

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**ANALÝZA PYROLYTICKÝCH PRODUKTŮ
V UZENINÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Marek Smital

Studijní obor:

Analytická Chemie

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Petr Barták, PhD.

Olomouc 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D. a použil pouze podklady uvedené v příloženém seznamu literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů v platném znění. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Uničově dne 16. dubna 2019.

vlastnoruční podpis autora

Tímto bych chtěl poděkovat panu docentovi RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D., za jeho věcné a odborné rady a zároveň i čas, který mi při vypracování této bakalářské práce věnoval.

Zároveň mé poděkování patří i mé rodině a přátelům za jejich neutuchající podporu při mém studiu. Bez Vás bych to nedokázal.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2018_027, IGA_PrF_2019_028).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Marek Smital

Název práce: Analýza pyrolytických produktů v uzeninách

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2019

Anotace: Tato práce se v teoretické části zabývá stručným zhodnocením významu masa a masných výrobků v lidské stravě a riziky spojenými s méně šetrnými tepelnými úpravami potravin. Dále seznamuje čtenáře s tradičními i netradičními způsoby uzení a s mechanismy, jimiž působí jednotlivé složky kouře na výsledné vlastnosti uzenin. V neposlední řadě mu předkládá pojednání o tvorbě heterocyklických aromatických aminů v potravinách a zaběhnutých i moderních postupech jejich analýzy. Experimentální část práce je pak věnována screeningu pyrolytických produktů v reálných vzorcích a snaze o stanovení heterocyklických aromatických aminů (HAA) v uzeninách a jiných výrobcích potravinového průmyslu. Destilační extrakce (SDE) a extrakce na tuhé fázi (SPME) jsou příklady použitých screeningových metod, zatímco pro stanovení HAA bylo využito kapalinové extrakce z vodně acetonového prostředí do dichlormethanu za změny pH (z kyselého na alkalické) pro dosažení vyšších výtěžků. Všechny připravené extrakty byly následně derivatizovány pomocí hexamethyldisilazanu (HMDS) a analyzovány na plynovém chromatografu spojeném s hmotnostním spektrometrem (GC-MS).

Klíčová slova: uzeniny, klobásy, pyrolytické produkty, heterocyklické aromatické aminy (HAA), SPME, destilační extrakce (SDE), kapalinová extrakce, hexamethyldisilazan (HMDS), GC-MS

Počet stran: 52

Počet příloh: 4 strany

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Marek Smital

Title: Analysis of pyrolytic products in smoked meat

Type of thesis: master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of submission: 2019

Anotation: The theoretical part of this thesis deals with a brief evaluation of the importance of meat and meat products in the human diet and the risks associated with the heat treatment of food. Furthermore, the reader is acquainted with traditional and non-traditional methods of smoking and with the mechanisms by which the individual components of smoke influence the resulting properties of smoked products. Last but not least, it presents a treatise on the formation of heterocyclic aromatic amines in food and established and modern methods of their analysis. The experimental part is devoted to screening of pyrolytic products in real samples and to the determination of heterocyclic aromatic amines (HAA) in smoked meat and other products of food industry. Simultaneous distillation-extraction (SDE) and Solid Phase Extraction (SPME) are examples of used screening methods, while liquid extraction from aqueous-acetone phase to dichloromethane was used for HAA determination, with changes of pH (from acidic to alkaline) to achieve higher yields. All prepared extracts were subsequently derivatized with hexamethyldisilazane (HMDS) and analyzed by a gas chromatograph with a mass spectrometer (GC-MS).

Keywords: smoked meat, sausages, pyrolytic products, heterocyclic aromatic amines (HAA), SPME, Simultaneous Distillation-Extraction (SDE), liquid-liquid extraction, hexamethyldisilazane (HMDS), GC-MS

Number of pages: 52

Number of appendices: 4 pages

Language: Czech

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část	7
2.1	Problematika masa a masných výrobků.....	7
2.2	Uzení.....	8
2.2.1	Historie a význam	8
2.2.2	Metody přímého uzení.....	9
2.2.3	Metody nepřímého uzení.....	10
2.2.4	Složení a účel kouře.....	12
2.3	Heterocyklické aminy	15
2.3.1	Vznik pyrolytických heterocyklických aromatických aminů	16
2.3.1	Vznik aminoimidazoazaarenů	18
2.4	Heterocyklické aminy z pohledu analytické chemie	22
2.4.1	Konvenční metody extrakce	22
2.4.2	Mikroextrakce	24
2.4.3	Instrumentální analytické techniky	25
3	Experimentální Část	28
3.1	Chemikálie, přístroje a pomůcky	28
3.2	Způsoby odběru a přípravy vzorků.....	29
3.3	Kapalinová extrakce (L/L extrakce)	30
3.4	Derivatizace	30
3.5	SPME analýza	31
3.6	Destilační extrakce	31
3.7	Parametry GC – MS analýzy	33
4	Výsledky a diskuze.....	34
4.1	SPME (Solid Phase Microextraction).....	34
4.2	Extrakce tekutého kouře ethylacetátem.....	35
4.3	Destilační extrakce (SDE).....	37
4.3.1	Destilace tekutého kouře	37
4.3.2	Destilace kávy	38
4.4	Vliv derivatizace	39
4.5	Kapalinová extrakce	40
5	Závěr.....	45
6	Použité zdroje.....	47
7	Přílohy	53

1 Úvod

Pyrolýza je tepelná dekompozice (rozklad) materiálu za zvýšené teploty v inertní atmosféře. Zahrnuje strukturní změny chemických individuí a jedná se o ireverzibilní (nevratný) fyzikálně-chemický děj. Název tohoto děje je odvozen z řeckých slov *pyro* „oheň“ a *lysis* „rozpuštění“. Pyrolýzou organických látek, v obecném měřítku, vznikají těkavé sloučeniny zanechávající pevná rezidua obohacená o uhlík. Odlišuje se od ostatních fyzikálně-chemických procesů, jako je spalování nebo hydrolýza, tím, že není třeba přítomnosti reagentu, kterými jsou např. kyslík nebo voda. Je podmíněna pouze teplotou vyšší, než je teplota varu vody nebo jiných rozpouštědel. [1]

Již od objevení ohně, lidstvo využívá tepelnou úpravu potravin ke zvýšení její stravitelnosti a snížení rizika růstu mikroorganismů. Naneštěstí úprava touto cestou dává vzniknout sloučeninám (pyrolytickým produktům), které mohou být pro zdraví člověka škodlivé. Kategorie potravin s nejvyšší pravděpodobností vzniku rizikových sloučenin jsou potraviny bohaté na sacharidy (tvorba akrylamidu a hydroxymethylfurfuralu), masné a rybí produkty (vznik heterocyklických aromatických aminů, N-nitrosoaminů a polyaromatických uhlovodíků) a oleje (vznik monochlorpropan diolů). V posledních letech se ukazuje, že ve výrobcích z masa a ryb vzniká nejvýznamnější portfolio a množství toxikantů vznikajících teplem, a měly by být proto sledovány, aby bylo možné posoudit skutečné riziko spojené s jejich spotřebou. [2, 3]

2 Teoretická část

2.1 Problematika masa a masných výrobků

Maso a masné výrobky jsou velmi významnou ekonomickou komoditou a představují nejhodnotnější živočišné produkty. Podle některých odhadů by se světová spotřeba masa měla zdvojnásobit do roku 2050. [4] V roce 2015 průměrná spotřeba masa na hlavu činila 41,3 kg za rok. Předpokládaná spotřeba v rozvojových a vyspělých státech bude činit 31,6 respektive 95,7 kg za rok. [5]

Maso hrálo důležitou roli v lidské evoluci a je důležitou komponentou zdravé a vyvážené diety díky svým nutričním hodnotám. Z nutričního hlediska důležitost masa vyplývá z jeho vysoce hodnotných bílkovin, obsahujících všechny esenciální aminokyseliny, stejně tak jako snadno přijatelné makro i mikro prvky, vitamíny jako železo, selen, zinek a vitamín B12. [6] Vnitřnosti jako játra jsou důležitým zdrojem vitamínu A a kyseliny listové. [7]

Avšak konzumace masa a masných výrobků byla asociována se zvýšeným rizikem výskytu některých chronických onemocnění jako je kolorektální karcinom neboli rakovina tlustého střeva, jež je třetí nejčastější rakovina u mužů (746 000 případů, 10% z celkového počtu) a druhá u žen (614 000, 9,2% z celkového počtu) celosvětově. [8] Tato spojitost byla mnohými studiemi odmítnuta, avšak je jistá míra nekonzistence mezi pozorováními a experimentálními daty týkajícími se červeného masa a rakoviny. [9] K osvětlení tohoto problému je zapotřebí více studií. Zároveň by mělo být zkoumáno předejití nebo zmírnění karcinogenní aktivity masných výrobků. Průmyslové zpracovávání snižuje hodnotu masných výrobků, a proto i jejich ceny mohou být sníženy a doba trvanlivosti může být prodloužena. [4] Avšak složení masa může být poškozeno přítomností nežádoucích látek, jako jsou nitrosaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), heterocyklické aromatické i nearomatické aminy, biogenní aminy a produkty lipidické oxidace. [10]

Speciální pozornost byla věnována procesu uzení, protože kontaminoval masné výrobky polyaromatickými uhlovodíky (PAU). Karcinogenita, mutagenita a biokumulace látek PAU byla potvrzena Organizací pro výživu a zemědělství (FAO), Světovou zdravotnickou organizací (WHO), Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC), Evropským výborem pro potraviny (SCF), Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) a Agenturou pro ochranu životního prostředí (EPA). [11] Maximální množství látek PAU v masných výrobcích bylo několikrát sníženo Evropskou unií.

Kontaminace látkami PAU může být kontrolována, přičemž jsou zachovány příznivé efekty uzení a předcházeny nežádoucí efekty této úpravy potravin. [12] Zejména předpisy

Codex Alimentarius Commission specifikují 10 proměnných, které je třeba kontrolovat k minimalizaci a prevenci kontaminace látkami PAU masných výrobků během uzení. Každá z těchto proměnných byla odpovídajícím způsobem nezávisle studována několika výzkumnými týmy. [13]

2.2 Uzení

2.2.1 Historie a význam

Uzení je jednou z nejstarších potravinářských technologií používaných lidstvem vůbec. [14, 15] Lidé pravděpodobně nechávali maso viset nad ohněm jako ochranu před masožravými predátory, přičemž byl pravděpodobně objeven konzervující účinek kouře ve smyslu prodloužení trvanlivosti masa. [16, 17] První zmínka o uzení jako technologického, tedy záměrného procesu, se datuje 90 000 let nazpět do Polska. Nejstarší udírna byla objevena archeology v osadě z doby kamenné nacházející se u města Zwierzymec poblíž Krakova. [18]

Nejvíce historických informací o uzení masa máme z Římské kultury z knihy Marcuse Cata *De Agri Cultura*, datující se do roku 160 před Kristem [19] a ze středověku z knihy Marxe Rumpolta *Nová kuchařka (Ein new Kuchbuch)* vydané v roce 1581. [18] Někteří výzkumníci tvrdí, že se Římané mohli naučit technologii uzení masa od Galů nebo Keltů. Emigrující Evropané rozšířili tuto metodu úpravy potravin do celého světa včetně Ameriky, Jižní Afriky a Austrálie. [19]

V dnešní době, kromě některých Afrických a Asijských zemí, kde nebyla rozšířena přeprava potravin v chlazených prostorech [20], se uzení využívá pouze pro zlepšení některých organoleptických vlastností, jako třeba vytříbení chutě, barvy a vůně výrobků, toliko potřebných pro spokojeného náročného zákazníka. [16, 21, 22] Bylo dokázáno, že profil masných výrobků (barva, vůně a chuť) je lepší s prodlužujícím se časem uzení. [23]

Alternativami uzení ve smyslu konzervačních technologiích jsou moderní techniky kontrolovaného sušení v sušicích komorách, používání tekutého kouře a jiné metody k uchování čerstvosti potravin ve smyslu chlazení, mrazení nebo super mrazení, využívání ionizujícího záření, chemická nebo biologická konzervace, konzervace vysokým tlakem a balicí metody jako vakuové balení, balení při upravené atmosféře, aktivní balení a antimikrobiální balení. [24]

Od počátků tradičního nekontrolovaného spalování biomasy se způsob uzení potravin zlepšoval, až se stal samostatným technologickým procesem. Je několik způsobů jak klasifikovat, rozdělit metody uzení např. podle teploty kouře, umístění potraviny během uzení

vůči zdroji kouře a zařízení použité k uzení. V této práci rozdělíme metody uzení na přímé a nepřímé. [18, 25, 26]

2.2.2 Metody přímého uzení

Během přímého uzení je kouř vytvářen ve stejné komoře jako zpracovávané maso. [13] Tento způsob zahrnuje většinu tzv. „klasických metod“. Tradiční metody uzení využívají přímého termického rozkladu dřeva k produkci kouře. Tato definice může být rozšířena, neboť jiné druhy tuhých paliv byly v minulosti používány po celém světě. Ve skutečnosti lidé využívaly ke spalování a vytváření kouře jakéhokoli odpadu na který narazili jako zbytky potravin (ořechové skořápky, kukuřičné klasy, ovocné pecky a další), stejně tak jako noviny nebo nábytek (dřevo ošetřené barvou). [27] Řada různých nezdravých a škodlivých látek, jako například polyaromatické uhlovodíky, se vytváří, pokud není použito vhodné palivo. Přímé uzení může být rozděleno podle teploty použitého kouře. [13]

2.2.2.1 Tradiční uzení studeným kouřem

Během studeného uzení je dřevo spalováno a vzniká kouř. Masné výrobky jsou zavěšeny nad teplou zónu situovanou v grilovací části udírny (ta nejbližší ohni), kudy kouř prostupuje vzhůru udírnou. Teplotu kouře regulujeme rozhořením dřeva, tedy množstvím kyslíku a odtahem komína nebo použitím výměníku tepla. Udírny pro tento typ uzení bývají větší. Podle různých autorů by se teplota kouře měla pohybovat buď pod 20 °C [18], mezi 15 a 25 °C [16, 28] nebo pod 30 °C. [27] Tento typ uzení se používá nejčastěji pro různé druhy salámů, šunek a klobásek. [28]

2.2.2.2 Tradiční uzení teplým kouřem

Během teplého uzení je udicí komora zahřívána hořícím dřevem v uspořádání podobnému pečení ve starých troubách (s otevřeným ohněm). Jakmile je maso v udírně, je zahříváno a vysušováno žhavými uhlíky z ohořelého dřeva. Poté se přidáním pilin do ohně oheň udusí s cílem vytvoření velkého množství kouře. [18] Obvykle dosahované teploty jsou 130 °C a 80 °C pro kouř respektive maso. [18, 27] Někteří autoři uvádí teploty v rozmezí 55 až 80 °C. [28]

2.2.3 Metody nepřímého uzení

2.2.3.1 Vývoj kouře pomocí generátoru tření

Již primitivní kmeny v pravěku při rozdělování ohně třením dvou dřívků o sebe vytvářely jistou dávku kouře, než došlo ke vznícení tolik požadovaného plamene. Tato skutečnost mohla poskytnout inspiraci pro sestrojení generátoru kouře za pomoci tření (friction smoke generator) dvojicí pánů Rasmussen a Rasmussen v roce 1961. [29] Od té doby nové modely tohoto zařízení byly sestrojeny, představeny a využívány k uzení potravin. [30]

Dnes jsou udící komory s tímto typem generátoru navrhované tak, aby všechny probíhající procesy (přehřívání a žhavení dřeva, generace a odvod kouře, sušení) byly plně pod kontrolou. Všechny vyjmenované procesy se opakují v cyklech, kdy počet a délka trvání cyklů záleží na druhu masného či jiného produktu uzení. Typické intervaly pro vývoj kouře se pohybují kolem 20 s kontinuálního tření ocelového kotouče o dřevo, následované pauzou s délkou trvání od 60 do 240 s. Během tohoto procesu se teplota dřeva pohybuje v rozmezí od 180 až 380°C. Intenzita vzniku kouře se odvíjí taktéž od tlaku působícího na dřevěný blok a době kontaktu dřeva s ocelovým třecím kolem. [30, 31]

S generátorem kouře na principu tření se čas nutný pro obsluhu a spotřeba dřeva snižují a produkce kouře je plně kontrolována a optimalizována. Navíc je zvýšena bezpečnost celého procesu, co se týče obsluhy – je sníženo riziko vzniku požáru, i nutriční bezpečnost vzniklého produktu snížením tvorby nežádoucích látek jako např. látek typu PAU. Dále je snížen úbytek hmoty uzených potravin, celková chuť produktů je obohacena o aroma jednotlivých ingrediencí, které při běžném uzení mohou být potlačeny, a je možná standardizace a homogenizace vzniklých produktů. [11, 30-32]

2.2.3.2 Tekutý kouř

Tekutý kouř je moderní způsob jak vytvářet komerční uzené produkty velmi rychle a levně. Tento způsob je více přátelský k životnímu prostředí, protože obě složky, jak druh a složení surového dřeva, tak koncentrace látek aplikovaných na potraviny, jsou kontrolovány. Jednodušší je i způsob aplikace než u tradičního uzení a umožňuje lepší reprodukovatelnost požadovaných charakteristik koncového produktu. [33]

Tekutý kouř vzniká kondenzací kouře vytvořeného kontrolovaným procesem pyrolýzy dřevěných pilin nebo pelet za minimálního přístupu kyslíku. Dřevo je tedy umístěno do velkého bubnového zásobníku, který se zahřeje na vysokou provozní teplotu, což způsobí doutnání (ne hoření) dřeva, přičemž se uvolní plyny typické pro kouř. Tyto plyny jsou rychle zchlazeny v kondenzátorech a dojde tedy ke zkapalnění kouře. Následně je vyprodukovaný tekutý kouř

filtrován a podroben frakcionačním a purifikačním procesům, které mají za cíl odstranit toxické a karcinogenní sloučeniny, jakou jsou například látky typu PAU, a zuhelnatělé částice. Proto je jeho použití považováno za zdraví méně poškozující alternativu tradičního uzení. Avšak širší využití kouřových aromat v porovnání s běžným uzením musí být bráno v potaz při hodnocení bezpečnosti, a proto je třeba dalšího zkoumání tohoto novodobého potravinářského trendu. [17, 33, 34]

2.2.3.3 Uzení v elektrostatickém poli

Při tomto typu uzení je produkt umístěn v trubici, na jejíchž obou koncích je přivedeno vysoké napětí v řádech desítek kilo voltů (20 až 60 kV). Kouř proudící tímto systémem se nabíjí v závislosti na složení jeho fází, neboť kouř je dvousložkový systém skládající se z pevných a kapalných částic. [22, 28] Látky schopné se v daném elektrickém poli ionizovat se lépe deponují na opačně nabitý povrch uzeného produktu. [35] K zajištění sedimentace látek z kouře na povrch produktu, je udicí krok následován ozářením infračerveným zářením. [18]

