

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vliv druhu mouky na obsah akrylamidu v pekařských produktech

Bc. Lucie Dibelková

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Dibelková**  
Osobní číslo: **C19476**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Vliv druhu mouky na obsah akrylamidu v pekařských produktech**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma vznik akrylamidu v potravinách a možnosti jeho stanovení separačními metodami. Zaměřte se na metody plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí a také na způsob přípravy vzorku.
2. V experimentální části vyvíňte a optimalizujte chromatografickou metodu na stanovení akrylamidu v pekařských výrobcích. Dále optimalizujte přípravu vzorku na stanovení akrylamidu a celou metodu validujte.
3. Metodu využijte na zjištění, zda je obsah akrylamidu v pekařských produktech ovlivněn různým zastoupením druhů mouk (pšeničná, pšeničná celozrná, žitná, špaldová, ovesná...).
4. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Vliv druhu mouky na obsah akrylamidu v pekařských produktech jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2021

Bc. Lucie Dibelková

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tomáši Hájkovi Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky při psaní této diplomové práce.

## **ANOTACE**

V teoretické části této diplomové práce je popsán vznik a výskyt akrylamidu v potravinách a možnosti jeho eliminace. Dále je zde uveden stručný popis metabolismu akrylamidu v lidském těle a jeho vlivu na lidské zdraví. Poslední kapitola je věnována možnostem stanovení akrylamidu v potravinách se zaměřením na plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí.

V experimentální části se práce zaměřuje na stanovení akrylamidu v pečivu ve formě xanthyl-derivátů pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí. Xanthyl-deriváty akrylamidu a vnitřního standardu byly ze vzorku extrahovány pomocí kapalinové disperzní mikroextrakce. Byla provedena optimalizace a validace způsobu přípravy vzorku, separace i detekce. Optimalizovaná metoda stanovení byla použita na analýza vzorků pečiva z hladké pšeničné, špaldové a kokosové mouky.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Akrylamid, kapalinová disperzní mikroextrakce, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **ANNOTATION**

The theoretical part of this thesis describes formation, occurrence and mitigation of acrylamide in food. There is also a short description of acrylamide metabolism in the human body and its effect on human health. Moreover, methods for determination of acrylamide in food listed and explained with a focus on gas chromatography with mass spectrometry.

The experimental part of the thesis focuses on the determination of acrylamide in bakery products in the form of xanthyl derivatives using gas chromatography combined with mass spectrometry. Xanthyl derivatives of acrylamide and internal standards were extracted from the sample by dispersive liquid–liquid microextraction. The optimization and validation of the method of sample preparation, separation and detection was performed. Furthermore, the optimized method was used for determination of acrylamide in bakery product samples made from wheat, spelt and coconut flour.

## **KEY WORDS**

Acrylamide, dispersive liquid–liquid microextraction, gas chromatography, mass spectrometry

# OBSAH

Úvod.....	13
1 Teoretická část.....	14
1.1 Charakteristika akrylamidu .....	14
1.2 Vznik akrylamidu v potravinách.....	15
1.2.1 Maillardovy reakce .....	15
1.2.1.1 Mechanismus vzniku akrylamidu .....	17
1.2.2 Ostatní způsoby vzniku AA.....	19
1.3 Výskyt akrylamidu v potravinách .....	21
1.3.1 Výrobky z brambor .....	21
1.3.2 Pečivo.....	22
1.3.3 Káva a kávoviny .....	23
1.4 Eliminace tvorby AA .....	23
1.4.1 Asparaginasa .....	24
1.4.2 Chitosan .....	24
1.4.3 Polyfenoly .....	25
1.4.4 Probiotika.....	26
1.4.5 Vakuum.....	26
1.4.6 Pulzní elektrické pole.....	26
1.5 Vliv akrylamidu na lidské zdraví .....	27
1.5.1 Metabolismus akrylamidu.....	27
1.5.2 Legislativa.....	27
1.6 Stanovení akrylamidu.....	29
1.6.1 Příprava vzorku k analýze.....	29
1.6.1.1 Extrakce.....	29
1.6.1.2 Odtučnění a deproteinace .....	30
1.6.2 Derivatizace akrylamidu .....	31

1.6.2.1	Bromace .....	31
1.6.2.2	2-naftalenthiol .....	32
1.6.2.3	Xanthidrol.....	32
1.6.2.4	Silylace.....	33
1.6.2.5	Acylace.....	33
1.6.3	Analýza akrylamidu.....	34
1.6.3.1	Plynová chromatografie .....	34
1.6.3.2	Kapalinová chromatografie.....	39
2	Experimentální část .....	41
2.1	Přístroje a zařízení.....	41
2.2	Chemikálie .....	41
2.3	Pracovní postupy.....	42
2.3.1	Příprava muffinů .....	42
2.3.2	Příprava standardních roztoků .....	42
2.3.3	Příprava reakčních roztoků.....	43
2.3.4	Příprava roztoků pro optimalizaci DLLME extrakce .....	43
2.3.5	Příprava kalibračních roztoků.....	44
2.3.6	Příprava vzorků.....	45
2.3.7	Derivatizace pomocí xanthidrolu.....	45
2.3.8	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny .....	46
2.3.9	Podmínky GC-MS .....	46
2.3.10	Experimentální zpracování dat .....	47
3	Výsledky a diskuze.....	48
3.1	Optimalizace GC-MS metody.....	48
3.1.1	Optimalizace GC.....	49
3.1.2	Optimalizace MS .....	50
3.2	Optimalizace přípravy vzorku.....	52
3.3	Optimalizace extrakce.....	53



3.3.1	Kalibrační závislost.....	55
3.3.2	Validace metody .....	56
3.3.2.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	56
3.3.2.2	Přesnost a správnost metody .....	57
3.4	Analýza akrylamidu ve vzorcích pečiva .....	58
4	Závěr.....	60
5	Seznam použité literatury .....	61
6	Přílohy .....	71

## Seznam zkratek

2-BPA .....	2-brompropanamid
2,3-DBPA .....	2,3-dibrompropanamid
AA.....	Akrylamid
ACA.....	Acetamid
APCI .....	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
DLLME.....	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
ECD .....	Detektor elektronového záchytu
EU .....	Evropská unie
GC.....	Plynová chromatografie
GF .....	Faktor zisku elektronového násobiče
GSH .....	Glutathion
HPLC .....	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MAA .....	Methakrylamid
MS.....	Hmotnostní detektor
MSTFA .....	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
PEF.....	Pulzní elektrické pole
PR.....	Pracovní roztok
RCF.....	Relativní odstředivá síla
SIM .....	Monitoring vybraných iontů (Selected ion monitoring)
SNFA .....	Švédský Národní úřad pro potraviny (Swedish National Food Administration)
SPE.....	Extrakce tuhou fází
TFAA.....	Anhydrid kyseliny trifluoroctové
TIC.....	Celkový iontový chromatogram (Total ion chromatogram)
TMCS.....	Trimethylchlorsilan
UV.....	Ultrafialové záření
ZR .....	Zásobní roztok

## Seznam ilustrací, grafů a tabulek

Seznam ilustrací:

Obrázek 1: Akrylamid [1].....	14
Obrázek 2: Výroba akrylamidu [3].....	14
Obrázek 3: 1. fáze Maillardových reakcí [10] .....	15
Obrázek 4: 2. fáze Maillardových reakcí [10] .....	16
Obrázek 5: 3. fáze Maillardových reakcí [10] .....	17
Obrázek 6: Vznik akrylamidu Maillardovými reakcemi [11] .....	18
Obrázek 7: Závislost koncentrace akrylamidu na době ohřevu [13] .....	19
Obrázek 8: Vznik akrylamidu mimo Maillardovy reakce [15].....	19
Obrázek 9: Vznik akrylamidu z kyseliny akrylové [16].....	20
Obrázek 10: Vznik akrylamidu z akroleinu [17] .....	20
Obrázek 11: Vznik akrylamidu ze serinu a cysteinu [18].....	21
Obrázek 12: Deacetylace chitinu na chitosan [30] .....	25
Obrázek 13: Metabolismus akrylamidu [41] .....	27
Obrázek 14: Reakce derivatizace bromací [50].....	31
Obrázek 15: Reakce derivatizace pomocí 2-naftalentiolu [49].....	32
Obrázek 16: Reakce derivatizace pomocí xanthidrolu [63].....	33
Obrázek 17: Schéma plynového chromatografu [56] .....	35
Obrázek 18: Schéma hmotnostního spektrometru [70] .....	35
Obrázek 19: Schéma kapalinového chromatografu [90] .....	39
Obrázek 20: Struktura acetamidu (A) [93] a methakrylamidu (B) [94] .....	48
Obrázek 21: SIM chromatogram nederivatizovaných standardů (AA+ACA+MAA), 100 µg/ml.....	49
Obrázek 22: SIM chromatogram vybraných iontů o $m/z$ 196; 239; 251 a 265.....	50
Obrázek 23: TIC chromatogram nederivatizovaných standardů (AA+ACA+MAA), 100 µg/ml .....	50
Obrázek 24: SIM chromatogram xanthyl-derivátů standardů (AA+ACA+MAA), 5 µg/ml, GF 1 .....	51
Obrázek 25: SIM chromatogram xanthyl-derivátů standardů (AA+ACA+MAA), 5 µg/ml, GF 10 .....	52
Obrázek 26: DOE – Paretův graf standardizovaných efektů .....	54
Obrázek 27: DOE – vliv objemů extrakčních rozpouštědel na poměr ploch AA/MAA .....	54

Obrázek 28: Závislost poměru ploch píků na podílu koncentrací (AA/ACA) .....	55
Obrázek 29: Závislost podílu ploch píků na podílu koncentrací (AA/MAA) .....	56
Obrázek 30: SIM chromatogram vzorku z hladké pšeničné mouky – $m/z = 251$ .....	58
Obrázek 31: SIM chromatogram vzorku z hladké pšeničné mouky – $m/z = 239$ a $265$ .....	59

#### Seznam tabulek:

Tabulka 1: Zdroje asparaginy [25] .....	24
Tabulka 2: Porovnávací hodnoty akrylamidu u vybraných potravin [37] .....	28
Tabulka 3: Podmínky pečení muffinů .....	42
Tabulka 4: Koncentrace ZR a PR standardů.....	42
Tabulka 5: Objemy extrakčního a disperzního rozpouštědla pro optimalizaci DLLME.....	44
Tabulka 6: Pipetované objemy standardů pro přípravu kalibrační závislosti.....	45
Tabulka 7: Přehled snímaných iontů pomocí SIM módu .....	46
Tabulka 8: Experimentální podmínky GC.....	46
Tabulka 9: Experimentální podmínky MS.....	46
Tabulka 10: Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti.....	56
Tabulka 11: Výsledné hodnoty správnosti.....	57
Tabulka 12: Výsledné hodnoty přesnosti.....	57

## Úvod

Akrylamid (AA) je sloučenina, která se mimo jiné tvoří během Maillardových reakcí. Maillardovy reakce jsou reakce neenzymatického hnědnutí při tepelné úpravě určitých typů surovin. Dochází ke změně barvy a také se vyvíjí chuť a aroma dané potraviny.

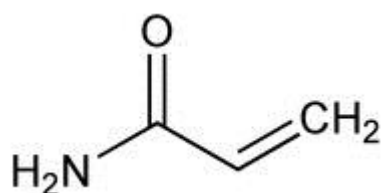
Poprvé byl akrylamid v potravinách sledován SNFA (Swedish National Food Administration) v roce 2002. Vznik probíhá při teplotách nad 120 °C za přítomnosti aminokyseliny asparaginu a redukujících cukrů. Jelikož jsou potraviny složitá matrice, může docházet k tvorbě akrylamidu i mimo Maillardovy reakce. Některé z možných cest vzniku zatím ani nejsou zcela pochopeny. Jsou však vyvíjeny a zkoumány metody pro inhibici tvorby akrylamidu v potravinách různými metodami, od úpravy podmínek přípravy, až po využití různých aditiv.

AA je prokázán jako potenciální karcinogen a přítomnost této látky v potravinách není žádoucí. Vzhledem k tomu, že se AA tvoří při vysokých teplotách, jsou velmi rizikové smažené a pečené potraviny. Patří sem hlavně brambůrky, hranolky, pečivo, ale i káva nebo snídaňové cereálie. Obliba těchto potravin je vysoká, proto je důležité v nich tvorbu akrylamidu sledovat a co nejvíce omezit. Z tohoto důvodu bylo vytvořeno NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/2158, které stanovuje zmírňující opatření a porovnávací hodnoty pro snížení přítomnosti akrylamidu v potravinách. Porovnávací hodnoty jsou ukazatele, které se používají k ověření účinnosti zmírňujících opatření, jsou vyjádřena jako koncentrace v  $\mu\text{g}$  akrylamidu na kg potraviny. Tyto hodnoty jsou stanoveny pro nejvíce rizikové potraviny, u kterých se provádí pravidelné kontroly a porovnávací hodnota v nich nesmí být překročena.

# 1 Teoretická část

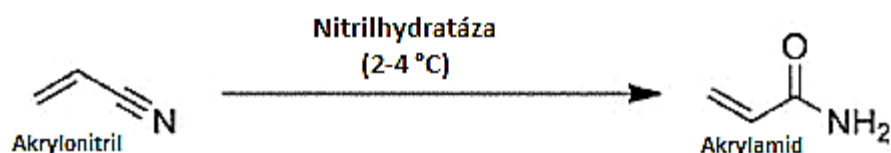
## 1.1 Charakteristika akrylamidu

Akrylamid (AA) je triviální název pro sloučeninu 2-propenamid (viz Obrázek 1). Je to monomerní bílá krystalická látka rozpustná ve vodě, methanolu, ethanolu a acetonu. Molekulová hmotnost akrylamidu je 71,08 g/mol. Bod tání je 84,5 °C. Snadno podléhá polymerizaci při teplotě nad bodem tání nebo pod UV zářením [1,2].



Obrázek 1: Akrylamid [1]

AA se dříve vyráběl chemickými postupy, pro které se využívají silné kyseliny nebo měděné katalyzátory, které je nutné po určitém čase regenerovat, což je nákladné. Navíc vzniká velké množství vedlejších produktů, proto byl vyvinut jiný způsob výroby. Principem je biotechnologický postup přeměny akrylonitrilu na akrylamid (viz Obrázek 2). Používají se imobilizované buňky kmene *Rhodococcus*, které produkují enzym nitrilhydratázu. Výroba probíhá při teplotě pod 10 °C, aby byla potlačena enzymová aktivita amidohydroláz, díky kterým by jinak docházelo ke vzniku kyseliny akrylové [3].



Obrázek 2: Výroba akrylamidu [3]

Hlavní využití akrylamidu je pro výrobu polyakrylamidu. Ten se využívá např. pro čištění odpadní a pitné vody, jelikož působí jako flokulant. Dále nachází využití při výrobě papíru nebo v textilním a kosmetickém průmyslu. Hojně využívaný je polyakrylamidový gel pro elektroforetickou separaci proteinů v biochemických laboratořích [2].

Bylo zjištěno, že u laboratorních hlodavců, kteří akrylamid konzumovali, působí neurotoxicky, vyvolává nádorové bujení, má negativní vliv na prenatální i postnatální vývoj a reprodukční schopnost u samců. U lidí je AA považován za potenciální karcinogen s neurotoxickými účinky [4,5].

## 1.2 Vznik akrylamidu v potravinách

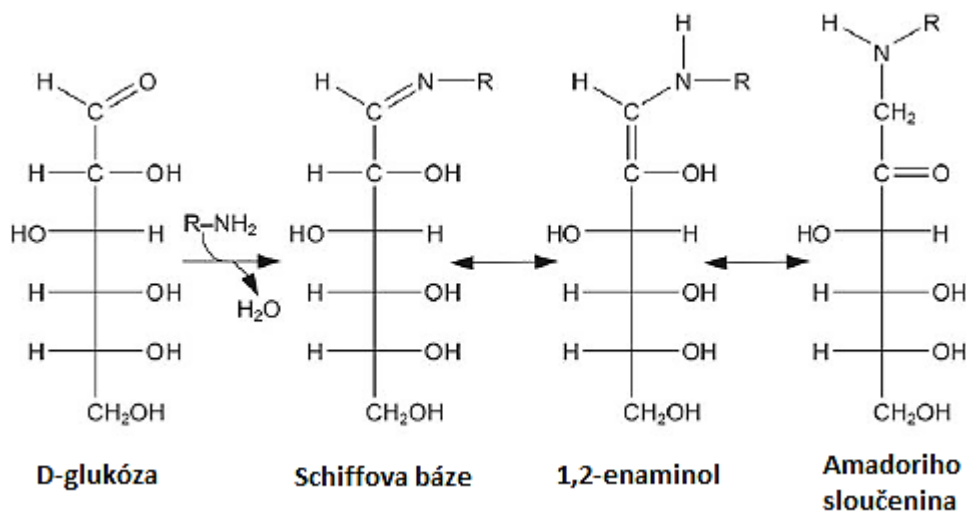
V průběhu zpracování potravin dochází k chemickým reakcím mezi jednotlivými obsaženými složkami. Při tepelné úpravě ( $> 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) určitých typů surovin probíhají tzv. Maillardovy reakce neboli reakce neenzymatického hnědnutí, které jsou mimo jiné i příčinou tvorby akrylamidu. Vznik probíhá v případě, kdy jsou v potravinách obsaženy redukující cukry a aminokyseliny. Avšak jsou i jiné cesty, kterými se může AA v potravině tvořit [6].

### 1.2.1 Maillardovy reakce

Při pečení, smažení, pražení atd. dochází k neenzymatickému hnědnutí známému jako Maillardovy reakce. Kromě změny barvy se vyvíjí i chuť a aroma. Toho se využívá při výrobě potravin jako jsou káva, pečivo nebo brambůrky [7].

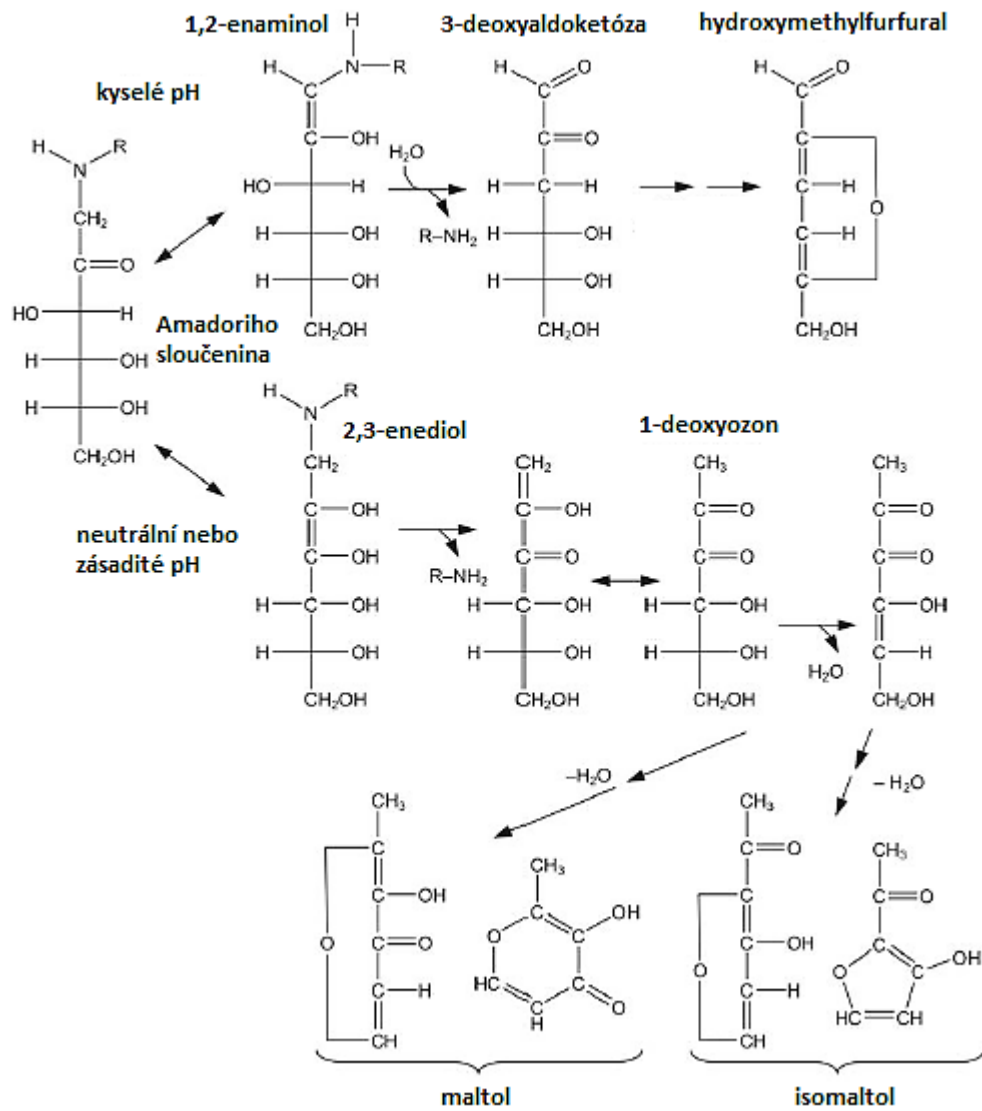
Mechanismus Maillardových reakcí se skládá ze 3 fází:

1. V první fázi, která je zobrazena na Obrázku 3, karbonylové skupiny redukujících cukrů (zde D-glukóza) kondenzují s aminovými skupinami aminokyselin, peptidů nebo bílkovin. Vznikne Schiffova báze, která se následně zacyklí na N-substituovaný glykosylamin. Dojde k samovolnému přechodu na 1,2-enaminol, který dále přechází Amadoriho přesmykem na tzv. Amadoriho sloučeninu, což je 1-amino-1-deoxy-2-ketóza [8,9].



Obrázek 3: 1. fáze Maillardových reakcí [10]

2. V další fázi (Obrázek 4), se reakce dělí dle pH prostředí, nicméně v potravině mohou probíhat obě zároveň. V případě kyselého pH Amadoriho sloučenina přechází na 3-deoxyaldoketózu odštěpením aminoskupiny. Poté ztrátou vody tvoří hydroxymethylfurfural. Pokud je pH neutrální až zásadité dochází k tvorbě  $\alpha$ -dikarbylových sloučenin (např. maltol, isomaltol) [7,10].

