



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

 Химически Факултет

Катедра „Аналитична химия и компютърна химия“

ДИПЛОМНА РАБОТА

за получаване на образователно-квалификационна степен „Бакалавър“

на тема:

Приложение на ICP-MS за охарактеризиране на бионаличност на целеви елементи от хранителни добавки в имитирана среда от стомашен сок

Дипломант: Кристина Емилова Губеркова

Специалност: Медицинска химия

Фак. № 2105571009

Научен ръководител: Гл. ас д-р Лидия Иванова Кайнарова - Кръстева

Пловдив

2025 година

Съдържание

1. Литературен обзор.....	2
1.1. Физиологично базирана екстракция.....	2
1.1.1. Принцип и приложение на метода.....	2
1.1.2. Използвани екстрагенти.....	3
1.1.3. Методи за определяне тоталното съдържание на елементи в хранителни добавки.....	5
1.1.4. Сравнение на ФБЕ с методи за пълно разтваряне на проби.....	6
1.2. Инструментални техники за анализ на хранителни добавки.....	7
1.2.1. Същност на масспектрометрията с индуктивно свързана плазма.....	9
1.2.2. Видове пречения при ICP-MS.....	10
2. Цели и задачи.....	14
3. Експериментална част.....	15
3.1. Използвана апаратура.....	15
3.2. Реактиви и стандартни разтвори.....	16
3.3. Подготовка на стандартни разтвори и количествен анализ.....	16
3.3.1. Микровълново подпомогната киселинна минерализация на проби от хранителни добавки за определяне тоталното съдържание на микро- и макроеlementи.....	17
3.3.2. Подготовка на проби за прилагане на физиологично базирана екстракция.....	17
3.3.3. Подготовка на разтвори за корекция на неспектрален матричен ефект чрез метода на стандартната добавка.....	18
4. Резултати и дискусия.....	21
4.1. Влияние на времето за третиране върху степента на освобождаване на изследваните аналити.....	21
4.2. Сравнение на използваните методики за ФБЕ.....	22
4.2.1. Оценка на неспектрален матричен ефект при анализ на микро- и макроеlementи след прилагане на ФБЕ.....	22
4.3. Количествено определяне съдържанието на изследваните микро- и макрокомпоненти.....	25
4.4. Оценка на биодостъпност след прилагане на ФБЕ.....	27
5. Изводи и заключения.....	29
Използвана литература.....	30

1. Литературен обзор

1.1. Физиологично базирана екстракция

1.1.1. Принцип и приложение на метода

Физиологично базираната екстракция (ФБЕ) представлява *in vitro* метод за извличане на биологично активни вещества от храни, напитки, хранителни добавки и др., чрез използване на различни техники и подходи, които имитират естествените физиологични условия и процеси. Методът е разработен от Rubby et al. през 1993г. [1] за оценка степента на акумулация на Рb в човешкия организъм от минни отпадъци, а през 1996г. [2] е модифициран и приложен за определяне количеството на метали, абсорбирани от пръст при деца между 2-3 годишна възраст. За ФБЕ се използва комбинация от реагенти, които имитират храносмилателни течности, базирани на човешката физиология, за екстракция на замърсители в почви, при условия, които наподобяват човешкия храносмилателен тракт. Въпреки че *in vivo* методите предоставят много по-точна и адекватна информация относно ефективността на освобождаване и последващо усвояване на елементи, тези тестове се прилагат по-рядко, поради факта че са скъпи, изискват повече време и интерпретацията на резултатите може да бъде затруднена, особено когато изпитванията се извършват върху животни, поради разлика в метаболитните процеси на тестваните обекти и хората. За разлика от тях, *in vitro* методите са бързи и лесни за изпълнение и се отличават с липса на етични ограничения, характерни за *in vivo* методите, при които изпитванията се провеждат върху живи обекти [3], [4]. Изследванията показват, че резултатите от *in vitro* методите могат да бъдат успешно корелирани с бионаличността, определена чрез *in vivo* експерименти (Ruby et al., 1996), поради което физиологично базираните екстракционни процедури се считат за подходящи алтернативни подходи на *in vivo* методите. Съгласно REACH [5], те отговарят на всички условия за безопасност и спадат към групата на „зелените“ екстракционни подходи, тъй като в процеса на екстракция не се използват токсични и/или органични разтворители. В зависимост от вида на имитираната храносмилателна система ФБЕ могат да бъдат разделени на 4-ри групи, имитиращи: процеси на храносмилане в устната кухина, в стомаха, в тънките черва и дебелото черво. Обикновено като екстрахиращи реагенти се използват неорганични киселини, разредени слаби органични киселини, соли и ензими в зависимост от имитираната среда.

През последните години ФБЕ намира широко приложение в две основни направления [3], [6], [7]:

- 1) оценка на потенциалните здравни рискове от усвояване на замърсители/токсични вещества, които се съдържат в почви и храни;

- 2) оценка бионаличност / биодостъпност на полезни съставки като витамини, минерали и др. от храни и хранителни добавки;

Съгласно законодателството на Европейския съюз и Съединените щати, хранителните добавки се дефинират като концентрирани източници на витамини, минерали и/или други вещества (като аминокиселини, есенциални мастни киселини, пробиотици, растителни компоненти и билкови екстракти) с хранителен или физиологичен ефект, предназначени за допълване на обичайния хранителен режим [8]. Известно е, че човешкият организъм се нуждае от около двадесет различни минерала за поддържане на различни метаболитни и физиологични процеси, както и за цялостното развитие, растеж и функциониране. В зависимост от необходимия дневен прием, минералите могат да бъдат разделени в две групи: микро- и макроминерали (елементи) [9]. Към групата на макроелементите спадат всички, чийто дневен прием надхвърля 100 mg.ден^{-1} . Те включват калций (Ca), фосфор (P), магнезий (Mg), сяра (S), натрий (Na) и калий (K). От друга страна, необходимият дневен прием на минералите е под 100 mg.ден^{-1} и към тях спадат елементи като желязо (Fe), цинк (Zn), йод (I), селен (Se), манган (Mn), хром (Cr), мед (Cu), молибден (Mo), флуор (F), бор (B), кобалт (Co), силиций (Si), алуминий (Al), арсен (As), калай (Sn), литий (Li) и никел (Ni). Ефектът на хранителните добавки върху здравословното състояние на човек зависи от степента на тяхното усвояване. Този процес е известен под наименованието „бионаличност“ и може да бъде оценен чрез ФБЕ. Терминът „бионаличност“ се използва за количествен измерител на процесите на освобождаване, транспортиране до системното кръвообращение и последващо усвояване на макро- и микроелементите от различни хранителни и природни източници, в това число и хранителните добавки. Цялостният процес на бионаличност зависи от два отделни етапа, известни под наименованията „биоактивност“ и „биодостъпност“. „Биодостъпността“ дава оценка за количеството биологично активно вещество, което е освободено от матрицата след постъпване в човешкия организъм и е достъпно за последваща абсорбция, докато „биоактивността“ е термин, който оценя физиологичните ефекти, които даденото вещество притежава, т.е. метаболитните процеси свързани с достъпа на веществото до системното кръвообращение, транспортирането му до целевите клетъчни структури/тъкани и физиологичния респонс. [4]

1.1.2. Използвани екстрагенти

Сред най-често използваните реагенти при ФБЕ са някои соли като NaCl и натриев цитрат ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$); слаби органични киселини $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ и $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$; ензими; HCl и други. В зависимост от имитираната среда, използваните реагенти могат да се различават. Така например, ако целта на анализа е да се определи бионаличност в устната кухина, като ензим е

необходимо да се използва мукоза, докато за имитиране на стомашен сок най-често използваният ензим е пепсин.

Choleva и съавтори [7], използват комбинация от различни соли и ензими, съдържащи се в устната кухина, стомаха и червата, като жлъчни соли, муцин, пепсин, панкреатин, глюкоза, урея, аминокиселини и др. за имитиране състава на стомаха и стомашно-чревните течности.

В своя научен обзор Şerife Tokalıoğlu и колектив [10], провеждат ФБЕ посредством двуетапна процедура. На първия етап имитират стомашна фаза като пробата се подлага на разтвор, съдържащ пепсин, малат, цитрат, оцетна киселина и млечна киселина при рН 2.5 (коригирано със солна киселина), а във втория етап, наподобяващ чревна фаза, полученият разтвор от първата фаза се третира с жлъчни соли и панкреатин при рН 7.0 (коригирано с наситен разтвор на Na_2CO_3). Пробата се инкубира при постоянна температура от 37°C , за да се симулира температурата на човешкото тяло.

В своят изследователски труд Marisa Intawongse и съавтори [11], имитират процесите протичащи в устната кухина, стомаха и тънките черва за оценка бионаличността на широк спектър от елементи - Al, As, Cd, Ce, Cu, Fe, Hg, Mg, Pb, Se и Zn. Тъй като устната кухина е мястото, където се осъществява механичното раздробяване на пробите в присъствие на слюнка, при рН около 6.5, учените най-напред подлагат почвените и хранителни проби на мацерация (дъвчене), при което се фрагментират на по-малки частици, като това увеличава тяхната обща повърхност. Престоят на пробите в устната кухина е с продължителност от няколко секунди до няколко минути, след което те преминават през хранопровода към стомаха в рамките на секунди. За осигуряване на силно киселинна среда (рН 1 – 3) в стомаха, те използват HCl, а за имитиране на ензимите в стомаха добавят пепсин – протеаза (ензим, който способства за разграждането на белтъци). Времето на престой на пробите в стомаха може да варира от няколко минути (около 8 мин) до няколко часа (до 3 ч), след което те преминават в тънките черва. В тях пробите се подлагат на допълнителна обработка чрез чревни сокове, съдържащи различни ензими (трипсин, панкреатин и амилаза), жлъчни соли и Na_2CO_3 . Този процес осигурява разграждане на полизахариди, белтъци и мазнини, което улеснява тяхната абсорбция. Продължителността на престоя на пробите в дуоденума е около 30 – 45 минути (при рН 4 – 5.5), в празното черво – 1.5 – 2 часа (при рН 5.5 – 7.0), а в хълбочното черво – 5 – 7 часа (при рН 7.0 – 7.5). Основната част от процеса на абсорбция и крайната фаза на храносмилането се извършват именно в тънките черва.