2.2.3.4 Jiné technologie k vytváření kouře

Další velmi známé způsoby generace kouře zahrnují parní, fluidizační a doutnající kouřové generátory. Parní kouř je generován prostupováním superpřehřáté páry skrz dřevěnou štěpku, čímž dochází k její pyrolýze. Vznikající kouř odváděný do udicí komory bývá nejčastěji chlazen na teplotu 80 °C. Pracovní teploty páry bývají v rozmezí od 450 do 650 °C. [14, 36]

Fluidizační kouřový generátor pracuje na principu fluidní pyrolýzy, kde dřevěné hobliny jsou přehřáté na teplotu 300 – 400 °C a vháněny do kontinuálního proudu vzduchu. Vzniká dobře homogenní směs připomínající tekutinu, odtud název fluidní. Pyrolýza je prováděna v reakční komoře, zatímco kouř je odváděn do cyklonového rafiněru (separátoru) k odstranění pevných částic a dále veden do udicí komory. [24]

V těchto technologiích jsou podmínky uzení velmi kontrolovatelné a optimalizovatelné. Mezi parametry optimalizace řadíme hustotu kouře (mírná, střední a intenzivní), teplotu generátoru kouře pohybující se mezi 300 až 520 °C, rychlosti ventilátorů (750, 1500 až 3000 RPM) a dobu expozice produktu kouři (od 3 do 40 minut). Kontrolou podmínek uzení v těchto a jiných technologiích umožní zmírnit míru kontaminace finálních produktů škodlivými látkami. [30, 32]

2.2.4 Složení a účel kouře

Složení kouře je definováno druhem paliva (dřeva), podmínkami uzení (teplota, čas, vlhkost, průtok vzduchu) a následnými úpravami kouře. V kapitole Smoked Foods knihy „*Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*“ se můžeme dočíst, že mezi hlavní složky kouře řadíme přes 400 identifikovaných těkavých látek zahrnující 48 kyselin, 22 alkoholů, 131 karbonylových sloučenin, 22 esterů, 46 furanů, 16 laktonů, 75 fenolů a 50 dalších různých sloučenin. [28] Nejvíce zastoupenou složkou kouře je vodní pára (82,4%), dehet (4,8%), rezidua (4,2%), extrakty z aktivovaného uhlí (4,1%), kyselina octová a kyseliny s větší molekulovou hmotností (1,7%), methanol (1,0%), ketony (0,7%), aldehydy vyšší molekulové hmotnosti (0,6%), kyselina mravenčí (0,4%), formaldehyd (0,1%) a fenoly (0,1%). [14, 18, 25, 26]

Chemické složení kouře můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin a řadu podskupin. Kritérium hlavních skupin jsou žádoucí a nežádoucí efekty látek na koncový produkt uzení. Například thymol, formaldehyd, kyseliny mravenčí, octová a benzoová, o-kresol, m-kresol, p-kresol, guajakol a kreosol mají požadované baktericidní, antimikrobiální, biocidní, fungicidní a konzervační účinky. Guajakol, vinylguajakol a kyseliny máselná, kapronová, enanthová, kaprylová a pelargonová udělují příjemnou vůni produktu. V prvních dnech dozrávání je barva masných produktů způsobena převážně dusíkatými látkami přítomnými v mase v kombinaci s myoglobinem, jež dohromady poskytují kýžený pigment. Tyto barevné změny jsou výsledky neenzymatického Maillardova hnědnutí. [18, 27, 30]

Na druhé straně jsou produkty, které mají nežádoucí efekty jako například fenol zodpovědný za špatnou chuť, aceton a vyšší nenasycené uhlovodíky mají nepříjemné a nežádoucí aroma. Mezi dalšími nežádoucími látkami a nejdůležitějšími v negativním slova smyslu můžeme nalézt polyaromatické uhlovodíky. [32]

Tabulka 1 - Význam látek obsažených v kouři [37]

Skupiny látek v kouři	Popis	Efekty na masné výrobky
Skupina 1 Uhlovodíky I	Nasycené a nenasycené alifatické uhlovodíky (parafiny a olefiny)	Nízký efekt kvůli jejich nízké reaktivitě
Skupina 2 Uhlovodíky II	Aromatické uhlovodíky (benzen, toluen, xyleny a polyfenoly)	Negativní efekt: Špatná chuť
Skupina 3 C-OH látky: Alifatické sloučeniny s 1 hydroxylem, alkoholy a étery	Methanol: prekurzor formaldehydu a kyseliny mravenčí Ethanol, propanol a isopropanol: oxidací vznikají karbonyly a kyseliny Butanol a amyl alkohol Fenyl alkoholy (benzyl alkohol, fenetyl alkohol)	Nežádoucí, toxické Žádoucí Žádoucí (olejové aroma) Žádoucí (vůně růží)
Skupina 4 C-OH látky: Aromatické sloučeniny s 1 hydroxylem	Guajakol a methylguajakol Fenol Deriváty fenolu o, m, p Kresol, dimethoxyfenol Xylenol (dimethylfenol) Thymol	Žádoucí (konzervanty a ochucovadla) Nežádoucí (špatná chuť) Žádoucí v omezeném množství Žádoucí (konzervace, vůně a barva kouře) Silné antimikrobiální, biocidní, fungicidní účinky Konzervant Aroma tymiánu a dřeva
Skupina 5 CH=O látky (karbonyly): Alifatické aldehydy	Formaldehyd	Žádoucí Tvrdnutí povrchu a pojivových tkání Baktericidní Konzervant
Skupina 6 CH=O látky (karbonyly): Aromatické aldehydy	Benzaldehyd	Žádoucí Hořkomandlové aroma
Skupina 7 C=O látky: Alifatické ketony	Aceton	Nežádoucí aroma
Skupina 8 C=O látky: Aromatické ketony	Acetofenon Ninhydriny	Vůně sena, květinové aroma Jemné aroma
Skupina 9 COO látky: Alifatické karboxylové kyseliny	Kyselina mravenčí a octová Kyselina máselná, valerová, kapronová, enanthová, kaprylová a pelargonová Nenasycené karboxylové kyseliny (krotonová a tiglová)	Žádoucí pro: Udávají zbarvení Dobrá vůně Baktericidní Determinují vůni (zápach) Žádoucí pro zbarvení Nežádoucí pro chuť

Tabulka 2 – Pokračování - Význam látek obsažených v kouři [37]

Skupiny látek v kouři	Popis	Efekty na masné výrobky
Skupina 10 COO látky: Aromatické karboxylové kyseliny	Kyselina benzoová Kyselina salicylová, galová, toluová, ftalová, isoftalová a tereftalová	Specifické konzervanty proti aerobním plísním rodu bacillus
Skupina 11 Aromatické polyhydroxy sloučeniny	Benzendioly (pyrokatechol, resorcinol, hydrochinon)	Nežádoucí
Skupina 12 Hydroxy-oxo sloučeniny: Alifatické hydroxyaldehydy a hydroxyketony	Acetol	Žádoucí Reakce s proteiny vedoucí k charakteristické barvě uzeného
Skupina 13 Hydroxy-oxo sloučeniny: Aromatické sloučeniny, fenol aldehydy a fenol ketony	Salicylaldehyd (2-hydroxybenzaldehyd), 4-anisaldehyd (4-methoxybenzaldehyd) Vanilin a koniferylaldehyd	Žádoucí: Intenzivní aroma a chuť vanilky a jehličí
Skupina 14 Sloučeniny s oxo skupinami: Dialdehydy a diketony	Glyoxal Diacetyl	Tvrdnutí povrchu Chuť a vůně margarínu a chleba
Skupina 15 Polykarboxy sloučeniny: Nasycené a nenasycené dikarboxylové sloučeniny	Kyselina maleinová	Žádoucí pro barvu: pigment
Skupina 16 Oxo-karboxy sloučeniny: ketokyseliny	Kyselina pyrohroznová a levulinová	
Skupina 17 Dusíkaté organické látky	Pyrol, pyrazin, indol, karbazol	Tmavnutí barvy
Skupina 18 Nearomatické cyklické uhlovodíky	Cykloten (3-methylcyklopentan-1,2-dion)	Javorové aroma
Skupina 19 Heterocyklické sloučeniny	Furan Laktony (Maltol)	Polymerizace ústí v tmavé pigmenty, dobré aroma Zlepšuje chuť, sladké a karamelové aroma
Skupina 20 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	Benzo(a)pyren, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten a chrysen	Nežádoucí v potravině (toxické a karcinogenní)

2.3 Heterocyklické aminy

Když je maso zpracováváno při vysokých teplotách (kolem 200 °C) mohou se vytvářet karcinogenní látky typu heterocyklických aromatických aminů (HAA). HAA mohou vznikat i při úpravě při nižší teplotě, pokud trvá delší dobu.[38] V libovém hovězím, kuřecím a rybách se HAA tvoří ve větších koncentracích, zatímco v párcích, klobásách a vepřovém mase nacházíme po tepelné úpravě méně HAA díky velkému obsahu tuku a vody. [39]

Heterocyklické aminy byly poprvé objeveny v roce 1977 profesorem Sugimurou a jeho spolupracovníky v mase po „běžném domácím vaření“. [40] Tehdy bylo objeveno 20 různých sloučenin, jež spadají do této kategorie. [41] Rozsah v jakém HAA vznikají ve zpracovávaném mase, závisí na typu masa, teplotě, délce přípravy a stupni zhnědnutí masa během přípravy. [38] Druh přípravy je dalším faktorem ovlivňující vznik HA. Studie ukázaly, že grilované, smažené, rožněné a opékané maso obsahuje větší množství heterocyklických aminů. [42]

Vědci dokázali, že HAA způsobují rakovinu u lidí a zvířat, blíže se jedná o nádory tlustého střeva, prostaty, plic, kůže, prsou, jater a gastrointestinálního traktu. [43] Je potřeba kontrolovat vznik HAA vhodnými metodami analýzy. Koncentrace těchto látek může být snížena zabráněním přímého kontaktu plamene s povrchem masa, využíváním mikrovlnné přípravy pro předpřípravu pokrmů a také neustálým obracením masa během tepelné úpravy. Vznik HAA se může rovněž redukovat užitím různých druhů koření a bylin nebo zeleninovými a ovocnými šťávami. [44]

Heterocyklické aromatické aminy jsou skupina 25 chemických individuí, které obsahují heterocyklický kruh a aminové funkční skupiny. [3, 41] HAA jsou dále klasifikovány do dvou odlišných skupin, aminoimidazoazaareny a aminokarboliny. [38] Azaareny jsou produktem reakcí volných aminokyselin kreatinu a kreatininu a hexos při konvenční úpravě při teplotách (150 – 300 °C) z masa, [45] zatímco aminokarboliny vznikají pyrolytickými reakcemi mezi volnými aminokyselinami a proteiny při vyšších teplotách. [2, 46]

HAA mohou existovat v obou formách: volných i vázaných v proteinech. Jak je dobře známo, volné HAA mohou být vytvářeny reakcemi volných aminokyselin, glukosy, kreati(ni)nu a jiných produktů Maillardových reakcí. Avšak zbytky aminokyselin vázaných v masných proteinech mohou reagovat s dalšími prekurzory za vzniku vázaných HA. Rovněž volná aminová funkční skupina HAA může reagovat s volnou karboxylovou skupinou v proteinech za vzniku amidické skupiny a tedy vázaných HAA. V masitých materiálech obsah bílkovin většinou přesahuje hodnotu 10%, zatímco koncentrace volných aminokyselin bývá méně než 1 mg/g (0,1%), tím pádem v proteinech vázané HAA mohou být na koncentračně

vyšších úrovní než volné HAA. Ačkoli nebylo zatím potvrzeno, jestli se vázané HAA rozloží na neškodné produkty při zpracovávání bílkovin v lidském organismu, bylo objeveno, že HAA dříve neextrahovatelné při enzymatickém trávení mohou být uvolněny a vstřebány z upraveného hovězího masa proteolýzou v prostředí tenkého střeva. [47]

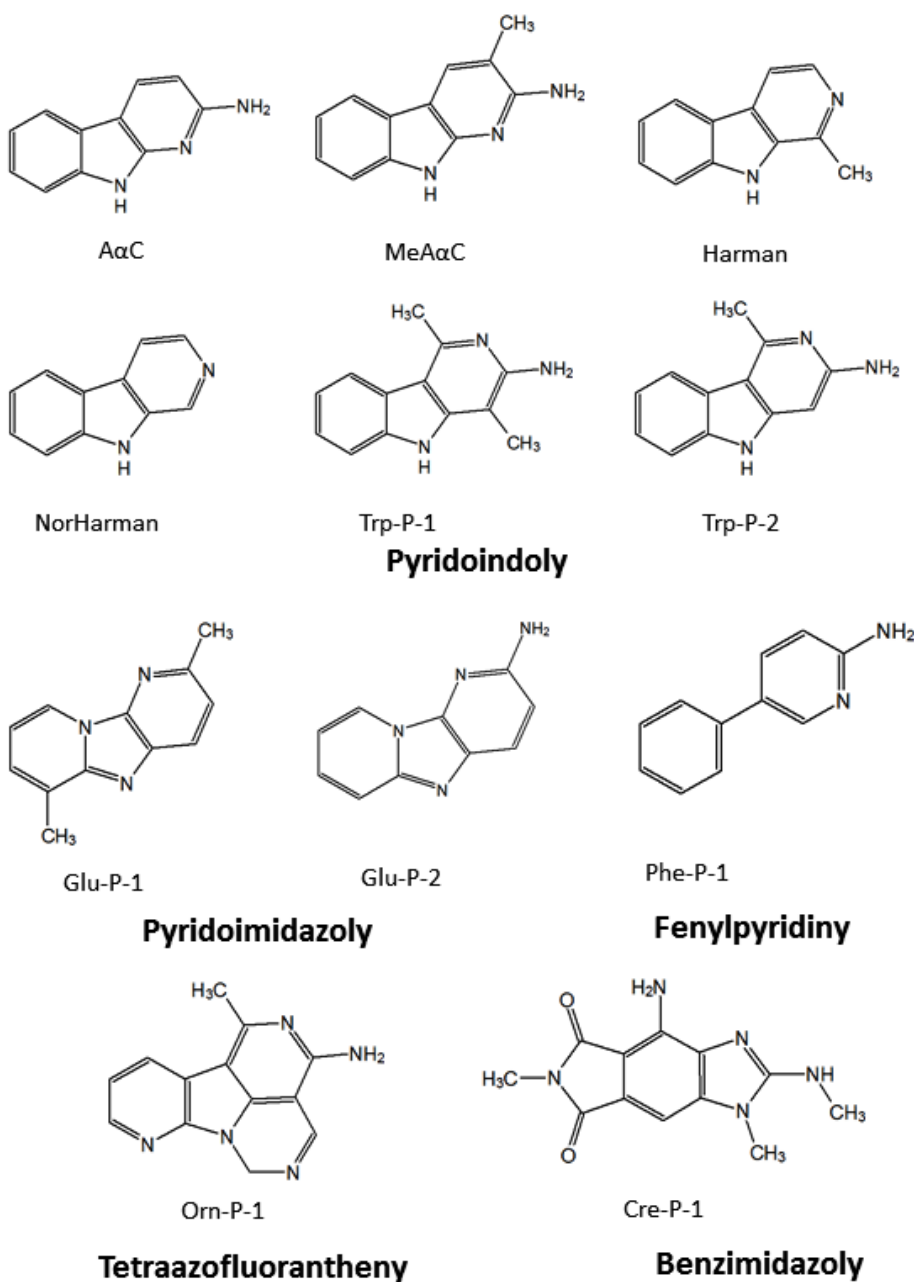
2.3.1 Vznik pyrolytických heterocyklických aromatických aminů

Pyrolytické HAA jak už jejich název napovídá, vznikají ve většině případů za vysokých teplot (obecně vyšších než 250°C). [38] Jak je ukázáno v obrázku 1 na následující straně, pyrolytické HAA můžeme rozdělit do 5 rozličných skupin: pyridoindoly (harman, norharman, AaC, MeAaC, Trp-P-1, Trp-P-2), pyridoimidazoly (Glu-P-1, Glu-P-2), fenylpyridiny (Phe-P-1), tetraazofluorantheny (Orn-P-1) nebo benzimidazoly (Cre-P-1). Tyto látky jsou vytvářeny z prekurzorových aminokyselin, jako jsou tryptofan, fenylalanin, kyselina glutamová nebo ornitin, ale také z pyrolyzních produktů kaseinu nebo sójového globulinu. Při vysokých teplotách vznikají také reaktivní radikály stejně jako produkty deaminace a dekarboxylace, které napomáhají vzniku látek typu pyrolytických HAA. [48]

Pyrolýza tryptofanu indukuje tvorbu Trp-p-1, Trp-P-2, AaC, MeAaC, harmanu a norharmanu. Naneštěstí pouze první kroky jejich vzniku jsou obecně popsány. Dlouhou dobu bylo předpokládáno, že se tyto látky tvoří při teplotách nad 250°C, proto se výzkumníci zaměřovali převážně na pyrolytické HAA vznikající ve značných množstvích v produktech s aktivním pyrolytickým krokem jako je cigaretový kouř, ve kterém lze nalézt vysoké koncentrace MeAaC a AaC nebo harmanu a norharmanu. [49] Konkrétně byly v jedné studii nalezeny koncentrace 12 ug/g norharmanu a 4 ug/g harmanu v kondenzátu cigaretového kouře [50, 51], zatímco množství nalezená v kuřecím mase smaženém na pánvi při teplotě 220 °C po dobu 12 minut jsou více než 1000 krát menší (3,5 ng/g a 5,7 ng/g respektive). [49]

Ukazuje se, že harman a norharman jsou hojně zastoupenými pyrolytickými HAA vytvářenými v potravinách. Jejich vznik je upřednostňován metodami zpracování potravin za vyšších teplot, jako jsou opékání nad ohněm, pečením v troubě nebo smažením na pánvi. Při opékání nad ohněm můžeme vyšší koncentraci pyrolytických HAA vysvětlit přímým kontaktem plamene indukujícího vysokou teplotu na povrchu potraviny. [50, 52]

Chemická struktura pyrolytických HAA:



Obrázek 1 - Struktura pyrolytických heterocyklických aminů

AαC: 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indol; **MeAαC:** 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol; **Norharman:** 9H-pyrido[3,4-b]indol; **Harman:** 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indol; **Trp-P-1:** 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol; **Trp-P-2:** 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol; **Glu-P-1:** 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol; **Glu-P-2:** 2-aminopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol; **Phe-P-1:** 2-amino-5-fenylpyridin; **Orn-P-1:** 4-amino-6-methyl-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranten, **Cre-P-1:** 4-amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrolo[3,4-f]benzimidazol-5,7-dion