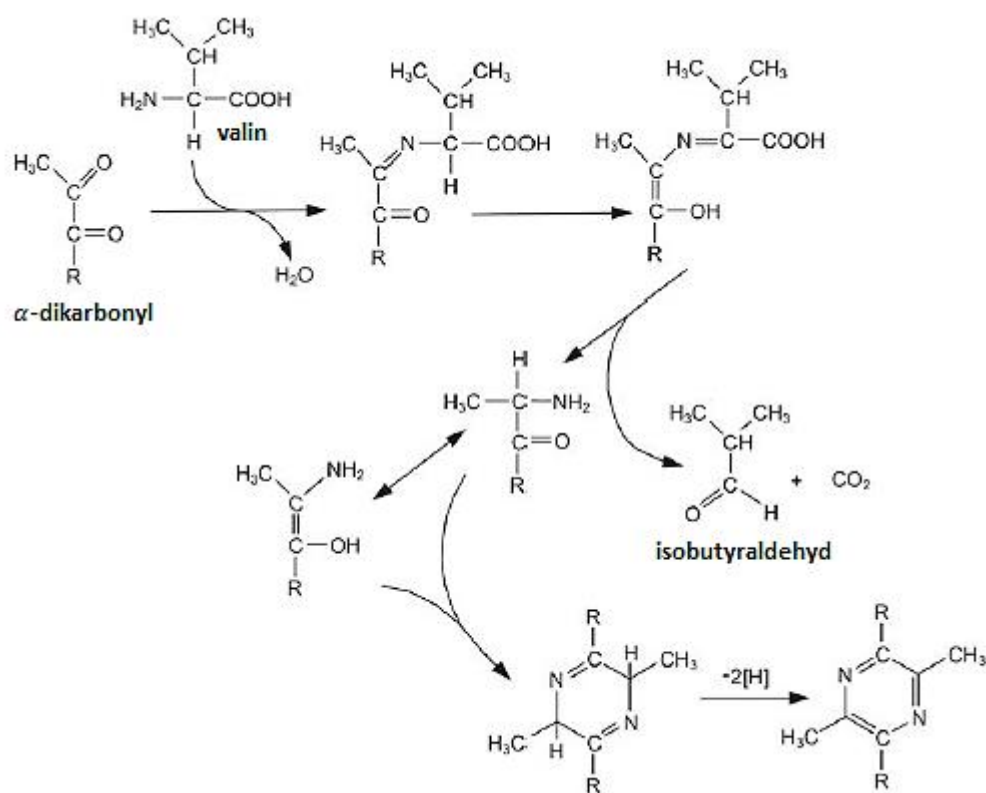


Obrázek 4: 2. fáze Maillardových reakcí [10]

3. Poslední fází, která je zobrazena na Obrázku 5, je tvorba organolepticky aktivních látek. Probíhá tzv. Streckerova degradace, kdy  $\alpha$ -dikarbylové sloučeniny reagují s přítomnou volnou aminokyselinou (v tomto případě s valinem). Vznikají těkavé aldehydy (Streckerovy aldehydy), které jsou o jeden atom uhlíku kratší než původní aminokyselina. Současně přechází  $\alpha$ -dikarbylová sloučenina na aminoketon, ze kterého se následně tvoří deriváty



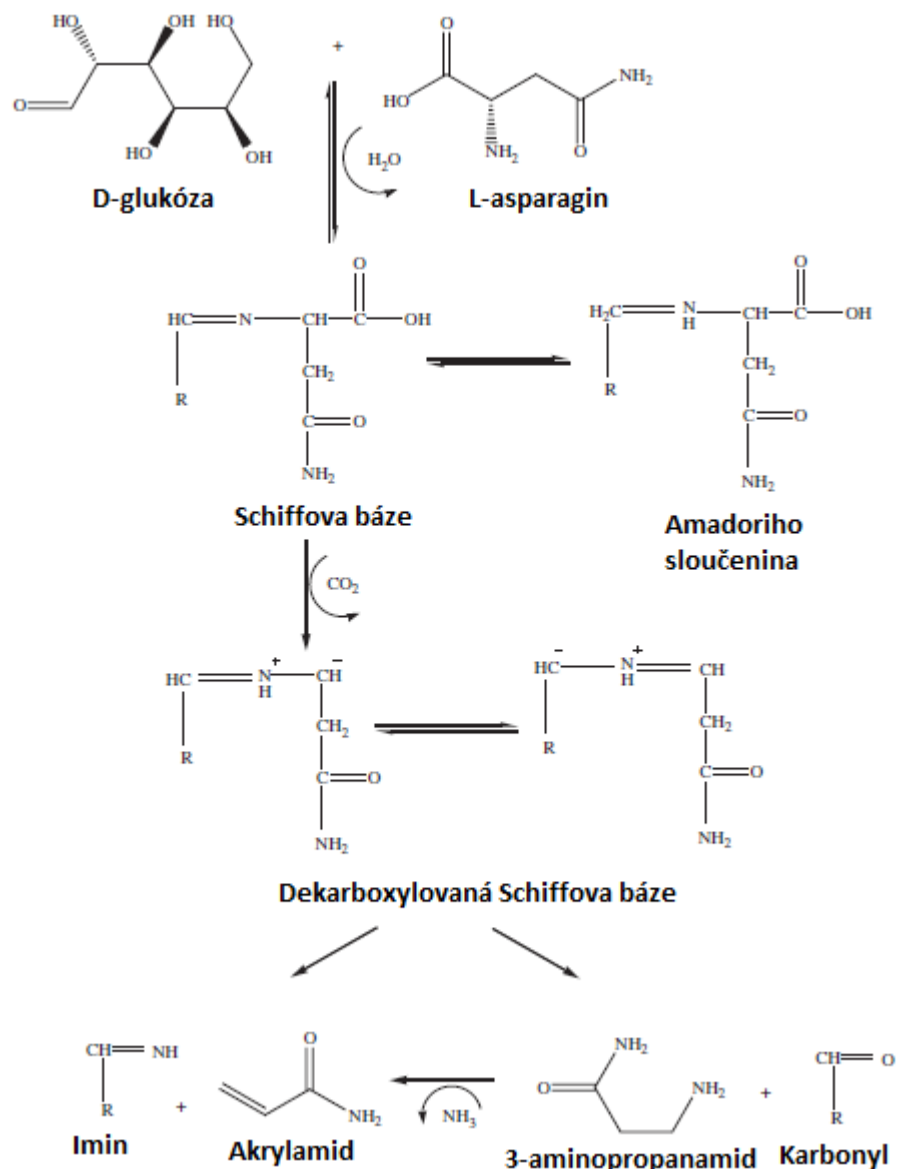
pyrazinu [8]. Tím se utvoří z velké části aromatický profil potraviny. Dále dochází k polymeraci přítomných  $\alpha$ -dikarbonylů s aminy za vzniku melanoidinů, které jsou nositelé hnědých odstínů [9].



Obrázek 5: 3. fáze Maillardových reakcí [10]

### 1.2.1.1 Mechanismus vzniku akrylamidu

Maillardovy reakce jsou hlavní příčinou vzniku akrylamidu v potravinách. Klíčovou sloučeninou je zde aminokyselina asparagin, kterou můžeme nalézt např. v bramborách nebo obilovinách. Jak je vyobrazeno na Obrázku 6, asparagin reaguje s redukujícím cukrem (v tomto případě s D-glukózou), při teplotách nad  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , za tvorby Schiffovy báze. Ta poté může dekarboxylací přecházet přímo na akrylamid a příslušný imin. Další možností je hydrolyza, při které dojde ke vzniku 3-aminopropanamidu a příslušného karbonylu. Po následném odštěpení amoniaku z 3-aminopropanamidu se tvoří akrylamid [2,11].

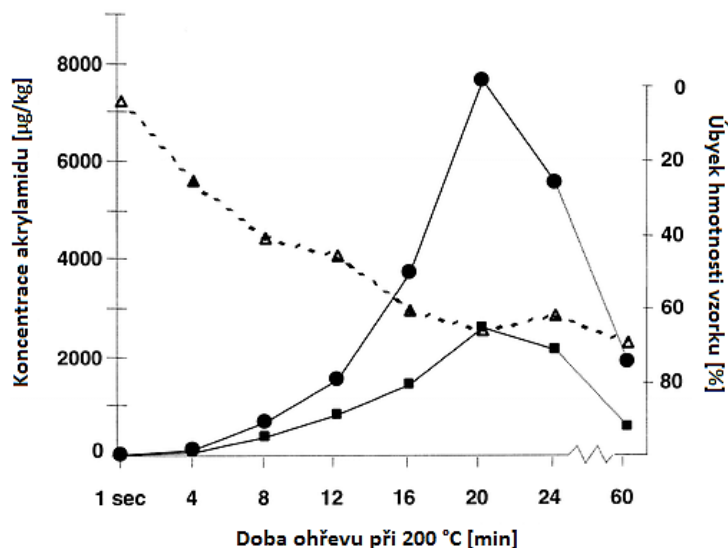


Obrázek 6: Vznik akrylamidu Maillardovými reakcemi [11]

Na tvorbu akrylamidu těmito reakcemi má vliv několik faktorů. Jedním z nich je přítomný redukující cukr. Bylo zjištěno, že AA se tvoří více, pokud je počátečním redukujícím cukrem fruktóza. V případě glukózy je tvorba o něco nižší. Je to způsobeno nejspíše tím, že fruktóza má bod tání  $104\text{ }^\circ\text{C}$  a glukóza  $146\text{ }^\circ\text{C}$  [12]. Fruktóza se tedy dříve rozpouští a rychleji interaguje s asparaginem. Další faktor je teplota a doba ohřevu. Ideální je samozřejmě teplota pod  $120\text{ }^\circ\text{C}$ . Jeho tvorbu ovlivňuje také pH. Nejvíce akrylamidu vzniká při pH okolo 8 [13,14].

Zajímavý jev je, že v některých případech při teplotách nad  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , a zároveň co nejdelší možné době úpravy, může být v potravine ve výsledku AA méně, jelikož dojde k jeho degradaci. Na Obrázku 7 lze vidět, že u hranolek připravovaných v troubě při  $200\text{ }^\circ\text{C}$  množství

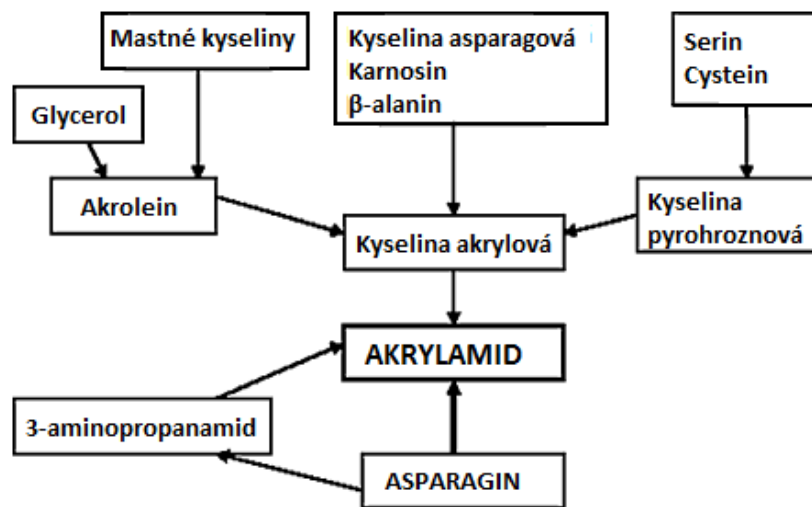
akrylamidu do 20 minuty stoupá, poté jeho koncentrace začne klesat. Čárkovaná křivka s trojúhelníkovými body značí procentuální úbytek hmotnosti vzorku. Křivka se čtvercovými body udává závislost koncentrace akrylamidu ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na čase (minuty) ve vzorku s kompenzací úbytku hmotnosti a křivka s kruhovými body udává stejnou závislost bez kompenzace úbytku hmotnosti [13].



Obrázek 7: Závislost koncentrace akrylamidu na době ohřevu [13]

### 1.2.2 Ostatní způsoby vzniku AA

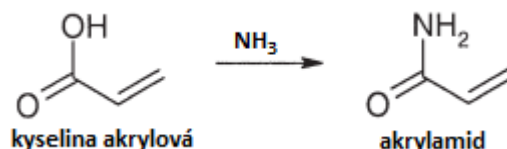
Hlavní podíl tvorby AA v potravinách je vytvořen reakcí asparaginu s redukujícími cukry. Je ale i několik vedlejších reakcí, kterými může vznikat. Na Obrázku 8 jsou znázorněny různé cesty tvorby akrylamidu a podrobnější popis jednotlivých reakcí je uveden níže.



Obrázek 8: Vznik akrylamidu mimo Maillardovy reakce [15]

## Kyselina akrylová

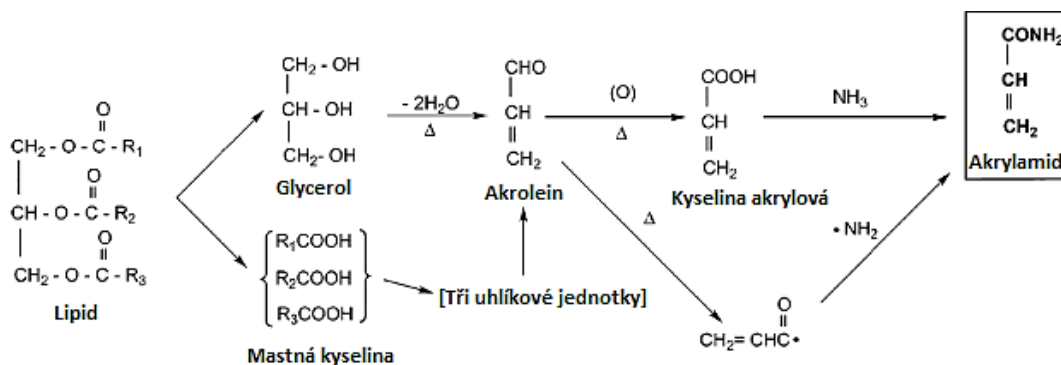
Jednou z možností vzniku akrylamidu mimo Maillardovy reakce je tepelný rozklad  $\beta$ -alaninu, kyseliny asparagové nebo karnosinu za vzniku kyseliny akrylové. Tato kyselina přechází na AA reakcí s amoniakem (viz Obrázek 9), který se pyrolyticky uvolňuje z aminokyselin jako např. lysin a asparagin nebo obecně ze sloučenin obsahující dusík [14,15].



Obrázek 9: Vznik akrylamidu z kyseliny akrylové [16]

## Akrolein

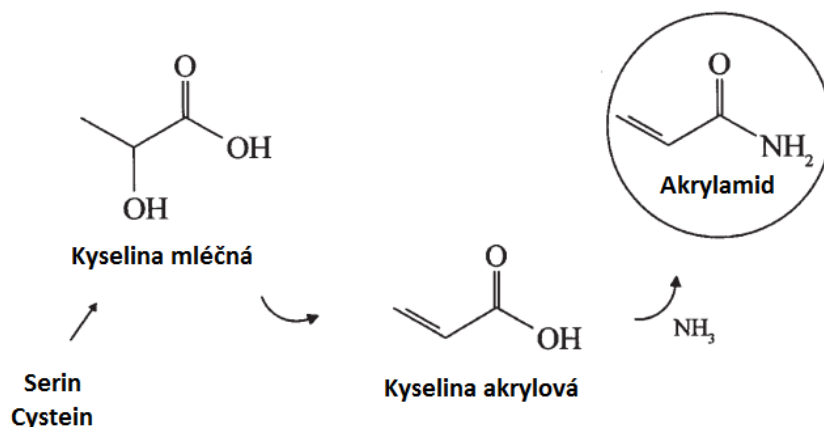
Přítomnost jedlých olejů a tuků v potravinách nebo úprava v nich může také mít za následek zvýšení tvorby akrylamidu. Prekurzorem pro jeho tvorbu je sloučenina akrolein (2-propenal), který vzniká tepelným rozkladem lipidů a následnou dehydratací glycerolu, jak lze vidět na Obrázku 10. Bod varu akroleinu je 51 °C, což je nízká teplota v porovnání s teplotami, při kterých se potraviny upravují. Je tedy možné, že akrolein vytěká a akrylamid nevznikne. Pokud však dojde k oxidaci akroleinu, vznikne kyselina akrylová. Ta poté reakcí s amoniakem, tvoří akrylamid. Akrolein může reagovat i přímo s asparaginem za tvorby akrylamidu [14,17].



Obrázek 10: Vznik akrylamidu z akroleinu [17]

## Serin a cystein

Z aminokyselin cysteinu a serinu může docházet k tvorbě kyseliny pyrohroznové působením vysokých teplot při úpravě potravin. Poté dojde k redukci této kyseliny na kyselinu mléčnou, která následně dehydratuje na kyselinu akrylovou. Opět reakcí s amoniakem dojde ke vzniku akrylamidu [15].



Obrázek 11: Vznik akrylamidu ze serinu a cysteinu [18]

Obrázek 11 zobrazuje reakci vedoucí přímo na kyselinu mléčnou, která následně přechází na kyselinu akrylovou. Z této kyseliny se po reakci s amoniakem tvoří akrylamid.

### 1.3 Výskyt akrylamidu v potravinách

Akrylamid v syrových potravinách nenajdeme, jelikož se tvoří až při tepelné úpravě. Je již ale známo, které suroviny v sobě mají vhodné prekurzory pro jeho tvorbu při vystavení vyšším teplotám. Obecně lze říct, že AA se tvoří nejvíce ve škrobnatých potravinách.

#### 1.3.1 Výrobky z brambor

Brambory lze upravit na mnoho způsobů, ale ne ve všech případech proběhne tvorba akrylamidu. U vařených nebo dušených brambor riziko výskytu AA není. Tvorba AA probíhá při smažení nebo pečení při teplotách nad 120 °C. Brambory obsahují 4–25 mg asparaginu v 1 g sušiny. Obsah redukujících cukrů, hlavně glukózy a fruktózy, v sušině brambor se pohybuje v rozmezí 0,04–4,8 mg/g. Vliv odrůdy na výsledné množství AA nebyl prokázán [19].

Mezi výrobky s vysokým obsahem AA patří hlavně hranolky a brambůrky. Při jejich výrobě se využívá smažení nebo pečení při vysokých teplotách (až 200 °C), a tím dochází k tvorbě akrylamidu z prekurzorů obsažených v bramborech. Čím tmavší je finální produkt, tím více AA v něm nalezneme. Průměrný obsah AA u hranolek je 377 µg/kg a u brambůrků 546 µg/kg [20,21].

### 1.3.2 Pečivo

Hlavní ingrediencí pro výrobu pečiva je mouka. Protože druhů mouk je velké množství a každá má jiný obsah asparaginu, také obsah AA bude záviset na druhu použité mouky. Nejznámější a nejvíce využívaná je mouka pšeničná. V dnešní době však stoupá obliba mouk z jiných druhů obilovin nebo i jiných surovin, než je jen obilí, jako např. kukuřice, hrách nebo rýže [22].

Obsah asparaginu v obilném zrně je závislá na několika faktorech. K ovlivnění dochází v případě, že zrně před mletím začne klíčit, čímž dojde k aktivaci enzymů a uvolnění asparaginu. Dalším faktorem je hnojení obilí, kdy dusíkatá hnojiva zvyšují obsah asparaginu v zrně. Také je důležité brát v potaz počasí v roce sklizně, jelikož teplota a vlhkost ovlivňují obsah aminokyselin a bílkovin v obilí. Zlomový bod přichází ve fázi mletí. Bylo zjištěno, že vnější vrstvy zrna obsahují nejvíce asparaginu. Otruby a celozrnné mouky proto budou obsahovat více asparaginu. S ohledem na všechny tyto podmínky se u pšeničné mouky pohybuje obsah asparaginu v rozmezí 1,74–19,05 mg ve 100 g mouky. Špaldová mouka má obsah asparaginu 6,46–12,17 mg/100 g a žitná mouka 41,37–44,10 mg/100 g [22].

Mouka není jedinou surovinou při výrobě pečiva. Také ostatní suroviny mají vliv na obsah akrylamidu a množství a druh použitých surovin se odvíjí od typu výrobku. U sladkého pečiva hraje významnou roli použité sladidlo. Pokud se použije jako sladidlo neredukují cukr, nejčastěji sacharóza, bude výsledný obsah akrylamidu výrazně nižší v porovnání s pečivem, kde slouží jako sladidlo redukující cukry (fruktóza, glukóza). Hydrogenuhličitan amonný ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), který se používá jako kypřící složka je také schopen ovlivnit tvorbu akrylamidu. Amoniak reaguje s redukujícími cukry a poskytuje ještě reaktivnější karbonylové sloučeniny (glyoxal, methylglyoxal) pro Maillardovu reakci a tvorbu AA. Je proto vhodnější používat hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ ). Kynuté pečivo by mělo obsahovat méně AA, jelikož kvasinky při fermentaci spotřebovávají asparagin. Sůl je další přísadou, která dokáže ovlivnit tvorbu AA. Chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ ) je schopný tvorbu akrylamidu potlačit i podpořit, záleží pouze na množství. Čím více soli, tím méně dochází k inhibici tvorby AA. Sůl může tvorbu AA i zvýšit, nicméně při použití takové koncentrace soli by bylo pečivo již nepoživatelné. Posledními ingrediencemi jsou různé ořechy, ovoce, semínka atd., které jsou schopny také zvýšit množství AA ve výsledném produktu [22,23].

Teplota a čas pečení samozřejmě hraje také velkou roli při tvorbě akrylamidu. Ve vnějších částech (kůrka) bývá obsah AA nejvyšší, jelikož dovnitř pečiva nepronikne tolik tepla. Aby se akrylamid netvořil, bylo by ideální péct co nejkratší dobu při co nejmenší teplotě.

Obě podmínky najednou však nelze takto dodržet, protože by pečivo nemělo dostačující senzorycké vlastnosti. Jsou tedy dvě možnosti, jak docílit alespoň snížení tvorby AA. Jednou z možností je péct při vyšší teplotě kratší dobu, druhou je delší doba pečení při nižší teplotě. Pečivo je však složitá matrice, tudíž zde může docházet ke zvýšené tvorbě AA i přes úpravu podmínek pečení. Odvíjí se to od složení těsta, velikosti a tvaru produktu, vlhkosti těsta nebo typu ohřevu (např. konvektomat vs. klasická trouba) [22,23].

### **1.3.3 Káva a kávoviny**

Výroba kávy a kávovin spočívá v pražení kávových zrn nebo náhražek při teplotách nad 200 °C. Náhražky kávy mohou být z různých zdrojů jako např. žito, ječmen nebo čekankový kořen (cikorka).

Pro výsledné množství AA je důležitý obsah aminokyselin, zejména asparaginu. V zelené kávě druhu Robusta je přítomno asparaginu asi 680 µg/g. V kávě druhu Arabica je obsaženo asparaginu méně a to cca 360 µg/g. Ovlivnění hladiny AA je také spojeno s intenzitou barvy praženého zrna, tedy délkou a teplotou pražení. Zajímavé je, že čím tmavší výsledné zrno je, tím méně AA obsahuje. Tento jev je nejspíše způsoben tím, že při vyšších teplotách AA reaguje s nějakou jinou složkou přítomnou v kávě, např. melaniody. Při stejných podmínkách pražení (240 °C a 7,5 minuty) zrnková káva Robusta obsahuje akrylamidu průměrně 700 µg/kg a zrnková káva Arabica 370 µg/kg. Faktorem, který neovlivní množství akrylamid je sušení instantní kávy (sušení mrazem vs. sušení teplem). V instantních kávách se množství AA pohybuje v rozmezí 200–645 µg/kg [22,24].

V případě kávovin vykazuje nejvyšší obsah AA čekankový kořen, jelikož obsahuje vysoké množství fruktózy. Kultivar a množství dusíku použitého při hnojení ovlivňuje hladinu volného asparaginu v rostlině. Hodnoty AA v čekance tedy v některých případech přesahují až 4 000 µg/kg. V obilných náhražkách se množství AA pohybuje v rozmezí 50–410 µg/kg [22].

## **1.4 Eliminace tvorby AA**

Vzhledem k tomu, že přítomnost akrylamidu je v potravinách nežádoucí, hledají se způsoby, kterými by se zamezilo jeho tvorbě. Ať už je to přídavek nějaké vhodné látky nebo úprava podmínek pro zpracování potraviny. Zároveň je ovšem zapotřebí zachovat požadované organoleptické vlastnosti jako je chuť, barva nebo vůně.

### 1.4.1 Asparaginasa

Zatím asi nejznámější metodou pro eliminaci tvorby AA je využití enzymu asparaginasa. Tento enzym je získáván hlavně produkcí mikroorganismů nebo jej lze získat z rostlinných zdrojů. Příklady zdrojů, ze kterých je možné enzym izolovat jsou v Tabulce 1 [25].

Tabulka 1: Zdroje asparaginasy [25]

<b>Bakterie</b>	<b>Plísně</b>	<b>Kvasinky</b>	<b>Rostlinné zdroje</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhodotorula spp.</i>	Hrách setý
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Candida utilis</i>	Sója
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Withania somnifera</i> (Vitánie spavá)

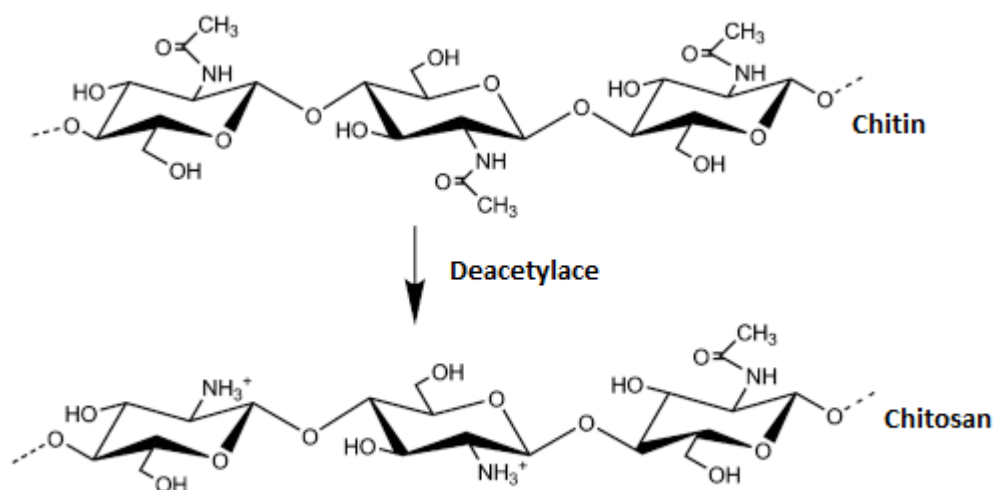
Asparaginasa způsobuje hydrolýzu asparaginu za vzniku kyseliny asparagové a amoniaku. Byly prováděny testy na různých typech potravin a výsledky ukázaly, že enzym nemění organoleptické vlastnosti potraviny, což je velkou výhodou [26].

Velmi vysoká účinnost eliminace AA byla zjištěna u výrobků z brambor (bramborové lupínky, hranolky, sušená bramborová kaše atd.) a také u potravin z mouky (chléb, sušenky, koblihy atd.), kdy je možné dosáhnout snížení obsahu AA až kolem 90 %. Výrobky se namáčí v roztoku asparaginasy předtím, než podstoupí tepelnou úpravu. V případě brambůrků nebo hranolek bylo zjištěno, že k účinku enzymu přispívá i předúprava brambor. Pokud před samotným smažením dojde k blanšírování, škrob v bramborech nabobtná a díky tomu selepší průchod asparaginu do roztoku s asparaginasou [25,27].

### 1.4.2 Chitosan

Chitosan je odpad při zpracování korýšů a mořských živočichů. Je to polymer, který vzniká deacetylací chitinu z jejich krunýřů (viz Obrázek 12). Výhodou je, že je dobře dostupný, biokompatibilní a snadno modifikovatelný. Pro člověka není stravitelný a je hodnocen jako vláknina. Obsahuje hodně aminoskupin, a tím může působit jako inhibitor tvorby akrylamidu [28,29].





Obrázek 12: Deacetylase chitinu na chitosan [30]

Velký počet aminoskupin znamená velkou pravděpodobnost, že redukující cukry budou reagovat s aminoskupinou chitosanu místo aminoskupiny asparaginu. Na inhibici postačují i velmi nízké koncentrace (0,27–1% vodné roztoky). Například u smažených těst byla zjištěna účinnost inhibice až 59 % při použití 0,27% roztoku chitosanu. Bylo prokázáno, že lépe probíhá eliminace AA, pokud je v potravine přítomna glukóza, a také při použití nízkomolekulárního chitosanu [24,28,29].