Голямото разнообразие от методики за ФБЕ, както и вариацията в изчислената биодостъпност показва необходимостта от разработване на стандартизирани процедури за оценка на този параметър. Към момента е разработена унифицирана методика за определяне

биодостъпност (UBM) на приоритетни замърсители в почвите, в човешкия стомашно-чревен тракт. Тази стандартизирана процедура е разработена от Изследователската група за оценка на биодостъпност на Европа (BARGE) - европейска мрежа, обединяваща международни институти и изследователски групи, които разработват валидирана и стандартизирана процедура [10]. До колкото ни е известно, към момента стандартизирани методики за оценка биодостъпност на минерали от хранителни добавки не са налични.

1.1.3. Методи за определяне тоталното съдържание на елементи в хранителни добавки

За да се оцени каква част от анализите реално се освобождават от матрицата и са достъпни за последващо усвояване е необходима информация за тяхното тотално съдържание. Един от подходите, които намират много широко приложение за определяне тоталното съдържание на елементи в храни и хранителни добавки е киселинната минерализация [10]. Киселинната минерализация е метод, при който различни типове матрици могат да бъдат напълно или частично разградени, с помощта на концентрирани неорганични киселини, като азотна (HNO_3), перхлорна (HClO_4), солна (HCl), флуороводородна (HF) и/или комбинация от тях. В зависимост от използваната апаратура разтварянето може да бъде извършено в отворени съдове, при които енергия се внася чрез термична плоча, или в затворени системи, каквито са микровълновите системи, при които енергията се внася под действието на микровълново поле. Микровълново подпомогната киселинна минерализация се предпочита пред термичната плоча, тъй като позволява гъвкавост при избора на параметрите, влияещи върху процесите на разтваряне, като температура и време, предотвратява загубата на летливи елементи както и потенциално замърсяване породено от изпръскване на пробите [12], [13]. Същевременно MW-минерализацията се отличава с висока ефективност благодарение на възможността за работа при по-високо налягане (100 atm) и температура (до 240 °C при съдчета изработени от PTFE), което значително скъсява времето за третиране [13].

В. Avula и съавтори [14] използват микровълново подпомогната киселинна минерализация за определяне тоталното съдържание на елементи в 11 билки и 21 хранителни добавки. Авторите използват две методики за разтваряне, при които между 0.1 - 0.5 g проба е разтворена в 10 ml к. HNO_3 или в 10 ml смес 4:1 к. HNO_3 : к. HCl . Пробите са третирани при 180°C за 15 min.

F.C. Pinheiro и съавтори [15] прилагат успешно микровълново подпомогната киселинна минерализация и последващо измерване с ICP-MS за определяне елементния състав в хранителни добавки с високо съдържание на протеин. За целта авторите използват смес от

к.ННО₃ и 30% Н₂О₂ и програма за 3-стъпкова градираща температурна програма: 180 – 210 – 240°C с общо време за третиране 30 min.

В своя научен труд Shaole Wu и съавтори [16], разработват метод за микровълнова минерализация в затворена съдова система на четири растителни стандартни референтни материала (SRMs) и два зърнени референтни материала (RMs) с използване на к.ННО₃ и смес от к.ННО₃ и Н₂О₂ за директно определяне на 26 елемента: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, Th, U, V и Zn. Пробите се подлагат на предварителна обработка с к. ННО₃, с или без добавяне на Н₂О₂, като се оставят да престоят за 24 h на стайна температура. След това пробите се третират при температура от 120 – 165°C и налягане до 13,8 bar (200 psi) за 20 минути. Чрез използваната методика авторите постигат аналитичен добив в диапазона 85 – 115% за зърнените референтни материали, включително царевични трици и пшенично брашно, а при растителните референтни материали, аналитичните добиви са между 90 – 115% за As, B, Ba, Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Pb, Sr и Zn; 70 – 100% за Al, Co, Cr, Fe, K, Sb и V и 40 – 80% за Ni, Th, Ti и U.

1.1.4. Сравнение на ФБЕ с методи за пълно разтваряне на проби

Както ФБЕ, така и киселинната минерализация са от съществено значение при анализа на хранителните добавки. Физиологично базирана екстракция е ценен подход, който позволява да се оцени ефективността на освобождаване на хранителните вещества в човешкия организъм, като същевременно дава информация относно влиянието на матрицата върху процесите на тяхното освобождаване, което е от критично значение при разработването на различни хранителни добавки, с цел тяхното по-лесно и ефективно усвояване от организма.

Въпреки предимствата си, методът има и някои недостатъци, като необходимостта от използване на множество ензими, което оскъпява значително процедурата. Също така, резултатите могат да варират в зависимост от конкретния използван модел на храносмилане.

Например, в своето проучване Zhi Xiang Ng и колектив [17], имат за цел да изследват ефекта на *in vitro* смилането върху общата антиоксидантна активност и инхибиторния потенциал на въглехидратно хидролизиращи ензими на 12 функционални растителни храни. За целта те използват като реагенти пепсин (pH ~ 2.0, стомашна фаза) и панкреатин заедно с жлъчни соли (pH ~ 7.0, чревна фаза). В резултатите се наблюдава значително намаляване на общото съдържание на полифеноли след храносмилане, като ензимното третиране води до деградация на някои биоактивни вещества, особено при използване на по-високи концентрации на панкреатин.

Същевременно, K. Wojtunik-Kulesza и съавтори [18], имат за цел да покажат влиянието на *in vitro* храносмилането върху състава, биодостъпността и антиоксидантната активност на

хранителните полифеноли и влиянието на рН върху антиоксидантните промени. Като реагенти те използват пепсин в стомашната фаза, но с по-ниска концентрация, панкреатин и жлъчни соли, като дозата е оптимизирана спрямо масата на пробата и добавят амилаза и липаза, което имитира по-реалистично човешкото храносмилане. Резултатите отчитат по-висока биодостъпност на полифенолите в края на симулираното храносмилане, запазване на антиоксидантната активност, благодарение на щадящите условия и се подчертава важноста на балансиран ензимен състав и контролирани рН условия за избягване на деградация.

Следователно, използването на по-щадяща и комплексна ензимна система, която по-добре имитира физиологичните условия, постига по-висока биоусвояемост, особено при оценка на хранителни добавки с антиоксидантни свойства.

Киселинната минерализация, от своя страна, е метод позволяващ разграждане на сложни по състав органични матрици с помощта на силни киселини и окислителни. Възможността за комбинация от различни киселинни смеси осигурява висока ефективност на извличане на голяма част от изследваните аналити и възможност за последващо количествено определяне с различни инструментални техники.

1.2. Инструментални техники за анализ на хранителни добавки

Количественото определяне на микро- и макроелементите в различни матрици като храни, почви, вода, биологични тъкани, както и хранителни добавки е от съществено значение, за надеждна оценка на биодостъпността, като изборът на аналитична техника трябва да бъде съобразен с целта на изследването, състава на анализираната проба (матрица), очаквана концентрация на аналитите и др. В таблица 1 са представени данни за инструменталните техники, използвани при оценка степента на освобождаване на различни минерали в голямо разнообразие от проби, сред които и хранителни добавки.

Таблица 1. Приложение на инструментални техники за елементен анализ

Аналит	Примерна матрица, (вид проба)	Инструментален метод
Se, K	Хранителни добавки	ICP – OES [19], [10]
Pb As, Cd, Ce, Fe, Mg	Минни отпадъци, Замърсени почви	ICP – AES [11]
Cd, Pb, Ce, Fe, Cr, Mo, Se, V, Ni	Какао на прах; ликьор, почва, хранителни добавки, минни отпадъци	ICP-MS [10],[11],[14],[15], [14],[20],[21],[22]
Al, Cd, Cu, Fe, Zn, Pb	Бързи храни (напр. телешки, пилешки, рибни и свински продукти), зърнени закуски, рибни продукти	ET-AAS [11]

От направената справка е видно, че най-широко приложение намира масспектрометрията с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) и оптико-емисионната спектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-OES).

В съвместната си работа Piotr Bawiec и колектив [19], прилагат успешно ICP-OES за определяне бионаличните фракции на Se от хранителни добавки след симулирано храносмилане.