Potraviny obsahující daleko vyšší koncentrace harmanu a norharmanu než jiných HAA (pyrolytických a aminoimidazoazaarenů) naznačují, že je daleko důležitější věnovat se vystavení člověka těmto dvou aminům než zbylým kandidátům z této skupiny. [49] Nicméně na výsledcích získaných s bakteriemi kmene *Salmonella typhimurium* se ukazuje, že ačkoliv jsou tyto dva HAA všudypřítomné v potravinách obsahující větší množství proteinů, nejsou mutagenní per se (sami o sobě), ale stávají se mutagenními v přítomnosti aromatických aminů, jako jsou anilin nebo 2-methylanilin. Tento komutagenní efekt je připisován endogenní tvorbě nových heterocyklických aminů. [53] Ostatní pyrolytické HAA se tvoří v zanedbatelných množstvích v porovnání s aminoimidazoazaareny a harmanem a norharmanem, [52] ale mohou stejně dobře odůvodňovat monitorování těchto látek v podobné míře jako je kontrola polycyklických aromatických uhlovodíků. Lidé by si měli být vědomi jejich existence, přičemž konvenční metody přípravy jídla mohou vyloučit nebo alespoň znatelně snížit riziko jejich vzniku. [54]

2.3.1 Vznik aminoimidazoazaarenů

Aminoimidazoazaareny jsou vytvářeny v rámci Maillardových reakcí při přípravě potravin za běžných teplot (150 – 200 °C). Z obrázku č. 2 na straně 20 můžeme vidět, že tyto HAA mohou vznikat z nejrůznějších prekurzorů. Jejich skelety, základní struktury, jsou formovány Maillardovými reakcemi mezi aminokyselinami a hexosami přes produkty Streckerovi degradace. [55] Různé intermediáty vytvořené během tohoto kroku poskytnou základní strukturu vznikajících HAA: pyraziny, chinoxaliny, pyridoimidazoly. Imidazo struktura se vytváří z kreatininu během tohoto kroku. Tyto HAA byly studovány v modelových reakcích při teplotách nad 130 °C k objasnění mechanismu jejich vzniku. [38]

Bohužel pouze PhIP je jediný HAA, pro který byla navrhována obecná dráha vzniku, viz obr. 3 na straně 31. [56] Dřívější výzkum reakcí pomocí značení uhlíkem ¹⁴C ukázal, že PhIP vznikal z fenylalaninu a kreatininu v možné přítomnosti glukosy [57] s fenylacetaldehydem jako kritickým meziproduktem. Tato skutečnost byla později potvrzena, rovněž s tím, že fenylacetaldehyd může vznikat různými cestami, z čehož některé nepotřebují redukující cukr, protože jeho tvorba může zahrnovat reaktivní karbonyly tvořené z volných aminokyselin. [58]

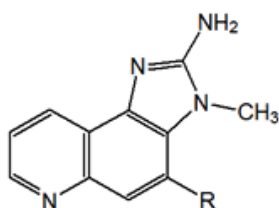
Mechanismus vzniku HAA typu IQ a IQx není úplně objasněno. Studie na modelových systémech ukazují, že jsou produkty reakcí mezi kreatininem, hexosami a různými volnými aminokyselinami. Viz obr. 3 na straně 21. [38] Předpokládá se, že aldolová kondenzace spojuje dvě skupiny za vzniku kruhové struktury prostřednictvím aldehydové nebo příbuzné Schiffovy báze. Elektronová spinová rezonance umožnila částečně objasnit mechanismus, neboť potvrdila přítomnost kation radikálového meziproductu. [55] Glukosa je jedním z nejúčinnějších cukrů k tvorbě IQx, 8-MeIQx, 4,8-DiMeIQx, v přítomnosti volných aminokyselin a kreatinu při teplotách nad 130 °C. [38]

Pomocí isotopového značení bylo dokázáno, že pyrazinové a pyridinové sktruktury pocházejí z reakcí mezi cukry a aminokyselinami, zatímco aldehydické skupiny vznikají pouze z aminokyselin. [48] Nejvíce uznávaný mechanismus navrhuje, že Maillardova reakce je následována Amadoriho přesmykem a Streckerovou degradací vytvářející alifatické aldehydy alfa-aminoketony. Finálním krokem je cyklizace poskytující pyrazinové a pyridinové skelety, které následně reagují s aldehydy a kreatininem za vzniku HAA typu IQ nebo IQx. Viz obr. 3 na straně 21. [59]

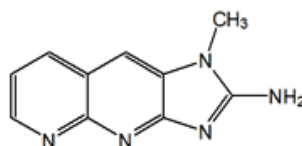
Jiný navrhovaný mechanismus ukazuje, že chinoliny vznikají z alkylypyridinových radikálů a kreatinu a chinoxaliny z dialkylypyrazinových radikálů a kreatinu, ale tento mechanismus zůstává relativně kontroverzní. [60]

Pyrazinové deriváty jsou dobře známy v potravinářské chemii, neboť udávají typickou vůni opečeného masa. Bylo zjištěno, že mechanismus jejich vzniku je podmíněn podstatou cukrů a tím, že fruktóza poskytuje největší výtěžky pyrazinových sloučenin v přítomnosti asparaginu za vysokých teplot v modelových systémech. [61] Zatímco v jiných pracích bylo ukázáno, že glukóza má největší potenciál k tvorbě HAA typu IQx [38], a proto společně s fruktózou a alaninem nebo glycinem tvoří základ pro tvorbu této skupiny aminoimidazoazaarenů. Někteří výzkumníci si povšimli, že zatímco pro vznik HAA typu IQ v jednom mechanismu je zapotřebí methyl pyridinových intermediátů, v jiných je vznik popsán z 2-methyl pyridinových meziproductů v přítomnosti glukózy a fenylalaninu a že nejlepší aminokyselinou pro vznik tohoto intermediátu je kyselina asparagová. [62] Tyto protichůdné výsledky mohou naznačovat, že další sloučeniny mohou zasahovat do vzniku HAA, což ústí v potřebu plného porozumění jejich celkového vzniku.

Chemická struktura aminoimidazoazaarenů:

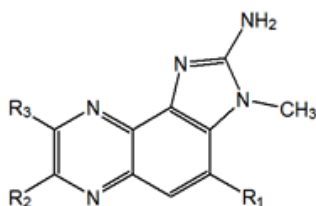


R = H (IQ)
R = Me (MeIQ)

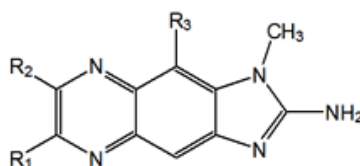


IQ[4,5-b]

Chinoliny

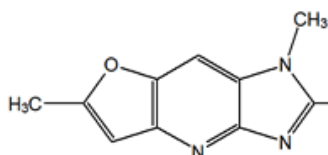


R₁, R₂, R₃ = H (IQx)
R₁, R₂ = H, R₃ = Me (8-MeIQx)
R₁, R₃ = Me, R₂ = H (4,8-DiMeIQx)
R₁, R₂ = Me, R₃ = H (7,8-DiMeIQx)

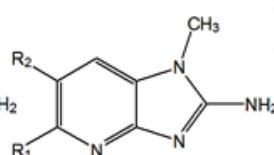


R₁, R₂, R₃ = H (IgQx)
R₁, R₃ = H, R₂ = Me (7-MeIgQx)
R₁, R₂ = Me, R₃ = H (6,7-DiMeIgQx)
R₁ = H, R₂, R₃ = Me (7,9-DiMeIgQx)

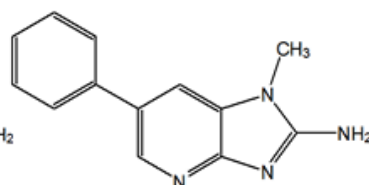
Chinoxaliny



IFP



R₁ = H, R₂ = Me (1,6-DMIP)
R₁, R₂ = Me (1,5,6-TMIP)

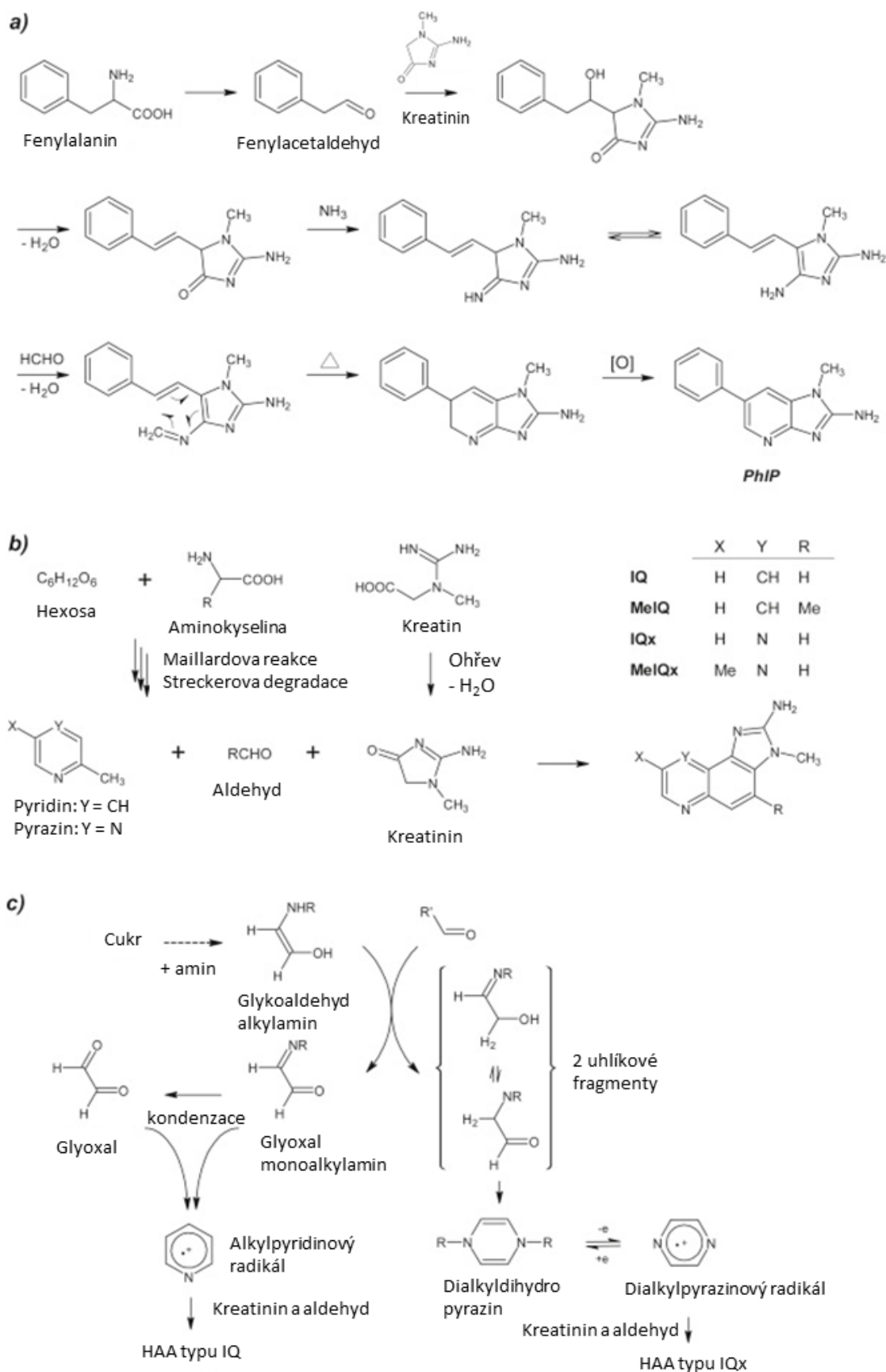


PhIP

Pyridiny

Obrázek 2 - Struktura aminoimidazoazaarenů

PhIP: 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin; **IQ:** 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin; **MeIQ:** 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin; **IQx:** 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinoxalin; **1,6-DMIP:** 2-amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-b]pyridin; **1,5,6-TMIP:** 2-amino-1,5,6-trimethylimidazo [4,5-b]pyridin; **IFP:** 2-amino-1,6-dimethylfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]pyridin; **IgQx:** 2-amino-1-methylimidazo[4,5-g]chinoxalin; **IQ[4,5-b]:** 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]chinolin **8-MeIQx:** 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin **4,8-DiMeIQx:** 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin **7,8-DiMeIQx:** 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin **7-MeIgQx:** 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]chinoxalin **6,7-DiMeIgQx:** 2-amino-1,6,7-trimethylimidazo[4,5-g]chinoxalin **7,9-DiMeIgQx:** 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]chinoxalin



Obrázek 3 - Reakční schéma vzniku aminoimidazoazaarenů [48, 56, 59, 60]

2.4 Heterocyklické aminy z pohledu analytické chemie

Kvůli přítomnosti heterocyklických aromatických aminů (HAA) v řadě tepelně upravených matric potravin a vzhledem k jejich negativnímu efektu na lidské zdraví je monitorování, extrahování a stanovování těchto toxických látek ve zpracovaných potravinách povinností. Stopová množství těchto látek způsobují v dlouhodobém hledisku řadu chorob v lidském organismu a nakonec mohou stát za vznikem několika různých forem rakoviny. [63] Jejich přítomnost ve stopových množstvích v řádech desítek až tisíců $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ve složitých matricích, jako jsou matrice potravin obsahující velkou škálu interferentů, vyžaduje použití vhodných čistících postupů. [64] Metody předběžné úpravy budou dále rozděleny na konvenční a mikroextrakce. Následně budou zmíněny dvě nejčastěji využívané instrumentální metody ke stanovování HAA. [65, 66]

2.4.1 Konvenční metody extrakce

2.4.1.1 Extrakce kapalina – kapalina (LLE)

Tato metoda je používána jako spolehlivá a „zaběhnutá“ extrakční metoda v řadě studií ke stanovování nejrozličnějších látek včetně HAA. [67, 68] Mechanismus LLE je založen na použití organické a vodné fáze větších objemů ve stejném poměru. Hledaný analyt je většinou extrahován z vodné fáze do organické. [69] Běžně využívanými rozpouštědly k extrakci HAA jsou hexan, ethyl-acetát, dichlormethan, aceton a acetonitril. [68] Tyto postupy extrakce mají své limity ve větší spotřebě organických rozpouštědel, delšímu času potřebného na všechny úkony a nižší návratnosti. Ovšem na druhou stranu je tato metoda instrumentálně velmi nenáročná a jednoduchá na obsluhu. [70, 71]

2.4.1.2 Extrakce na tuhé fázi (SPE)

Tato další velmi oblíbená extrakční metoda, využívá kolonek na bázi silikagelu se zakotvenou extrakční fází. Tento přečišťující krok byl využit v řadě vědeckých pracích k extrakci HAA z různých potravinových vzorků. [72] Byly popsány práce s komerčně dostupnými fázemi Blue Coton, Blue Chitin a Blue Rayon, jejichž základem je ftalocyaninové barvivo s mědí jako centrálním atomem. [68-70] Ke kondicionaci kolony se běžně využívá kyselina chlorovodíková, voda a methanol. Extrakce HAA z kolonek probíhá promýváním dichlormethanem, alkalizovaným roztokem methanolu nebo ethyl-acetátem. [68, 73]

SPE vyžaduje použití menších objemů rozpouštědel než LLE, ale má i své nevýhody jako je vyšší riziko ztráty analytu, paměťový efekt sorbentů (zadržování a postupné uvolňování látek) a nižší vhodnost automatizace. [63]

2.4.1.3 Superkritická fluidní extrakce

Tato technika se řadí mezi vysoce efektivní metody extrakce. S její pomocí je možné eliminovat řadu interferujících sloučenin z velmi rozličných pevných materiálů za zisku velmi čistých extraktů. V porovnání s SPE je tato metoda, díky automatizované instrumentaci, daleko více vhodná pro opakující se čistící kroky, jimiž postupně zvyšujeme čistotu výsledného extraktu a také méně zatěžuje životní prostředí organickými rozpouštědly. [71]

Oxid uhličitý je hlavní využívanou složkou v této metodě. Chemická individua jsou totiž extrahována superkritickým oxidem uhličitým namísto organickými rozpouštědly. Podmínky, za kterých se látka stává superkritickou, jsou takové, kdy hodnoty tlaku a teploty tekutiny jsou nad jejími kritickými mezemi a její vlastnosti jsou mezi plynným a kapalným stavem. Změnou teploty a pracovního tlaku tekutiny můžeme nastavit vhodné podmínky pro rozpouštění a selektivní extrakci požadovaných sloučenin. Tato metoda má jistě své výhody v šetrnější a selektivnější extrakci a vyšších výtěžcích bez potřeby odpařování rozpouštědla. [74]

Je vhodná pro extrakci HAA z libovolných vzorků. Avšak použití čistého oxidu uhličitého nepřináší požadované výtěžky, proto se využívá 10% přídatku methanolu jako modifikátoru superkritické fáze a zvýšeného tlaku a teploty. [68, 75]

2.4.1.4 Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PSE, PLE)

Jedná se o plně automatizovanou metodu předpřípravy vzorku. V této technice je aplikována vyšší teplota (50 – 200 °C) a vyšší tlak (10 – 14 MPa) na extrakční rozpouštědla, aby lépe difundovala přes pevný vzorek pro uvolnění cílových analytů. PSE má řadu výhod, mezi které patří časová efektivita, nízká spotřeba rozpouštědel, automatizace a vysoká efektivita celého procesu. Jedná se o jednu z nejvhodnějších metod pro extrakci tuhých vzorků. K běžně využívaným rozpouštědlům se řadí dichlormethan, aceton nebo methanol a průměrný čas extrakce se pohybuje kolem 15 minut. [76]

2.4.1.5 Mikrovlnně asistovaná extrakce (MAE)

MAE je jednou z nových preparačních technik s vysokou mírou schopnosti extrahovat nejrozličnější sloučeniny. Využívá se pro extrakci cílových analytů z komplexních matic, typicky těch potravinových. Největšími výhodami této metody je časová nenáročnost a vysoké výtěžky. Princip metody je založen na ohřevu vzorku a extrakčního rozpouštědla za pomoci mikrovlnného záření po dobu extrakce. [77, 78]

Oproti konvenčnímu zahřívání, kdy teplo prochází z vnější části do vnitřní části nádoby, v MAE se uskutečňuje ohřívání uvnitř extrakční nádoby a vytvořené teplo proniká do vnější

části. Mikrovlnné záření vyvolává pohyb polárních molekul a iontů kapalin, z čehož vyplývá omezené použití na rozpouštědla schopná přijímat mikrovlnné záření. Nejpoužívanějším rozpouštědlem bývá methanol. [79]

