

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 8: Ochrana a tvorba životního prostředí

**Biopřístupnost organických polutantů z prachu
v trávicím ústrojí ovlivněná různými druhy nápojů**

**Filip Frederik Foršt
Jihomoravský kraj**

Brno, 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 8: Ochrana a tvorba životního prostředí

Biopřístupnost organických polutantů z prachu
v trávicím ústrojí ovlivněná různými druhy nápojů

Bioaccessibility of organic pollutants from dust in the
digestive tract affected by different types of beverages

Autoři: Filip Frederik Foršt

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, 616 00 Brno-střed

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: Mgr. Simona Rozárka Jílková, Ph.D.

Brno, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 6.1. 2024.....

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fonst'.

Poděkování

Srdečně bych chtěl poděkovat **Mgr. Simoně Rozárce Jílkové, Ph.D.** za vstřícný přístup, velikou trpělivost a možnost vypracovat práci na pracovišti RECETOXU. Patří jí můj obrovský dík za nesmírné množství věnovaného času, úsilí, mnoho rad a odborné vedení nejen v laboratoři, ale také při psaní této práce. Jsem jí velice vděčný za veškeré zkušenosti a informace, které mi předala. Děkuji jí za důvěru, kterou jsem vždy při práci pociťoval a také, že mi důvěřovala při práci v laboratoři. Rovněž bych chtěl poděkovat za podporu výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2023069, MŠMT, 2023–2026), díky které jsem mohl tuto práci zrealizovat. Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK a patří jim mé velké díky za tuto příležitost. Nesmírně si cením podpory a pomoci ode všech, kteří mi dali možnost vytvořit tuto práci.

Anotace

Tato práce se zabývá biopřístupností organických polutantů (konkrétně polycyklických aromatických uhlovodíků) z prachu v trávicích šťávách s přítomností nealkoholických nápojů. Prach se nachází všude okolo nás a člověk ho neúmyslně konzumuje (např. společně s konzumací nápojů). Prach potom společně s pitím prochází přes gastrointestinální trakt, kde dochází k uvolňování (biopřístupnosti) různých polutantů z prachu. Uvolněné polutanty jsou vstřebávány do těla člověka skrze výstelku tenkého střeva, což může způsobovat zdravotní komplikace. V této práci prostřednictvím fyziologicky založeného extrakčního testu (PBET) byly získány konkrétní hodnoty biopřístupnosti organických polutantů z prachu v gastrointestinálním traktu ovlivněné přítomností různých nealkoholických nápojů. Z výsledků vyplývá zvýšená biopřístupnost organických polutantů ve vzorku s plnotučným mlékem. Tímto způsobem může tato práce pomoci odborným studiím do budoucna.

Klíčová slova

biopřístupnost; PBET; prach; nealkoholické nápoje

Annotation

This work investigates the bioaccessibility of organic pollutants (specifically polycyclic aromatic hydrocarbons) from dust in digestive fluids with the presence of non-alcoholic beverages. Dust is present all around us and is unintentionally consumed by humans (e.g., together with beverage consumption). Dust then passes through the gastrointestinal tract along with the drink, where different pollutants from the dust are released (bioaccessibility). The released pollutants are absorbed into the human body through the lining of the small intestine, which can cause health complications. In this work, specific values of the bioaccessibility of organic pollutants from dust in the gastrointestinal tract affected by the presence of different non-alcoholic beverages were obtained using a physiologically based extraction test (PBET). The results show an increased bioaccessibility of organic pollutants in the sample with whole milk. In this way, this work can help expert studies.

Keywords

bioaccessibility; PBET; dust; non-alcoholic drinks

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Expoziční cesty.....	8
2.2	Biopřístupnost	8
2.3	PBET	8
2.3.1	Vliv vnějších podmínek na testy.....	9
2.4	Polycyklické aromatické uhlovodíky	9
2.5	Prach.....	10
2.5.1	Usazený vnitřní prach	10
3	Praktická část	12
3.1	Příprava:	12
3.2	Postup:.....	13
3.2.1	Příprava roztoku žaludeční tekutiny	13
3.2.2	Příprava extraktu žaludeční fáze.....	14
3.2.3	Příprava extraktu fáze tenkého střeva.....	15
3.2.4	Převedení analytů z vodní fáze do organické fáze (Solvent exchange).....	16
3.2.5	Vyčištění (clean-up).....	18
3.2.6	Analýza	19
4	Výsledky a diskuze	20
5	Závěr	21
6	Použitá literatura	22

1 ÚVOD

Do životního prostředí jsou uvolňovány chemické látky antropogenního původu, tedy látky, které svojí činností člověk produkuje. Tyto chemické látky se zde mohou shlukovat či cirkulovat v různých formách. Následně se mohou různými expozičními cestami dostávat do těla živých organismů. Prach je všudypřítomná matrice, která je složena z chemických látek různého charakteru. Je přítomný jak ve vnitřních prostorech (např. domácnosti), tak i ve venkovním atmosférickém vzduchu. Právě člověk tráví mnoho času ve vnitřních prostorech, kde se nachází usazený prach. Prach je klíčovou matricí pro expozici člověka různým chemickým látkám, třeba i persistentním organickým polutantům. Je to dáno tím, že člověk prach nezáměrně konzumuje. Vystává nám tedy otázka o biopřístupnosti polutantů z prachu, a tedy o potenciálním zdravotním riziku pro člověka (Papiernikova, 2022).