В своят научен труд Şerife Tokalıoğlu и съавтори [10] описват методът *in vitro* на Обединената изследователска група за биодостъпност на Европа (BARGE), за оценка на биодостъпността на Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se и Zn в десет проби от хранителни добавки и три сертифицирани референтни материала. Степента на освобождаване за Cu, Fe, Mg, Mn и Zn са определени чрез ICP-OES, а Cr, Mo и Se чрез ICP-MS. Изчислените биодостъпни фракции на елементите в стомашната фаза за хранителните добавки са в диапазона 13 – 89% за Cr, 9 – 79% за Cu, 55 – 99% за Fe, 33 – 95% за Mg, 83 – 94% за Mn, 42 – 101% за Mo, 74 – 125% за Se и 81 – 104% за Zn, а за стомашно-чревната фаза както следва: 6 – 65% за Cr, 27 – 66% за Cu, 3 – 14% за Fe, 34 – 91% за Mg, 53 – 62% за Mn, 40 – 109% за Mo, 53 – 146% за Se и 3 – 35% за Zn.

María V. Principe и колектив [22], прилагат масспектрометрия с индуктивно свързана плазма за определяне нивата на Fe, Cu и Zn, след прилагане на ФБЕ за хранителни добавки, съдържащи *Spirulina*. Резултатите показват, че концентрациите на Fe, Cu и Zn в добавките варират съответно от 63 ± 1 до 1066 ± 7 $\mu\text{g/g}$, от 1.8 ± 0.1 до 187.9 ± 1.9 $\mu\text{g/g}$ и от 3.0 ± 0.3 до 57.3 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$, като определената бионаличност на Fe, Cu и Zn се оказва по-висока в чревната фаза на храносмилане в проби с високо съдържание на *Spirulina*. Бионаличността на Fe е по-

ниска в таблетните форми. Бионаличността на Cu е по-висока в устната фаза, отколкото в чревната, когато Cu присъства като част от помощни веществата, а не свързан със *Spirulina*, а бионаличността на Zn намалява при наличие на магнезиев стеарат като помощно вещество.

Bharathi Avula и съавтори [14], успешно използват ICP-MS метода за количествено определяне на V, Cr, Hg, Ni, Cd, Mn и др. след прилагане на ФБЕ като са анализирали 11 билки и 21 добавки.

Това показва, че плазмените методи са подходящи за оценка биодостъпността на елементи в хранителни добавки след прилагане на физиологично базирана екстракция. Поради това в настоящата работа за количествено определяне на микроелементите бе избран ICP-MS метода, а за оценка концентрацията на макроелементите, съответно MP - AES.

1.2.1. Същност на масспектрометрията с индуктивно свързана плазма

Масспектрометрията с индуктивно свързана плазма е сред широко използваните инструментални техники за елементен анализ. Методът се характеризира с възможност за бърз, многоелементен анализ, притежава ниски граници на откриване, широк линеен диапазон и възможност за изотопен анализ. Инструменталната техника е съставена от шест основни компонента: пробовъвеждаща система, йонизационен източник (индуктивно свързана плазма-ICP), интерфейс (самплер и скимер), йонна оптика, масов анализатор (квадрупол) и детектор. С помощта на перисталтична помпа течните проби се въвеждат в пулверизатор, който под действието на газов носител Ar разпръсква течната проба на фини аерозолни капчици, в състава на които се носят анализите. Формираният аерозол преминава през пулверизационна камера, в която големите капки, които не могат да генерират спектрално активна форма се сепарират в дренажа и до йонизационния източник достигат само най-фините капки с размер под 8 μm . Йонизационният източник при ICP-MS е индуктивно свързана плазма. Тя се формира в кварцова горелка, съставена от три отделни концентрични тръби, като през всяка от тях преминава поток аргон. През най-вътрешната тръба преминава пробата, носена от газов поток Ar. Средната тръба служи за осигуряване количеството аргон, необходим за формиране на плазмата, а външната подава аргон за охлаждане и капсулиране на плазмата. Самата плазма се образува чрез взаимодействието на силно магнитно поле, създадено от радиочестотен генератор свързан с медна намотка, с тангенциалния поток от аргонен газ. Генерирането на плазмата се осъществява чрез подаване високоволтова искра, която предизвиква йонизация на аргона. Този процес се самоподдържа като в плазмата съществуват както аргонни йони така и електрони. Под действието на високотемпературната плазма, около 10 000°C, пробата се атомизира и йонизира, генерирайки йони, които се насочват към масфилтъра чрез интерфейса. Той представлява два метални никелови конуса, наречени самплер и скимер, които имат малки

отвори (0,6 – 1,2 mm). Тяхната функция е да пропускат йоните към фокусиращите лещи, където те биват насочени към мас-разделителното устройство, което разделя йоните според съотношението им маса-заряд (m/z) [23].

В таблица 2 са представени основните предимства и недостатъци на ICP-MS метода [23], [24], [25].

Таблица 2. *Предимства и недостатъци на ICP-MS метода*

<i>Предимства</i>	<i>Недостатъци</i>
Възможност за многоелементен качествен, полуколичествен и количествен анализ	Скъпоструваща апаратура
Широк динамичен обхват (8 – 9 порядъка)	Експлоатационни разходи (висока консумация на аргон)
Ниски граници на откриване - ng.l^{-1}	Необходимост от високо квалифициран персонал
Висока чувствителност	Пробите за анализ трябва да бъдат в течно агрегатно състояние
Малък обем на пробата	Методът е деструктивен
Бързина на анализа	Наличие на спектрални и неспектрални пречения

Въпреки че методът се характеризира с множество предимства пред останалите инструментални техники за елементен анализ, в някои случаи анализът може да бъде сериозно затруднен поради наличие на редица спектрални и неспектрални пречения, което изисква прилагане на различни стратегии за тяхната корекция.

1.2.2. Видове пречения при ICP-MS

1.2.2.1. Спектрални пречения – същност и подходи за корекция

Спектралните пречения възникват, когато се регистрира сигнал със същото отношение маса към заряд (m/z) с това на анализа, недължащ се на неговото присъствие в изследвания разтвор. Този ефект води до завишаване на сигнала, генериран на масата на анализа, поради което тези пречения се наричат адитивни и по резултат на въздействие са винаги положителни – към сигнала на анализа се добавя сигнала, генериран от пречещия компонент [26]. Спектралните пречения, характерни за ICP-MS могат да бъдат разделени на 3 групи, в

зависимост от природата на тяхното възникване: изобарно спектрално припокриване, полиатомни пречения и припокриване от двойно заредени йони. В таблица 3 са представени видовете спектрални пречения и тяхната същност. [25]

Таблица 3. Видове спектрални пречения, характерни за ICP-MS

<u>Вид спектрално пречене</u>	<u>Същност</u>	<u>Пример</u>
Изобарно спектрално припокриване	Причинено е от изотопи на различни елементи, които притежават идентично отношение m/z с това на анализа.	$^{204}\text{Hg}/^{204}\text{Pb}$, $^{64}\text{Zn}/^{64}\text{Ni}$, $^{50}\text{V}/^{50}\text{Cr}$, $^{112}\text{Sn}/^{112}\text{Cd}$, $^{114}\text{Sn}/^{114}\text{Cd}$,
Полиатомни пречения	Формиране на молекулни йони/радикали, съставени от елементи на плазмения газ (аргон), разтворителя, матрицата на пробата и/или атмосферни газове.	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ върху ^{56}Fe $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$ върху ^{60}Ni $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$ върху ^{63}Cu $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ върху ^{52}Cr
Припокриване от двойно заредени йони	Формиране на йони с заряд $^{+2}$, при което се наблюдава припокриване със сигнали на целевите анализи.	$^{138}\text{La}/^{69}\text{Ga}$, $^{130}\text{Ba}/^{65}\text{Cu}$, $^{136}\text{Ce}/^{68}\text{Zn}$

В своя научен труд Fernanda Costa Pinheiro и колектив [27], разработват процедура за оценка тоталното съдържание на As, Cd, Hg и Pb в десет спортни добавки чрез ICP-MS процедура за храносмилане с помощта на киселинна минерализация, използвайки разредени разтвори на HNO_3 . За корекция на спектралните полиатомни пречения те работят в режим на колизионен газ. При този режим на работа през колизионната клетка, която се намира непосредствено преди мас-филтъра, се пропуска инертен газ, най-често хелий (He), в перпендикулярна посока на йонния лъч. Атомите на He се удрят в полиатомните радикали, при което под действието на сблъсъка те или се разпадат на съставлящите ги атоми, притежаващи различно m/z от това на анализа, или губят част от енергията си, в резултат на което траекторията им се променя и не успяват да преодолеят потенциалната бариера между колизионната клетка и квадрупола. [25]

Предимството на този режим на работа е, че He е инертен газ, който не участва във формирането на нови полиатомни радикали, които потенциално биха могли да запречат други анализи. Сериозен недостатък на метода е намаляване на работната чувствителност, поради

вероятността Не атоми да се сблъскат както с пречещите радикали, така и с йоните на анализите, при което по-малка част от тях ще достигнат до мас-филтъра, съответно детектора.