### 1.4.3 Polyfenoly

Tyto látky se přirozeně vyskytují v produktech rostlinného původu jako např. čokoláda, zelený čaj, červené víno, a obecně v zelenině a ovoci. Působí jako antioxidanty. Jsou složeny z alespoň jednoho aromatického kruhu a alespoň jedné hydroxylové skupiny. Lze je dále dělit podle struktury na flavonoidy, fenolové kyseliny, taniny atd. Vzhledem k tomu, že se vyskytují v běžně konzumovaných potravinách, nejsou nijak zdravotně závadné. Velký počet polyfenolů a jejich rozmanitá struktura je důvodem toho, že ne všechny se hodí na eliminaci tvorby AA. Naopak některé polyfenolické sloučeniny (silymarin, kurkumin) dokonce mohou způsobit jeho zvýšení tím, že poskytují karbonylovou skupinu pro reakci s asparaginem. V opačném případě dochází k reakci mezi karbonylovou skupinou (např. z redukujících cukrů) a polyfenolem. Asparagin poté již nemá s čím reagovat a AA se netvoří. Jako vhodné polyfenolické látky se prokázaly hlavně flavonoidy jako např. epikatechin nebo naringenin [31].

#### 1.4.4 Probiotika

Mikroorganismy jako *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* atd. jsou označovány jako probiotika. Některé z těchto mikroorganismů mohou produkovat enzym asparaginasu a tím snižovat výskyt AA v potravinách (viz kapitola 1.4.1.) [32].

Dalším způsobem, kterým mohou mikroorganismy eliminovat AA je jejich schopnost vazby na karcinogeny. Metoda zatím není plně prozkoumána, ale mechanismus účinku je založen na vazbě akrylamidu na peptidoglykan v buněčné stěně bakterií. Tento proces je závislý na mnoha faktorech jako je pH, teplota, koncentrace akrylamidu nebo typ kmene. Hlavním rozdílem je zde to, že dochází k odstranění již vzniklého AA, místo potlačení jeho vzniku. V tomto případě by tedy bylo možné konzumovat probiotika a potraviny odděleně, a do výrobního procesu potraviny by nemuselo být nijak zasahováno. Případně by bylo možné přidat probiotika přímo do potraviny [32].

#### 1.4.5 Vakuum

Tvorba AA vzrůstá se zvyšující se dobou nebo teplotou úpravy. Použitím vakuového pečení nebo smažení je možné dosáhnout snížení teplot, a tím i redukce AA ve výsledném produktu. Snížením teploty se musí nepatrně prodloužit doba tepelné úpravy (v řádu minut v závislosti na potravině), avšak na tvorbu akrylamidu to nemá vliv. Hlavním faktorem je zde tedy snížená teplota úpravy potraviny tak, aby nedocházelo k tvorbě AA (<120 °C). Dalším faktorem je odstranění vzdušného kyslíku, což je výhoda hlavně v případě smažení, jelikož kvalita oleje během smažení zůstává zachována v porovnání s klasickým smažením. Jedinou nevýhodou je, že konečné produkty mají ve výsledku světlejší barvu [33,34].

#### 1.4.6 Pulzní elektrické pole

Metoda pulzního elektrického pole (PEF) byla zkoumána u smažených bramborových lupínků. PEF metoda, která byla použita při předúpravě brambor, se prokázala jako účinnější ke snížení obsahu AA v porovnání s klasickým blanšírováním [35].

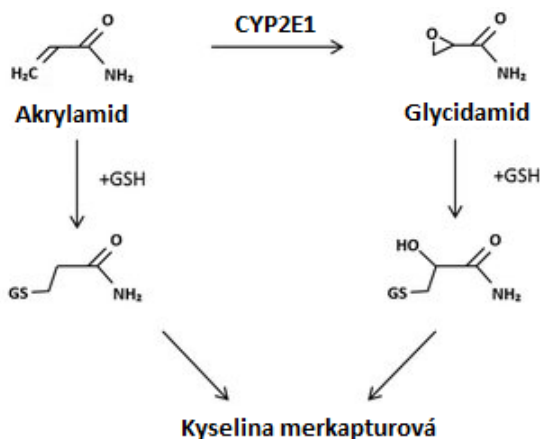
Pulzní elektrické pole funguje na principu vkládání krátkých a silných elektrických impulzů do roztoku s potravinou. Toto ošetření brambor před smažením způsobí uvolnění aminokyselin a redukujících cukrů, a tím odstranění prekurzorů pro tvorbu AA. Ve výsledném produktu, který byl upraven pomocí PEF, dochází ke snížení AA zhruba o 30 % oproti produktu neošetřenému. Po usmažení mají brambůrky světlejší barvu. Ostatní aspekty (pevnost, křupavost atd.) jsou sice také ovlivněny, ale jen v malé míře [35,36].

## 1.5 Vliv akrylamidu na lidské zdraví

Akrylamid je potvrzený jako potenciální karcinogen pro člověka. Ostatní účinky, které jsou zkoumány, jsou zatím prokázány pouze u laboratorních hlodavců. U nich se projevuje velké množství problémů jako je genotoxicita, neurotoxicita, zhoršená reprodukce u samců nebo negativní dopady na prenatální i postnatální vývoj. U lidí nedochází k takovým expozicím AA, aby se tyto účinky mohly projevit. Neurotoxicita by se u člověka projevila, pokud by byl denní příjem AA 0,5 mg na 1 kg tělesné hmotnosti. Takovou dávku nelze z potravin za normálních okolností přijmout [23,37].

### 1.5.1 Metabolismus akrylamidu

Potenciální karcinogenita je způsobena metabolismem akrylamidu v těle. Mechanismus celé reakce je znázorněn na Obrázku 13, kde probíhá epoxidace akrylamidu na glycidamid pomocí enzymu cytochrom 2E1 (CYP2E1). Tato sloučenina je velmi reaktivní a váže se na řadu biomolekul jako je hemoglobin a DNA, tím dochází k mutacím a následnému nádorovému bujení. AA je také schopen vazby na biomolekuly, ale metabolit glycidamid je oproti němu reaktivnější. Akrylamid i glycidamid mohou reagovat s glutathionem (GSH) (Obrázek 13) za tvorby merkapturové kyseliny nebo jejích derivátů, které jsou poté vyloučeny močí a jsou považovány za biomarkery akrylamidu [38–40].



Obrázek 13: Metabolismus akrylamidu [41]

### 1.5.2 Legislativa

V roce 2017 nabylo platnosti NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/2158. V tomto dokumentu jsou definovány potraviny, u kterých je nutné dodržovat hladinu akrylamidu nižší, než jsou stanovené porovnávací hodnoty (viz Tabulka 2). „Porovnávacími hodnotami se rozumí

ukazatele, které se použijí k ověření účinnosti zmírňujících opatření, a vycházejí ze zkušeností a výskytu u širokých kategorií potravin.“ Ke každé z těchto potravin jsou podrobně popsána zmírňující opatření, která by měla být dodržována, aby nedošlo k překročení limitní koncentrace AA v potravine. Dále je zde i popis požadavků na odběr vzorku a analýzu. Všichni provozovatelé potravinářských podniků se musí řídit tímto nařízením a nemělo by docházet k překračování porovnávacích hodnot [37].

Tabulka 2: Porovnávací hodnoty akrylamidu u vybraných potravin [37]

Potravina	Porovnávací hodnota [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Hranolky (k přímé spotřebě)	500
Bramborové lupínky z čerstvých brambor a z bramborového těsta Bramborové krekry Jiné bramborové výrobky z bramborového těsta	750
Měkký chléb	
a) Pšeničný chléb	50
b) Měkký chléb, jiný než pšeničný chléb	100
Snídaňové cereálie (kromě obilné kaše)	
– výrobky z otrub a celozrnné cereálie, zrna pufovaná v pufovacím dělu	300
– pšeničné a žitné výrobky (1)	300
– výrobky z kukuřice, ovsy, pšenice špaldy, ječmene a rýže (1)	150
Sušenky a oplatky	350
Krekry s výjimkou bramborových krekřů	400
Křupavý chléb	350
Perník	800
Výrobky podobné ostatním výrobkům této kategorie	300
Pražená káva	400
Instantní (rozpuštná) káva	850
Náhražky kávy	
a) náhražky kávy výhradně z obilovin	500
b) náhražky kávy ze směsi obilovin a čekanky	(2)
c) náhražky kávy výhradně z čekanky	4 000
Potraviny pro malé děti, obilné příkrmy pro kojence a malé děti, kromě sušenek a sucharů (3)	40
Sušenky a suchary pro kojence a malé děti (3)	150

(1) Jiné než celozrnné cereálie a/nebo jiné než otrubové cereálie. Obilovina přítomná v největším množství určuje kategorii.

(2) Porovnávací hodnota, která se použije na náhražky kávy ze směsi obilovin a čekanky, zohledňuje relativní podíl těchto složek v konečném výrobku.

(3) Podle definice v nařízení (EU) č. 609/2013.

V Tabulce 2 jsou uvedeny potraviny, které obsahují prekurzory pro tvorbu akrylamidu a u kterých se koncentrace akrylamidu ve výsledném produktu sleduje. Hlavními kategoriemi jsou: hranolky; bramborové lupínky, krekry a jiné výrobky z bramborového těsta; chléb; snídaňové cereálie; jemné pečivo (keksy, sušenky, perník atd.); káva (pražená, instantní); náhražky kávy; potraviny pro děti a kojence. Největší omezení je u výrobků pro děti a kojence,

kam spadají obilné příkrmy a ostatní potraviny s výjimkou sušenek a sucharů. Porovnávací hodnota je zde pouhých 40 µg/kg, jelikož děti a kojenci jsou rizikovou skupinou z důvodu malé tělesné hmotnosti. Pro pšeničný chléb je stanovena nízká hodnota (50 µg/kg), protože je to velmi často konzumovaná potravina. Naopak vysoké porovnávací hodnoty jsou u perníku (800 µg/kg) a instantní kávy (850 µg/kg). Nejvyšší porovnávací hodnota je pro náhražky kávy výhradně z čekanky, a to 4 000 µg/kg [37].

## 1.6 Stanovení akrylamidu

Z výše uvedených informací je zřejmé, že sledování a stanovení akrylamidu v potravinách je nezbytné. Akrylamid se v potravinách analyzuje nejčastěji pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie. Nejvíce využívaným detektorem je v obou případech hmotnostní spektrometr. Vzorky potravin je nutné upravit tak, aby bylo možné analýzu uskutečnit s co nejlepšími výsledky, neboť potravina je velice složitá matrice, může docházet k interferencím a AA je přítomen v malých koncentracích. Toho je docíleno vhodným výběrem extrakčního činidla, odstraněním interferujících látek, derivatizací, zakoncentrováním atd. Jako kvantifikační metodu lze zvolit metodu standardního přídatku nebo metodu vnitřního standardu. Pokud je využit hmotnostní spektrometr, tak lze jako vnitřní standard využít izotopicky značený <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-akrylamid, ale lze samozřejmě použít i neznačený. Pro metodu vnitřního standardu je možné zvolit acetamid nebo lindan [42–45].

### 1.6.1 Příprava vzorku k analýze

Základem je správné odebrání reprezentativního vzorku. Poté přichází na řadu úpravy vzorku tak, aby ho bylo možné vzorky analyzovat požadovanou metodou. Vzorek se upravuje mletím nebo drcením na menší části a homogenizací. Pokud obsahuje vlhkost, je někdy nutné ji odstranit například sušením [46].

#### 1.6.1.1 Extrakce

AA je velmi dobře rozpustný ve vodě, proto je nejjednodušším rozpouštědlem pro extrakci destilovaná voda. Další vhodná extrakční činidla jsou methanol [47], aceton [48] nebo kyselina mravenčí [47].

Vysušený a rozemletý vzorek se smísí s extrakčním činidlem, nechá se třepat v třepačce po dobu několika minut, a poté se vloží do ultrazvukové lázně pro větší efektivitu extrakce. Následně se provede odstředění na centrifuze pro získání čirého extraktu AA, který se odebere k dalšímu zpracování [42,43,49].

### 1.6.1.2 Odtučnění a deproteinace

Potraviny jsou složitá matrice, ve které je přítomno mnoho interferentů. Tyto rušivé elementy se musí před analýzou odstranit.

První nežádoucí složkou, které je třeba odseparovat, jsou tuky. Jedním způsobem je provedení extrakce při nízké teplotě, aby došlo k oddělení tuku v podobě pevné vrstvy na povrchu [47]. Další možnost je tuk vyextrahovat s použitím vhodného rozpouštědla, např. hexanu [50] nebo petroletheru [51]. Ke vzorku se přidá vybrané rozpouštědlo a nechá se několik minut třepat ve třepačce [51], případně se může vložit do odstředivky [50]. Supernatant se odebere a proces je dobré ještě jednou zopakovat, aby separace byla účinnější a odstraní se veškerý tuk.

Bílkoviny jsou také nežádoucí příměs a je nutné je odstranit. To se provádí čiřením například pomocí roztoků Carrez I (hexakvanoželeznatan draselný) a Carrez II (síran zinečnatý). K extraktu vzorku se přidají oba tyto roztoky a provede se vytřepání. Dojde ke vzniku sraženiny a k vysrážení bílkovinných složek. Následuje centrifugace, při které sraženina zůstane na dně a ve vrchní vodné fázi již nejsou bílkoviny přítomny [43,49].

Pro úplné přečištění a/nebo zakoncentrování vzorku se používá jako další krok promytí přes SPE (extrakce tuhou fází) kolonku. Princip SPE je založen na dělení rozpuštěných látek mezi dvě fáze, kapalnou (vzorek) a pevnou (sorbet). Podle povahy vzorku (např. polární vs. nepolární, kyselý vs. zásaditý) se zvolí vhodný sorbet, který může být naplněn v kolonce, disku nebo ve špičce pipety. Sorbet může být např. silikagel, florisil (křemičitan hořečnatý) nebo aminopropyl. Na sorbetu se zachytí analyt, ale zároveň i nežádoucí složky, které se odstraní v následujícím kroku. Kolonka se po nasorbování látek ze vzorku promyje vhodným rozpouštědlem k eluci nečistot, a poté rozpouštědlem vhodným pro eluci analytu [52,53].

Pro AA se používají silně hydrofilní kolonky s reverzní fází. Náplň je nejčastěji chemicky modifikovaný silikagel (C18, C8, benzensulfonová kyselina), grafitizovaný uhlík a polymerové sorbenty jako styren-divinylbenzen nebo poly(N-vinylpyrrolidondivinylbenzen), což je náplň SPE kolonky Oasis HLB, která je pro akrylamid hojně využívána [54].

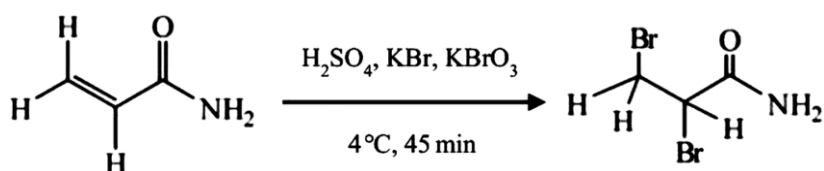
Kolonky se před použitím kondicionují methanolem a vodou [51,57] nebo acetonitrilem a vodou [55,56].

## 1.6.2 Derivatizace akrylamidu

AA je polární sloučenina s nízkou molekulovou hmotností, malou těkavostí a špatnou absorpcí v UV nebo viditelné oblasti záření. Z tohoto důvodu je přínosné použít derivatizační krok k úpravě jeho vlastností podle dané techniky měření. Vhodným výběrem derivatizačního činidla se zvýší selektivita i citlivost metody. Nejznámější derivatizační technika je bromace akrylamidu na 2,3-dibrompropanamid [58,59].

### 1.6.2.1 Bromace

K derivatizaci dochází v přítomnosti bromidu draselného (KBr) a bromičnanu draselného (KBrO<sub>3</sub>) v kyselém prostředí (zajišťuje H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), jak je znázorněno na Obrázku 14 [50,51]. Také se může použít kombinace bromidu draselného (KBr), kyseliny bromovodíkové (HBr) a bromové vody (nasycený roztok Br<sub>2</sub>) [60]. V obou případech je konečným produktem 2,3-dibrompropanamid (2,3-DBPA), který je méně polární, více těkavý a má větší molekulovou hmotnost oproti AA. To má za následek zvýšení citlivosti a selektivity pro analýzu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), ale i pro další techniky (LC-UV, GC-MECD atd.). Snížením polaritoy se docílí lepšího oddělení od interferenčních látek rozpustných ve vodě [50,51,60].

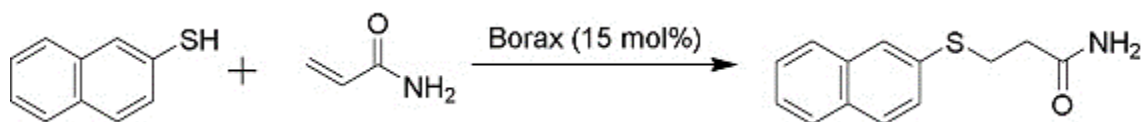


Obrázek 14: Reakce derivatizace bromací [50]

Postup přípravy derivátu je poměrně jednoduchý. Ke vzorku se přidá kyselina sírová, bromid draselný a bromičnan draselný. Bromace se provádí při 4 °C po dobu 45 minut. Po uplynutí této doby se přidává po kapkách thiosíran sodný (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) do odbarvení, aby došlo k ukončení reakce a odstranění přebytku bromu. Následuje dvojnásobná extrakce výsledného 2,3-DBPA ethylacetátem. Extrakt se vysuší bezvodým síranem sodným a zakoncentruje odpařením pod proudem dusíku. Nakonec se odparek znovu rozpustí v ethylacetátu, přefiltruje a analyzuje [50].

### 1.6.2.2 2-naftalenthiol

Tato metoda spočívá v derivatizaci vzorku pomocí 2-naftalenthiolu s následnou disperzní mikroextrakcí z kapaliny do kapaliny (DLLME) a kapalinovou chromatografií s UV detekcí. Výsledný derivát je více hydrofobní a má vyšší retenční čas na kolonách s reverzní fází (v tomto případě žádoucí efekt). Derivát také vykazuje posun absorpčních maxim z 210 nm na 254 nebo 280 nm, což zlepšuje citlivost, protože při vlnové délce 210 nm absorbuje většina interferencí ze vzorku [49].



Obrázek 15: Reakce derivatizace pomocí 2-naftalenthiolu [49]

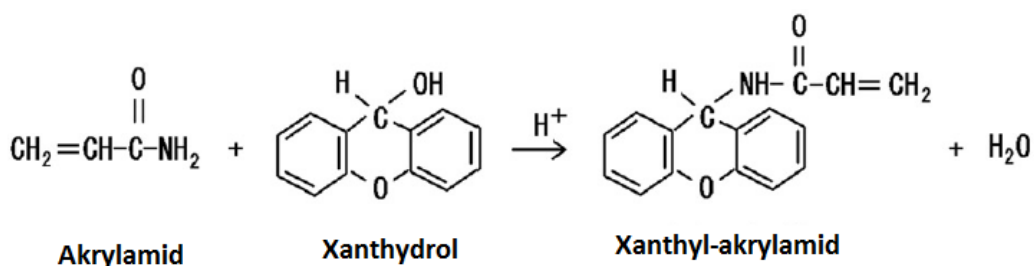
Derivatizace se provádí tak, že se k extrahovanému vzorku přidá 2-naftalenthiol a borax (Obrázek 15). Ten slouží jako pufr k úpravě pH pro alkalické podmínky reakce. Pro urychlení se reakce provádí s použitím ultrazvuku, díky čemuž derivatizace trvá pouze 45 minut (při 30 °C) místo 3 hodin [49].

### 1.6.2.3 Xanthidrol

Derivatizace pomocí xanthidrolu se využívá pro plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí (GC-MS). Oproti bromaci je tato metoda výhodná v tom, že se nepoužívá toxický brom, a navíc ve spojení s disperzní mikroextrakcí z kapaliny do kapaliny (DLLME) má vysokou citlivost a selektivitu [61]. Lze využít i jiné druhy extrakcí jako např. SPE nebo SPME, nicméně DLLME je výhodná svou jednoduchostí, rychlostí a malou spotřebou rozpouštědel. DLLME se provádí rychlým vstříknutím směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla do vzorku. Extrakční rozpouštědlo musí být nemísitelné s vodnou fází, ve které se nachází analyt. Disperzní rozpouštědlo musí být mísitelné s oběma a slouží k rozptýlení kapiček extrakčního rozpouštědla. Dojde k vytvoření zakaleného roztoku, který se následně odstředí, čímž se fáze oddělí, a v extrakčním rozpouštědle je zakoncentrovaný analyt [62].

Akrylamid reaguje s xanthidrolem, jak je vyobrazeno na Obrázku 16, za vzniku xanthyl-akrylamidu a vody [63].





Obrázek 16: Reakce derivatizace pomocí xanthrolu [63]

Derivatizace se provádí s použitím 5% xanthrolu v methanolu a kyselém prostředí, které je zajištěno kyselinou chlorovodíkovou (HCl). Reakce s AA může probíhat 30 minut v temnu při teplotě laboratoře [42,43,64] nebo 50 minut v tmavém skle ve vodní lázni (40 °C) [65]. Poté se přidá hydroxid draselný a směs hydrogenuhličitanu sodného a uhličitanu draselného (3:1 [66] nebo 2:11 [65]), aby bylo pH cca 9. Případně se může použít hydroxid draselný a hydrogenfosforečnan draselný. Následně se pomocí HCl se pH upraví na 7. Po přidání solí a úpravě pH se provede centrifugace po dobu 2–10 minut (v závislosti na velikosti relativní odstředivé síly) [42,43,64]. Horní čirá fáze se odebere pro DLLME s tetrachlorethylenem (extrakční činidlo) a ethanolem [64] nebo methanolem (disperzní činidlo) [43], také je možné použít kombinaci tetrachlormethanu s ethanolem [32]. Další možností je extrakce ethylacetátem [65] nebo terc-butyl(methyl)etherem [66].

#### 1.6.2.4 Silylace

Derivatizační činidlem je v případě silylace N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA). K tomuto činidlu se přidává 1% trimethylchlorsilan (TMCS), který slouží jako katalyzátor reakce. Silylace se provádí za míchání při 70 °C po dobu 60 minut. Po ochlazení na teplotu laboratoře je takto derivatizovaný vzorek vhodný k analýze pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), protože má zvýšenou chemickou i tepelnou stabilitu [67].

#### 1.6.2.5 Acylace

Pro plynovou chromatografii spojenou s detektorem elektronového záchytu (GC-ECD) byla vyvinuta metoda derivatizace pomocí anhydridu kyseliny trifluoroctové (TFAA). Skupiny -COCF<sub>3</sub> z anhydridu reagují v kyselém prostředí s AA za vzniku tris(trifluoroacetyl) derivátu. Výhodou je, že není potřeba další přečištění a může se přímo dávkovat k analýze [45].

Anhydrid kyseliny trifluoroctové se společně s pyridinem přidá ke vzorku. Reakční směs se zahřívá na 65 °C cca 30 minut a poté se ochladí. Po přidání methanolu a hydrogenuhličitanu sodného se pod proudem dusíku odpaří rozpouštědla. Zbytek po odpaření se rozpustí v toluenu a derivatizovaný vzorek se může nadávkovat do plynového chromatografu [45].

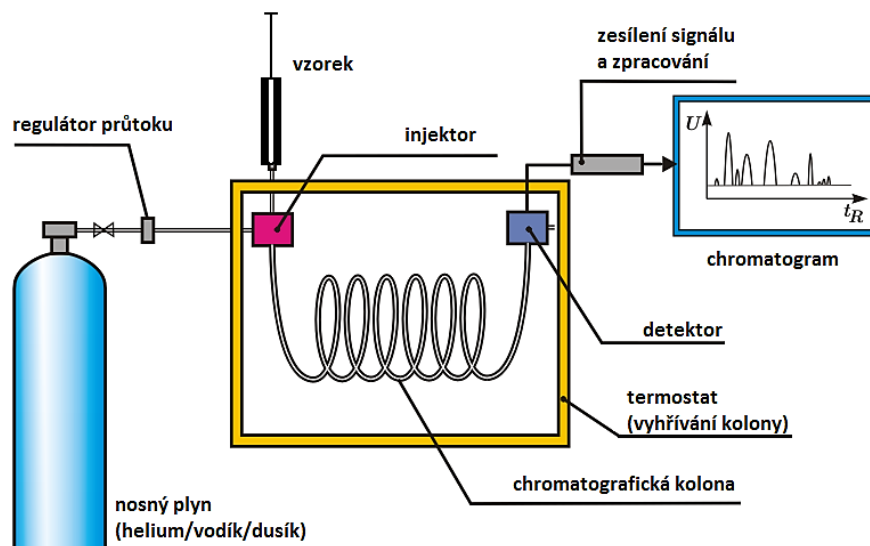
### **1.6.3 Analýza akrylamidu**

Po veškerých úpravách vzorku přichází na řadu vlastní analýza akrylamidu. Nejvíce využívanou technikou je plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS). Je však mnoho dalších metod, které mohou být použity k analýze. Jsou to hlavně plynová a kapalinová chromatografie s použitím různých detektorů. Dalšími, ale již méně využívanými technikami jsou např. kapilární elektroforéza nebo metody založené na imunochemických reakcích [59].

#### **1.6.3.1 Plynová chromatografie**

Principem plynové chromatografie je rozdělování složek mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fázi je zde nosný plyn. Stacionární fáze může být kapalná (Gas-Liquid Chromatography – GLC) nebo pevná látka (Gas-Solid Chromatography – GSC), v závislosti na vybraném typu kolony. Kolony mohou být náplňové nebo kapilární. Interakcí jednotlivých složek vzorku se stacionární fází dochází k dělení do samostatných zón podle doby retence. Na základě rozdílných retenčních časů se pomocí nosného plynu jednotlivé složky po eluci dopravují do detektoru. Tento typ chromatografie je vhodný pro látky plynné i kapalně, jelikož při nástřiku do kolony je nastavena vyšší teplota, než je bod varu dané látky [68,69].