Uskutečnilo se mnoho studií, zaměřujících se na biopřístupnost organických polutantů z prachu, jako jsou např. zpomalovače hoření. Podstatou laboratorních testů byla simulace přirozených trávicích mechanismů v gastrointestinálním traktu člověka s využitím trávicích šťáv (Papiernikova, 2022). Ve výsledku se potenciálně, relativně malá biopřístupnost potvrdila. Avšak nebyla zohledňována přítomnost potravin a nápojů. Nealkoholické nápoje jako jsou např. mléko, káva, sirup aj., se přirozeně nacházejí v každodenní potravě člověka (u většiny lidí). Je tedy otázka o existenci vztahu mezi nealkoholickými nápoji a mírou biopřístupnosti organických polutantů v trávicím traktu člověka.

Práce je vytvořena ze dvou částí: teoretické a praktické. Cílem teoretické části je shrnout poznatky o gastrointestinální soustavě a přiblížit hlavní principy realizovaných testů v jednotlivých studiích zaměřujících se na biopřístupnost organických polutantů z prachu. V praktické části byl proveden experiment s cílem zjistit vliv nealkoholických nápojů na samotnou biopřístupnost polycyklických aromatických uhlovodíků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Expoziční cesty

Expoziční cesty popisují vstup chemických a biologických činitelů do lidského těla. Existují tři expoziční cesty: inhalace (vdechnutí), ingesce (sněžení) a dermální expozice (přes kůži) (*Exposure Pathways and Routes*, n.d.). K ingesci organických polutantů (škodlivin) může docházet jak při konzumaci jídla, tak při neúmyslném nedietárním požití např. půdy nebo usazeného prachu. Nejvíce prachu pozřou děti, které vkládají různé hračky a věci do úst. Když se polutant dostane do našeho těla, tak ji nazýváme dávkou. Existuje několik různých způsobů měření dávky. Potenciální dávka je množství požitého kontaminantu, z nichž ne vše je absorbováno. Aplikovaná dávka je množství kontaminantu na absorpční bariéře (např. střevo), které může být absorbováno tělem, aplikovaná dávka může být menší než potenciální dávka, pokud je kontaminant pouze částečně biologicky dostupný (biopřístupný). Vnitřní dávka je množství kontaminantu, které se dostane za absorpční bariéru, tedy do krve, a tak může integrovat s orgány a tkáněmi a způsobit biologické účinky. Biologicky účinná dávka je množství kontaminantu, které integruje s vnitřní cílovou tkání nebo orgánem (*Exposure Assessment Tools by Routes - Ingestion / US EPA*, n.d.).

2.2 Biopřístupnost

Aby se polutant dostal přes absorpční bariéru, musí být nejdříve biopřístupný (bioaccessibility) (*What Is the Difference Between Bioavailability Bioaccessibility and Bioactivity of Food Components? / SciTech Connect*, n.d.). Pro zjištění biopřístupnosti se využívají in-vitro inkubace vzorků ve fyziologických roztocích. Konkrétně pro zjištění biopřístupnosti v gastrointestinálním traktu se používají chemické podmínky vyskytující se v lidském žaludku a střevě (Turner, 2011). V současné době se používá několik in-vitro gastrointestinálních metod ke stanovení biologické přístupnosti organických znečišťujících látek, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), polychlorované bifenylly (PCB), polybromované difenylethery (PBDE), kyselina perfluoroktanová a jiné. Většinu metod in-vitro jde klasifikovat jako statické metody, které uvažují pouze o uvolňování znečišťujících látek z jejich matrice. Ve skutečném lidském střevě jsou znečišťující látky absorbovány střevním epitelem současně s uvolňováním znečišťujících látek z matric. Proto více a více studií zkoumá dynamické in-vitro metody začleňující absorbenty, jako je např. Tenax, C18 membrána a ethylenvinylacetátová membrána. Mezi běžné statické gastrointestinální in-vitro metody řadíme i fyziologicky založený extrakční test (PBET), který jsem při své práci využíval (Lu et al., 2021).

2.3 PBET

Fyziologicky založený extrakční test (PBET) je významným nástrojem při hodnocení možného rizika na zdraví lidí vlivem kovů a perzistentních organických polutantů (POPs). Napodobuje procesy trávení různých matric, ze kterých následně hodnotí biologickou přístupnost POPs a kovů. Podmínky testovacího systému jsou nastavené tak, aby simulovaly reakce v žaludku a střevech (Papiernikova, 2022). Metoda PBET bylo poprvé použita Ruby (1996) pro měření