В разглежданата научна работа Бхарати Авула и съавтори [14], създават метод за анализ на 21 елемента в различни растителни продукти и хранителни добавки, използвайки ICP-MS. Използваният маспектрометър е оборудван с октополна реакционна система, която позволява, корекция на спектрални пречения чрез изместване по маси. Чрез използване на водород (H_2) като реакционен газ са елиминирани повечето полиатомни пречения, включително $^{39}K^{16}O$ върху ^{55}Mn , $^{40}Ar^{16}O$ върху ^{56}Fe , $^{44}Ca^{16}O$ върху ^{60}Ni и $^{40}Ar^{23}Na$ върху ^{63}Cu . В реакционната клетка пречещите полиатомни йони се елиминират чрез протониране или трансфер на заряд преди навлизането им в масовия анализатор. Например, аргоновите йони могат да бъдат неутрализирани чрез реакция с водород, както следва: $Ar^+ + H_2 \rightarrow Ar + H_2^+$, което позволява определяне на основния изотоп на ^{40}Ca . При прилагането на този подход е от съществено значение прецизният подбор на инструменталните параметри, за да се избегне образуването на вторични пречения, произтичащи от реакционните продукти. [25]

1.2.2.2. Неспектрални пречения – същност и подходи за корекция

Неспектралните пречения са породени от разликата в поведението на анализите в пробите и калибрационните стандарти, дължаща се на промяната в условията за извършване на определени етапи от трансформацията на пробата. По резултат на въздействието си те биват мултипликативни - могат да доведат до усилване или потискане сигнала на анализа. Матричните ефекти се дефинират като усилване или, по-често, потискане на сигнала на анализа под действие на матрицата на пробата, т.е. при много високи концентрации на пречещите компоненти, в резултат на което се променят условията за формиране на аналитичен сигнал [23].

Един от етапите на трансформиране на пробата, който може да се повлияе от матрицата на пробата е процесът на пренос и генериране на аерозол. Ефективността на пренасяне на аерозолната проба към плазмата зависи в голяма степен от размерите на аерозолните капчици и тяхното транспортиране. Следователно промени във физикохимичните свойства на пробата, като вискозитет, парно налягане, повърхностно напрежение и др. могат да повлияят на характеристиките на аерозола, а оттам и на измервания сигнал. Например, намаляване на вискозитета или увеличаване на парното налягане води до по-ефективно въвеждане на пробата в плазмата и до усилване на сигнала, при условие че плазмата не е пренаситена с разтворител. Пренасищането с разтворител може да доведе до охлаждане на плазмата, което понижава степента на йонизация на анализите и води до потискане на сигнала. [23]

Наличието на въглерод в матрицата оказва противоположен ефект като засилва йонизацията на анализа (особено за елементи с високи йонизационни потенциали). Това може да бъде обяснено с реакции на трансфер на заряд между въглеродни катиони (C^+) и анализа. Такъв ефект е наблюдаван при елементи като As, Se, Hg и Te, всички от които имат високи, но все пак по-ниски от въглерода, йонизационни потенциали. [23]

Един от най-лесно приложимите и често използвани методи за намаляване на матрични ефекти е разреждането на пробния разтвор. Този подход обаче има своите ограничения, особено когато се анализират елементи, присъстващи в много ниски (следови) концентрации, при които разреждането може да доведе до загуба на чувствителност. Алтернативен метод за минимизиране на неспектралните пречения е при калибрация работните стандарти да се приготвят в имитирана или частично съответстваща матрица. Тази стратегия е ефективна при сравнително прости по състав проби, чиито матрици могат да бъдат имитирани и за които са налични сертифицирани референтни материали. Най-широко приложение за корекция на неспектрален матричен ефект намират методът на вътрешния стандарт и метод на стандартната добавка.

1.2.2.2.1. Метод на вътрешния стандарт

Методът на вътрешния стандарт (IS) се използва за корекция както на неспектрален матричен ефект, така и за отчитане и корекция на промени в инструменталните условия на работа, които могат да усилят или потиснат сигнала на анализа – инструментален дрейф. За подходящи вътрешни стандарти при ICP-MS се считат елементи, които имат близък йонизационен потенциал и близка маса с тези на анализа. Избраният елемент за IS не трябва да присъства в пробата или, ако присъства, неговата концентрация трябва да бъде известна и постоянна [23].

Към всяка проба, стандартен разтвор и празна проба, се добавя едно и също количество вътрешен стандарт, а резултатите се изчисляват, като се използва отношението на сигнала на анализа към сигнала на IS.

1.2.2.2.2. Метод на стандартната добавка (МСД)

Тази техника включва добавяне на известни количества анализ в градираща концентрация, към еквивалентни аликвотни части от пробата. За да се оцени наличие на неспектрален матричен ефект се прави сравнение на наклоните получени чрез калибрация по водни стандарти и МСД. Въпреки, че този подход коригира успешно матричните ефекти, методът на стандартната добавка не отчита инструменталния дрейф, поради което при работа с ICP-MS двата метода – IS и МСД се прилагат едновременно [23].

2. Цели и задачи

Целта на настоящата дипломна работа е да се направи сравнение между ефективността на извличане на минерали от хранителни добавки чрез две процедури за физиологично базирана екстракция (ФБЕ) в имитирана среда от стомашен сок.

За изпълнение на поставената цел са формулирани следните изследователски задачи:

1. Да се оцени влиянието на времето за третиране върху ефективността на извличане на изследваните аналити.
2. Да се оцени влиянието на матрицата върху работната чувствителност на изследваните микроелементи при ICP-MS определянето и да се предложи подходяща калибрационна стратегия.
3. Да се оцени влиянието на матрицата върху работната чувствителност на изследваните макроелементи при MP-AES определянето и да се предложи подходяща калибрационна стратегия.
4. Да се оцени ефективността на извличане на приложените методики по отношение на изследваните микро- и макроелементи.
5. Да се оцени тоталното съдържание на анализирани минерали чрез микровълново подпомогната киселинна минерализация.
6. Да се оцени „биодостъпността“ за двете използвани физиологично базирани екстракции.

3. Експериментална част

3.1. *Използвана апаратура*

- Квадруполен масспектрометър с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) – Agilent 7700, оборудван с концентричен MicroMist® пулверизатор и Scott double pass, Peltiew cooled 2°C (Glass Expansion) пулверизационна камера.

Таблица 4. *Работни параметри на ICP-MS – Agilent 7700*

Условия на плазмения разряд RF мощност: Ar охлаждащ поток: Ar спомагателен поток: Ar пулверизиращ поток: Дебит на пробния разтвор:	1.55 kW 12 L.min ⁻¹ 1 L.min ⁻¹ 1.2 L.min ⁻¹ 0.3 mL.min ⁻¹
Пулверизатор:	Micromist (Glass Expansion)
Аерозолна камера:	Scott double pass, Peltiew cooled 2°C
Конуси на интерфейса (sampler and skimmer):	Ni
Настройки на масспектрометъра Resolution: Acquisition mode: Channels per Mass: Dwell time: Replicates	Normal Peak Hopping 1 100 ms 5
Колизионна клетка Колизионен газ Дебит на колизионния газ:	He 4.5 mL.min ⁻¹
Аналити Вътрешни стандарти	⁵² Cr, ⁵³ Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁹ Co, ⁶² Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁹⁵ Mo, ⁹⁸ Mo, ¹¹⁰ Cd, ¹¹¹ Cd, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁸ Pb ¹⁰³ Rh

- Атомно емисионен спектрометър с микровълнова плазма, Agilent 4300.
Изследвани аналити: K I 766.491, K I 769.897, Ca I 396.847, Ca II 422.673, Zn I 213.857, Zn I 481.053, Mg I 280.271, Mg I 383.829, Mn I 403.076, Mn I 403.307.

Друга използвана апаратура и лабораторни съдове:

- Микровълнова система за екстракция (High performance microwave digestion system) – ETHOS ONE, Milestone;
- Система за ултра чиста вода ELGA Veolia модел PURELAB Chorus 2+ ;
- Аналитична везна KERN ABJ 220-4NM с клас на прецизност – 0.1 mg;
- Центрофуга;
- Автоматични пипети VWR и BRAND;
- Полиетиленови чашки с винтови капачки от 100 mL и полиетиленови епруветки с конично дъно и винтови капачки от 15 и 50 mL;

3.2. Реактиви и стандартни разтвори

- Използвани реактиви:

- ултрачиста вода (UPW);
- 69% HNO₃, p.a., Fluka
- 30% H₂O₂, p.a., Sigma-Aldrich
- Пепсин на прах, ≥250 units/mg, Sigma-Aldrich
- NaCl – 99.9% чисто в-во (ЧЗА), Рай-хим
- Оцетна киселина - 99.9 % чисто в-во (ЧЗА), Рай-хим
- Млечна киселина - 90 % чисто в-во (ЧЗА), Рай-хим
- Натриев цитрат – ЧЗА, Химснаб, Димитровград

- За приготвяне на калибрационните стандартни разтвори се използва:

- Многоелементен стандартен разтвор 100 mg.L⁻¹ в 10 % HNO₃, d=1.041 g/cm³ при 20°C, (CPAchem Ltd, Bulgaria);

- Използван стандартен разтвор с цел избор на подходящ вътрешен стандарт:

- Rh 998.6 ± 4.1 mg.L⁻¹ в 2 % HNO₃, d=1.012 g/cm³ при 20°C (CPAchem Ltd, Bulgaria);

- Хранителна добавка:

- Хранителна добавка съдържаща екстракт от канела, наричана за по-кратко „Канела“.

3.3. Подготовка на стандартни разтвори и количествен анализ

За количествено определяне на целевите аналити е подготвена серия от калибрационни йонни стандарти в концентрационен диапазон от 0 – 100 µg.L⁻¹, в среда от 0.5% к.HNO₃. Работните стандарти са приготвени гравиметрично с UPW. За корекция на евентуален

инструментален дрейф към всеки стандартен разтвор е дотиран вътрешен стандарт на Rh на ниво $2 \mu\text{g.L}^{-1}$.