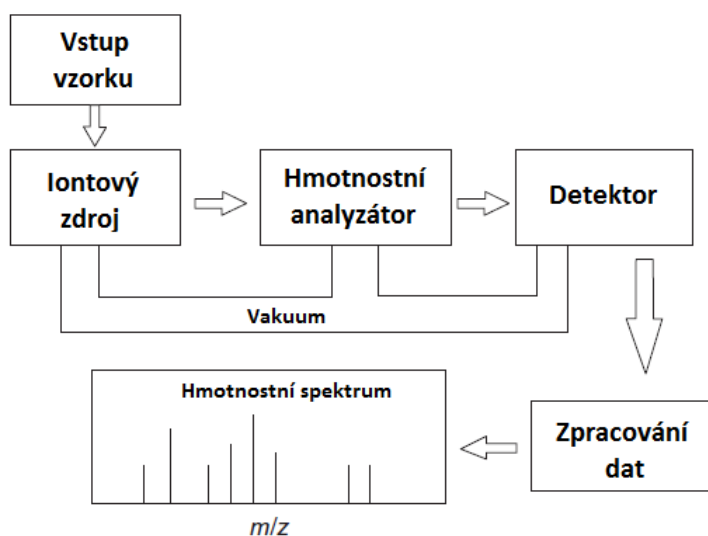
Celé schéma plynového chromatografu je znázorněno na Obrázku 17. Nosný plyn, kterým může být např. helium, vodík nebo dusík, prochází přes regulátor průtoku do vyhřívaného injektoru, kam se dávkuje vzorek pomocí mikrostříkačky. Odpařený vzorek je unášen nosným plynem do chromatografické kolony, která je umístěna v termostatu vyhřátém na požadovanou teplotu. V koloně dochází k rozdělení látek, které jsou následně dle retenčních časů jednotlivě unášeny nosným plynem do detektoru. Signál z detektoru je poté zesílen a zpracován ve výsledný chromatogram [68].



Obrázek 17: Schéma plynového chromatografu [56]

### Hmotnostní detekce v GC

Hmotnostní spektrometr se skládá z několika součástí (Obrázek 18) a slouží k identifikaci analytů na základě rozdílných hodnot poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ), které se získají po ionizaci a průchodu hmotnostním analyzátozem [70,71].



Obrázek 18: Schéma hmotnostního spektrometru [70]

Kombinace GC a MS je výhodná v tom, že se v obou případech pracuje v plynném stavu. Jediný problém zde představuje rozdíl tlaků, jelikož v plynovém chromatografu se pracuje za atmosférického tlaku a v hmotnostním spektrometru ve vakuu. K tomuto účelu je mezi vstupem vzorku a hmotnostním spektrometrem umístěno rozhraní (interface), které zajišťuje bezpečný a vysoce účinný průchod analytů [70].

Iontový zdroj slouží k ionizaci neutrálních molekul analytu, aby následně mohlo docházet k interakci s magnetickým nebo elektrickým polem v hmotnostním analyzátoru. V GC-MS se nejvíce uplatňuje elektronová ionizace a chemická ionizace [70,72].

- Elektronová ionizace je prováděna pomocí wolframového nebo rheniového vlákna, které emituje svazek elektronů. Tyto elektrony po setkání s molekulami vzorku způsobí uvolnění valenčního elektronu z molekuly analytu a dojde k tvorbě kladně nabitých iontů [73].
- Chemická ionizace je velmi podobná ionizaci elektronové. Rozdílem je pouze to, že u chemické ionizace je přítomen reaktivní plyn (methan, isobutan, amoniak...), který je elektrony ionizován přednostně. Ion-molekulárními reakcemi jsou poté ionizovány molekuly analytu za vzniku kladně i záporně nabitých iontů [73].

Poté co jsou molekuly analytů ionizovány, vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde dojde k rozdělení dle jejich  $m/z$ . Hmotnostními analyzátory jsou např. analyzátor doby letu, iontová past nebo kvadrupólový analyzátor.

- Analyzátor doby letu měří čas, za který ionty urazí pevně danou vzdálenost. Ionty jsou ve stejný čas urychleny napěťovým pulsem do oblasti bez pole, kde mají všechny ionty stejnou kinetickou energii a dochází k dělení pouze dle jejich  $m/z$  (menší ionty jsou rychlejší, větší ionty pomalejší) [70].
- Iontová past je tvořena dvěma koncovými elektrodami, mezi něž je umístěna prstencová elektroda, na kterou je vkládáno vysokofrekvenční napětí a tím se tvoří trojrozměrné pole. Napětí v pasti se s časem mění, a tím se postupně uvolňují ionty na základě rozdílných  $m/z$  [73].
- Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř vzájemně na sebe kolmých tyčí, na které je vkládáno stejnosměrné napětí a vysokofrekvenční napětí. Sousedící tyče mají vždy odlišné stejnosměrné napětí (kladné a záporné). Ionty, které se vyskytují mezi tyčemi začnou oscilovat a při určitém poměru stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí dojde k ustálení oscilací iontů o určitém  $m/z$  a projdou do detektoru. Postupně se poměr vkládaných napětí mění a jednotlivě prochází všechny ionty podle  $m/z$  [70,71].

Poslední částí hmotnostního spektrometru je detektor. Mezi nejznámější detektory patří elektronový násobič, Faradayova klec a fotonásobič.

- Elektronový násobič pracuje na principu sekundární elektronové emise. Pokud ion narazí na povrch dynody, dojde k uvolnění sekundárních elektronů. Počet uvolněných

elektronů závisí na typu a energii primárního iontu. Následně dojde k postupnému dopadu na další dynody nebo na stěnu jedné zakřivené dynody, tím se zvýší počet vyražených sekundárních elektronů a zesílí se výsledný signál [74].

- Faradayova klec měří indukovaný proud. Ionty dopadající na povrch Faradayovy klece (dynody), emitují elektrony a indukují tak proud, který se následně zesílí a zaznamenává [74].
- Principem fotonásobiče je, že ionty nejprve dopadají na konverzní dynodu a emitují sekundární elektrony. Ty poté při styku s fosforovou destičkou emitují fotony, které prochází do fotonásobiče, kde je výsledný signál zesílen stejným systémem jako u elektronového násobiče [75].

Konečným krokem je zpracování dat do výsledné podoby chromatogramu. GC-MS systémy mohou pracovat ve skenovacím (full scan) nebo SIM (selected ion monitoring) módu. Skenovací mód provede analýzu celého spektra  $m/z$  analytu a následně je možné porovnání s knihovnou spekter pro kvalitativní určení sloučenin. SIM mód, tj. monitoring vybraných iontů, umožňuje analýzu se zaměřením pouze na vybrané iont. Tento mód je tedy citlivější a lze ho lépe využít pro kvantitativní analýzu. Nevýhodou je, že nezískáme celá hmotnostní spektra  $m/z$ , tudíž nelze porovnávat s knihovnou spekter [76,77].

Možností pro analýzu akrylamidu plynovou chromatografií je mnoho. Prvním faktorem je výběr detektoru. Dále volba, zda použít derivatizační krok či ne, pokud ano, jaké činidlo zvolit. Také je důležité použití vhodné kolony, nastavení všech parametrů chromatografu atd. Otázku ohledně samotného provedení analýzy nelze zobecnit, jelikož v publikovaných experimentech se vyskytují chromatografické systémy od různých výrobců, různé typy kolon, ale také odlišné podmínky analýzy.

## GC-MS

Analýza plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní detekcí se může provádět buď pro samotný akrylamid, nebo pro jeho derivát. Jako nosný plyn se používá zejména helium, pro které se nastavuje optimální lineární rychlost 20–35 cm/s [78–80]. Vstřikovaný objem vzorku je nejčastěji 1  $\mu$ l [61,64,83], ale může se dávkovat i např. 2  $\mu$ l [78,84]. Pro dávkování vzorku jsou dvě možnosti: buď dávkovat celý vzorek přímo na kolonu, tzv. bez splitu [63,65]. Častější je dávkovat pouze část vzorku a využít rozdělení vzorku v dávkovacím prostoru (tzv. se splitem). Pokud se použije mód se splitem, může být použit splitovací poměr např. 1:50 [42,83]. Pro měření spekter akrylamidu je výhodnější použití SIM módu, jelikož poskytuje

přesnější výsledky v porovnání se skenovacím módem, ve kterém jsou detekovány i ostatní látky ve vzorku [80].

Při detekci akrylamidu bez derivatizace lze pro separaci využít kapilární kolonu se stacionární fází polyethylenglykol [79,85] nebo o složení 50 % kyanopropyl + 50 % methylpolysiloxan [82]. Teplota dávkovacího prostoru bývá obvykle 200–240 °C [79,82,86]. Teplotní gradientová eluce začíná od 80 °C a končí na 220 °C [79,82], případně může být 60–240 °C [85,86]. Sledují se ionty o  $m/z$  55 a 71 při použití elektronové ionizace [79,82,85], případně o  $m/z$  72 při pozitivní chemické ionizaci [79].

Pro bromovaný AA je vhodnou chromatografickou kolonou na separaci je kapilární kolona s polyethylenglykolem [60,78,84] nebo s 5% fenylem a 95% dimethylpolysiloxanem jako stacionární fází [78,81]. Teplota vstřikovacího prostoru může být 180 °C [81], 240 °C [78] nebo 260 °C [60]. Teplotní gradient lze použít v rozmezí 50–260 °C [60,78,84]. Ionty se sledují při  $m/z$  149 nebo 151 pro elektronovou ionizaci [78,84], případně  $m/z$  152 pro pozitivní chemickou ionizaci [81].

Pro akrylamid derivatizovaný xanthidolem se využívá zejména nepolární kapilární kolona se stacionární fází složenou z 5 % fenylu a 95 % dimethylpolysiloxanu [42,43,61,63,64,80,83]. Dávkovací prostor je vyhříván na teplotu 250 °C [63,65,80] nebo 290 °C [42,43,61,64,83]. Eluce se provádí s využitím teplotního programu na koloně a teplota se pohybuje v rozmezí 40–300 °C [42,43,61,63,64,65,80,83]. S použitím elektronové ionizace se identifikuje při  $m/z$  207, 234 [42,43,61,64,65,83] nebo 251 [63,80,83].

Jako vnitřní standardy pro nederivatizovaný i derivatizovaný AA se mohou využít izotopicky značený  $^{13}\text{C}_3$ -akrylamid [65,78,81], deuteriovaný  $\text{D}_3$ -akrylamid [60,63,80,82] nebo acetamid [61,64].

## GC-ECD

Detektor elektronového záchytu (ECD) funguje na principu, že vodivost v ionizační komůrce se mění, pokud jsou přítomny cizí ionty. ECD je složen z ionizační komůrky, která obsahuje radioaktivní zdroj  $\beta$ -záření ( $^{63}\text{Ni}$ ), trysku přivádějící inertní plyn (dusík) a sběrné elektrody mezi nimiž prochází ionizační proud.  $\beta$ -paprsky ionizují inertní plyn a tvoří tok volných elektronů. Při vstupu eluentu z kolony na detektor dochází k reakci s volnými elektrony a tvorbě záporných iontů, které se pohybují pomaleji než volné elektrony. Tím dochází k poklesu toku proudu, což se prokáže jako vznikající pík [92].

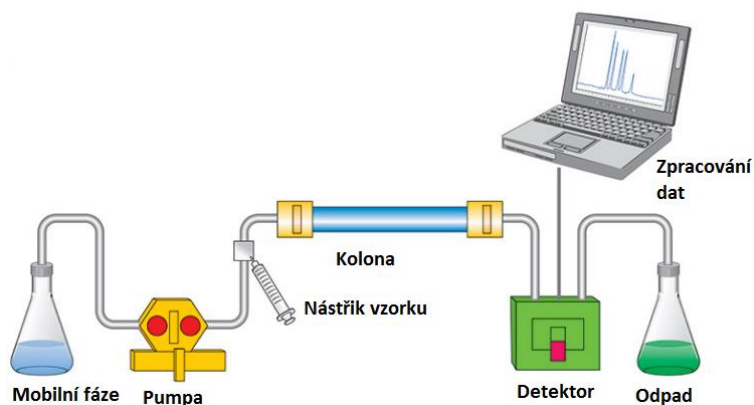
Při použití plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu se akrylamid může derivatizovat např. bromací [87] nebo pomocí anhydridu kyseliny trifluoroctové [45].

Používají se kapilární kolony s polyethylenglykolem [87] nebo s 5 % fenylsiloxanu a 95 % dimethylpolysiloxanu [45]. Jako nosný plyn se může použít vodík [45] nebo dusík [87]. Teplotní program je v rozmezí 60–280 °C [45,87]. Teplota ECD je shodná s koncovou teplotou gradientu, a to např. 260 °C [87] nebo 280 °C [45].

### 1.6.3.2 Kapalinová chromatografie

Nejvíce využívaným typem kapalinové chromatografie je v této době tzv. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze jsou částice kulovitého tvaru o velikosti 3–6 µm, z tohoto důvodu se pracuje s vysokými tlaky (až 120 MPa), aby bylo možné čerpat mobilní fází kolonou. Nejčastější stacionární fází jsou částice na bázi silikagelu, protože odolávají vysokým tlakům a mohou být jednoduše modifikovány podle potřebné polarit. V HPLC se používají dva systémy podle polarit mobilní fáze. Prvním je systém s obrácenými fázemi (RP), kde je mobilní fáze polárnější než fáze stacionární. Druhým případem je systém s normálními fázemi (NP). V tomto případě je polárnější stacionární fáze [88,89].

Na Obrázku 19 je schéma kapalinového chromatografu, který se skládá ze zásobníků s mobilní fází, odkud se pomocí pumpy čerpá mobilní fáze dále do přístroje: dávkovacího zařízení pro nástřik vzorku, kolony, detektoru a odpadu [89].



Obrázek 19: Schéma kapalinového chromatografu [90]

### HPLC-MS

Analýza akrylamidu metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí se může provádět bez derivatizace. Ionizační technika může být ionizace elektrosprejem (ESI) [47] nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [44,47,46]. Ionty akrylamidu se sledují při  $m/z$  55 a 72. Na separaci se používá se oktadecylová (C18) stacionární fáze navázaná na

silikagelu jako nosiči a mobilní fázi může být směs např. 0,01mM kyselina octové s 0,2 % kyseliny mravenčí [46] nebo 10mM kyselina mravenčí [47]. Pro detekci se využívá kvadrupólový hmotnostní spektrometr [44,46,47].

### **HPLC-UV**

Akrylamid může být po separaci detekován přímo bez derivatizace pomocí UV detektoru [57,58,60] nebo se využije zlepšení citlivosti derivatizací, např. s 2-naftalenthiolem [49] nebo bromací [60]. Kolona se používá C18. K separaci za izokratických podmínek může být použita např. směs acetonitril/voda (60:40) [49] nebo se může použít gradientová eluce s kombinací acetonitrilu/voda (1:24) a čistého acetonitrilu [57]. Separace v gradientové eluci lze dosáhnout také s použitím vodné mobilní fáze (MF-A) a směsi methanol/acetonitril (50:50, MF-B) [60]. Nederivatizovaný AA byl detekován při vlnových délkách 210 a 225 nm [57], bromovaný při 205 a 220 nm [60] a derivatizovaný pomocí 2-naftalenthionu při 254 nm [49].



## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a zařízení

- Plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA)
- Kvadrupólový hmotnostní detektor s elektronovou ionizací Agilent 5977A (Agilent Technologies, USA)
- Chromatografická kolona SLB-5ms, 30 m × 0,25 mm × 0,5 μm (Bellefonte, PA, USA)
- Centrifuga Sorvall ST Plus Series (Fisher Scientific, USA)
- Centrifuga NF 400 (NÜVE, Turecko)
- Ultrazvuk Sonorex TK52 (Bandelin, Německo)
- Analytické váhy KERN ABT 220 (Kern & Sohn, Německo)
- Vortex 1 (IKA, Německo)
- Rotační třepačka Rotator multimix (VWR International, Česká republika)
- Injekční stříkačky
  - Gastigh 1002 (Hamilton, Švýcarsko)
  - Microliter 702 (Hamilton, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Eppendorf, Česká republika; Biohit, Helsinky, Finsko)

### 2.2 Chemikálie

- Hydroxid draselný, p.a. (Penta, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan draselný, p.a. (Merck, Německo)
- Tetrachlormethan, p.a. (Penta, Česká republika)
- Methanol, ≥99,9 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol, Uvasol® (Merck, Německo)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Česká republika)
- Carrezovo čiřidlo I. (30% síran železnatý)
- Carrezovo čiřidlo II. (15% hexakynoželeznatan draselný)
- Xanthidrol, 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Akrylamid monomer, >98 % (TCI, Belgie)
- Methakrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetamid, ≥98 % (Sigma-Aldrich, Německo)

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Příprava muffinů

Pečivem, ve kterém byl sledován obsah akrylamidu, byly domácí muffiny vyrobené ze tří druhů mouk (pšeničná hladká, špaldová a kokosová). Všechny vzorky byly připraveny podle stejného receptu: 250 g mouky, 100 g cukru, 2 lžičky prášku do pečiva, špetka soli, 1 vanilkový cukr, 2 středně velká vejce, 200 ml mléka, 85 g másla.

Změklé máslo, vejce a mléko byly prošlehány dohromady. V jiné nádobě byly smíchány všechny sypké ingredience. Poté byly obě směsi promíchány dohromady v hladké těsto, které bylo ihned plněno do formiček a formičky s těstem byly vloženy do předem vyhřáté trouby. Podmínky pečení muffinů jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Podmínky pečení muffinů

Typ mouky	Teplota [°C]	Čas [min]
<b>Pšeničná hladká</b>	180	18
<b>Pšeničná hladká</b>	180	30
<b>Špaldová</b>	180	30
<b>Kokosová</b>	180	30

Muffiny z pšeničné mouky pečené 18 minut sloužily jako matrice pro optimalizaci metody a kalibrační závislost. Ostatní byly pečené po dobu 30 minut.

### 2.3.2 Příprava standardních roztoků

Zásobní roztoky (ZR-AA; ZR-ACA; ZR-ACA) standardů akrylamidu (AA), acetamidu (ACA) a methakrylamidu (MAA) o koncentraci 2 mg/ml byly připraveny navážením přesně cca 0,02 g do 10ml odměrné baňky a doplněné methanolem po rysku.

Ze zásobního roztoku akrylamidu byl připraven pracovní roztok (PR-AA) o koncentraci 20 µg/ml odpipetováním 500 µl zásobního roztoku akrylamidu do 50ml odměrné baňky a doplněním po rysku methanolem. Přehled koncentrací standardních roztoků je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4: Koncentrace ZR a PR standardů

Roztok	c [µg/ml]
ZR-AA	2 000
ZR-ACA	2 000
ZR-MAA	2 000
PR-AA	20

### 2.3.3 Příprava reakčních roztoků

Z některých výše uvedených chemikálií (viz kapitola 2.2) byly dále připraveny roztoky:

- 2M hydroxid draselný – 11,4 g hydroxidu draselného ve 100ml odměrné baňce doplněné po rysku destilovanou vodou
- 2M hydrogenfosforečnan draselný – 34,8 g hydrogenfosforečnanu draselného ve 100ml odměrné baňce doplněné po rysku destilovanou vodou
- 1M kyselina chlorovodíková – 8,77 ml 35% kyseliny chlorovodíkové ve 100ml odměrné baňce doplněné po rysku destilovanou vodou
- Xanthidrol 25 mg/ml – 0,05 g xanthidrolu ve 2 ml methanolu
- Carrezovo čiřidlo I – 60 g síranu zinečnatého ve 200ml odměrné baňce doplněné po rysku destilovanou vodou
- Carrezovo čiřidlo II – 30 g hexakvanoželeznatanu draselného ve 200ml odměrné baňce doplněné po rysku destilovanou vodou

### 2.3.4 Příprava roztoků pro optimalizaci DLLME extrakce

Byla provedena homogenizace vnitřní části muffinu pečeného po dobu 18 minut: těsto bylo důkladně rozdrobeno a promícháno v suché a čisté kádince. 1 g této matrice byl navážen do 50ml centrifugační zkumavky. Do matrice bylo pipetováno 25  $\mu$ l ZR-ACA a 25  $\mu$ l ZR-MAA jako vnitřní standardy a 500  $\mu$ l PR-AA, aby koncentrace akrylamidu v matrici odpovídala 10  $\mu$ g/g. Bylo přidáno 10 ml směsi destilovaná voda/ethanol (90:10, V/V), směs byla na 20 vteřin vložena do ultrazvukové lázně, poté třepána po dobu 2 minut a odstředěna při RCF 6 683 $\times$ g po dobu 5 minut. 9 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 50ml centrifugační zkumavky a pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na 3. Byl přidán 1 ml roztoku Carrez I a 1 ml roztoku Carrez II. Směs byla opět třepána po dobu 2 minut a odstředěna (RCF = 6 683 $\times$ g, 5 minut). 9 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 50ml centrifugační zkumavky k derivatizaci (viz kapitola 2.3.7). Poté byla provedena DLLME stejným postupem jako v kapitole 2.3.8, pouze s tím rozdílem, že objemy extrakčního a disperzního rozpouštědla byly měněny podle parametrů Plánování experimentu (DOE), které jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Objemy extrakčního a disperzního rozpouštědla pro optimalizaci DLLME

<b>Pokus</b>	<b>Replikace</b>	<b>Extrakční rozpouštědlo [μl]</b>	<b>Disperzní rozpouštědlo [μl]</b>
<b>1</b>	1	80	400
<b>2</b>	1	80	800
<b>3</b>	1	120	400
<b>4</b>	1	120	800
<b>5</b>	1	72	600
<b>6</b>	1	128	600
<b>7</b>	1	100	317
<b>8</b>	1	100	883
<b>9 (C)</b>	1	100	600
<b>10 (C)</b>	1	10	600
<b>11</b>	2	80	400
<b>12</b>	2	80	800
<b>13</b>	2	120	400
<b>14</b>	2	120	800
<b>15</b>	2	72	600
<b>16</b>	2	128	600
<b>17</b>	2	100	317
<b>18</b>	2	100	883
<b>19 (C)</b>	2	100	600
<b>20 (C)</b>	2	100	600

### 2.3.5 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky byly připraveny prakticky stejným postupem jako roztoky pro optimalizaci DLLME extrakce (kapitola 2.3.4). Byla provedena homogenizace vnitřní části muffinu (pečeného 18 minut): těsto bylo důkladně rozdrobeno a promícháno v suché a čisté kádince. 1 g této matrice byl navážen do 50ml centrifugační zkumavky. Do matrice bylo pipetováno 25 μl ZR-ACA a 25 μl ZR-MAA jako vnitřní standardy. Dále byly pipetovány jednotlivé objemy akrylamidu (viz Tabulka 6). Současně byl připraven slepý pokus bez přídavku akrylamidu. Bylo přidáno 10 ml směsi destilovaná voda/ethanol (90:10, V/V), směs byla na 20 vteřin vložena do ultrazvukové lázně, poté třepána po dobu 2 minut a odstředěna při RCF 6 683×g po dobu 5 minut. 9 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 50ml centrifugační zkumavky a pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na 3. Byl přidán 1 ml roztoku Carrez I a 1 ml roztoku Carrez II. Směs byla opět třepána po dobu 2 minut a odstředěna (RCF = 6 683×g, 5 minut). 9 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 50ml centrifugační zkumavky k derivatizaci.

Tabulka 6: Pipetované objemy standardů pro přípravu kalibrační závislosti

AA			ACA		MAA	
Koncentrace [µg/g]	Použitý roztok	Objem [µl]	Koncentrace [µg/g]	Objem [µl]	Koncentrace [µg/g]	Objem [µl]
40	ZR-AA	20	50	25	50	25
24	ZR-AA	12	50	25	50	25
10	PR-AA	500	50	25	50	25
5	PR-AA	250	50	25	50	25
1	PR-AA	50	50	25	50	25

Koncentrace standardů pro kalibrační závislost a následně i pro výpočet akrylamidu ve vzorku jsou uváděny jako µg analytu (AA, ACA nebo MAA) v 1 g matrice (resp. vzorku).

### 2.3.6 Příprava vzorků

Vzorek muffinu byl důkladně rozdroben do suché a čisté kádinky a promíchán. 1 g vzorku byl navážen do 50ml centrifugační zkumavky. K těstu bylo pipetováno 25 µl ZR-ACA a 25 µl ZR-MAA jako vnitřní standardy. Bylo přidáno 10 ml směsi destilovaná voda/ethanol (90:10, V/V), směs byla na 20 vteřin vložena do ultrazvukové lázně, poté třepána po dobu 2 minut a odstředěna při RCF 6 683×g po dobu 5 minut. 9 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 50ml centrifugační zkumavky a pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na 3. Byl přidán 1 ml roztoku Carrez I a 1 ml roztoku Carrez II. Směs byla opět třepána po dobu 2 minut a odstředěna (RCF = 6 683×g, 5 minut). 9 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 50ml centrifugační zkumavky k derivatizaci.