Tato technika byla několikrát využita k extrakci polárních HAA z hamburgerů a jiných masných matric. Běžně se využívá mikrovlnná energie o frekvenci 500 MHz po dobu 1,5 – 5 minut [65, 70, 78]

2.4.2 Mikroextrakce

Mikroextrakční techniky ukazují slibný potenciál v posunu k tzv. technikám přátelským k životnímu prostředí nebo známým také jako techniky zelené chemie, díky snižování objemů organických rozpouštědel a navážek reálných vzorků. Dále dosahují lepších výtěžků, doba ekvilibrace systému se díky mikroměřítku zkracuje, vytváří se zanedbatelná množství odpadu a tyto metody jsou velmi adaptivní ve spojování s moderními separačními technikami. [80]

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je v podstatě založena na volném přecházení analytů z plynné, kapalně nebo tuhé fáze vzorku do polopevného polymerního materiálu (polymerem potažené vlákno). SPME byla poprvé představena v roce 1990 jako jednoduchá, rychlá, citlivá a efektivní metoda poskytující vysoké výtěžky. [81] Může být použita pro *in situ* analýzy vzorků a byla nesčetněkrát použita k extrakci HAA z rozličných potravin. Nejběžněji využívaná vlákna jsou potažená směsí Carbowax-templátové pryskyřice (CW-TPR), Carbowax-divinylbenzen (CW-DVB), polydimethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS-DVB) a polyakrylát (PA) k extrakci HAA metodou SPME. [66, 82]

Mikroextrakce kapalnou fází (LPME) byla poprvé představena v roce 1985. [83] V této metodě je extrakční proces situován v malém objemu organické fáze (akceptorové fáze), která přidána nebo vnořena do vodné fáze vzorku (donorové fáze) obsahující analyty. [84] Mikroextrakce jednou kapkou (SDME), disperzivní kapalina-kapalina extrakce (DLLME) a mikroextrakce využívající duté vlákno naplněné sorpční vrstvou (HF-LPME) jsou vše varianty LPME. Typicky využívanými rozpouštědly jsou oktanol, oktadekanol nebo tetrachlormethan. [70, 85]

Při SDME je na hrotu injekční stříkačky vnořené do donorové fáze vytvořena kapička z 1 – 5 µl organického rozpouštědla, na jejímž povrchu začne docházet k extrakci látek, po uplynutí potřebné doby je kapička vtažena zpět do stříkačky a extrakt může být přímo nastříknut do separační techniky. [69]

V DLLME metodě je do donorové fáze přidáno dispergační a extrakční činidlo za současného vzniku zakaleného roztoku. Dispergační činidlo ovlivňuje polaritu směsi a

umožňuje extrakčnímu rozpouštědlu vytvořit disperzní systém malých kapiček ve vodném roztoku. Tímto způsobem se enormně zvýší plocha styku extrakčního činidla s extrahovaným prostředím. [77]

Při HF-LPME metodě jsou sledované sloučeniny ze vzorku (donorová fáze) extrahovány do organické fáze s vodou nemísitelného rozpouštědla imobilizovaného v pórech dutého vlákna. Při extrakci se volí takové pH, aby u co nejvíce látek byla potlačena disociace. Na konci procesu jsou sledované látky extrahovány do vhodného rozpouštědla uvnitř druhého vlákna. [80]

2.4.3 Instrumentální analytické techniky

Po předúpravě vzorku a čistících krocích je nutno aplikovat jednu z instrumentálních analytických metod ke kvantifikaci vyextrahovaných heterocyklických aminů (HAA). Chromatografické metody, jako je kapalinová chromatografie (LC) a plynová chromatografie (GC), jsou mocnými nástroji ke stanovování HAA v nejrůznějších vzorcích. [70, 86]

2.4.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je využívána k analýze HAA v potravinách v širokém rozsahu od šedesátých let minulého století. Přičemž popularita tohoto analytického přístupu tkví ve velké citlivosti a rychlosti prováděných analýz. HPLC je vhodná pro separaci vysoce polárních, termicky málo stabilních a netěkavých látek. [68]

Většina analytických metod pro kvantifikaci HAA v potravinách založených na HPLC využívá UV detekce po separaci na kolonách typu C18, C8 tedy reverzních fází. [76] Po analýze extraktů se získávají komplexní chromatogramy, ve kterých je vyžadováno potvrzení píků pomocí ultrafialového spektra z detektoru diodového pole (DAD), tedy porovnání spektra vzorku s referenčním spektrem. [87] Obvykle se fluorescenční spektra zaznamenávají společně s UV spektry, aby se zároveň kvantifikovaly fluoreskující HAA. Sloučeniny typu IQ neposkytují fluorescenční signál za podmínek potřebných pro reverzní fáze a proto k jejich kvantifikaci je vyžadováno UV spektrum. [88]

Fluorescence poskytuje vyšší selektivitu a citlivost. Výsledky fluorescence mohou být 100-400 krát citlivější než detekce s pomocí UV. [66] S tímto detektorem však není možné jednoznačné potvrzení chromatografických píků, a proto je potřeba DAD. Identifikace píků je provedena srovnáním retenčních časů a spekter s referenčními standardy. Homogenita píků může být také určena detektory DAD. [73]

Některé HAA vykazují charakter elektrochemicky oxidovatelných – redukovatelných látek. Tedy s výhodou lze využít elektrochemický detektor (ED). Jejich zástupcem je

amperometrický detektor využívající vložené konstantní napětí na pracovní elektrodě za současného měření proudu. Kdykoli látka podlehne elektrochemické přeměně, je tato skutečnost zaznamenána výchylkou proudu. Tyto detektory jsou velmi citlivé, mají nízkou mez detekce, ovšem měření pomocí nich jsou méně reprodukovatelná z důvodů měnícího se povrchu elektrody. [68, 72, 89]

Hmotnostní spektrometr (MS) může být využit jako robustní detektor k detekci a kvantifikaci HAA. HPLC následovaná MS je široce využívaným spojením nabízejícím vysokou citlivost, přesnost a nízké limity detekce k simultánnímu stanovení HAA. [87] Nejdůležitější částí spojení HPLC-MS je ionizační technika, tedy interface, prostřednictvím něhož se separované analyty dostávají z kolony do vakuově odčerpávaného prostoru hmotnostního detektoru za jejich současné ionizace. V dnešní době jsou nejčastější spojení LC-MS realizovány ionizací za atmosférického tlaku (API), jejímiž modifikacemi jsou foto-ionizace za atmosférického tlaku (APPI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a elektrosprej (ESI). Z běžně používaných detektorů můžeme zmínit kvadrupól, analyzátor doby letu (TOF) a iontovou past, popřípadě jejich vzájemné spojení ve smyslu tandemové hmotnostní spektrometrie. [65, 68, 72]

2.4.3.2 Plynová chromatografie (GC)

Přesná identifikace analytů pomocí GC-MS je velmi využívané spojení pro analýzu HAA. Spojení GC s MS je daleko snazší než u LC-MS, protože plyn vycházející z GC kolony je lépe kompatibilní. [90, 91] S oblibou se využívá tvrdá ionizační technika ionizace elektronem (EI), neboť poskytuje dobře reprodukovatelná fragmentační spektra a je tedy snadná tvorba knihoven spekter a jejich vzájemná porovnávání. Dalším používaným druhem ionizace je chemická ionizace (CI) patřící mezi měkké ionizační techniky. [91, 92] Odpadá tedy nutnost vlastnit a analyzovat standard analytu. Ovšem pro jistou identifikaci je vždy nutnost porovnání chromatografických vlastností (retenčního času, objemu) a spekter analytu a standardu. Ve spojení GC-MS můžeme běžně vidět kvadrupól (Q) jako detektor iontů, nebo tandemové uspořádání ve smyslu trojitých kvadrupólů (TQMS) nebo dvojitých kvadrupólů s analyzátozem doby letu (QqTOF).

Mezi další používané detektory pro stanovení HAA v potravinových matricích patří plameno-ionizační detektor (FID), který spaluje organické sloučeniny v plameni v proudu vodíku a vytváří tak kationty a detekované elektrony. Tento typ detektoru má výrazný rozsah linearit a řádnou citlivost. [93] Dříve velmi populárním detektorem pro analýzu HAA byl NPD, tedy detektor dusíku a fosforu. Jelikož HAA obsahují dusík ve své molekule, nabízí tento

detektor velmi citlivé a selektivní stanovení těchto látek. Jeho mez detekce a selektivita mohou v některých případech předčít i spojení GC-MS. [94, 95]

Oproti kapalinové chromatografii, se v plynové chromatografii s velkou oblibou využívá derivatizace analytů za zisku bohatších hmotnostních spekter, vyšší stability vzniklých derivátů oproti jejich prekurzorech, lepších chromatografických vlastností a vyšší těkavosti. K derivatizaci HAA se používá tři přístupů a těmi jsou: acylace, alkylace a silylace. [64]

Acylací anhydridy kyselin vznikají deriváty HAA se špatnými vlastnostmi pro GC. Nicméně nejlepších výsledků se v této oblasti dosahuje acylací anhydridem heptafluorobutanové kyseliny následované methylací amidického vodíku diazomethanem. [86] Mezi další acylační činidla řadíme např. anhydrid kyseliny octové, trifluorooctové, pentafluoropropionové, pentafluorobenzoyl chlorid či pentafluoropropanol. [96]

Alkylace znamená vnášení alkylového zbytku do látek s aktivním vodíkem. Tento způsob se derivatizace se pro HAA moc nepoužívá. Mezi užívaná činidla se řadí tetrabutylamoniumhydroxid. [97]

Ovšem bezesporu nejpoužívanější derivatizací v GC analýze je silylace. [98] Jedná se o způsob nahrazování aktivních (kyselých) protonů za silylové skupiny rozličných struktur. Nejčastěji využívanou skupinou je trimethylsilyl (TMS). Mezi běžná silylační činidla řadíme BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid), BSA (N,O-bis(trimethylsilyl) acetamid) a HMDS (hexamethyldisilazan) obsahující tuto skupinu. [64, 92]

3 Experimentální Část

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

2,6-dimethylpyrazin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

2-ethyl-3-methylpyrazin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Harman (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Norharman (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Indol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Hexamethyldisilazan (HMDS) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Pyridin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Hexan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Diethylether (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Dichlormethan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Aceton (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Ethyl-acetát (Bc-Chemservis, Rožnov pod Radhoštěm, ČR)

Roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [1 M]

Roztok hydroxidu draselného o koncentraci $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [5 M]

Agilent Technologies 7890A GC System (Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA)

Agilent Technologies 5975C inert XL EI/CI MSD wih Triple-Axis Detector (Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA)

Analytické váhy AB204 (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)

Blokový termostát SBH130 (Stuart, Stone, Staffordshire, Velká Británie)

Centrifuga 5702 (Eppendorf, Hamburk, Německo)

Elmasonic S 40H (Elma Schmidbauer, Singen, Německo)

SPME vlákno StableFlex (2 cm) Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS) s holderem 57348-U (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA), běžné laboratorní sklo, skleněný aparát pro destilační extrakci, chladič, varná baňka, topné hnízdo, automatické pipety, plastové špičky a plastové zkumavky

3.2 Způsoby odběru a přípravy vzorků

Dochucovadla polévek a omáček – Tento typ vzorků byl vybrán z hlediska jejich jednoduché matrice, jedná se totiž o hydrolyzované průmyslové produkty. Při hydrolýze se většina proteinů a jiných balastních látek rozloží na menší části, čímž se usnadní případná extrakce sledovaných látek. Všechny vybrané vzorky, Masox, Hovězí a Zeleninový bujón od firmy Vitana, byly zakoupeny v místním obchodním řetězci. K analýze byly použity celé kostky dochucovadel o různých hmotnostech.

Rezidua po smažení na pánvi – Rostlinné nebo živočišné tuky dosahují při smažení na pánvi teplot až 250 °C. Tyto teploty zapříčiňují pyrolýzu látek, především proteinů a cukrů, obsažených ve smaženém jídle. Proto bylo na slunečnicovém oleji podrobena smažení po dobu 16 minut (8 minut z každé strany) asi 150 g kuřecího masa. Poté byla z pánve odebrána všechna pevná rezidua s trochou oleje.

Tuk a saze z udírny – Při uzení v udírně vznikající kouř obsahující rozličné pyrolytické produkty dřeva ulpívá nejen na masných výrobcích, ale rovněž i na stěnách udírny. Zároveň vyšší teplota masných výrobků v důsledku kontaktu kouře a uzeniny vyvolává tzv. proces vytavování tuků. Vytavený a odkapávající tuk z povrchu masného výrobku může rozpustit část deponovaných pyrolytických produktů. A proto odkapaný tuk a saze z vnitřního povrchu udírny mohou být předmětem analýzy. Vzorky sazí i tuků byly odebrány pomocí kosmetických tampónů bez přidání přípravků. K analýze byly použity přímo tampóny.

Uzené masné výrobky – K analýze byly vybrány 3 druhy výrobků. Uzená vepřová kotleta a uzená slanina z domácí produkce a uzená šunková klobása od soukromého řezníka zakoupená v Olomouci. K analýze byla odkrojena a nadrobno nakrájena vždy část vzorku tak, aby byla reprezentativní pro příčný řez vzorku.

Tekutý kouř – Byl zakoupen tekutý kouř s aroma Hickory se zemí původu v USA. Balení obsahovalo 50 ml kondenzátu.

Káva – Byla zakoupena černá káva Henri excellent mletá v balení o hmotnosti 250 g

3.3 Kapalinová extrakce (L/L extrakce)

Do 100 ml kádinky bylo odváženo dané množství vzorku, ke kterému bylo následně přidáno 20 ml acetonu. Pomocí kovové špachtle byl vzorek co nejlépe homogenizován. Pro lepší extrakci látek byla kádinka se suspenzí podrobena sonifikaci v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut při mírně zvýšené teplotě 35 °C. Po sonifikaci byl kapalný podíl suspenze rozdělen do dvou plastových 15 ml zkumavek, tak aby byly naplněny vždy stejným objemem.

Zkumavky s kapalným podílem byly centrifugovány 10 minut při rychlosti 4400 RPM. Po skončení centrifugace byl z obou zkumavek odpipetován 1 ml supernatantu do čisté plastové zkumavky, kde výsledně byly 2 ml acetonového extraktu zbaveného pevných nečistot. Z identifikačních a kvantifikačních důvodů byly pro každý vzorek připraveny vždy 2 paralelně zpracovávané zkumavky s extrakty. Do jedné zkumavky bylo odpipetováno vždy 10 µl roztoku standardu (STD) a druhá se ponechala bez přídavku. Obě zkumavky (s a bez STD) byly následně podrobeny stejným, dále popsáním úkonům. Všechny používané základní roztoky standardů měly koncentraci 1 mg·ml⁻¹ v methanolu.

Do zkumavky obsahující 2 ml acetonového extraktu byly přidány 2 ml destilované vody a 400 µl 1M kyseliny chlorovodíkové. Obsah byl intenzivně protřepán a promíchán na vortexu. Následně byly připipetovány 2 ml dichlormethanu (DCM). Obsah zkumavky byl protřepán v rukách, homogenizován na vortexu a podroben centrifugaci po dobu 5 minut při 4400 RPM pro lepší oddělení organické a vodně acetonové fáze. Poté byla spodní organická fáze oddělena pomocí pipety a zlikvidována. Tento čistící krok z okyseleného vodně acetonového prostředí mohl být opakován, pokud byl předpokládán vyšší obsah balastních látek, mezi které patří především lipidy. Následně k okyselené vodně acetonové fázi byly přidány 4 ml vody a 1 ml 5 M hydroxidu draselného. Roztok byl intenzivně protřepán a promíchán na vortexu. Potom byl k alkalizovanému roztoku přidán 1 ml DCM a opět homogenizován a centrifugován 5 min při 4400 RPM. Po vyčerení rozhraní mezi fázemi byla spodní organická fáze odebrána do čisté vialky odpařena v mírném proudu dusíku ve vyhřívaném bloku při teplotě 50 °C. Extrakční krok z alkalizovaného prostředí byl zopakován a organické fáze byly postupně spojeny a odpařeny do sucha.

3.4 Derivatizace

Odparek dichlormethanového extraktu byl rozpuštěn v 200 µl pyridinu. Následně bylo přidáno 200 µl hexamethyldisilazanu (HMDS). Vialka byla opatřena víčkem a ponechána v kovovém bloku derivatizaci po dobu 30 min a při teplotě 60 °C. Nakonec bylo do vialek přidáno 100 µl hexanu a takto připravený roztok byl podroben GC/MS analýze.

3.5 SPME analýza

SPME (solid phase microextraction) je jednoduchá metoda vhodná jak ke screeningovým analýzám, tak k semikvantitativním. Její jednoduchost spočívá ve faktu, že v závislosti na způsobu použití vlákna není nutná žádná úprava vzorku. V této práci byla použita pro headspace screening těkavých látek z tekutého kouře, tak že 200 μ l kouře bylo odpipetováno do skleněné vialky o objemu 4 ml opatřené víčkem se septem. Skrz septum bylo do vialky zasunuto SPME vlákno a ponecháno v prostoru nad kapalinou sorpci po dobu 1 hod. Po uplynutí doby bylo SPME vlákno vytaženo a vloženo do injektoru plynového chromatografu.

3.6 Destilační extrakce

Jedná se o zajímavý způsob extrakce těkavých i netěkavých látek, které destilují s vodní parou. Vzorek je vložen do destilační baňky s destilovanou vodou a ponechán varu. Lze extrahovat jak tuhé, polotuhé tak i kapalně vzorky vždy s přidavkem vody. Další výhodou je možnost změny pH vodného roztoku, ze kterého jsou destilovány látky. Tuto možnost nemají všechny extrakční postupy.

Teplota varu zapříčiní digesci uvolnitelných látek ze vzorku a jejich oddestilování společně s vodní parou. Vodní pára díky svému parciálnímu tlaku nad směsí sníží parciální tlaky ostatních látek, a proto ze směsi mohou odtékávat i látky, jejichž teplota varu je nad 100 °C. Páry destilovaných látek stoupají vzhůru aparaturou, až doputují do zpětného chladiče, kde se setkají s parami extrakčního rozpouštědla zahříváného ve zvláštní nádobce. Na stěnách chladiče dojde ke kondenzaci celé parní fáze systému a následné extrakci extrahovatelných látek do organického rozpouštědla. Zkondenzovaná voda i extrakt stékají do společné střední části aparatury, přičemž voda jako kapalina s větší hustotou zaplňuje pravý odtok a ztéká zpět do předlohy, a organické extrakční činidlo o menší hustotě zaplňuje levý odtok a stéká do extrakční nádoby. Existují zařízení i pro obrácené fáze, tedy systémy kde voda je rozpouštědlo s menší hustotou, než je hustota organického rozpouštědla.