3.3.1. Микровълново подпомогната киселинна минерализация на проби от хранителни добавки за определяне тоталното съдържание на микро- и макроелементи

За определяне тоталното съдържание на изследваните микро- и макроелементи, анализирани проби са подложени на микровълново подпомогната киселинна минерализация. За целта 0.3 g от предварително хомогенизирана проба на хранителната добавка, са претеглени директно в тefлонови съдчета за киселинна минерализация. Към тях са добавени 10ml к. HNO_3 и 2ml 30% H_2O_2 . Пробите са оставени за 24 h на стайна температура, до затихване на първоначално наблюдаваната реакция. След затихване на реакцията, пробите са третираны по програмата за микровълново разтваряне, описана в таблица 5. След приключване на програмата и охлаждане до стайна температура, пробите са прехвърлени тегловно до крайна маса 50 g с UPW. По същата методика са разработени и празните проби.

Таблица 5. Програма за микровълново подпомогната киселинна минерализация на проби от хранителни добавки

Време, min	Стъпка	Температура (T_1), °C	Температура (T_2), °C
00:25:00	Достигане на T_1	180	120
00:20:00	Поддържане на T_1	180	120

* T_1 – реална температура на пробата, отчетена чрез температурна сонда;

T_2 – температура в микровълновата система, отчетена чрез инфрачервен сензор.

За определяне тоталното съдържание на избраните микроелементи: Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Mo, Cd и Pb, 5 mL от бистрата фракция на пробните разтвори са отпипетирани и подложени за анализ посредством ICP – MS.

Тоталното съдържание за микро- и макроелементите Zn, Ca, Mg и K е определено чрез MP - AES.

3.3.2. Подготовка на проби за прилагане на физиологично базирана екстракция

За оценка биодостъпността на изследваните микро- и макроелементи от хранителни добавки в среда от имитиран стомашен сок са тествани две физиологично базирани екстракционни методики. Двете методики са избрани след преглед на научната периодика, като са съобразени с вида на изследваната проба, както и с използваните инструментални

техники за анализ, представени в таблица 6.

Таблица 6. *Описание на използваните методики за ФБЕ*

	<i>Първа методика (M1)</i>	<i>Втора методика (M2)</i>
Стомашен сок	1.25 g пепсин, 0.5 g натриев цитрат ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 420 μL млечна киселина ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) и 500 μL оцетна киселина ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) се разтварят в 100 mL UPW (pH 2.5)	50 mg пепсин се разтварят в 5 mL 150 mM NaCl (pH 2.5)
Пробоподготовка	~ 0.1 g в 10 mL стомашен сок (pH 2.5)	~ 1 g в 5 mL стомашен сок (pH 2.5)

Необходимото количество проба е претеглено директно в епруветки от 50 mL. След добавяне на необходимото количество стомашен сок, пробите се поставят на магнитна бъркалка с външна температурна сонда при температура 37°C и 100 rpm. За да оценим влиянието на времето за екстракция върху биодостъпната фракция, пробите са третирани за 1h и 2h. Всички екстракции са проведени при частично отворени капачки на епруветките, за да се осигури достъп на кислород, което позволява да се имитира процеса на дишане. След провеждане на екстракцията, пробите се центрофугират за 10 min при 4000 rpm, след което се филтруват през целулозен филтър с размер на порите 0,45 μm . Получените бистри фракции се подлагат на последващ анализ за оценка степента на биодостъпна фракция. По същата процедура са разработени празни проби за двете методики на ФБЕ.

3.3.3. Подготовка на разтвори за корекция на несpekтрален матричен ефект чрез метода на стандартната добавка

За да се оцени наличието на несpekтрален матричен ефект методът на стандартната добавка е приложен при всички получени за анализ проби – след киселинна минерализация и след прилагане на ФБЕ по двете методики. Независимо от използваната методика, пробите от хранителната добавка, съдържаща канела са предварително разредени, като използвания DF е съобразен с нивата на анализите, получени по съответните методики. Всички пробни разтвори са приготвени гравиметрично, като разреждането е направено с UPW. Нивата на добавката и схемите за пробоподготовка за различните методики са описани в таблица 7.

Таблица 7. Схема за подготовка на проби по МСД за микроелементите Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Mo, Cd и Pb

Вид проба	$m_{\text{пр}}$ след екстракция, g	Концентрация на добавките	Концентрация на вътрешния стандарт Rh, $\mu\text{g.L}^{-1}$	Количество к. HNO_3 , % (v/v)	Крайна маса на разтвор, g
<u>Определяне на микроелементи след киселинна минерализация</u>					
Проба Канела без добавка	0.5	-	$2 \mu\text{g.L}^{-1}$	-	5.0
Проба Канела с добавка	0.5	0.5, 1, 20 и 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	$2 \mu\text{g.L}^{-1}$	-	5.0
<u>Определяне на макроелементи след киселинна минерализация</u>					
Проба Канела без добавка	1.0	-	-	-	10.0
Проба Канела с добавка	1.0	0.2, 0.5, 1 и 3 mg.L^{-1}	-	-	10.0
<u>Определяне на микроелементи по Методика 1 (M1)</u>					
Проба Канела, третирана за 1 и 2 h без добавка	5.0	-	$2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0.5% v/v	5.0
Проба Канела третирана за 1 и 2 h с добавки	5.0	0.5, 2 и 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	$2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0.5% v/v	5.0
<u>Определяне на микроелементи по Методика 2 (M2)</u>					
Проба Канела, третирана за 1 и 2 h без добавка	1.0	-	$2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0.5% v/v	5.0
Проба Канела третирана за 1 и 2 h с добавки	1.0	0.5, 2 и 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	$2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0.5% v/v	5.0
<u>Определяне на макроелементи по Методика 1 (M1)</u>					
Проба Канела, третирана за 1	0.1	-	-	0.5 % v/v	10.0
	1.0	-	-		10.0

<i>и 2 h без добавка</i>					
<i>Проба Канела третирана за 1 и 2 h с добавки</i>	0.1 1.0	1 и 2 mg.L ⁻¹	-	0.5 % v/v	10.0 10.0
<u>Определяне на макроелементи по Методика 2 (M2)</u>					
<i>Проба Канела, третирана за 1и 2 h без добавка</i>	0.1 1.0	-	-	0.5 % v/v	10.0 10.0
<i>Проба Канела третирана за 1 и 2 h с добавки</i>	0.1 1.0	1 и 5 mg.L ⁻¹	-	0.5 % v/v	10.0 10.0

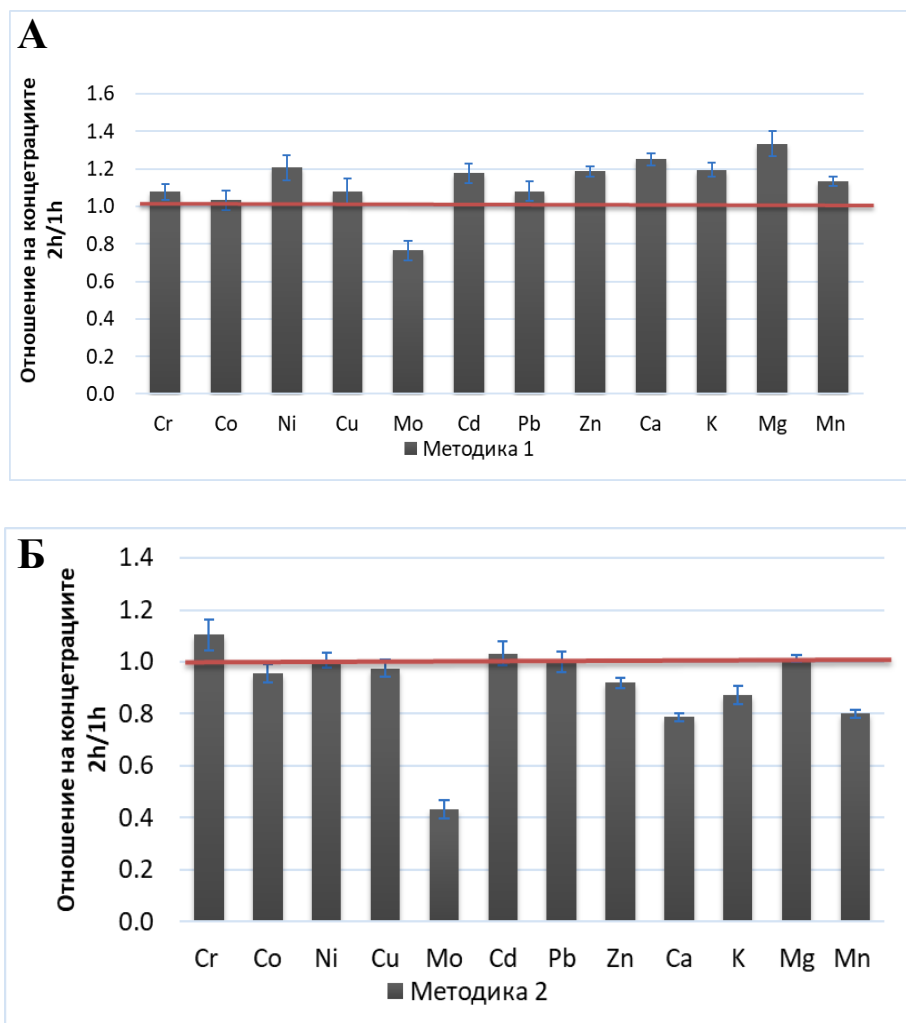
4. Резултати и дискусия

4.1. Влияние на времето за третиране върху степента на освобождаване на изследваните аналити

Един от основните параметри, които оказват влияние върху ефективността на освобождаване на аналитите в стомашния сок, е времето за третиране. Според изследването на Marisa Intawongse и съавтори [11], времето на престой на пробите в стомашната среда може да варира от няколко минути (приблизително 8 min) до няколко часа (до 3 h), преди да преминат в тънките черва. Тъй като при използваните от нас методики е постулирано време за третиране от 1 час, с цел да се установи дали по-продължителният контакт със средата води до по-висока степен на извличане на елементите, удължихме времето за екстракция до 2 часа.