### 2.3.7 Derivatizace pomocí xanthidrolu

K supernatantu po centrifugaci (viz kapitola 2.3.4–2.3.6) bylo přidáno 60 µl xanthidrolu o koncentraci 25 mg/ml, který byl připravován každý den čerstvý, a 2 ml kyseliny chlorovodíkové (1M). Směs byla ponechána 30 minut v temnu za stálého míchání. Po uplynutí této doby bylo přidáno 2 ml hydroxidu draselného (2M) a 2 ml hydrogenfosforečnanu draselného (2M). Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo pH upraveno na hodnotu cca 7 a směs byla odstředěna (RCF = 6 683×g, 5 minut). 12 ml horní čiré fáze bylo odebráno do 15ml centrifugační zkumavky a odstředěno (RCF = 2 490×g, 10 minut). 10 ml horní čiré fáze bylo odebráno do nové 15ml centrifugační zkumavky k provedení extrakce xanthyl-derivátů (XH-AA, XH-ACA, XH-MAA).

### 2.3.8 Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

Byla připravena extrakční směs smísením 100  $\mu\text{l}$  tetrachlormethanu (extrakční rozpouštědlo) a 600  $\mu\text{l}$  ethanolu (disperzní rozpouštědlo). 700  $\mu\text{l}$  extrakční směsi bylo odměřeno do injekční stříkačky a následně prudce vstříknuto 2 cm pod hladinu supernatantu získaného po derivatizaci xanthidolem. Po dobu 1 minuty byla směs mírně míchána a poté odstředěna (RFC = 2 490 $\times$ g, 10 minut). Injekční stříkačkou byla odebrána spodní fáze (tetrachlormethan) do vialky k analýze pomocí GC-MS.

### 2.3.9 Podmínky GC-MS

Hmotnostní spektra byla snímána v SIM módu s použitím elektronové ionizace (70 eV). Byly snímány ionty, které jsou uvedeny v Tabulce 7. Pro kvantitativní analýzu byly zvoleny molekulové ionty, které jsou v tabulce vyznačeny tučně. Ostatní podmínky plynového chromatografu a hmotnostní detekce jsou uvedeny v Tabulkách 8 a 9.

Tabulka 7: Přehled snímaných iontů pomocí SIM módu

Derivát xanthidrolu (XH)	<i>m/z</i>
XH-AA	196; 207; 234; <b>251</b>
XH-MAA	196; 248; <b>265</b>
XH-ACA	196; <b>239</b>

Tabulka 8: Experimentální podmínky GC

<b>Kolona</b>	SLB-5ms (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,5 $\mu\text{m}$ )
<b>Nosný plyn</b>	Helium
<b>Průtok nosného plynu</b>	1 ml/min
<b>Dávkovaný objem vzorku</b>	1 $\mu\text{l}$
<b>Splitovací poměr</b>	5:1
<b>Teplotní program</b>	Počáteční teplota: 100 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) Gradient: 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ Konečná teplota: 300 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)
<b>Teplota nástřiku</b>	290 $^{\circ}\text{C}$

Tabulka 9: Experimentální podmínky MS

<b>Ionizace</b>	Pozitivní elektronová ionizace
<b>Gain factor</b>	10
<b>Solvent delay</b>	3 minuty
<b>Frekvence skenování</b>	6 skenů/s
<b>Teplota EI zdroje</b>	300 $^{\circ}\text{C}$
<b>Teplota kvadrupólu</b>	150 $^{\circ}\text{C}$
<b>Teplota MSD Transfer Line</b>	300 $^{\circ}\text{C}$

### **2.3.10 Experimentální zpracování dat**

Veškeré výsledky GC-MS analýz se interpretovaly v programu Agilent MassHunter (Agilent Technologies, USA) a následně zpracovaly v programu Microsoft Excel a Microsoft Word. K optimalizaci DLLME pomocí metody Plánování experimentu (DOE: Design of experiment) byl využit program Statistica 12 (StatSoft, ČR). Dále byl využit program QC Expert (TriloByte Statistical Software, ČR) pro zjištění významnosti členů kalibrační rovnice.

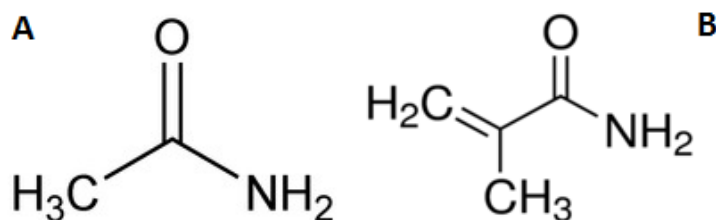
### 3 Výsledky a diskuze

Akrylamid je považován za potenciální karcinogen a jeho množství je sledováno u potravin ve kterých se nejvíce vyskytuje. Mimo kávy, bramborových lupínků nebo hranolek s největším výskytem AA je pečivo jednou z těchto potravin. Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat GC-MS metodu na stanovení akrylamidu v potravinách a také zjistit, jaký vliv má druh použité mouky při výrobě pečiva na výsledný obsah akrylamidu v pekařském výrobku. Metoda GC-MS byla vybrána proto, že se jedná o nejpoužívanější metodu na stanovení akrylamidu.

#### 3.1 Optimalizace GC-MS metody

Metodu bylo nutné optimalizovat, aby byly nalezeny nejvhodnější podmínky přípravy vzorku a následné analýzy pomocí GC-MS. Byla provedena optimalizace přípravy vzorku, optimalizace kapalinové disperzní mikroextrakce (DLLME) s cílem co nejvíce snížit mez detekce, a také optimalizace GC a MS. Bylo také zkoumáno, zda je možné stanovit akrylamid přímo, nebo je lepší provést derivatizaci.

Kvantifikace s využitím hmotnostní detekce pomocí externí kalibrační závislosti je problematické z důvodu změny ionizace látek s časem. Také postupně dochází ke snižování intenzity iontů a tím ke snižování (zmenšování) piků. Z tohoto důvodu byl na kvantifikaci použit vnitřní standard, kterým byly dvě sloučeniny: acetamid (ACA) a methakrylamid (MAA) (Obrázek 20). Obě tyto látky se podobají svou strukturou i vlastnostmi akrylamidu. Použitím obou vnitřních standardů zároveň bylo umožněno jejich porovnání a následně posouzení, který z nich je vhodnější pro zamýšlené použití.



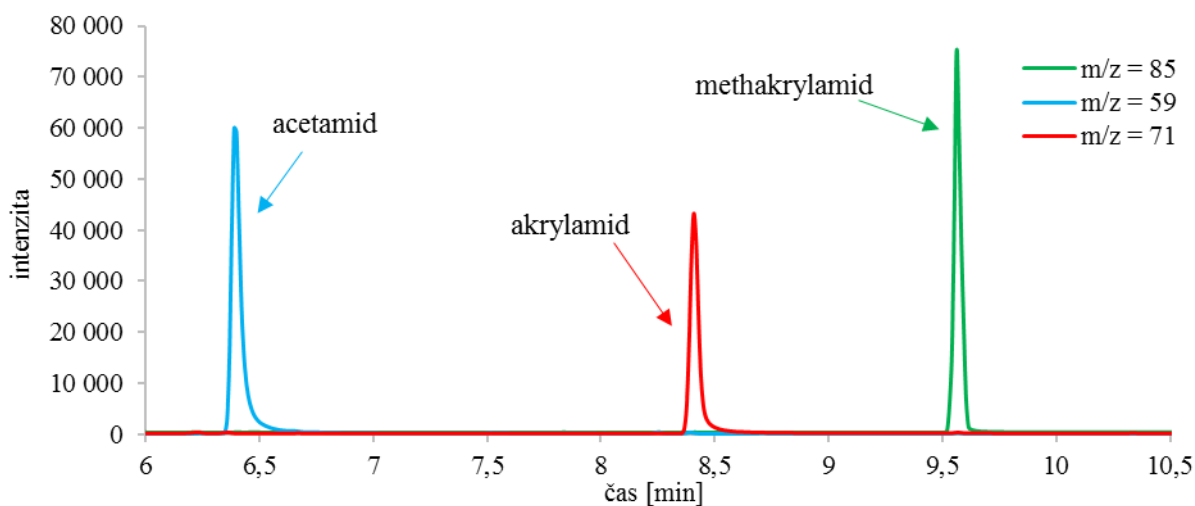
Obrázek 20: Struktura acetamidu (A) [93] a methakrylamidu (B) [94]



### 3.1.1 Optimalizace GC

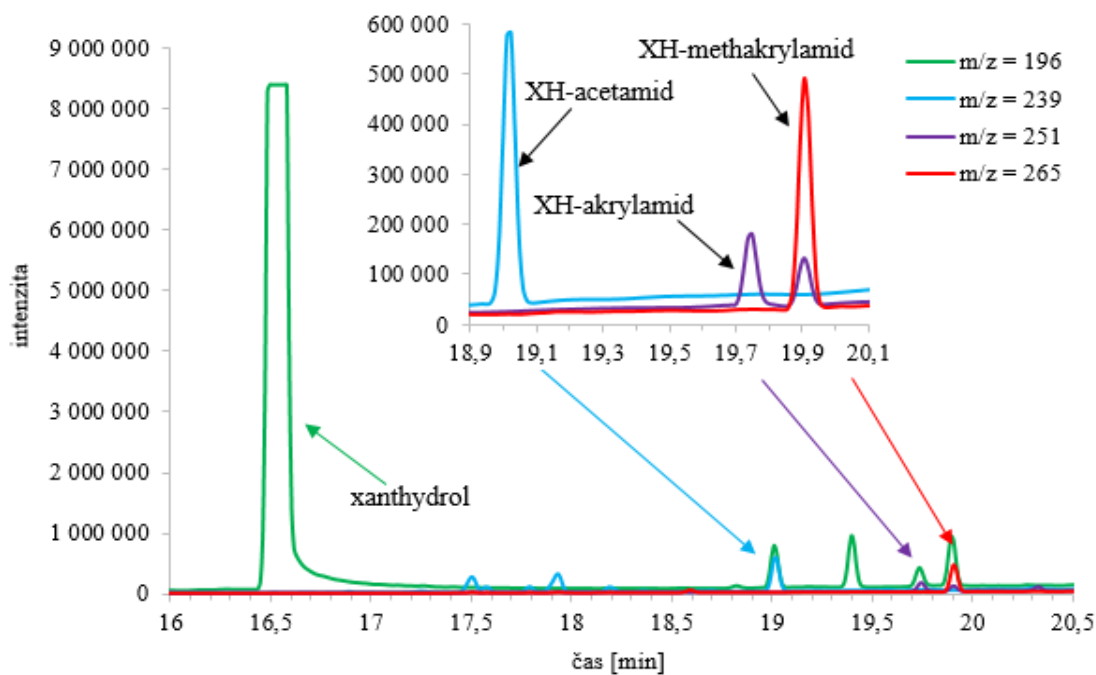
U podmínek plynové chromatografie byl optimalizován pouze teplotní program. Ostatní parametry byly převzaty z literatury [42,43,64]. Byla snaha o to, aby analýza trvala co nejkratší možnou dobu, a proto bylo provedeno několik pokusů s různými teplotními gradienty. Jako nejvhodnější byl zvolen teplotní program s gradientem teploty 100–300 °C, kdy analýza trvala cca 20 minut a došlo k separaci jak akrylamidu, acetamidu a methakrylamidu, tak jejich derivátů s xanthidolem.

Retenční čas acetamidu ( $m/z$  59) za konečných podmínek GC separace uvedených v kapitole 2.3.9 byl 6,5 minut, akrylamidu ( $m/z$  71) 8,5 minut a methakrylamidu ( $m/z$  85) 9,5 minut (Obrázek 21).



Obrázek 21: SIM chromatogram nederivatizovaných standardů (AA+ACA+MAA), 100 µg/ml

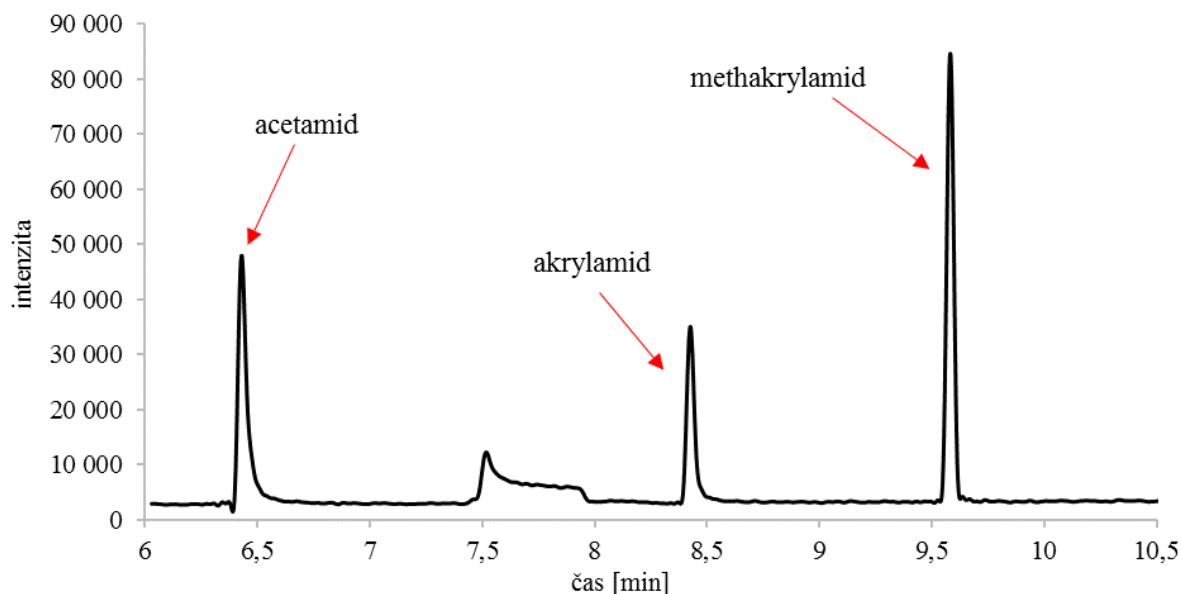
Na Obrázku 22 je znázorněn SIM chromatogram vybraných iontů. Retenční čas derivátu xanthyl-acetamidu (XH-ACA) byl 19,0 min ( $m/z$  239), xanthyl-akrylamidu (XH-AA) 19,8 min ( $m/z$  251) a xanthyl-methakrylamidu (XH-MAA) 19,9 min ( $m/z$  265). Dále je na obrázku patrný velký pík s retenčním časem 16,5 min ( $m/z$  196), který odpovídá nezreagovanému derivatizačnímu činidlu xanthidrol. Iont  $m/z$  196 je také možné pozorovat u každého píku derivatizovaného standardu, neboť vlivem ionizace dochází k odštěpení iontu xanthidrolu. Je tedy zřejmé, že xanthidrol do vzorku je přidán v dostatečném množství a je v nadbytku.



Obrázek 22: SIM chromatogram vybraných iontů o  $m/z$  196; 239; 251 a 265

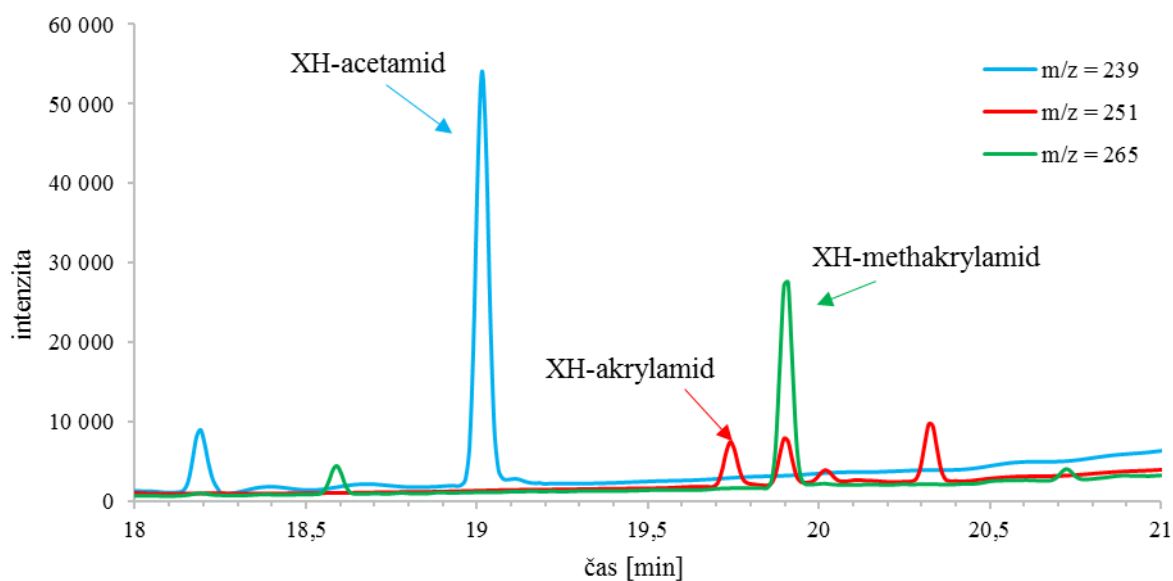
### 3.1.2 Optimalizace MS

Optimalizace podmínek detekce chromatografické analýzy byla uskutečněna v několika krocích. Nejprve byly provedeny analýzy samotných nederivatizovaných standardů o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  bez extrakce ve skenovacím módu v rozmezí  $m/z$  40–400 (viz Obrázek 23) a následně v SIM módu (viz Obrázek 21), který byl více selektivní a vhodnější pro kvantifikaci známých analytů. Díky použití SIM módu také vzrostla citlivost metody, neboť detektor nemusí skenovat celé vybrané spektrum iontů.



Obrázek 23: TIC chromatogram nederivatizovaných standardů (AA+ACA+MAA), 100  $\mu\text{g/ml}$

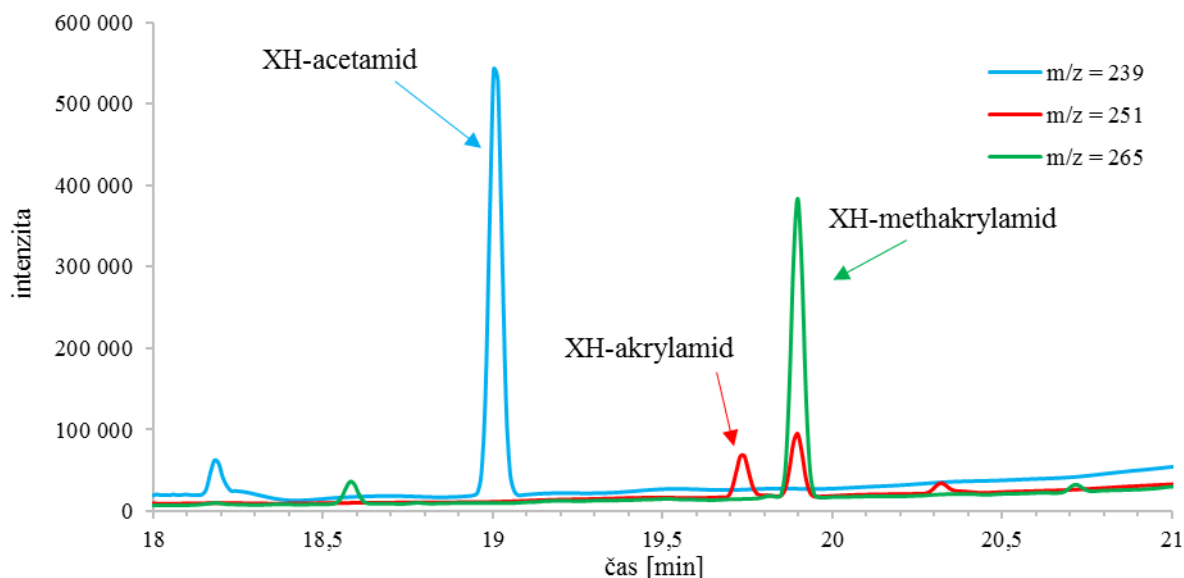
Poté byla provedena derivatizace analytů s xanthidolem, již s celým procesem úpravy matrice a DLLME s cílem efektivnější kvantifikace a snížení meze detekce (viz kapitola 2.3.4; 2.3.7; 2.3.8). Derivatizované standardy (xanthyl-deriváty) byly detekovány v SIM módu. Přehled snímaných iontů je uveden v Tabulce 7. Pro analýzu bylo použito nastavení s gain factorem 1. Jako nejvhodnější pro kvantifikaci byly zvoleny molekulové ionty o  $m/z$ : 251 (XH-akrylamid), 239 (XH-acetamid) a 265 (XH-methakrylamid). Chromatogramy všech tří derivátů jsou společně zobrazeny na Obrázku 24. Ukázky chromatogramů ostatních iontů ( $m/z = 196, 207, 234, 248$ ) jsou v Příloze 1–4.



Obrázek 24: SIM chromatogram xanthyl-derivátů standardů (AA+ACA+MAA), 5  $\mu\text{g/ml}$ , GF 1

Díky xanthidolu dochází ke zvýšení molekulové hmotnosti, zvýšení citlivosti detekce a je umožněna detekce nižších koncentrací. Porovnáním Obrázků 21 a 24 lze vidět, že píky nederivatizovaných standardů o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  vykazují podobnou intenzitu jako xanthyl-deriváty o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  (XH-ACA, XH-MAA).

Následně byla provedena stejná analýza xanthyl-derivátů pouze s tím rozdílem, že faktor zisku elektronového násobiče (gain factor, GF) hmotnostního detektoru byl pro zesílení výsledného signálu nastaven z hodnoty 1 na hodnotu 10. Chromatogramy molekulových iontů jsou na Obrázku 25. Toto nastavení bylo poté použito pro veškeré následné analýzy.



Obrázek 25: SIM chromatogram xanthyl-derivátů standardů (AA+ACA+MAA), 5 µg/ml, GF 10

### 3.2 Optimalizace přípravy vzorku

Byla provedena optimalizace postupu přípravy vzorku, kdy byly zkušeny různé objemy, poměry a druhy extrakčních roztoků a také byl zkoumán vliv matrice a přídavku Carrezových čířidel.

Extrakční roztoky slouží k extrakci akrylamidu z matrice. Zpočátku byly provedeny pokusy pouze se standardy bez matrice. Jako hlavní extrakční roztok byla zvolena destilovaná voda, jelikož akrylamid vykazuje velmi dobrou rozpustnost ve vodě (až 390 g/l). Druhým extrakčním roztokem byl methanol. První pokusy byly s 20 ml směsí extrakčních roztoků o složení destilovaná voda/methanol (80:20). V tomto složení bylo zjištěno, že nedochází k rozdělení fází při následné disperzní mikroextrakci. Bylo tedy zkušeno 20 ml stejné směsi, destilovaná voda/methanol, s poměrem 90:10, ale ani v tomto případě nedošlo k rozdělení fází při DLLME. Následně se provedly další pokusy, kdy bylo zkoumáno použití pouze samotné destilované vody a dále směs destilovaná voda/ethanol (80:10 a 90:10). Při těchto pokusech již došlo k oddělení fází při extrakci kapalinou. Poté byly tyto extrakční roztoky použity pro pokusy s matricí. K 1 g matrice, upravené destilovanou vodou do konzistence těsta, bylo přidáno 10 ml extrakčních roztoků. Rozdělení fází při DLLME proběhlo u všech tří typů extrakčních roztoků. Matrice tedy neměla vliv na výsledné dělení fází. Jako nejvhodnější extrakční roztok byla vybrána směs destilovaná voda/ethanol (90:10).

Carrezova čířidla slouží k odstranění interferentů jako jsou např. bílkoviny. Byly provedeny pokusy s jedním čířením a dvěma čířeními provedenými postupně za sebou s cílem

co nejvíce odstranit pevné a interferující složky vzorku. Při použití Carrezových čířidel ve dvou krocích bylo zjištěno, že část standardů je zachyceno výslednou sraženinou hexakvanoželeznatanu zinečnatého. Dochází tak ke snížení koncentrace a tím ke komplikacím při detekci a kvantifikaci. Bylo tedy zvoleno pouze jedno číření.

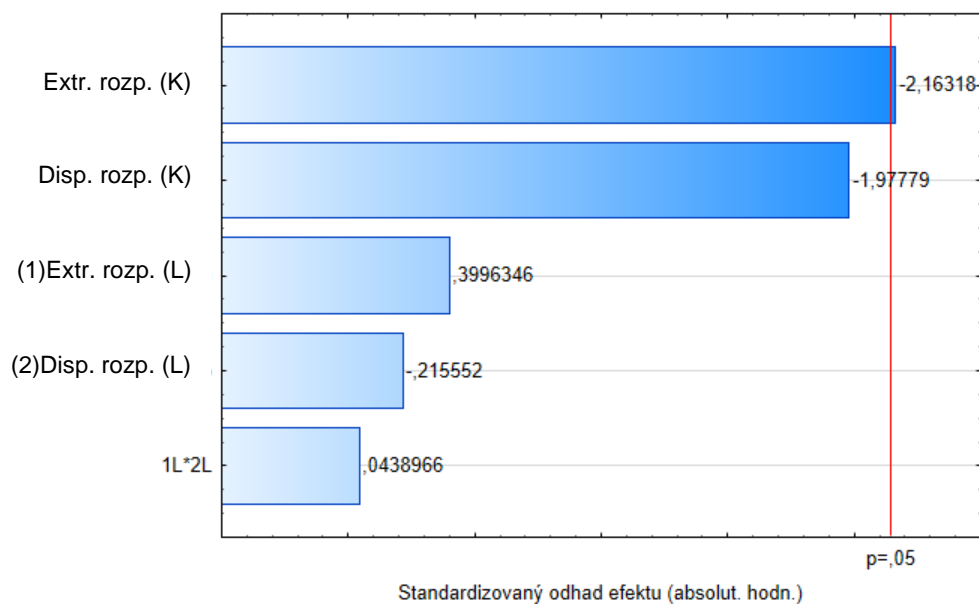
### 3.3 Optimalizace extrakce

Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME) je metoda, která se provádí nastříknutím směsi extrakčního a disperzního rozpouštědla do vzorku, čímž dojde k rozptýlení extrakčního rozpouštědla ve formě mikrokapiček a tím i k rychlé a účinné extrakci analytu.