biologické přístupnosti olova (Pb) a arsenu (As) ve vzorcích půdy a následně byl test využit i pro stanovení POPs (dioxinů a furanů) (Ruby et al., 2002). Při navrhování extrakčního postupu je možné identifikovat tři hlavní části lidského trávicího systému: ústa, žaludek a tenké střevo. Skutečnost, že potraviny zůstávají v úseku úst relativně krátkou dobu znamená, že se tato část zanedbává v simulovaných metodách extrakce gastrointestinálního traktu (GIT). V praxi se kvůli uvedenému důvodu napodobuje fyziologie GIT pouze simulací žaludku a tenkého střeva. V celém PBET testu se udržují nutné optimální tepelné podmínky reakce (tj. 37 °C). V modelu žaludku je materiál podroben trávicím šťávám skládající z enzymů a kyseliny chlorovodíkové, kde pH by mělo být upravené na hodnotu 1,1-4,0. Délka zdržení materiálu v umělých žaludečních šťávách bývá 8 minut až 3 hodiny v závislosti na použitém testu. Napodobení tenkého střeva se uskutečňuje přidáním reagentů skládajících se z jednotlivých enzymů trypsinu, pankreatinu, amylázy a žlučových solí. Přidání žlučových solí napomáhá k rozpuštění tuků a k absorpci v tenkém střevě. Střevní šťávy se udržují na pH v rozmezí 5,0-8,0, přičemž střevní inkubace trvá 1-5 hodin (Papiernikova, 2022).

2.3.1 Vliv vnějších podmínek na testy

Biopřístupnost je podíl chemických látek uvolněných do trávicích šťáv k celkovému množství chemických látek nacházejících se v původní matrici. Každý faktor, který může ovlivnit uvolnění a rozpuštění zkoumané látky (polutantu) zákonitě ovlivňuje i výslednou biopřístupnost. Faktory jsou klasifikované na in-vitro podmínky trávení, charakteristika zkoumaného polutantu a charakteristika matrice (Papiernikova, 2022). V případě ovlivnění podmínek trávení jsou důležité složky sněžené potraviny. Bylo zjištěno, že přítomnost lipidů v průběhu PBET zvyšuje biopřístupnost některých organických polutantů (konkrétně PCB, organochlorovaných pesticidů (OCP) a některých PAH) (Papiernikova, 2022). Dále bylo zjištěno, že lyofilizované mléko zvýšilo podíl biopřístupnosti PAH a PCB až o 95 % (Hack & Selenka, 1996). Naopak skoro ve všech vzorcích, kde byla bílkovina nutričním komponentem, byla výsledná biopřístupnost analytů nižší (Papiernikova, 2022).

2.4 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou velká skupina organických sloučenin se dvěma nebo více kondenzovanými benzenovými jádry, která jsou v různých strukturních konfiguracích. PAH obsahující až 4 kruhy nazýváme lehké a ty, které mají více než 4 kruhy, nazýváme těžké. Těžké PAH jsou mnohem více stabilnější a toxičtější než lehké (Lawal, 2017). Vznikají především při nedokonalém spalování organických materiálů jako je např. ropa, dřevo, benzín a uhlí. Většina emisí polycyklických aromatických uhlovodíků je antropogenního původu, avšak některé PAH pochází z přírodních zdrojů např. vulkanickou činností či lesním požárem. Mezi hlavní antropogenní zdroje patří výroba asfaltu, hliníku, ale i výfukové plyny z motorových vozidel. PAH jsou vysoko rozpustné v lipidech (lipofilní), a proto jsou těžce rozpustné ve vodných prostředích (např. žaludeční a intestinální šťávy) a tak se dá uvažovat o jejich malé biopřístupnosti. Mnohé PAH jsou toxické, mutagenní a s karcinogenními vlastnostmi, kvůli tomu byl upozorován zvýšený vztah s výskytem rakoviny plic, kůže,

močového měchýře a gastrointestinálního traktu (Abdel-Shafy & Mansour, 2016) a to zejména u lidí, kteří kouří cigarety, jelikož spalování cigaret produkuje PAH (*Polycyklické Aromatické Uhlovodíky (PAU) – Společnost pro Výživu, n.d.*).

2.5 Prach

Prach je všeobecné označení pevných mikročastic, které mají průměr menší než 500 mikrometrů a jsou lehce odnášeny větrem. Prachové částice tzv. particulate matter (PM) v atmosféře pochází z různých zdrojů. Jejich velikost a chemické složení značně závisí od samotné povahy zdroje, jako je např. automobilová a nákladní doprava, půda z polí atd. Pro potřeby měření se celosvětově ustanovily tři hlavní kategorie PM částic podle jejich velikosti. PM₁₀ jsou hrubé částice prachu o aerodynamickém průměru menším nebo rovném 10 mikrometrů (někdy se udává 2,5 až 10 μm). PM_{2,5} jsou jemné částice prachu o aerodynamickém průměru menším nebo rovném 2,5 mikrometrů (někdy se udává 1,0 až 2,5 μm). PM₁ jsou velmi jemné částice prachu o aerodynamickém průměru menším nebo rovném 1 mikrometr (někdy se udává 0,3 až 1,0 μm). Toto rozdělení bylo zvoleno s ohledem vlivu působení na lidský organismus (zdraví) a všeobecně jsou nejvíce měřené a známé první dvě. Zatímco částice velikosti do 10 μm jsou zachyceny v horních cestách dýchacích, ty menší již pronikají i do dolních dýchacích cest. Tedy částice PM₁₀ jsou méně škodlivé než částice PM_{2,5}, kterým naše dýchací ústrojí nestaví do cesty žádné zábrany. Vůbec nejnebezpečnější jsou pak částice výrazně menší než 2,5 μm (někdy označované jako PM₁, tedy menší než 1 μm), protože se mohou snadno dostávat až do plicních sklípků. V případě nanočástic (menší než 0,5 μm = PM_{0,5}) pak již můžeme hovořit o pronikání až do krevního řečiště a přímém ovlivnění jednotlivých orgánů. V případě částic PM₁₀ při krátkodobé expozici dochází k podráždění dýchacích cest a častějším infekcím, při dlouhodobé pak k rozvoji vážných onemocnění dýchacích cest (*Kvalita Vzduchu v Uzavřených Místnostech - 5. Co Jsou PM Částice? | Automatizace.HW.Cz, n.d.*).