За целта са проведени две паралелни екстракции, съответно за 1 h и 2 h по двете ФБЕ методики. Резултатите за изследваните микро- и макроелементите по двете методики са представени като отношение на получените концентрации за 2h/1h на фигура 1 - А и Б, съответно за М1 и М2.

Фигура 1. Влияние на времето за третиране върху ФБЕ на микро- и макроелементи по двете методики



От представените данни се вижда, че с изключение на Мо, по-дългото време за третиране благоприятства степента на освобождаване за всички макроелементи, както и за Ni (~20 %), Cr – под 10% и Cd – около 18%. Най-вероятно този ефект се дължи на по-продължителното време за контакт между пробата и екстрахиращата среда, което позволява и по-ефективното извличане на анализите.

При втората екстракционна процедура изчислените концентрации за микроелементите и при двете тествани времена, с изключение на Мо, са статистически неразличими, докато за изследваните макрокомпоненти, с изключение на Mg, за който времето не оказва значение, по-ефективно освобождаване се наблюдава при по-краткото време.

От получените резултати можем да заключим, че влиянието на времето за третиране е елемент специфично и зависи от използваната екстрахираща среда, поради което е необходимо внимателно проучване и оптимизиране в зависимост от целевите анализи и използваните реагенти. В настоящата работа като оптимално време за третиране е избрано 2h за M1 и 1h за M2.

4.2. Сравнение на използваните методики за ФБЕ

4.2.1. Оценка на неспектрален матричен ефект при анализ на микро- и макроелементи след прилагане на ФБЕ

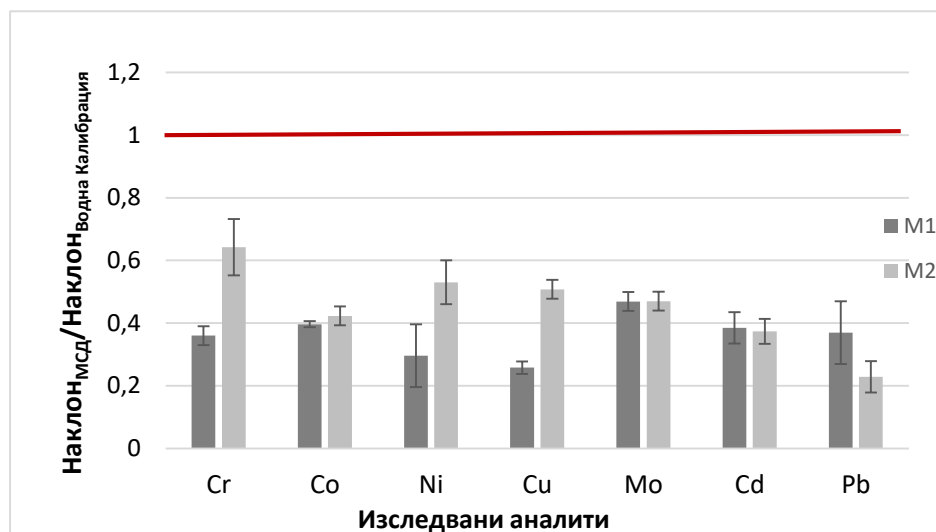
В настоящото изследване са приложени две методики за физиологично базирана екстракция (ФБЕ), разработени и описани в научната литература, като част от труда на Marisa Intawongse и колектив [11]. Изборът на методиките се основа на сходството в матрицата на изследваната проба, както и на сходни инструментални техники, използвани за последващ количествен анализ. Тъй като едната методика се характеризира с относително опростена процедура за имитиране на стомашен сок – изисква само NaCl и пепсин (M2), докато другата включва по-сложен протокол за имитиране на средата (M1), това създава предпоставки за сравнение ефективността на двете методики върху степента на извличане на изследваните микро- и макрокомпоненти при едни и същи условия на екстракция и последващ анализ.

За количествено определяне на микроелементите е използван ICP – MS метод в режим на He, докато макрокомпонентите са оценени чрез MP – AES. Въпреки че елементите Mn и Zn, спадат към групата на микроелементите на база техния дневен прием, поради установени високи концентрации в изследваната проба, те бяха анализирани заедно с макрокомпонентите.

За оценка и корекция на евентуален неспектрален матричен ефект бяха приложени две калибрационни стратегии: калибрация по водни стандарти и метод на стандартната добавка (МСД) като е направено сравнение на наклоните, получени по двете калибрационни стратегии.

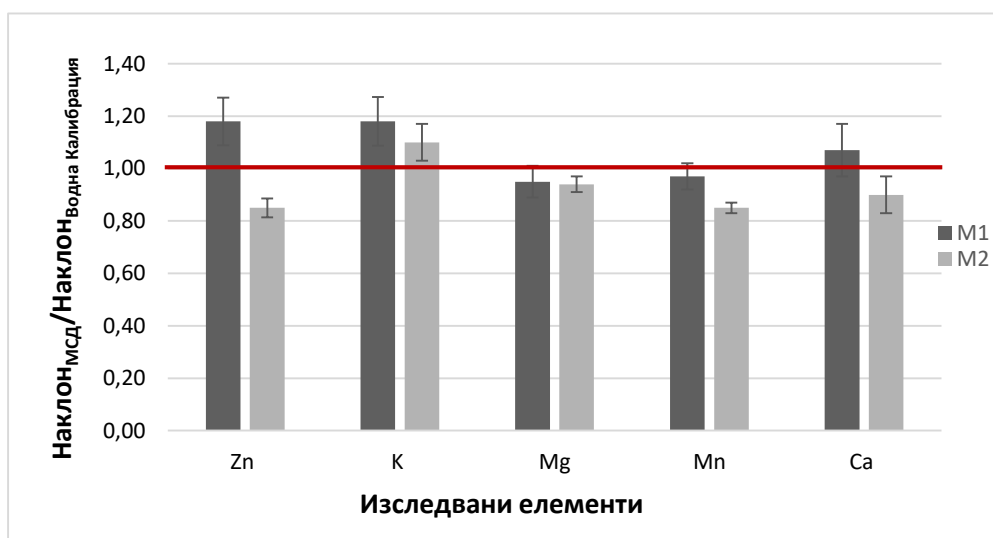
Отношението на наклоните с техните неопределености са представени на фигура 2 за изследваните микроелементи и фигура 3 – съответно за мониторираните макроелементи.

Фигура 2: *Отношение на наклоните по водна калибрация и метода на стандартната добавка (МСД) за целевите микроелементи за двете ФБЕ методики*



Въз основа на представените на фигура 2 данни е видно, че за всички изследвани микроелементи и при двете използвани методики (M1 и M2), отношенията на наклоните са статистически различни от единица, което е доказателство за наличие на неспектрален матричен ефект. Степента на потискане за всички мониторирани аналити при M1 е приблизително 60%, с изключение на Ni и Cu, където достига до 70%, докато при M2 този ефект е по-силно изразен за Pb – приблизително 80% и най-слабо изразен за Cr – около 30%. Евентуално обяснение за различното поведение на аналитите при втората методика е високото съдържание на Na, който се внася в плазмата от екстракционната система, както и по-сериозното натоварване с проба, поради самата същност на методиката за екстракция. По-високото съдържание на лесно йонизиращи елементи като Na и K могат да доведат до промяна в условията на плазмата и съответно да са причина за наличие на йонизационно пречене, по-силно изразено при по-трудно йонизиращите елементи.

Фигура 3: *Отношение на наклоните по водна калибрация и метода на стандартната добавка (МСД) за целевите макроелементи за двете ФБЕ методики*



От данните на фигура 3 е виден, значително по-слабо изразен матричен ефект при анализа на макроелементите. Това може да бъде обяснено от една страна с разликата в същността на метода - при МР – AES спектрално активната форма са възбудени атоми и/или йони, които емитират при избрана дължина на вълната; както и поради по-ниската температура на плазмата, което я прави по-стабилна и по-малко податлива на йонизационни пречения.

С цел корекция на наблюдавания матричния ефект, концентрациите на елементите в пробите, след екстракция са изчислени чрез метода на стандартната добавка съгласно уравнение 1:

$$C = \frac{b_0}{b_1}, \text{ където}$$

b_0 – отрез на правата;

b_1 – наклон на правата.

Изчислените концентрации на нализирания микро- и макроелементи са представени в таблица 8 и 9 съответно.

Таблица 8: Концентрации на изследваните микроелементи след, прилагане на ФБЕ, изчислени към обекта.

Концентрация на изследваните микроелементите	Cr mg/kg	Co mg/kg	Ni mg/kg	Cu mg/kg	Mo µg/kg	Cd µg/kg	Pb µg/kg
M1	0.31±0.05	0.11±0.03	0.6±0.5	0.3±0.2	41±7	32±5	13±3
M2	0.13±0.05	0.04±0.03	0.15±0.06	0.06±0.01	39±2	19±2	3.5±0.5

* Неопределеността е представена като SD, при n=5

Таблица 9: Концентрации на изследваните макроелементи, след прилагане на ФБЕ, изчислени към обекта.