DLLME byla v této práci využita proto, že je rychlá, jednoduchá a spotřebuje se pouze malé množství rozpouštědel, řádově desítky až stovky mikrolitrů. Dalším důvodem bylo to, že akrylamid se ve vzorcích vyskytuje v nízkých koncentracích. Bylo tedy potřeba provést zakoncentrování z původního vodno-ethanolického roztoku, který sloužil k vyextrahování AA ze vzorku, a dostáhnout tak nízké meze detekce. Za disperzní rozpouštědlo byl zvolen ethanol, jelikož byl již v roztoku se vzorkem přítomen, a za extrakční rozpouštědlo tetrachlormethan.

Optimalizace podmínek DLLME, tedy vhodného poměru extrakčního rozpouštědla (tetrachlormethan) a disperzního rozpouštědla (ethanol), byla provedena pomocí metody Plánování experimentu (DOE). Dále bylo zjišťováno, zda mají tyto kombinace rozpouštědel významný vliv na účinnost extrakce akrylamidu a vnitřního standardu, kterým byl methakrylamid. Byl použit pouze jeden vnitřní standard, jelikož methakrylamid a acetamid mají podobné chemické struktury a vlastnosti. Přesný postup je uveden v kapitole 2.3.4. Jelikož je akrylamid velmi dobře rozpustný ve vodě, neochotně by přecházel do extrakčního rozpouštědla, bylo nutné před vlastní extrakcí přidat do roztoku vzorku hydrogenufosforečnan draselný a hydroxid draselný. Tento krok způsobí vysolení analytů a jejich přechod do extrakčního činidla.

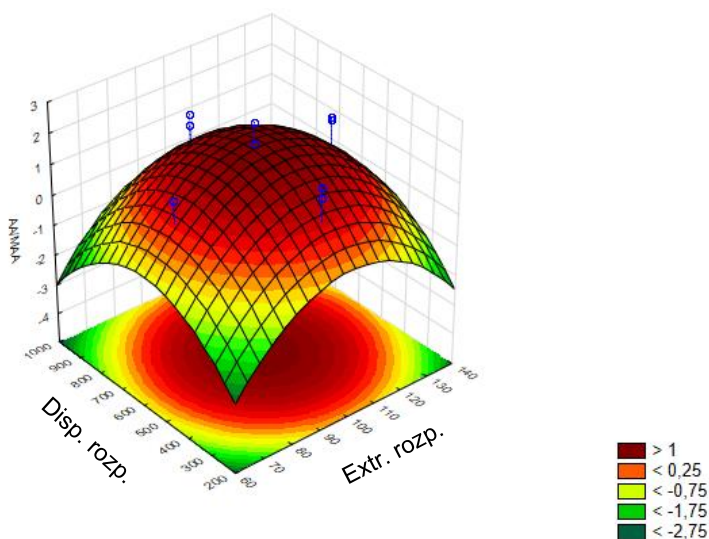
K optimalizaci byl využit program Statistica a metoda plánování experimentu (DOE). Byl zvolen centrální kompozitní design experimentu, dva faktory a každá extrakce byla provedena ve dvou opakováních. Vstupními faktory byly objem extrakčního rozpouštědla (80; 100 a 120  $\mu$ l) a objem disperzního rozpouštědla (400; 600 a 800  $\mu$ l). Výsledným a sledovaným parametrem byl poměr ploch píků akrylamidu a methakrylamidu. Vstupní i výstupní parametry DOE jsou uvedeny v Příloze 5 a výsledky jsou zobrazeny na Obrázcích 26; 27 a v Příloze 6.



Obrázek 26: DOE – Paretův graf standardizovaných efektů

Paretův graf na Obrázku 26 zobrazuje, že objem extrakčního rozpouštědla (tetrachlormethan) je významný parametr ovlivňující extrakci ( $p > 0,05$ ). Čím větší je hodnota  $p$ , tím více daný parametr ovlivňuje účinnost extrakce. Objem tetrachlormethanu má tedy vliv na výsledný poměr ploch píků AA/MAA, tudíž i na koncentraci akrylamidu.

Obrázek 27 zobrazuje závislost poměru ploch píků (AA/MAA) na extrakčním rozpouštědle a disperzním rozpouštědle. Červená barva udává nejvhodnější složení extrakčních rozpouštědel, kdy jsou plochy píků, a tedy i poměry ploch největší. Při tomto složení dochází k neúčinnější extrakci. Z obrázku je patrné, že nejvhodnější kombinací objemů rozpouštědel je 100  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla (tetrachlormethan) a 600  $\mu$ l disperzního rozpouštědla (ethanol).

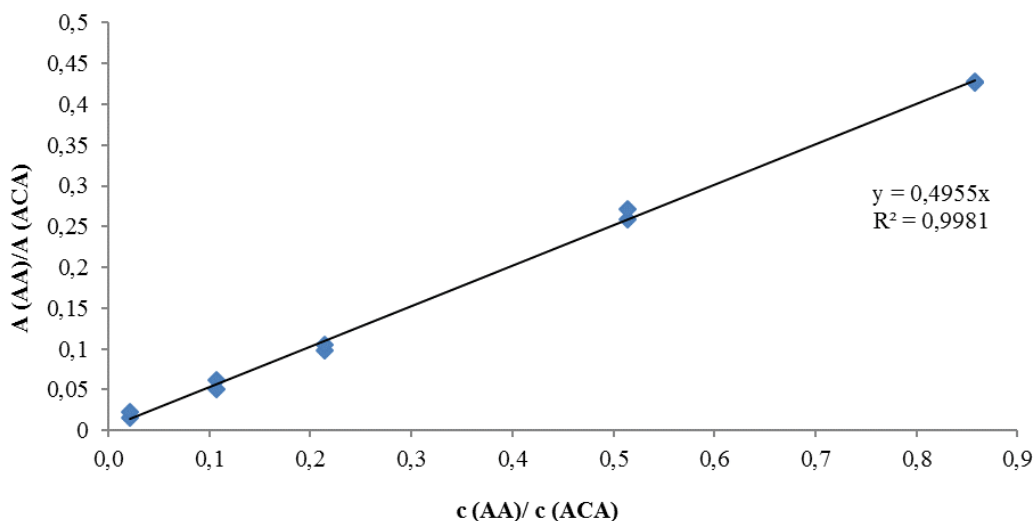


Obrázek 27: DOE – vliv objemů extrakčních rozpouštědel na poměr ploch AA/MAA

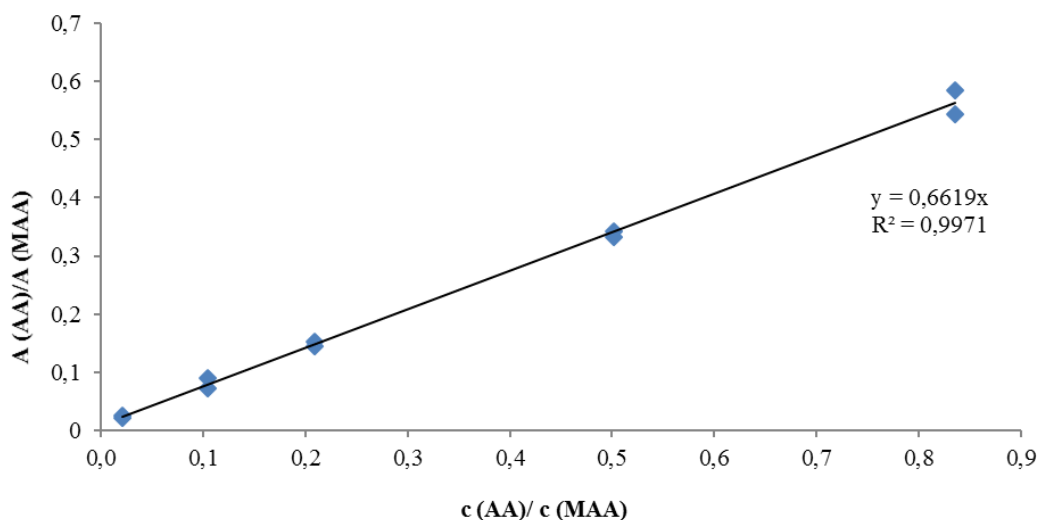
### 3.3.1 Kalibrační závislost

Kvantifikace AA byla provedena na základě kalibrační závislosti, která byla provedena tak, že jednotlivé kalibrační body byly připravovány do matrice ještě před vlastní úpravou, derivatizací a extrakcí. Tím se do kalibrační závislosti zahrnuly matriční efekty, vliv extrakce i vliv derivatizace. Matrici tvořil muffin vyrobený z hladké pšeničné mouky pečený po dobu 18 minut. Vnitřní standardy byly použity dva, acetamid a methakrylamid, aby bylo možné je mezi sebou porovnat a zajistit tak větší přesnost výsledků, případně vybrat pouze jeden, který by vykazoval lepší použitelnost.

Kalibrační závislost byla složena z 5 bodů s různou koncentrací AA (1–40  $\mu\text{g/g}$ ) a stejnou koncentrací vnitřního standardu (viz Tabulka 6). Každý kalibrační bod byl připraven ve dvou opakováních. Po separaci pomocí optimalizované GC-MS metody a odečtení hodnot ploch píků akrylamidu, acetamidu a methakrylamidu (viz Příloha 9–11) byly vytvořeny dvě kalibrační závislosti poměrů ploch píků akrylamidu k vnitřnímu standardu na poměru koncentrací akrylamidu k vnitřnímu standardu. Tyto dvě kalibrační křivky zobrazují Obrázky 28 a 29. Veškerá data, která byla použita pro vytvoření kalibrační závislosti jsou uvedena v tabulkách v Příloze 7 a 8.



Obrázek 28: Závislost poměru ploch píků na podílu koncentrací (AA/ACA)



Obrázek 29: Závislost podílu ploch píků na podílu koncentrací (AA/MAA)

Obě kalibrační závislosti byly podrobeny diagnostice v programu QC Expert, kde byla hodnocena významnost členů rovnice kalibrační přímky. Úsek přímky (AA/ACA: 0,0039; AA/MAA: 0,0095) byl v obou případech vyhodnocen jako nevýznamný ( $p > 0,05$ ; viz Příloha 12) a pro následné výpočty nebyl brán v potaz. Linearita obou kalibračních závislostí byla pro měřený koncentrační rozsah vyhovující. U kalibrační závislosti s vnitřním standardem acetamidem (AA/ACA) byl koeficient determinace,  $R^2$ , 0,9981 a u kalibrační závislosti s vnitřním standardem methakrylamidem (AA/MAA) byl koeficient determinace  $R^2$ , 0,9971.

### 3.3.2 Validace metody

Pro zjištění, zda je optimalizovaná metoda vhodná a dostatečná pro zamýšlené použití byla provedena částečná validace.

#### 3.3.2.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce definuje takové množství analytu, které lze danou metodou prokázat. Mez stanovitelnosti udává koncentraci, kterou lze při dané metodě s přesností kvantifikovat.

Ke zjištění mezí detekce a stanovitelnosti byla odečtena výška šumu a výška píku pro nejmenší kalibrační bod, a to 1  $\mu\text{g/g}$  (viz Příloha 13). Následným výpočtem pomocí podílu výšky píku (S) a výšky šumu (N), kdy mez detekce je dána jako  $3 \times S/N$  a mez stanovitelnosti jako  $10 \times S/N$ , byly zjištěny koncentrace jednotlivých mezí, které jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti

<b>Mez detekce</b>	0,292 $\mu\text{g/g}$
<b>Mez stanovitelnosti</b>	0,973 $\mu\text{g/g}$



### 3.3.2.2 Přesnost a správnost metody

Přesnost metody vyjadřuje blízkost shody mezi výsledky nezávislých testů a hodnotí se pomocí směrodatné odchylky. Správnost metody je míra shody mezi referenční hodnotou a hodnotami výsledků nezávislých testů a hodnotí se jako výtěžnost [91].

Pro zjištění přesnosti a správnosti metody bylo provedeno 6 měření se stejnou koncentrací akrylamidu, a to na koncentrační hladině 10 µg/g a jako matrice byl použit muffin bez akrylamidu stejně jako v případě měření kalibrační závislosti (kontrolováno pomocí slepého pokusu bez přídavku AA). Vnitřní standardy měly koncentraci 50 µg/g (MAA a ACA). Veškeré výsledky byly hodnoceny z poměru plochy píku akrylamidu a plochy piků vnitřních standardů. Tyto hodnoty jsou uvedeny v Příloze 14. Kritéria přijatelnosti byla převzata z AOAC International [91].

V tabulce 11 jsou uvedeny vypočtené hodnoty správnosti, která byla vyjádřena jako výtěžnost. V tomto případě kritérium přijatelnosti splňuje pouze metoda, kde je použit vnitřní standard acetamid.

Tabulka 11: Výsledné hodnoty správnosti

C <sub>AA</sub> [µg/g]	Správnost		
	Výtěžnost (AA/ACA) [%]	Výtěžnost (AA/MAA) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
10,45	98,67	133,60	80–110

V tabulce 12 jsou uvedeny vypočtené hodnoty přesnosti, vyjádřené pomocí relativní směrodatné odchylky a porovnání s kritériem přijatelnosti. Stejně jako u případu správnosti, je vhodnějším vnitřním standardem acetamid, jelikož jeho hodnota směrodatné odchylky nepřekročila kritérium přijatelnosti.

Tabulka 12: Výsledné hodnoty přesnosti

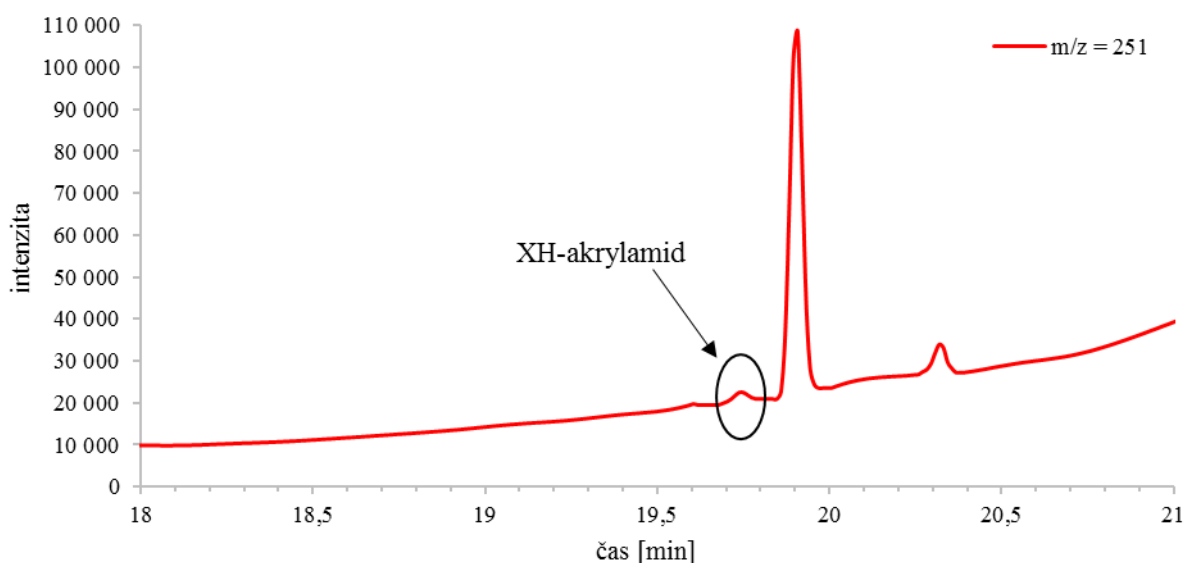
C <sub>AA</sub> [µg/g]	Přesnost		
	Relativní směrodatná odchylka (AA/ACA) [%]	Relativní směrodatná odchylka (AA/MAA) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
10,45	6,94	10,62	< 7,3

Acetamid vykazuje lepší výsledky jak v případě správnosti, tak i v případě přesnosti. Je tedy patrné, že jako vnitřní standard je nejvhodnější použít jako vnitřní standard právě acetamid.

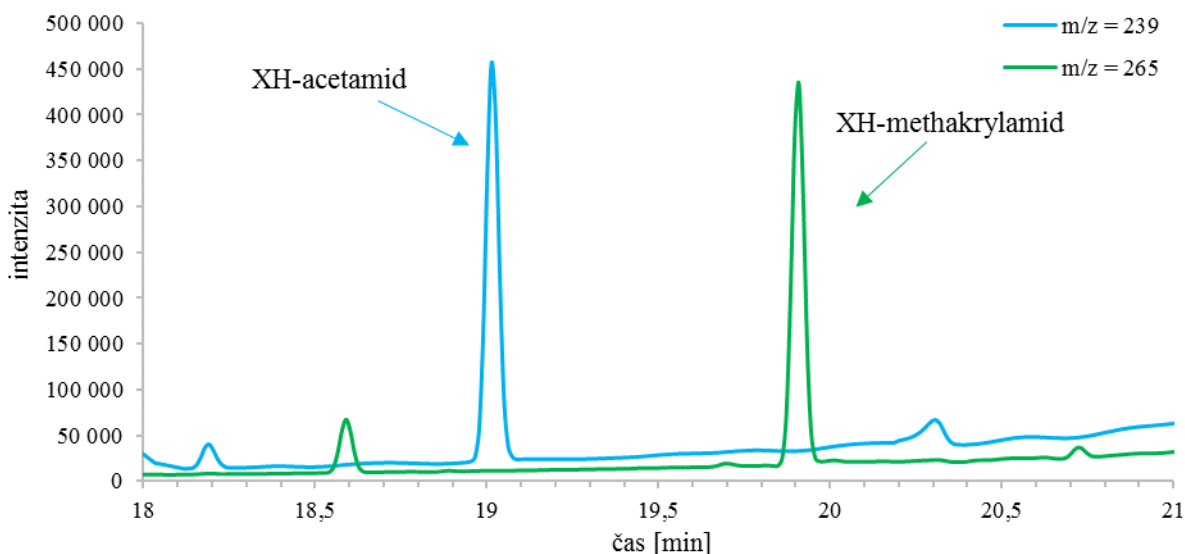
### 3.4 Analýza akrylamidu ve vzorcích pečiva

Optimalizovaná metoda zahrnující derivatizaci a disperzní mikroextrakci z kapaliny do kapaliny s GC-MS koncovkou byla použita na stanovení akrylamidu ve vzorcích pekařských výrobků. V této práci byly použity 3 druhy mouky (pšeničná hladká, špaldová a kokosová) pro výrobu muffinů. Všechny vzorky byly pečeny stejným postupem a za stejných podmínek (viz kapitola 2.3.1). Metoda pro stanovení akrylamidu v pečivu byla optimalizována za použití matrice, což byl muffin vyrobený z hladké pšeničné mouky pečený po kratší dobu než vzorky, aby byla pravděpodobnost výskytu akrylamidu co nejmenší.

Každý vzorek byl připraven a měřen minimálně třikrát, aby nedocházelo k náhodným chybám. Na Obrázcích 30 a 31 jsou ukázkové chromatogramy jedné analýzy vzorku muffinu vyrobeného z hladké pšeničné mouky. Retenční čas AA je 19,8 minut. Je zde pozorovatelný pouze velmi malý pík akrylamidu, který nelze kvantifikovat. Píky acetamidu a methakrylamidu jsou jasně patrné. Ukázky chromatogramů dalších dvou vzorků (špaldová, kokosová mouka) jsou zobrazeny v Přílohách 15–18.



Obrázek 30: SIM chromatogram vzorku z hladké pšeničné mouky –  $m/z = 251$



Obrázek 31: SIM chromatogram vzorku z hladké pšeničné mouky –  $m/z = 239$  a  $265$

Při dodržení postupu s 1 g vzorku nebyla metoda dostačující, proto byla zkoušena analýza většího množství vzorku (1,5 g). Ani v tomto případě nebylo možné akrylamid z chromatogramu kvantifikovat. Bylo by tedy nutné projít všechny kroky při přípravě vzorku a snížit mez detekce, např. vyzkoušet jiné extrakční či disperzní rozpouštědlo nebo použít jiné vysolovací soli při přípravě vzorku před extrakcí. Další možností, kde by mohl být problém je špatné uvolnění AA z matrice. Nicméně tento postup je v mnoha publikacích používán. Bohužel časová náročnost přípravy vzorku neumožňovala tuto optimalizaci provést. Čas na experiment byl omezený, a navíc zkrácený důsledku opatření vlády v návaznosti na situaci ohledně SARS-CoV-2 v ČR.

V odborných článcích [42,43,64], podle kterých byla tato práce prováděna, je stanovován akrylamid v různých druzích pečiva. Všechny tři tyto publikace a některé další [20, 44, 45, 46] uvádějí výsledný obsah akrylamidu v pečivu v koncentracích pohybujících se v rozmezí cca 10–500 ng/g. Meze detekce v publikacích [43,64] byly 0,54 a 0,6 ng/g. Mez detekce zjištěná pro tuto optimalizovanou metodu byla 292 ng/g. Je tedy pravděpodobné, že ve vzorcích muffinů byl akrylamid v koncentracích pod mezí detekce a bylo by nutné, jak je již zmíněno výše, znovu optimalizovat metodu a snížit mez detekce.

## 4 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu GC-MS pro stanovení akrylamidu v pekařských výrobcích, optimalizovat přípravu vzorku a celou metodu validovat. Dalším cílem bylo zjistit, zda je obsah akrylamidu v pekařských produktech ovlivněn různým zastoupením druhů mouk.

Optimalizace metody GC-MS a přípravy vzorku proběhla v několika hlavních krocích. Nejprve bylo zjištěno, že akrylamid je nutné podrobit derivatizaci, aby bylo dosaženo co nejlepší detekce. Derivatizace byla provedena s použitím xanthidrolu. Také bylo zjištěno, že za použití SIM módu pro analýzu těchto xanthyl-derivátů se dosahuje velmi dobré separace a kvantifikace. Dále byla provedena optimalizace přípravy vzorku s různými extrakčními činidly. Jako nejlepší kombinace byla vybrána směs destilovaná voda/ethanol (90:10). Poté byla provedena optimalizace kapalinové disperzní mikroextrakce, kde se zjišťovaly nejvhodnější objemy extrakčního a disperzního rozpouštědla, kterými byli tetrachlormethan a ethanol. Dospělo se k závěru, že nejefektivnější extrakci vykazuje kombinace 100 µl tetrachlormethanu jako extrakčního rozpouštědla a 600 µl ethanolu jako disperzního rozpouštědla. Na kvantifikaci akrylamidu byl použit vnitřní standart. Byly testovány dva vnitřní standardy s podobnými vlastnostmi jako akrylamid, a to acetamid a methakrylamid. Při validaci metody bylo zjištěno, že acetamid splňoval lépe kritéria přijatelnosti a je tedy vhodnější.

Optimalizovaná a validovaná metoda byla použita ke stanovení akrylamidu v pekařských produktech. Analýza vzorků pečiva z pšeničné, špaldové a kokosové mouky byla provedena na několika vzorcích muffinů vyrobených stejným postupem. Bylo zjištěno, že v těchto třech vzorcích se vyskytuje jen velmi malé množství akrylamidu, které bohužel nebylo možné kvantifikovat. Bylo by nutné nalézt vhodnější podmínky metody, aby došlo ke snížení meze detekce, např. otestovat jiné extrakční rozpouštědlo, jiné vysolovací roztoky, případně ověřit dostatečné uvolnění akrylamidu ze vzorku. Tyto kroky nebylo bohužel možné provést v důsledku časové náročnosti a omezenému času na experimentální provedení diplomové práce, který byl zkrácen díky mimořádnému a ochrannému opatření vlády v důsledku situace onemocnění covid-19 způsobeného koronavirem SARS-CoV-2.

