane w badaniach środowiskowych w celu prognozowania zachowania metali obecnych w próbkach stałych;

poprzez symulację warunków środowiskowych, zarówno naturalnych, jak i zmienionych antropogenicznie, możliwe jest prognozowanie zagrożeń wynikających z obecności metali ciężkich w różnych elementach środowiska.

# ***Ekstrakcja w badaniach środowiska:***

frakcjonowanie analitów z próbek stałych przeprowadzane jest z zastosowaniem następujących technik:

1. ekstrakcja jednoetapowa;
2. ekstrakcja wieloetapowa:
  - a) ekstrakcja sekwencyjna,
  - b) ekstrakcja równoległa.

## ***Ekstrakcja jednoetapowa:***

jest stosowana do oznaczania frakcji biodostępnej oraz oceny zdolności migracyjnych metali związanych z fazą stałą;

przeprowadzana jest najczęściej w badaniach gleb i innych materiałów geologicznych, osadów morskich, osadów komunalnych, odpadów stałych i próbek roślinnych.

# *Ekstrakcja jednoetapowa:*

jest realizowana przy użyciu następujących ekstrahentów:

1. niezbuforowanych roztworów soli:

$\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,

2. roztworów buforowych np.  $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{AcOH}$ ,

3. roztworów związków kompleksujących: EDTA, DTPA, EDTA-  
 $\text{AcOH}/\text{NH}_4\text{OAc}$ .

## ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

jest stosowana w celu uzyskania informacji pozwalającej na poznanie form występowania metali, ich pochodzenia, sposobu związania ze składnikami matrycy, możliwości uruchamiania i transportu;

# ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

podstawową metodą ekstrakcji sekwencyjnych, do której odwołuje się większość autorów zajmujących się frakcjonowaniem metali w próbkach stałych, jest metoda opracowana w **1979** roku przez **A. Tessiera, P. Campbella i M. Bissona** do frakcjonowania metali matrycowych i śladowych (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) obecnych w **osadach dennych**.

Tessier A., Campbell P., Bisson M., 1979: *Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals*. Anal. Chem., 51(7): 844-851



# ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

procedura zaproponowana przez Tessiera i jego zespół umożliwia oznaczanie pięciu frakcji:

1. jonowymiennej
2. węglanowej,
3. tlenkowej,
4. organicznej i siarczkowej,
5. pozostałej;

# ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

przy tym sposobie postępowania różnicowanych jest pięć grup:

1. metale zaadsorbowane,
2. metale związane z węglowodorami,
3. metale związane z tlenkami Fe i Mn,
4. metale związane ze skł. organicznymi i siarczkowymi,
5. metale związane ze szkieletem mineralnym.

# *Ekstrakcja sekwencyjna - procedura:*

1. 1 M  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,0 lub 1 M  $\text{NaOAc}$ , pH 8,2  
*1:8 (m:v), 1h, temp. pokojowa, mieszanie ciągłe;*
2. 1 M  $\text{NaOAc}/\text{AcOH}$ , pH 5  
*1:8 (m:v), 5h, temp. pokojowa, mieszanie ciągłe;*
3. 0,04 M  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/25\% \text{AcOH}$  lub 0,3 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/0,175 \text{ M}$  cytrynian trisodu/ $0,025 \text{ M}$  kwas cytrynowy  
*1:20 (m:v), 6h, 96 °C, mieszanie okresowe;*
4. a) 0,02 M  $\text{HNO}_3+30\% \text{H}_2\text{O}_2$  pH 2 ( $\text{HNO}_3$ ) (3 ml+5ml)  
b) 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  pH 2 ( $\text{HNO}_3$ ) (3 ml)  
c) 3,2 M  $\text{NH}_4\text{AcOH}/20\% \text{HNO}_3$  (5 ml),  
*1:8 (m:v), 2h, 3h, 0,5h, 85 °C, 85 °C, temp. pokojowa, mieszanie okresowe;*
5.  $\text{HF} + \text{HClO}_4$  (10 ml+ 2 ml)  
*1:12 (m:v), odparowanie do białych dymów.*

## *Ekstrakcja sekwencyjna:*

pomiędzy poszczególnymi etapami próbki odwirowywano z prędkością 10000 obrotów na minutę (30 min), roztwór z nad osadu oddzielano przy pomocy pipety i pozostawiano do analizy;

osad przemywano wodą dejonizowaną, którą po odwirowaniu (30 min, 10000 obr/min.) odrzucano;

w poszczególnych frakcjach oznaczano zawartość: Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn z zastosowaniem atomowej spektrometrii absorpcyjnej.

