

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



ANALÝZA AKRYLAMIDU METODOU GC/MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Roman Papoušek

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2012

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

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce, doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D., za jeho ochotu, věcné připomínky, rady a čas, který mi při vytváření této práce věnoval.

Poděkování patří také mé rodině za její vytrvalou podporu a za snahu o vytvoření co nejlepších podmínek ke studiu.

SHRNUTÍ

Diplomová práce se zabývá možnostmi stanovení akrylamidu v různých typech matic za využití plynové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a derivatizace analytu. Navržená metoda využívá bromace akrylamidu za vzniku 2-brompropenamidu. Tento derivát je na rozdíl od samotného akrylamidu méně polární, tudíž lépe extrahovatelný organickými rozpouštědly, má vyšší molekulovou hmotnost a dovoluje citlivější detekci akrylamidu.

Způsob analýzy představený v této práci byl využit pro stanovení akrylamidu ve vodě, v plynných produktech spalování (pyrolýzy) vonné tyčinky, vonných františků a doutníku. Analyzovány byly také matričně složitější vzorky potravin jako smažené bramborové lupínky, sušenky, mletá káva apod. Naměřené koncentrace akrylamidu se pohybovaly v rozmezí 46 – 1984 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, přičemž největší množství akrylamidu bylo nalezeno v mleté kávě a v tabákovém kouři.

Použitá metoda je charakteristická širokou využitelností, uplatňuje se nejen při kontrolách životního prostředí, potravin a průmyslových výrobků, ale také v medicíně a forenzních aplikacích.

KLÍČOVÁ SLOVA

akrylamid, derivatizace, bromace, 2-brompropenamid, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, GC/MS

SUMMARY

This thesis deals with possibilities of acrylamide determination in various types of matrices using gas chromatography, mass spectrometry and derivatization of the analyte. The proposed method uses bromination of acrylamide to 2-bromopropenamide. This derivative is less polar than native acrylamide, thus better extractable into organic solvents, has a higher molecular weight and allows sensitive detection of acrylamide.

The method of analysis presented in this thesis was used for determination of acrylamide in water, in gaseous products of combustion (pyrolysis) of incense stick, incense cones and cigar. Also some complex matrices of food samples such as potato chips, cookies, ground coffee, etc. were analyzed. The measured concentration of acrylamide ranged from 46 to 1984 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and the highest levels of acrylamide were found in ground coffee and in tobacco smoke.

The method is widely applicable and may be used not only for analysis of environmental samples, food and industrial products, but also in medical and forensic applications.

KEYWORDS

acrylamide, derivatization, bromination, 2-bromopropenamide, gas chromatography, mass spectrometry, GC/MS

OBSAH

	Strana
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti akrylamidu	11
2.2 Biologické údaje	13
2.2.1 Toxicita	13
2.2.2 Toxikokinetika	13
2.3 Průmyslová produkce a použití	14
2.4 Akrylamid v životním prostředí	15
2.4.1 Ovzduší	15
2.4.2 Voda	15
2.4.3 Půda a půdní sedimenty	16
2.5 Akrylamid v potravinách	17
2.5.1 Příčiny a způsoby vzniku akrylamidu	18
2.5.1.1 Maillardova reakce	18
2.5.1.2 Alternativní způsob tvorby akrylamidu	20
2.5.2 Možnosti eliminace tvorby v potravinách	21
2.5.2.1 Výrobky z brambor	21
2.5.2.2 Pekařské a cereální výrobky	22
2.5.2.3 Káva	22
2.5.2.4 Pražené mandle	23
2.6 Legislativa	23

2.7 Metody stanovení akrylamidu	24
2.7.1 Plynová chromatografie.....	25
2.7.2 Kapalinová chromatografie	26
2.7.3 Kapilární elektroforéza.....	27
2.7.4 Bioanalytické metody	28
2.8 Postup bromace akrylamidu	29
2.9 Akrylamid – případové studie	31
2.9.1 Hallandsås, Švédsko	31
2.9.2 Romeriksporten, Norsko.....	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1 Zařízení a pomůcky pro úpravu vzorku	33
3.2 Instrumentace	33
3.3 Chemikálie	33
3.4 Experimentální podmínky	34
3.5 Výběr bazické látky pro dehydrobromaci	35
3.6 Pracovní postupy analýzy akrylamidu	36
3.6.1 Analýza akrylamidu ve vodě	36
3.6.2 Analýza akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy.....	36
3.6.2.1 <i>Odpaření pevného akrylamidu a jeho záchyt</i>	36
3.6.2.2 <i>Vonná tyčinka, vonný františek</i>	37
3.6.2.3 <i>Doutník</i>	38
3.6.3 Analýza akrylamidu v potravinách.....	39
3.6.3.1 <i>Smažené výrobky, pečivo, sušenky</i>	39
3.6.3.2 <i>Káva a její náhražky, kakao, koření</i>	39

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	40
4.1 Identifikace a kvantifikace akrylamidu.....	40
4.2 Výběr bazické látky pro dehydrobromaci	41
4.3 Analýza akrylamidu ve vodě	44
4.4 Analýza akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy.....	45
4.4.1 Odpaření pevného akrylamidu a jeho záchyt	45
4.4.2 Vonná tyčinka, vonný františek.....	46
4.4.3 Doutník	47
4.5 Analýza akrylamidu v potravinách	50
4.5.1 Smažené výrobky, pečivo, sušenky.....	50
4.5.2 Káva a její náhražky, kakao, koření	52
4.6 Další toxické látky detekované během analýz.....	54
5. ZÁVĚR	56
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	58
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60

1. ÚVOD

Akrylamid (prop-2-enamid, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) je vinylový monomer, který se přes více než padesát let využívá v různých průmyslových aplikacích.[1] Tato nízkomolekulární krystalická látka bez barvy a zápachu je vysoce rozpustná ve vodě, na vzduchu reaktivní a schopná rychle polymerizovat za vzniku polyakrylamidu. [2]

Polyakrylamid se v moderním chemicko-technologickém průmyslu využívá jako flokulant při čištění odpadních a pitných vod, jako těsnicí materiál při stavbě přehrad, tunelů, vodních nádrží, dále také pro zpevnění půdy při stavbě silnic, jako pojivo v papírenském průmyslu a také jako aditivum při výrobě průmyslových a kosmetických produktů. V neposlední řadě je velmi často využíván v analytické biochemii při elektroforetické separaci a purifikaci proteinů.[2-5] Samotný polyakrylamid je netoxický, ale ve většině případů obsahuje rezidua nezpolymerizovaného akrylamidu, který už toxické účinky vykazuje.[6]

Nespočtem studií bylo prokázáno, že akrylamid je karcinogenním, genotoxickým, toxickým pro reprodukci a neurotoxickým pro centrální nervový systém člověka.[7-10] Z těchto důvodů v roce 1994 zařadila Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny akrylamid do skupiny látek s označením 2A („potenciální lidský karcinogen“).[1]

Je tedy pochopitelné, že v roce 2002 vyvolal rozruch objev švédských vědců, kteří poukázali na přítomnost a vysoký obsah akrylamidu v některých potravinách.[11] Významné koncentrace akrylamidu našli v potravinách rostlinného původu, které jsou bohaté na škrob a tepelně upravované při více než 120 °C (smažení, pražení, pečení, grilování apod.). Jedná se především o smažené bramborové lupínky a hranolky, kávu, pečivo, sušenky, snídaňové cereálie a mnoho dalších. Přítomnost akrylamidu v potravinách lze z větší části vysvětlit jako důsledek Maillardovy reakce, kdy dochází k reakci mezi aminokyselinami (asparaginem) a redukcujícími cukry (především glukózou a fruktózou).[5,12-14] Za další nezanedbatelný zdroj akrylamidu pro lidský organismus lze považovat tabákový kouř, kosmetiku, obalový materiál potravin a pitnou vodu.[15,16] Ke kontaminaci pitných vod dochází snadno, a to díky vysoké mobilitě akrylamidu v půdě a podzemních vodách.[5]

Všechny doposud zjištěné poznatky o výskytu a nebezpečnosti akrylamidu poukazují na nutnost vývoje a validace spolehlivých a citlivých analytických metod, které by umožnily kvantifikovat velmi nízké koncentrace akrylamidu v rozmanitých a komplikovaných

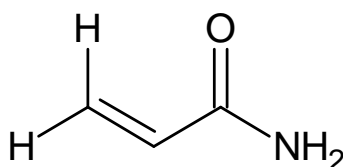
matricích, mezi něž tepelně upravené potraviny bezesporu patří. Dříve vytvořené metody založené na klasické HPLC popř. GC jsou vhodné pro stanovení akrylamidu ve vodách, biologických tekutinách a tepelně neopracovaných potravinách (kukuřice, brambory, cukrová řepa,...). Pro analýzu potravin upravovaných za vysokých teplot nejsou tyto metody příliš vhodné z důvodu nedostatečné selektivity.[17]

Jako vhodnější alternativa se jeví metody využívající spojení chromatografické separace (LC popř. GC) s hmotnostní spektrometrií. Vedle přímé detekce akrylamidu se výhodnější zdají být postupy zahrnující rovněž derivatizaci analytu.[18] Cílem této práce je aplikace citlivé GC/MS metody, založené na bromaci akrylamidu. Snahou je využít tuto velmi citlivou metodu nejen při analýze vody a matričně složitějších vzorků potravin, ale také při stanovení akrylamidu v plynných produktech uvolňovaných při spalování a pyrolýze různých typů vzorků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti akrylamidu

Akrylamid ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, Obr. 1) je bezbarvá krystalická látka bez zápachu, s molekulovou hmotností 71,08. Za pokojové teploty je tato sloučenina stabilní a jen pozvolna sublimuje. Při jejím zahřátí na teplotu tání, případně vystavení UV záření, intenzivně polymerizuje za vzniku polyakrylamidu. Rozkladem při vysoké teplotě pak dochází k uvolňování štiplavého kouře a oxidů dusíku. Rozpustnost akrylamidu v polárních a nepolárních rozpouštědlech se značně liší. V případě vody je rozpustnost extrémně vysoká. Přehled fyzikálně-chemických vlastností akrylamidu poskytují tabulky Tab. I a Tab. II. [19,20]



Obr. 1: Strukturní vzorec akrylamidu

Tab. I: Fyzikálně-chemické vlastnosti akrylamidu

Vlastnost	Hodnota
Molekulová hmotnost	71,08
Hustota	1,122 g/ml (při 30°C)
Teplota tání	84,5°C
Teplota varu	
0,27 kPa	87°C
0,67 kPa	103°C
1,4 kPa	116,5°C
3,3 kPa	136°C
Tenze par	0,9 Pa (při 30°C)
Teplota vzplanutí	138°C

Tab. II: Rozpustnost akrylamidu v různých rozpouštědlech

Rozpouštědlo	Rozpustnost (g/100 ml při 30°C)
Voda	215,5
Methanol	155
Dimethyl sulfoxid	124
Dimethyl formamid	119
Ethanol	86,2
Aceton	63,1
Pyridin	61,9
Acetonitril	39,6
Dioxan	30
Ethylacetát	12,6
Chloroform	2,66
1,2-Dichlorethan	1,5
Benzen	0,35
Tetrachlormethan	0,038
<i>n</i> -Heptan	0,0068

Akrylamid je difunkčním monomerem obsahujícím reaktivní dvojnou vazbu a amidickou skupinu. Vykazuje jen slabé acidobazické vlastnosti. Ne fluoreskuje a jeho molekula postrádá silný chromofor pro UV detekci. Při teplotě vyšší, než je jeho teplota tání, polymerizuje rychlou a silně exotermní reakcí. Při této reakci vznikají hydrofilní polymery o molekulové hmotnosti mezi jedním až třiceti miliony a s řetězcem obsahujícím 14 000 až 420 000 monomerních jednotek. Protože proces polymerizace není dokonalý, obsahují vzniklé polymery proměnlivá reziduální množství nezreagovaného monomeru.[19,20]

2.2 Biologické údaje

2.2.1 Toxicita

Akrylamid patří do skupiny látek, které jsou schopny jak u zvířat, tak u člověka vyvolávat široké spektrum toxických účinků. Mezi nejzávažnější účinky patří poškození nervového systému, karcinogenita, genotoxicita a reprotoxicita.[21]

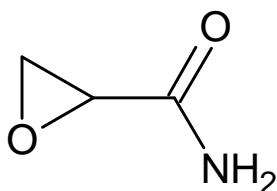
K akutní otravě akrylamidem dochází vzácně, většinou po požití vysoké dávky. Studie ukazují, že se hodnota letální dávky akrylamidu LD₅₀ (orálně) pro potkany, myši, králíky a morčata pohybuje v rozmezí 107 – 203 mg·kg⁻¹. Jediný známý případ akutní otravy akrylamidem u člověka byl popsán v r. 1987 Donovanem a Pearsonem. Jednalo se o otravu ženy, která záměrně požila vysoké množství pevného akrylamidu v množství odpovídající přibližně koncentraci 375 mg·kg⁻¹. Do pěti hodin od otravy byly u ženy pozorovány halucinace a hypotenze, po devíti hodinách záchvaty a po třech dnech od otravy bylo zaznamenáno gastrointestinální krvácení, dýchací potíže, poškození jater a nervů.[20]

Při dlouhodobé expozici akrylamidu hrozí poškození nervového systému a to jak u lidí, tak také u zvířat. Podle posledních experimentů provedených *in vitro* i *in vivo* je akrylamid považován za genetický a reprodukční toxin s mutagenními a karcinogenními vlastnostmi. Testy na laboratorních zvířatech, která byla vystavena příjmu akrylamidu v pitné vodě, prokázaly zvýšené riziko nádorů centrálního nervového systému, štítné žlázy, dělohy, prsní žlázy a dalších orgánů.[1] Již dříve provedené toxikologické studie poukazovaly na dráždivé účinky par akrylamidu pro oči a kůži, dále na poškození nervového systému a karcinogenitu u zvířat. Díky těmto poznatkům byl akrylamid v r. 1994 Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) označen za „potenciální lidský karcinogen“.[21]

2.2.2 Toxikokinetika

Studiemi prováděnými na lidech a laboratorních zvířatech (potkani, myši, psi, prasata) bylo zjištěno, že i přes některé rozdíly v metabolismu lidí a zvířat, je absorpce, distribuce a exkrece akrylamidu v těchto organismech velice podobná. Perorálně aplikovaný akrylamid se velice snadno a rychle absorbuje z gastrointestinálního traktu a následně metabolizuje.

Experimenty na zvířatech ukázaly, že je akrylamid široce distribuován do všech tkání.[22] Autoradiografickými pokusy u myši a potkanů bylo zjištěno, že se akrylamid a jeho metabolity hromadí v pohlavních orgánech samců a také ve vyvíjejícím se plodu a mléce gravidních samic. V celé řadě tkání byly také nalezeny adukty akrylamidu a jeho metabolitů s RNA, DNA a proteiny (např. hemoglobinem).[23] Mezi hlavní dráhy metabolismu akrylamidu patří jeho oxidace cytochromem P450 za vzniku epoxidu glycidamidu (Obr. 2) a také přímá konjugace s glutathionem za vzniku N-acetyl-S-(2-karbamoylethyl)cysteinu.[24] Některé studie naznačují, že metabolit glycidamid vykazuje mnohem výraznější mutagenní účinek než samotný akrylamid.[8,25] Akrylamid je spolu se svými metabolity vylučován z těla především močí a to ve formě konjugátů s kyselinou merkapturovou. V menší míře je také vylučován stolicí a plícemi.[22,23]



Obr. 2: Strukturní vzorec glycidamidu

2.3 Průmyslová produkce a použití

První technický akrylamid byl syntetizován v r. 1893 německým vědcem C. Moreau, který jej připravil pomalým přidáváním suchého amoniaku do roztoku benzenu nasyceného akryloyl chloridem při teplotě 10°C.[26] Komerčně začal být akrylamid vyráběn v roce 1954. Již na počátku 80. let bylo dosaženo jeho roční produkce v USA a Japonsku 40 000 tun v každé z těchto zemí. V r. 1993 činila výrobní kapacita tří hlavních výrobců v Americe 75 000 tun. Celková produkce v Evropské unii v r. 1995 dosahovala 80 000 – 100 000 tun. Téměř veškerý akrylamid (99,9 %) se v EU využívá k výrobě polyakrylamidu.[20] Ten se uplatňuje především jako flokulant při čištění městských a průmyslových odpadních vod a vod znečištěných při výrobě papíru a celulózy. Používá se také k vysušení odpadních kalů z těchto čistíren. Polyakrylamid nachází mimo jiné uplatnění jako aditivum v kosmetických a hygienických prostředcích a jako výchozí surovina pro přípravu gelů používaných

v biochemických laboratořích při elektroforetických separacích. Akrylamid a polyakrylamidy se dále používají při výrobě barviv, organických chemikálií, při výrobě kontaktních čoček, v textilním průmyslu, při zpracování rud, rafinaci cukru, popřípadě jako prostředek pro stabilizaci půdy při stavbě tunelů, přehrad, nádrží, kanalizace a studní.[27]

2.4 Akrylamid v životním prostředí

2.4.1 Ovzduší

Ke znečištění ovzduší akrylamidem dochází nejčastěji při výrobě polymerů, kosmetiky nebo jiného spotřebního zboží a také v laboratoři při výrobě polymerních gelů používaných pro elektroforetickou separaci.[27] V případě uzavřených prostor lze za významný zdroj kontaminace považovat tabákový kouř, ve kterém je přítomnost akrylamidu také prokázána.[27-29] Z údajů EPA (United States Environmental Protection Agency) vyplývá, že celkové emise akrylamidu do ovzduší v USA v r. 2005 činily 12,12 tun. Přesto se předpokládá, že k významnějšímu znečištění ovzduší akrylamidem nedochází a to z důvodu jeho malé těkavosti a vysoké rozpustnosti ve vodě. Akrylamid přítomný v atmosféře je také náchylný k fotochemickému rozkladu prostřednictvím hydroxylových radikálů a ozonu. Z omezeného množství dostupných dat, lze říci, že atmosférická koncentrace akrylamidu je na velice nízké úrovni nebo žádná.[27]