Концентрация на изследваните макроелементи	Ca g/kg	K g/kg	Mg mg/kg	Zn g/kg	Mn mg/kg
M1	23±5	3.4±0.8	580±65	4.3±1.0	56±7
M2	1.59±0.12	2.9±1.1	479±56	3.2±0.7	45±6

* Неопределеността е представена като SD, при n=3

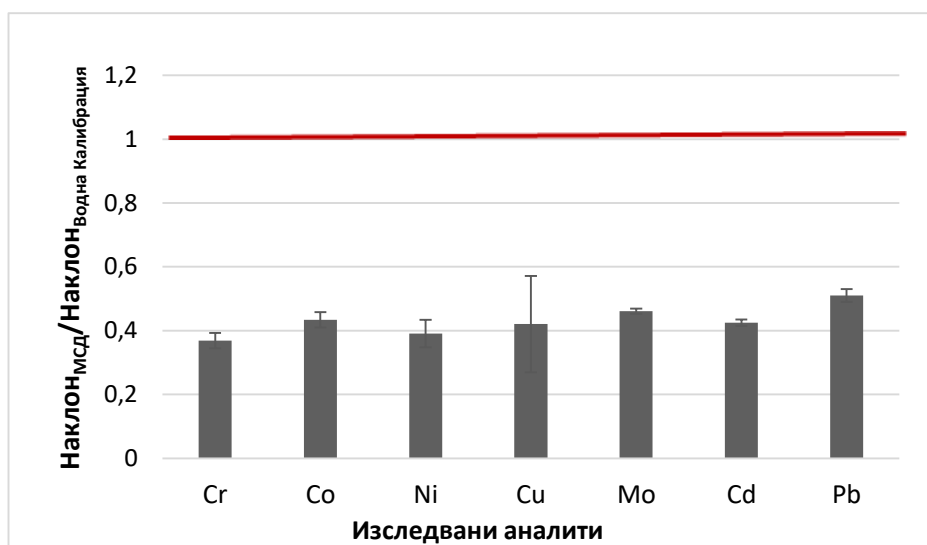
Данните, представени в таблица 8 и 9 показват, че по-висока или съпоставима биодостъпност се постига по M1, което свидетелства за по-ефективно извличане в симулирана стомашна среда, която е по-близка до реалната. Най-съществена разлика в степента на извличане се наблюдава за Ni, Cu, Pb и Ca.

4.3. Количествено определяне съдържанието на изследваните микро- и макрокомпоненти

Един от широко използваните подходи за определяне на тоталното съдържание на елементи в твърди проби е киселинната минерализация. Използваната в настоящата работа методика е адаптирана съобразно протокола, предложен от F.C. Pinheiro и съавтори [15], които успешно прилагат микровълново подпомогната киселинна минерализация за анализ на елементен състав в хранителни добавки с високо съдържание на протеин. За оценка количественото съдържание на елементите в изследваната добавка е използвана смес от к.HNO₃ и 30% H₂O₂, при време за третиране 45 min и температура от 180 °C.

За определяне на концентрациите на елементите в изследваната проба са приложени две калибрационни стратегии: калибрация по водни стандарти и метод на стандартната добавка (МСД). На фигура 4 и фигура 5 са представени отношенията на наклоните за двете калибрационни процедури заедно с техните неопределености.

Фигура 4: *Отношение на наклоните по водна калибрация и метод на стандартната добавка за мониторираните микроелементи*



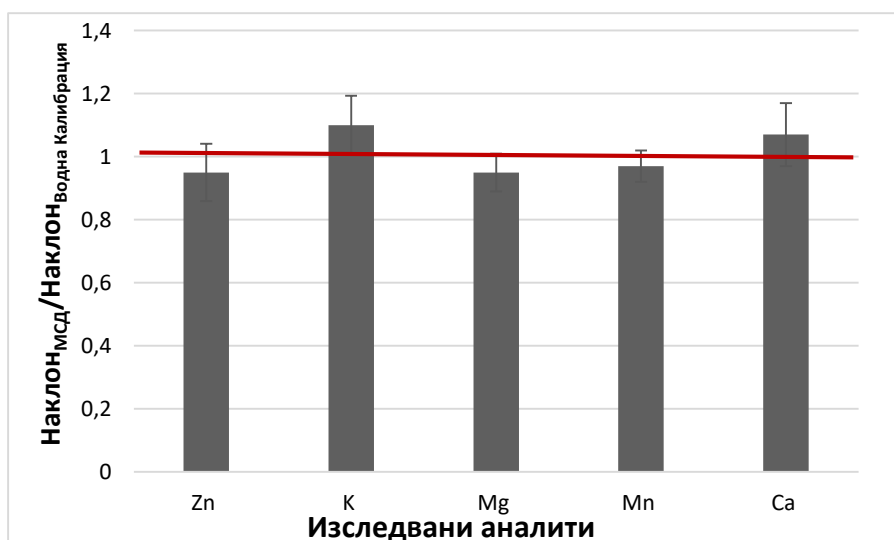
Поради установен неспектрален матричен ефект, концентрациите на изследваните микроелементи са изчислени по МСД, и резултатите са представени в таблица 10.

Таблица 10: *Концентрации на изследваните микроелементи, изчислени към обекта*

Микроелементи	Cr mg/kg	Co mg/kg	Ni µg/kg	Cu mg/kg	Mo µg/kg	Cd µg/kg	Pb µg/kg	Mn mg/kg
Концентрации	109.2±2.1	0.15±0.04	904±51	1.1±0.3	85±4	110±6	42.0±2.0	120±4

* Неопределеността е представена като SD, при n=5

Фигура 5: *Отношение на наклоните по водна калибрация и метод на стандартната добавка за мониторираните микроелементи*



Тъй като отношението на наклоните по двете калибрационни стратегии, представени на фигура 5 са статистически неразличими от 1, за всички тествани елементи, концентрациите на макрокомпонентите са изчислени по водна калибрация и са представени в таблица 11.

Таблица 11: Концентрации на изследваните макроеlementи, изчислени към обекта

<i>Макроеlementи</i>	Ca g/kg	Zn g/kg	K g/kg	Mg g/kg
<i>Концентрация</i>	113±11	6.3±0.8	3.9±0.5	2.04±0.08

* Неопределеността е представена като SD, при n=3

Получените данни за общо съдържание на изследваните анализи са сравнени с декларираните от производителя в хранителната добавка. От всички изследвани минерали, декларирани стойности са налични само за Cr и Zn, като съдържанието на Cr в една таблетка с маса 0.5g съответства на 50µg, а за Zn респективно 3,5 mg. Получените от нас резултати за двата елемента са както следва: съдържание на Cr - 54±2 µg/0.5g; и за Zn - 3.2±0.4 mg/0.5g, което е в добро съответствие с декларираните резултати.

За два от изследваните елементи - Cd и Pb е известно, че не са от есенциално значение за човешкия организъм, но тъй като спадат към групата на потенциално токсичните елементи, тяхната концентрация в храни, напитки, както и хранителни добавки е обект на непрекъснато мониториране. Съгласно Регламент №1881/2006 на комисията на европейските общности, посочените пределно допустими концентрации за Pb и Cd в хранителни добавки са съответно 3.0 mg/kg и 1mg/kg. Съгласно получените от нас резултати: 0.042±0.02 mg/kg за Pb и 0.11±0.06 mg/kg за Cd, концентрациите и за двата елемента са под пределно допустимите норми.

4.4. Оценка на биодостъпност след прилагане на ФБЕ

Биодостъпността на изследваните елементи е оценена чрез аналитичен добив (R, %), което представлява относителният дял на екстрахираното количество от общото съдържание на съответния анализ в пробата. За целта, след прилагане на физиологично базираната екстракция (ФБЕ), пробите са анализирани, като получените концентрации се съпоставят с тоталното съдържание на елементите, определено чрез микровълново подпомогната киселинна минерализация. Аналитичният добив е изчислен съгласно уравнение 2:

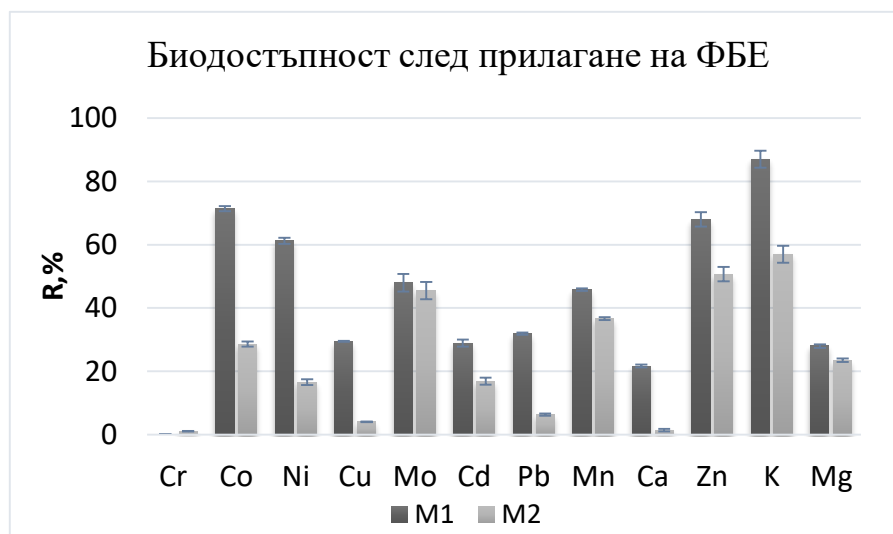
$$R, \% = \frac{q_A}{q_A^0} \times 100, \text{ където}$$

q_A - количество анализ, след ФБЕ;

q_A^0 - общо количество на изследваните елементи, определени след микровълново подпомогната минерализация.