Celý systém tedy pracuje tak, že se z předlohy se vzorkem vydestilují všechny sloučeniny destilující za daných podmínek a zakoncentrují se v extrakčním činidle. Po skončení destilace je třeba pracovat jednak s extraktem v extrakční nádobě, tak s roztokem extrakčního rozpouštědla ve střední části, který obsahuje rovněž extrahovatelné látky.

K analýzám bylo vždy použito 100 ml vodného roztoku pro různá pH. Destilace/extrakce z kyselého prostředí probíhaly v 0,1 M HCl o pH 1,1 (připraveného z 90 ml

destilované vody a 10 ml 1 M HCl). Neutrální prostředí bylo zajištěno použitím 100 destilované vody a zásadité přidáním 4 ml 5 M KOH ke kyselému 0,1 M roztoku HCL, čímž vznikl přibližně 0,1 M KOH. K analyzovaným vzorkům uzenin byly rovněž přidány 2 g NaCl.

Všechny extrakce probíhaly po dobu 90 minut. Po uplynutí této doby byly extrakty z extrakční zkušavky a ze střední části aparatury sjednoceny do skleněné vialky a odpařeny na konečný objem 1 ml. Takto získaný roztok byl podroben GC/MS analýze. Následně byly roztoky derivatizovány postupem z kapitoly 3.4 a znovu analyzovány.



Obrázek 4 - Fotografie aparatury použité pro destilační extrakci

3.7 Parametry GC – MS analýzy

V Tabulce FG jsou uvedeny základní chromatografické podmínky analýzy plynovým chromatografem Agilent Technologies 7890A GC Systém spojeného s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 5975C.

Všechny roztoky byly skenovány v módu TIC (celkový iontový proud) s detekcí m/z od 29 do 650 m/z , a zároveň i módu SIM (monitorování selektivních iontů). Pro metodu SIM byly po celou dobu analýzy sbírány ionty o m/z 108, 117, 122, 168 a 182 vycházejících z analýzy standardů a jejich hmotnostních spekter uvedených v přílohách na stranách 53 – 56.

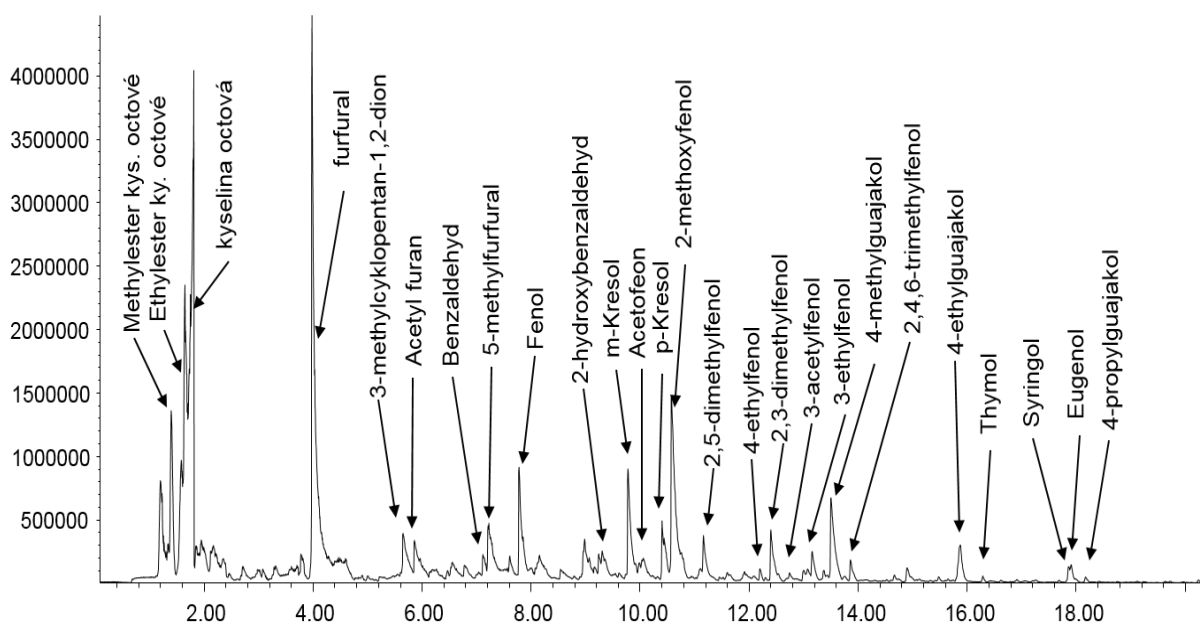
Tabulka 3 - Parametry chromatografické analýzy

Teplotní program:		50 °C po 2 min, gradient 10 °C/min do 300 °C po 15 min	
Doba analýzy:	42 minut	Dávkování s tlakovým pulsem:	20 psi po 0,2 min
Objem nástřiku:	1 μ l	Zpoždění solventu pro MS:	4,20 min
Teplota nástřiku:	280 °C	Průtok nosného plynu (He):	0,9 ml/min
Kolona:		Agilent HP-5MS s rozměry – 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m	

4 Výsledky a diskuze

4.1 SPME (Solid Phase Microextraction)

Analýza pomocí SPME vlákna je velmi jednoduchá a univerzální. Vhodná je např. pro rychlý screening těkavých látek ze všech typů vzorků, jak pevných, tak kapalných, díky vzorkování headspace metodou. Tento typ analýzy by se mohl zařadit mezi tzv. provozní metody, které jsou pouze orientační a podávají informaci např. o přítomnosti nebo nepřítomnosti sledovaného analytu, který je pro nás něčím důležitý.



Obrázek 5 – Chromatogram SPME extrakce tekutého kouře, TIC

Analýzou tekutého kouře pomocí SPME bylo identifikováno celkem 26 chemických individuů. Bezvýhradně se jedná o produkty pyrolýzy dřeva vzniklých za kontrolovaných podmínek. Nicméně tekutý kouř je ochuzen o jednu skupinu pyrolytických produktů a to o polyaromatické uhlovodíky (PAU), které jsou, jak již bylo zmíněno v teoretické části, vysoce karcinogenní a toxické. Technologický proces frakcionace (čištění) ovšem nijak nenarušuje rovnováhu ostatních látek podílejících se na olfaktorickém a chuťovém vjemu a aromatu produktu ošetřeného tekutým kouřem. To může potvrdit výše uvedený chromatogram, ve kterém se nachází většina důležitých složek kouře. Pro barvu a konzervaci je důležitá kyselina octová a její deriváty, deriváty furanu a furfuralu dodávají dobré aroma, samotný fenol a jeho alkyl deriváty přispívají spíše k negativním vjemům, zvláště ve vysokých koncentracích.

V chromatogramu lze nalézt i čtveřici sloučenin, a jejich deriváty, bez kterých si chuť a vůni uzeného nelze představit – thymol, syringol, eugenol a guajakol.

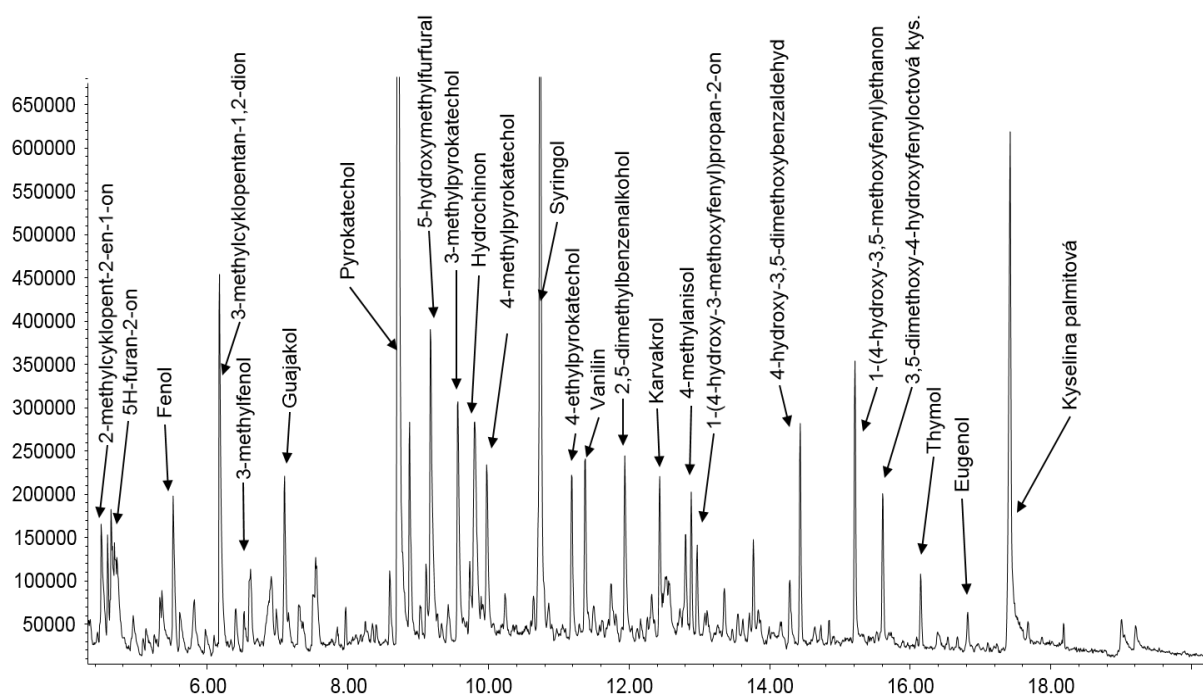
Tekutý kouř i po odstranění polyaromátů (PAU) obsahuje řadu toxických a zdraví škodlivých látek, jako třeba deriváty fenolu, furanu a furfuralu, ale ty se zde vyskytují v tak malých koncentracích, že by bylo nutné spořádat opravdu velké množství, aby se negativní účinky těchto látek projevíly.

Všechny výše uvedené látky ovlivňují způsobem sobě vlastním, ať už pozitivním nebo negativním, celkový vjem z uzeného masa a jeho prospěšnost pro lidský organismus, a proto by měly být zájmem analytického zkoumání např. pro účely odhalování pančování potravin nebo kontroly nezávadnosti potravin.

4.2 Extrakce tekutého kouře ethylacetátem

Chceme-li analyzovat méně těkavé nebo netěkavé látky ve vzorku, musí se přistoupit k jiné extrakční metodě než je headspace SPME. K těmto účelům byl vyzkoušen výše popsáný postup z kapitoly 3.3 a 3.4. Analyzovaný tekutý kouř obsahoval větší množství emulgátoru, který po přidání značného objemu organické fáze v kombinaci s alkalizací roztoku způsobil gelatizaci celého systému fází. Po takové přeměně nešlo se vzorkem dále nic udělat, proto bylo od tohoto postupu upuštěno.

Namísto toho byla použita jednoduchá extrakce ethylacetátem, činidlem běžně využívaným pro své univerzální extrakční vlastnosti. Po přidavku organického rozpouštědla nedošlo k významným změnám fází vzorku, a tak organická fáze mohla být analyzována. Chromatogram z této analýzy se nachází na další straně.



Obrázek 6 - Chromatogram analýzy tekutého kouře po extrakci ethyl-acetátem, TIC

Po analýze ethyl-acetátového extraktu bylo identifikováno (na základě jejich hmotnostních spekter) 25 chemických sloučenin. Z logiky a podstaty věci lze nalézt stejné pyrolytické produkty jako v předchozím chromatogramu SPME analýzy – fenol a jeho methyl/ethyl deriváty a další sloučeniny. Nově byly vyextrahovány polárnější, hydrofilnější a tedy méně těkavé sloučeniny typu benzendiolů (pyrokatechol a hydrochin). Tyto látky jsou z hlediska vjemu uzenin méně žádoucí, neboť mají trpkou chuť a ve větším množství jsou zdraví škodlivé a toxické. Ovšem v malých množstvích, jako ostatní fenoly v uzeninách, působí antioxidačním mechanismem. Z dalších pozorovaných látek lze zmínit např. vanilin a karvakrol, látky podílející se velkou měrou na nezaměnitelné chuti a v případě karvakrolu antimikrobiální aktivitě.

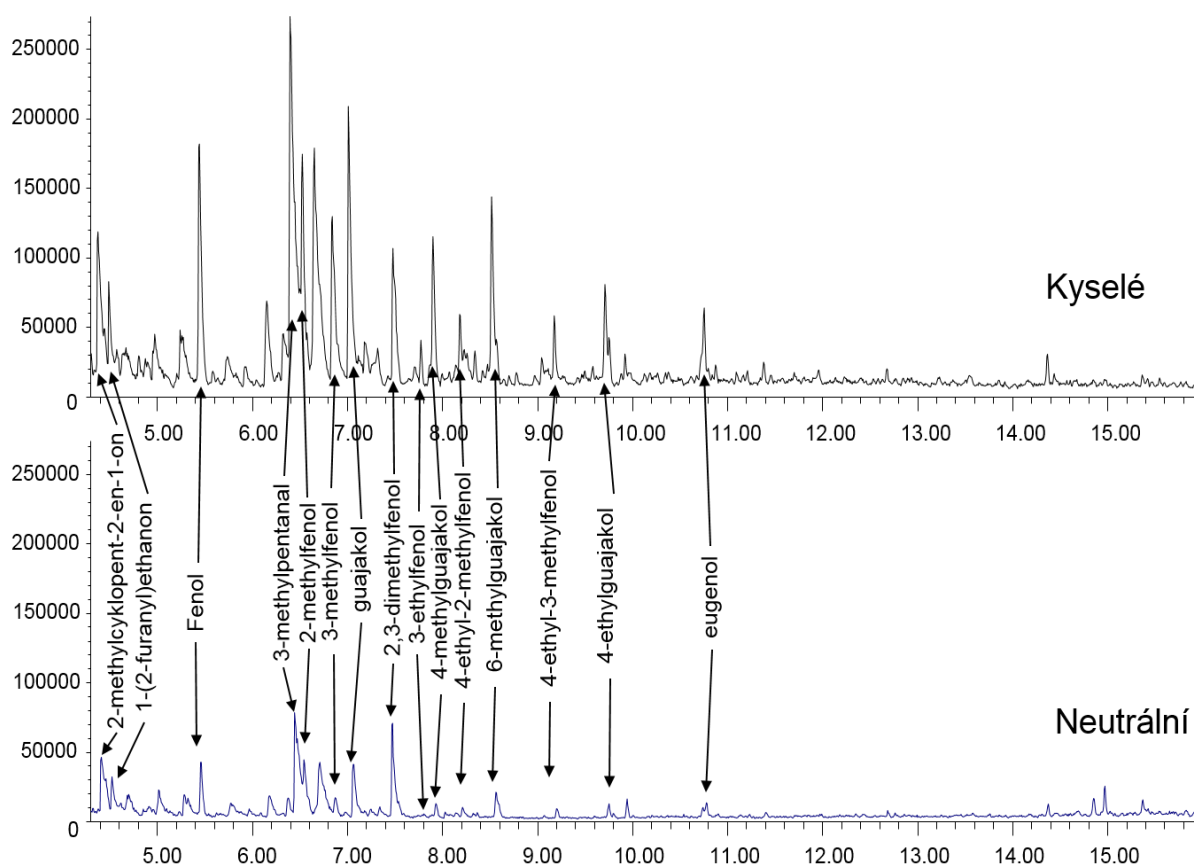
Tato analýza je dalším příkladem screeningových metod. Trendem současného analytického snažení je pátrání po jednotlivých sloučeninách v komplexních maticích a snižování limitů detekce. Bude-li se ovšem zužovat úhel pohledu jen na látky našeho nynějšího zájmu, lehce mohou být přehlédnuty jiné sloučeniny, které svými vlastnostmi rovněž zaujmou nebo které jsou nebezpečné ve stejné či větší míře.

4.3 Destilační extrakce (SDE)

Jedná se o velmi zajímavou techniku, neboť umožňuje kontinuální extrakci produktů vznikajících či uvolňujících se při vaření různých potravin. Tímto způsobem lze studovat systémy, se kterými se běžně setkáváme doma. Jako je např. vaření kávy nebo čaje, příprava vývaru z masa a kostí, dušení nejrůznějších pokrmů atd.

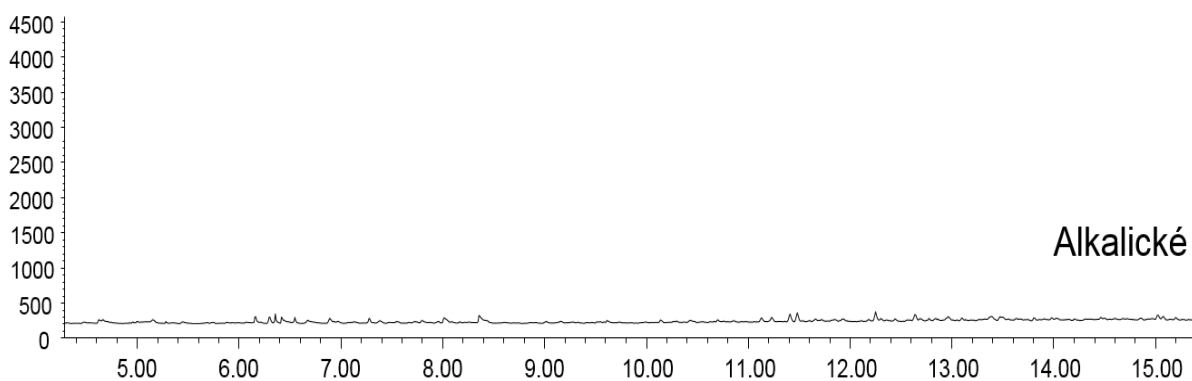
4.3.1 Destilace tekutého kouře

Jedním ze vzorků extrahovaných touto technikou se stal tekutý kouř. Byl extrahován při různých pH k zjištění dílčího zastoupení kyselých a neutrálních sloučenin vůči bazickým. Změnu pH neumožňují veškeré extrakční techniky ať už z principu použití pouze organických rozpouštědel, tak z nutnosti dodržování optimálního pH pro stabilitu pevných fází některých SPE sorbentů. Proto je metoda destilační extrakce velmi univerzální technika k analýze všech látek destilujících s vodní parou, k jejichž frakcionaci lze využít nastavení vhodného pH.



Obrázek 7 - Porovnání analýz tekutého kouře při různých pH, SDE, TIC

Z chromatogramu na obrázku 7 z předchozí strany lze vyčíst, že po okyselení vzorku došlo k potlačení disociaci látek kyselé povahy a tím pádem ke zvýšení jejich těkavosti a extrahovatelnosti. Dále byly identifikovány stejné sloučeniny jako v případě analýzy a extrakce tekutého kouře pomocí ethyl-acetátu a SPME a to jmenovitě jsou alkyl deriváty fenolu, guajakolu a eugenol.