2.5.1 Usazený vnitřní prach

V průměru trávíme více než 90 % našeho času ve vnitřním prostředí, tedy v domovech, na pracovišti, ve škole, nebo na veřejných prostranstvích (obchody, restaurace atd.). Prach je všudypřítomný v celém interiéru a obsahuje komplexní směs polotěkavých a netěkavých chemikálií odrážejících složení okolního prostředí (např. stavebního materiálu nebo vybavení místnosti). Vnitřní prach se skládá z usazených částic (PM) a najdeme ho na podlahách, koberecích a na povrchu dalších předmětů. Je to heterogenní směs částic včetně vláken (umělých a přírodních), půdy, vlasů, biologického materiálu (plísňe, pyl, bakterie, zvířecí srst a srst), popele, částí kůže a stavebních a spotřebních komponentů. Částice usazeného domácího prachu jsou v řádu mikrometrů až milimetrů, přičemž velikost částic je 30 až 300 mikrometrů. Částice menší než 10 mikrometrů mají tendenci zůstat ve vzduchu spíše než se usazovat. Pokud se usadí, vytváří povrchový prach a tvoří méně než 10 % celkové hmotnosti vnitřního prachu. Domácí prach se obvykle skládá z 35 % materiálů z venkovní půdy, která je donesena např. na botách a na oblečení. Příspěvek outdoorového prachu z půdy k vnitřnímu prachu se může značně lišit (např. 30 až 70 %) v závislosti na přítomnosti domácích mazlíčků a zda jsou boty

nošené uvnitř. Taktéž je rozdíl, jestli se boty nosí uvnitř i venku např. auto nebo právě naopak např. ve školce, kde se děti přezouvají. Samotný prach však není primární obavou s ohledem na expozici člověka, spíše je to široká škála chemikálií nacházející se na prachových částicích. Vnitřní prach obsahuje složitou směs stovek chemikálií v různých koncentracích na základě zdroje prachu. V rozsáhlém literárním přehledu bylo detekováno v prachu 355 různých chemických látek, z nichž pouze čtyři byly biologického původu, například mastné kyseliny. Chemikálie, které se zde mohou vyskytovat jsou např. bisfenoly, alkylfenoly, ftalátové estery aj. (Melymuk et al., 2020).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem experimentální části bylo zjistit, jaký vliv mají nealkoholické nápoje jako je např. mléko, káva, ovocný čaj aj. na biopřístupnost organických polutantů (konkrétně PAH), které se mohou nacházet ve sledovaném prachu. Celkově se vytvořilo 9 vzorků, které jsou uvedené v Tabulce 1. Pro zjištění biopřístupnosti byl využit fyzikálně založený extrakční test PBET.

Tabulka 1: Přehled zpracovávaných vzorků s přehledem použitých nealkoholických nápojů a s množstvím naváženého prachu.

Číslo vzorku	Popis složení vzorku	Navážka prachu (mg)
1	Slepý vzorek (blank)	-
2	Pouze prach	399,2
3	Prach + coca cola	398,6
4	Prach + aloe vera	398,7
5	Prach+ sirup (pampeliškový)	397,5
6	Prach + mléko (plnotučné)	402,4
7	Prach + ovocný čaj	397,6
8	Prach + káva	403,5

3.1 Příprava:

V celém PBET testu byly využívány následující chemikálie. Při práci se žaludeční tekutinou (gastric fluid) byl použit pepsin, který je trávicí enzym vznikající v žaludku, rozkládá bílkoviny na albumózy a peptony, je aktivní v silně kyselém prostředí (z toho důvodu máme v žaludku kyselinu chlorovodíkovou HCl) (*Pepsin – Wikipedie*, n.d.). Kyselina citronová (citric acid) je slabá trikarboxylová kyselina, používá se jako dochucovací prostředek jídel, nealkoholických a alkoholických nápojů. V biochemii je důležitým meziproduktem v citrátovém cyklu (*Kyselina Citronová – Wikipedie*, n.d.). Malát sodný (sodium malate) je sodná sůl kyseliny jablečné (*Sodium Malate - Wikipedia*, n.d.). Kyselina octová (acetic acid) systematicky nazývaná kyselina ethanová. Kyselina octová je druhá nejjednodušší karboxylová kyselina (po kyselině mravenčí). Je to důležité chemické činidlo a průmyslová chemikálie v různých oblastech, která se používá především při výrobě acetátu celulózy pro fotografické filmy, polyvinylacetátu pro lepidlo na dřevo a syntetických vláken a tkanin (*Acetic Acid - Wikipedia*, n.d.). Kyselina mléčná (lactic acid) je chemická látka, kterou tělo produkuje, když buňky

rozkládají sacharidy na energii (*What Is Lactic Acid?*, n.d.). Poslední chemikálií zde je koncentrovaná HCl.