# *Ekstrakcja sekwencyjna:*

na wydajność i powtarzalność techniki ekstrakcji wieloetapowej mają wpływ:

1. właściwości chemiczne, selektywność i wydajność wybranych ekstrahentów,
2. kolejność poszczególnych kroków,
3. warunki pracy, takie jak: pH ekstrahentów, ich stężenia, czas ługowania, stosunek mas ciała stałego do roztworu, temperatura ekstrakcji, rodzaj atmosfery nad roztworem, sposób rozdziału faz, itp.,
4. specyficzne „efekty matrycowe” związane z zawartością faz i pierwiastków oraz readsorpcją.

# *Ekstrakcja sekwencyjna:*

optymalizacja wydajności procesu ekstrakcji sekwencyjnej, poza doбором odpowiedniego dla danej frakcji metali ekstrahenta, polega na ocenie wpływu następujących parametrów:

1. pH roztworów,
2. ich stężenie,
3. temperatura ekstrakcji,
4. czas ługowania,
5. rodzaj atmosfery nad roztworem (powietrze, azot),
6. sposób rozdziału faz: prędkość wirowania, czas wirowania, a nawet rodzaj użytych sączków).

## ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

w celu ujednoczenia warunków badań i uzyskiwania porównywalnych wyników na zlecenie ***The Standards, Measurement and Testing Programme*** (dawniej BCR) Komisji Europejskiej przeprowadzono międzylaboratoryjne badania, mające na celu porównanie różnych procedur ekstrakcji sekwencyjnej;

## ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

na podstawie tych badań w roku 1997 stwierdzono, że najbardziej odpowiednim i wystarczającym sposobem postępowania dla certyfikowanych próbek **gleby** jest zastosowanie EDTA lub kwasu octowego do zidentyfikowania frakcji metali bioprzyswajalnych;



# *Ekstrakcja sekwencyjna:*

w przypadku pozostałych rodzajów próbek najlepsze wyniki uzyskano po zastosowaniu trzyetapowej procedury:

1.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ;
2.  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ;
3.  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,

do zidentyfikowania i pomiaru zawartości:

1. metali przyswajalnych i związanych z węglanami;
2. metali wbudowanych w tlenki żelaza i manganu;
3. frakcji organicznej i siarczkowej.

## ***Ekstrakcja sekwencyjna:***

Stosowane są również procedury, w których pierwszy etap obejmuje ługowanie wodą dejonizowaną w celu określenia ilości metali rozpuszczalnych w wodzie

- postępowanie to jest stosowane w przypadku próbek środowiskowych pobranych na terenach, na których znaczący udział ma parowanie.

## *Ekstrakcja sekwencyjna:*

metoda SM&T nie precyzuje warunków ługowania frakcji pozostałej;

jej udział można wyznaczyć na drodze obliczeniowej z różnicy między całkowitą zawartością metali a sumą frakcji oznaczonych lub po ekstrakcji mieszaniną stężonych kwasów np.  $\text{HNO}_3$  i  $\text{HClO}_4$ .

Metoda ta jest szeroko stosowana nie tylko do frakcjonowania metali w osadach i glebach, ale również w osadach ściekowych pyłach i popiołach.

## *Ekstrakcja sekwencyjna:*

przeprowadzono również badania, w których zamiast konwencjonalnego wytrząsania próbek i ogrzewania w łaźni wodnej, zastosowano ultradźwięki i energię mikrofalową, co umożliwiło znaczne skrócenie czasu eksperymentów.