## 5 Seznam použité literatury

- [1] Acrylamide. The Merck Index Online [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2021 [cit. 2021-03-21]. <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m1390/acrylamide?q=unauthorize>
- [2] Motarjemi Yasmine, Moy Gerald, Todd Ewen. Encyclopedia of Food Safety. Volume 2. Elsevier, 2014, s. 363-370. ISBN 978-0-12-378613-5
- [3] Kamer Paul C. J., Vogt Dieter, Thybaut Joris W. Contemporary Catalysis – Science, Technology, and Applications. Royal Society of Chemistry, 2017. ISBN 978-1-84973-990-0.
- [4] Akrylamid v potravinách [online]. European Food Safety Authority, 2015 [cit. 2021-03-28]. doi:10.2805/812093v
- [5] Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA Journal [online]. 2015, 13(6) [cit. 2021-4-14]. ISSN 18314732. doi:10.2903/j.efsa.2015.4104
- [6] Jaeger Henry, Janositz Arthur, Knorr Dietrich. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. Pathologie Biologie [online]. 2010, 58(3), s. 207-213. ISSN 03698114. doi:10.1016/j.patbio.2009.09.016
- [7] Lund Marianne N., Ray Colin A. Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2017, 65(23), s. 4537-4552. ISSN 0021-8561. doi:10.1021/acs.jafc.7b00882
- [8] Eskin Michael N. A., Shahidi Fereidoon. Browning Reactions in Foods. Biochemistry of foods. 3rd edition. Elsevier, 2013, s. 245-256. ISBN 978-0-12-242352-9.
- [9] Perez-Locas Carolina, Yaylayan Varoujan A. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. UK: Woodhead Publishing, 2010, s. 70-88. ISBN 978-1-84569-495-1.
- [10] Coultate Tom. Food: The chemistry of its components. 6th Edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016, s. 40-49. ISBN 978-1-84973-880-4.
- [11] Pedreschi Franco, Mariotti María Salomé, Granby Kit. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. Journal of the Science of Food and Agriculture [online]. 2014, 94(1), s. 9-20. ISSN 00225142. doi:10.1002/jsfa.6349
- [12] Washburn Edward W. International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology. Knovel, 2003. ISBN 978-1-59124-491-2.
- [13] Rydberg Per, Eriksson Sune, Tareke Eden, Karlsson Patrik, Ehrenberg Lar, Törnqvist Margareta. Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foods. Chemistry

- and Safety of Acrylamide in Food [online]. New York: Springer-Verlag, 2005, s. 317-328. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 0-387-23920-0. doi:10.1007/0-387-24980-X\_24
- [14] Stadler Richard H., Studer Alfred. Acrylamide Formation Mechanisms. Acrylamide in Food [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 1-17. ISBN 9780128028322. doi:10.1016/B978-0-12-802832-2.00001-2
- [15] Keramat Javad, Lebail Alain, Prost Carole, Soltanizadeh Nafiseh. Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. Food and Bioprocess Technology [online]. 2011, 4(3), s. 340-363. ISSN 1935-5130. doi:10.1007/s11947-010-0470-x
- [16] Stadler Richard H., Scholz Gabriele. Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control. Nutrition Reviews [online]. 2004, 62(12), s. 449-467. ISSN 00296643. doi:10.1301/nr.2004.janr.449-467
- [17] Keramat Javad, Lebail Alain, Prost Carole, Jafari Maryam. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. Food and Bioprocess Technology [online]. 2011, 4(4), s. 530-543. ISSN 1935-5130. doi:10.1007/s11947-010-0495-1
- [18] Yaylayan Varoujan A, Stadler Richard H. Acrylamide Formation in Food: A Mechanistic Perspective. Journal of AOAC INTERNATIONAL [online]. 2005, 88(1), s. 262-267. ISSN 1060-3271. doi:10.1093/jaoac/88.1.262
- [19] Bethke Paul C., Bussan Alvin J. Acrylamide in Processed Potato Products. American Journal of Potato Research [online]. 2013, 90(5), s. 403-424. ISSN 1099-209X. doi:10.1007/s12230-013-9321-4
- [20] Michalak Joanna, Czarnowska-Kujawska Marta, Gujska Elzbieta. Acrylamide and Thermal-Processing Indexes in Market-Purchased Food. International Journal of Environmental Research and Public Health [online]. 2019, 16(23). ISSN 1660-4601. doi:10.3390/ijerph16234724
- [21] Matthäus Bertrand, Haase Norbert U. Acrylamide - Still a matter of concern for fried potato food? European Journal of Lipid Science and Technology [online]. 2014, 116(6), s. 675-687. ISSN 14387697. doi:10.1002/ejlt.201300281
- [22] Gökmen Vural. Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects. Academic Press, 2016, s. 181-195. ISBN 978-0-12-802832-2.
- [23] Claus Achim, Carle Reinhold, Schieber Andreas. Acrylamide in cereal products: A review. Journal of Cereal Science [online]. 2008, 47(2), s. 118-133. ISSN 07335210. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.016

- [24] Baskar Gurunathan, Aiswarya Ravi. Overview on mitigation of acrylamide in starchy fried and baked foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2018, 98(12), s. 4385-4394. ISSN 00225142. doi:10.1002/jsfa.9013
- [25] Munir Naveed, Zia Muhammad A., Sharif Sumaira, et al. L-Asparaginase potential in acrylamide mitigation from foodstuff: a mini-review. *Progress in nutrition* [online]. 2019, vol 21(3), s. 498-506. doi:10.23751/pn.v21i3.6771
- [26] Xu Fei, Oruna-Concha Maria-Jose, Elmore J. Stephen. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry* [online]. 2016, 210, s. 163-171. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.105
- [27] Friedman Mendel. Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. *Food & Function* [online]. 2015, 6(6), s. 1752-1772. ISSN 2042-6496. doi:10.1039/C5FO00320B
- [28] Sansano Mariola, Castelló María L., Heredia Ana, Andrés Ana. Protective effect of chitosan on acrylamide formation in model and batter systems. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 60, s. 1-6. ISSN 0268005X. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.03.017
- [29] Chang Yu-Wei, Sung Wen-Chieh, Chen Jing-Yi. Effect of different molecular weight chitosans on the mitigation of acrylamide formation and the functional properties of the resultant Maillard reaction products. *Food Chemistry* [online]. 2016, 199, s. 581-589. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.065
- [30] Nilsen-Nygaard Julie, Strand Sabina, Vårum Kjell, Draget Kurt, Nordgård Catherine. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* [online]. 2015, 7(3), s. 552-579. ISSN 2073-4360. doi:10.3390/polym7030552
- [31] Liu Yanbing, Wang Pengpu, Chen Fang, Yuan Yuan, Zhu Yuchen, Yan Haiyan, Hu Xiaosong. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chemistry* [online]. 2015, 186, s. 46-53. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.122
- [32] Khorshidian Nasim, Yousefi Mojtaba, Shadnoush Mahdi, Siadat Seyed Davar, Mohammadi Mehrdad, Mortazavian Amir M. Using probiotics for mitigation of acrylamide in food products: a mini review. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2020, 32, s. 67-75. ISSN 22147993. doi:10.1016/j.cofs.2020.01.011
- [33] Mariotti-Celis María S., Cortés Pablo, Dueik Verónica, Bouchon Pedro, Pedreschi Franco. Application of Vacuum Frying as a Furan and Acrylamide Mitigation Technology in Potato Chips. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2017, 10(11), s. 2092-2099. ISSN 1935-5130. doi:10.1007/s11947-017-1981-5

- [34] Mogol Burçe Ataç, Gökmen Vural. Mitigation of acrylamide and hydroxymethylfurfural in biscuits using a combined partial conventional baking and vacuum post-baking process: Preliminary study at the lab scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2014, 26, s. 265-270. ISSN 14668564. doi:10.1016/j.ifset.2014.05.002
- [35] Schouten Maria Alessia, Genovese Jessica, Tappi Silvia, et al. Effect of innovative pre-treatments on the mitigation of acrylamide formation in potato chips. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2020, 64. ISSN 14668564. doi:10.1016/j.ifset.2020.102397
- [36] Genovese Jessica, Tappi Silvia, Luo Wei, et al. Important factors to consider for acrylamide mitigation in potato crisps using pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2019, 55, s. 18-26. ISSN 14668564. doi:10.1016/j.ifset.2019.05.008
- [37] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/2158. Úřední věstník Evropské unie, 2017. <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=EN>
- [38] Rifai Lubna, Saleh Fatima A. A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. *International Journal of Toxicology* [online]. 2020, 39(2), s. 93-102. ISSN 1091-5818. doi:10.1177/1091581820902405
- [39] Fuhr Uwe, Boettcher Melanie I., Kinzig-Schippers Martina, et al. Toxicokinetics of Acrylamide in Humans after Ingestion of a Defined Dose in a Test Meal to Improve Risk Assessment for Acrylamide Carcinogenicity. *American Association for Cancer Research* [online]. 2006, 15(2), s. 266-271. ISSN 1055-9965. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0647
- [40] Besaratinia Ahmad, Pfeifer Gerd P. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis* [online]. 2006, 28(3), s. 519-528. ISSN 0143-3334. doi:10.1093/carcin/bgm006
- [41] Samuelheriantogintingmunthe [online]. WORDPRESS.COM [cit. 2021-02-07]. <https://samuelheriantogintingmunthe.wordpress.com/page/2/>
- [42] Elahi Motahareh, Kamankesh Marzieh, Mohammadi Abdorreza, Jazaeri Sahar. Acrylamide in Cookie Samples: Analysis Using an Efficient Co-Derivatization Coupled with Sensitive Microextraction Method Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* [online]. 2019, 12(6), s.1439-1447. ISSN 1936-9751. doi:10.1007/s12161-019-01479-7
- [43] Norouzi Elham, Kamankesh Marzieh, Mohammadi Abdorreza, Attaran Abdolmohammad. Acrylamide in bread samples: Determining using ultrasonic-assisted extraction



- and microextraction method followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cereal Science* [online]. 2018, 79, s. 1-5. ISSN 07335210. doi:10.1016/j.jcs.2017.09.011
- [44] Senyuva Hamide, Gökmen Vural. Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography–mass spectrometry method. *Food Chemistry* [online]. 2006, 97(3), s. 539-545. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.005
- [45] Notardonato Ivan, Avino Pasquale, Centola Angela, Cinelli Giuseppe, Russo Mario Vincenzo. Validation of a novel derivatization method for GC–ECD determination of acrylamide in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, 405(18), s. 6137-6141. ISSN 1618-2642. doi:10.1007/s00216-013-7001-3
- [46] Gökmen Vural, Senyuva Hamide Z. A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, 1120(1-2), s. 194-198. ISSN 00219673. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.084
- [47] Gökmen Vural, Morales Francisco J., Atac Burçe, Serpen Arda, Arribas-Lorenzo Gema. Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2009, 22(2), s. 142-147. ISSN 08891575. doi:10.1016/j.jfca.2008.09.007
- [48] Zahra Naseem, Syed Qurat-ul-Ain, Kalim Imran, Khurshid Zohaib, Ahmad Ijaz, Saeed Muhammad Khalid. Determination of Acrylamide in Branded and Non-branded Potato Chips by using High Performance Liquid Chromatography. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry* [online]. 2018, 19(1), s. 91-95. ISSN 1996918X. doi:10.21743/pjaec/2018.06.10
- [49] Faraji Mohammad, Hamdamali Mohammadreza, Aryanasab Fezzeh, Shabaniyan Meisam. 2-Naphthalenthioal derivatization followed by dispersive liquid–liquid microextraction as an efficient and sensitive method for determination of acrylamide in bread and biscuit samples using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2018, 1558, s. 14-20. ISSN 00219673. doi:10.1016/j.chroma.2018.05.021
- [50] Kang Cuicui, Ma Haijian, Li Yuan, Zhang Chizhong, Hong Yueqin, Shao Minghua. Determination of acrylamide in foods by automatic accelerated solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Chromatographica* [online]. 2020, 33(1), s. 64-72. ISSN 2083-5736. doi:10.1556/1326.2020.00755
- [51] Zhang Yu, Ren Yiping, Zhao Hangmei, Zhang Ying. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with

- electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, 584(2), s. 322-332. ISSN 00032670. doi:10.1016/j.aca.2006.10.061
- [52] Poole Colin F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, 22(6), s. 362-373. ISSN 01659936. doi:10.1016/S0165-9936(03)00605-8
- [53] Zwir-Ferenc Agata, Biziuk Marek. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Pol. J. Environ. Stud.* [online]. 2006, 15(5), s. 677-690. ISSN 1230-1485. <http://www.pjoes.com/Solid-Phase-Extraction-Technique-Trends-Opportunities-and-Applications,87920,0,2.html>
- [54] Rosén Johan, Nyman Arne, Hellenäs Karl-Erik. Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for food analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1172(1), s. 19-24. ISSN 00219673. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.050
- [55] Granby Kit, Fagt Sisse. Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2004, 520(1-2), s. 177-182. ISSN 00032670. doi:10.1016/j.aca.2004.05.064
- [56] Togola Anne, Coureau Charlotte, Guezennec Anne-Gwenaëlle, Touzé Solène. A sensitive analytical procedure for monitoring acrylamide in environmental water samples by offline SPE–UPLC/MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2015, 22(9), s. 6407-6413. ISSN 0944-1344. doi:10.1007/s11356-014-3900-x
- [57] Wang Haiyan, Lee Albert W. M., Shuang Shaomin, Choi Martin M. F. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchemical Journal* [online]. 2008, 89(2), s. 90-97. ISSN 0026265X. doi:10.1016/j.microc.2007.12.006
- [58] Ghalebi Maryam, Hamidi Samin, Nemati Mahboob. High-Performance Liquid Chromatography Determination of Acrylamide after Its Extraction from Potato Chips. *Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, 25(4), s. 338-344. ISSN 1735-403X. doi:10.15171/PS.2019.42
- [59] Pan Mingfei, Liu Kaixin, Yang Jingying, Hong Liping, Xie Xiaoqian, Wang Shuo. Review of Research into the Determination of Acrylamide in Foods. *Foods* [online]. 2020, 9(4). ISSN 2304-8158. doi:10.3390/foods9040524
- [60] Crawford Lauren M., Wang Selina C. Comparative Study of Four Analytical Methods for the Routine Determination of Acrylamide in Black Ripe Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2019, 67(46), s. 12633-12641. ISSN 0021-8561. doi:10.1021/acs.jafc.9b00363

- [61] Kamankesh Marzieh, Nematollahi Amene, Mohammadi Abdorreza, Ferdowsi Roohallah. Investigation of Composition, Temperature, and Heating Time in the Formation of Acrylamide in Snack: Central Composite Design Optimization and Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* [online]. 2021, 14(1), s. 44-53. ISSN 1936-9751. doi:10.1007/s12161-020-01849-6
- [62] Quigley Andrew, Cummins Wayne, Connolly Damian. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Chemistry* [online]. 2016, 2016, s. 1-12. ISSN 2090-9063. doi:10.1155/2016/4040165
- [63] Yamazaki Kumiko, Isagawa Satoshi, Kibune Nobuyuki, Urushiyama Tetsuo. A method for the determination of acrylamide in a broad variety of processed foods by GC–MS using xanthidrol derivatization. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2012, 29(5), s. 705-715. ISSN 1944-0049. doi:10.1080/19440049.2011.645217
- [64] Nematollahi Amene, Kamankesh Marzieh, Hosseini Hedayat, Ghasemi Jahanbakhsh, Hosseini-Esfahani Firoozeh, Mohammadi Abdorreza. Investigation and determination of acrylamide in the main group of cereal products using advanced microextraction method coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cereal Science* [online]. 2019, 87, s. 157-164. ISSN 07335210. doi:10.1016/j.jcs.2019.03.019
- [65] Molina-Garcia Lucía, Santos Carl S. P., Melo Armindo, Fernandes Jose O., Cunha Sara C., Casal Susana. Acrylamide in Chips and French Fries: a Novel and Simple Method Using Xanthidrol for Its GC-MS Determination. *Food Analytical Methods* [online]. 2015, 8(6), s. 1436-1445. ISSN 1936-9751. doi:10.1007/s12161-014-0014-5
- [66] Lim Hyun-Hee, Shin Ho-Sang. Ultra trace level determinations of acrylamide in surface and drinking water by GC-MS after derivatization with xanthidrol. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(18), s. 3059-3066. ISSN 16159306. doi:10.1002/jssc.201300209
- [67] Cooper Jane. Simple and cost-effective determination of acrylamide in food products and coffee using gas chromatography-mass spectrometry. In: Thermo Fisher Scientific [online]. UK, 2019 [cit. 2021-03-15]. <https://apps.lab.thermofisher.com/App/4361/acrylamide-food-products-coffee-using-gcms>
- [68] Poole Collin F. *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-012-3855-404.
- [69] Rahman Md. Musfiqur, El-Aty Abd A. M., Choi Jeong-Heui, Shin Ho-Chul, Shin Sung Chul, Shim Jae-Han. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Analytical Separation Science* [online]. 2015, 3. doi:10.1002/9783527678129.assep024

- [70] McNair Harold M., Miller James M., Snow Nicholas H. Basic gas chromatography. 3rd edition. John Wiley, 2019, s. 157-175. ISBN 9781119450795.
- [71] De Hoffmann Edmond. Mass Spectrometry. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology [online]. John Wiley, 2005, 2000 [cit. 2021-5-2]. doi:10.1002/0471238961.1301191913151518.a01.pub2
- [72] Li Du-Xin, Gan Lin, Bronja Amela, Schmitz Oliver J. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. Analytica Chimica Acta [online]. 2015, 891, s. 43-61. ISSN 00032670. doi:10.1016/j.aca.2015.08.002
- [73] Pico Yolanda. Chemical analysis of food - Techniques and applications. Elsevier, 2012, s. 249-275. ISBN 978-0-12-384862-8.
- [74] Medhe Sharad. Mass Spectrometry: Detectors Review. Chemical and Biomolecular Engineering [online]. Dayalbagh Educational Institute, 2018, 3(4), s. 51-58. ISSN 2578-8884. doi:10.11648/j.cbe.20180304.11
- [75] Gates Paul J. Ion Detectors. University of Bristol: School of chemistry [online]. UK, 2014 [cit. 2021-5-22]. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/detectors.shtml>
- [76] Lynch Kara L. Toxicology: liquid chromatography mass spectrometry. Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory [online]. Elsevier, 2017, s. 109-130. ISBN 9780128008713. doi:10.1016/B978-0-12-800871-3.00006-7
- [77] Harvey David J. GAS CHROMATOGRAPHY Mass Spectrometry. Encyclopedia of Analytical Science [online]. Elsevier, 2005, s. 106-116 [cit. 2021-5-22]. ISBN 9780123693976. doi:10.1016/B0-12-369397-7/00223-5
- [78] Cengiz Mehmet Fatih, Boyaci Gündüz Cennet Pelin. An eco-friendly, quick and cost-effective method for the quantification of acrylamide in cereal-based baby foods. Journal of the Science of Food and Agriculture [online]. 2014, 94(12), s. 2534-2540. ISSN 00225142. doi:10.1002/jsfa.6592
- [79] Lee Maw-Rong, Chang Li-Yo, Duo Jianpeng. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–positive chemical ionization tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta [online]. 2007, 582(1), s. 19-23. ISSN 00032670. doi:10.1016/j.aca.2006.08.042
- [80] Luo Lan, Ren Yan, Liu Jie, Wen Xiaodong. Investigation of a rapid and sensitive non-aqueous reaction system for the determination of acrylamide in processed foods by gas chromatography-mass spectrometry. Analytical Methods [online]. 2016, 8(30), s. 5970-5977. ISSN 1759-9660. doi:10.1039/C6AY00673F

- [81] Shakeri Fatemeh, Shakeri Somayeh, Ghasemi Sajad, Troise Antonio D., Fiore Alberto. Effects of Formulation and Baking Process on Acrylamide Formation in Kolompeh, a Traditional Cookie in Iran. *Journal of Chemistry* [online]. 2019, 2019, s. 1-6. ISSN 2090-9063. doi:10.1155/2019/1425098
- [82] Lindhauer Meinolf G., Vosmann Klaus, Matthäus Bertrand, Razia Sultana. Investigation of acrylamide levels in branded biscuits, cakes and potato chips commonly consumed in Pakistan. *International Food Research Journal* [online]. 2016, 23(5), s. 2187-2192. ISSN 2231 7546. [http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20\(05\)%202016/\(47\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(05)%202016/(47).pdf)
- [83] Nematollahi Amene, Kamankesh Marzieh, Hosseini Hedayat, Hadian Zahra, Ghasemi Jahanbakhsh, Mohammadi Abdorreza. Investigation and determination of acrylamide in 24 types of roasted nuts and seeds using microextraction method coupled with gas chromatography–mass spectrometry: central composite design. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2020, 14(3), s. 1249-1260. ISSN 2193-4126. doi:10.1007/s11694-020-00373-9
- [84] Nemoto Satoru, Takatsuki Satoshi, Sasaki Kumiko, Maitani Tamio. Determination of Acrylamide in Foods by GC/MS Using <sup>13</sup>C-labeled Acrylamide as an Internal Standard. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* [online]. 2002, 43(6), s. 371-376. ISSN 0015-6426. doi:10.3358/shokueishi.43.371
- [85] Tateo Fernando, Bononi Monica. A GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food. *Italian Journal of Food Science* [online]. 2003, 15(1), s. 149-151. ISSN 1120-1770. [https://www.researchgate.net/publication/291793165\\_A\\_GCMS\\_method\\_for\\_the\\_routine\\_determination\\_of\\_acrylamide\\_in\\_food](https://www.researchgate.net/publication/291793165_A_GCMS_method_for_the_routine_determination_of_acrylamide_in_food)
- [86] Haase Norbert U., Grothe Karl H., Matthäus Bertrand, Vosmann Klaus, Lindhauer Meinolf G. Acrylamide formation and antioxidant level in biscuits related to recipe and baking. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2012, 29(8), s. 1230-1238. ISSN 1944-0049. doi:10.1080/19440049.2012.690349
- [87] Zhu Yonghong, Li Genrong, Duan Yunpeng, Chen Shiqi, Zhang Chun, Li Yanfei. Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector. *Food Chemistry* [online]. 2008, 109(4), s. 899-908. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.020
- [88] Nollet Leo M. L. *Food Analysis by HPLC*. 3rd edition. CRC Press, 2012. ISBN 9781439830840.

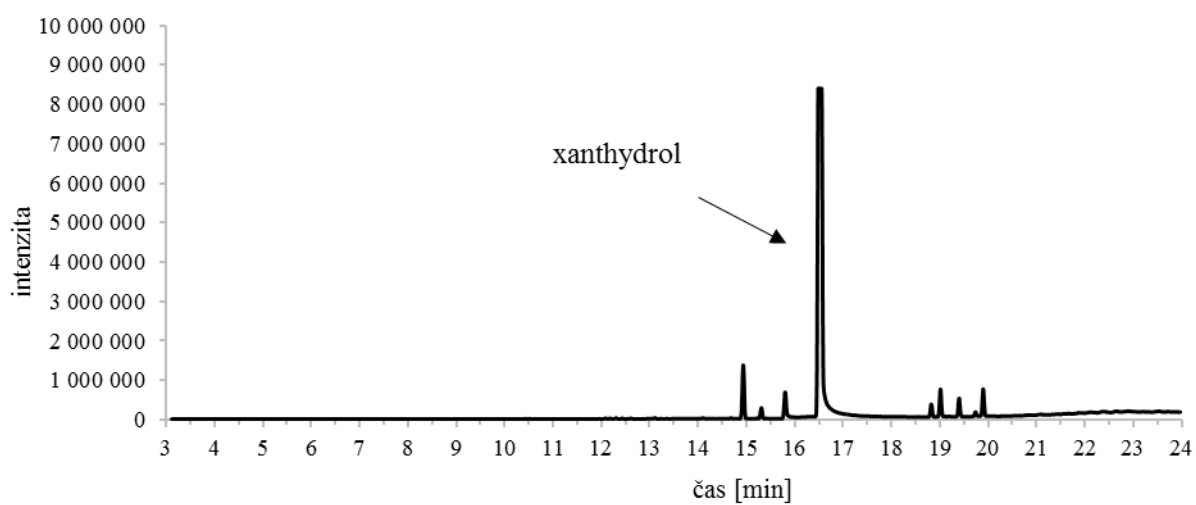
- [89] Clavier Ron. Characterization analysis of polymers. Hoboken: Wiley, 2008, s. 252-266. ISBN 978-0-470-23300-9.
- [90] High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In: Microbe notes [online]. 2021 [cit. 2021-02-29]. <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- [91] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Official Methods of Analysis [online]. AOAC INTERNATIONAL, 2016 [cit. 2021-6-22]. [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)
- [92] Worsfold Paul, Townshend Alan, Poole Colin. Encyclopedia of Analytical Science. Second edition. Elsevier, 2005. ISBN 978-0-12-369397-6.
- [93] Acetamide. The Merck Index Online [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2021 [cit. 2021-6-30]. <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m1314/acetamide?q=authorize>
- [94] Methacrylamide. Merck [online]. Německo: Merck KGaA, 2021 [cit. 2021-6-30]. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/ALDRICH/109606>

## 6 Přílohy

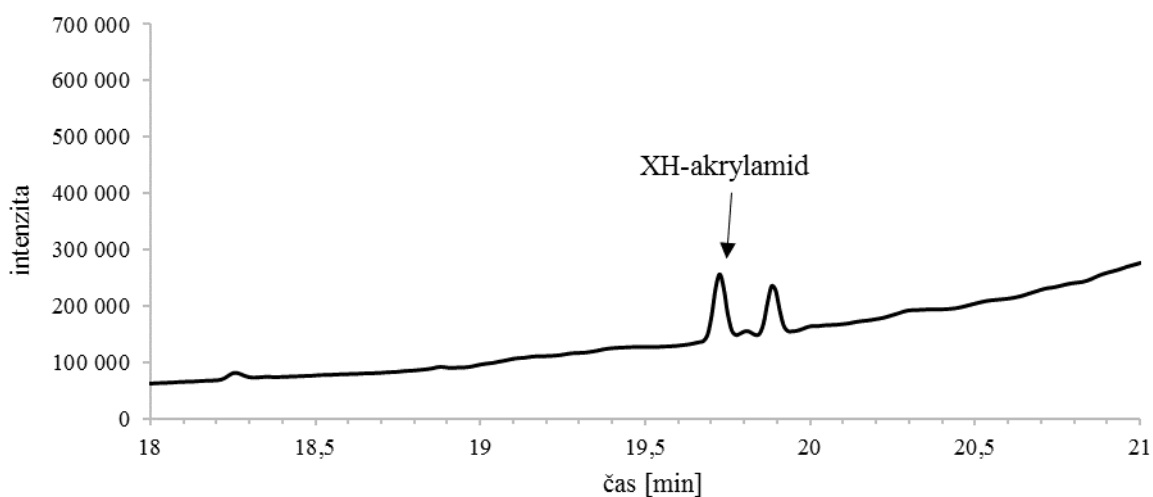
Seznam příloh:

Příloha 1: SIM chromatogram ( $m/z = 196$ ).....	72
Příloha 2: SIM chromatogram ( $m/z = 207$ ).....	72
Příloha 3: SIM chromatogram ( $m/z = 234$ ).....	72
Příloha 4: SIM chromatogram ( $m/z = 248$ ).....	73
Příloha 5: Parametry optimalizace DLLME pomocí Plánování experimentu a výsledné poměry ploch akrylamidu – A (AA) a vnitřního standardu methakrylamidu – A (MAA).....	73
Příloha 6: DOE – profily pro předpovědi a vhodnost.....	74
Příloha 7: Hodnoty ploch píků AA a ACA a jejich podíl pro kalibrační závislost.....	74
Příloha 8: Hodnoty ploch píků AA a MAA a jejich podíl pro kalibrační závislost.....	75
Příloha 9: SIM chromatogram kalibrace při $m/z$ 239 (XH-acetamid) .....	75
Příloha 10: SIM chromatogram kalibrace při $m/z$ 251 (XH-akrylamid).....	75
Příloha 11: SIM chromatogram kalibrace při $m/z$ 265 (XH-methakrylamid).....	76
Příloha 12: Odhad, směrodatná odchylka, pravděpodobnost a hodnocení významnosti úseku a směrnice kalibrační přímky z programu QC Expert.....	76
Příloha 13: Hodnoty pro výpočet mezí detekce a stanovitelnosti.....	76
Příloha 14: Hodnoty podílu ploch píků AA a vnitřních standardů a z nich vypočtené koncentrace pomocí rovnice kalibrační přímky pro přesnost a správnost.....	76
Příloha 15: SIM chromatogram vzorku ze špaldové mouky – $m/z = 251$ .....	77
Příloha 16: SIM chromatogram vzorku ze špaldové mouky – $m/z = 239$ a 265.....	77
Příloha 17: SIM chromatogram vzorku z kokosové mouky – $m/z = 251$ .....	78
Příloha 18: SIM chromatogram vzorku z kokosové mouky – $m/z = 239$ a 265 .....	78

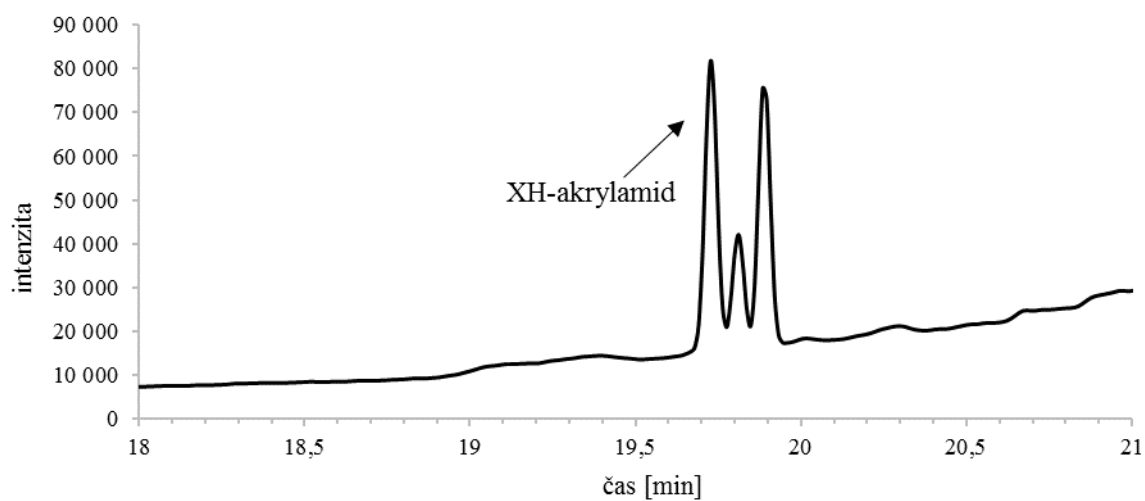
Příloha 1: SIM chromatogram ( $m/z = 196$ )



Příloha 2: SIM chromatogram ( $m/z = 207$ )

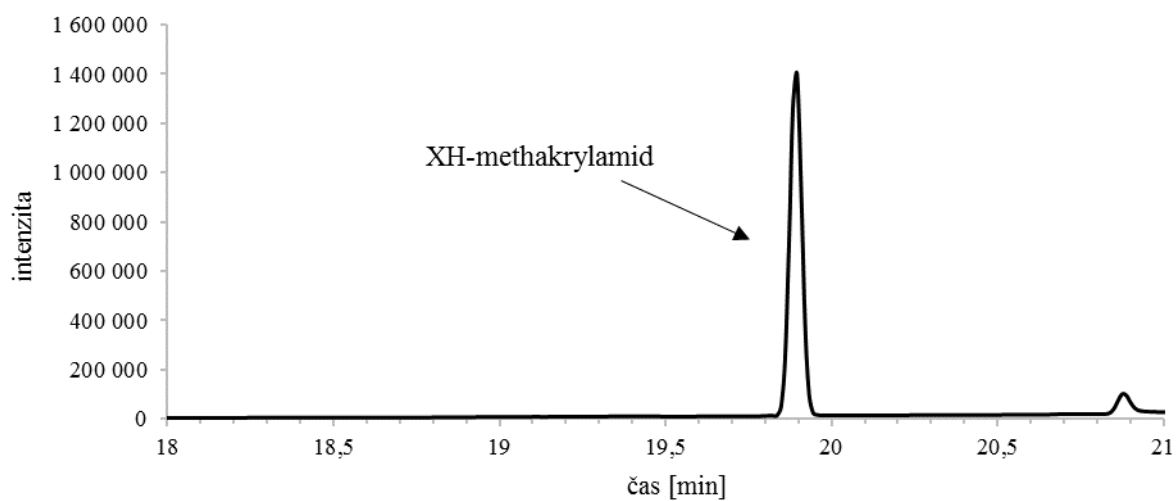


Příloha 3: SIM chromatogram ( $m/z = 234$ )





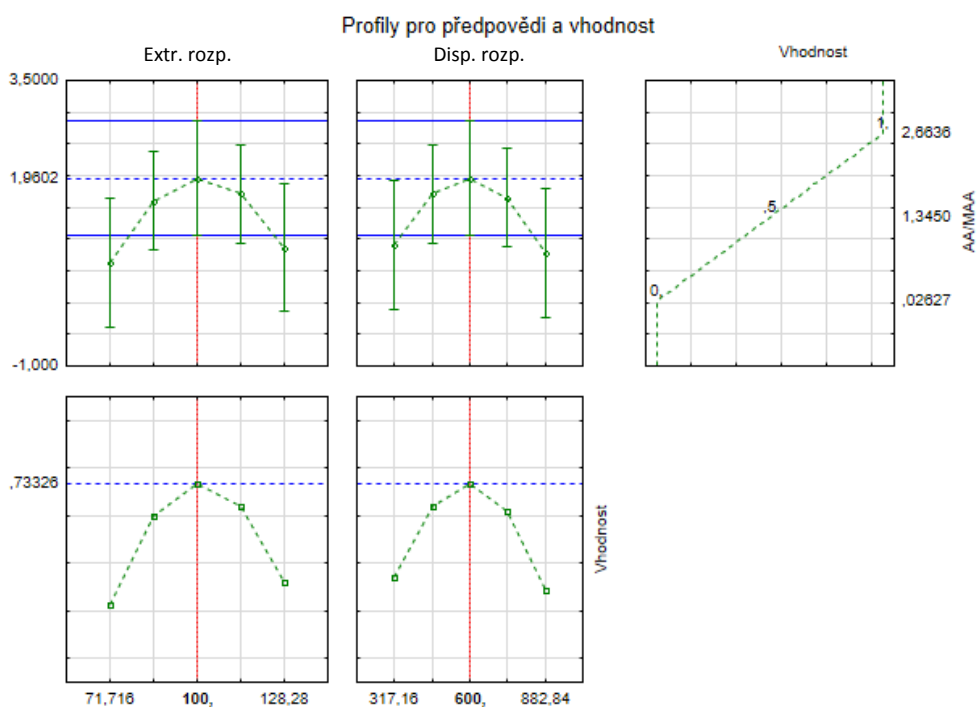
Příloha 4: SIM chromatogram ( $m/z = 248$ )



Příloha 5: Parametry optimalizace DLLME pomocí Plánování experimentu a výsledné poměry ploch akrylamidu – A (AA) a vnitřního standardu methakrylamidu – A (MAA)

<b>Pokus</b>	<b>Replikace</b>	<b>Extrakční rozpouštědlo [μl]</b>	<b>Disperzní rozpouštědlo [μl]</b>	<b>A (AA)/ A (MAA)</b>
1	1	80	400	0,049
2	1	80	800	0,032
3	1	120	400	0,056
4	1	120	800	0,074
5	1	72	600	1,278
6	1	128	600	1,757
7	1	100	317	1,581
8	1	100	883	1,292
9 (C)	1	100	600	1,469
10 (C)	1	100	600	1,727
11	2	80	400	0,046
12	2	80	800	0,026
13	2	120	400	0,039
14	2	120	800	0,087
15	2	72	600	1,174
16	2	128	600	1,684
17	2	100	317	1,893
18	2	100	883	1,647
19 (C)	2	100	600	1,981
20 (C)	2	100	600	2,664

## Příloha 6: DOE – profily pro předpovědi a vhodnost



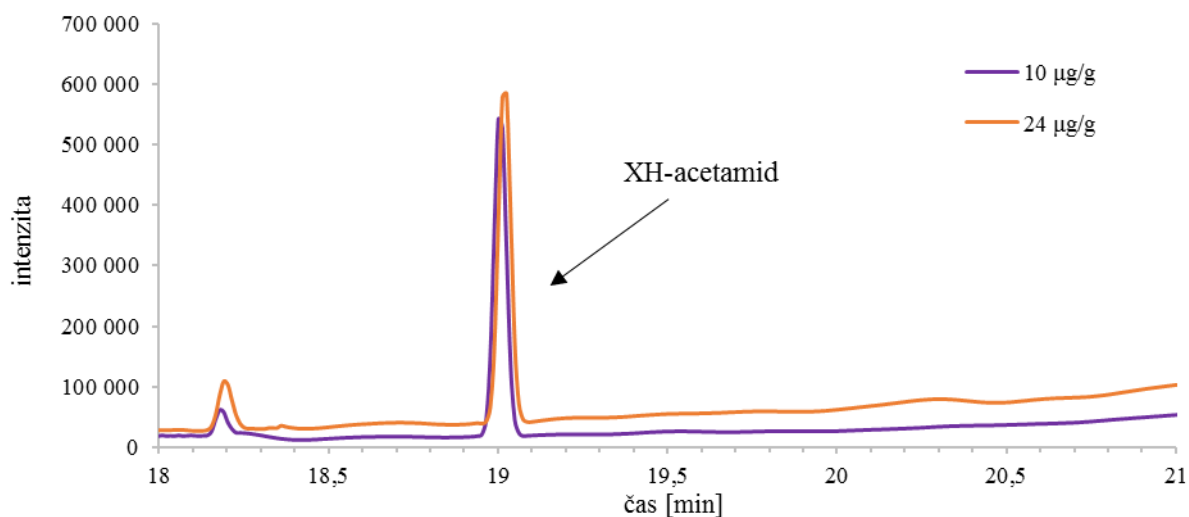
Příloha 7: Hodnoty ploch píků AA a ACA a jejich podíl pro kalibrační závislost

$c_{AA}$ [ $\mu\text{g/g}$ ]	A (AA) $m/z$ 251	$c_{ACA}$ [ $\mu\text{g/g}$ ]	A (ACA) $m/z$ 239	A (AA)/ A (ACA)	c (AA)/ c (ACA)
<b>1,045</b>	23 198	48,75	1 493 274	0,0155	0,0214
<b>1,045</b>	23 882	48,75	1 065 668	0,0224	0,0214
<b>5,225</b>	86 722	48,75	1 394 806	0,0622	0,1072
<b>5,225</b>	76 617	48,75	1 518 709	0,0504	0,1072
<b>10,45</b>	142 159	48,75	1 441 694	0,0986	0,2144
<b>10,45</b>	141 570	48,75	1 340 288	0,1056	0,2144
<b>25,08</b>	444 107	48,75	1 716 285	0,2588	0,5145
<b>25,08</b>	407 636	48,75	1 505 258	0,2708	0,5145
<b>41,80</b>	653 544	48,75	1 534 021	0,4260	0,8574
<b>41,80</b>	648 602	48,75	1 513 990	0,4284	0,8574

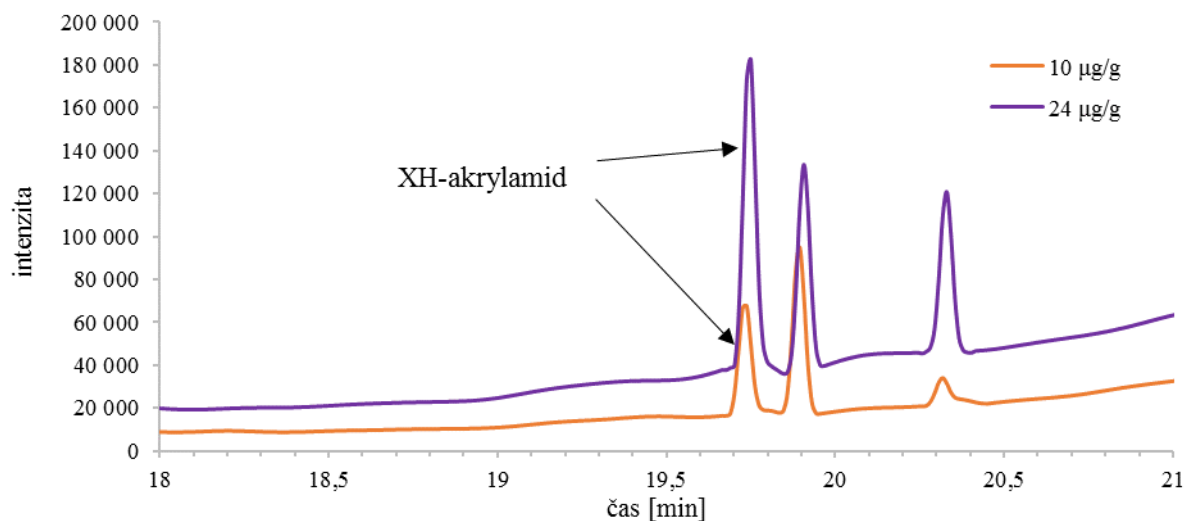
Příloha 8: Hodnoty ploch píků AA a MAA a jejich podíl pro kalibrační závislost

$c_{AA}$ [ $\mu\text{g/g}$ ]	A (AA) $m/z$ 251	$c_{MAA}$ [ $\mu\text{g/g}$ ]	A (MAA) $m/z$ 265	A (AA)/ A (MAA)	c (AA)/ c (MAA)
<b>1,045</b>	23 198	50,00	1 058 674	0,0219	0,0209
<b>1,045</b>	23 882	50,00	965 467	0,0247	0,0209
<b>5,225</b>	86 722	50,00	966 341	0,0897	0,1045
<b>5,225</b>	76 617	50,00	1 074 594	0,0713	0,1045
<b>10,45</b>	142 159	50,00	938 127	0,1515	0,2090
<b>10,45</b>	141 570	50,00	982 015	0,1442	0,2090
<b>25,08</b>	444 107	50,00	1 335 843	0,3325	0,5016
<b>25,08</b>	407 636	50,00	1 192 086	0,3420	0,5016
<b>41,80</b>	653 544	50,00	1 116 078	0,5856	0,8360
<b>41,80</b>	648 602	50,00	1 190 946	0,5446	0,8360

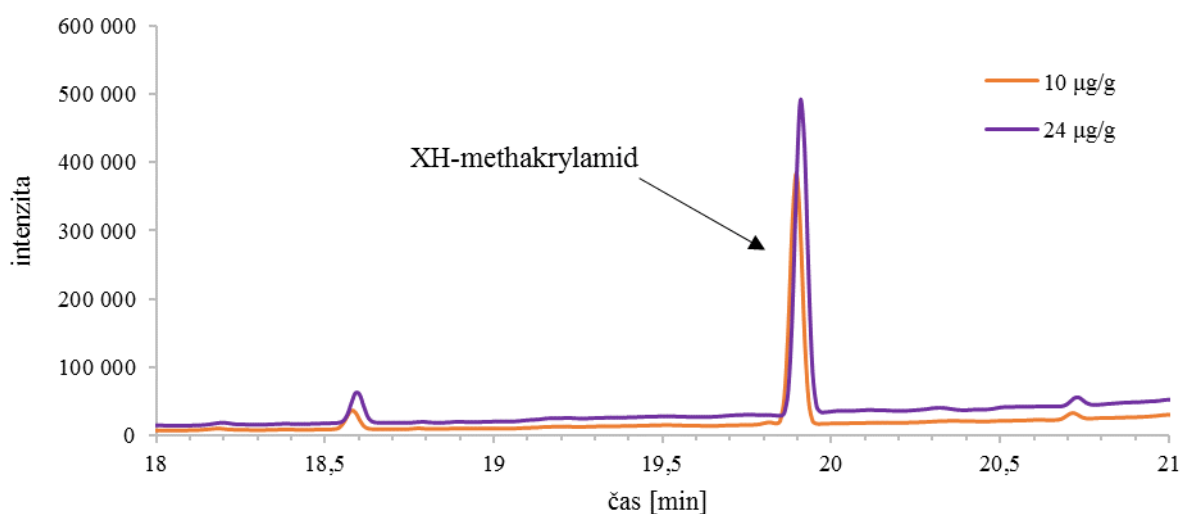
Příloha 9: SIM chromatogram kalibrace při  $m/z$  239 (XH-acetamid)



Příloha 10: SIM chromatogram kalibrace při  $m/z$  251 (XH-akrylamid)



Příloha 11: SIM chromatogram kalibrace při  $m/z$  265 (XH-methakrylamid)



Příloha 12: Odhad, směrodatná odchylka, pravděpodobnost a hodnocení významnosti úseku a směrnice kalibrační přímky z programu QC Expert

AA/ACA	Odhad	Směrodatná odchylka	Pravděpodobnost	Závěr
<b>Úsek</b>	0,0039	0,0035	0,2936	Nevýznamný
<b>Směrnice</b>	0,4955	0,0002	$3,5 \cdot 10^{-12}$	Významný
AA/MAA	Odhad	Směrodatná odchylka	Pravděpodobnost	Závěr
<b>Úsek</b>	0,0095	0,0057	0,133	Nevýznamný
<b>Směrnice</b>	0,6619	0,0003	$1,9 \cdot 10^{-11}$	Významný

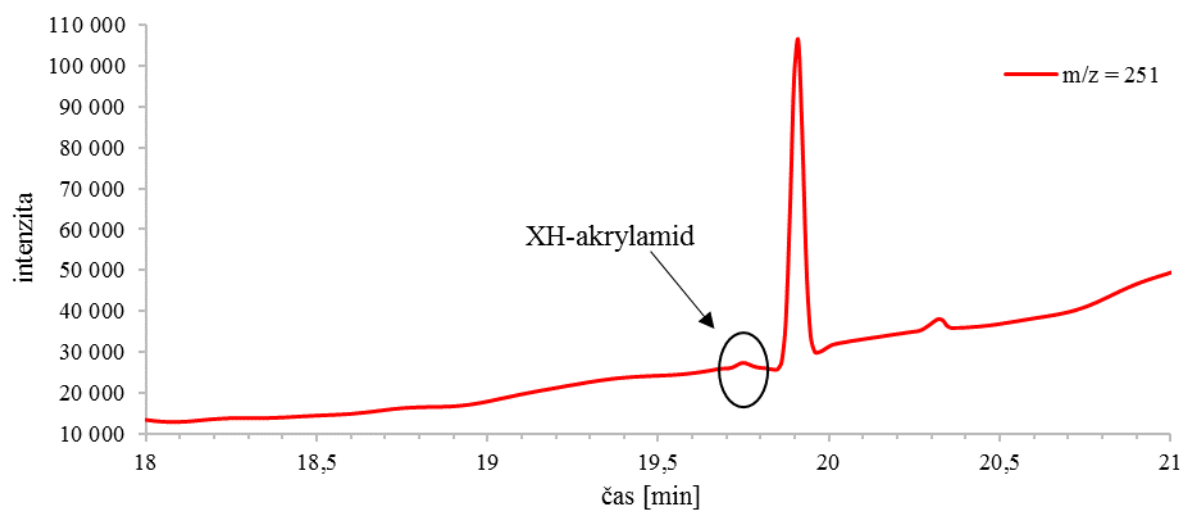
Příloha 13: Hodnoty pro výpočet mezí detekce a stanovitelnosti

Výška píku (S)	Výška šumu (N)	S/N
8453,48	787,41	10,74

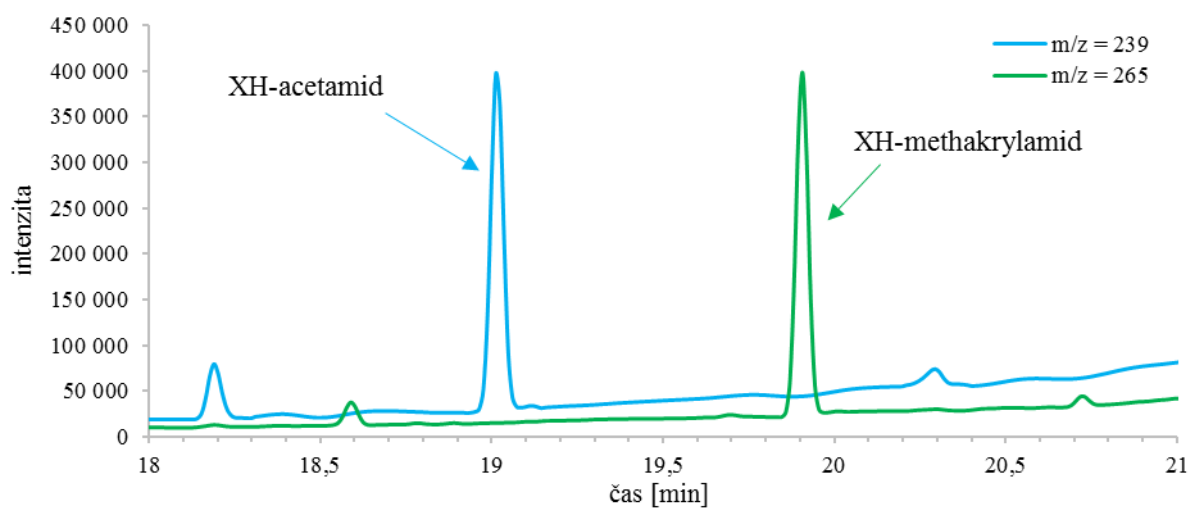
Příloha 14: Hodnoty podílu ploch píků AA a vnitřních standardů a z nich vypočtené koncentrace pomocí rovnice kalibrační přímky pro přesnost a správnost

$c_{AA}$ [µg/g]	vnitřní standard ACA		vnitřní standard MAA	
	A (AA)/A (ACA)	$c_{AA}$ [µg/g]	A (AA)/A (MAA)	$c_{AA}$ [µg/g]
10,45	0,1126	11,082	0,2175	16,429
	0,1000	9,837	0,1949	14,721
	0,1143	11,243	0,2240	16,918
	0,0977	9,608	0,1769	13,361
	0,0986	9,701	0,1515	11,447
	0,1056	10,392	0,1442	10,890

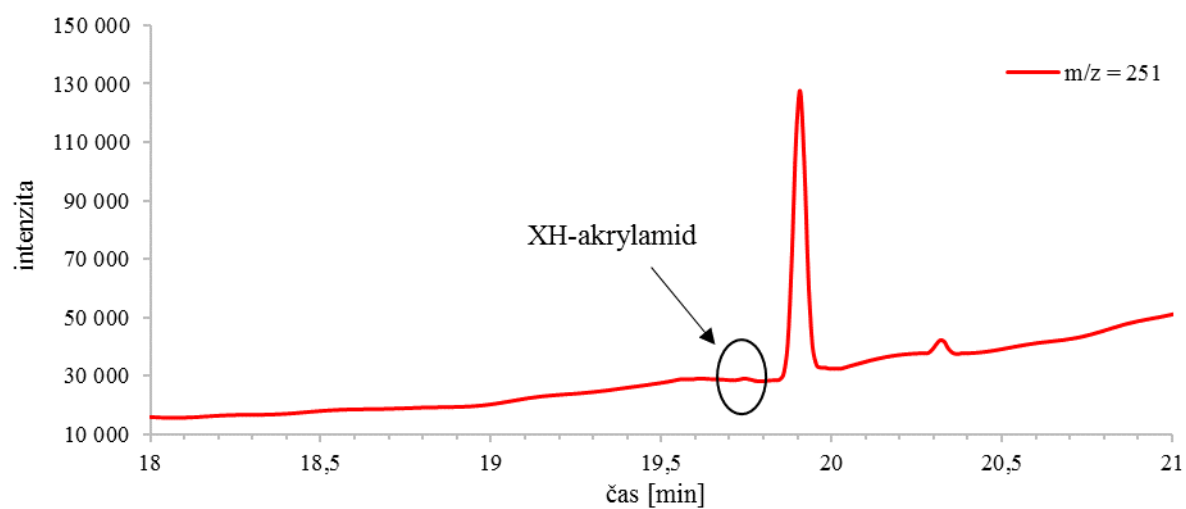
Příloha 15: SIM chromatogram vzorku ze špaldové mouky –  $m/z = 251$



Příloha 16: SIM chromatogram vzorku ze špaldové mouky –  $m/z = 239$  a  $265$



Příloha 17: SIM chromatogram vzorku z kokosové mouky –  $m/z = 251$



Příloha 18: SIM chromatogram vzorku z kokosové mouky –  $m/z = 239$  a  $265$