Při práci s tekutinou tenkého střeva (small intestinal fluid) se využíval pankreatin, což je komerční směs amylázy, lipázy, proteázy a laktázy (*Pancreatic Enzymes (Medication)* - *Wikipedia*, n.d.). Žlučové soli (bile salts) jsou vyrobeny ze žlučových kyselin, které jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem. Jsou produkovány v játrech přímo z cholesterolu. Žlučové soli jsou důležité při solubilizaci dietních tuků ve vodním prostředí tenkého střeva (Dawson et al., 2006). Nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného neboli jedlé sody, což je bílý prášek rozpustný ve vodě za vzniku roztoku se zásaditým pH (*Hydrogenuhličitan Sodný* – *Wikipedie*, n.d.).

3.2 Postup:

Pro zjištění biopřístupnosti PAH byla využita metoda PBET. Následně byly analyty převedeny z vodného prostředí (gastriká a intestinální šťáva) do organické fáze (dichlormethan, DCM). Vzorky byly vyčištěny na silikagelové koloně a analyty byly měřeny pomocí GC-MS.

3.2.1 Příprava roztoku žaludeční tekutiny

Na jeden vzorek bylo zapotřebí 40 ml umělé žaludeční šťávy. Bylo připraveno 0,5 l umělé žaludeční šťávy, která obsahovala reagenty uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2: Reagenty naměřené pro přípravu roztoku žaludeční tekutiny.

Název vzorku	Množství chemikálie
Milli-Q voda (MQ)	500 ml
pepsin	0,625 g
kyselina citrónová	0,25 g
malát sodný	0,25 g
kyselina octová	0,25 ml
kyselina mléčná	0,21 ml

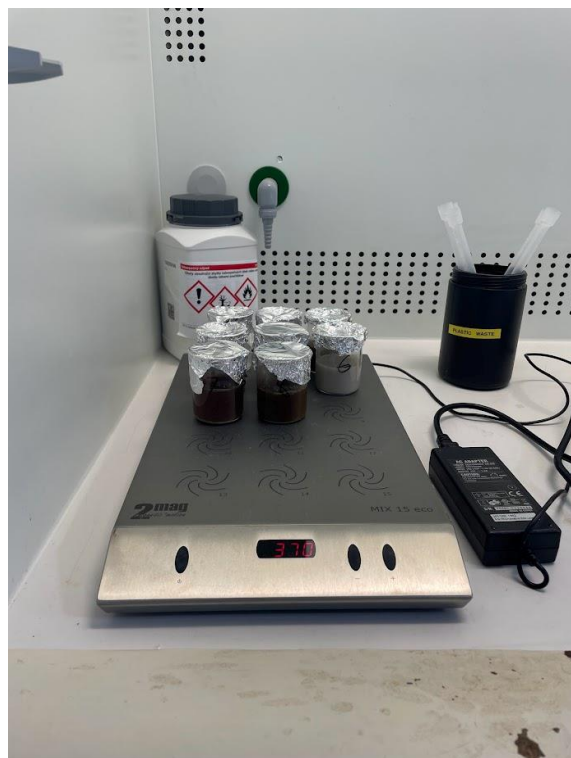
Činidla byla smíchána v kádince na magnetickém míchadle. Pro dosažení pH 2,5 byla přidána koncentrovaná HCl. Žaludeční šťáva byla vytemperovaná na 37 °C.

3.2.2 Příprava extraktu žaludeční fáze.

- i. Vzorke obsahovaly navážku prachu o přibližné hmotnosti 0,4 g (Tabulka 1), nealkoholické nápoje (Obrázek 1) a dále bylo přidáno 40 ml připravených žaludečních šťáv, které byly následně umístěny na magnetickou míchačku s ohřevem na 15 min za teploty 37 °C (Obrázek 2). Míchání mělo simulovat přirozený pohyb žaludku po naplnění potravou. Po uvedené době bylo ve vzorkách upravené pH na 2,0 – 2,5 přidáním HCl. Vzorke byly následně umístěny zpět na magnetickou míchačku. Po 30 minutách bylo jejich pH opět upraveno kyselinou chlorovodíkovou. Následně bylo posledních 15 min inkubace, po kterých nebylo už pH upravováno. Celkový čas inkubace byl 60 minut, který reprezentoval čas zdržení potraviny v žaludku.



Obrázek 1: Připravené nealkoholické nápoje, zleva coca-cola, aloe vera, sirup, mléko, ovocný čaj, káva.



Obrázek 2: Promíchávání vzorků na magnetické míchačce.

- ii. Ve kádinkách se nacházela směs o objemu 40 ml. Z tohoto objemu bylo odpipetováno 8 ml, které představovaly výslednou žaludeční fázi. Následně byly vialky s výslednou žaludeční fází o objemu 8 ml dány do centrifugy na 10 min při otáčkách 3000 rpm (rpm jsou otáčky za minutu). Po centrifuzi zůstal jakýkoliv prach a případné nutriční sedimentované komponenty na dně. Nad vrstvou sedimentu se nacházel roztok s pravděpodobnými rozpuštěnými analyty. Tento extrakt byl převeden do jiné vialky (Obrázek 3).