# Ekstrakcja sekwencyjna - porównanie:

Etap	Frakcja / zastosowany ekstrahent	Warunki procesu ługowania		
		ekstrakcja konwencjonalna	ekstrakcja wspomagana mikrofalowo	ekstrakcja wspomagana ultradźwiękowo
1	wymienna / 1M roztwór $MgCl_2$ 8 cm <sup>3</sup> , pH = 7	1 h, 25 C	3 min., 50% amplitudy	30 s, 90 W
2	węglanowa / 1M roztwór $CH_3COONa$ 8 cm <sup>3</sup> , pH = 5	5 h, 25 C	1 min., 50% amplitudy	30 s, 90 W
3	redukowalna / 0,04 M r-r $NH_2OH \cdot HCl$ / 25 % (w/w) r-r $CH_3COOH$ , 20 cm <sup>3</sup>	6 h, 96 C	7 min., 50% amplitudy	30 s, 90 W
4	utlenialna / 0,02 M $HNO_3$ / 30 % $H_2O_2$ + 30 % $H_2O_2$ + 3,2 M r-r $CH_3COONa$ 3 cm <sup>3</sup> / 5 cm <sup>3</sup> + 3 cm <sup>3</sup> + 5 cm <sup>3</sup>	2 h, 85 C 3 h, 85 C 30 min., 25 C	7 min., 50% amplitudy 2 min., 50% amplitudy	30 s, 270 W 10 s, 270 W

# Ekstrakcja sekwencyjna - przykłady:

rozpuszczalniki stosowane w ekstrakcji sekwencyjnej próbek gleby i odpowiadające im frakcje:

źródło: J.Namieśnik, Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy, WNT, Warszawa 2000

Frakcja	Ekstrahent
Wymienna Związki zaadsorbowane Materia organiczna Pozostałość	$\text{KNO}_3$ $\text{NaOH}$ EDTA $\text{HNO}_3$
Rozpuszczalna w wodzie Wymienna Materia organiczna Węglany, związki żelaza (zaokludowane) Tlenki manganu (zaokludowane) Tlenki żelaza (zaokludowane) Siarczany (IY) Pozostałość	$\text{H}_2\text{O}$ $\text{KNO}_3$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ EDTA $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{HNO}_3$ Cytrynian sodu/ $\text{NaHCO}_3$ / $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $\text{HNO}_3$ $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$

# Ekstrakcja sekwencyjna - przykłady:

Frakcja	Ekstrahent
Materia organiczna i związki humusowe Związki humusowe Węglany, wodorotlenki żelaza Siarczany(TV)	$\text{HCO}_3^-/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ NaOH HCl NaOH (na gorąco)
Wymienna Materia organiczna Tlenki manganu Tlenki żelaza (amorficzne) Tlenki żelaza (krystaliczne) Pozostałość	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ NaOCl $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{HNO}_3$ $(\text{NH}_4\text{COO})_2$ kwas askorbinowy/bufor szczawianowy HCl/HF/ $\text{HNO}_3$
Wymienna Węglany Tlenki manganu Tlenki żelaza (amorficzne) Siarczany (IV) i materia organiczna Pozostałość	$\text{NH}_4\text{Ac}$ NaAc/HAc $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{HNO}_3$ bufor szczawianowy $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3/\text{NH}_4\text{Ac}$ $\text{HNO}_3$

## ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

przeprowadzenie sekwencji etapów ługowania z wykorzystaniem enzymów, które prowadzi do wydzielenia frakcji metali wbudowanych w odpowiednie związki organiczne hydrolizowane przez zastosowane enzymy.



# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

badania *in vivo* przeprowadzane na organizmach żywych są ograniczone wieloma czynnikami (szybki metabolizm analizowanej próbki, którą stanowi krew, małe stężenia badanych substancji) i wymagają zgody komisji etycznych tworzone są modele do badań *in vitro*, odtwarzające warunki panujące w przewodzie pokarmowym.

## ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

stosowana jest w celu oszacowania biodostępności mikroelementów, jak i pozostałych składników pokarmowych znajdujących się głównie w ciekłych i stałych produktach pokarmowych.