На фигура 6, съгласно уравнение 2, са визуализирани R, % за всички анализирани микро- и макроелементи и по двете методики за физиологично базирана екстракция (ФБЕ).

Фигура 6: Аналитични добиви след ФБЕ



От представените данни на фигура 6 се установява, че с изключение на молибден (Mo), при който аналитичният добив е съпоставим и за двете приложени ФБЕ методики, за всички останали изследвани елементи се отчита по-висока ефективност на извличане при използване на M1. За Co, Ni и Mn биодостъпността, постигната чрез M1, надвишава 50%, докато за Cu, Cd и Pb тя е приблизително 30%. Най-нисък R, % е установен за хром (Cr) - под 5%.

Съгласно научния труд на Şerife Tokalıoğlu и съавтори [10], в който се описва методът *in vitro* на Обединената изследователска група за биодостъпност на Европа (BARGE), за оценка на биодостъпността на Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se и Zn в десет проби от хранителни добавки и три сертифицирани референтни материала, изчислените биодостъпни фракции на елементите в стомашната фаза за хранителните добавки са в диапазона 13 – 89% за Cr, 9 – 79% за Cu, 55 – 99% за Fe, 33 – 95% за Mg, 83 – 94% за Mn, 42 – 101% за Mo и 81 – 104% за Zn.

Според изследвания на Naiyi Yin и колектив [28], биодостъпността на следи от метали, свързана с оралното поглъщане на пазарни зеленчуци (маруля, пак чой, зеле и листна маруля), в стомашно-чревните фази е съответно: 5,7–75,5% за Cu, 17,3–50,4% за Fe, 13,3–49,1% за Mn и 19,9–63,7% за Zn.

Въз основа на получените резултати можем да заключим, че с изключение за Cr, стойностите за биодостъпност, получени в настоящото изследване, са в добро съответствие с публикуваните данни в научната литература.

5. Изводи и заключения

1. Успешно са приложени две процедури за ФБЕ в имитирана среда от стомашен сок, при анализ на хранителна добавка, съдържаща екстракт от канела.
2. Установено е, че влиянието на времето за третиране е елемент специфично и зависи от използваната екстракционна среда.
3. За всички изследвани минерали по-ефективно извличане е постигнато, при третиране на пробата чрез методика 1, чийто състав е по-близък до реалния стомашен сок.
4. Успешно е разработена и приложена микровълново подпомогната киселинна минерализация за количествено определяне на целевите аналити.
5. Установено е добро съответствие между декларираните стойности за Cr и Zn в листовката на продукта, с получените от нас резултати след прилагане на киселинна минерализация.
6. ICP-MS метода в комбинация с MP-AES могат да бъдат успешно приложени при анализ на микро- и макроеlementи в хранителни добавки.

Благодарности: Това изследване е финансирано от Европейския съюз - NextGeneration EU, чрез Националния план за възстановяване и устойчивост на Република България, проект № BG-RRP-2.004-0001-C01.

Участия в постерни конференции:

1. **18 – 19.10.2024г.** – Участие в Седма научна конференция за млади студенти, докторанти и млади учени „Предизвикателства в Химията“, гр. Пловдив, с постер на тема: „Приложение на ICP – MS за охарактеризиране на бионаличност на целеви елементи от хранителни добавки в имитирана среда от стомашен сок“.
2. **05.06.2025г.** – Участие в семинар АСМ 2 – „Инструментални техники и методи за химичен анализ – предизвикателства и нови решения“, гр. Пловдив, с постер на тема: „Приложение на физиологично базирана екстракция в имитирана среда от стомашен сок за оценка биодостъпност на целеви елементи в хранителна добавка от канела чрез ICP – MS“.

Исползвана литература:

- [1] Ruby, M. V., Davls, A., Link, T. E., Schoof, R., Chancy, R. L., Freeman, G. B., & Bergstrom, P. (1993). Development of an in Vifro Screening Test To Evaluate the in Vivo Bioaccessibility of Ingested Mine-Waste Lead. In *Environ. Sci. Technol* (Vol. 27).
- [2] A N D Y D A V I S. (1996). *Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [3] Intawongse, M., & Dean, J. R. (2008). Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollution*, 152(1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.05.022>
- [4] Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Lal, M. K., & Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 97, pp. 366–380). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.019>
- [5] Gissi, A., Mangiatordi, G. F., Sobański, T., Netzeva, T., & Nicolotti, O. (2017). Nontest Methods for REACH Legislation. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 1–8, 472–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12300-5>
- [6] Rodríguez-Navas, C., Rosende, M., & Miró, M. (2017). In-vitro physiologically based extraction of solid materials: Do we have reliable analytical methods for bioaccessibility studies of emerging organic contaminants? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 42–52. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.03.005>
- [7] Choleva, T. G., Tziasiou, C., Gouma, V., Vlessidis, A. G., & Giokas, D. L. (2023). In Vitro Assessment of the Physiologically Relevant Oral Bioaccessibility of Metallic Elements in Edible Herbs Using the Unified Bioaccessibility Protocol. *Molecules*, 28(14). <https://doi.org/10.3390/molecules28145396>
- [8] Wierzejska, R. E. (2021). Dietary supplements—for whom? The current state of knowledge about the health effects of selected supplement use. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph18178897>

- [9] Farag, M. A., Abib, B., Qin, Z., Ze, X., & Ali, S. E. (2023). Dietary macrominerals: Updated review of their role and orchestration in human nutrition throughout the life cycle with sex differences. In *Current Research in Food Science* (Vol. 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100450>
- [10] Tokalioğlu, Ş., Clough, R., Foulkes, M., & Worsfold, P. (2014). Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. *Food Chemistry*, 150, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.151>
- [11] Intawongse, M., & Dean, J. R. (2006). In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25(9), 876–886. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.03.010>
- [12] el Hosry, L. Sok, N. Richa, R. al Mashtoub L. Cayot, P. & Bou-Maroun, E. (2023). Sample Preparation and Analytical Techniques in the Determination of Trace Elements in Food: A Review. In *Foods* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods12040895>
- [13] Hu, Z., & Qi, L. (2013). Sample Digestion Methods. In *Treatise on Geochemistry: Second Edition* (Vol. 15, pp. 87–109). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.01406-6>
- [14] Avula, B., Wang, Y. H., Smillie, T. J., Duzgoren-Aydin, N. S., & Khan, I. A. (2010). Quantitative determination of multiple elements in botanicals and dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 8887–8894. <https://doi.org/10.1021/jf101598g>
- [15] Pinheiro, F. C., Babos, D. V., Barros, A. I., Pereira-Filho, E. R., & Nóbrega, J. A. (2019). Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.018>

- [16] Wu, S., Feng, X., & Wittmeier, A. (n.d.). Microwave Digestion of Plant and Grain Reference Materials in Nitric Acid or a Mixture of Nitric Acid and Hydrogen Peroxide for the Determination of Multi-elements by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.
- [17] Artavia, G., Cortés-Herrera, C., Granados-Chinchilla, F., & Pinto, A. di. (2021). 12. *Selected Instrumental Techniques Applied in Food and Feed: Quality, Safety and Adulteration Analysis*. <https://doi.org/10.3390/foods>
- [18] Wojtunik-Kulesza, K., Oniszcuk, A., Oniszcuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>
- [19] Bawiec, P., Sawicki, J., Łasińska-Pracuta, P., Czop, M., Sowa, I., Iłowiecka, K., & Koch, W. (2023). In Vitro Evaluation of Bioavailability of Se from Daily Food Rations and Dietary Supplements. *Nutrients*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/nu15061511>
- [20] Krachler, M., Radner, H., Irgolic, K. J., Krachler, M., & Irgolic, · K J. (1996). Microwave digestion methods for the determination of trace elements in brain and liver samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. In *Fresenius J Anal Chem* (Vol. 355). Springer-Verlag.
- [21] Givélet, L., Amlund, H., Loeschner, K., & Sloth, J. J. (2024). Aluminium Determination in Foodstuffs by ICP-MS: Influence of Microwave Digestion Parameters on the Recovery. *Food Analytical Methods*, 17(7), 1038–1045. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02628-3>
- [22] Principe, M. v, Permigliani, I. S., della Vedova, M. C., Petenatti, E., Pacheco, P., & Gil, R. A. (2020). Bioaccessibility studies of Fe, Cu and Zn from Spirulina dietary supplements with different excipient composition and dosage form Metal bioaccessibility from Spirulina supplements. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 8(5), 422–433. <http://jppres.com/jppreshttp://jppres.com/>
- [23] Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>

- [24] Houk, R. S., & Thompson, J. J. (n.d.). *Inductively coupled plasma mass spectrometry*".
- [25] „Основи на химичния анализ“ на проф. дхн инж. Рахила Борисова към издателство „Водолей“, София 2009г.
- [26] Лекционен курс по „Методи за инструментален анализ в химията“ на Доц. Кметов, 2021г.
- [27] Pinheiro, F. C., Babos, D. V., Barros, A. I., Pereira-Filho, E. R., & Nóbrega, J. A. (2019). Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 471–478. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2019.06.018>
- [28] Yin, N., Cai, X., Chen, X., Du, H., Xu, J., Wang, L., Sun, G., & Cui, Y. (2017). Investigation of bioaccessibility of Cu, Fe, Mn, and Zn in market vegetables in the colon using PBET combined with SHIME. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17901-1>