3.2.3 Příprava extraktu fáze tenkého střeva.

- a) Při trávicím procesu nastává v tenkém střevě změny pH a zároveň jsou do tenkého střeva vylučovány různé enzymy a látky, jako je např. pankreatin a žlučové soli. Proto bylo ve vzorcích se zbylou gastrickou fází (32 ml) upraveno pH na 7 pomocí nasyceného roztoku jedné sody. Dále bylo do každého z 8 vzorků dodáno 20 mg pankreatinu a 70 mg žaludečních solí.
- b) Po upravení pH byly vzorky umístěny na magnetickou míchačku, kde za teploty 37 °C byly míchány po dobu 4 hodin. Délka 4 hodiny představuje zdržení trávení v tenkém střevě. Míchání představovalo peristaltiku tenkého střeva. Následně byly vzorky centrifugované 10 minut při otáčkách 3000 rpm. Opět se nám nad vrstvou sedimentu vytvořil výsledný roztok, který jsme odpipetovali do jiné vialky (Obrázek 3).



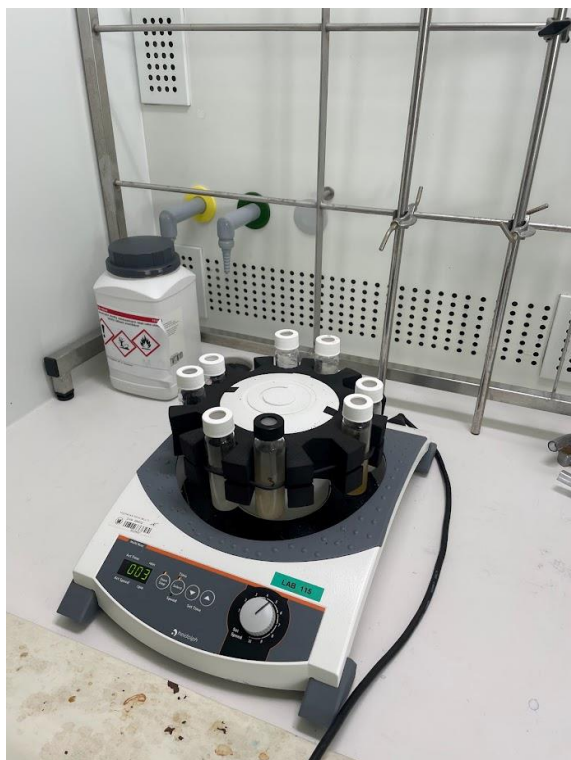
Obrázek 3: Oddělování výsledného roztoku od sedimentu.

3.2.4 Převedení analytů z vodní fáze do organické fáze (Solvent exchange)

Chemikálie, které byly využity při solvent exchange, jsou chlorid sodný (NaCl), kyselina octová (acetic acid), dichlormethan (DCM) a síran sodný (Na₂SO₄).

1) Postup solvent exchange u žaludeční fáze:

Do vialek s 8 ml s výslednou žaludeční fází bylo přidáno 0,3 g chloridu sodného, 0,03 ml kyseliny octové a nakonec 5 ml dichlormethanu. Tyto připravené směsi byly dány do třepačky po dobu 3 minut (Obrázek 4). Po ustálení rovnováhy mezi organickou a kapalnou fází šlo na dně vialky pozorovat pozůstalý DCM. Výsledná organická fáze byla odpipetována do jiné nádoby (Obrázek 5). Ke zvýšení extrakční síly bylo opět přidáno 5 ml DCM a znovu 3 minuty protřepáváno. Následně byla opět odpipetována organická fáze. Tento krok se ještě jednou zopakoval. Pozůstatek gastrické fáze byl odstraněn a pro další účely se nevyžíval. Organický extrakt byl vysušen pomocí síranu sodného. K organické fázi byly přidány standardy a uložily se do lednice až do dalšího zpracování.



Obrázek 4: Směsi promíchávány v třepačce.



Obrázek 5: Odpipetování DCM.

2) Postup solvent exchange u fáze tenkého střeva:

Postup byl zcela totožný, jako u žaludeční fáze s jediným rozdílem, že se přidávalo 1 g NaCl, 0,1 ml kyseliny octové a 10 ml DCM.

3.2.5 Vyčištění (clean-up)

V poměru 3:7 byly vytvořeny dvě frakce:

- a) 30 %, která byla čištěna na nedestruktivní koloně s cílem analyzovat polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)

Do spodní části skleněné kolony byla přidána vata, na kterou bylo dodáno 5 g aktivovaného silikagelu a následně 1 cm síranu sodného. Do této připravené kolony byl kvantitativně převeden vzorek a bylo nanášeno 10 ml hexanu a potom 20 ml DCM (Obrázek 6). Výsledkem byl čirý eluát, ke kterému bylo dodáno 50 mikrolitrů nonanu. Extrakty byly zakonzentrovány pod slabým proudem dusíku a při teplotě 32 °C.