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

procedury ekstrakcji enzymatycznej mają również zastosowanie w analizie próbek gleby

- są przeprowadzane w celu oszacowania ilości pierwiastków uwolnionych w układzie trawiennym po przedostaniu się gleby do organizmu ludzkiego.

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

biodostępność (*ang. oral bioavailability*) wyraża stopień, w jakim dany składnik odżywczy może zostać:

1. uwolniony,
2. wchłonięty z przewodu pokarmowego,
3. wykorzystany przez organizm.

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) odtwarzane są procesy hydrolizy enzymatycznej zachodzącej w poszczególnych odcinkach ludzkiego układu pokarmowego;

najczęściej odtwarzane są dwa etapy trawienia obejmujące żołądek i jelito cienkie lub trzy etapy, na które składają się procesy zachodzące w: jamie ustnej - żołądku - jelicie cienkim lub żołądku - jelicie cienkim - jelicie grubym.

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

w czasie ekstrakcji enzymatycznej symulowane są procesy zachodzące w:

1. jamie ustnej, w której wydzielana jest ślina  
ślina zawiera  $\alpha$ -amylazę ślinową oraz lipazę ślinową

czas zalegania pokarmu w jamie ustnej wynosi do kilku minut,

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

w czasie ekstrakcji enzymatycznej symulowane są procesy zachodzące w:

2. żołądka, w którym trawienie zachodzi dzięki obecności soku żołądkowego  
sok żołądkowy, zawiera pepsynę oraz kwas solny

czas przebywania pokarmu w żołądku wynosi od 2 do 4 h,  
rzadko do 16 h,

## ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

3. dwunastnicy i jelicie cienkim, w których przebiega na skutek działania enzymów trzustkowych i soli żółciowych spośród enzymów trzustkowych najczęściej stosowane są:

amylaza, lipaza, tripsyna, chymotrypsyna, pankreatyna, będąca mieszaniną wcześniej wymienionych

czas przebywania pokarmu w jelicie cienkim wynosi od 1 do 6 h, najczęściej 2 h,

w jelicie cienkim zachodzi również proces wchłaniania substancji odżywczych,



## ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

4. jelicie grubym, którego najważniejszą funkcją, z punktu widzenia ekstrakcji enzymatycznej, są: wchłanianie wody i elektrolitów.

# ***Ekstrakcja enzymatyczna - enzymy i ich funkcje:***

## 1. trawienie w jamie ustnej:

amylaza ślinowa - rozpoczyna proces trawienia złożonych węglowodanów (skrobi i glikogenu),

lipaza ślinowa - działa na triacylo-glicerole,

lizozym - niszczy bakterie obecne w pokarmie;

# ***Ekstrakcja enzymatyczna - enzymy i ich funkcje:***

## **2. trawienie żołądkowe:**

pepsyna - rozkłada duże cząsteczki białek na mniejsze cząsteczki peptydów,

renina - powoduje ona zmiany w strukturze kazein,

lipaza żołądkowa - bierze udział we wstępnym trawieniu tłuszczów,

pH soku żołądkowego mieści się w zakresie 1 - 2;

# *Ekstrakcja enzymatyczna enzymy i ich funkcje:*

## 3. trawienie jelitowe:

proteazy trzustkowe - rozkładają polipeptydy do aminokwasów:

trypsyna - rozszczepia wiązania peptydowe z udziałem aminokwasów: lizyny lub argininy,

chymotrypsyna - produktem jej działania jest mieszanina oligopeptydów, czyli krótkich łańcuchów aminokwasowych,

karboksypeptydaza - odszczepia po jednym aminokwasie od końca łańcucha peptydowego,

amylazy trzustkowe: diastaza, maltaza i laktaza - rozkładają ostatecznie węglowodany na cukry proste

lipazy trzustkowe - rozkładają tłuszcze do kwasów tłuszczowych i gliceroli

sok trzustkowy jest bezbarwnym płynem o alkalicznym odczynie (pH 8,0 - 8,3)

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

- ✓ kwasowość ekstrahentów regulowana jest poprzez dodatek właściwych kwasów lub zasad (najczęściej HCl i NaHCO<sub>3</sub>);
- ✓ procesy ekstrakcji enzymatycznej przeprowadzane są w temperaturze zbliżonej do ciepłoty ludzkiego ciała, czyli w temperaturze 37 °C; temperatura utrzymywana jest najczęściej za pomocą łaźni wodnej;
- ✓ mieszanie odbywa się najczęściej z zastosowaniem mieszadła magnetycznego lub wytrząsarek.

## ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

sztuczne modele przewodu pokarmowego mogą być bardzo proste (symulacja procesów trawiennych odbywa się w prostych naczyniach laboratoryjnych), lub złożone tj.: takie, dla których kontrolę prowadzonych procesów przeprowadza się z poziomu komputera, prowadzi się symulację ruchów perystaltycznych jelit, odtwarza się procesy wchłaniania składników pokarmowych.

# *Ekstrakcja enzymatyczna*

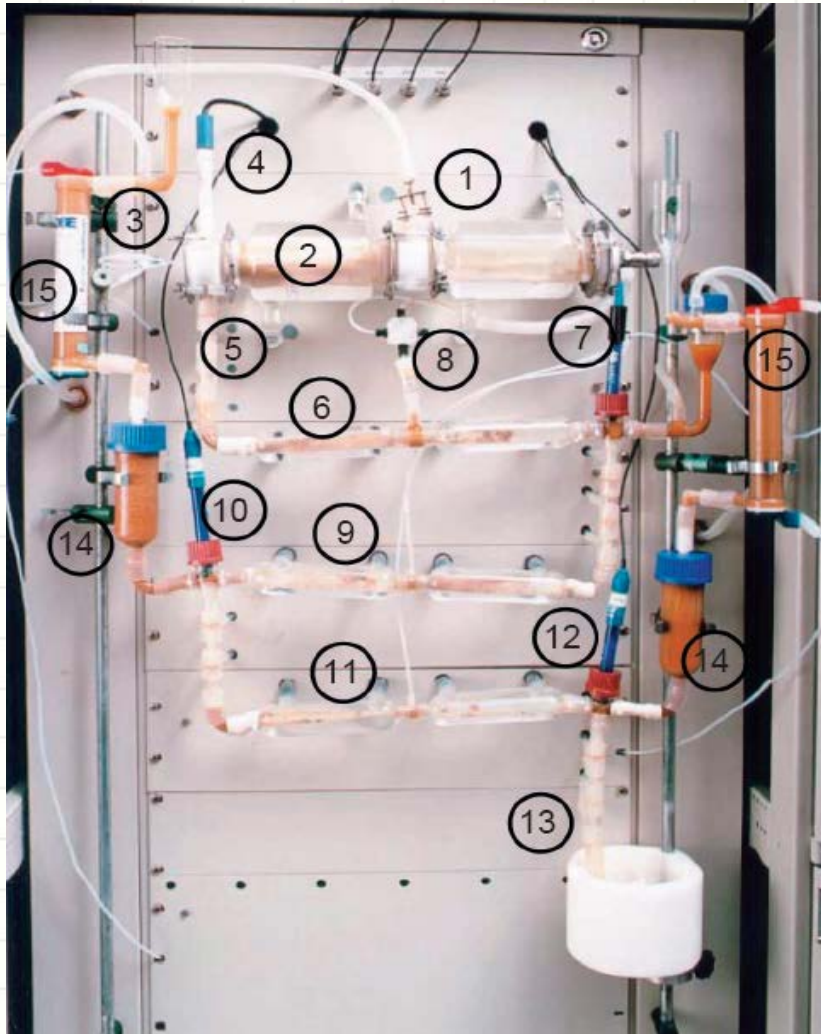
## *– modele przewodu pokarmowego:*



Sivieri K., Bianchi F., Rossi E.A., Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183. *Functional foods in health and disease*, 2011, 10, 389-402.