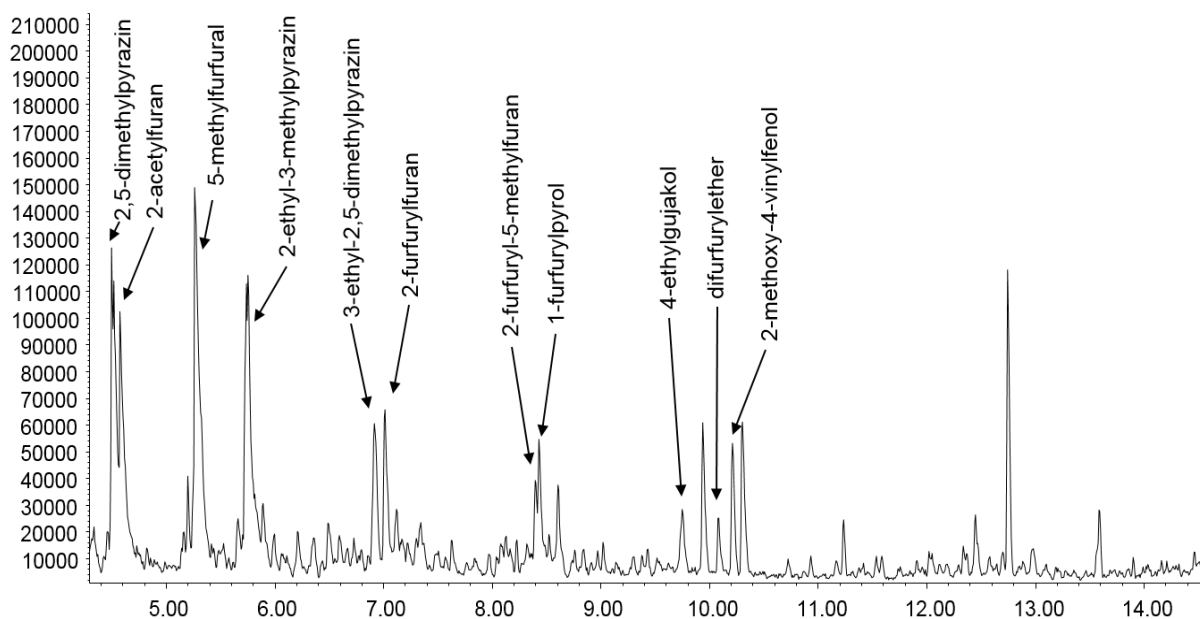
Obrázek 8 - Analýza tekutého kouře z alkalického pH, SDE, TIC

Po zalkalizování stejného roztoku, tedy roztoku, ze kterého byly vydestilovány neutrální a kyselé látky, by se měly uvolnit a extrahovat bazické látky. Ovšem po realizaci tohoto experimentu se na výsledném chromatogramu neobjevily žádné látky. Tento fakt je dokládán obrázkem č. 8. Tekutý kouř tedy neobsahuje žádné bazické látky na významných koncentračních hladinách podobných kyselým látkám.

4.3.2 Destilace kávy

Dalším vzorkem podrobeným destilační extrakci byla káva. Při pražení kávových bobů vznikají pyrolytické produkty, které dávají této pochutině její nezaměnitelnou chuť. Tyto látky se následně uvolňují při přípravě nápoje zalitím vařící vodou. Proto tato metoda extrakce je vhodná pro screening látek, které vnímáme jako chuť, vůni a aroma kávy.

V analýze extraktu kávy získaného po destilační extrakci bylo na základě hmotnostních spektrů identifikováno 11 chemických individuí. Všechny se opět řadí mezi pyrolytické produkty vznikající během pražení kávových bobů, a tedy jsou zodpovědné za smyslové vjemy spojené s kávou a jsou extrahovatelné použitou metodou. Jsou jimi převážně deriváty pyrazinu, furanu a furfuralu. Nachází se zde i dva deriváty guajakolu, což jsou stavební složky ligninu (rostlinného polymeru), dodávající další charakteristickou chuť.



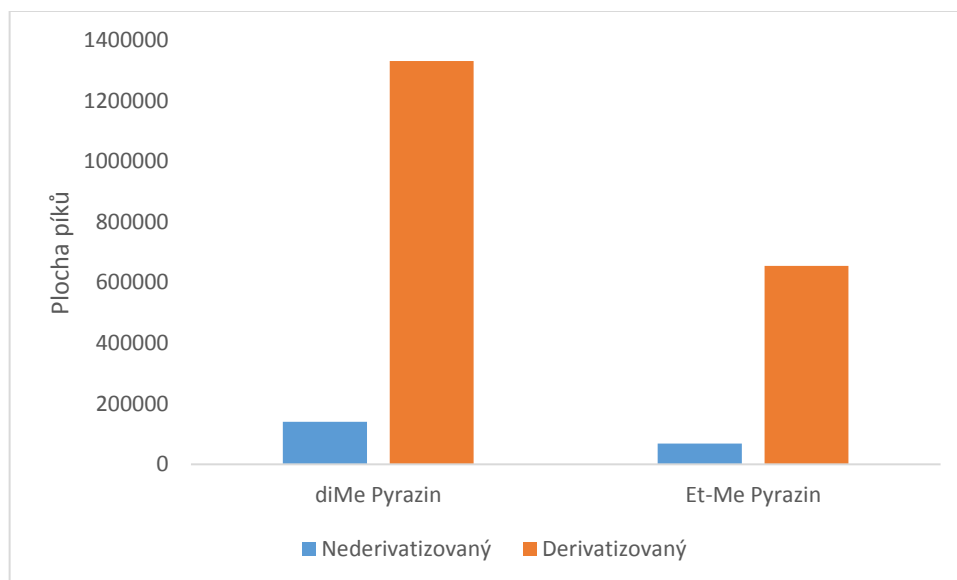
Obrázek 9 - Chromatogram analýzy kávy, SDE, TIC

Pro úplnost byla provedena extrakce standardů pyrazinů, indolu a harmanu s norharmanem metodou destilační extrakce a na základě této analýzy byly kvantifikovány oba pyraziny a indol. Výsledky jsou uvedeny v souhrnné tabulce 4 na straně 53.

4.4 Vliv derivatizace

Na extraktech získaných metodou destilační extrakce byl studován vliv derivatizace hexamethyldisilazánem na velikost a rozlišení píků analyzovaných látek. V tomto případě ovšem nejde o derivatizaci analytů, nýbrž o derivatizaci balastních látek rušících výslednou analýzu. Představa je taková, že derivatizované látky změní své fyzikálně chemické vlastnosti, především se sníží polarita a zvýší těkavosti, což má za následek rovněž změnu retenčního času. Posun balastních látek chromatogramem může a nemusí pozitivně ovlivnit odezvu analytů.

Z následujícího grafu ovšem jasně vyplývá, že plocha píků analytů se po derivatizaci významně zvětšila, což potvrzuje fakt, že derivatizace v tomto případě pozitivně ovlivňuje odezvu analytů a je tedy příznivé ji využívat.



Graf 1 - Porovnání vlivu derivatizace na vybraných analytech

4.5 Kapalinová extrakce

Další náplní této práce byla analýza dusíkatých heterocyklických látek, mezi které spadají i heterocyklické aromatické aminy, jež jsou karcinogenní a vznikají taktéž při pyrolytických procesech spojených s masem, podobně jako polyaromatické uhlovodíky. Dusíkaté látky jsou výzvou pro plynovou chromatografii kvůli jejich vysoké sorpční schopnosti vycházející z jejich bazicity. Rovněž extrakce těchto sloučenin bývá spojována s řadou problémů.

Z těchto důvodů byl použit extrakční postup, který byl dříve odzkoušen na pražené kávě [99], kde poskytoval požadované výsledky. S mírnými modifikacemi byl postup přejat a využit k analýzám reálných vzorků v této práci.

Mezi reálnými vzorky se nacházely nejen uzené potraviny, ale i jiné produkty, které s uzeninami na první pohled takřka nesouvisí. Ovšem společným jmenovatelem všech vzorků je pyrolytický proces.

Bujóny a jiná dochucovadla omáček a polévek se vyrábí dlouhým vařením masa s dalšími ingrediencemi a následnými fermentačními a konzervačními procesy. Při smažení masa na rostlinném oleji se teplota oleje pohybuje kolem 250 °C v kombinaci s bílkovinami v mase

a volnými cukry se jedná o téměř modelový systém pro vznik heterocyklických aminů. Proto byly k analýze vybrány rovněž rezidua po smažení. Během uzení v udrně vzniklý kouř neulpívá jen na uzených produktech nýbrž i na stěnách udrny a teplota kouře způsobuje vytavování tuků z masných výrobků, které při odkapávání z uzenin mohou v sobě rozpustit některé deponované pyrolytické produkty. Proto i tuk a saze z udrny byly vybrány jako reálné vzorky k analýze. Rovněž kávová zrna při pražení dosahují teplot od 200 do 250 °C, tedy typických podmínek pro pyrolýzu. Tento typ vzorku byl zvolen i z toho důvodu, že v něm byla v minulosti nalezena detekovatelná množství heterocyklických aminů zvoleným postupem extrakce. Jednalo se tedy o kontrolní vzorek.

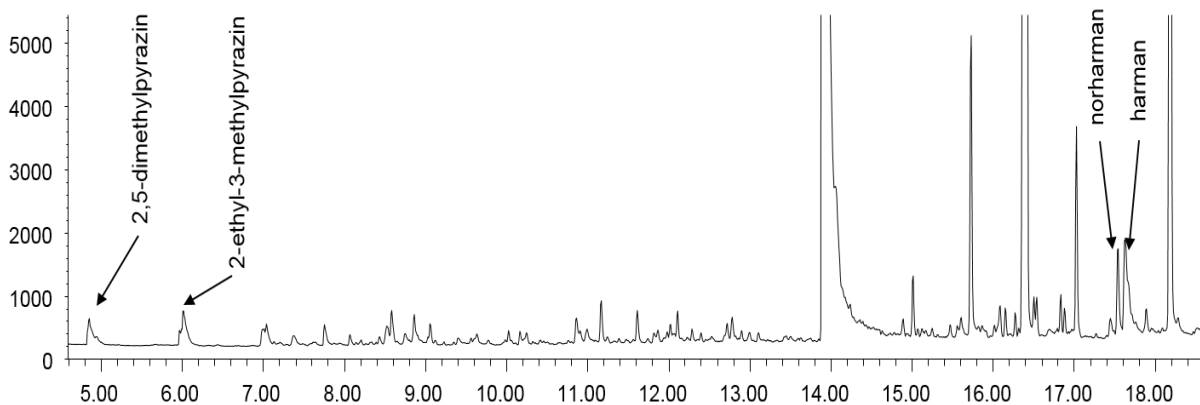
V následující tabulce jsou uvedeny všechny výsledky analýz reálných vzorků metodou kapalinové extrakce. Ke kvantifikaci hodnot koncentrací bylo použito metody přidavku standardu.

Je vidno, že v téměř žádném vzorku nebyla nalezena detekovatelná množství sledovaných látek. Výjimkou je vzorek kávy a uzené šunkové klobásky, ve které byla stanovena nízká koncentrace norharmanu. Nabízí se otázka: Je použitý postup extrakce vhodný pro předložené vzorky a sledované analyty?

Tabulka 4 - Výsledky L/L extrakce vzorků

Vzorek	Navážka [g]	Sledovaný analyt [ng/g]				
		diMe Pyrazin	Et-Me Pyrazin	Indol	Norharman	Harman
Masox	9,8	-	-	-	-	-
Hovězí bujón	11,7	-	-	-	-	-
Zeleninový bujón	10,5	-	-	-	-	-
Rezidua	5,62	-	-	-	-	-
Tuk a saze	3,35	-	-	-	-	-
Káva	4,1	315	321	101	1365	732
Uz. slanina	10,0	-	-	-	-	-
Uz. klobása	10,0	-	-	-	126	-
Uz. kotleta	10,0	-	-	-	-	-

Matrice kávových bobů je srovnatelně komplikovaná s matricí masa. Obsahuje totiž proteiny, vyšší mastné kyseliny a jiné lipidy a řadu nízkomolekulárních látek stejně jako maso, přičemž na rozdíl od masa obsahuje i rostlinné polysacharidy, které mohou být rovněž interferenty. Zároveň se podařilo identifikovat a kvantifikovat norharman v uzené šunkové klobáse, což dokládá jasný důkaz, že předložený postup je vhodný ke kvantifikaci zmíněných analytů v mase a masných výrobcích.



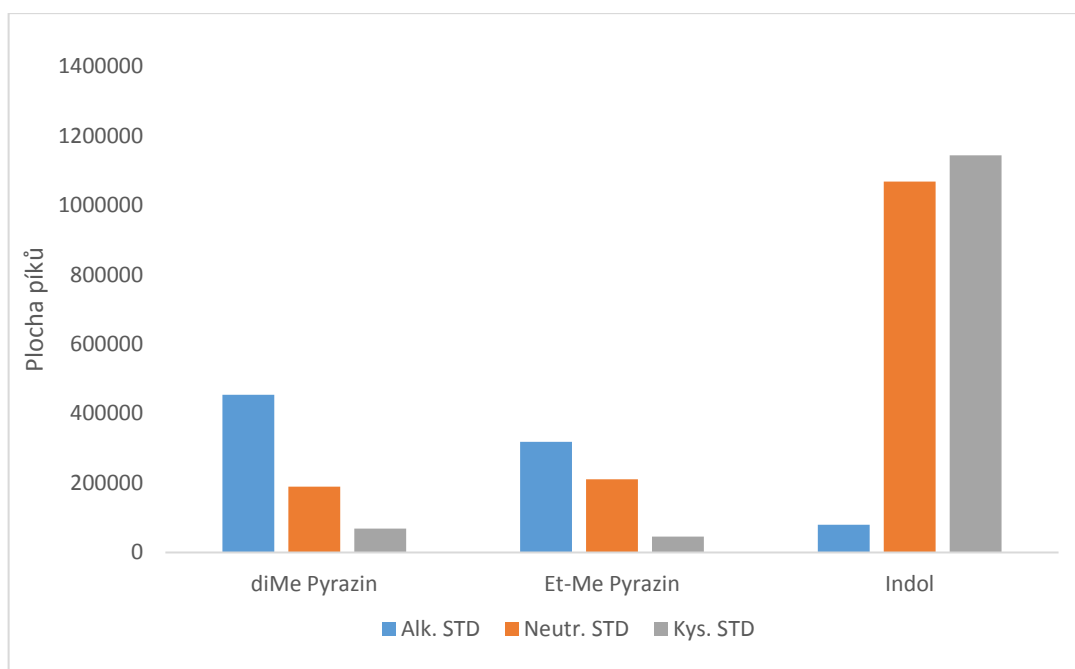
Obrázek 10 - Chromatogram analýzy kávy, L/L extrakce, SIM

Jelikož v průběhu procesu extrakce se mění pH vodně acetonové fáze, vyvstala rovněž otázka, zdali při odstraňování balastních látek po okyselení, nedochází k významným ztrátám analytů. Úvaha je taková, že bazické látky se protonizují v kyselém prostředí a neměly by tím pádem přecházet z vodně acetonové fáze do organické, v tomto případě dichlormethanové. K potvrzení nebo vyvrácení této úvahy byla provedena řada experimentů se samotnými standardy.

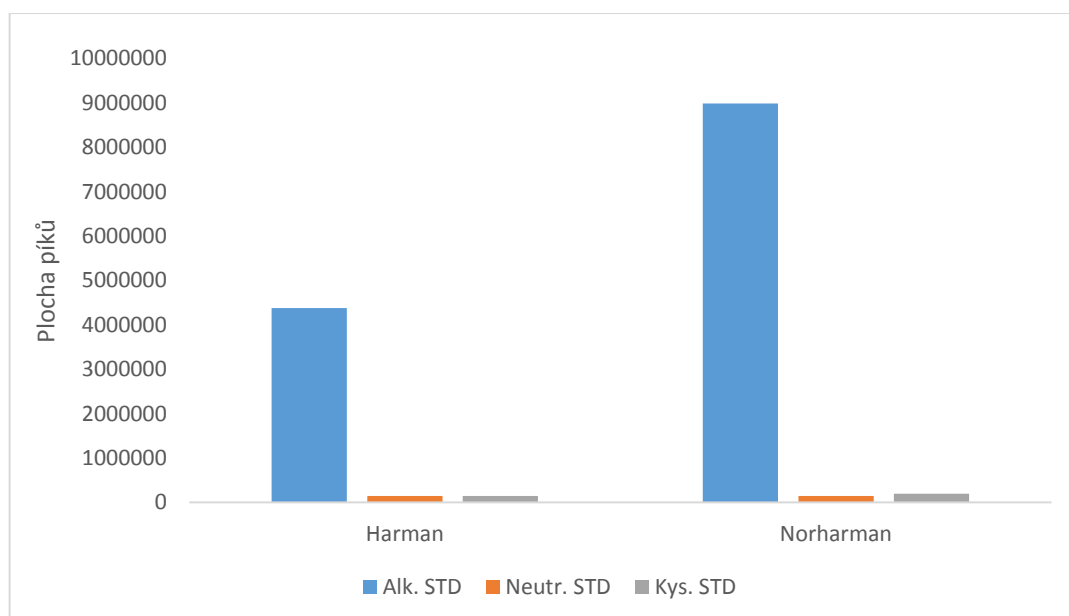
Grafy č. 2 a 3 s výsledky analýz standardů se nachází na následující straně. Přičemž extrakce z kyselého a zásaditého pH probíhaly podobně jako v postupu pro reálné vzorky se stejnými přísadkami kyselin a alkálií z vodně acetonové fáze do dichlormethanu. Neutrální extrakce probíhala z vodně acetonového prostředí přímo bez úpravy pH.

U obou pyrazinů a harmanu s norharmanem nedochází při extrakci z kyselého prostředí k signifikantním ztrátám analytu. Po odstranění kyselého balastu má tak následná extrakce pro pyraziny výtěžnost 85 % a pro heterocyklické aminy 98%.

Výjimku ovšem tvoří indol, který se lépe extrahuje z kyselého a neutrálního prostředí. Tento fakt je vysvětlen snahou volného elektronového páru na dusíku zapojit se do konjugace s π elektrony dvojných vazeb za vzniku stabilního aromatického systému podle známého vztahu $4n + 2$, vyjadřujícího počet π elektronů nutných pro tvorbu aromatického systému. Proto indol není bazický a protonizuje se až při velmi nízkých pH. Z toho vyplývá, že pro analýzu indolu v reálných vzorcích je nutné využít jiného extrakčního postupu. Strukturní vzorec indolu je uveden na straně 55 včetně jeho hmotnostního spektra.