Obrázek 6: Kolony s postupným převedením vzorků.

- b) 70 %, která byla čištěna na destruktivní koloně s cílem analýzy polychlorovaných bifenyly (PCB)

Do spodní části kolony byla dána vata, na kterou byl přidán 1 cm aktivovaného silikagelu, následně 5 g silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou (připraveno z 50 g aktivovaného silikagelu a 22 ml koncentrované kyseliny

sírové). Nakonec byl přidán 1 cm neaktivovaného silikagelu. Do takto připravené kolony byl kvantitativně převeden vzorek (Obrázek 7). Jako eluční činidlo bylo použito 30 ml hexanu a DCM v poměru 1:1. Výsledkem byl čirý eluát, ke kterému bylo přidáno 50 mikrolitrů nonanu. Extrakty byly zakonzentrovány pod slabým proudem dusíku a při teplotě 32 °C.



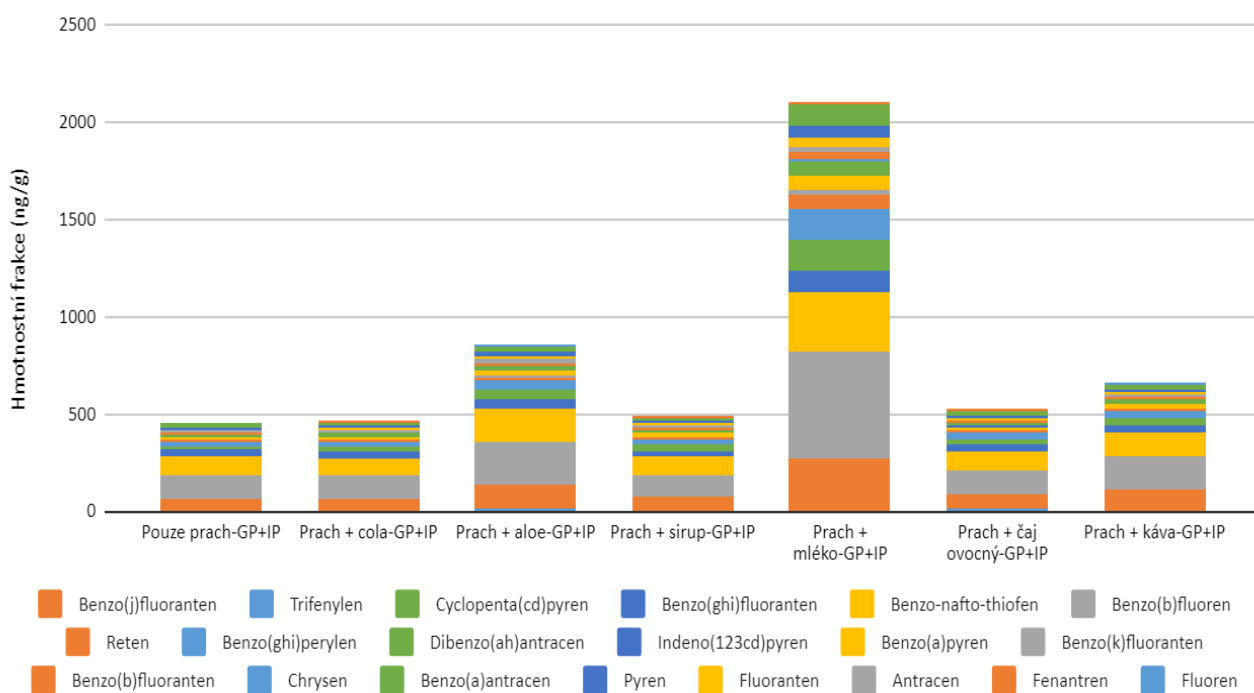
Obrázek 7: Přidávání vzorku na kolonu Pasterovými pipetami.

3.2.6 Analýza

Vybrané PAH byly analyzovány pomocí GC Agilent 8890A, vybavené kapilárou Rxi-5Sil-MS o rozměrech 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm, spojenou s trojitým kvadrupólem Agilent 7000D MS. Teplotní program pro GC pec začínal při 80 °C (2 minuty udržování), poté pokračoval rychlostí 15 °C/min na 180 °C (bez udržování) a nakonec 5 °C/min na 310 °C (20minutové udržování). Vstupní teplota byla 280 °C. Injekční objem byl 1 μl v bez pulzního rozdělení. Nosným plynem bylo helium s průtokem 1,5 ml/min. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu monitorování vybraných iontů (SIM).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Díky výslednému grafu (Graf 1) můžeme říci, že biopřístupnost PAH ve vzorcích s nápoji coca – coly, pampeliškového sirupu a ovocného čaje mají podobnou hmotnostní frakci jako prach (okolo 500 ng/g). Káva s limonádou aloe vera vykazují vyšší biopřístupnost oproti předchozím vzorkům (pohybují se okolo 700–800 ng/g). Nejvyšší biopřístupnost byla pozorována u vzorku s plnotučným mlékem, kdy hmotnostní frakce PAH byla čtyřikrát větší než samotná hmotnostní frakce PAH v samotném prachu (okolo 2000 ng/g). Mléko jako jediný nápoj obsahoval tuk, což mohlo vést ke zvýšení biopřístupnosti sledovaných lipofilních PAH.