# Ekstrakcja enzymatyczna

## – modele przewodu pokarmowego:



- (1) przedział żołądkowy;
- (2) symulacja ruchów ścian żołądka;
- (3) enzymy: lipaza i pepsyna;
- (4) elektroda kontrolująca pH w przedziale żołądka;
- (5) przejście do dwunastnicy – symulacja zwieracza;
- (6) dwunastnica wraz z symulacją ruchów perystaltycznych;
- (7) elektroda kontrolująca pH w przedziale dwunastnicy;
- (8) enzym pankreatyna i żółć;
- (9) jelito czcze wraz z symulacją ruchów perystaltycznych.;
- (10) elektroda kontrolująca pH w przedziale jelita czczego;
- (11) jelito kręte wraz z symulacją ruchów perystaltycznych;
- (12) elektroda kontrolująca pH w przedziale jelita krętego;
- (13) symulacja ujścia krętnico-kątniczego;
- (14) filtry;
- (15) membrany typu „hollow fibers”



# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

na wydajność procesów ekstrakcji enzymatycznej bezpośredni wpływ mają:

1. temperatura,
2. odczyn roztworów  
(wpływający m.in. na aktywność enzymów),
3. stężenie enzymu,
4. czas trwania ekstrakcji/hydrolizy.

# ***Ekstrakcja enzymatyczna:***

przeprowadzana z użyciem modeli przewodu pokarmowego *in vitro*, jest tańszą, szybszą i bardziej powtarzalną alternatywą badań przeprowadzanych z udziałem ludzi i zwierząt;

wyniki oszacowania biodostępności składników dżywczych, w tym pierwiastków śladowych, są istotne z punktu widzenia dietetyków, farmaceutów i toksykologów;

w przypadku zastosowania procedury sekwencyjnej pozwala na frakcjonowanie analitów, natomiast selektywność enzymów pozwala na ługowanie niektórych form specjacyjnych oznaczanych indywiduów.

# Ekstrakcja enzymatyczna:

Najczęściej bada się biodostępność:

1. składników pokarmowych, takich jak:
  - sole mineralne,
  - witaminy,
  - białka,
2. przeciwutleniaczy,
3. pestycydów,
4. toksyn.

Modele *in vitro* układu trawiennego człowieka wykorzystywane są również do oceny stopnia przeżycia bakterii w środowisku sztucznego układu pokarmowego człowieka, a także do badania fizycznych i chemicznych zmian żywności.

# *Badane materiały:*

## 1. warzywa:

pomidory, papryka, marchew, zielone warzywa liściaste (w tym szpinak), groch, soja, ciecierzycy, czerwona fasola, fasolka mung, sorgo cukrowe, różne odmiany ryżu;

## 2. owoce, orzechy:

jabłka, mango, pomarańcze, papaja, orzechy laskowe, brazylijskie, nerkowca, włoskie;

## 3. ryby, skorupiaki i wodorosty

## 4. produkty specjalnego przeznaczenia żywieniowego

dania w słoiczkach przeznaczone dla niemowląt, produkty bezglutenowe, produkty dla diabetyków;

## 5. herbaty mrożone i zielone, mieszanki mleka sojowego, soki owocowe i warzywne, oliwa z oliwek.

# *Oznaczane substancje - przykłady:*

1. związki fenolowe, w tym antyoksydanty polifenolowe-katechiny, izoflawony, flawan-3-ole,
2. karotenoidy, w tym:  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, likopen,  $\beta$ -kryptoksantyna, luteina, zeaksantyna, wiolaksantyna, neoksantyna,
3. saponiny,
4. witaminy, np.: witamina A, C, D<sub>2</sub>,
5. mikroelementy i makroelementy, najczęściej: Fe, Zn, Cu, Mn, Se, As, Cd, Hg, Pb, F, Ca, Mg;
6. pestycydy chloroorganiczne.

# ***Najczęściej stosowane metody oznaczeń:***

1. wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC),
2. atomowa spektrometria absorpcyjna (AAS),
3. spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS),
4. optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES)
5. techniki sprzężone: HPLC-UV/VIS i HPLC-ICP-MS.