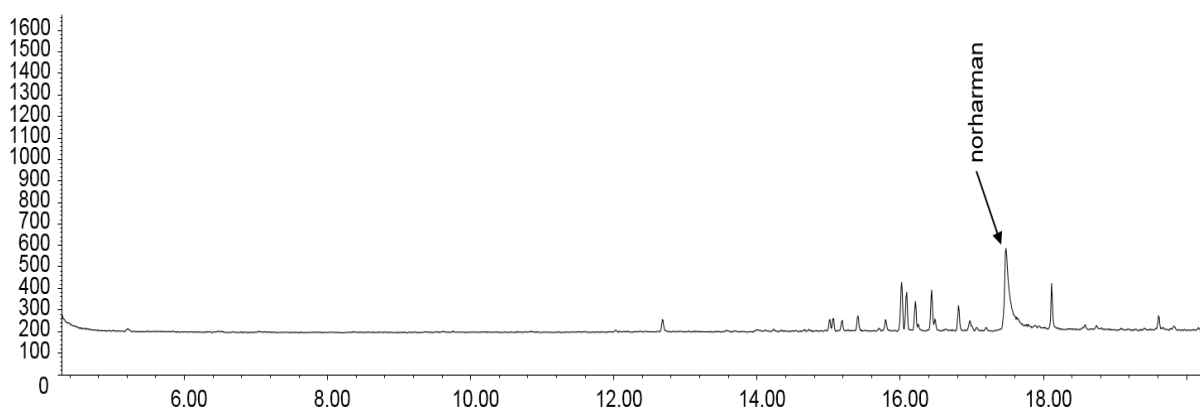


Graf 2 - Porovnání extrakce standardů z různých pH



Graf 3 - Porovnání extrakce standardů z různých pH

Kromě mleté kávy, jež byla kontrolním vzorkem, se nízká koncentrace jednoho z heterocyklických aminů našla ve vzorku uzené šunkové klobásy. Její hodnota činila 126 ng/g, což je desetkrát méně než u vzorku mleté kávy. Nutno podotknout, že běžná navážka pro přípravu kávy se pohybuje okolo 5 – 7 g na šálek a porce klobásy váží zhruba 150 g. Tedy přijatá dávka heterocyklických aminů je tedy srovnatelná, pokud by došlo k 100 % extrakci do vodného prostředí, ale není doajista signifikantní ke zvýšení rizika propuknutí nádorového bujení při jednorázové ani střídavě se opakující konzumaci těchto potravin.



Obrázek 11 - Chromatogram analýzy uzené šunkové klobásy, L/L extrakce, SIM

5 Závěr

V této práci jsou představeny méně běžné screeningové metody určené pro analýzu těkavých látek z více či méně složitých matric. Jsou jimi mikroextrakce tuhou fází (SPME) a destilační extrakce (SDE). Vložením SPME vlákna do headspace prostoru vzorku uzavřeného ve skleněné vialce lze velmi jednoduše dosáhnout extrakce těkavých látek. Tímto způsobem bylo z 200 μl tekutého kouře spolehlivě identifikováno 26 sloučenin patřících mezi hlavní složky určující vůni a aroma uzených potravin. Metoda SDE pracuje na principu extrakce látek destilujících s vodní parou do organického rozpouštědla. Velkou výhodou tohoto postupu je možnost použití tuhých, polotuhých i tekutých vzorků za současné změny pH díky vodnému prostředí. Po extrakci tekutého kouře z postupně neutrálního, okyseleného a alkalického prostředí bylo identifikováno celkem 15 sloučenin převážně neutrálního nebo kyselého charakteru, které se podílejí na požadovaném vjemu uzených potravin. Po přímé extrakci tekutého kouře ethyl-acetátem bylo ztotožněno celkem 25 látek, z čehož 7 se nevyskytovalo v žádné z předchozích analýz. Z kávy bylo metodou SDE vyextrahováno a identifikováno 11 látek. Všechny identifikované látky jsou pyrolytické produkty vznikající při pyrolýze dřeva a pražení kávových bobů.

Dále se experimentální část práce zaměřila na stanovení heterocyklických aromatických aminů (HAA) a jiných heterocyklických látek obsahující dusík. Konkrétněji kvantifikovány byly 2,6-dimethylpyrazin, 2-ethyl-3-methylpyrazin, indol, harman a norharman. K extrakci sledovaných analytů byl použit již dříve popsáný postup s několika modifikacemi. Proces extrakce se děje z vodně-acetonového prostředí do dichlormethanu za změny pH z kyselého do alkalického oblasti potřebné pro oddělení balastních látek a následovného zvýšení výtěžků. Reálnými vzorky byly bujóny, masox, rezidua po smažení kuřecího masa na pánvi, tuk a saze z udrny, uzená slanina, uzená kotleta, uzená šunková klobása a káva. Káva byla zvolena jako kontrolní vzorek proto, že uvedený postup extrakce byl navrhnout a odzkoušen na této matrici.

Ve většině zmíněných reálných vzorků nebyly nalezeny žádné koncentrace sledovaných analytů. Výjimku tvořily káva a uzená šunková klobása. V extraktu kávy byly nalezeny koncentrace odpovídající 1365 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ norharmanu a 735 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ harmanu. Množství ostatních analytů se pohybovaly mezi 100 - 330 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ kávy. A v uzené šunkové klobásě bylo stanoveno množství norharmanu jako 126 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Koncentrace nalezených látek není nikterak zdraví či život ohrožující při střídavě se opakující konzumaci těchto potravin.

Nepřítomnost HAA ve vybraných vzorcích je jistě pozitivní výsledek, poukazující na relativní neškodnost těchto produktů a způsobů přípravy potravin. Relativní proto, že nesmíme

zapomínat na to, že HAA nejsou jedinými toxickými a pro zdraví škodlivými látkami obsaženými v masných potravinách. Navíc stanovováním HAA v uzených potravinách se do dnešní doby věnovalo pouze malé množství vědeckých prací.

A proto je třeba pokračovat ve snaze identifikovat a popřípadě stanovovat HAA v dalších uzených produktech a zkoumat různé postupy uzení. Má větší vliv na případnou tvorbu HAA uzení teplým nebo studeným kouřem? Je bezpečnější použití kouře vytvořeného pomocí generátoru tření oproti tekutému kouři?

Tekutý kouř je moderní způsob uzení, který je používán na přípravu stále se zvětšujícího počtu produktů, a tak by tu měla být snaha o plné porozumění jeho složení a mechanismu jeho účinků na potraviny.

6 Použité zdroje

1. Feng, Y.H., et al., *The emission of gaseous nitrogen compounds during pyrolysis of meat and bone meal*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2018. **130**: p. 314-319.
2. Rahman, U.U., et al., *Production of heterocyclic aromatic amines in meat: Chemistry, health risks and inhibition. A review*. Lwt-Food Science and Technology, 2014. **59**(1): p. 229-233.
3. Lu, F., G.K. Kuhnle, and Q.F. Cheng, *Heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market*. Food Control, 2017. **73**: p. 306-315.
4. Agriculture and consumer protection department. *Animal production and health. Meat & meat products*. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). 2019 [cited 2019 30. 3.]; Available from: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.html>.
5. Agriculture and consumer protection department. *FAO corporate document repository. "World agriculture: Towards 2015/2030. An FAO perspective..."* Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). 2019 [cited 2019 30. 3.]; Available from: <http://www.fao.org/3/y4252e/y4252e05b.htm>.
6. Pereira, P. and A. Vicente, *Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet*. Meat Science, 2013. **93**(3): p. 586-592.
7. Biesalski, H.K., *Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?* Meat Science, 2005. **70**(3): p. 509-524.
8. *GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012 [cited 2019 30. 3.]; Available from: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
9. McAfee, A.J., et al., *Red meat consumption: An overview of the risks and benefits*. Meat Science, 2010. **84**(1): p. 1-13.
10. Olmedilla-Alonso, B., F. Jimenez-Colmenero, and F.J. Sanchez-Muniz, *Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods*. Meat Science, 2013. **95**(4): p. 919-930.
11. Ledesma, E., M. Rendueles, and M. Diaz, *Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention*. Food Control, 2016. **60**: p. 64-87.
12. *European Union commission regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1831/2003 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs*. 2011 [cited 2019 31. 3.]; Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2011:215:TOC>.
13. *Codex alimentarius commission (CAC). Code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes*. 2009 [cited 2019 31. 3.]; Available from: www.codexalimentarius.org/download/standards/11257/CXP_068e.pdf.
14. Toldrá, F., *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2008: Wiley.
15. Hesseltine, C.W. and H.L. Wang, *Traditional fermented foods*. Biotechnology and Bioengineering, 1967. **9**(3): p. 275-288.

16. Simko, P., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002. **770**(1-2): p. 3-18.
17. Simko, P., *Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings*. Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(7): p. 637-647.
18. Möhler, K., *Das Räuchern*. 1978: Verlag der Rhein Hess. Druckwerkstätte.
19. Leroy, F., et al., *Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook*. Trends in Food Science & Technology, 2013. **31**(2): p. 130-137.
20. *Guide for developing and using the FAO-thiaroye processing technique (FTT-Thiaroye)*. National Training Centre for Fish and Aquaculture Technicians Thiaroye (Thiaroye)-Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). 2015 [cited 2019 1. 4.]; Available from: <http://www.fao.org/3/a-i4174e.pdf>.
21. Lorenzo, J.M., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: "Chorizo gallego" and "Chorizo de cebolla"*. Meat Science, 2011. **89**(1): p. 105-109.
22. Vaz-Velho, M., *SMOKED FOODS | Production*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: Oxford. p. 5302-5309.
23. Pöhlmann, M., et al., *Contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in Frankfurter-type sausages depending on smoking conditions using glow smoke*. Meat Science, 2012. **90**(1): p. 176-184.
24. Zhou, G.H., X.L. Xu, and Y. Liu, *Preservation technologies for fresh meat - A review*. Meat Science, 2010. **86**(1): p. 119-128.
25. Devine, C. and M. Dikeman, *Encyclopedia of Meat Sciences*. 2014: Elsevier Science.
26. Toledo, R.T., *Wood smoke components and functional properties*. International Smoked Seafood Conference Proceedings, ed. D.E. Kramer and L. Brown. Vol. 2008. 2008, Fairbanks: Alaska Sea Grant Coll Program. 55-61.
27. Ahmad, J.I., *SMOKED FOODS | Applications of Smoking*. 2003. p. 5309-5316.
28. Woods, L., *SMOKED FOODS | Principles*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: Oxford. p. 5296-5301.
29. Rasmussen, H.R., & Rasmussen, H. J. *Treating of food products with smoke*. United States Patent and Trademark Office. 1961 [cited 2019 2. 4.]; Available from: <https://bit.ly/2IclMyp>.
30. Pöhlmann, M., et al., *Influence of different smoke generation methods on the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in Frankfurter-type sausages*. Food Control, 2013. **34**(2): p. 347-355.
31. Varlet, V., et al., *Organoleptic characterization and PAH content of salmon (Salmo salar) fillets smoked according to four industrial smoking techniques*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007. **87**(5): p. 847-854.
32. Pöhlmann, M., et al., *PAH contents in hot smoked meat products Influence of different smoke generation methods on the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances*. Fleischwirtschaft, 2013. **93**(6): p. 110-116.
33. Lingbeck, J.M., et al., *Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation*. Meat Science, 2014. **97**(2): p. 197-206.

34. Ramakrishnan, S. and P.W. Moeller, *Liquid smoke: Product of hardwood pyrolysis*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2002. **223**: p. U581-U581.
35. Pinilla, E.A., J.M. Diaz, and J. Coca, *MASS-TRANSFER AND AXIAL-DISPERSION IN A SPRAY TOWER FOR GAS-LIQUID CONTACTING*. Canadian Journal of Chemical Engineering, 1984. **62**(5): p. 617-632.
36. Rahman, M.S., *Handbook of Food Preservation, Second Edition*. 2007: CRC Press.
37. Pandey, A., et al., *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*. 2016: Elsevier Science.
38. Skog, K.I., M.A.E. Johansson, and M.I. Jägerstad, *Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake*. Food and Chemical Toxicology, 1998. **36**(9): p. 879-896.
39. Augustsson, K., et al., *A population-based dietary inventory of cooked meat and assessment of the daily intake of food mutagens*. Food Additives and Contaminants, 1999. **16**(5): p. 215-225.
40. Norat, T., et al., *Meat consumption and colorectal cancer risk: Dose-response meta-analysis of epidemiological studies*. International Journal of Cancer, 2002. **98**(2): p. 241-256.
41. Sugimura, T., *Overview of carcinogenic heterocyclic amines*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1997. **376**(1): p. 211-219.
42. Cross, A.J. and R. Sinha, *Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2004. **44**(1): p. 44-55.
43. Sugimura, T., et al., *Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish*. Cancer Science, 2004. **95**(4): p. 290-299.
44. Awney, H., *The effect of green tea and olive oil on the mutagenic activity of heterocyclic amines extracted from common food consumed in Saudi Arabia*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2011. **62**(3): p. 295-302.
45. Toribio, F., et al., *Ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food*. Journal of Chromatography A, 2002. **948**(1): p. 267-281.
46. Jägerstad, M., et al., *Creatin(in)e and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds: Effects of various amino acids*. Food Chemistry, 1983. **12**(4): p. 255-264.
47. Yang, D.D., et al., *Effects of smoking or baking procedures during sausage processing on the formation of heterocyclic amines measured using UPLC-MS/MS*. Food Chemistry, 2019. **276**: p. 195-201.
48. Murkovic, M., *Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems*. Journal of Chromatography B, 2004. **802**(1): p. 3-10.
49. Totsuka, Y., et al., *Quantification of the co-mutagenic β -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods*. Cancer Letters, 1999. **143**(2): p. 139-143.
50. Pfau, W. and K. Skog, *Exposure to beta-carbolines norharman and harman*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004. **802**(1): p. 115-126.
51. Snook, M.E. and O.T. Chortyk, *Capillary gas chromatography of carbolines: Application to cigarette smoke*. Journal of Chromatography A, 1982. **245**(3): p. 331-338.
52. Alaejos, M.S. and A.M. Afonso, *Factors That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011. **10**(2): p. 52-108.

53. Hada, N., et al., *Structures of mutagens produced by the co-mutagen norharman with o- and m-toluidine isomers*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2001. **493**(1-2): p. 115-126.
54. Meurillon, M. and E. Engel, *Mitigation strategies to reduce the impact of heterocyclic aromatic amines in proteinaceous foods*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **50**: p. 70-84.
55. Milic, B.L., S.M. Djilas, and J.M. Canadanovicbrunet, *SYNTHESIS OF SOME HETEROCYCLIC AMINOIMIDAZOAZARENES*. Food Chemistry, 1993. **46**(3): p. 273-276.
56. Zamora, R., E. Alcon, and F.J. Hidalgo, *Ammonia and formaldehyde participate in the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo 4,5-b pyridine (PhIP) in addition to creati(ni)ne and phenylacetaldehyde*. Food Chemistry, 2014. **155**: p. 74-80.
57. Shioya, M., et al., *FORMATION OF A MUTAGEN, 2-AMINO-1-METHYL-6-PHENYLIMIDAZO 4,5-B PYRIDINE (PHIP) IN COOKED BEEF, BY HEATING A MIXTURE CONTAINING CREATININE, PHENYLALANINE AND GLUCOSE*. Mutation Research, 1987. **191**(3-4): p. 133-138.
58. Zamora, R., E. Alcon, and F.J. Hidalgo, *Effect of amino acids on the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo 4,5-b pyridine (PhIP) in creatinine/phenylalanine and creatinine/phenylalanine/4-oxo-2-nonenal reaction mixtures*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 4240-4245.
59. Stadler, R.H. and D.R. Lineback, *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*. 2008: Wiley.
60. Pearson, A.M., et al., *MECHANISM(S) INVOLVED IN MEAT MUTAGEN FORMATION AND INHIBITION*. Free Radical Biology and Medicine, 1992. **13**(2): p. 161-167.
61. Shibamoto, T. and R.A. Bernhard, *INVESTIGATION OF PYRAZINE FORMATION PATHWAYS IN SUGAR-AMMONIA MODEL SYSTEMS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. **25**(3): p. 609-614.
62. Hwang, H.I., T.G. Hartman, and C.T. Ho, *RELATIVE REACTIVITIES OF AMINO-ACIDS IN THE FORMATION OF PYRIDINES, PYRROLES, AND OXAZOLES*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(11): p. 2917-2921.
63. Barzegar, F., M. Kamankesh, and A. Mohammadi, *Heterocyclic aromatic amines in cooked food: A review on formation, health risk-toxicology and their analytical techniques*. Food Chemistry, 2019. **280**: p. 240-254.
64. Barceló-Barrachina, E., et al., *Comparison of dimethylformamide dialkylacetal derivatization reagents for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts by gas chromatography–mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2005. **545**(2): p. 209-217.
65. Agudelo Mesa, L.B., J.M. Padró, and M. Reta, *Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid–ionic liquid microextraction*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 1694-1701.
66. Martín-Calero, A., et al., *Determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts: Fast sample preparation method using solid-phase microextraction prior to high-performance liquid chromatography-fluorescence quantification*. Analytica Chimica Acta, 2007. **582**(2): p. 259-266.
67. Janoszka, B., et al., *Clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazaarenes) from heat-treated meat samples*. Journal of Chromatography A, 2001. **938**(1-2): p. 155-165.