2.4.2 Voda

Přítomnost akrylamidu v pitné vodě je obvykle důsledkem uvolňování zbytkového monomeru z polyakrylamidu, který se používá jako koagulant, sloužící k zachycení a vysrážení nerozpustných látek přítomných v upravované vodě. Ke znečištění povrchových a podzemních vod dochází také při používání polyakrylamidu jako zpevňující látky při stavbě přehrad, uvolňováním z plastů a průmyslových barviv. Z důvodu vysoké mobility akrylamidu v půdě je třeba počítat se zvýšeným rizikem kontaminace povrchových a podzemních vod. Celkové množství akrylamidu uvolněné do vod v důsledku průmyslové činnosti činilo v USA v letech 1987 až 1993 téměř 16,5 tuny. Mezi hlavní průmyslové odvětví podílející se na znečištění vod akrylamidem patří výroba plastů a pryskyřic (8,6 t), dále výroba celulózy (1,4

t) a průmyslová anorganická chemie (1,1 t). Pro příklad ve studnách v Západní Virginii, které slouží jako zdroj pitné vody, bylo nalezeno 24 – 41 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ akrylamidu. Vzorokly vody odebrané z řeky v blízkosti výrobce polyakrylamidu obsahovaly okolo 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ akrylamidu, zatímco ve vzorcích z jiných průmyslových oblastí činila koncentrace méně než 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. [27]

Na základě požadavků zákona o bezpečnosti pitné vody z r. 1974 (USA) stanovila EPA nulový maximální limit pro množství akrylamidu v pitné vodě. Z důvodu neexistující standardizované analytické metody pro pitné vody, reguluje EPA obsah akrylamidu v této vodě prostřednictvím kontroly množství volného akrylamidu v polyakrylamidu využívaném při čištění vod. Podle nařízení je dovoleno při čištění pitné vody použít dávku polymeru o hodnotě 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž množství volného akrylamidu v tomto polymeru musí činit maximálně 0,05 % z jeho celkové hmotnosti (to odpovídá 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). [30] V případě, že je akrylamid přítomen již v surové vodě, lze pro snížení jeho koncentrace využít ozonizaci popř. přísávek manganistanu draselného. Při běžném čištění v konvenčních úpravnách pitných vod a čistírnách vod odpadních k odstranění akrylamidu nedochází. [27]

Podle provedených studií se předpokládá, že akrylamid přítomný ve vodě snadno podléhá biologickému rozkladu. Při pokusu s říční vodou obsahující 10 ppm akrylamidu došlo k jeho úplnému rozkladu asi po 12 dnech. Při jiném pokusu byla využita voda z řeky Temže s koncentrací akrylamidu 8 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V dobře provzdušněném vzorku za přítomnosti slunečního záření došlo k celkové degradaci akrylamidu přibližně po devíti dnech. [27]

2.4.3 Půda a půdní sedimenty

Ke kontaminaci půd dochází opět nejčastěji uvolněním nezpolymerizovaného akrylamidu z polyakrylamidových gelů. Podle údajů EPA činil celkový únik akrylamidu do půdy v USA mezi lety 1987 a 1993 asi 2,6 tuny. Mezi největší znečišťovatele patří výrobci plastů a pryskyřic, dále organický a anorganický průmysl. [27]

K vazbě mezi akrylamidem a půdními částicemi nedochází, proto také akrylamid snadno půdní vrstvou proniká. Biodegradaci podléhá akrylamid ve všech druzích půd, jak v písčítých, tak také v těžších jílovítých půdách. Vyšší mobilitu a nižší rychlost biodegradace vykazují akrylamid v půdách písčítých. Hlavním mechanismem rozkladu akrylamidu v půdě je enzymaticky katalyzovaná hydrolýza, při které vznikají NH_4^+ ionty. Rychlost rozkladu je ovlivněna jak teplotou, tak také inkubační dobou. Na základě zjištěných informací se předpokládá, že k akumulaci akrylamidu v půdě nedochází. [27]

2.5 Akrylamid v potravinách

V dubnu roku 2002 uveřejnili vědečtí pracovníci ze Švédské národní potravinové správy (The National Food Administration) a Stockholmské univerzity informace o nálezu akrylamidu v tepelně upravovaných potravinách. Akrylamid se v potravinách přirozeně nenachází a do doby tohoto objevu ani neexistovaly žádné informace o jeho vzniku v potravinách upravovaných za vysokých teplot.[15] Na zprávu o přítomnosti potenciálního lidského karcinogenu v potravinách okamžitě reagovaly světové instituce zabývající se bezpečností potravin (FDA, WHO, FAO, JIFSAN, EFSA), které svým výzkumem přítomnost akrylamidu v těchto potravinách potvrdily.[31] Akrylamid se jako kontaminant nachází v relativně vysokých koncentracích ve smažených, pečených, grilovaných a pražených potravinách připravených především ze surovin rostlinného původu. Surové a vařené potraviny jej obvykle neobsahují, popřípadě jen v nepatrných množstvích. Nejvyšší koncentrace akrylamidu jsou typické pro smažené bramborové lupínky, hranolky, snídaňové cereálie, pečivo, sušenky, perník, popcorn, zrnkovou i instantní kávu, kávové náhražky. Překvapivě také sušené ovoce (švestky, hrušky) obsahuje vysokou hladinu akrylamidu (více než $1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), a to i v případě tepelného zpracování při méně než 80°C . Dále byla jeho přítomnost potvrzena v pražených mandlích, černých olivách, sladu, kakaovém prášku, mleté paprice a jiných potravinách.[12,13,15,31-35]

Další možnou cestou, jak může ke kontaminaci potravin docházet, je uvolňování akrylamidu z obalových materiálů, akrylamidových polymerů používaných ve výrobě, popř. z vody na oplachování ovoce a zeleniny. Nepředpokládá se ale, že by tímto způsobem docházelo k tak významné kontaminaci potravin, jaká nastává při jejich tepelné úpravě nad 120°C . [31]

Podle dostupných údajů se průměrný denní příjem akrylamidu populací odhaduje na $0,3 - 2,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. U dětí je příjem akrylamidu z důvodu jejich nižší hmotnosti asi dvakrát až třikrát vyšší než u dospělých. Celkový příjem akrylamidu se odvíjí od složení potravního koše v různých zemích. Ve střední Evropě se hlavní měrou na celkovém příjmu podílejí především pečené a smažené výrobky z brambor.[13]

2.5.1 Příčiny a způsoby vzniku akrylamidu

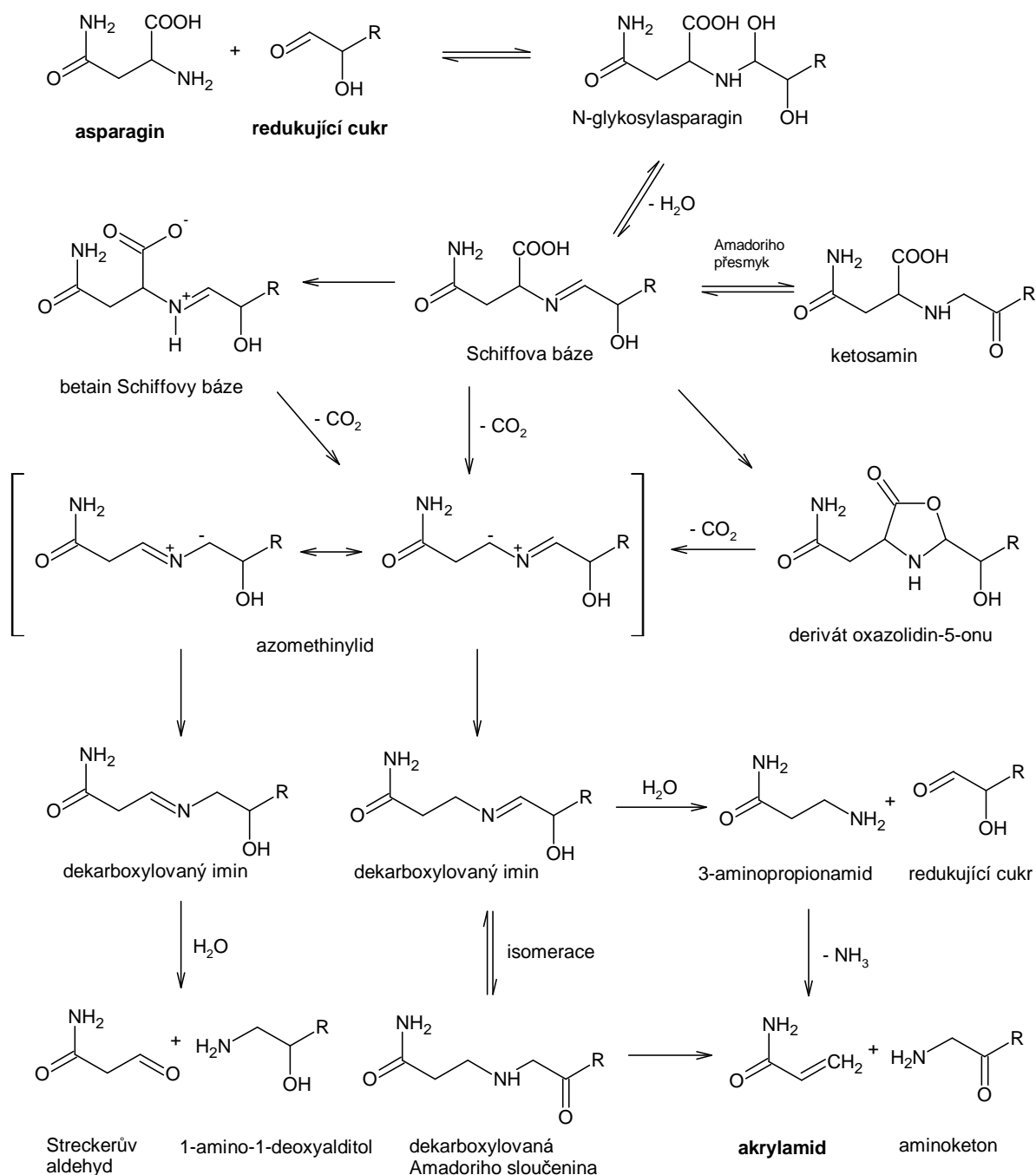
2.5.1.1 Maillardova reakce

Za hlavní mechanismus tvorby akrylamidu v potravinách je považována především Maillardova reakce, konkrétně pak reakce mezi volnou neesenciální aminokyselinou asparaginem, od které je odvozen skelet akrylamidu, a redukujícími cukry popř. jinými karbonylovými sloučeninami (k nejintenzivnější tvorbě akrylamidu dochází v přítomnosti glukózy, fruktózy nebo acetolu). V případě, že redukující cukry nebo jiné karbonylové sloučeniny (α -hydroxykarbonylové nebo α -dikarbonylové) nejsou přítomny, tak dochází pouze k deaminaci asparaginu a vzniku kyseliny fumarové.[13]

Maillardova reakce patří obecně k nejvýznamnějším a nejrozšířenějším chemickým reakcím, ke kterým dochází při skladování a zpracování potravin. Jedná se o soubor reakcí mezi redukujícími cukry a aminosloučeninami, při kterých vzniká řada velmi reaktivních karbonylových sloučenin. Charakteristickým pro tyto reakce je vznik hnědých až černých pigmentů (melanoidů), díky kterým se tyto reakce nazývají reakcemi neenzymového hnědnutí. Současně vznikají také látky, odpovědně za charakteristickou chuť a vůni, ale také látky toxické.[31]

Obecné schéma mechanismu vzniku akrylamidu z asparaginu v přítomnosti α -hydroxykarbonylových sloučenin je znázorněné na Obr. 3.[13] Základním produktem vznikajícím reakcí mezi asparaginem a redukujícím cukrem je N-glykosylasparagin (přímý prekurzor akrylamidu). Jeho dehydratací vzniká příslušná Schiffova báze. Jak N-glykosylasparagin, tak také příslušná Schiffova báze vykazují stabilitu v prostředí s nízkým obsahem vody. Ve vodném prostředí Schiffova báze hydrolyzuje, popř. dochází k Amadoriho přesmyku za vzniku ketosaminu, který není prekurzorem akrylamidu. Z ketosaminu mohou následnými reakcemi vznikat sloučeniny účastnící se produkce sensoricky významných produktů. V podmínkách s vyšší vlhkostí může Schiffova báze dekarboxylovat za vzniku stabilního azomethinylidu. Dalšími možnými alternativami přeměny Schiffovy báze je vznik betainu Schiffovy báze, popř. cyklizace na derivát oxazolidin-5-onu. Dekarboxylací obou těchto sloučenin dosáhneme opět vzniku azomethinylidu, který může být přítomen ve dvou formách lišících se polohou vazby C=N. Dekarboxylací obou těchto forem získáme příslušný imin, který dále může hydrolyzovat na původní cukr a 3-aminopropionamid, jehož enzymovou deaminací vzniká akrylamid. Další možností je izomerace azomethinylidu na

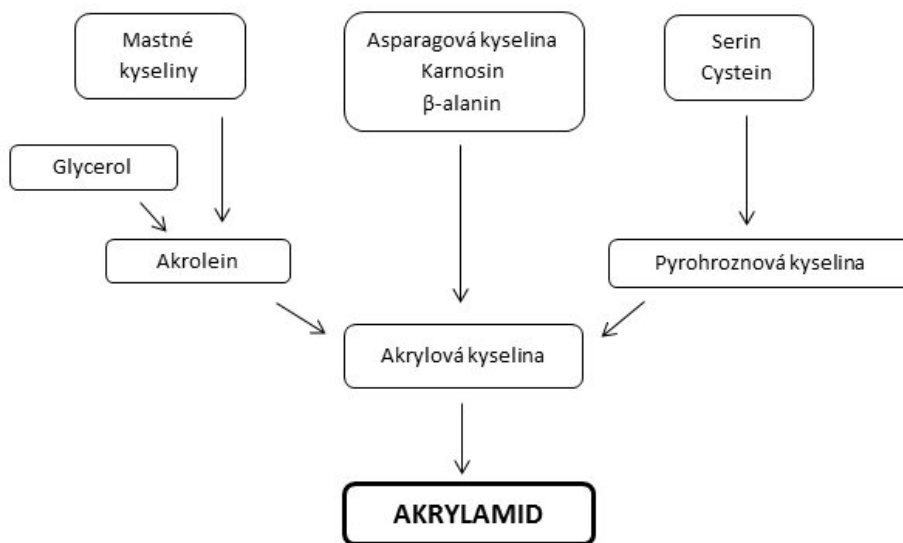
dekarboxylovanou Amadoriho sloučeninu, která je klíčovým prekurzorem akrylamidu. Vznik akrylamidu z této Amadoriho sloučeniny je doprovázen tvorbou aminoketonu, a to rozštěpením kovalentní vazby mezi uhlíkem a dusíkem.[13,31]



Obr. 3: Mechanismus tvorby akrylamidu z asparaginu za přítomnosti α -hydroxykarbonylových sloučenin

2.5.1.2 Alternativní způsob tvorby akrylamidu

Přestože dominantní cestou pro vznik akrylamidu v potravinách je reakce mezi asparaginem a redukujícími cukry, existují také další možnosti, jak k jeho vzniku může docházet, třebaže ve stopových koncentracích. Za tyto další možné prekurzory tvorby akrylamidu považujeme akrolein, kyselinu akrylovou a kyselinu pyrohroznovou (Obr. 4).[13]



Obr. 4: Alternativní způsoby tvorby akrylamidu

Akrolein (1-propenal) je jednoduchý nenasycený aldehyd. Používá se k mnoha účelům, např. jako biocid vodních plevelů nebo jako meziproduct při syntéze některých organických chemikálií. Jeho přítomnost byla prokázána v některých druzích potravin. Tvoří se dehydratací glycerolu při zahřívání živočišných a rostlinných tuků (potravin y bohaté na lipidy). Dále bylo zjištěno, že může vznikat z polynenasycených mastných kyselin během enzymatického i neenzymatického zrání v důsledku oxidace lipidů. Mimo jiné je považován za látku s cytotoxickými vlastnostmi.[19]

Tepelný rozklad kyseliny asparagové, karnosinu a β -alaninu vede ke vzniku kyseliny akrylové. Ta je v přítomnosti amoniaku prekurzorem pro tvorbu akrylamidu. Za nejčastější zdroje amoniaku při tepelném zpracování potravin považujeme aminokyseliny asparagin, glutamin, cystein a kyselinu asparagovou.[19]

Další možnou cestou pro vznik akrylamidu je dehydratace serinu, ať již samotného nebo v přítomnosti cukrů, při které může docházet ke tvorbě kyseliny pyrohroznové. Také ztráta thiolové skupiny u cysteinu může vést ke tvorbě kyseliny pyrohroznové. Redukcí kyseliny pyrohroznové vzniká kyselina mléčná. Její následnou dehydratací se tvoří kyselina akrylová. Studiemi bylo prokázáno, že pyrolýzou směsi kyseliny mléčné a amoniaku vzniká amid kyseliny mléčné, dále kyselina akrylová a akrylamid.[19]

2.5.2 Možnosti eliminace tvorby v potravinách

Ze závěrů studií zabývajících se objasněním mechanismů vzniku akrylamidu v tepelně upravovaných potravinách vyplývá, že úroveň kontaminace potravin akrylamidem závisí především na těchto faktorech:

- obsah redukujících cukrů ve výchozí surovině
- obsah asparaginu a dalších volných aminokyselin
- teplotní profil použitý při zpracování
- hodnota pH
- obsah vody
- aditiva použitá v receptuře [13]

2.5.2.1 Výrobky z brambor

Hlízy brambor obsahují značné množství prekurzorů akrylamidu, především volného asparaginu, glukózy a fruktózy, které jsou odpovědné za vysoké koncentrace akrylamidu v hranolkách, chipsech a dalších potravinách vyrobených z brambor. Protože se jedná o velmi často konzumované potraviny, je důležité využívat metod a postupů eliminujících vznik akrylamidu. Podstatným faktorem je obsah redukujících cukrů, který lze ovlivnit výběrem vhodných odrůd brambor a také jejich správným skladováním. Teplota, při které jsou bramborové hlízy skladovány, by neměla dlouhodobě klesnout přibližně pod 10°C, protože nízká teplota má za následek zvýšení obsahu redukujících cukrů. Dalšími možnostmi, jak obsah akrylamidu ve výrobcích z brambor snížit, je blanšírování v okyselených roztocích, popř. sledování odstínu zbarvení potravin při tepelné úpravě. Kvalita oleje používaného při smažení nemá žádný vliv na tvorbu akrylamidu.[18,19]

2.5.2.2 Pekařské a cereální výrobky

Chléb a další druhy pečiva, včetně sušenek, patří mezi významné zdroje akrylamidu. Obsah akrylamidu je závislý na obsahu asparaginu, dále na době a teplotě pečení. Nejvyšší množství akrylamidu se nachází v povrchové vrstvě potraviny (kůrce). Mezi nejčastější doporučení patří používání mouky s nízkým obsahem asparaginu. Ovšem toto doporučení není jednoduché aplikovat, protože např. celozrnná mouka, která je zdraví prospěšná a je výchozí surovinou pro řadu pekařských výrobků, obsahuje v porovnání s jinými moukami poměrně vysokou koncentraci asparaginu. Dalším doporučením je upravit receptury tak, aby nebylo nutné přidávat redukující cukry. Dále upravit dobu a teplotu pečení, aby se zabránilo přílišnému zhnědnutí kůrky a také prodloužit dobu kynutí těsta.[19,36] Je také nezbytné vyloučit z receptury kypřící přípravky na bázi uhličitanu amonného, který se velkou měrou např. u perníků podílí na zvyšování koncentrace tohoto kontaminantu. Jako vhodnou alternativu hydrogenuhličitanu amonného lze použít uhličitan draselný s vinanem draselným nebo difosforečnan sodný s hydrogenuhličitanem sodným. Další možností pro snížení obsahu akrylamidu je použití komerčně vyráběného enzymu asparaginasy, který nemá vliv na kvalitu konečného výrobku, ale jeho účinnost se může u různých výrobků lišit.[13,36,37]

2.5.2.3 Káva

Při procesu pražení kávy se obvykle využívá teplot dosahujících 220 - 250°C. Protože jsou kávové boby zpracovávány při relativně vyšší teplotě než ostatní potraviny, je nutné počítat se složitějším průběhem tvorby akrylamidu, než je tomu u jiných matric.[38] Něktými studiemi bylo zjištěno, že při dlouhodobém skladování mleté kávy dochází k velmi významným ztrátám přítomného akrylamidu (až 60 %), zatímco v již uvařené kávě, která byla zahřívána po dobu 5 hodin, nebylo významné snížení koncentrace akrylamidu zpozorováno.[39,40] Největší množství akrylamidu se v kávě tvoří hned v počátečním kroku pražení a s koncem pražicího cyklu jeho obsah prudce klesá. Zvýšením teploty pražení dochází ve vysoké míře k degradaci akrylamidu, ale také ke vzniku jiných nežádoucích látek včetně negativního ovlivnění sensorických vlastností celého výrobku. Důležitou roli také v případě kávových směsí hraje poměr mezi obsahem Arabiky a Robusty. Přítomnost většího množství Robusty je spojena s větší koncentrací akrylamidu v kávové směsi.[38]

2.5.2.4 Pražené mandle

V mandlích jsou přítomny oba prekurzory nutné pro tvorbu akrylamidu. Jak volný asparagin, tak také glukóza a fruktóza. Ke tvorbě akrylamidu dochází při pražení okolo teploty 130°C. Detekovaná množství akrylamidu v pražených mandlích se pohybovala v rozmezí 260 – 1530 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Zajímavá je skutečnost, že během skladování při pokojové teplotě dochází v pražených mandlích ke snížení obsahu akrylamidu. Obsah akrylamidu v mandlích také velmi dobře koresponduje s jejich barvou. Čím je barva pražených mandlí tmavší, tím vyšší koncentraci akrylamidu obsahují.[38]

2.6 Legislativa

Z hlediska potravinářských výrobků neexistuje do dnešní doby právní předpis, kterým by byl obsah akrylamidu v těchto produktech regulován. Přestože Evropská Komise nestanovila žádné limitní hodnoty, vydala Doporučení Komise 2007/331/ES, podle kterého byl v letech 2007 – 2009 v členských státech obsah akrylamidu v potravinách monitorován. V roce 2010 tento monitoring pokračoval na základě Doporučení Komise 2010/307/ES. Sledování kontaminace bylo zaměřeno na ty potraviny, u kterých se předpokládala vysoká koncentrace akrylamidu. Cílem tohoto monitoringu bylo získat jasnou představu o obsahu akrylamidu v potravinách a také informace o dietárním příjmu celé populace. Nejnovější Doporučení Komise (K(2010) 9681) o zkoumání množství akrylamidu v potravinách pochází ze dne 10. 1. 2011. Toto Doporučení je platné pro rok 2011 i 2012 a na základě výsledků zkoumání z těchto let posoudí Komise situaci a do 31. 12. 2012 rozhodne o nutnosti přijetí dalších vhodných opatření.[41,42]

Množství monomerního akrylamidu migrujícího z obalových materiálů, které přicházejí do kontaktu s potravinami, upravuje Vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmu (38/2001 Sb.). Tato vyhláška říká, že z obalového materiálu nesmí do potravin migrovat větší množství akrylamidu, než udávaná hodnota 0,01 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.[43]

V případě, že je akrylamid přítomen v pitných vodách, musí jeho obsah splňovat limity dané Vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 376/2000 Sb., která stanovuje požadavky na pitnou vodu a rozsah a četnost její kontroly. Tato vyhláška plně koresponduje se Směrnicí

Rady 98/83/ES o jakosti vody určené k lidské spotřebě. V obou těchto právních předpisech činí limitní hodnota 0,1 µg akrylamidu na litr pitné vody.[44,45]

Z důvodu používání polyakrylamidových gelů v kosmetických přípravcích může docházet ke kontaminaci těchto výrobků monomerním akrylamidem. Limity pro obsah akrylamidu v kosmetice stanovuje Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb. U prostředků k péči o tělo, které se neoplachují, činí maximální zbytkový obsah akrylamidu 0,1 mg·kg⁻¹. Pro ostatní kosmetické prostředky činí max. zbytkový obsah akrylamidu 0,5 mg·kg⁻¹. Limity stanovené touto vyhláškou jsou totožné s hodnotami uvedenými ve Dvacáté šesté směrnici Komise 2002/34/ES.[46,47]

Dalším právním předpisem zabývajícím se akrylamidem je Nařízení Komise č. 366/2011. Toto nařízení za účelem ochrany lidského zdraví a životního prostředí omezuje uvádění na trh a používání akrylamidu v cementu a ve všech prostředcích pro cementování. Stanovená mezní hodnota pro akrylamid v cementu činí 0,1 %.[48]

Ve Spojených státech amerických jsou v platnosti také omezení týkající se obsahu akrylamidu v pracovním ovzduší a v polyakrylamidových gelech používaných jako koagulanty při čištění vod. Podle OSHA (Occupational Safety and Health Administration) činí přípustný expoziční limit (PEL) v pracovním ovzduší 0,3 mg·m⁻³. [49] Limit pro obsah monomerního akrylamidu v polyakrylamidovém gelu používaném při čištění vod je podle EPA (United States Environmental Protection Agency) 0,05 % z celkové hmotnosti polymeru. Tento polymer může být jako koagulant přidáván do vody v koncentraci 1 ppm.[50]

2.7 Metody stanovení akrylamidu

Poté, co švédští vědci v roce 2002 objevili přítomnost akrylamidu v tepelně zpracovaných potravinách, byly několika výzkumnými týmy navrženy rozličné metody vhodné pro stanovení hladiny akrylamidu v obtížných potravinových maticích. Kvantifikace akrylamidu v potravinách není snadná, a to především kvůli jeho nízké molekulové hmotnosti, vysoké polaritě, velmi dobré rozpustnosti ve vodě, vysoké reaktivitě a malé těkavosti. Navíc tyto složité matrice obsahují složky, které působí rušivě a samotnou analýzu

tak komplikují. Taktéž množství akrylamidu v analyzovaných vzorcích bývá obvykle minimální, a proto je nezbytné věnovat zvýšenou pozornost prekoncentračním postupům.[51]

Používané metody jsou založeny na různých způsobech přečištění a zakoncentrování analytu v závislosti na typu matrice analyzovaného vzorku. Jedná se především o metody založené na plynové nebo kapalinové chromatografii ve spojení se selektivními popř. specifickými detektory, nejčastěji však s hmotnostním spektrometrem. V případě plynové chromatografie je analýza akrylamidu obvykle doplněna navíc o jeho derivatizaci. Možná je ovšem také přímá analýza bez derivatizace analytu.[18,21] Za další užitečnou techniku pro stanovení akrylamidu lze považovat kapilární elektroforézu. Také bioanalytické metody, jako jsou imunoenzymatické testy a biosenzory vykazují dostatečnou citlivost a selektivitu.[51] Z provedených metodických studií se však techniky GC/MS a LC/MS/MS zdají být při stanovení akrylamidu směrodatnými a nejužitečnějšími.[21]

2.7.1 Plynová chromatografie

Ke stanovení obsahu akrylamidu v potravinách a dalších komplexnějších maticích se velmi často využívá spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, ať již za použití derivatizace analytu nebo bez ní. Využití kombinace chromatografické separace a hmotnostní spektrometrie umožňuje provést současně jak separaci analytu z matrice, tak také jeho kvantitativní stanovení. Aby bylo dosaženo vyšší selektivity a nižších detekčních limitů, je nezbytná derivatizace analyzované látky. V případě akrylamidu se velice často provádí bromace. Přesto, že je proces derivatizace pracnější a časově náročnější, je vše ve výsledku vykompenzováno snížením limitu detekce a významným zlepšením přesnosti stanovení.[51]

Zřejmě nejčastějšími detektory používanými ve spojení s plynovou chromatografií jsou hmotnostní spektrometry, které umožňují sledování fragmentace vybraného iontu v tzv. SIM módu. S plynovou chromatografií se pro kvantifikaci akrylamidu také velmi často používá plamenově-ionizační detektor (FID) popř. detektor elektronového záchytu (ECD). Oba detektory jsou v kombinaci s předchozí bromací analytu vysoce selektivní a citlivé. Při analýze smažených bramborových lupínků, bramborových hranolek a smažených kuřecích křídel bylo za použití systému GC/ECD dosaženo meze detekce akrylamidu okolo $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a meze kvantifikace $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Také náklady na instrumentaci v tomto systému jsou ve

srovnání s GC/MS/MS podstatně nižší, zatímco citlivost obou těchto systémů je srovnatelná. Za další, relativně novou a do budoucna perspektivní metodu lze při kvantifikaci akrylamidu považovat spojení plynové chromatografie s detektorem citlivým na atomy dusíku a fosforu (NPD).[51]

Přestože je bromace akrylamidu při GC/MS analýze považována za dobrý způsob, jak dosáhnout přijatelných výsledků, lze se v některých výzkumech setkat s postupy, které derivatizaci analytu nevyužívají. Vzhledem k vysoké polaritě nederivatizovaného akrylamidu je nutné při těchto analýzách pracovat s kolonami s polární fází, nejčastěji s polyethylenglykolem. Samotný teplotní program není od analýzy využívající derivatizaci příliš odlišný. Hlavní nevýhodou GC analýzy bez derivatizace analytu je nedostatek charakteristických iontových píků v hmotnostním spektru akrylamidu a interference způsobené složkami matrice. Při práci v režimu elektronové ionizace získáme hlavní iontové fragmenty o hodnotách 71 respektive 55 m/z, použitelné pro kvantifikaci akrylamidu. Ovšem současně extrahovatelné látky, jako jsou např. maltol popř. kyselina heptanová mohou také fragmentovat za vzniku iontů o stejné hmotnosti a tím při analýze rušit. Tyto interference je možné minimalizovat použitím plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC/MS/MS) a dosáhnout tak podstatně nižších limitů detekce. Například při analýze dětské stravy bylo touto technikou dosaženo hodnoty meze detekce $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a meze stanovitelnosti pod $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. [21,51]

2.7.2 Kapalinová chromatografie

Možnou a v dnešní době stále častěji používanou alternativou k technice GC/MS je spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Ve studiích z posledních let bylo spojení LC/MS/MS využíváno ke zjišťování hladin akrylamidu v potravinách, k průzkumu expozice akrylamidu a optimalizováno pro použití v rutinní analýze. Výhodou této chromatografické techniky při kvantitativní analýze akrylamidu je její vysoká citlivost bez nutnosti provádění derivatizačního kroku.[21]

Kapalinová chromatografie je ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií zvláště vhodná pro analýzu polárních a nedostatečně těkavých sloučenin. Tandemové spojení hmotnostních spektrometrů umožňuje separovat vybrané ionty od ostatních v prvním hmotnostním analyzátoru. Z těchto vybraných iontů vznikají následně ionty dceřiné, které

jsou analyzovány ve druhém hmotnostním spektrometru. Při kvalitativním i kvantitativním stanovení akrylamidu se jako nejvhodnější jeví spojení UHPLC systému (Ultra high performance liquid chromatography) s hmotnostním spektrometrem nejčastěji vybaveným trojitým kvadrupólovým analyzátozem (QqQ), jehož podstatnou nevýhodou jsou vyšší pořizovací náklady. Systémy s iontovou pastí nejsou příliš často používány a to kvůli jejich nižší přesnosti v měření hmoty a horší reprodukovatelnosti. Přesto iontová past vykazuje vyšší citlivost při měření v režimu „full scan“. Oba zmíněné typy analyzátozů řadíme do skupiny systémů s nízkým rozlišením. Existuje ale také možnost v podobě analyzátozů s vysokým rozlišením, mezi které například patří analyzátoz doby letu (TOF), který je rovněž možno použít v tandemovém zapojení. Toto zařízení nám umožňuje získat výrazně vyšší rozlišení hmotnosti, než při použití kvadrupólového analyzátozu.[51]

Mezi nejpoužívanější ionizační metody v LC/MS systémech patří ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), které jsou tzv. „měkkými“ ionizačními technikami, a které nám umožňují analýzu i velmi polárních látek. V systémech LC/MS/MS s trojitým kvadrupólem popř. iontovou pastí může být identifikace a kvantifikace analytu prováděna prostřednictvím monitoringu vybraných reakcí (MRM). Díky vysoké selektivitě a velmi dobré citlivosti je tato metoda vhodná pro použití při kvantitativní analýze akrylamidu. Pro příklad u systému UHPLC s ESI-MS/MS použitým při analýze smažených bramborových lupínků dosahovala mez detekce akrylamidu $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. [51]

2.7.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je dalším typem separační techniky, která se nabízí k použití při kvantitativní analýze akrylamidu. Jedná se o univerzální, relativně mladou a stále se vyvíjející analytickou metodu, umožňující rychlou separaci směsi látek. Podstatou kapilární elektroforézy je separace analytu od ostatních složek analyzovaného vzorku v křemenné kapiláře, na kterou se vkládá vysoké napětí. Kapilára bývá naplněna roztokem základního elektrolytu o definované hodnotě pH (nejčastěji se jedná o roztok pufru). V závislosti na vloženém napětí dochází k separaci nabitých látek přítomných v kapiláře na základě jejich rozdílné mobility v elektrickém poli. Výhodou elektroforetických technik je

spotřeba malého objemu vzorku při analýze, krátká doba analýzy, minimální požadavky na instrumentaci a na rozdíl od HPLC techniky nevyžadují přečištění vzorku před analýzou.[51]

Vzhledem k tomu, že je akrylamid polární nenabitá sloučenina a nemůže se tedy pohybovat v elektrickém poli, lze pro jeho separaci ze vzorku využít jednu z variant kapilární elektroforézy – micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), která umožňuje separaci jak nabitých, tak také neutrálních látek. Nejběžnějšími detektory používanými ve spojení s MEKC jsou spektrofotometrické detektory s diodovým polem (DAD).[38,51] Jiná navržená řešení spojují micelární elektrokinetickou chromatografii s hmotnostním detektorem, což je ovšem problematické, z důvodu přítomnosti solí v roztocích pufrů, které způsobují znečištění ionizační komory a zasolení dalších částí hmotnostního spektrometru. Nevýhodou prvních technik MEKC při analýze akrylamidu v potravinách byla velmi nízká citlivost a selektivita. Postupně však dochází ke zlepšování těchto technik. Např. spojením MEKC s UV-VIS detektorem bylo při analýze smažených bramborových lupínků dosaženo nízkých detekčních limitů, čímž by tato metoda mohla být vhodná pro analýzu stopových množství akrylamidu ve složitých maticích.[51,52]