Graf 1: Závěrečný graf s výslednými hodnotami, kde jde vidět rozdílnost plnotučného mléka a zbylých vzorků.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo zaměřit se na změnu biopřístupnosti organických polutantů z prachu v průběhu trávení za přítomnosti nealkoholických nápojů (mléko, káva, pampeliškový sirup, aloe vera, coca-cola, ovocný čaj). Celá práce je vytvořena jako teoretická a praktická část.

Teoretickou část tvoří rešerše o mechanismem gastrointestinální soustavy a hlavní principy realizovaných testů v jednotlivých studiích, zaměřujících se na biopřístupnost organických polutantů z prachu v simulovaném gastrointestinálním traktu člověka. Jsou zde shrnuty toxikologické a chemické vlastnosti zkoumaných organických polutantů.

V praktické části je popis zrealizovaného fyziologicky založeného extrakčního testu (PBET) a analýzy vzorků. Vzorky byly zpracovávány v laboratoři a měřeny na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem. V rámci porovnání biopřístupnosti jednotlivých analytů byly taktéž posuzovány vlivy nealkoholických nápojů na výslednou biopřístupnost. Celkově bylo měřeno 8 vzorků s tím, že největší a nejvíce rozdílnou hmotnostní frakci měl vzorek s plnotučným mlékem.

Polycyklické aromatické uhlovodíky byly detekovány ve směsi prachu. Prach se nachází s případnými organickými polutanty všude okolo nás a dochází k jeho nezáměrné konzumaci. Prach spolu s případnými potravinami nebo nápoji přechází do gastrointestinálního traktu člověka, kde dochází k potenciální absorpci výstelkou tenkého střeva. Je důležité se těmito látkám do budoucna věnovat z důvodu ochrany lidského zdraví.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2015.03.011>
- Acetic acid* - *Wikipedia*. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from https://en.wikipedia.org/wiki/Acetic_acid
- Dawson, P. A., Shneider, B. L., & Hofmann, A. F. (2006). Bile Formation and the Enterohepatic Circulation. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2, 1437–1462. <https://doi.org/10.1016/B978-012088394-3/50059-3>
- Exposure Assessment Tools by Routes - Ingestion | US EPA*. (n.d.). Retrieved February 7, 2024, from <https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-routes-ingestion>
- Exposure Pathways and Routes*. (n.d.). Retrieved February 7, 2024, from <https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/PH717-QuantCore/PH717-Module2-ExposureAssessment/PH717-Module2-ExposureAssessment5.html>
- Hack, A., & Selenka, F. (1996). Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology Letters*, 88(1–3), 199–210. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(96\)03738-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(96)03738-1)
- Hydrogenuhlíčan sodný* – *Wikipedie*. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from https://cs.wikipedia.org/wiki/Hydrogenuhlí%20Ditan_sodn%C3%BD
- Kvalita vzduchu v uzavřených místnostech - 5. Co jsou PM částice? | Automatizace.HW.cz*. (n.d.). Retrieved February 7, 2024, from <https://automatizace.hw.cz/kvalita-vzduchu-v-uzavrenych-mistnostech-5-co-jsou-pm-castice.html>
- Kyselina citronová* – *Wikipedie*. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_citronov%C3%A1
- Lawal, A. T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. In *Cogent Environmental Science* (Vol. 3, Issue 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>
- Lu, M., Li, G., Yang, Y., & Yu, Y. (2021). A review on in-vitro oral bioaccessibility of organic pollutants and its application in human exposure assessment. In *Science of the Total Environment* (Vol. 752). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142001>

- Melymuk, L., Demirtepe, H., & Jílková, S. R. (2020). Indoor dust and associated chemical exposures. In *Current Opinion in Environmental Science and Health* (Vol. 15, pp. 1–6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.005>
- Pancreatic enzymes (medication)* - Wikipedia. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from [https://en.wikipedia.org/wiki/Pancreatic_enzymes_\(medication\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Pancreatic_enzymes_(medication))
- Papiernikova, E. (2022). *Biodostupnost organických polutantů z prachu v trávicím traktu*. MUNI.
- Pepsin* – Wikipedie. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Pepsin>
- Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) – Společnost pro výživu*. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from <https://www.vyzivapol.cz/polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky-pau/>
- Ruby, M. V., Fehling, K. A., Paustenbach, D. J., Landenberger, B. D., & Holsapple, M. P. (2002). Oral Bioaccessibility of Dioxins/Furans at Low Concentrations (50–350 ppt Toxicity Equivalent) in Soil. *Environmental Science and Technology*, 36(22), 4905–4911. <https://doi.org/10.1021/ES020636L>
- Sodium malate* - Wikipedia. (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_malate
- What Is Lactic Acid?* (n.d.). Retrieved February 16, 2024, from <https://my.clevelandclinic.org/health/body/24521-lactic-acid>
- What is the Difference Between Bioavailability Bioaccessibility and Bioactivity of Food Components?* | SciTech Connect. (n.d.). Retrieved February 7, 2024, from <https://scitechconnect.elsevier.com/bioavailability-bioaccessibility-bioactivity-food-components/>