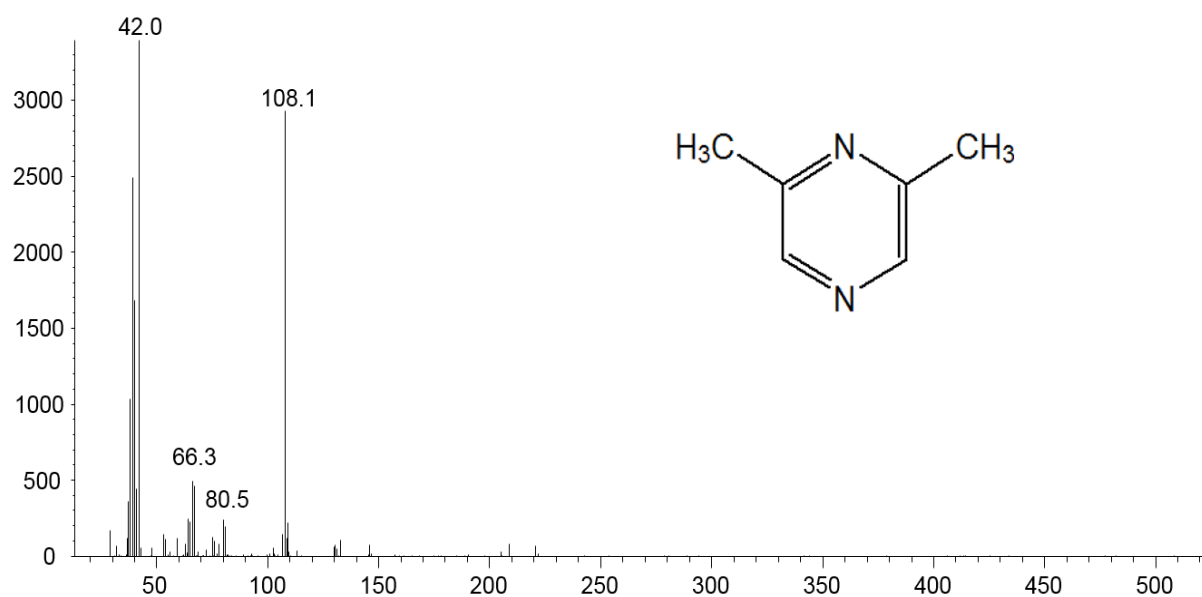
68. Sanz Alaejos, M., et al., *Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods*. Journal of Chromatography B, 2008. **862**(1): p. 15-42.
69. Rezaee, M., Y. Yamini, and M. Faraji, *Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2342-2357.
70. Aeenhvand, S., et al., *Evaluation and application of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of polar heterocyclic aromatic amines in hamburger patties*. Food Chemistry, 2016. **190**: p. 429-435.
71. Rezaee, M., et al., *Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples*. The Journal of Supercritical Fluids, 2010. **55**(1): p. 161-168.
72. Bermudo, E., et al., *Analysis of heterocyclic amines in chicken by liquid chromatography with electrochemical detection*. Analytica Chimica Acta, 2005. **536**(1): p. 83-90.
73. Karpaviciute, D., et al., *Determination of non-polar heterocyclic aromatic amines in roasted coffee by SPE-HPLC-FLD*. Chemical Papers, 2017. **71**(1): p. 67-70.
74. Luque de Castro, M.D. and M.M. Jiménez-Carmona, *Where is supercritical fluid extraction going?* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2000. **19**(4): p. 223-228.
75. Thiebaut, H.P., et al., *MUTAGENICITY AND CHEMICAL-ANALYSIS OF FUMES FROM COOKING MEAT*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(7): p. 1502-1510.
76. Khan, M.R., et al., *New method for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(2): p. 155-160.
77. Ghasemzadeh-Mohammadi, V., et al., *Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish*. Journal of Chromatography A, 2012. **1237**: p. 30-36.
78. Bashiry, M., et al., *Application and optimization of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for sensitive determination of polyamines in turkey breast meat samples*. Food Chemistry, 2016. **190**: p. 1168-1173.
79. Ramezani, H., et al., *Rapid determination of nitrosamines in sausage and salami using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry*. European Food Research and Technology, 2015. **240**(2): p. 441-450.
80. Sarafraz-Yazdi, A. and A. Amiri, *Liquid-phase microextraction*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(1): p. 1-14.
81. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH THERMAL-DESORPTION USING FUSED-SILICA OPTICAL FIBERS*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
82. Cárdenes, L., et al., *Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines*. Journal of Chromatography A, 2004. **1030**(1): p. 87-93.

83. Hrivnak, J., *SOLVENT THIN-LAYER SEPARATOR FOR MICROEXTRACTION OF WATER*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(11): p. 2159-2160.
84. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
85. Kataoka, H., H.L. Lord, and J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**(1-2): p. 35-62.
86. Casal, S., et al., *Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography-mass spectrometry as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives*. Journal of Chromatography A, 2004. **1040**(1): p. 105-114.
87. Hsiao, H.Y., B.H. Chen, and T.H. Kao, *Analysis of Heterocyclic Amines in Meat by the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Method Coupled with LC-DAD-MS-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(42): p. 9360-9368.
88. Dundar, A., C. Sarıçoban, and M.T. Yılmaz, *Response surface optimization of effects of some processing variables on carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amine (HAA) content in cooked patties*. Meat Science, 2012. **91**(3): p. 325-333.
89. Minamoto, S. and K. Kanazawa, *ELECTROCHEMICAL DETERMINATION FOR ENZYMATIC PRODUCTION OF ULTIMATE CARCINOGEN FROM TRYPTOPHAN PYROLYSATE BY RAT HEPATIC MICROSOMES*. Analytical Biochemistry, 1995. **225**(1): p. 143-148.
90. Skog, K., et al., *Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1998. **803**(1-2): p. 227-233.
91. Richling, E., M. Kleinschnitz, and P. Schreier, *Analysis of heterocyclic aromatic amines by high resolution gas chromatography-mass spectrometry: a suitable technique for the routine control of food and process flavours*. European Food Research and Technology, 1999. **210**(1): p. 68-72.
92. Sparkman, O.D., Z. Penton, and F.G. Kitson, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. 2011: Elsevier Science.
93. Poole, C.F., *Gas Chromatography*. 2012: Elsevier.
94. Kataoka, H. and K. Kijima, *Analysis of heterocyclic amines as their N-dimethylaminomethylene derivatives by gas chromatography with nitrogen-phosphorus selective detection*. Journal of Chromatography A, 1997. **767**(1): p. 187-194.
95. Kataoka, H., et al., *Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked food samples by gas chromatography with nitrogen phosphorus detector*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2002. **69**(5): p. 682-689.
96. Zaikin, V. and J.M. Halket, *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*. 2009: IM Publications.
97. Knapp, D.R., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. 1979: Wiley.
98. Pais, P. and M.G. Knize, *Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2000. **747**(1-2): p. 139-169.
99. Adámek, R., *Analýza heterocyklických aromatických aminů v kávě metodou plynové chromatografie*, P.f.U.P.v.O. Katedra analytické chemie, Editor. 2018: Olomouc.

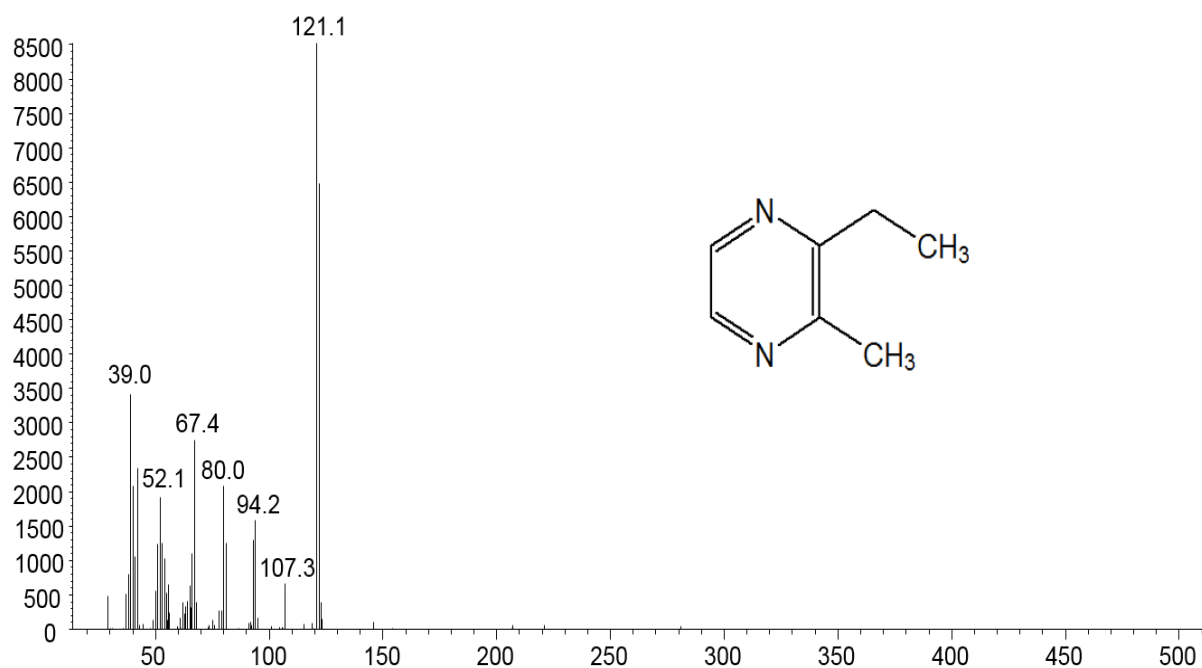
7 Přílohy

Tabulka 5 - Souhrné výsledky extrakcí reálných vzorků

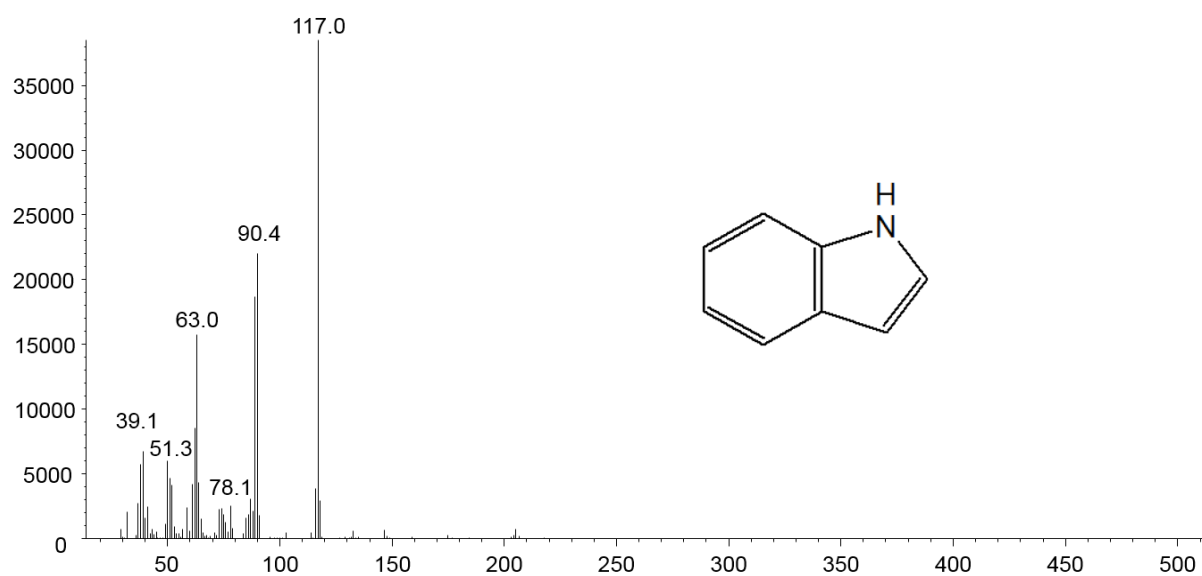
Metoda	Vzorek	Navážka [g]	pH	Sledovaný analyt [ng/g]						
				diMe	Pyrazin	Et-Me	Pyrazin	Indol	Norharman	Harman
Extrakce kapalina/kapalina	Masox	9,8		-	-	-	-	-	-	-
	Hovězí bujón	11,7		-	-	-	-	-	-	-
	Zeleninový bujón	10,5		-	-	-	-	-	-	-
	Rezidua	5,6		-	-	-	-	-	-	-
	Tuk a saze	3,35		-	-	-	-	-	-	-
	Káva	4,1		315	321	101	1365	732		
	Uz. Kotleta	10,0		-	-	-	-	-	-	-
	Uz. klobása	10,0		-	-	-	126	-	-	-
	Uz. Slanina	10,0		-	-	-	-	-	-	-
SDE	Uz klobása	15,0		-	76	-	-	-	-	-
	Uz slanina	15,0	Neutrální	-	-	-	-	-	-	-
	Káva	7,0	Kyselé	-	-	-	-	-	-	-
				156	80	73	-	-	-	-
			Neutrální	-	-	-	-	-	-	-
	Tekutý kouř	5 ml	Kyselé Alkalické	-	-	-	-	-	-	-



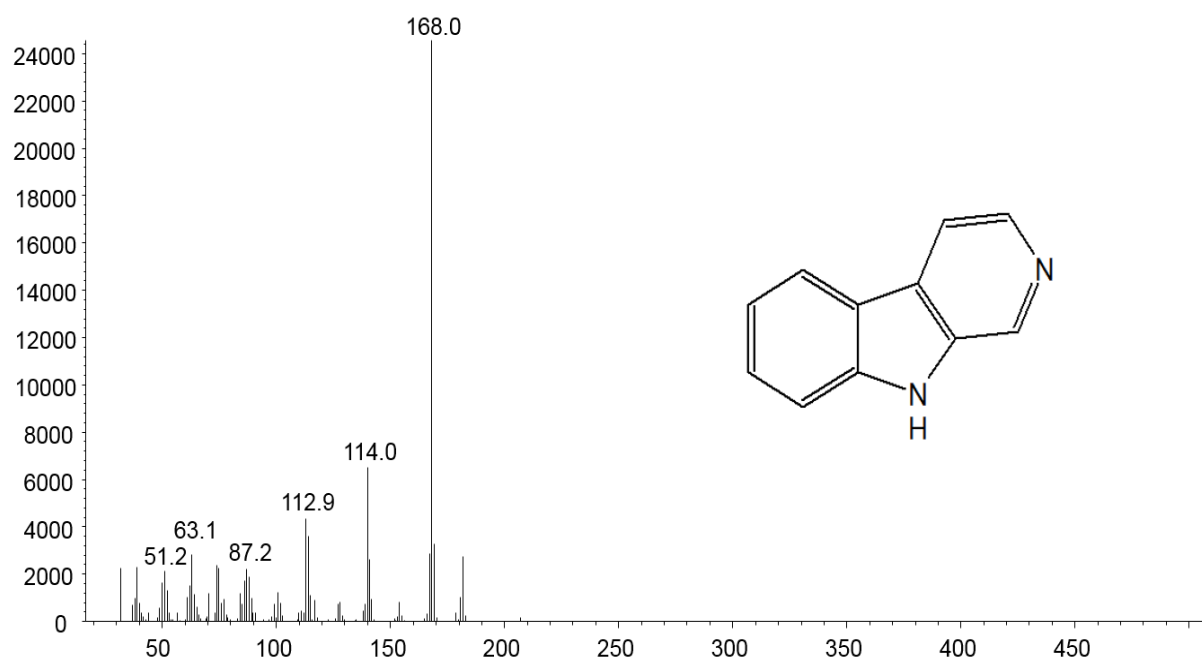
Obrázek 12 - Hmotnostní spektrum a struktura 2,6-dimethylpyrazinu



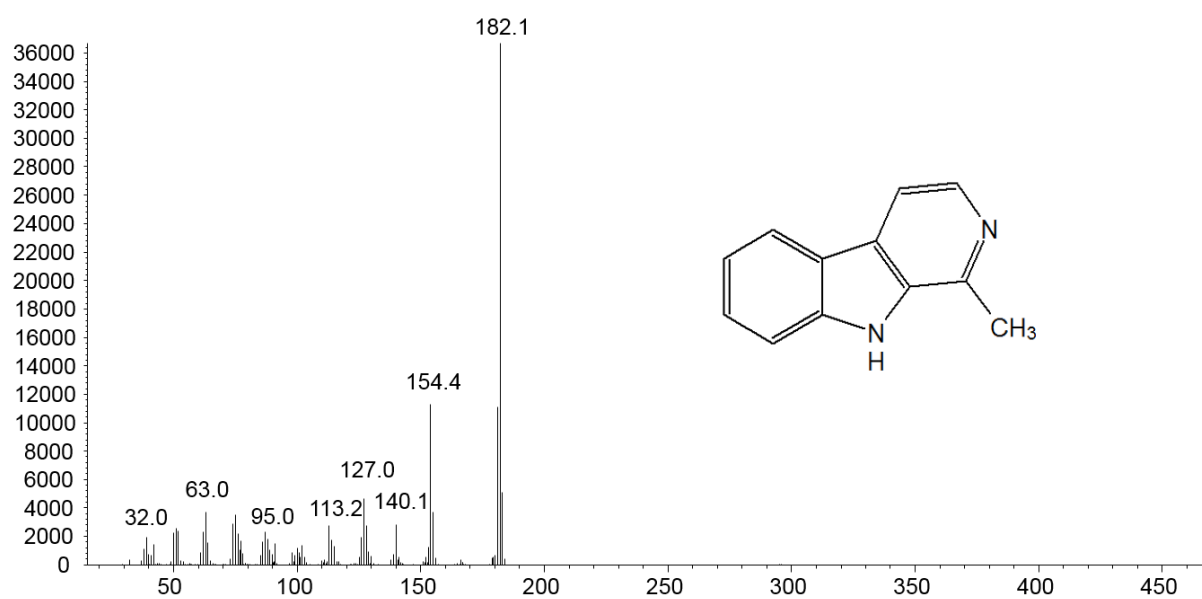
Obrázek 13 - Hmotnostní spektrum a struktura 2-ethyl-3-methylpyrazinu



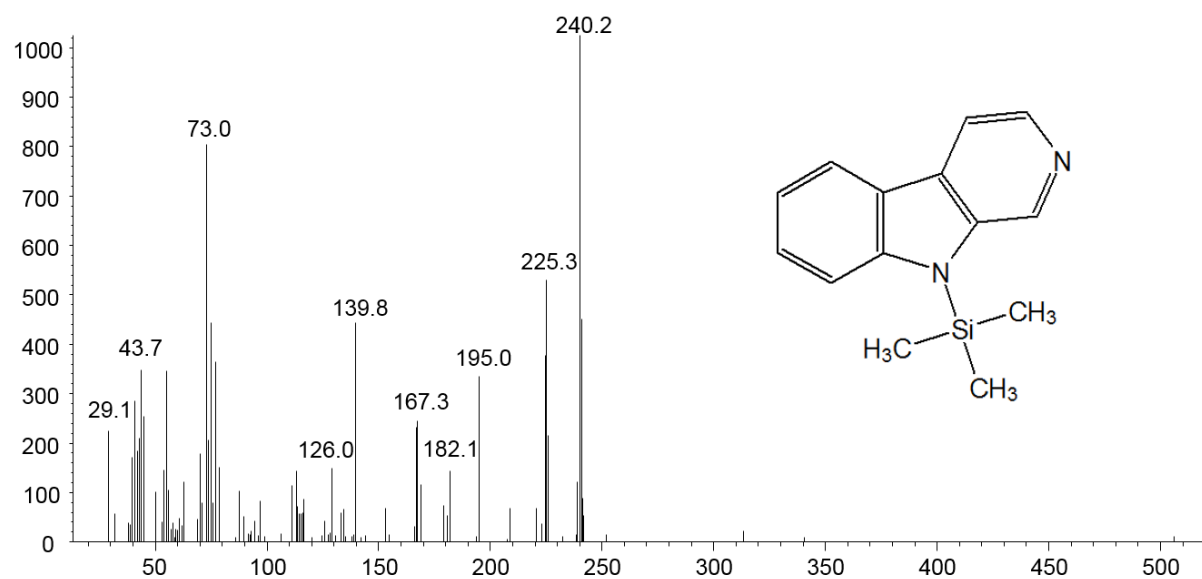
Obrázek 14 - Hmotnostní spektrum a struktura indolu



Obrázek 15 - Hmotnostní spektrum a struktura norharmanu



Obrázek 16 - Hmotnostní spektrum a struktura harmanu



Obrázek 17 - Hmotnostní spektrum a struktura trimethylsilylovaného (TMS) norharmanu