# Ekstrakcja enzymatyczna - przykłady:

Rodzaj analitu	Próbka/matryca	Enzym - rodzaj trawienia	pH
Cu, Fe, Mg, Zn Ag, As, Cd, Pb	omulek, mięsień kolenia, wątroba kolenia, włosy ludzkie	pronaza E/ lipaza -trawienie jelitowe	7,4
Specjacja As	odżywki dla dzieci	trypsyna /pankreatyna -trawienie jelitowe	0,1 M wodorowęglan amonu
Specjacja Se	odżywki wzbogacone selenem	pepsyna -trawienie żołądkowe	2
Se	drożdże, ostrygi, omulek	pronaza E/ subtilizyna -trawienie jelitowe	7,4
As, specjacja As	ryby, koleń	trypsyna -trawienie jelitowe	7,4
Al, Cr, Mn, Pb, Zn, As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn	małże	pepsyna -trawienie żołądkowe pankreatyna/amylaza/ lipaza/pancreatyna -trawienie jelitowe	1 9 (As, Cd, Cu, Fe, Ni) 6 (Al, Cr, Mn, Pb, Zn)

# Ekstrakcja enzymatyczna - przykłady:

Rodzaj analitu	Próbka/matryca	Enzym - rodzaj trawienia	pH
K, Mn, Zn, Fe, Na	pszenica	pepsyna	1,75
		-trawienie żołądkowe	
		pankreatyna	7,0
Pb, Cu	wina	-trawienie jelitowe	
		pepsyna	3,5
		-trawienie żołądkowe	
Se, specjacja Se	pieczarka dwuzarodnikowa wzbogacona selenem	pankreatyna+amylaza	7,4
		-trawienie jelitowe	
		pepsyna	2,1
As	gleba	-trawienie żołądkowe	
		trypsyna	7,4
		-trawienie jelitowe	
		pronaza E	7,4
		-trawienie jelitowe	
		pepsyna	2,5
		-trawienie żołądkowe	
		pankreatyna	7,0
		-trawienie jelitowe	



# *QuEChERS:*

**Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe;**

opracowana w 2003 roku przez zespół pod kierunkiem prof. Anastasiadesa ;

jako alternatywna metoda ekstrakcji pestycydów z owoców i warzyw.

Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.

Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce.

J. AOAC Int. 2003, 86(2), 412–431.

# QuEChERS:



<http://www.waters.com>

# *Procedura QuEChERS:*

## etap 1: ekstrakcja

1. homogenizacja próbki, umieszczenie 10 g próbki w próbówce,
2. dodanie 10 cm<sup>3</sup> acetonityrlu, homogenizacja (1 min.),
3. dodanie wzorca wewnętrznego (fosforan trifenylu),
4. przeniesienie próbki do próbówki zawierającej 4g MgSO<sub>4</sub> i 1g NaCl – wysolenie, usunięcie wody,
5. wytrząsanie (1 min.),
6. odwirowanie,

# *Procedura QuEChERS:*

## etap 2: oczyszczanie

1. przeniesienie porcji ekstraktu ( $1\text{ cm}^3$ ) do próbówki zawierającej  $\text{MgSO}_4$  i odczynnik pozwalający na usunięcie kwasów organicznych, cukrów i kwasów tłuszczowych - aminy,
2. wytrząsanie (30 s),
3. odwirowywanie,
4. oznaczenie (GC-MS lub LC-MS).

# Procedura QuEChERS:

## Step 1: Extraction

Homogenize sample and place 10 g in a 50 mL tube

Add 10 mL acetonitrile and mix

Add internal standard(s)

Add prepared sample to an extraction reagent tube

Shake

Centrifuge

## Step 2: Clean-Up

Transfer an aliquot of the supernatant to a clean-up tube

Shake

Centrifuge

Test supernatant directly by GC, GC/MS, LC, LC/MS

# *Zastosowania QuEChERS:*

izolacja związków organicznych (obecnie około 200 różnych związków) niebezpiecznych dla ludzi i środowiska z próbek środowiskowych, takich jak:

- ✓ gleba,
- ✓ osady,
- ✓ wody,
- ✓ owoce,
- ✓ warzywa.