Další slibnou variantou kapilární elektroforézy, poskytující lepší výsledky při analýze akrylamidu, je kapilární zónová elektroforéza (CZE). Použití této techniky však vyžaduje iontovou sloučeninu, kterou lze získat derivatizací akrylamidu 2-merkaptobenzoovou kyselinou. Tato metoda umožňuje dosažení limitu detekce odpovídající koncentraci $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. [22,38,53]

2.7.4 Bioanalytické metody

Ke stanovení akrylamidu je možno využívat také bioanalytických metod. Jednou z nich je například imunoenzymatický test (ELISA), který k identifikaci i kvantitativnímu stanovení využívá velmi specifické imunologické reakce mezi antigenem a protilátkou. Protilátkou se rozumí skupina globulárních proteinů označovaných jako imunoglobuliny o molekulové hmotnosti 150 000 Da. Imunoenzymatické testy se vyznačují vysokou specifičností a selektivitou a umožňují rychlou detekci stopových množství kontaminantů v potravinách. Na rozdíl od chromatografických a elektroforetických technik nevyžadují imunoenzymatické testy speciální vybavení, ani složitou přípravu vzorku.[22,51]

Další technikou, která se nabízí jako alternativa ke klasickým chromatografickým metodám, jsou elektrochemické biosenzory. Kvantitativní stanovení analytů je v případě této metody založeno na použití vysoce selektivních bioreceptorů, fungujících na principu přirozené afinity biologicky aktivních látek k látce analyzované. Existuje celkem šest hlavních typů biosenzorů, lišících se ve způsobu přenosu biologického signálu (elektrochemické, optické, tepelné, piezoelektrické, magnetické a mikromechanické). Přičemž při kvantitativní analýze stopových množství akrylamidu v potravinách se nejčastěji používají biosenzory elektrochemické, konkrétně amperometrické a voltamperometrické. Výhodou biosenzorů je jejich vysoká citlivost, selektivita, odolnost vůči rušivým složkám v matici a menší časová náročnost analýzy oproti jiným technikám.[51]

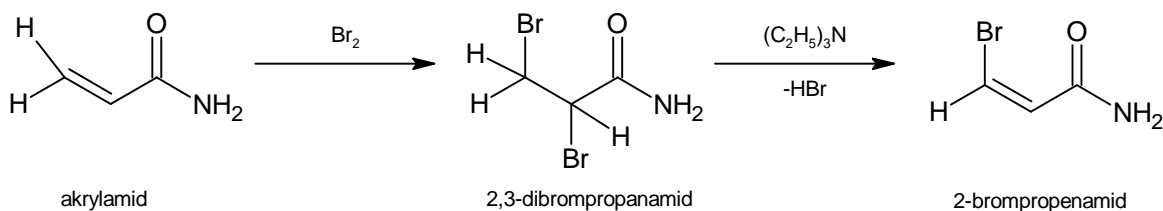
2.8 Postup bromace akrylamidu

Přestože je možné analyzovat akrylamid metodou plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie přímo, bez nutnosti jeho předchozí derivatizace, je provedení derivatizačního kroku považováno za velmi výhodné. Nejčastěji používaným typem derivatizace při GC/MS analýze akrylamidu je bromace (Obr. 5). Výhoda bromovaného akrylamidu spočívá ve snížení jeho vysoké polariry, což usnadňuje extrakci do organických rozpouštědel, a také v dosažení lepších limitů detekce (díky vyšší hmotnost iontů a získání charakteristických $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ vzorů).[17]

Původní postup bromace zahrnuje přidavek bromidu draselného, kyseliny bromovodíkové a nasyceného roztoku bromu ke vzorku. Celá směs se nechá reagovat asi 1 hodinu. Za těchto podmínek by měl být zajištěn téměř vždy stejný výtěžek 2,3-dibrompropanamidu. Nadbytek bromu se následně odstraňuje přidavkem roztoku thiosíranu sodného až do odbarvení celého roztoku, čímž je derivatizační reakce ukončena. Vzniklý derivát má nižší polaritu než původní sloučenina, proto je možné jej extrahovat do nepolárních organických rozpouštědlech jako je ethylacetát nebo hexan. Z důvodu nižší stability 2,3-dibrompropanamidu je vhodnější tento derivát převést na vstupu do GC popř. přímo na kapilární koloně na stabilnější 2-brompropenamid. Kvůli špatné opakovatelnosti této dehydrobromace se doporučuje ke konečnému extraktu před jeho nástřikem do plynového chromatografu přidat triethylamin. Ke konverzi dochází téměř okamžitě již při pokojové

teplotě. Bylo prokázáno, že dehydrobromace tímto způsobem je kvantitativní a reprodukovatelná.[21,54]

Pokud se jedná o reakční dobu bromace, je mnohými studii doporučována doba od 1 hodiny až po celou noc. Podstatné je, aby byla reakční směs po celou dobu uložena v temném prostředí při teplotě blízké 0°C.[54]



Obr. 5: Derivatizace akrylamidu

Novější bromační postupy jsou založeny na přidavku pevného bromidu draselného a roztoku bromičnanu draselného ke vzorku, který je okyselen kyselinou sírovou. Ke tvorbě molekuly bromu dochází na základě oxidačně-redukční reakce mezi KBr a KBrO₃ v kyselém prostředí, čímž se vyvarujeme práce s elementárním bromem. Díky tomu je tento postup bromace akrylamidu podstatně bezpečnější.[21]



Jak již bylo zmíněno, bromací akrylamidu získáme méně polární derivát, s vyšší molekulovou hmotností, který je díky přítomnému atomu bromu lépe identifikovatelný a při chromatografické separaci poskytuje symetričtější pík. Použití techniky GC/MS je ve spojení s bromací zřejmě nejlepší volbou pro analýzu akrylamidu v potravinách s mezí detekce nižší než 10 µg·kg⁻¹. [17,21]

2.9 Akrylamid – případové studie

2.9.1 Hallandsås, Švédsko

Hallandsås je železniční tunel nacházející se v jihozápadní části Švédska v oblasti s velkou biologickou diverzitou a s významnými zdroji podzemní vody. V r. 1991 byl vypracován projekt, jehož cílem mělo být zlepšení dopravy mezi norským Oslem a Německem, prostřednictvím tunelu vedoucím právě touto oblastí. Stavba tunelu začala v roce 1992, její dokončení bylo plánováno na rok 1995 a celkové náklady na tuto stavbu byly odhadovány asi na 1 miliardu Švédských korun (SEK). Kvůli problémům s prosakováním vody pokračovala stavba až do října r. 1997, kdy bylo zjištěno, že voda vytékající ven z tunelu obsahuje vysokou koncentraci akrylamidu. V okolí tunelu začalo docházet k úhynu ryb a hospodářských zvířat, která s kontaminovanou vodou byla v kontaktu. Následně bylo zjištěno, že zdrojem kontaminace je spárovací hmota, která byla použita k utěsnění tunelu. Celkem bylo použito více než 1400 tun této hmoty (nazývané Rhoca-Gil), obsahující asi 140 tun monomerního akrylamidu a N-(hydroxymethyl)akrylamidu. Obě tyto sloučeniny byly také nalezeny v podzemních vodách.[55]

Z důvodu obav o zdraví obyvatel a pracovníků z tunelu bylo u těchto lidí provedeno rozsáhlé testování na přítomnost hemoglobinových aduktů obou látek v krvi. Testováním vzorků krve bylo zjištěno, že pracovníci v tunelu byli vystaveni vysokým dávkám akrylamidu a že u nich došlo k rozvoji příznaků typických pro otravu touto látkou. Stavba tunelu byla pozastavena, kontaminovaná oblast byla prohlášena za vysoce rizikovou zónu, veškerý dobytek byl z této oblasti odvezen a potravinářské produkty zde vyrobené byly zlikvidovány.[19]

Proti hlavnímu zhotoviteli stavby – Skanska, dále chemické společnosti Rhone-Poulenc a Švédským Dráhám bylo podáno trestní obvinění, což vedlo k odstoupení některých vedoucích pracovníků v těchto společnostech. V roce 2005 byla dostavba tunelu obnovena a termín dokončení stavby je plánován na rok 2015. Překročení původně plánovaných nákladů na stavbu tunelu je obrovské. V roce 2005 činil odhad výdajů více než 4 mld. SEK. Celkové náklady ale zřejmě dosáhnou více než 12 mld. SEK, což odpovídá přibližně 2 miliardám dolarů.[56]

2.9.2 Romeriksporten, Norsko

Romeriksporten je norský železniční tunel spojující Oslo a Lillestrøm. Se svojí délkou 14,58 km je nejdelším železničním tunelem v Norsku.[57] Stavbu tohoto tunelu podobně jako švédského Hallandsåsu doprovázely problémy s pronikáním vody do tunelu. Při stavbě tunelu totiž došlo k významnému snížení hladiny blízkého jezera Puttjern (o 6 metrů), které sloužilo jako zásobárna vody. Ve snaze zabránit únikům vody z jezera byla od roku 1995 do července 1997 používána k utěsnění tunelu spárovací hmota v kombinaci s cementovými zálivkami. Náklady na utěsnění tunelu činily v té době asi 750 000 euro.[55]

V říjnu 1997 bylo zjištěno, že použitá spárovací směs je totožná se směsí, která byla použita při stavbě tunelu Hallandsås. Následně provedenými analýzami byla objevena kontaminace jezera akrylamidem. Naměřená koncentrace akrylamidu dosahovala $140 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, v případě N-(hydroxymethyl)akrylamidu činila koncentrace $42 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Navíc testováním pitné vody bylo odhaleno, že obsah akrylamidu v ní 560x překračuje limit stanovený Evropskou unií. Hlavním problémem byl také fakt, že daná spárovací hmota od společnosti Rhone-Poulenc obsahující monomerní akrylamid byla používána bez vědomí úřadů, v rozporu s vnitrostátními právními předpisy.[55]

U 43 pracovníků tunelu, kteří mohli přijít do kontaktu s kontaminovanou spárovací hmotou byly provedeny krevní testy. U třech z nich byla nalezena zvýšená hladina akrylamidu v krvi. Během dalších dvou let provedené testy neprokázaly u žádného z pracovníků trvalé zdravotní následky.[55]

Po událostech v tunelech Hallandsås i Romeriksporten zastavila francouzská společnost výrobu spárovací hmoty Rhoca-Gil. V důsledku stavebních problémů v tunelu Hallandsås zavedla řada významných stavebních společností systémy environmentálního managementu v místě provádění stavby. Úkolem těchto systémů by mělo být zajištění vyšší úrovně ochrany životního prostředí a jasnější vymezení různých úrovní odpovědnosti.[55]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Zařízení a pomůcky pro úpravu vzorku

- analytické váhy NewClassic MS205 (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)
- ultrazvuková lázeň Elmasonic – S 40H (Merci, s.r.o., Brno, ČR)
- odstředivka Eppendorf 5702 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- dusík (Messer Group GmbH, Sulzbach, Německo)
- automatické mikropipety a plastové špičky
- laboratorní sklo a porcelán, laboratorní stojany a držáky, třecí miska s tloučkem, filtrační papíry, promývačky, dělicí nálevky, centrifugační zkumavky, krimpovací kleště a krimpovací vialky o objemu 1,8 ml

3.2 Instrumentace

- plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- hmotnostní spektrometr Agilent MS 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- automatický dávkovač Agilent G 4513A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- nepolární kapilární kolona HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- nosný plyn: He 5.0 (SIAD, Bergamo, Itálie)
- program MSD ChemStation E, (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- elektronická databáze spekter NIST 08 Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH)

3.3 Chemikálie

- akrylamid, p.a. (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko)
- kyselina sírová 96%, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- bromičnan draselný, p.a. (Lachema, n. p., Brno, ČR)
- bromid draselný, p.a. (Lachema, n. p., Brno, ČR)

- thiosíran sodný pentahydrát, p.a. (Lachema, n. p., Brno, ČR)
- triethylamin (99%), p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- pyridin (99,5%), p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- amoniak – vodný roztok min. 25%, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- 2-(diethylamino)-ethanol (99,5%), p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- hexan, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- ethylacetát, p.a. (Lachema, n. p., Brno, ČR)
- destilovaná voda

Z uvedených chemikálií byl připraven:

- zásobní roztok akrylamidu o $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- 10% roztok H_2SO_4
- roztok KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
- roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.4 Experimentální podmínky

Všechna měření byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A a hmotnostním detektoru Agilent 5975C. Tato zařízení byla ovládána pomocí programu MSD ChemStation E.

Součástí plynového chromatografu byl automatický dávkovač G 4513A odebírající pro každou analýzu 1 μl kapalného vzorku. Použita byla bezděličová technika nástřiku (teplota injektoru 280°C) a metoda pulzního dávkování na kolonu. Průtok helia, jako nosného plynu, byl nastaven na konstantní hodnotu $0,9 \text{ ml}/\text{min}$. Pro samotnou separaci byla použita nepolární kapilární kolona HP-5ms se stacionární fází (5%-fenyl)-methylpolysiloxan (rozměry kolony: $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). Teplotní program byl nastaven na $50^\circ\text{C} - 2 \text{ min } 10^\circ\text{C}/\text{min} - 300^\circ\text{C} - 15 \text{ min}$.

Hmotnostní spektrometr vybavený kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem využíval pozitivní ionizaci elektrony o energii 70 eV . Hmotnostní spektra byla snímána v režimu celkového iontového proudu (TIC) v rozsahu $29 - 520 \text{ m}/z$, popř. v režimu monitorování selektivních iontů $106, 149$ a $151 \text{ m}/z$ (SIM mód). Celková doba GC/MS

analýzy činila 42 minut. Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit software MSD ChemStation E. Naměřená hmotnostní spektra byla porovnávána s databází spekter NIST 08 Mass Spectral Library.

3.5 Výběr bazické látky pro dehydrobromaci

Do skleněné vialky byl navážen přesně asi 1 mg akrylamidu a rozpuštěn v 5 ml destilované vody. K roztoku byl poté přidán 1 ml 10% H_2SO_4 , 1 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 1,5 g pevného KBr . Po rozpuštění veškerého bromidu byla vialka uzavřena, zabalena do alobalu a uložena do lednice na dobu 60 minut při teplotě 4°C . Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován nejprve 3 ml a poté 2 ml ethylacetátu. Oba získané extrakty byly spojeny a v odměrné baňce doplněny na objem 5 ml. Z tohoto objemu bylo následně odebráno šest podílů, každý o objemu 500 μl .

K těmto podílům byla přidána báze, jak je uvedeno v Tab. III, a poté byla směs doplněna ethylacetátem na výsledný objem 1000 μl . Po provedení GC/MS analýzy byla sledována účinnost konverze 2,3-dibrompropanamidu na 2-brompropenamid v závislosti na použité bazické látce.

Tab. III: Množství a typ báze přidávané k extraktu

500 μl extraktu +	
I.	-
II.	500 μl EtAc nasyceného NH_3
III.	4 μl triethylaminu
IV.	20 μl triethylaminu
V.	20 μl pyridinu
VI.	20 μl 2-(diethylamino)-ethanolu

3.6 Pracovní postupy analýzy akrylamidu

3.6.1 Analýza akrylamidu ve vodě

Do kuželové Erlenmeyerovy baňky s úzkým hrdlem a zábrusem bylo odměřeno 500 ml vody určené k analýze. Voda byla nejprve okyselena přidavkem 20 ml 10% H_2SO_4 . Poté bylo ke vzorku přidáno 5 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 7,5 g pevného KBr . Po zamíchání směsi a rozpuštění veškerého bromidu, byla baňka uzavřena zátkou, zabalena do alobalu a uložena do lednice. Bromační reakce tak probíhala za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, až do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován za použití ethylacetátu. Nejdříve byla provedena extrakce pomocí 55 ml ethylacetátu (z toho se více než 40 ml ve směsi rozpustilo). Po oddělení vrstev byla organická fáze odebrána a extrakce zopakována s 10 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly v krimpovací vialce zakoncentrovány proudem dusíku na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke vzorku přidáno 10 μl triethylaminu.

3.6.2 Analýza akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy

3.6.2.1 Odpaření pevného akrylamidu a jeho záchyt

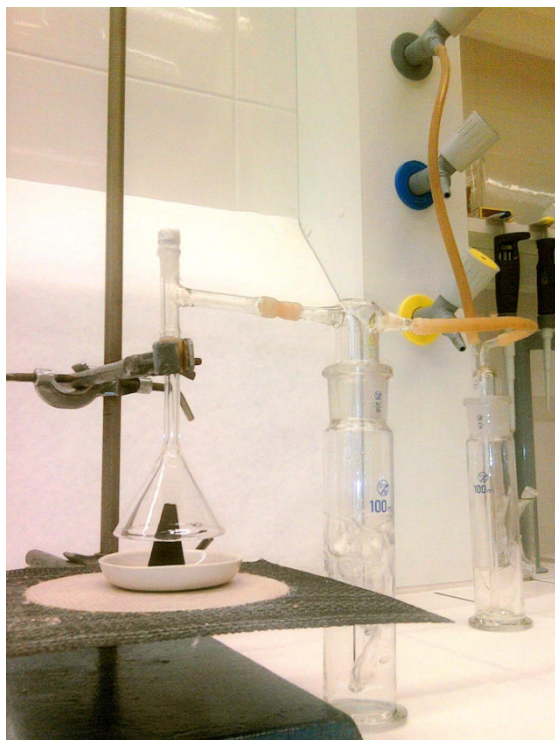
Pro tuto analýzu byla použita aparatura, která je znázorněna na Obr. 6. Do vyžíhané porcelánové misky byl navážen čistý krystalický akrylamid o přesně známé hmotnosti. Porcelánová miska s akrylamidem byla poté umístěna nad plynový kahan a zahřívána. Páry uvolňované zahříváním akrylamidu byly za pomoci vakua a skleněné nálevky jímány do promývačky obsahující absorpční roztok. Tento roztok byl připraven ze 40 ml destilované vody a 8 ml 10% kyseliny sírové. Po skončení termického rozkladu byly z promývačky odebrány alikvotní podíly absorpčního roztoku, každý o objemu 6 ml. Následně byla u odebraného vzorku a u vzorků se standardními přídávky provedena derivatizace. Vzorky byly bromovány přidavkem 1 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 1,5 g pevného KBr . Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po této době

byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován 2 x 2 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly v krimpovací vialce pomocí proudu dusíku zakoncentrovány na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno $10 \mu\text{l}$ triethylaminu.

3.6.2.2 Vonná tyčinka, vonný františek

Pro analýzu plynných produktů uvolňovaných při pyrolýze vonné tyčinky a vonného františka byla použita opět stejná aparatura jako na Obr. 6. Aparatura obsahovala držák pro vzorek, těsně nad ním umístěnou skleněnou nálevku napojenou na promývačku s absorpčním roztokem (40 ml destilované vody + 8 ml 10% H_2SO_4), která byla dále napojena na vakuum. Po zapálení vzorku v držáku byl vznikající kouř veden do promývačky, kde probublával absorpčním roztokem. Po dokončení spalování (cca 30 minut) byly z promývačky odebrány alikvotní podíly absorpčního roztoku (6 ml). Odebrané vzorky a vzorky se standardními přísadkami akrylamidu byly bromovány přísadkou 1 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a 1,5 g pevného KBr . Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný

derivát byl extrahován 2 x 2 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly v krimpovací vialce pomocí proudu dusíku zakoncentrovány na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno $10 \mu\text{l}$ triethylaminu.

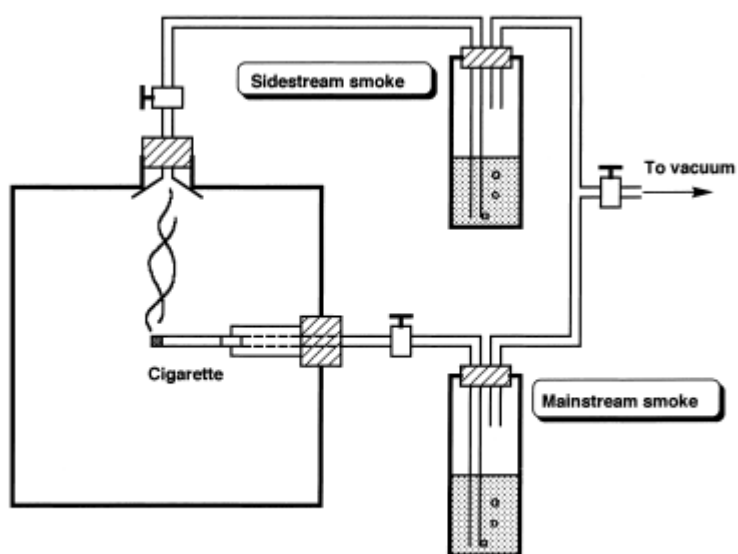


Obr. 6: Aparatura pro záchyt plynných produktů vznikajících při pyrolýze vonné tyčinky a vonného františka

3.6.2.3 Doutník

Aparatura pro záchyt plynných produktů vznikajících při hoření doutníku byla sestavena na stejném principu, jako v publikaci H. Kataoky a kol. (Obr. 7).[58] Tato aparatura se skládala ze dvou hlavních částí. Z místa pro pyrolýzu vzorku a z místa pro záchyt plynných produktů, které se při pyrolýze uvolňovaly.

Záchyt plynných produktů byl proveden prostřednictvím promývaček s absorpčním roztokem napojených na vakuum. Absorpční roztok byl připraven ze 40 ml destilované vody a 8 ml 10% kyseliny sírové. Po zapálení doutníku umístěném v držáku byl vznikající kouř veden do promývaček, kde přítomným absorpčním roztokem probublával. Po skončení spalování byly z těchto promývaček odebrány alikvotní podíly absorpčního roztoku (6 ml). U odebraných vzorků a vzorků se standardními přídávky akrylamidu byla následně provedena bromace přídávkem 1 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 1,5 g pevného KBr . Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován 2 x 2 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly poté v krimpovací vialce zakonzentrovány na výsledný objem 1 ml pomocí proudu dusíku. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno 10 μl triethylaminu.



Obr. 7: Aparatura pro záchyt plyných produktů vznikajících při pyrolýze doutníku

3.6.3 Analýza akrylamidu v potravinách

3.6.3.1 Smažené výrobky, pečivo, sušenky

K navážce 10 g zhomogenizovaného vzorku potraviny bylo přidáno 40 ml destilované vody a 40 ml hexanu. Směs byla sonifikována 20 minut při teplotě 50°C. Následně byla směs rozdělena do centrifugačních zkumavek a centrifugována 10 minut při 4400 ot·min⁻¹. Vodná fáze byla ze zkumavek odebrána, hexanová fáze byla spolu s pevným vzorkem smíchána s 20 ml destilované vody a celý sonifikační i centrifugační postup byl zopakován. Spojené vodné podíly byly v odměrné baňce doplněny do 50 ml. Z tohoto objemu byly odebrány alikvotní podíly o objemech 5 ml. Odebrané vzorky a vzorky se standardními přídávky byly bromovány přídávkem 1 ml roztoku KBrO₃ o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹, 1,5 g pevného KBr a 1 ml 10% H₂SO₄. Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku Na₂S₂O₃·5H₂O o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován 2 x 2 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly v krimpovací vialce pomocí proudu dusíku zakoncentrovány na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno 10 µl triethylaminu.

3.6.3.2 Káva a její náhražky, kakao, koření

Navážka 2 g vzorku byla smíchána s 20 ml destilované vody a tato směs byla po dobu 20 minut sonifikována při teplotě 50°C. Následně byla směs rozdělena do centrifugačních zkumavek a centrifugována 15 minut při 4400 ot·min⁻¹. Vodná fáze byla ze zkumavek odebrána a doplněna v odměrné baňce na objem 20 ml. Z tohoto objemu byly odebrány alikvotní podíly o objemech 5 ml. Odebrané vzorky a vzorky se standardními přídávky byly bromovány přídávkem 2 ml roztoku KBrO₃ o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹, 3 g pevného KBr a 1 ml 10% H₂SO₄. Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku Na₂S₂O₃·5H₂O o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován 2 x 2 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly v krimpovací vialce pomocí proudu dusíku zakoncentrovány na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno 10 µl triethylaminu.

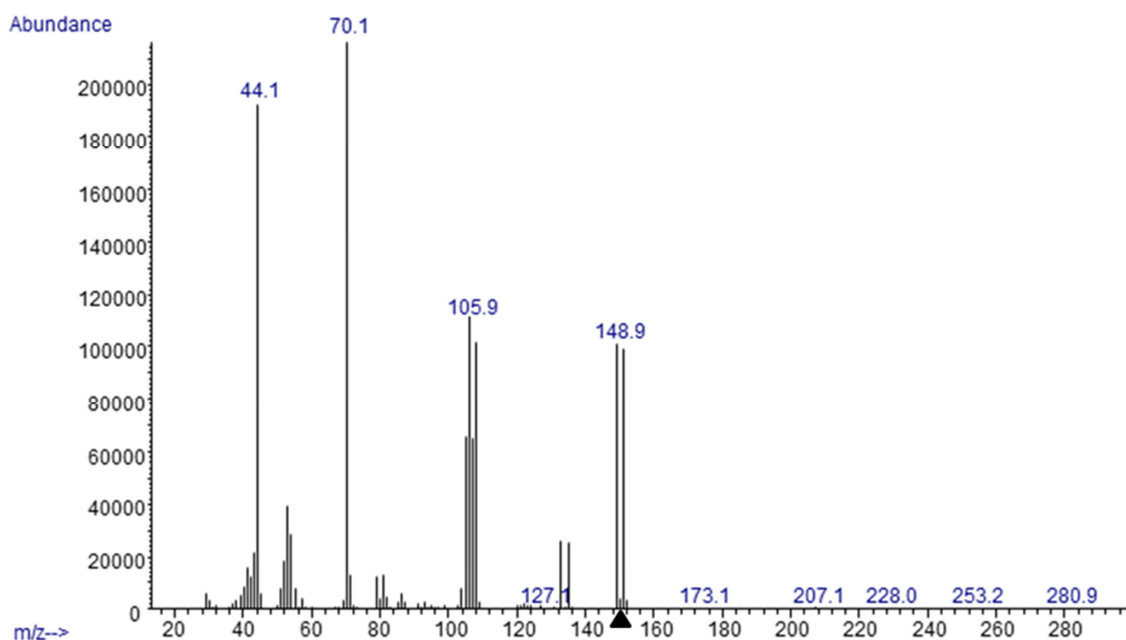
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Identifikace a stanovení akrylamidu

Izolace a analýza akrylamidu v nativní podobě není z důvodu jeho vysoké polaridy snadná. Zde navržené analytické postupy využívají možnosti akrylamid derivatizovat. Výsledným produktem bromace akrylamidu je 2-brompropenamidy, který v EI hmotnostním spektru poskytuje intenzivnější ionty o větší hmotnosti, než je tomu v případě nativního akrylamidu.

Ze získaného hmotnostního spektra 2-brompropenamidu (Obr. 8) byly pro kvantifikaci akrylamidu vybrány ionty $[\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}]^+ = 151 \text{ m/z}$, $[\text{C}_3\text{H}_4^{79}\text{BrNO}]^+ = 149 \text{ m/z}$ a ion $[\text{C}_2\text{H}_3^{79}\text{Br}]^+ = 106 \text{ m/z}$. Molekulární ion je tvořen skoro stejně intenzivními ionty 149 a 151 m/z, které se navzájem liší v obsaženém izotopu bromu. Za případnou nevýhodu iontu 149 m/z lze považovat skutečnost, že tento ion je typický také pro kontaminující ftaláty, jejich retenční čas má ale na rozdíl od retenčního času 2-brompropenamidu vyšší hodnotu. Dalším intenzivním iontem v hmotnostním spektru 2-brompropenamidu je ion 70 m/z. Ten však nebyl vybrán jako vhodný ion pro kvantifikaci akrylamidu kvůli jeho nízké selektivitě.

Pro stanovení koncentrace akrylamidu v analyzovaných vzorcích byla použita metoda standardního přídatku s vyhodnocením pomocí tabulkového editoru Microsoft Excel 2010.



Obr. 8: Hmotnostní spektrum 2-brompropenamidu

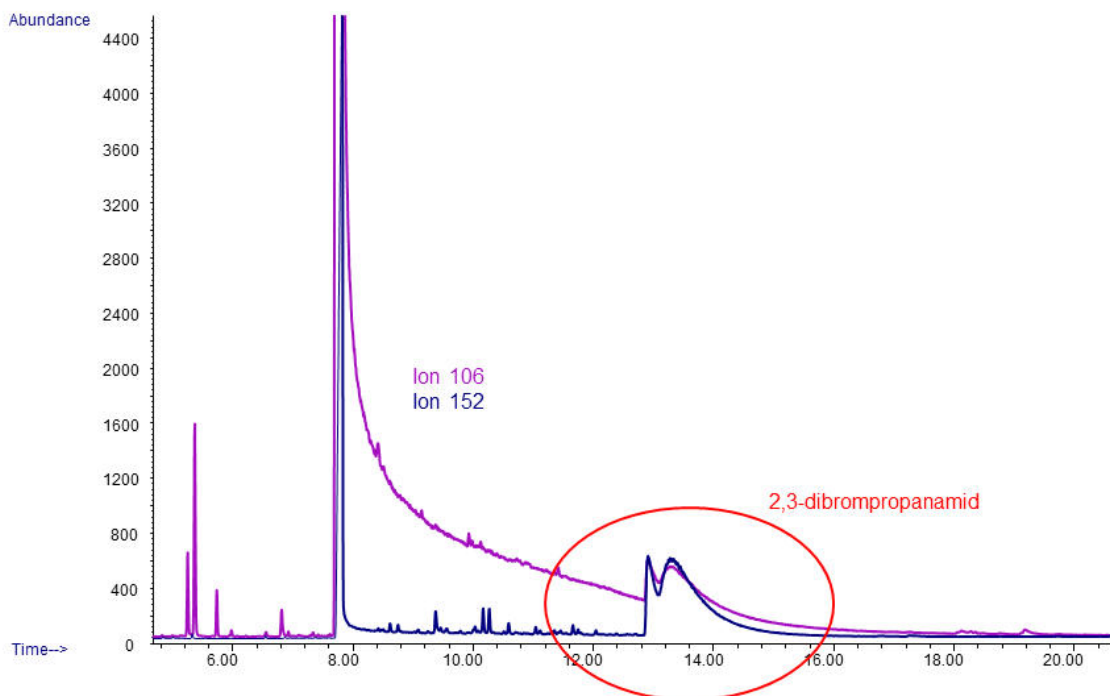
4.2 Výběr bazické látky pro dehydrobromaci

Derivatizace akrylamidu je způsob, jakým lze při GC/MS analýze dosáhnout jeho spolehlivější identifikace a nižších detekčních limitů. Primárním produktem bromace akrylamidu je 2,3-dibrompropanamid, jehož výhodou je nižší polarita ve srovnání s nativním akrylamidem. Z tohoto důvodu je dibromderivát snáze extrahovatelný organickými rozpouštědly. Jeho negativem je nižší stabilita, protože snadno podléhá dehydrobromaci za vzniku stabilnějšího 2-brompropenamidu. Dehydrobromaci je možné provést přímo na kapilární koloně. Tento způsob konverze na monobromderivát ale nevykazuje příliš dobrou opakovatelnost.[21] Pro zajištění kvantitativní a reprodukovatelné dehydrobromace je v mnohých studiích doporučován přídavek bazické látky, zejména triethylaminu, k extraktu.[17,21,54]

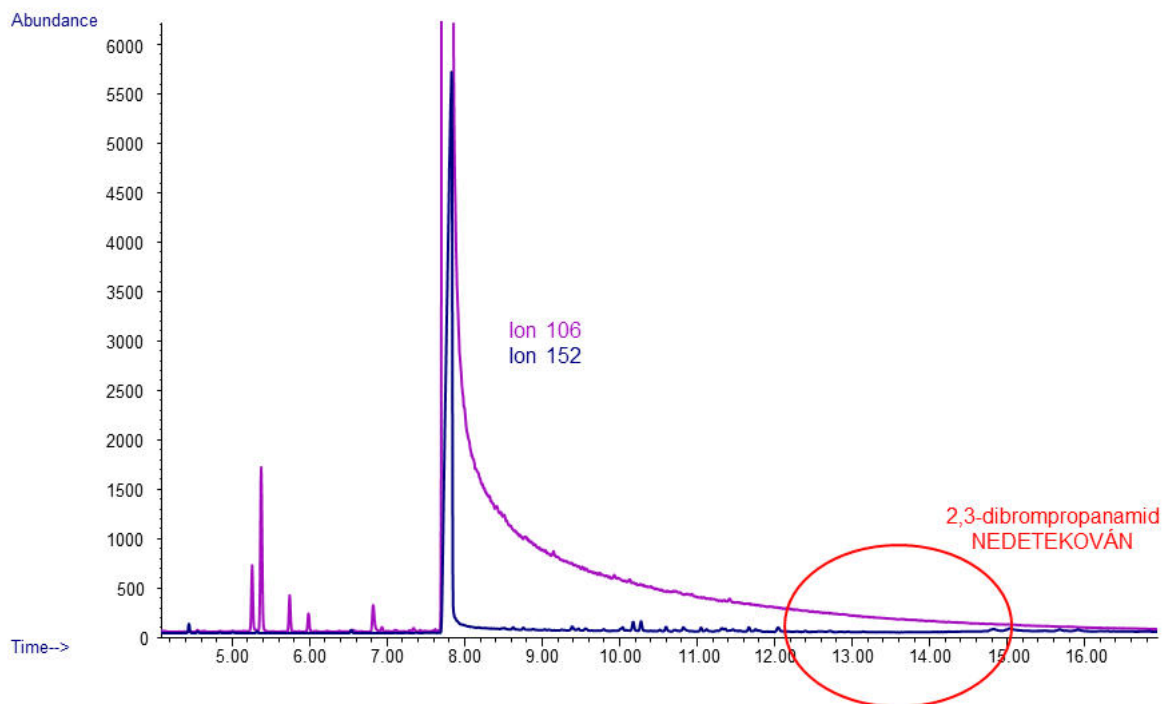
Z výsledků experimentu, který byl proveden pro zjištění vlivu bazické látky na dehydrobromaci 2,3-dibrompropanamidu vyplývá, že v případě, kdy ke konečnému extraktu nebyla přidána žádná báze, nedošlo k jeho kvantitativní konverzi na monobromderivát.

V chromatografickém záznamu proto bylo možné detekovat více jak 3,5 % nežádoucího 2,3-dibrompropanamidu (Obr.9).

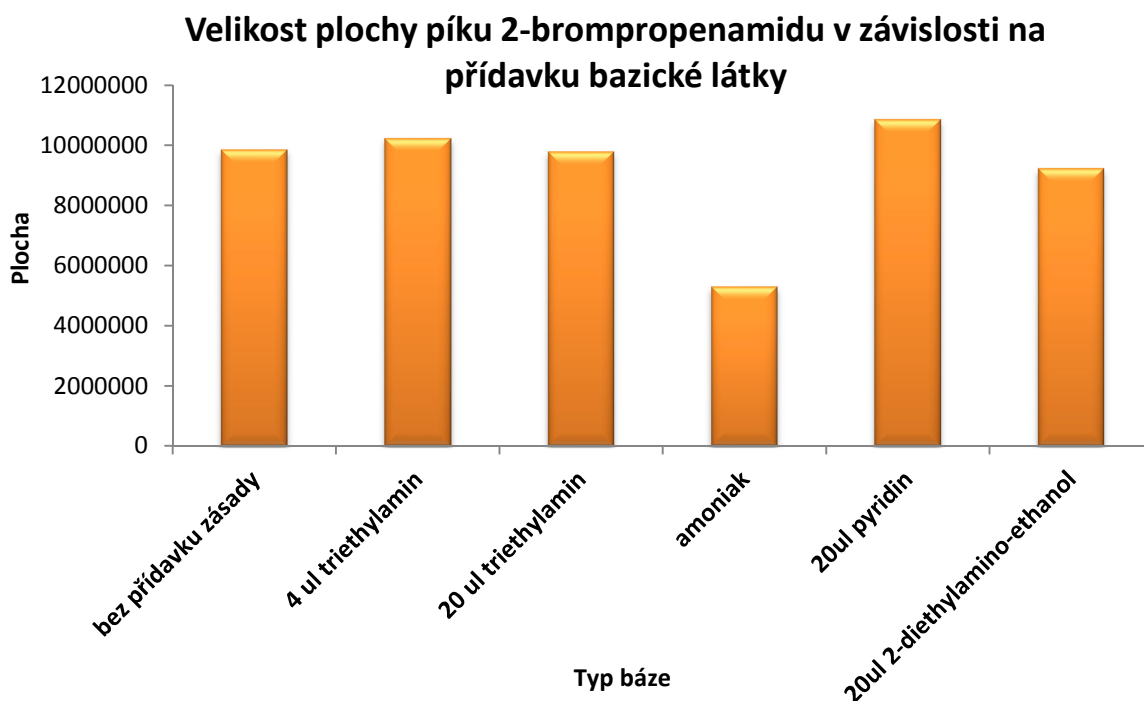
Po přidavku triethylaminu popř. pyridinu k extraktu již nebyl v chromatografickém záznamu 2,3-dibrompropanamid detekován (Obr. 10). Přítomností těchto bazických látek došlo k účinné konverzi veškerého dibromderivátu. Přídavek amoniaku jako báze se příliš neosvědčil, protože vedle požadovaného 2-brompropenamidu vznikaly také další vedlejší produkty. Množství vzniklého 2-brompropenamidu v závislosti na přidavku bazické látky znázorňuje Obr. 11.



Obr. 9: Iontový chromatogram pro ionty 106 a 152 m/z; analýza akrylamidu bez přidané bazické látky



Obr. 10: Iontový chromatogram pro ionty 106 a 152 m/z; analýza akrylamidu po přidání triethylaminu

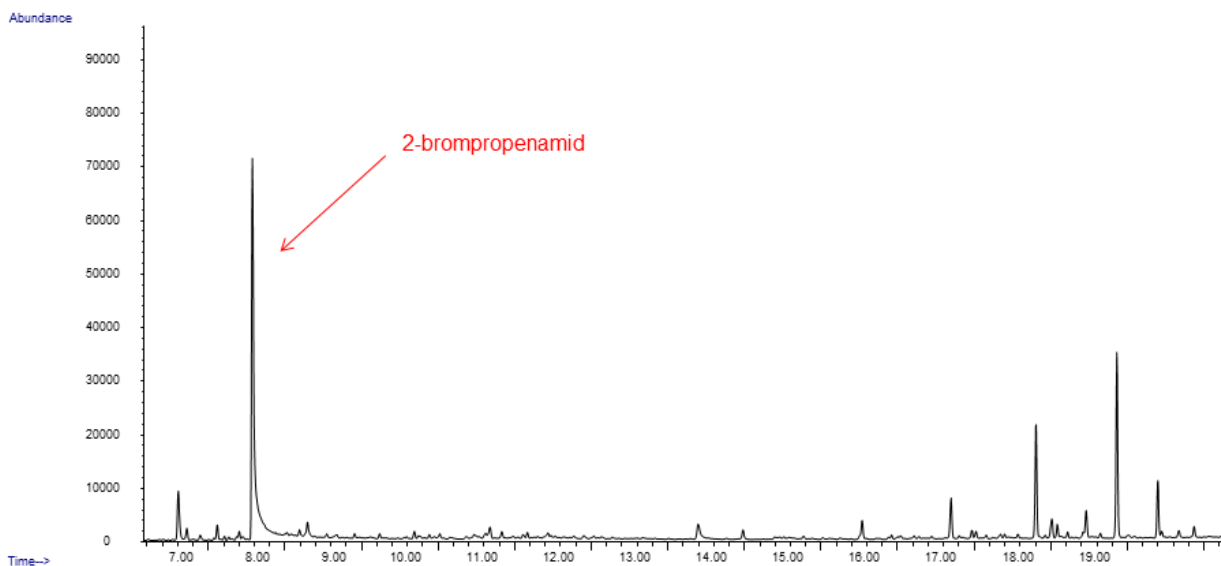


Obr. 11: Graf znázorňující závislost velikosti plochy píku 2-brompropenamidu na přídavku bazické látky

4.3 Analýza akrylamidu ve vodě

Akrylamid je látka, pro kterou je typická vysoká polarita, extrémní rozpustnost ve vodě a vysoká mobilita v půdě. Z těchto důvodů je velmi reálné riziko kontaminace povrchových či podzemních vod. Kvůli již zmíněné vysoké polaritě vyžaduje GC/MS analýza provedení bromace akrylamidu. Díky ní je možné polaritu akrylamidu snížit a ze vzorku vody jej vyextrahovat do organického rozpouštědla. Úspěch analýzy v tomto případě velkou měrou závisí právě na provedení prekoncentračního kroku. Je nutné mu věnovat zvýšenou pozornost, protože množství akrylamidu, zvláště pak v pitných vodách, bývá na velice nízké úrovni.

Veškeré experimenty v této práci, které se týkají analýzy akrylamidu v potravinách a v plynných produktech pyrolýzy využívají pro izolaci nebo záchyt volného akrylamidu právě vodu. Proto bylo nutné ověřit, zdali je možné z vodné fáze o větším objemu vyextrahovat do nepolárních rozpouštědel i nízké koncentrace bromovaného akrylamidu. Podle postupu, který je popsán v podkapitole 3.6.1 byla provedena analýza 500 ml destilované vody obsahující 100 μg akrylamidu. V získaném iontovém chromatogramu pro ion 106 m/z (Obr. 12) byl identifikován intenzivní pík 2-brompropenamidu. Tím byl potvrzen předpoklad, že bromaci i následnou extrakci připraveného derivátu ethylacetátem lze s úspěchem aplikovat i na větší objemy vodných roztoků s nízkým obsahem akrylamidu.



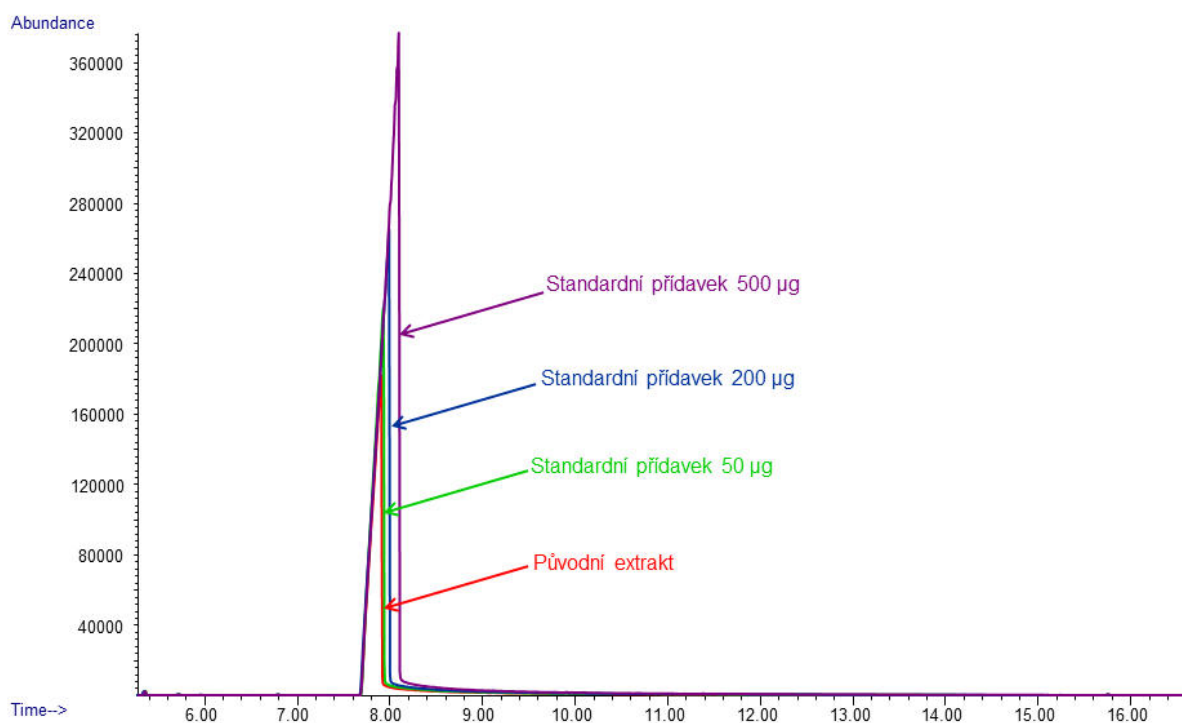
Obr. 12: Iontový chromatogram pro ion 106 m/z získaný při analýze vody

4.4 Analýza akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy

4.4.1 Odpaření pevného akrylamidu a jeho záchyt

Před analýzou plynných produktů pyrolýzy reálných vzorků byl sestaven tento experiment z důvodu získání informací o možnosti záchytu akrylamidu z plynného prostředí do připraveného absorpčního roztoku. Pro záchyt akrylamidu byla sestavena stejná aparatura jako na Obr. 6, která byla navíc doplněna o plynový kahan. Do vyžíhané porcelánové misky bylo naváženo 5,99 mg akrylamidu. Miska s navážkou byla umístěna pod nálevku napojenou na promývačku s absorpčním roztokem, a poté mírným plamenem plynového kahanu zahřívána. Při dosažení teploty tání akrylamidu (84,5°C) bylo možno pozorovat, že dochází k jeho polymerizaci. Po skončení odpařování byl akrylamid zachycený v kyselém absorpčním roztoku derivatizován přidávkem bromičnanu a bromidu draselného. Po provedení bromace byl získaný derivát extrahován do ethylacetátu a po přidávku triethylaminu byla provedena analýza.

Pro vyhodnocení obsahu akrylamidu v absorpčním roztoku byla aplikována metoda standardního přídatku. Hodnoty standardních přídatků v tomto případě činily 50, 200 a 500 µg. (Obr. 13). Z hmotnostního spektra 2-brompropenamidu byl pro kvantifikaci akrylamidu vybrán ion 106 m/z. Z výsledků analýzy vyplývá, že z celkové navážky 5,99 mg akrylamidu, bylo absorpčním roztokem zachyceno 1,77 mg (29,5 % z celkové navážky akrylamidu).



Obr. 13: Iontový chromatogram pro ion 106 m/z; odpaření pevného akrylamidu a jeho záchyt

4.4.2 Vonná tyčinka, vonný františek

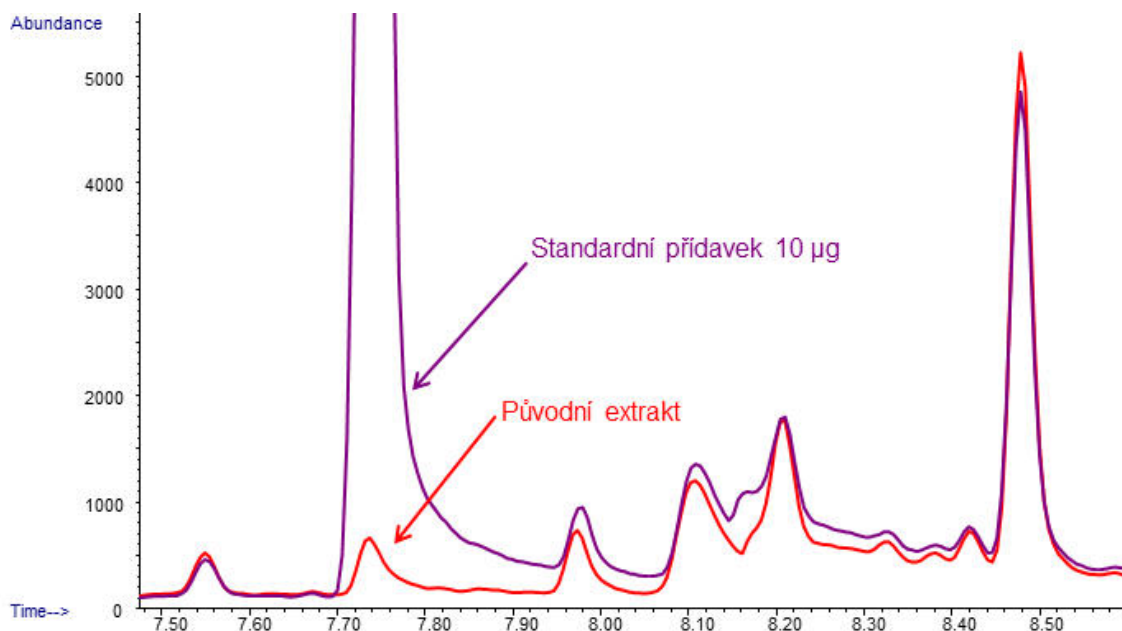
Při analýze reálných vzorků byla zaměřena pozornost na výrobky běžně používané v domácnostech, při jejichž používání hrozí riziko kontaminace okolního ovzduší akrylamidem. Jako modelové vzorky pro testování obsahu akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy byly vybrány vonné tyčinky a dva druhy vonných františků („hnědý“ a „černý“)

U vonné tyčinky a jednoho druhu vonného františka („černý“) bylo možné na první pohled odhadnout, že jsou vyrobeny z materiálu na bázi dřevěného uhlí. V případě „hnědého“ františka se jednalo o blíže neurčený druh pojiva s výrazným syntetickým aroma. Pro záchyt plynných produktů uvolňovaných při pyrolýze těchto vzorků opět byla použita stejná aparatura, jako na Obr. 6, včetně absorpčního roztoku skládajícího se z destilované vody a 10% kyseliny sírové. V tomto vodném prostředí byl akrylamid bromován, derivát extrahován do ethylacetátu, poté přídavkem triethylaminu dehydrobromován a analyzován.

Co se týče vonné tyčinky a „černého“ vonného františka, tak v plynných produktech pyrolýzy těchto vzorků akrylamid detekován nebyl. Zatímco v plynných spalinách z

„hnědého“ františka se přítomnost akrylamidu potvrdila (Obr. 14). Pro stanovení koncentrace akrylamidu byla použita metoda standardního přídávku. Pro kvantifikaci byl z hmotnostního spektra 2-brompropenamidu vybrán ion 106 m/z.

Naměřená koncentrace akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy „hnědého“ františka činila $1712 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (odpovídá $2,5 \mu\text{g}$ akrylamidu v jednom františku).



Obr. 14: Iontový chromatogram pro ion 106 m/z; analýza „hnědého“ vonného františka

4.4.3 Doutník

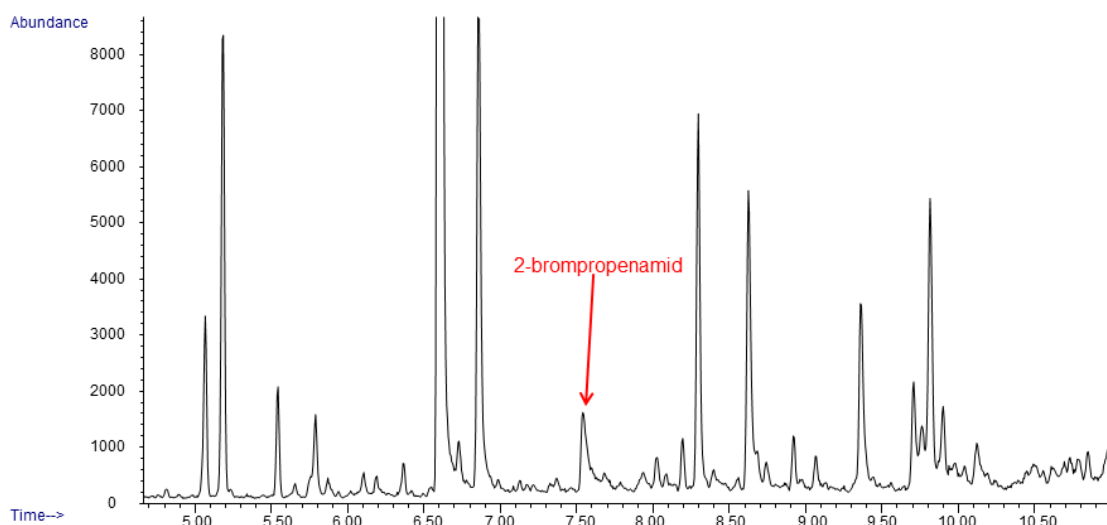
Tabákové výrobky, konkrétně dým uvolňovaný při jejich spalování, jsou významným zdrojem akrylamidu. U kuřáků a u lidí, kteří jsou tabákovému kouři vystaveni, podstatně navyšují míru denně přijatého akrylamidu.[16,27]

V případě tohoto experimentu byl pro analýzu akrylamidu v tabákovém kouři vybrán doutník. Zvolen byl z důvodu své větší hmotnosti a delší doby hoření ve srovnání s cigaretou. Při analýze byly sledovány dva typy plynných produktů vznikajících při hoření doutníku. Tzv. hlavní kouř („mainstream smoke“) a kouř vedlejší („sidestream smoke“) (Obr. 7). Vedlejší

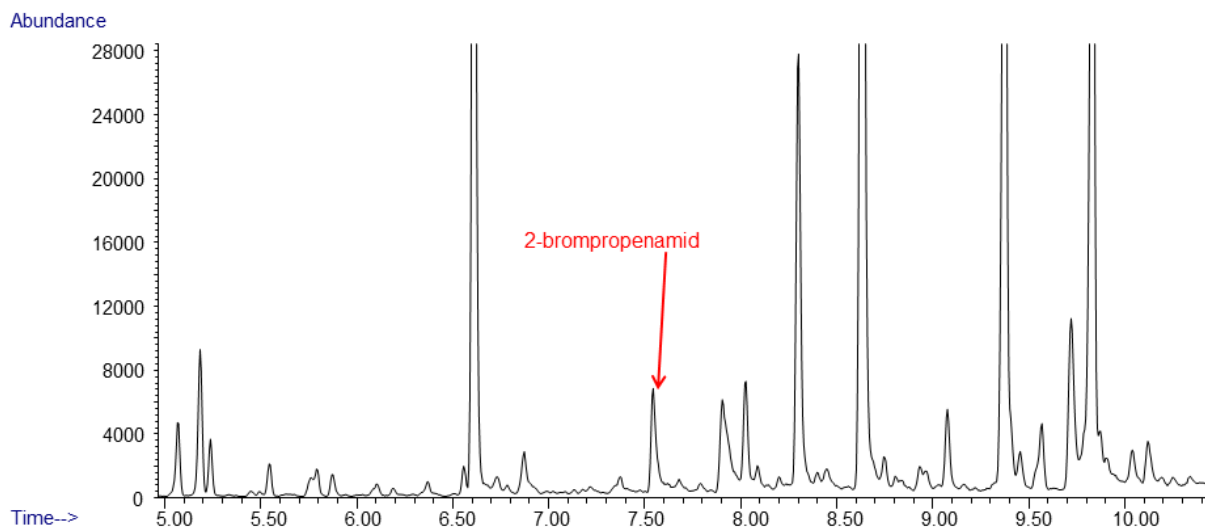
kouř se uvolňuje z přední části doutníku do okolního prostředí a je spojován s tzv. pasivním kouřením. Zatímco hlavní kouř je kuřákem vdechován přímo do plic.

Záchyt těchto plynných produktů byl proveden pomocí dvou promývaček obsahujících absorpční roztoky a za pomoci vakua, na které byly obě promývačky napojeny. Nativní akrylamid byl zachycen do okyselené vodné fáze, ve které byl následně derivatizován. Získaný bromovaný derivát byl poté extrahován do ethylacetátu a po přidavku triethylaminu analyzován.

Akrylamid byl detekován jak v hlavním, tak také ve vedlejším kouři doutníku (Obr. 15, Obr. 16). Jeho koncentrace byla stanovena použitím metody standardního přídávku. Z hmotnostního spektra 2-brompropenamidu byl pro kvantifikaci akrylamidu vybrán ion 106 m/z s retenční časem 7,54 min. Naměřená koncentrace akrylamidu v případě vedlejšího kouře činila $492 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (odpovídá asi 1 μg akrylamidu v analyzovaném doutníku). V hlavním kouři, který kuřákovi vstupuje přímo do plic, byla naměřená hodnota víc jak 3,5-krát vyšší, a to $1821 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Při přepočtu na hmotnost analyzovaného doutníku se jedná o 3,6 μg .



Obr. 15: Ionový chromatogram pro ion 106 m/z; analýza doutníku (vedlejší kouř)



Obr. 16: Iontový chromatogram pro ion 106 m/z; analýza doutníku (hlavní kouř)

V plynných produktech pyrolýzy vonné tyčinky, vonných františků i doutníku bylo detekováno několik dalších nežádoucích a pro lidský organismus toxických látek. V řadě případů se jednalo o dominantní píky v pořízeném chromatogramu. Blíže se o těchto detekovaných látkách pojednává v kapitole 4.6.

4.5 Analýza akrylamidu v potravinách

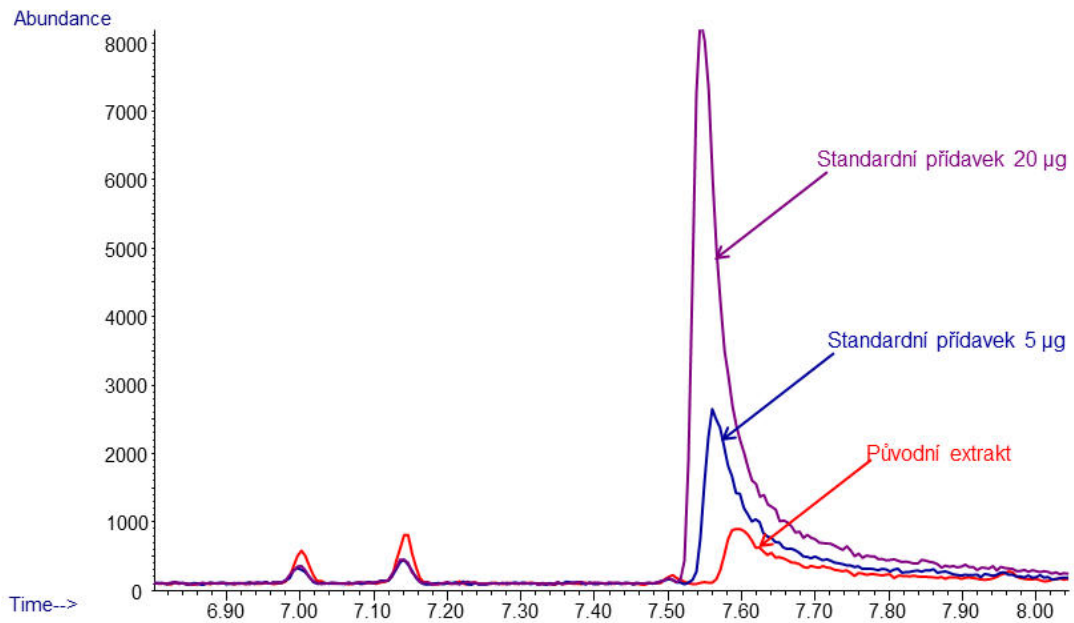
4.5.1 Smažené výrobky, pečivo, sušenky

Smažené bramborové výrobky, pečivo, sušenky a zapékané snídaňové cereálie obsahují z důvodu většího množství přítomného asparaginu, redukujících cukrů a kvůli tepelné úpravě za vysokých teplot vyšší koncentrace akrylamidu, než je v potravinách obvyklé. Navíc tyto potraviny tvoří základ potravního koše evropské populace, proto je důležité obsah akrylamidu v těchto potravinách monitorovat a optimalizovat jejich výrobní postupy.

Matrice těchto vzorků je složitá a zpravidla obsahuje vysoký podíl tuku, který analýzu komplikuje. Proto byla analýza akrylamidu v tomto typu potravin náročnější nejen časově, ale také z důvodu zvýšené pozornosti, která musela být věnována prekoncentračnímu kroku.

Zde navržené postupy jsou založeny na extrakci nativního akrylamidu z dobře homogenizovaného vzorku do vodného prostředí pomocí ultrazvukové lázně vyhřáté na teplotu 50°C. Díky zvýšené teplotě došlo ke snadnějšímu rozpuštění tuků ze vzorku, které bylo možno pohodlně odstranit ve dvoufázovém extrakčním systému hexan - voda. Poté byla celá směs centrifugována a vodná fáze odebrána. Přídavkem kyseliny sírové byl extrakt okyselen, následně byla provedena bromace a extrakce získaného 2,3-dibrompropanamidu do ethylacetátu. Po přidání triethylaminu byl extrakt analyzován.

Vyjma jednoho typu sušenek byl akrylamid detekován ve všech analyzovaných vzorcích potravin. Pro stanovení koncentrace akrylamidu byla použita metoda standardního přídatku. Pro kvantifikaci byly z hmotnostního spektra 2-brompropanamidu vybrány ionty 106 popř. 151 m/z. Iontový chromatogram pro ion 151 m/z z analýzy smažených bramborových lupínků (Strážnické brambůrky) je znázorněn na Obr. 17. Souhrn naměřených hodnot obsahu akrylamidu v analyzovaných vzorcích potravin poskytuje Tab. IV.



Obr. 17: Iontový chromatogram pro ion 151 m/z; analýza smažených bramborových lupínků (Strážnické brambůrky)

Tab. IV: Obsah akrylamidu v analyzovaných potravinách

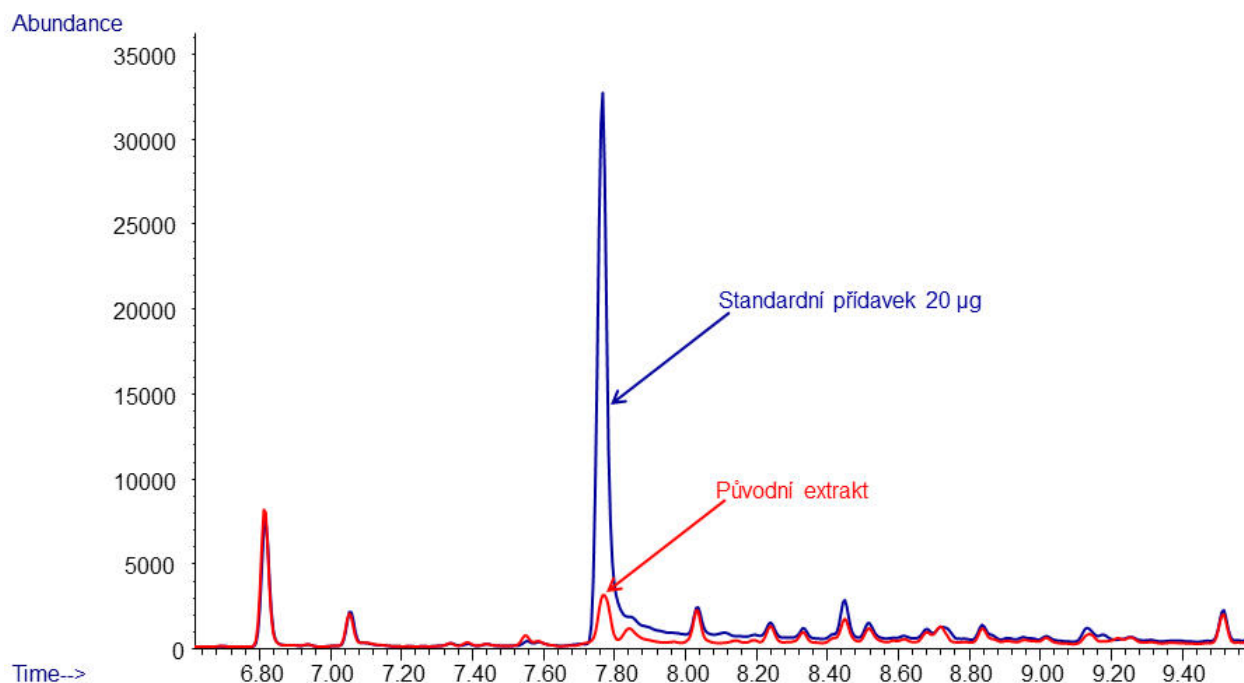
Vzorek	Obsah akrylamidu (µg/kg)
smažené bramborové lupínky (Lays)	82
smažené bramborové lupínky (Strážnické)	418
karamelové sušenky	79
rodinné sušenky	nedetekováno
perník	46

4.5.2 Káva a její náhražky, kakao, koření

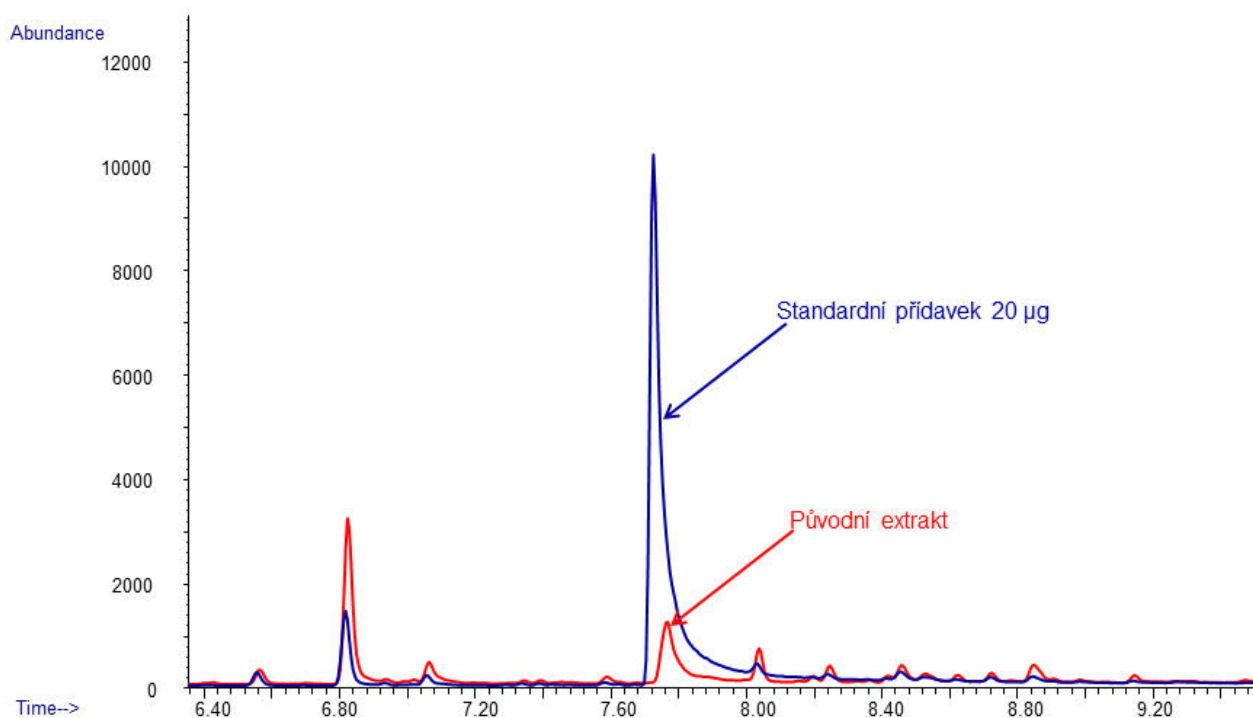
Na hodnotě denně přijatého akrylamidu se podílí i další často konzumované potraviny, které ve výrobním procesu procházejí pražením popřípadě sušením při vysokých teplotách. Mezi tyto potraviny patří především káva, kávové náhražky (jejich základem je směs kořene čekanky, cukrové řepy, obilí žita a ječmene), dále kakaový prášek a některé druhy koření.

Při analýze byl nativní akrylamid ze vzorku extrahován opět do vodné fáze pomocí ultrazvukové lázně. Po centrifugaci byl vodný extrakt bromován a následně analyzován stejným způsobem, jako v případě analýzy smažených výrobků a pečiva.

Akrylamid byl detekován ve všech čtyřech analyzovaných vzorcích. Pro stanovení koncentrace akrylamidu byla použita metoda standardního přídávku. Pro kvantifikaci byl z hmotnostního spektra 2-brompropenamidu vybrán ion 106 m/z (Obr. 18 a 19). Souhrn naměřených hodnot obsahu akrylamidu v analyzovaných vzorcích potravin poskytuje Tab. V. Vůbec nejvyšší koncentrace akrylamidu ze všech vzorků potravin byla naměřena v mleté kávě. V jednom šálku nápoje připraveném ze 7 gramů této kávy by obsah akrylamidu dosahoval téměř 14 μg .



Obr. 18: Iontový chromatogram pro ion 106 m/z; analýza mleté kávy



Obr. 19: Iontový chromatogram pro ion 106 m/z; analýza kávové náhražky

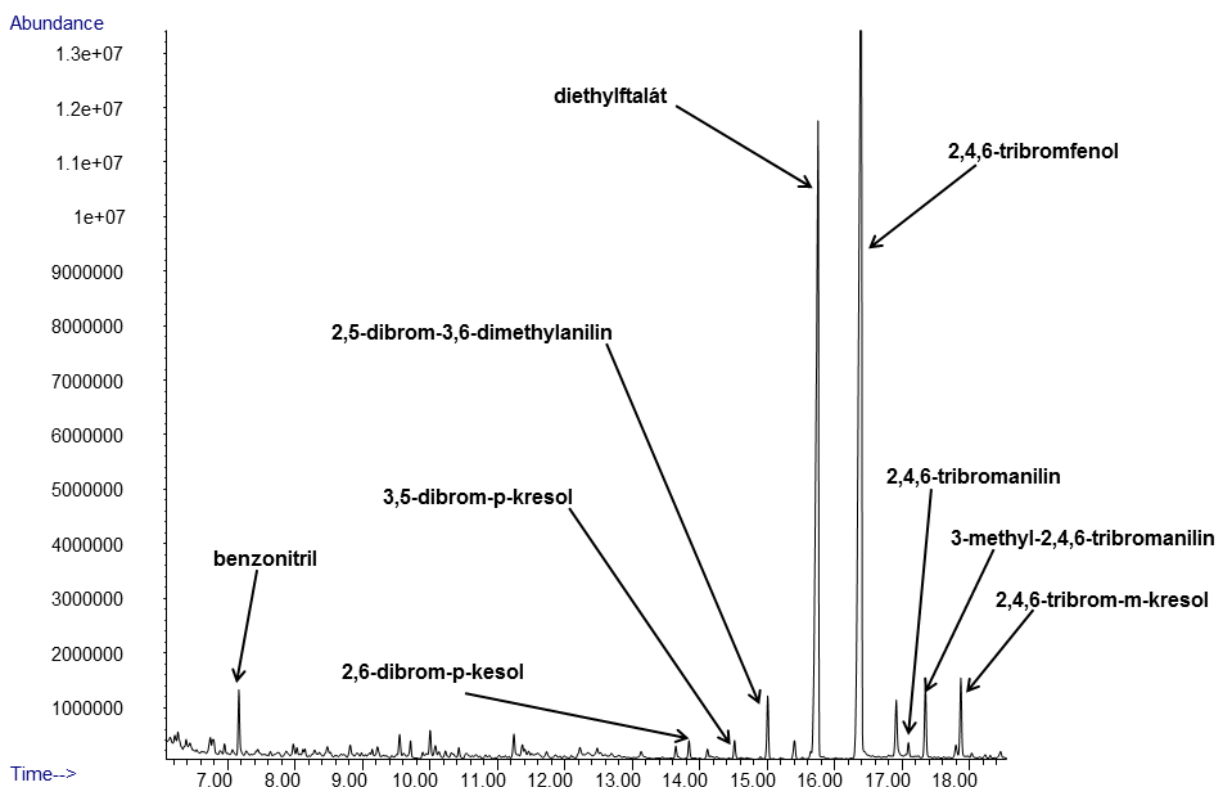
Tab. V: Obsah akrylamidu v analyzovaných potravinách

Vzorek	Obsah akrylamidu (µg/kg)
mletá káva (100% arabika)	1984
kávová náhražka	1251
kakaový prášek	85
mletá červená paprika	259

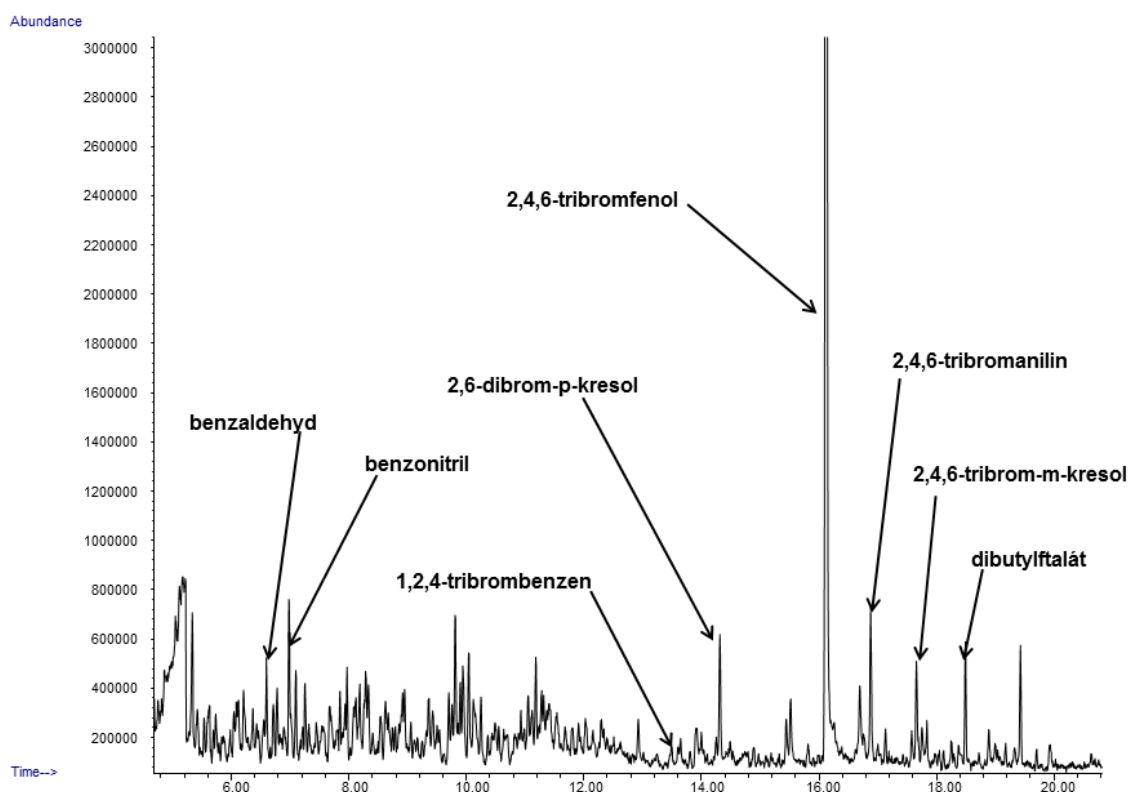
4.6 Další toxické látky detekované během analýz

Při analýzách akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy vonné tyčinky, františků i doutníku byla v hmotnostním spektru měřeném v režimu „full scan“ (TIC) detekována řada látek toxických pro lidský organismus. Píky některých těchto látek z hlediska své intenzity významně převyšovaly nad ostatními. Z velké míry byly tyto látky detekovány v podobě svých bromovaných derivátů. Na základě tohoto zjištění by bylo možné bromaci, která byla primárně provedena z důvodu derivatizace akrylamidu, aplikovat také na další složky plynných produktů pyrolýzy zmíněných vzorků.

V plynných produktech pyrolýzy vonné tyčinky a vonných františků byly nejčastěji detekovány bromované deriváty fenolu, kresolů a anilinu, dále benzonitril a velice často také intenzivní pík diethylftalátu (Obr. 20). V chromatogramu získaném při analýze tabákového kouře převažovaly bromované deriváty fenolu, kresolů a anilinu, deriváty benzenu, benzaldehyd, benzonitril a dibutylftalát. (Obr. 21)



Obr. 20: Celkový iontový chromatogram (TIC); analýza „hnědého“ vonného františka



Obr. 21: Celkový iontový chromatogram (TIC); analýza doutníku (vedlejší kouř)

V uvedených chromatogramech jsou znatelné velmi intenzivní píky náležící 2,4,6-tribromfenolu. Výrazné množství fenolu se podařilo do okyseleného absorpčního roztoku zachytit i přes skutečnost, že se jedná o látku kyselého povahy, pro jejíž záchyt je vhodnější alkalický absorpční roztok. Tuto polární látku s neurotoxickými účinky je možné bromovat za stejných podmínek jako akrylamid, proto je vhodným předmětem zájmu do dalších analýz.

5. ZÁVĚR

Úkolem této práce bylo poskytnout přehled možností stanovení akrylamidu, navrhnout analytické postupy využívající plynovou chromatografii, hmotnostní spektrometrii a derivatizaci analytu a navržené metody následně aplikovat na reálné vzorky. Analyzována byla voda, plynné produkty pyrolýzy různých typů vzorků a vybrané matričně obtížnější vzorky potravin. Pozornost byla věnována také ekologickým rizikům spojeným s aplikací spárovacích hmot s obsahem (poly)akrylamidu. Práce obsahuje dvě případové studie, které přibližují průmyslové havárie včetně jejich (nejen) ekologických dopadů.

Pro derivatizaci akrylamidu byla použita bromační směs skládající se z bromičnanu draselného a bromidu draselného. Tento způsob bromace do značné míry eliminuje nepříjemnou manipulaci s elementárním bromem a významně snižuje environmentální a bezpečnostní rizika. Výhodou bromačního stanovení akrylamidu je převedení na méně polární dibromderivát, který je extrahovatelný organickými rozpouštědly. Kvůli jeho nižší stabilitě je nutné provedení dehydrobromace prostřednictvím přidané báze. Na základě provedených experimentů byl za nejvhodnější bazickou látku vybrán triethylamin. Výsledný produkt derivatizace (2-brompropenamid) poskytuje při chromatografii symetričtější pík lépe oddělený od ostatních složek matrice s lepším odstupem signálu od šumu.

Analýzou vody, která byla kontaminována akrylamidem, bylo zjištěno, že navržená metoda je použitelná i na větší objemy vodných roztoků s nízkou koncentrací akrylamidu, a že je možné ji využít pro sledování kontaminace vod při případných ekologických haváriích. V případě analýzy plyných produktů spalování byly nalezeny významné hodnoty akrylamidu hned ve dvou vzorcích, a to v „hnědém“ vonném františku ($1712 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a v doutníku ($1821 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Kromě akrylamidu ale také stojí za zmínku další látky, které se při spalování těchto vzorků dostávají do ovzduší. Jedná se o fenol, anilin, benzen, ftaláty a další pro člověka toxické látky.

U analyzovaných potravin byl akrylamid detekován ve všech vzorcích vyjma jednoho typu sušenek. Nalezené hodnoty akrylamidu se pohybovaly v rozmezí 46 – 1984 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Limit detekce použité metody byl u tohoto typu vzorků odhadnut na hodnotu blízkou 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace akrylamidu (1984 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) byla naměřena ve vzorku mleté kávy. Nápoj připravený ze 7 g této mleté kávy by obsahoval téměř 14 μg akrylamidu. Vyšší

hodnoty akrylamidu byly nalezeny také v kávové náhražce a v bramborových lupíncích, které zvláště u dětí patří mezi často konzumované pochutiny a mohou tak u nich významně zvyšovat množství denně přijatého akrylamidu.

Pro navrženou GC/MS metodu je typický široký rozsah využití, který je ale částečně limitován vyšší časovou náročností derivatizačního postupu. Delší doba analýzy je však bohatě vyvážena vyšší selektivitou, vyšší účinností extrakce a nižším detekčním limitem.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECD	detektor elektronového záchytu
EFSA	European Food Safety Authority
EI	elektronová ionizace
ELISA	imunoenzymatický test
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	ionizace elektrosprejem
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FID	plamenově-ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer
JIFSAN	Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition
LC	kapalinová chromatografie
LD ₅₀	letální dávka (udává množství látky, po které uhynulo 50 % testovaných živočichů)
MRM	monitoring vybraných reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
NPD	detektor citlivý na atomy dusíku a fosforu
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PEL	přípustný expoziční limit
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor
RNA	ribonukleová kyselina
SEK	Švédské koruny
SIM	režim sledování vybraných iontů

TIC	režim celkového iontového proudu
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	extrémně vysokoúčinná kapalinová chromatografie
WHO	World Health Organization

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Mojska H., Gielecińska I., Szponar L., Ołtarzewski M.: *Food Chem. Toxicol.* *48*, 2090 (2010).
- [2] Vatter D. A., Shetty K.: *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* *4*, 331 (2003).
- [3] Matthäus B., Haase N. U., Vosmann K.: *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* *106*, 793 (2004).
- [4] Besaratinia A., Pfeifer G. P.: *Carcinogenesis* *28*, 519 (2007).
- [5] Friedman M.: *J. Agr. Food Chem.* *51*, 4504 (2003).
- [6] Muhlendahl K. E., Otto M.: *Eur. J. Pediatr.* *162*, 447 (2003).
- [7] Rice J. M.: *Mutat. Res.* *580*, 3 (2005).
- [8] Besaratinia A., Pfeifer G. P.: *J. Natl. Canc. Inst.* *96*, 1023 (2004).
- [9] Wang R. S., McDaniel L. P., Manjanatha M. G., Shelton S. D., Doerge D. R., Mei N.: *Toxicol. Sci.* *117*, 72 (2010).
- [10] Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S., Kinae N., Honma M.: *Mutat. Res.* *603*, 151 (2006).
- [11] Swedish National Food Administration: *Information about Acrylamide in Food*, Sweden, 2002, www.slv.se.
- [12] Svensson K., Abramsson L., Becker W., Glynn A., Hellenas K. E., Lind Y., Rosén J.: *Food Chem. Toxicol.* *41*, 1581 (2003).

- [13] Velíšek J., Hajšlová J., *Chemie potravin*, 3. vydání, Osis, Tábor 2009.
- [14] Hedegaard R. V., Frandsen H., Skibsted L. H.: *Food Chem.* 108, 917 (2008).
- [15] Konings E. J. M., Baars A. J., Klaveren J. D., Spanjer M. C., Rensen P. M., Hiemstra M., Kooij J. A., Peters P. W. J.: *Food Chem. Toxicol.* 41, 1569 (2003).
- [16] Vesper H. W., Bernert J. T., Ospina M., Meyers T., Ingham L., Smith A., Myers G. L.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 16, 2471 (2007).
- [17] Pittet A., Périsset A., Oberson J. M.: *J. Chromatogr., A* 1035, 123 (2004).
- [18] Dybing E., Farmer P. B., Andersen M., Fennell T. R., Lalljie S. P. D., Muller D. J. G., Olin S., Petersen B. J., Schlatter J., Scholz G., Scimeca J. A., Slimani N., Tornqvist M., Tuijtelaars S., Verger P.: *Food Chem. Toxicol.* 43, 365 (2005).
- [19] Eriksson S.: *Doctoral Thesis*. Stockholm University, Stockholm, Sweden, 2005.
- [20] National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme: *Acrylamide*, Australia, 2002, www.nicnas.gov.au.
- [21] Zhang Y., Zhang G., Zhang Yi.: *J. Chromatogr., A* 1075, 1 (2005).
- [22] World Health Organization: *Safety evaluation of certain contaminants in food (WHO Food Additives Series: 63)*, Geneva, 2011.
- [23] Scientific Committee on Food: *Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food*, Belgium, 2002.
- [24] Boettcher M. I., Schettgen T., Kütting B., Pischetsrieder M., Angerer J.: *Mutat. Res.* 580, 167 (2005).

- [25] Mei N., Hu J., Churchwell M. I., Guo L., Moore M. M., Doerge D. R., Chen T.: *Food Chem. Toxicol.* *46*, 628 (2008).
- [26] Berihie G. K.: *Dissertation*. Universität Magdeburg, Magdeburg, Germany, 2006.
- [27] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: *Draft toxicological profile for acrylamide*, Atlanta, 2009, www.atsdr.cdc.gov.
- [28] Smith C. J., Perfetti T. A., Rumble M. A., Rodgman A. Doolittle D. J.: *Food Chem. Toxicol.* *38*, 371 (2000).
- [29] Vesper H. W., Bernert J. T., Ospina M.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* *16*, 2471 (2007).
- [30] U. S. Environmental Protection Agency: *Drinking Water Contaminants*, EPA 816-F-09-0004 (U.S. EPA 2009), water.epa.gov.
- [31] Ciesarová Z.: *Chem. Listy* *99*, 483 (2005).
- [32] Tateo F., Bononi M., Andreoli G.: *J. Food Compos. Anal.* *20*, 232 (2007).
- [33] Murkovic M.: *J. Biochem. Biophys. Methods* *61*, 161 (2004).
- [34] Mikulíková R., Sobotová K.: *Acta Chim. Slov.* *54*, 98 (2007).
- [35] Kolářová J., Řehůřková I., Ruprich J.: *Chem. Listy* *102*, 265 (2008).
- [36] Food Drink Europe: *Acrylamide Toolbox 2011*, Belgium, 2011, ec.europa.eu.
- [37] Amrein T. M., Schönbacher B., Escher F., Amadó R.: *J. Agric. Food Chem.* *52*, 4282 (2004).

- [38] Zhang Y., Ren Y., Zhang Yi.: Chem. Rev. *109*, 4375 (2009).
- [39] Delatour T., Périsset A., Goldmann T., Riediker S., Stadler R. H.: J. Agric. Food Chem. *52*, 4625 (2004).
- [40] Andrzejewski D., Roach J. A. G., Gay M. L., Musser S. M.: J. Agric. Food Chem. *52*, 1996 (2004).
- [41] Evropská Komise: Doporučení Komise ze dne 10. 1. 2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách, K(2010) 9681, Brusel, 2011.
- [42] Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí: *Přehled aktuálních problémů v oblasti chemické bezpečnosti potravin*, Praha, 2007, www.phytopsanitary.org.
- [43] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmami, Sbírka zákonů č. 38, částka 13, str. 672.
- [44] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 376/2000 Sb. kterou se stanoví požadavky na pitnou vodu a rozsah a četnost její kontroly, Sbírka zákonů č. 376, částka 103, str. 4879.
- [45] Směrnice Rady 98/83/ES o jakosti vody určené k lidské spotřebě, Úř. věst. L 330, str. 32.
- [46] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb. o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku, Sbírka zákonů č. 369, částka 118, str. 5770.

- [47] Dvacátá šestá směrnice Komise 2002/34/ES *kerou se přizpůsobují technickému pokroku přílohy II, III a VII směrnice Rady 76/768/EHS o sblížení právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků.*
- [48] Nařízení Komise č. 366/2011 *kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH), pokud jde o přílohu XVII (akrylamid), Úř. věst. L 101, str. 12.*
- [49] Occupational Safety and Health Administration (OSHA): *Acrylamide*, www.osha.gov (staženo 03/2012).
- [50] United States Environmental Protection Agency (EPA): *Basic Information about Acrylamide in Drinking Water*, water.epa.gov (staženo 03/2012).
- [51] Oracz J., Nebesny E., Zyzelewicz D.: *Talanta* 86, 23 (2011).
- [52] Zhou X., Fan L. Y., Zhang W., Cao Ch. X.: *Talanta* 71, 1541 (2007).
- [53] Bermudo E., Nunez O., Puignou L., Galceran M. T.: *J. Chromatogr., A* 1120, 199 (2006).
- [54] Keramat J., LeBail A., Prost C., Soltanizadeh N.: *Food Bioprocess Technol.* 4, 340 (2011).
- [55] Risk & Policy Analysts Limited (RPA): *Risk Reduction Strategy and Analysis of Advantages and Drawbacks for Acrylamide*, Loddon, 2000, www.rpaltd.co.uk.
- [56] http://en.wikipedia.org/wiki/Hallands%C3%A5s_Tunnel (staženo 03/2012).
- [57] http://en.wikipedia.org/wiki/Romerike_Tunnel (staženo 03/2012).
- [58] Kataoka H., Kondo T., Sumida A.: *Anal. Chim. Acta* 358, 269 (1998).