# Literatura:

1. Anese M., Mirolo G., Fabbro A., Lippe G., Lycopene bioaccessibility and bioavailability from processed foods, NISCAIR-CSIR, 2013, 72, 543-547
2. Brandon E.F.A., Janssen P.J.C.M., de Wit-Bos L., Arsenic: bioaccessibility from seaweed and rice, dietary exposure calculations and risk assessment, Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, 2014, 31(2), 1993-2003
3. Cardoso C., Afonso C., Lourenço H., Costa S., Nunes M.L., Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food, Trends in Food Science & Technology, 2015, 41(1), 5-23
4. Dinnella C., Minichino P., D'Andrea A.M., Monteleone E., Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra – virgin olive oils during in vitro digestion, J. Agric Food Chem., 2007, 55, 8423-8429
5. do Nascimento da Silva E., Beatriz Perriello Leme A., Cidade M., Cadore S., Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods, Talanta, 2013, 117, 184-188
6. He Y., Pedigo C.E., Lam B., Cheng Z., Zheng Y.: Bioaccessibility of arsenic in various types of rice in an in vitro gastrointestinal fluid system, J. Environ. Sci. Health B., 2013, 47, 74-80
7. Ithamani G., Srinivasan K., Bioaccessibility of Polyphenols from Wheat (*Triticum aestivum*), Sorghum (*Sorghum bicolor*), Green Gram (*Vigna radiata*), and Chickpea (*Cicer arietinum*) as Influenced by Domestic Food Processing, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62, 11170-11179
8. Laird B.D., Chan M.H., Bioaccessibility of metals in fish, shellfish, wild game and seaweed harvested in British Columbia, Canada, Food and Chemical Toxicology, 2013, 58, 381-387
9. Lemmens L., Colle L., Van Buggenhout S., Palmero P., Van Loey A., Hendrickx M., Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review, Trends in Food Science & Technology, 2014, 38(2), 125-135
10. Moser S., Chegeni M., Jones O.W., Liceaga A., Ferruzzi M.G., The effect of milk proteins on the bioaccessibility of green tea flavan-3-ols, Food Research International, 2014, 66, 297-305

# Literatura - ciqg dalszy:

11. Pugliese A., O'Callaghan Y., Tundis R., Galvin K., Menichini F., O'Brien N., Loizzo M.R., In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers, *European Journal of Nutrition*, 2014, 53(2), 501-510
12. Reif C., Arrigoni E., Baumgartner D., Schärer H., Bozzi Nising A., Adaption of an in vitro digestion method to evaluate carotenoid accessibility from vegetables, 2014, 1040, 255-260
13. Rio D.D., Calani L., Scazzina F., Jechiu L., Cordero C., Brighenti F., Bioavailability of catechins from ready – to-drink tea, *Nutrition*, 2010, 26, 528-533
14. Rocha R.A. de la Fuente B., Clemente M.J., Ruiz A., Vélez D., Devesa V.: Factors affecting the bioaccessibility of fluoride from seafood products, *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 59, 104-110
15. Rodríguez-Roque M.J., Rojas-Graü M.A., Elez-Martínez P., Martín-Belloso O., In vitro bioaccessibility of health-related compounds from a blended fruit juice–soymilk beverage: Influence of the food matrix, *Journal of Functional Foods*, 2014, 7, 161-169
16. Serventi L., Chitchumroonchokchai Ch., Riedl K.M., Kerem Z., Berhow M.K., Vodovotz Y., Schwartz S.J., Failla M.L., Saponins from Soy and Chickpea: Stability during Beadmaking and in Vitro Bioaccessibility, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 6703-6710
17. Suliburska J., Krejpcio Z., Evaluation of the content and bioaccessibility of iron, zinc, calcium and magnesium from groats, rice, leguminous grains and nuts, *J. Food Sci. Technol.*, 2014, 51, 589-594
18. Suliburska J., Krejpcio Z., Reguła J., Grochowicz Z., Evaluation of the content and the potential bioavailability of minerals from gluten – free products, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2013, 12, 75-80





**DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ**