

# **Sledování obsahu akrylamidu v ječmeni a sladu během technologie výroby sladu**

Bc. Monika Plátová

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav analýzy a chemie potravin  
akademický rok: 2012/2013

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Plátová**  
Osobní číslo: **T11722**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Sledování obsahu akrylamidu v ječmeni a sladu během technologie výroby sladu**

Zásady pro vypracování:

## I. Teoretická část

1. Akrylamid a jeho výskyt v potravinách
2. Technologie výroby sladu
3. Možnosti analytického stanovení akrylamidu v potravinách

## II. Praktická část

1. Stanovení obsahu akrylamidu v ječmeni a sladu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí
2. Sledování obsahu akrylamidu v ječmeni a sladu v průběhu výroby sladu

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2, Rozš. a přeprac. 3. vydání, OSSIS, Tábor 2009*
2. CIESAROVÁ, Z. *Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách, Chem. Listy, 1999*
3. KOSAŘ, K. *Technologie výroby sladu a piva, 3.vyd. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha 2012*
4. FRIEDMAN, M. *Chemistry, Biochemistry and Safety of Acrylamide. A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003*
5. BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva, Vyd.1. VŠCHT Praha 2010*
6. CHURÁČEK, J. a kol. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia Praha 1993*

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.**

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s..

Datum zadání diplomové práce:

**11. února 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**17. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

*děkan*

L.S.



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2013

.....  
Plátová Monika

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na sledování obsahu akrylamidu v ječmeni a sladu v průběhu hvozdění sladu. Akrylamid je považovaný za pravděpodobný karcinogen pro člověka. V potravinách vzniká v průběhu Maillardovy reakce a jeho prekurzory jsou redukující cukry a aminokyselina asparagin. V této práci byl sledován vliv teploty hvozdění na obsah akrylamidu ve sladu odklíčeném a neodklíčeném. Ke stanovení akrylamidu byla použita metoda plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Vzorky sladu byly analyzovány po derivatizaci bromem. Obsah akrylamidu se pohyboval v rozmezí 0,03 – 1 mg/kg. Zároveň byl sledován obsah akrylamidu ve speciálních komerčně vyráběných sladech. Obsah akrylamidu se pohyboval v rozmezí 0,049 – 0,427 mg/kg v závislosti na typu sladu.

Klíčová slova: akrylamid, slad, hvozdění, plynová chromatografie

## **ABSTRACT**

The thesis is focused on the monitoring of acrylamide levels in barley and malt during kilning malt. Acrylamide is considered as a probable human carcinogen. It is formed during the Maillard reaction in the food and its precursors are reducing sugars and amino acid asparagine. The effect of temperature kilning to the acrylamide content in germinated malt and nongerminated malt was followed in the thesis. For determination of acrylamide was used the method of gas chromatography in combination with mass spectrometry. Malt samples were analyzed after derivatization with bromine. Acrylamide content ranged between 0,03 – 1 mg/kg. In the same time the content of acrylamide in commercially produced special malts was observed. Acrylamide content ranged between 0,049 – 0,427 mg/kg depending on the malt.

Key words: acrylamide, malt, kilning, gas chromatography

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Renatě Mikulíkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a vedení při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. za zázemí poskytnuté při zpracování praktické část.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 AKRYLAMID</b> .....	<b>12</b>
1.1 FYZIKÁLNÍ CHARAKTERISTIKA .....	12
1.2 CHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA .....	13
1.3 POUŽITÍ .....	13
1.4 VZNIK AKRYLAMIDU .....	13
1.4.1 Vznik akrylamidu z asparaginu v přítomnosti redukujících cukrů .....	13
1.4.2 Alternativní možnosti vzniku akrylamidu .....	16
1.5 ÚČINKY AKRYLAMIDU NA LIDSKÝ ORGANISMUS .....	18
1.5.1 Karcinogenita .....	18
1.5.2 Neurotoxicita .....	18
1.5.3 Reproductivní toxicita .....	19
1.6 VÝSKYT AKRYLAMIDU V POTRAVINÁCH .....	19
1.7 LEGISLATIVA.....	19
1.8 MINIMALIZACE VZNIKU AKRYLAMIDU .....	20
<b>2 TECHNOLOGIE VÝROBY SLADU</b> .....	<b>22</b>
2.1 MÁČENÍ JEČMENE.....	23
2.2 PŘÍJEM, ČISTĚNÍ A TRÍDĚNÍ JEČMENE .....	23
2.3 MÁČENÍ JEČMENE.....	24
2.4 KLÍČENÍ JEČMENE.....	25
2.5 HVOZDĚNÍ SLADU.....	26
2.6 ODKLIČOVÁNÍ A SKLADOVÁNÍ SLADU .....	27
2.7 DRUHY SLADU.....	28
2.7.1 slad český (plzeňský) .....	28
2.7.2 slad bavorský (mnichovský) .....	28
2.7.3 slad vídeňský .....	28
2.7.4 slad karamelový .....	28
2.7.5 slad barevný .....	29
2.7.6 slad diastatický .....	29
2.7.7 slad nakuřovaný .....	29
2.7.8 slad melanoidinový .....	29
2.7.9 slad proteolytický .....	30
2.8 NÁHRAŽKY SLADU .....	30
<b>3 METODY STANOVENÍ AKRYLAMIDU V POTRAVINÁCH</b> .....	<b>31</b>
3.1 PRINCIP CHROMATOGRFICKÉ METODY .....	31
3.2 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRFICKÝCH METOD .....	32
3.3 ZÁKLADNÍ PARAMETRY SEPARACE V KOLONOVÉ CHROMATOGRFII.....	33
3.4 KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZA.....	34
3.4.1 Kvalitativní analýza .....	34
3.4.2 Kvantitativní analýza .....	34



3.5	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	35
3.5.1	Stacionární fáze .....	35
3.5.2	Nosný plyn .....	36
3.5.3	Dávkovač vzorku .....	36
3.5.4	Kolony .....	36
3.5.5	Detektory .....	37
3.6	CHEMICKÁ DERIVATIZACE V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII .....	38
3.7	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ KOLONOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	39
3.7.1	Čerpadlo .....	39
3.7.2	Směšovací zařízení .....	40
3.7.3	Dávkovací zařízení .....	40
3.7.4	Kolony .....	41
3.7.5	Detektory .....	41
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>44</b>
4.1	POMŮCKY A PŘÍSTROJE .....	44
4.2	CHEMIKÁLIE .....	44
4.3	PRACOVNÍ POSTUP .....	45
4.3.1	Vzorky sladu .....	45
4.3.2	Příprava vzorků sladu .....	45
4.4	INSTRUMENTACE A CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ .....	46
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>65</b>

## ÚVOD

Zjištění výskytu poměrně vysokých koncentrací akrylamidu v běžně konzumovaných potravinách vyvolalo velkou pozornost odborníků na bezpečnost potravin, protože se jedná o látku považovanou za pravděpodobný karcinogen pro člověka a navíc i o účinný neurotoxin. Přítomnost akrylamidu byla potvrzena v mnoha druzích tepelně zpracovaných potravin, zejména v kávě, cereálních produktech (pražené slady, kávoviny), smažených bramborových výrobcích.

Akrylamid vzniká především při Maillardově reakci, kde jsou hlavními prekurzory redukující cukry a aminokyselina asparagin. Menší množství akrylamidu se také může tvořit alternativními způsoby. Mechanismus vzniku akrylamidu je závislý na podmínkách zpracování. Tvorba akrylamidu začíná při teplotách nad 80 °C a s rostoucí teplotou se zvyšuje. Maximum akrylamidu vzniká v teplotním rozmezí 150 – 170 °C. Při vyšších teplotách jsou již hodnoty akrylamidu nižší z důvodu stoupající rychlosti degradačních reakcí akrylamidu.

Mezi potraviny upravované vysokými teplotami během zpracování patří bez pochyby slad. Surovinou pro výrobu sladu je ječmen. Tato rostlina patří mezi obiloviny, které jsou charakteristické vysokým obsahem škrobu. Procesem hvozdění dochází k aktivaci enzymů, jež rozkládají přítomný škrob na redukující cukry. Dalším faktem, který přispívá ke vzniku akrylamidu je přítomnost aminokyseliny asparaginu v zrně ječmene. Tyto prekurzory za vhodných podmínek vstupují do Maillardovy reakce, kde se tvoří melanoidinové látky a také již zmiňovaný akrylamid.

Intenzivní výzkum v oblasti stanovení obsahu akrylamidu ve zpracovaných potravinách byl zahájen krátce po objevení akrylamidu v potravinách v dubnu 2002. Jako vhodnou metodou použitelnou pro jeho stanovení se jevila metoda chromatografie. Mnoho laboratoří pracovalo na vývoji metod kapalinové a plynové chromatografie v kombinaci s detektorem na bázi hmotnostní spektrometrie. Nedávné metodické studie shrnují poznatky o použití LC – MS a GC – MS ke stanovení obsahu akrylamidu a tyto metody jsou považovány za nejvhodnější. Dalšími možnými metodami stanovení akrylamidu mohou být kapilární elektroforéza nebo bioanalytické metody.

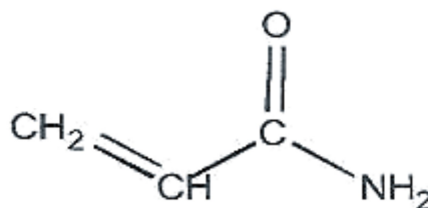
Cílem této práce je sledování obsahu akrylamidu v ječmeni a různých typech sladu v závislosti na teplotě hvozdění.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 AKRYLAMID

### 1.1 Fyzikální charakteristika

Akrylamid (prop – 2 – enamid) je krystalická látka bez barvy a zápachu. Molekulová hmotnost je 71,08. Tato látka má teplotu tání  $84,5 \pm 0,3$  °C, nízký tlak par 0,007 mm Hg při 25 °C a vysoký bod varu 136 °C (Eriksson, 2005, Ciesarová, 2005).



Obr. 1. Strukturální vzorec Akrylamidu

Akrylamid je dobře rozpustný ve vodě, acetonu a etanolu, má vysokou pohyblivost v půdě a podzemních vodách a je biologicky odbouratelný (Ciesarová, 2005). V tab.1 je uvedena rozpustnost v jednotlivých rozpouštědlech při teplotě 30 °C (Othmer and Kirk, 1972).

Tab. 1. Rozpustnost akrylamidu při 30 °C

Rozpouštědlo	[g/ l]
Voda	2151
Methanol	1550
Ethanol	862
Aceton	631
Acetonitril	396
Ethylacetát	126
Chloroform	26,6
Benzen	3,46
n-heptan	0,068

## 1.2 Chemická charakteristika

Akrylamid je difunkční monomer, který podstupuje reakce typické chemikáliím obsahující reaktivní dvojnou vazbu a amidovou skupinu. Protože se limitující konjugace účastní  $\pi$  – elektrony, akrylamid postrádá silný chromofor pro UV detekci a není fluoreskující. Akrylamid vykazuje jak slabě zásadité tak neurální vlastnosti. Elektron odnímající karboxyamidovou skupinu aktivuje dvojnou vazbu, která reaguje s nukleofilním činidlem za vzniku adiční vazby v pozici 1,4. Mnohé z těchto reakcí jsou reverzibilní, a rychlost reakce závisí na síle nukleofilu. Při vyšších teplotách než je bod tání akrylamid polymeruje. Tato reakce je vysoce exotermická (Eriksson, 2005, National Industrial Chemicals and assesment scheme ).

## 1.3 Použití

Akrylamid byl poprvé vyroben v Německu v roce 1893, avšak jeho komerční produkce začala až po roce 1954. Největší produkce akrylamidu je použita při výrobě polyakrylamidů a gelů. Polyakrylamidové polymery a kopolymery jsou používány v papírenském a textilním průmyslu, jako flokulanty při ošetření odpadních vod, jako půdní kondicionéry, při zpracování rud a v kosmetickém průmyslu. Akrylamid se také široce používá při vědeckém výzkumu na selektivní úpravu SH- skupin strukturálních a funkčních bílkovin a jako tlumič fluorescence tryptofanu při studiích určených k objasnění struktury a funkce proteinů. Polyakrylamidové gely jsou používány v laboratořích k separaci bílkovin a jiných sloučenin pomocí elektroforézy (Friedman, 2003, National Industrial Chemicals and assesment scheme ).

## 1.4 Vznik akrylamidu

### 1.4.1 Vznik akrylamidu z asparaginu v přítomnosti redukcujících cukrů

První detailní náhled na tvorbu akrylamidu byl předložený Zyzakem et al. (2003) a Yaylayanem et al. (2003) a potvrdil hypotézu Stadlera et al. (2002) a Mottrama et al. (2002), že akrylamid se tvoří v Maillardově reakci (Zyzak et al., 2003, Yaylayan et al., 2003, Stadler et al., 2002, Mottram et al., 2002) V Maillardově reakci jsou klíčovými prekurzory aminokyselina asparagin, od níž je odvozen skelet akrylamidu, a redukcující cukry nebo různé karbonylové sloučeniny vzniklé ze sacharidů, které umožňují dekarboxylaci aspara-

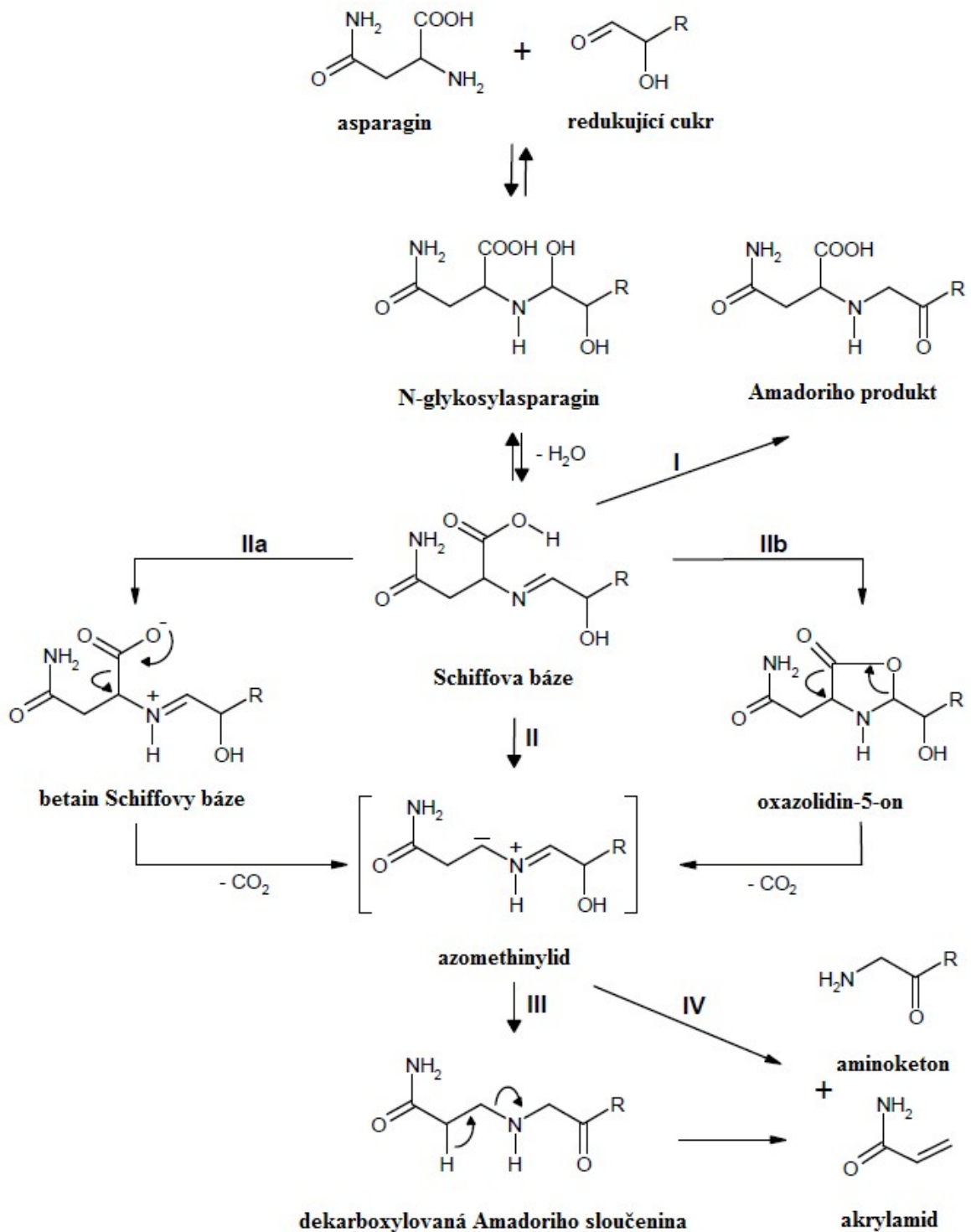
ginu. V případě, že redukujících cukry nebo jiné  $\alpha$ -hydroxykarbonylové či  $\alpha$ -dikarbonylové sloučeniny nejsou přítomny, dochází pouze k deaminaci asparaginu a vzniku fumarové kyseliny (Velíšek, 2009).

Na obr. 2 je znázorněno schéma vzniku akrylamidu. Primárním produktem reakce asparaginu s redukujícími cukry je karbinolamin N – glykosylasparagin nebo Schiffova báze, jež jsou přímými prekurzory akrylamidu. Při nízkém obsahu vody jsou obě sloučeniny – N – glykosylasparagin a Schiffova báze relativně stabilní. Ve vodném prostředí může Schiffova báze hydrolyzovat za vzniku prekurzorů akrylamidu, případně může vznikat Amadoriho přesmyk, jehož výsledkem je ketosamin, který není významným prekurzorem akrylamidu. (Ciesarová, 2005, Studer et al., 2004). Dokonce v prostředí s velmi nízkým obsahem vody je tato reakce hlavní cestou zahájení Maillardovy reakce, při níž vznikají 1 – a 3 – deoxycukry. Tyto ketosaminy se podílejí na tvorbě barvy a vůně ( Studer et al., 2004).

V podmínkách s vyšší vlhkostí vzniká dekarboxylací Schiffovy báze stabilní azomethinylid, který po tautomerizaci dává vzniku Amadoriho produktu (dráha I). Podmínkou pro průběh této reakce je přítomnost hydroxylové skupiny v  $\beta$ -pozici k atomu dusíku. Další alternativou přeměny Schiffovy báze je vznik betainu Schiffovy báze (dráha IIa) a intramolekulární cyklizace na derivát oxazolidin-5-onu (dráha IIb). Obě tyto sloučeniny poskytují dekarboxylací azomethinylid, vyskytující se ve 2 formách. Obě formy azomethinylidu poskytují dekarboxylací příslušný imin. Imin s dvojnou vazbou mezi dusíkem a uhlíkem pocházející z cukru se může hydrolyzovat na původní cukr a 3 – aminopropionamid, ale může také isomerizovat na dekarboxylovanou Amadoriho sloučeninu. K tvorbě akrylamidu doprovázenému vznikem aminoketonu dochází za vyšší teploty, rozštěpením kovalentní vazby mezi uhlíkem a dusíkem. Imin s dvojnou vazbou mezi dusíkem a uhlíkem pocházejícím z asparaginu může být pouze hydrolyzován na Streckerův aldehyd asparaginu a 1 – amino – 1 – deoxyalditol. Další podíl akrylamidu vzniká enzymovou deaminací 3 – aminopropionamidu (Ciesarová, 2005, Velíšek, 2009).

Množství vzniklého akrylamidu se liší zastoupením prekurzorů.  $\alpha$ -hydroxykarbonylové sloučeniny (glukóza, fruktóza, hydroxyaceton, 2 – hydroxy – 1 – butanal) tvoří výrazně vyšší množství akrylamidu než  $\alpha$ -dikarbonylové sloučeniny (2,3 – butanedion, 2 – oxopropional) (Studer et al., 2004).

Vznik akrylamidu z asparaginu v přítomnosti sacharidů má více možností. Další takovouto možnost uvádí Mottram et al.(2002) Produkty Maillardovy reakce, které jsou spojovány s vůní a barvou, také mohou reagovat s aminokyselinami v tzv. Streckerově degradaci za vzniku Streckerova aldehydu, který po dalších redukčních a oxidačních krocích může konvertovat na akrylamid.



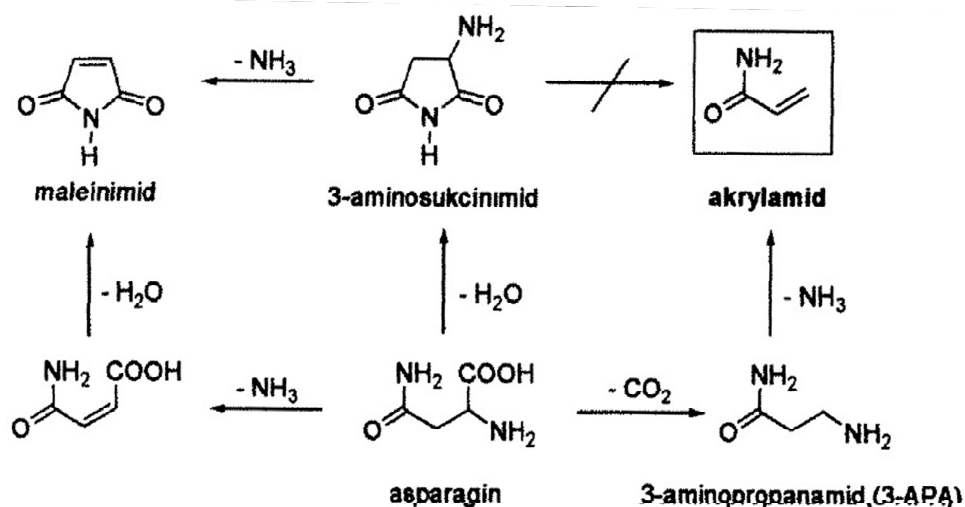
Obr. 2. Mechanismus tvorby akrylamidu z asparaginu v přítomnosti  $\alpha$ -hydroxykarbonylových sloučenin (Studer et al., 2004)

#### 1.4.2 Alternativní možnosti vzniku akrylamidu

Kromě Maillardovy reakce byly pro vznik akrylamidu navrhovány další reakční mechanismy. Tyto způsoby vzniku akrylamidu ale vedou ke vzniku minoritních množství (Stadler et al., 2004).

- **Termální degradace asparaginu**

Dřívější studie poukázali na několik možných cest vzniku akrylamidu. Jednou z nich je termicky indukovaná dekarboxylace asparaginu na 3 – aminopropanamid (3 – APA) a následnou deaminací může vzniknout akrylamid (Ciesarová, 2005, Zyzak et al., 2003). Přítomnost redukujících cukrů je nutná pro efektivní konverzi asparaginu na akrylamid (Ciesarová, 2005).



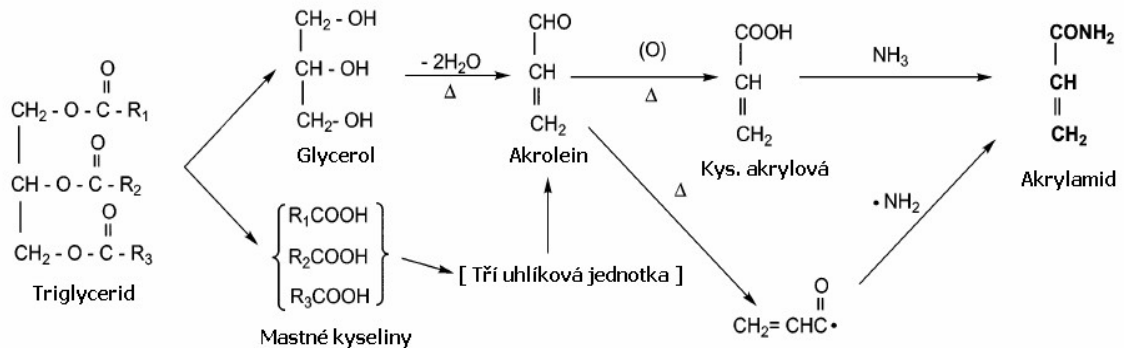
Obr. 3. Termální degradace asparaginu (Ciesarová, 2005)

- **Tvorba akrylamidu z akroleinu**

Akrolein (2 – propenal) je jednoduchý nenasycený aldehyd, připomínající strukturu akrylamidu. Akrolein a kyselina akrylová mohou vznikat dehydratací glycerolu, zejména při zahřívání tuku za vysoké teploty. Následnou reakcí kyseliny akrylové s amoniakem vzniká akrylamid (Claus et al., 2008, Friedman, 2003). Prekurzorem pro tvorbu kyseliny akrylové může být také asparagová kyselina, vznikající v Maillardově reakci (Stadler et al.,



2004). Avšak experimenty s amonnými soli, oleji a akroleinem indikují, že tyto mechanis-



my mohou být irelevantní pro tvorbu akrylamidu v potravinách (Claus et al., 2008).

Obr. 4. Hypotetický mechanismus vzniku akrylamidu z lipidů (Yashuhara et al., 2003)

- **Neoxidativní tvorba akrylamidu**

V potravinách bohatých na škrob probíhá za vyšších teplot degradace škrobového komplexu za uvolnění volného škrobu, který následně degraduje na D – glukózu. Ta poté podstupuje sérii enolizací a izomerizací za tvorby 2,4 – deoxycukrů.

2,4 – deoxycukr podstupuje keto – enolizaci za vzniku 2,5 – deoxydilulosa. 2,5 – deoxydilulosa je nestálá a štěpí se na dvě 3 – uhlíkaté sloučeniny – hydroxyaceton a hydroxymethylglyoxal. Hydroxyaceton přechází v hydroxyketon, který se odbourává na acetaldehyd a formaldehyd. Ve Streckerově degradaci může rovněž vznikat acetaldehyd degradací volných aminokyselin. Acetaldehyd a formaldehyd kondenzují za vzniku alkoholoxidu, který se dehydratuje na 2 – propenal. 2 molekuly 2 – propenalů v Canniarově reakci tvoří kyselinu akrylovou. Tato kyselina reaguje s amoniakem, uvolněným z Streckerovy degradace za vzniku akrylamidu (Vattem and Shetty, 2003).

- **Tvorba akrylamidu z karnosinu**

Byla zaznamenána i tvorba akrylamidu z dipeptidu karnosin v zahříváném mase. Tento dipeptid hydrolyzuje na β – alanin, který poté reaguje s amoniakem uvolněným při Streckerově degradaci aminokyselin. Důvodem, proč se akrylamid nachází v masných

výrobcih ve velmi malých koncentracích je, že akrylamid následně tvoří methylové deriváty, u nichž dosud nejsou známy toxikologické účinky (Claus et al., 2008).

## 1.5 Účinky akrylamidu na lidský organismus

Akrylamid je neurotoxická sloučenina s genotoxickým potenciálem, podle IARC (International Agency for Research on Cancer) je klasifikován jako potenciální lidský karcinogen (třída 2A). V organismu je akrylamid rychle absorbován a rovnoměrně distribuován. Primárními metabolity jsou konjugáty s glutationem a produkt oxidace glycinamid. Akrylamid i glycinamid mohou reagovat, respektive tvořit adukty, s makromolekulami jako je hemoglobin či DNA (Velíšek, 2009).

### 1.5.1 Karcinogenita

Důkazy karcinogenních účinků akrylamidu a jeho metabolitu glycidamidu byly poskytnuty v různých in vivo a in vitro studiích. Ve studiích na buněčných kulturách akrylamid indukoval chromozomální zlomy a bodové mutace. Ve studiích prováděných na myších byly pozorovány nádory na štítné žláze, varlatech, mléčné žláze, plicích, klitorisu a mozku (Claus et al., 2008). Studiemi bylo zjištěno, že myši jsou 10x citlivější k akrylamidu než krysy. Metabolit glycinamid se zdá být hlavním karcinogenem u hlodavců. Hladiny aduktů hemoglobinu z glycinamidu jsou 3 – 10 x větší u myši než u krys. Karcinogenní projevy akrylamidu mohou být druhově závislé, proto je nutné provést studie na primátech (Friedman, 2003).

### 1.5.2 Neurotoxická

Ve studiích prováděných na zvířatech bylo prokázáno, že akrylamid vyvolává charakteristické neurotoxické příznaky. U potkanů vyvolával pokles intenzity stisku a pohybové aktivity (Yong et al., 2012). Možné vysvětlení neurotoxicity akrylamidu spočívá v charakteru molekuly. Tato molekula je bipolární, z níž část  $\text{CH}_2=\text{CH}$  reaguje hydrofóbně a část  $\text{CONH}_2$  reaguje hydrofilně s buněčnými komponenty. Tato vlastnost zlepšuje schopnost měnit strukturu buněčných membrán a urychluje pronikání a šíření do nervového zakončení (Friedman, 2003).

### 1.5.3 Reproductivní toxicita

Byly prováděny studie na samčí a samičí populaci potkanů. Akrylamid byl těmto populacím podáván v napájecí vodě (50 – 200 ppm) v období před chovem, v průběhu páření a během laktace. Výsledkem bylo narušení páření, zhoršené schopnosti ejakulace spermií, pokles tělesné hmotnosti, snížený příjem potravy, úbytek porodní hmotnosti mláďat.

Molekulární mechanismy reprodukční toxicity by mohly být důsledkem alkylace SH- skupiny na jádře a ocasu spermií, snížení GSH nebo poškození DNA ve varlatech (Friedman, 2003).

## 1.6 Výskyt akrylamidu v potravinách

Akrylamid se v žádné formě nepřidává do potravin, tedy jeho přítomnost v potravinách má jiný původ. Kontaminace potravin může být jednak z vnějšího prostředí (kontaktem s obalovými materiály), nebo samotným vznikem akrylamidu během tepelného zpracování potravin. Je však nepravděpodobné, že by kontakt potravin s materiálem byl příčinou vysokých koncentrací akrylamidu zjištěných v tepelně opracovaných produktech. Jedná se o potraviny, obsahující zároveň bílkoviny a cukry, upravované při teplotách vyšších než 120 °C, tedy pečením, smažením, grilováním nebo mikrovlnným ohřevem (Ciesarová, 2005).

Mezi rizikové potraviny obsahující akrylamid patří zejména smažené nebo pečené produkty z brambor (hranolky, bramborové lupínky), cereální výrobky (snídaňové cereálie, sušenky, chléb), dále káva, pražené mandle a olivy. V syrových nebo vařených potravinách nebyla přítomnost akrylamidu prokázána (Šucman a Veselá, 2012).

Vypočítané průměrné hodnoty akrylamidu přijaté v potravinách se pohybují 0,3 – 0,6 µg/kg tělesné hmotnosti na den u dospělého jedince, u dětí a dospívajících se tato hodnota zvyšuje až na 0,4 – 0,6 µg/kg. Důvodem zvýšeného příjmu je fakt, že děti mají vyšší příjem kalorií v kombinaci s konzumací potravin bohatých na akrylamid, jakými jsou hranolky nebo bramborové lupínky (Claus et al., 2008).

## 1.7 Legislativa

V současné době neexistuje žádný právní předpis, který by obsah akrylamidu v potravinářských výrobcích reguloval. Ačkoliv Evropská Komise nestanovila žádné limitní hodnoty pro potravinářské výrobky, vydala Doporučení Komise 2007/331/ES ze dne 3.

května, na základě něhož byl proveden monitoring v letech 2007 – 2009. Toto doporučení bylo rozšířeno v roce 2010 o Doporučení Komise 2010/307/EU ze dne 2. června 2010. Na základě těchto doporučení bylo monitorováno množství akrylamidu v potravinách, o nichž je známo že obsahují vysoká množství akrylamidu. V letech 2011 – 2012 byl monitorován obsah akrylamidu na základě nejnovějšího Doporučení Komise K (2010) 9681 ze dne 10. ledna 2011. Na základě výsledků monitorování v těchto letech posoudí Komise situaci do 31. prosince 2012 a rozhodne o nutnosti přijmout další vhodná opatření (K (2010) 9681).

Evropská Rada vydala dne 3. Listopadu 1998 Směrnicí Rady 98/83/ES o jakosti vody určené k lidské spotřebě, v níž jsou určeny maximální limity pro obsah akrylamidu v pitné vodě na 0,1 µg/l. S touto Směrnicí plně koresponduje vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a rozsah kontroly pitné vody, v níž jsou uvedeny totožné limity.

Další problematikou z oblasti potravin řeší vyhláška Ministerstva zdravotnictví č.38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy. Tato vyhláška stanovuje maximální množství akrylamidu, které nesmí být překročeno při migraci látky z obalových materiálů na hodnotu 0,01 mg/kg.

## 1.8 Minimalizace vzniku akrylamidu

Faktory rozhodující o úrovni kontaminace výrobku:

- Obsah redukujících cukrů, asparaginu a dalších volných aminokyselin
- Teplota použitá při zpracování (výrobě)
- Hodnota pH
- Obsah vody
- Použití aditivních látek v receptuře (Velíšek, 2009)

Asparagin, glukóza a fruktóza jsou tedy považované za hlavní prekurzory tvorby akrylamidu, přičemž asparagin se svojí amidovou skupinou tvoří základ molekuly akrylamidu. Z dosud známých mechanismů tvorby akrylamidu v tepelně upravovaných potravinách lze uvažovat o možnosti eliminace vzniku akrylamidu v potravinách buď cestou snižování obsahu asparaginu nebo redukcí obsahu redukujících cukrů, zásahem do mechanismu

vzniku prekurzorů nebo úpravou technologického procesu zpracování potravin (Ciesarová, 2005).

Na základě mnoha výzkumů JIFSAN s NCFST a FDA byly stanoveny následující body ke snížení akrylamidu v potravinách:

1. Vyvinout databáze týkající se obsahu volného asparaginu a glukózy v různých kategoriích potravin
2. Určit vztah mezi množstvím asparaginu v nezpracovaných potravinách a množstvím akrylamidu v potravinách po zpracování
3. Definovat kinetiku vzniku akrylamidu a vliv podmínek zpracování, jakými jsou čas, teplota, pH, aktivita vody a složení potravin
4. Redukce již vzniklého akrylamidu (Friedman, 2003)

Na redukci obsahu již vzniklého akrylamidu bylo v modelových případech použito více způsobů:

- a) kyselá nebo enzymová hydrolyza amidové skupiny akrylamidu na kyselinu akrylovou a amoniak.
- b) polymerizace akrylamidu na netoxický polyakrylamid působením UV záření, radiace nebo volnými radikály přítomnými ve fenolických sloučeninách, flavonoidech, melaninech, tryptofanu a v některých mastných kyselinách.
- c) reakce akrylamidu s SH-skupinou aminokyselin, esterů, peptidů nebo proteinů
- d) úprava pH kyselinou citronová po dobu pečení nebo smažení (Ciesarová, 2005)

## 2 TECHNOLOGIE VÝROBY SLADU

Surovinou pro výrobu sladu je ječmen (obr. 5). Tato rostlina patří do říše rostlin, oddělení semenných (*Spermatophyta*), pododdělení krytosemenných (*Angiospermae*), třídy jednoděložných (*Monocotyledonae*), čeledi lipnicovité (*Poaceae*) (Kosař a Procházka, 2002).

V našich zemích jsou první písemné zmínky o pěstování ječmene již z roku 1227. Sladovnický ječmen má mít následující parametry: výnos přibližně 7 tun/ha, počet zrn v klasu 18 – 20, délku vegetační doby přibližně 100 dní, obsah škrobu 60 – 65 %, obsah bílkovin 10 – 11 %. Pro výrobu sladu a sladových výtažků se na našem území pěstují vybrané odrůdy jarního dvouřadého ječmene, např. Rubín, Jubilant, Forum a další, které patří k nejkvalitnějším odrůdám na světě (Chládek, 2007).



Obr. 5. Sladovnický ječmen

Technologický postup výroby sladu zahrnuje několik fází:

- nákup ječmene
- příjem, čištění a třídění ječmene
- máčení ječmene
- klíčení ječmene
- hvozdnění sladu
- odkličování a skladování sladu

## 2.1 Máčení ječmene

Nákup sladovnického ječmene se provádí na základě smluv mezi odběratelem a dodavatelem (pěstitelé ječmene nebo obchodní organizace). Tyto smlouvy vychází z ČSN normy 46 1100 – 5 z roku 1994 (Kosař a Procházka, 2002, Pelikán aj., 2002).

## 2.2 Příjem, čištění a třídění ječmene

Příjem zrna se provádí na přijímací rampě z valníků, nákladních automobilů nebo vagónů. Z každé dodávky je nutno odebrat vzorky k analýzám. Z příjmových košů se ječmen dopravuje k předčištění, čištění a uložení do sil. K dopravě zrna se nejčastěji používají následující dopravní prostředky: elevátory, šnekové dopravníky, dopravní pásy nebo pneumatická doprava.

Čištění ječmene probíhá na čističce, na kterou navazuje třídíčka. Čištění probíhá ve dvou stupních. V prvním stupni dochází k odstranění hrubých nečistot, cizích příměsí a nakonec jemných příměsí. První stupeň probíhá na vibrujících sítích tzv. aspirátorech. Následující druhý stupeň probíhá na triéru. V této fázi dochází k odstranění kulatých zrn jiných plodin nebo úlomků zrn ječných.

Třídění ječmene je důležité z technologického hlediska. Významné je z hlediska máčení, klíčení a následně získání homogenního sladu (Kosař a Procházka, 2002, Pelikán aj., 2002).

Rozdělení ječmene dle velikosti:

- I. třída – zrna větší než 2,5 mm, tzv. prima
- II. třída – zrna v rozmezí 2,2 – 2,5 mm, tzv. sekunda
- propad – zrna menší než 2,2 mm

Skladovaný ječmen je živý organismus, který se vyvíjí a mění. K zajištění životaschopnosti a minimálních ztrát dýcháním je třeba skladovat zrna s nízkým obsahem vody (14-15 %). (Kosař a Procházka, 2002, Pelikán aj., 2002). Při skladování se čerstvě sklizený a vytříděný ječmen nachází ve stadiu základního klidu, tzv. dormace a není schopen vyklíčit. Špatná klíčivost čerstvě sklizeného ječmene je způsobena přítomností inhibitorů klíčení, tzv. dorminů. Teprve jejich odbouráním oxidací dormace zaniká, uvolňuje činnost stimulatorů klíčení gibberelinů, a zrna je schopna klíčit (Rop a Hrabě, 2009). Dalšími faktory ovlivňují-

cími kvalitu skladování jsou teplota zrna, poškození obilok, kvalita čištění a třídění a přítomnost škůdců (Kosař a Procházka, 2002, Pelikán aj., 2002).

### 2.3 Máčení ječmene

Máčení je technologický proces, při němž se zvyšuje obsah vody v zrně podle typu výrobného sladů na 42 – 48 %. Cílem máčení je zahájení enzymatických reakcí, odstranění splavky a lehké nečistoty a vylouhovat nežádoucí látky.

Máčení probíhá v náduvnících (kónické, ploché, Wildův), nejlépe za konstantní teploty.

Faktory ovlivňující příjem vody:

- teplota vody
- chemické složení máčecí vody
- velikost zrna
- struktura zrna
- přítomnost kyslíku
- technologie máčení (Kosař a Procházka, 2002, Rop a Hrabě, 2009)

Typy máčení

- vzdušné máčení
- záplavové máčení
- opakované máčení
- sprchové máčení
- klasické máčení (Kosař a Procházka, 2002)

V současné době je nejpoužívanějším způsobem vzdušné máčení. Použití této technologie máčení je nutné při sladování čerstvých, odleželých sladů. Důležitým faktorem technologie vzdušného máčení je odsávání oxidu uhličitého během vzdušných přestávek. Při použití způsobu záplavového máčení se provádí odstranění oxidu uhličitého a zchlazení vodou. Nevýhodou tohoto postupu je o 30 % vyšší spotřeba vody. Dalším způsobem je opakované máčení, jehož předností jsou nižší sladovací ztráty, naopak nevýhodou je špatný vzhled zrna a vyšší náklady na spotřebu energie. Při sprchovém máčení je ječmen pouze kroupen.



Důležitou podmínkou při použití tohoto způsobu máčení je, aby byl ječmen dobře vyčištěn. Tento způsob je obvyklý při použití plochých náduvníků a výsledkem je minimální spotřeba vody. Naopak nevýhoda při použití tohoto způsobu máčení je, že nedochází k vyloučení nežádoucích látek z pluchy, odstranění prachu a splavků. Posledním způsobem je klasické máčení, které je opakem moderního máčení. Při klasickém máčení jsou doby namočení ječmene dlouhé a vzdušné přestávky jsou krátké. Tento způsob poskytuje vysoce kvalitní slady, avšak pouze u ječmenů fyziologicky zdravých, dokonale vyzrálých a odleželých (Kosař a Procházka, 2002).

## 2.4 Klíčení ječmene

Cílem klíčení je aktivace a tvorba enzymů a dosažení požadovaného stupně rozluštění zrna. Faktory, jimiž je ovlivňováno klíčení jsou vhodná teplota, vláh a přístup kyslíku. Během procesu klíčení je aktivována a syntetizována řada enzymů, z nichž mají největší význam fosfatasy, cytasy, proteasy a hlavně amylasy.

Fosfatázy rozkládají fytylin a další organické látky za vzniku kyselých reagujících fosforečnanů. Kyselé prostředí je důležité pro činnost ostatních enzymů. Ke kyselé reakci uvnitř zrna přispívají i organické kyseliny vznikající při rozkladu sacharidů a aminokyselin. Cytasy jako komplex enzymů štěpících neškrobové polysacharidy celulosu, hemicelulosu a gumovité látky (glukany, pentosany) pomáhají zpřístupnit zrnka škrobu a molekuly bílkovin uzavřené v buňkách endospermu. Klíčící zrno se stává působením těchto enzymů křehčí a měkčí, a tím dochází k tzv. cytolytickému rozluštění (Rop a Hrabě, 2009).

Nejdůležitější enzymy vznikající při klíčení jsou bezpochyby amylázy, ačkoliv štěpení škrobu probíhá během sladování v omezené míře. Tyto enzymy mají zásadní význam pro hydrolýzu škrobu při rmutování.  $\alpha$  – Amylasy není v ječmeni přítomna. Největší tvorba tohoto enzymu probíhá od druhého do čtvrtého dne klíčení (Kosař a Procházka, 2002). Pozitivní vliv na tvorbu  $\alpha$  – amylasy mají vlhkost, doba klíčení a příznivě působí nižší teploty (Pelikán aj., 2002).  $\beta$  – Amylasy je v malém množství obsažena již v ječném zrně. Během prvního dne klíčení dochází k malé ztrátě tohoto enzymu. Naopak ke zvyšování obsahu enzymu dochází od druhého dne klíčení. Na tvorbě  $\beta$  – amylasy má zásadní význam dýchání v prvním dni klíčení (Kosař a Procházka, 2002).

Klíčení sladovnického ječmene je možno provádět klasickým způsobem na humnech nebo v moderních pneumatických sladovnách. Humna jsou prostorné místnosti s hladkými podlahami, konstantní teplotou a účinným větráním (Rop a Hrabě, 2009).

Klíčení zrna při klasickém vedení na humnech má několik charakteristických stádií:

- mokrá hromada
- suchá hromada
- pukavka
- mladík
- stará hromada

Sladování klasickým způsobem vyžaduje rozsáhlé prostory a hodně namáhavé ruční práce, proto je nahrazováno pneumatickým sladováním, které lze rozdělit do 4 skupin (bubnová, skříňová, šachtová a horizontální klíčidla) (Rop a Hrabě, 2009). Typickým znakem pneumatického sladování ve srovnání s humnovým, je vysoká vrstva klíčícího zrna, která má za následek vysokou spotřebu energie pro nucenou ventilaci klimatizovaného vzduchu (Pelikán aj., 2002).

Konečným produktem klíčení je zelený slad, který má mít zdravou vůni, mírně zavadlé kořínky, správně vyvinutou střelku a má být rozluštěn. Podle vývinu střelky se rozeznávají krátké slady, zpravidla nedoluštěné a dlouhé slady, používané pro výrobu tmavých piv (Rop a Hrabě, 2009).

## 2.5 Hvozdění sladu

Hvozdění je technologický postup, při němž dochází ke snížení obsahu vody ve sladu pod 4 %. Snížením obsahu vody se slad stává skladovatelným a stabilním. Dochází k zastavení vegetačních pochodů (zastavení klíčení a dalšího luštění zrna), avšak enzymová aktivita zůstává v odpovídající míře zachována. Během hvozdění dochází k tvorbě charakteristických barevných a aromatických látek, jež jsou charakteristické pro jednotlivé druhy sladů a piv (Kosař a Procházka, 2002, Rop a Hrabě, 2009).

Vlastní proces hvozďení se provádí na hvozdech. Hvozdy mohou být rozděleny podle různých hledisek. Nejčastěji se však dělí podle počtu lísek (jednolískový, dvoulískový nebo třílískový) (Kosař a Procházka, 2002, Pelikán aj., 2002).

Z hlediska chemických a biochemických změn rozlišujeme 3 fáze hvozďení:

- růstová fáze
- enzymová fáze
- chemická fáze

Během růstové fáze stále ještě probíhají vegetační pochody včetně růstu kořínku a střelky. Tato fáze probíhá za teploty 40 °C a obsahu vody nad 20 %. Následuje fáze enzymová, která probíhá při obsahu vody pod 20 %. V této fázi se zvyšuje teplota na 60 °C a dochází k zastavení růstu kořínků a střelky, ale enzymové reakce probíhají nadále. Poslední fází je chemická fáze probíhající při teplotách nad 60 °C a vlhkosti pod 10 %. V zrně probíhají již pouze chemické reakce, jejichž výsledkem je tvorba barevných a aromatických látek charakteristických pro dané slady (Kosař a Procházka, 2002, Rop a Hrabě, 2009, Pelikán aj., 2002).

K nejdůležitějším reakcím během hvozďení patří tvorba barevných a aromatických látek. Tyto látky jsou dvojího charakteru (dusíkaté a bezdusíkaté). Látky obsahující dusík tzv. melanoidiny jsou sloučeniny vznikající při dotahování sladu při Maillardových reakcích. Melanoidiny mají sladovou aromatickou chuť a vůni, reagují kyselé a mají oxidačně – redukční vlastnosti. Barevné a aromatické látky bezdusíkaté tzv. melaniny vznikají karamelizací cukerných roztoků při termickém štěpení cukrů. Dále vznikají enzymovou oxidací polyfenolů a reduktonů (Kosař a Procházka, 2002).

## 2.6 Odkličování a skladování sladu

Na hvozďení navazuje odkličování sladu, při němž se slad zbaví kořínků zvaných sladový květ, který má vysoký obsah biologicky významných látek. Před expedicí se slad leští. Tímto krokem se získá výrobek čistého vzhledu za současného odstranění prachu a poškozených zrn.

Odkličený slad se uskladňuje na sladové půdy nebo do sil. Zde se slad nechává 4 až 6 týdnů dozrát. V této době slad mírně zvýší svou vlhkost důležitou k technologickému odležení (Kosař a Procházka, 2002, Rop a Hrabě, 2009).

## 2.7 Druhy sladu

### 2.7.1 slad český (plzeňský)

Surovinou pro výrobu plzeňského sladu jsou ječmeny s nízkým až středním obsahem bílkovin (do 11 %). Pro výrobu je charakteristické máčení zrna na 42 – 45 % vlhkosti. Na humně se vede tak, aby bylo dosaženo optimální rozluštění endospermu, při kratší strelce. Při hvozdění se slad předsouší při teplotě 40 – 50 °C po dobu 12 hodin, až do poklesu obsahu vody na 10 %. Potom se dosouší dalších 12 hodin, přičemž posledních 5 hodin se udržuje dotahovací teplota 80 °C (Pelikán aj., 2002, Rop a Hrabě, 2009).

### 2.7.2 slad bavorský (mnichovský)

Surovinou pro výrobu bavorského sladu jsou ječmeny bohatší na bílkoviny (12 % a více). Zrno se máčí na vyšší stupeň domočení (46 – 48 %) a na humně se vede tak, aby se dosáhlo velmi dobrého rozluštění zrna, přičemž strelka dosahuje 3/4 délky zrna, což trvá 6 – 7 dní. Tento slad se hvozdí dvakrát 24 hodin a teplota dotahování je 100 – 105 °C po dobu 4 – 5 hodin (Pelikán aj., 2002, Rop a Hrabě, 2009).

### 2.7.3 slad vídeňský

Tento slad tvoří přechod mezi sladem českým a bavorským, přičemž svými vlastnostmi se přibližuje více sladu českému. Hvozdění se vede tak, aby se slad na horní lísce částečně doložil. Teplota dotahování je vyšší než u sladu českého (Pelikán aj., 2002, Rop a Hrabě, 2009).

### 2.7.4 slad karamelový

Tento slad je charakteristický vysokým obsahem aromatických a barevných látek. Surovinou pro výrobu tohoto typu sladu je dobře rozluštěný zelený slad, který se vlhčí na 45 % vody, aby se při zahřívání vytvořilo dostatečné množství vodní páry nutné ke zcukření endospermu. Karamelizace probíhá ve speciálních bubnech při konečné teplotě 120 až 180 °C. Aroma karamelových sladů silně ovlivňuje složení v nich obsažených dusíkatých heterocyklických sloučenin (Basařová, 2010, Rop a Hrabě, 2009).

### 2.7.5 slad barevný

Barevný slad se používá k výrobě silně tmavých piv. Surovinou pro výrobu těchto sladů jsou hotové, navlhčené slady upražené za zvýšení teploty až na 225 °C. Technologickým postupem je docíleno vysoké tvorby melanoidinů a postupné degradace škrobu, který dává vznik dextrinům, karamelu a později hořkému Samaru (Basařová, 2010).

### 2.7.6 slad diastatický

Diastatický slad se používá při zpracování enzymově chudých sladů nebo při současném zpracování náhražek sladu. Pro jeho výrobu se používají ječmeny s vyšším obsahem dusíkatých látek (14 % a více). Na humně se vede při nízké teplotě 2 týdny do dosažení dokonalého zcukření. Tento slad obsahuje značný počet zcela vyklíčených zrn. Opatrným sušením při teplotě do 50 °C se zachovávají vysoké hodnoty diastatické mohutnosti (Basařová, 2010, Rop a Hrabě, 2009, Pelikán aj., 2002).

### 2.7.7 slad nakuřovaný

Tento speciální slad se používá k výrobě whisky skotského typu. Surovinou pro tento slad je ječmen s vyšším obsahem bílkovin. Výroba probíhá ve specializovaných sladovnách z ječného sladu sušeného přímými spaliny rašeliny, které dodávají sladu typické aroma související s vysokým obsahem fenolů těkajících s vodní párou (Basařová, 2010, Pelikán aj., 2002).

### 2.7.8 slad melanoidinový

Tento slad je typický svou intenzivně tmavou barvou. Této charakteristické vlastnosti se docílí nikoliv zvýšenou teplotou, ale intenzivnějším průběhem Maillardovy reakce, kterého se dosáhne zapařením sladu na teplotu 50 °C (Basařová, 2010, Rop a Hrabě, 2009, Pelikán aj., 2002). Melanoidinový slad má čistě sladovou vůni a chuť bez nahořklé příchuti typické pro barevné a karamelové slady (Basařová, 2010).

### 2.7.9 slad proteolytický

Proteolytický slad se vyrábí ze zeleného sladu skrápěním kulturou mléčných bakterií, takže obsahuje až 4 % kyseliny mléčné. Mléčné bakterie se poté ničí při hvozdnění sladu (Basařová, 2010, Rop a Hrabě, 2009, Pelikán aj., 2002) Tento slad využívají v zahraničí k úpravě pH rmutů (Rop a Hrabě, 2009, Pelikán aj., 2002).

## 2.8 Náhražky sladu

V některých zemích se nahrazuje slad levnějšími surovinami – náhražkami sladu, které se nazývají surogáty. V tradičních pivovarských zemích se používají omezeně, zpravidla pro výrobu speciálních piv. Používání surogátu je nejvíce rozšířeno především v Americe, Africe a Asii.

Škrobnaté surogáty představují nesladovaný ječmen, rýži nebo čirok cukrový. Jako náhražka sladu se při výrobě speciálních piv v Německu a Belgii používá pšenice. Vysokého použití zaznamenala kukuřice v oblastech Severní Ameriky a Asie.

Další možnou alternativou jsou cukernaté surogáty, které jsou oproti škrobovým snáze zpracovatelné, ale jsou dražší. K nim patří řepný cukr a třtinový cukr a různé glukózové a dextrinové sirupy (Kosař a Procházka, 2002, Rop a Hrabě 2009).

### 3 METODY STANOVENÍ AKRYLAMIDU V POTRAVINÁCH

Intenzivní výzkum v oblasti stanovení obsahu akrylamidu ve zpracovaných potravinách byl zahájen krátce po objevení akrylamidu, v tepelně opracovaných potravinách, švédskými vědci v dubnu 2002. V následujících letech se začalo vyvíjet množství metod, jimiž by bylo možno stanovit akrylamid, zvláště ve vodě, biologickém materiálu a tepelně upravovaných potravinách. Mnoho laboratoří začalo intenzivně pracovat na vývoji metody na základě LC – MS. Tato metoda byla založena hlavně na MS, jako rozhodující technice pro lepší identifikaci akrylamidu, ve spojení s kapalinovou nebo plynovou chromatografií. Nejprve byla použita analýza sloučeniny přímo, později byly vzorky derivatizovány (Gilbert and Senyuva, 2008).

Pro stanovení množství akrylamidu v potravinách jsou vhodné chromatografické metody, jako je plynová chromatografie (GS) nebo kapalinová chromatografie (LC) s využitím selektivních a specifických detektorů. Dalšími možnými metodami stanovení akrylamidu mohou být kapilární elektroforéza nebo bioanalytické metody, jimiž jsou imunoenzymatické testy (Oracz et al., 2011)

První publikace z oblasti analýzy akrylamidu v různých tepelně opracovaných potravinách byly zaměřeny na použití LC – MS metody. Byla použita metoda hmotnostní spektrometrie pro přímou detekci akrylamidu, která by jednoznačně ověřila přítomnost akrylamidu v řadě tepelně upravovaných potravin (Gilbert and Senyuva, 2008).

#### 3.1 Princip chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Podstatou chromatografického procesu je opakované ustavování rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi vzorku (mobilní a stacionární fází). Mobilní fáze je představována kapalinou nebo plynem, který unáší vzorek prostorem, v němž je nepohyblivá stacionární fáze. Při prostupu vzorku stacionární fází dochází k separaci složek vzorku na základě opakované interakce se stacionární fází. Složky vzorku jsou interakcí selektivně brzděny, míra brzdění je úměrná vazebné síle této interakce. Distribuci složky mezi mobilní a stacionární fází lze vyjádřit distribučním poměrem  $D$ , případně distribuční konstantou  $K_D$ , která vyja-

druje poměr koncentrace složky ve stacionární ( $c_s$ ), ke koncentraci složky v mobilní fázi ( $c_m$ ) (Fukal, 2006, Opekar, 2010).

$$K_D = c_s/c_m$$

Čím je hodnota distribuční konstanty vyšší, tím je složka více vázána stacionární fázi a déle zadržována v koloně. Složky vzorku lišící se  $K_D$  procházejí kolonou různou rychlostí, na základě které se separují. U složek se shodnými  $K_D$  nedochází k rozdělení. Hodnota distribuční konstanty nezávisí pouze na povaze látky, ale i na vlastnostech mobilní a stacionární fáze. Daná látka může být charakterizována různými hodnotami  $K_D$  v závislosti na použité mobilní a stacionární fázi (Opekar, 2010).

### 3.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek. Přesné rozdělení chromatografických metod není vždy jednotné, neboť někdy se při separaci uplatňuje více mechanismů, jindy zase není podstata separačního procesu zcela objasněna.

Podle skupenství mobilní fáze

- Plynová chromatografie
- Kapalinová chromatografie

Podle uspořádání stacionární fáze

- Kolonová chromatografie
- Plošná chromatografie
  - o Papírová
  - o Tenkovrstvá
- Vsádková chromatografie

Podle separačního principu

- Adsorpční chromatografie
- Rozdělovací chromatografie
- Iontově – výměnná chromatografie
- Gelová permeační chromatografie



- Bioafinitní chromatografie

Podle provozních podmínek

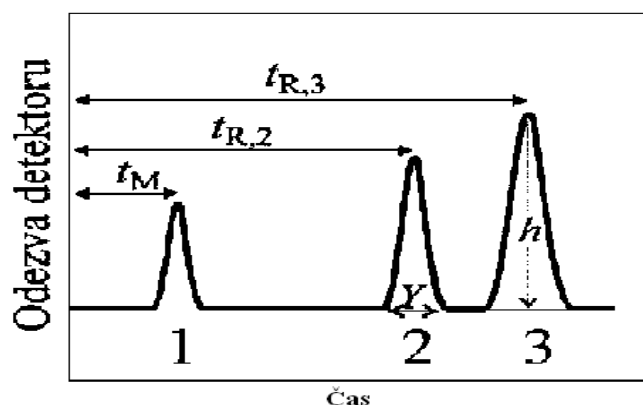
- Nízkotlaká chromatografie
- Středotlaká chromatografie
- Vysokotlaká chromatografie (Fukal, 2006, Klouda, 2003)

### 3.3 Základní parametry separace v kolonové chromatografii

Hodnocení separačních parametrů za získaných experimentálních dat závisí na typu použitého chromatografu. V případě použití kolonového chromatografu s detektorem je výsledkem analýzy záznam odezvy detektoru na čase – tzv. chromatogram. Chromatogram je tvořen soustavou tzv. chromatografických píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky.

Z chromatogramu je možno určit následující parametry:

- **retenční čas složky vzorku** – je vyjádřen časovým intervalem odpovídajícím době od nástřiku vzorku do okamžiku detekce, jeho hodnoty jsou udávány v jednotkách času
- **mrtvý retenční čas** – představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce u složky, jež není stacionární fází zadržována a pohybuje se rychlostí toku mobilní fáze
- **šířka chromatografického píku** – odečet této hodnoty se provádí na úrovni základní linie, šířka chromatografického píku se udává v jednotkách času
- **výška chromatografického píku** – představuje veličinu, jež určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza) (Opekar, 2010, Fukal, 2006)



Obr. 6. Příklad chromatogramu

### 3.4 Kvalitativní a kvantitativní analýza

#### 3.4.1 Kvalitativní analýza

Používá se k identifikaci jednotlivých složek separované směsi, závislé na typu použitého detektoru. Při použití spektrálního detektoru poskytujícího přímou strukturní informaci je identifikace látky odpovídající určitému píku možná na základě rozboru příslušného spektra. Běžné detektory tuto informaci neposkytují, přiřazení určité látky píku je nutno provést na základě porovnání a posouzení shody retenčních charakteristik identifikované složky vzorku a standardu (Opekar, 2010).

#### 3.4.2 Kvantitativní analýza

Principem kvantitativní analýzy je určení ploch chromatografických píků stanovované složky. Kvantitativní analýzu lze provádět 4 metodami:

**Metoda kalibrační přímky** – provádí se několik nástřiků standardů o různém obsahu stanovované složky, dále se sestrojí kalibrační křivka závislosti výšky (plochy) píku na koncentraci a z grafu se určí koncentrace stanovované složky ve vzorku

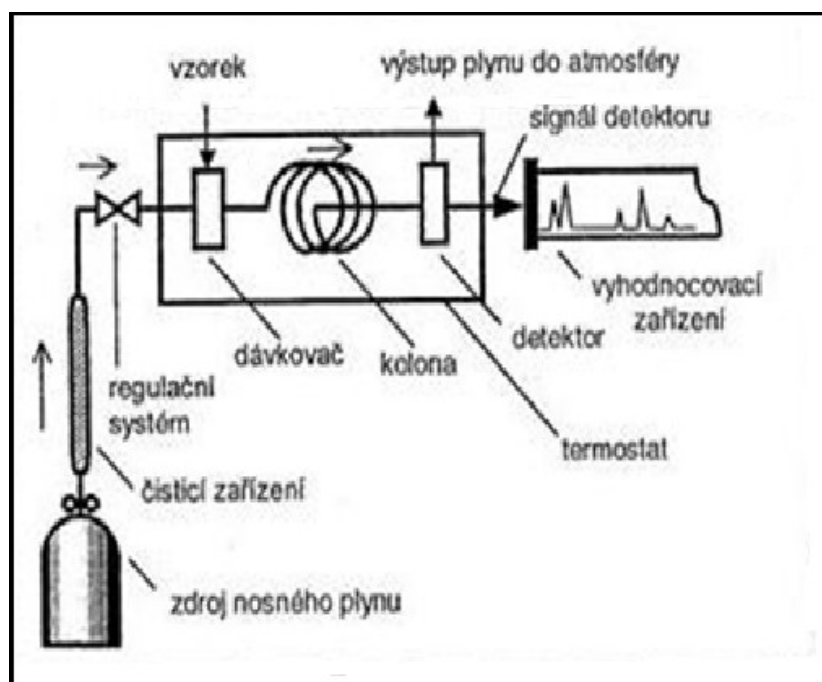
**Metoda standardního přidavku** – při této kalibrační metodě se standardní vzorek přidává přímo do vzorku s hledanou koncentrací

**Metoda vnitřní normalizace** – při této metodě je zjišťován podíl ploch píků stanovovaných látek k celkové ploše všech detekovaných píků

**Metoda vnitřní standardizace** – ke známému objemu vzorku je přidán známý objem standardní látky o definované molární koncentraci, přidávaný standard nesmí být přítomen v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku, musí eluovat v blízkosti píku stanovované složky a být dobře oddělen od všech složek vzorku (Opekar, 2010).

### 3.5 Plynová chromatografie

Metoda založená na separaci látek probíhající v kapilární nebo náplňové koloně, která obsahuje stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (nosný plyn). Plyná mobilní fáze zde slouží pouze k transportu analytu a neovlivňuje stacionární fázi (Motyka a Hlaváč, 2009).



Obr. 7. Schéma plynového chromatografu (Klouđa, 2003)

#### Instrumentace

##### 3.5.1 Stacionární fáze

V plynové chromatografii systému plyn – pevná látka je stacionární fází absorbent (aktivní uhlí, silikagel nebo molekulová síta), zatímco v chromatografii systému plyn – kapalina je

stacionární fázi kapalinový film zakotvený na inertním nosiči nebo vnitřní stěně kapiláry (Motyka a Hlaváč, 2009).

### 3.5.2 Nosný plyn

V plynové chromatografii se jako mobilní fáze používá inertní plyn. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev. K ideálním nosným plynům patří hélium, které se však často nepoužívá z důvodu vysoké ceny. Nejvíce používanými nosnými plyny jsou dusík, argon a vodík. Volba nosného plynu může záviset také na druhu kolony a použitém detektoru (Motyka a Hlaváč, 2009, Klouda, 2003).

### 3.5.3 Dávkovač vzorku

Dávkovací zařízení musí umožnit rychlé vpravení vzorku do kolony a dobrou reprodukovatelnost dávkování (Karlíček, 2007). Nástřik vzorku se provádí mikrostříkačkou přes pryžové těsnění a vzorek se vpraví do vyhřátého prostoru dávkovacího zařízení. Pro zabránění kondenzace vzorku je důležité, aby teplota dávkovače přesahovala bod varu nejméně těkavé analyzované složky vzorku alespoň o 50 °C (Karlíček, 2007, Opekar, 2010). Dávkování vzorku lze provádět několika technikami. Nejčastěji se používá dávkování s děličem toku (split inject), dávkování bez děliče toku (splitless inject), dávkování přímo do kolony (on column inject) a dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku (Motyka a Hlaváč, 2009)

### 3.5.4 Kolony

V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární separační kolony.

- ***Kolony náplňové***

Náplňové kolony jsou tvořeny do spirály stočenou kovovou nebo skleněnou trubicí o vnitřním průměru 2 – 4 mm a délce 2 – 6 m. Náplň těchto kolon je stacionární fáze, jež představuje absorbent (GSC) nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází (GLC) (Karlíček, 2007).

- ***Kolony kapilární***

Kapilární kolony jsou nejčastěji vyrobeny z křemene, který je potažen polyamidem. Toto potažení zvyšuje mechanickou odolnost kolon. Stacionární fáze je u kapilárních kolon na-

nesena na vnitřních stěnách kapiláry o vnitřním průměru 50 – 350  $\mu\text{m}$ . Délka kolon se pohybuje v rozmezí 15 – 100 m (Motyka a Hlaváč, 2009; Opekar, 2010).

Z hlediska charakteru stacionární fáze nanesené na vnitřní stěně kapiláry se rozlišují 3 způsoby pokrytí kolon stacionární fází:

WCOT – na vnitřní stěně kapilární kolony je zakotvena kapalná stacionární fáze

SCOT – kapalná stacionární fáze je zakotvena na povrchu pevného nosiče na vnitřní stěně kapiláry

PLOT – vrstva pevného aktivního sorbentu se nachází na vnitřním povrchu kapiláry (Motyka a Hlaváč, 2009)

### 3.5.5 Detektory

Detektor převádí výsledky dělení v chromatografické koloně na registrovatelnou formu. Obecným požadavkem je univerzálnost detekce pro všechny látky a vysoká citlivost (Karlíček, 2007).

- ***Teplotně vodivostní detektor***

Tento typ detektoru měří změny tepelné vodivosti mobilní fáze způsobené přítomností eluované látky (Štulík, 2004). Je tvořen tenkou kovovou spirálou, žhavenou průchodem elektrického proudu. Elektrický odpor spirály závisí na její aktuální teplotě, která je závislá na tepelné vodivosti okolí. Pokud se do prostoru detektoru dostane eluovaná látka vystupující z chromatografické kolony, dojde díky změně tepelné vodivosti prostředí ke změně teploty a elektrického odporu vlákna, velikost této změny je úměrná tepelné vodivosti a koncentraci této látky (Opekar, 2010).

- ***Plamenově ionizační detektor***

Podstata detekce spočívá v měření změny ionizačního proudu vodíko – vzduchového plamene způsobené přítomností eluovaného analytu (Štulík, 2004). Pokud je v plameni spálena látka vystupující z chromatografické kolony, počet iontů a elektronů v prostoru detektoru vzroste, vzroste elektrická vodivost prostředí a zvýší se hodnota procházejícího proudu. Velikost signálu detektoru závisí na typu a koncentraci detegované látky (Opekar, 2010). Tento detektor poskytuje odezvu na většinu organických látek, anorganické sloučeniny odezvu neposkytují (Opekar, 2010; Motyka a Hlaváč, 2009).

- ***Detektor elektronového záhytu***

Principem detekce je využití schopnosti eluovaných látek vytvořit negativní ion zachycením nízkoenergetického elektronu (Štulík, 2004). Zdrojem ionizace u tohoto typu detektoru je  $\beta$  – záření, nejčastěji  $^{63}\text{Ni}$  emitující rychlé elektrony. Elektrony způsobují ionizaci nosného plynu a dochází k emisi sekundárních elektronů o nízké energii (Opekar, 2010, Motyka a Hlaváč, 2009). Mezi kovovou stěnou detektoru zapojenou jako anoda a katodou prochází díky přítomnosti sekundárních elektronů elektrický proud. Pokud se do prostoru detekční cely dostane z výstupu chromatografické kolony látka pohlcující sekundární elektrony, dojde k poklesu jejich počtu a tedy i k poklesu procházejícího proudu. Pokles proudu závisí na typu a koncentraci látky vystupující z kolony. Detektor je citlivý na organické látky, halogeny a nitroskupiny (Opekar, 2010).

- ***Heliový ionizační detektor***

Principem detekce je ionizace heliovými atomy vzbuzenými do metastabilního stavu s vysokým ionizačním potenciálem. Detektor je citlivý na organické i anorganické sloučeniny (Motyka a Hlaváč, 2009).

- ***Hmotnostně spektrometrický detektor (MS)***

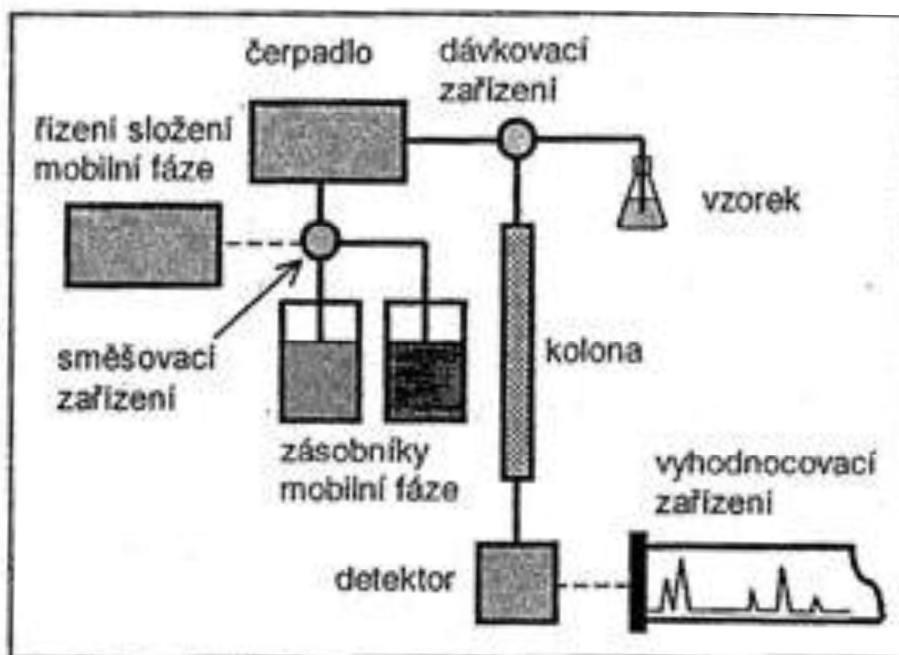
Tento detektor je vhodný pro identifikaci a kvantifikaci analyzovaných složek směsi. Organické molekuly jsou v MS detektoru ionizovány a fragmentovány a následně analyzovány kvadrupólovým analyzátozem nebo iontovou pastí. Výsledné hmotnostní spektrum obsahuje informace o intenzitě jednotlivých iontů. Vyhodnocení záznamu z MS detektoru se provádí porovnáním spektra s knihovnou MS spekter (Motyka a Hlaváč, 2009).

### **3.6 Chemická derivatizace v plynové chromatografii**

Derivatizace je cílená chemická reakce, která je prováděna za účelem zlepšení chromatografického chování, snížení polaritu analytu, blokováním polárních funkčních skupin. Může být také použita jako podpůrný důkaz identifikace domnělého analytu po převedení na vhodný derivát. Ke zlepšení účinnosti může dojít při odstranění nežádoucích vedlejších interakcí polárních skupin analytu na koloně, což vede k symetrickým, vyšším úzkým píčkům a snížení meze detekce (Klouda, 2003, Motyka a Hlaváč, 2009).

### 3.7 Vysokoučinná kapalinová kolonová chromatografie

Kapalinová chromatografie umožňuje dělení většiny organických i anorganických látek. Využívá se především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní. Mobilní fáze v případě kapalinové chromatografie hraje důležitou a aktivní roli. Podle mechanismu separace se používají rozpouštědla, případně jejich směsi, různé polarity, přičemž vlastnosti mobilní fáze jsou v systému s danou stacionární fází rozhodujícím faktorem, který ovlivňuje retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení (Motyka a Hlaváč, 2009). Separací kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutno použít přetlaku (Opekar, 2010).



Obr. 8. Schéma kapalinového chromatografu (Klouda, 2003)

#### Instrumentace

##### 3.7.1 Čerpadlo

Tok mobilní fáze je zajišťován vysokotlakým čerpádem. V HPLC jsou používány 3 druhy čerpadel.

- ***Pneumatické čerpadlo***

Zdrojem tlaku u pneumatického čerpadla je stlačený plyn, který může být v přímém kontaktu s kapalinou nebo je oddělen od kapaliny pístem nebo membránou (Motyka a Hlaváč, 2009).

- ***Lineární čerpadlo***

Lineární čerpadlo se skládá z vysokotlakého válce o objemu až 500 ml a pístu, který se pohybuje uvnitř válce. Mobilní fáze je před analýzou naplněna do válce a posuvem pístu následně vytlačována do dávkovacího ventilu a separační kolony. Hlavní výhodou tohoto čerpadla je bezpulsní provoz (Opekar, 2010, Motyka a Hlaváč, 2009), nedostatkem je nemožnost změny složení mobilní fáze během analýzy (Opekar, 2010).

- ***Reciproční čerpadlo***

V současnosti nejčastěji používaný typ čerpadla je reciproční čerpadlo. Píst ve válci periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi. Definovaný směr toku mobilní fáze ze zásobníku do dávkovacího ventilu a na kolonu zajišťuje dvojice kuličkových ventilů. V případě recipročních čerpadel dostáváme pulsni tok sinusového průběhu, a proto je třeba pulsni tok tlumit. Tlumení tlakových pulsů je možno dosáhnout zařazením druhého pracovního válce s pístem pracujícím v opačné periodě. U tohoto typu čerpadla je možno měnit složení mobilní fáze před jejím vstupem do pracovního válce (Opekar, 2010, Motyka a Hlaváč, 2009).

### **3.7.2 Směšovací zařízení**

Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace (Klouda, 2003, Karlíček 2007)

### **3.7.3 Dávkovací zařízení**

K dávkování se běžně používá šesticečný ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu. Nástřiková smyčka má daný objem, čímž je omezena maximální velikost nástřiku na kolonu. Používané ventily dosahují vysoké reprodukovatelnosti nástřiku (Motyka a Hlaváč, 2009).



### 3.7.4 Kolony

Kolony pro HPLC jsou ocelové nebo skleněné trubice 5 – 30 cm dlouhé o vnitřním průměru 2 – 8 mm naplněné stacionární fází. Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná (Karlíček 2007). Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází, obvykle oxidem křemičitým vhodné zrnitosti. Oxid křemičitý je chemicky modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin. Typ funkční skupiny určuje výslednou polaritu stacionární fáze. Jako stacionární fáze může být použit i granulovaný iontoměnič, tvořený nejčastěji síťovaným polystyrenem s navázanými kationogenními nebo anionogenními funkčními skupinami. Další možnou stacionární fází je použití mikroporézních sorbentů (Opekar, 2010).

### 3.7.5 Detektory

V metodě HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezi detekce a lineárním dynamickým rozsahem (Motyka a Hlaváč, 2009).

- ***Fotometrický detektor***

Fotometrický detektor umožňuje sledovat absorpenci látek vystupujících z chromatografické kolony. Přes stěnu květy prochází světelný paprsek přicházející ze zdroje přes fokusační čočku a štěrbinu. Typ světelného zdroje závisí na sledovaném oboru vlnových délek. Fotometrický detektor pracující v ultrafialové oblasti je pro organické látky univerzální (Opekar, 2010).

- ***Fluorescenční detektor***

Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření (Klouda, 2003). Detektor umožňuje dosáhnout velmi nízkých mezí detekce (Klouda, 2003, Opekar, 2010).

- ***Refraktometrický detektor***

Princip detekce je založen na měření rozdílu indexu lomu mezi mobilní fází a eluátem. Podmínkou přesného měření je nutnost udržovat konstantní teplotu (Klouda, 2003, Motyka a Hlaváč, 2009).

- *Hmotnostní detektor*

Specifické postavení mezi detektory pro HPLC má hmotnostní detektor, protože umožňuje nejen kvantitativní stanovení, ale poskytuje také kvalitativní informace o analytu. Základními součástmi hmotnostního detektoru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor iontů. V iontovém zdroji je neutrální částici vhodným způsobem dodáno dostatečné množství energie, aby došlo ke vzniku iontů. Nejčastěji se používají dva typy ionizace – elektrosprejem a chemická ionizace. Při separaci iontů ionty vstupují do analyzátoru, jímž bývá kvadrupólový analyzátor, iontová past nebo průletový analyzátor, kde dochází k jejich separaci podle poměru molární hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). K detekci iontů se používá nejčastěji elektronový násobič nebo fotonásobič (Motyka a Hlaváč, 2009).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Pomůcky a přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC ULTRA 2000 (Thermo Finnigan, USA)
- Hmotnostní spektrometr TRACE DSQ (Thermo Finnigan, USA)
- Kapilární kolona DB-WAX (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) (J&W Scientific, USA)
- Tlaková láhev Hélium – čistota 5.5 (Siad, ČR)
- Laboratorní sušárna Venticel 55 (BMT Medical Technology s.r.o., ČR)
- Laboratorní mlýnek MIAG (Miag, Německo)
- Analytické váhy GE 512 – OCE (Sartorius, Hamburg Německo)
- Mixér – Dispergátor DI 18 basic (IKA – WERKE GMBH & CO. KG, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S60 (ELMA, Německo)
- Centrifuga 3-16K (SIGMA, Německo)
- Centrifuga – Minispin (Eppendorf, Německo)
- Třepačka – TTS3 digital (IKA-WERKE GMBH & CO. KG, Německo)
- Chladnička (Liebherr, Německo)
- laboratorní sklo – Erlenmayerovy baňky (50 ml), odměrné baňky (150 ml), pipety (50 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml),
- automatické pipety (1 ml, 0,2 ml), Hamilltonova stříkačka, rtuťový teploměr, plastové mikrozkuhavky, skleněné vialky, víčka se septem

### 4.2 Chemikálie

- značený akrylamid (1,2,3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, 99 %), c (1 mg/ml) v metanolu (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA)
- bromid draselný, p.a. (ML Chemica, ČR)
- kyselina bromovodíková, c (47%), (Merck KGaA, Německo)
- brom, p.a. (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA)
- thiosíran sodný pentahydrát, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- etylacetát (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA)
- triethylamin –(99.5%), (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA)
- 2,3,-dibrompropionamid - c(1000 $\mu$ g/ml) v metanolu (Absolute Standards, Inc., USA)
- deionizovaná voda

Z uvedených chemikálií byly připraveny tyto roztoky:

- roztok  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci  $1 \text{ mol.l}^{-1}$
- bromová voda, která byla připravena rozpuštěním 1,5 ml  $\text{Br}_2$  v 50 ml deionizované vody

### 4.3 Pracovní postup

#### 4.3.1 Vzorky sladu

Jako surovina pro laboratorní pokus byl použit ječmen a z něj vyrobený zelený slad. Tento slad byl sušen a pražen v laboratorní sušárně v rozmezí teplot od 60 °C do 210 °C. Teplotní gradient sušárny byl 5 °C za hodinu. Vzorky byly odebírány po 10 °C (po 2 hodinách). Dále byl analyzován komerční vzorek ječmene a z něj vyrobený světlý slad ze sladovny Bernard.

Posledními vzorky, které byly použity pro analýzy, byly komerčně vyráběné speciální slady: karamelový, mnichovský, plzeňský, barvicí a žitný fermentovaný.

#### 4.3.2 Příprava vzorků sladu

K navážce 5 g pomletého vzorku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu izotopicky značeného akrylamidu a 50 ml deionizované vody o teplotě 60 °C. Směs byla homogenizována dispergátorem a následně extrahována 20 minut v ultrazvukové lázni. Po extrakci byla směs kvantitativně převedena do centrifugačních zkumavek a odstředěna po dobu 15 minut při 6500 otáčkách za minutu. Z centrifugačních zkumavek bylo odebráno pomocí automatické pipety 5 ml supernatantu, který byl použit k derivatizaci bromem. Derivatizace probíhala v Erlenmayerových baňkách, kde byly k supernatantu přidány 2 g bromidu draselného a kyselina bromovodíková (takové množství, aby výsledné pH bylo 0 – 1). Tato směs byla umístěna do chladničky. Po vychlazení byly přidány 2 ml bromové vody. Obsah byl důkladně promíchán a směs byla umístěna do nádoby s ledovou drtí na 10 hodin do chladničky, kde probíhala derivatizace vzorku.

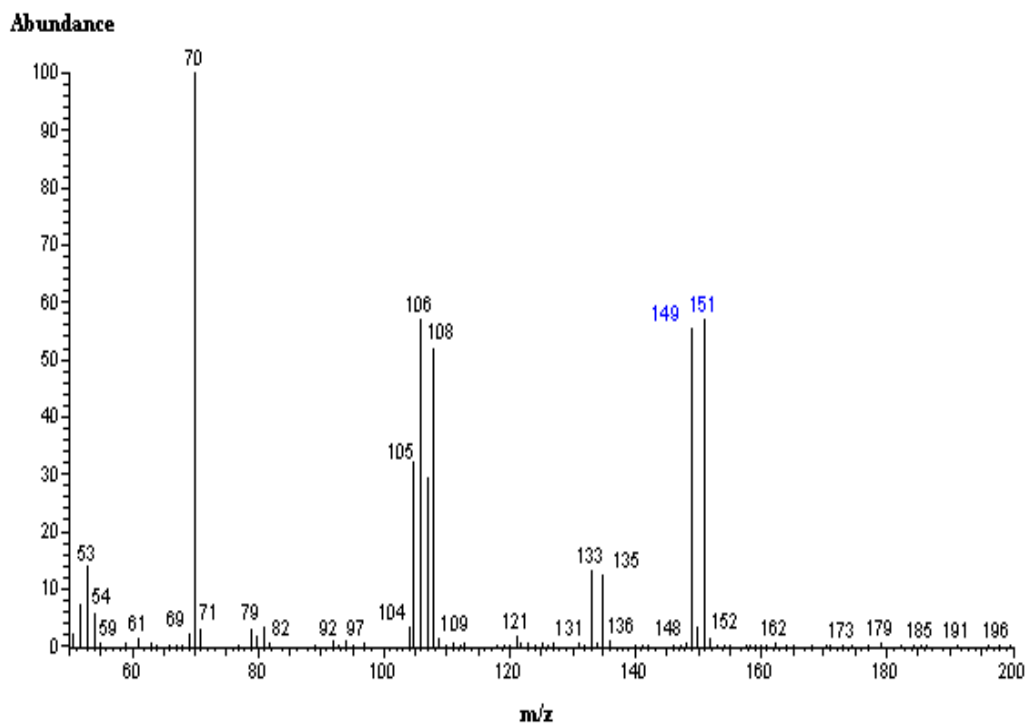
Po derivatizaci bromem byl přebytečný brom ztitrován 1M odměrným roztokem thiosíranu sodného a obsah baněk byl převeden do centrifugačních baněk, do kterých bylo přidáno 5 ml etylacetátu. Směs v centrifugačních zkumavkách byla intenzivně třepána po dobu 1 minuty a následovala 1 minuta klidu. Tento proces byl zopakován třikrát. Po důkladném promísení fází byl vzorek odstředěn při 5000 ot./min po dobu 5 minut. Z odstředěného vzorku byl pomocí automatické pipety odebrán z organické fáze 1 ml do plastových mi-

krozkumavek a přidán triethylamin o objemu 0,2 ml. Tato směs byla promíchána a po 15 minutách opět odstředěna při 5000 ot./min po dobu 5 minut. Obsah mikrozkumavek byl převeden do skleněných vialek a analyzován na GC/MS.

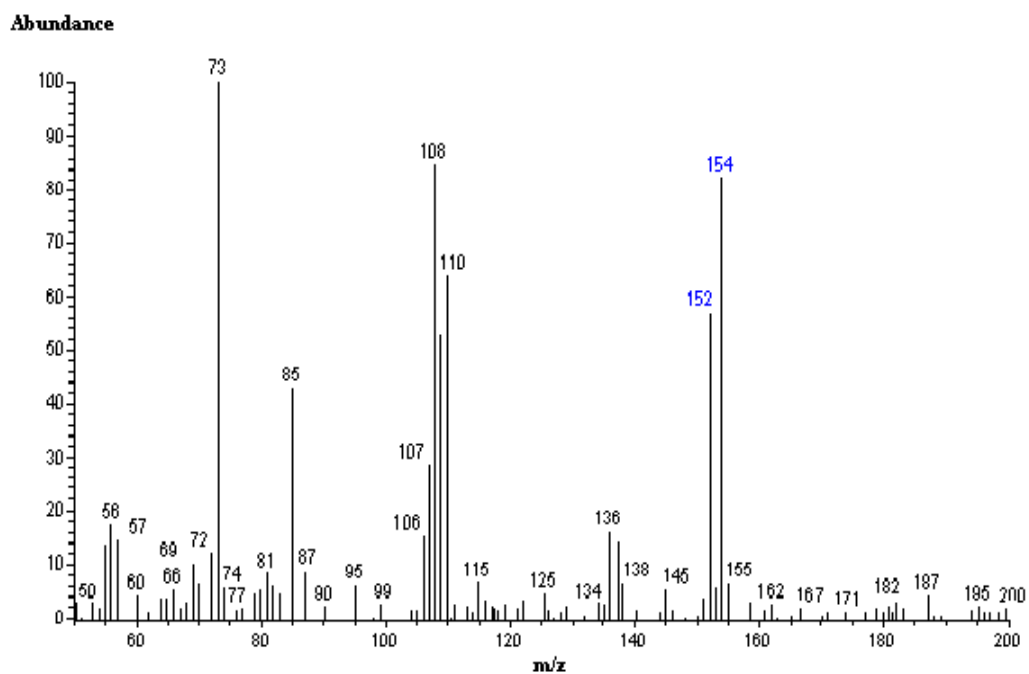
#### 4.4 Instrumentace a chromatografické stanovení

Ke stanovení bromovaného derivátu akrylamidu ve vzorcích sladu byl použit plynový chromatograf, kombinovaný s hmotnostním detektorem. Separace proběhla na kapilární koloně (délka kolony 30 m x 0,25 mm vnitřní průměr, tloušťka filmu 0,25  $\mu\text{m}$ ). Kolona byla udržována při 50 °C po dobu 1 minuty, poté byl zahájen teplotní program zvyšování teploty 15 °C/min do 150 °C po dobu 5 minut. Teplota teplotně programovatelného injektoru byla nastavena 200 °C - Splitless mód (1 minuta). Teplota transfer line byla 200 °C. Hmotnostně selektivní detektor pracoval v SIM módu, s pozitivní elektron impakt (EI) ionizací. Jako nosný plyn bylo použito hélium s průtokem 1,5 ml/min V těchto podmínkách byl retenční čas akrylamidu a ( $^{13}\text{C}_3$ ) akrylamid derivátu 15,21 min.

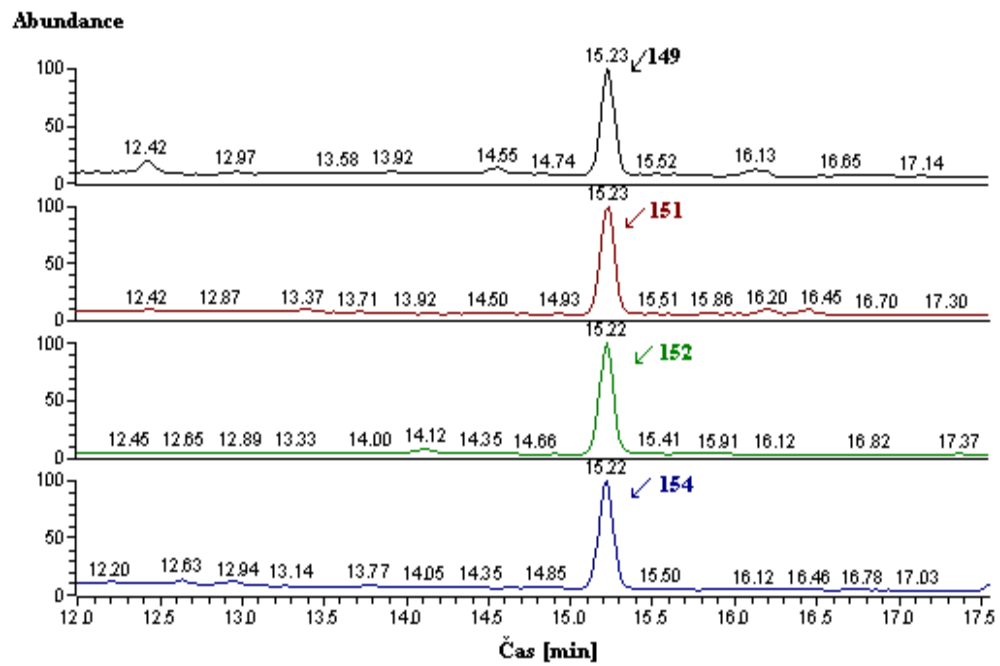
Identifikace 2 – brompropenamidu ze získaného hmotnostního spektra (obr. 9) byla provedena na základě retenčního času a pro 2 – brompropenamid specifických iontů m/z 149 a 151 (obr. 11). Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky. Pro spolehlivost a dosažení maximální selektivnosti byl použit jako vnitřní standard izotopicky značený akrylamid (1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ ), se specifickými ionty m/z 152 a 154 (obr. 11), jehož hmotnostní spektrum je uvedeno na obr. č. 10.



Obr. 9. Hmotnostní spektrum 2 – brompropenamidu



Obr. 10. Hmotnostní spektrum značeného akrylamidu ( $1,2,3 - ^{13}\text{C}_3$ )



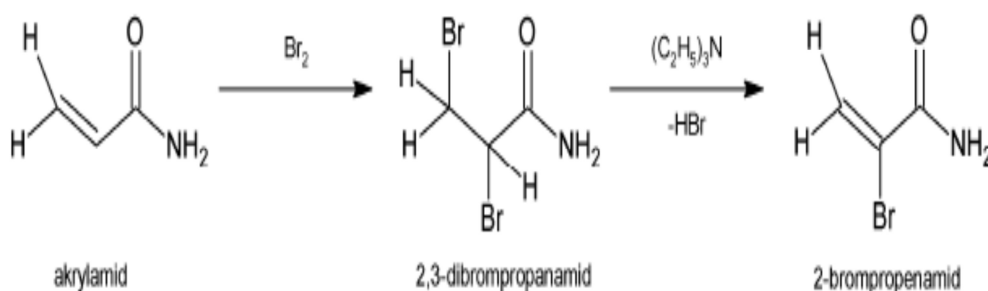
Obr. 11. Iontový chromatogram



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení obsahu akrylamidu ve sladu a ječmeni bylo provedeno metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií po derivatizaci bromem. Aplikace chromatografických technik v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) umožňuje současné oddělení izolované sloučeniny z matrice a kvantitativní stanovení.

Izolace a analýza akrylamidu v nativní formě není z důvodu jeho vysoké polaritě snadná. Navržený analytický postup využívá možnosti akrylamid derivatizovat. Na obr. 12 je znázorněna konverze akrylamidu na 2,3 – dibrompropionamid, která zahrnuje přidání bromidu draselného, kyseliny bromovodíkové a nasyceného vodného roztoku bromu (Pittet et al., 2004, Zhang et al., 2005).



Obr. 12. Derivatizace akrylamidu (Papoušek aj., 2013)

Reakce probíhá v kyselém prostředí bez přístupu světla a za teploty  $0\text{ }^\circ\text{C}$  nebo mírně nad bodem mrazu vody. Za těchto podmínek se pro dosažení reprodukovatelných výsledků doporučuje reakční doba okolo jedné hodiny (Keramat et al., 2011, Papoušek aj., 2013). Zpravidla se však bromace provádí v délce 10 hodin. Nadbytek bromu se odstraní titrací thiosíranem sodným, který je přidáván až do odbarvení roztoku. Vzniklý dibromovaný derivát je méně polární než původní akrylamid a je možné ho extrahovat do nepolárního organického rozpouštědla (etylacetátu). Z důvodu nedostatečné stability 2,3 – dibromopropanamidu je tato sloučenina převedena na stabilnější 2 – bromopropenamid přidávkem triethylaminu. Konverze probíhá téměř okamžitě při pokojové teplotě. Bylo prokázáno, že dehydrobromace je za těchto podmínek kvantitativní a reprodukovatelná (Zhang et al., 2005, Pittet et al., 2004, Keramat et al., 2011).

Hlavní nevýhodou při GC – MS bez derivatizace je nedostatek charakteristických iontů v hmotnostním spektru nederivovaného akrylamidu a rušení způsobené složením matrice. Ve spojení s vysokým šumem je nemožné získat nízké hodnoty meze detekce (Oracz et al., 2011).

Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 150-3100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s korelačním koeficientem 0,999. Výpočtem byla zjištěna mez stanovení (LOQ) na 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Jako mez stanovení (kvantitativní limit) je označována nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Obvykle bývá trojnásobkem detekčního limitu. Ke zjištění hodnoty LOQ se používají 2 metody:

- Metoda poměru signálu k šumu – porovnání změřeného signálu vzorku se známou nízkou koncentrací analytu a slepého vzorku. Obecně se za mez detekce považuje poměr signálu k šumu 2:1.
- Výpočtem dle vzorce

$$\text{LOQ} = 10h/S$$

$h$  - hodnota šumu základní linie v chromatogramu rozpouštědla použitého pro přípravu vzorku nebo chromatogramu placebo změřená v časovém intervalu ( $t_R$  dané látky) a vyhodnocená příslušným chromatografickým programem

$S$  – směrnice přímky získaná při měření linearitu u zkoušky čistoty pro závislost výšky píku na koncentraci analytu (Dohnal a Brusová, 2010)

Další hodnotou, kterou bylo nutno stanovit je mez detekce. Mez detekce (LOD) byla stanovena na 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Jako mez detekce je označována nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestanovované kvantitativně. Hodnotu LOD lze stanovit 2 způsoby:

- Metoda poměru signálu k šumu – porovnání změřeného signálu vzorku se známou nízkou koncentrací analytu a slepého vzorku. Obecně se za mez detekce považuje poměr signálu k šumu 10:1.
- Výpočtem dle vzorce

$$\text{LOD} = 3,3h/S$$

kde hodnoty  $h$  a  $S$  jsou vyjádřeny u výpočtu hodnoty LOQ (Dohnal a Brusová, 2010)

Výtěžnost vzorků obohacených izotopicky značeným ( $^{13}\text{C}_3$ ) akrylamidem se pohybovala v rozmezí 25 – 85 %. Tyto vysoké rozdíly výtěžnosti mohly být pravděpodobně

způsobeny širokým časovým rozmezím při zpracování série vzorků. Poslední zpracovaný vzorek před extrakcí v ultrazvuku měl teplotu 60 °C, ale první z připravovaných vzorků měl již teplotu nižší.

Výchozí surovinou pro přípravu sladu byl vzorek ječmene, který byl také analyzován na přítomnost akrylamidu. Výsledky analyzovaného ječmene jsou uvedeny v tab. 2. Ve vzorcích původní suroviny nebyla použitou metodou zjištěna přítomnost akrylamidu nebo se její hodnoty pohybovaly pod mezí detekce.

*Tab. 2. Obsah akrylamidu v ječmeni*

<b>Ječmen</b>	<b>Akrylamid [µg/kg]</b>
Vzorek A	< 25
Vzorek B	< 25
Průměr	< 25

Při závěrečné fázi výroby sladu, nazvané hvozdění je zelený slad nejprve předsoušen při teplotách pohybujících se v rozmezí 55 – 65 °C po dobu až 10 hodin. Již při těchto teplotách se začíná tvořit akrylamid. Po předsoušení následuje další fáze hvozdění – dotahování sladu. V této fázi dochází ke zvyšování teploty. Dotahovací teplota je pro každý druh sladu specifická. Pohybuje se v rozmezí 80 – 225 °C. Tato fáze hvozdění je velmi důležitá pro tvorbu aromatických a barevných látek, charakteristických pro druh sladu. Tvorbu těchto látek způsobují reakce neenzymového hnědnutí (Maillardovy reakce). Je důležité, že tyto reakce probíhají při vyšší teplotě a při vyšším obsahu vody. Čím rychleji dochází k odstranění vody při předsoušení při nízkých teplotách, tím méně se tvoří enzymatickými reakcemi nízkomolekulární látky, které se mohou podílet na reakcích neenzymového hnědnutí (Kosař a Procházka, 2010).

Analýzou byly porovnávány 2 typy sladů (Tab. 3). Z těže výchozí suroviny ječmene byl stejným způsobem připraven slad odklíčený a neodklíčený. Byla sledována závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění. Výsledky závislosti tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění u neodklíčeného sladu jsou znázorněny na obr. 13. Na následujícím obr. 14 je uvedena závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění u odklíčeného sladu.

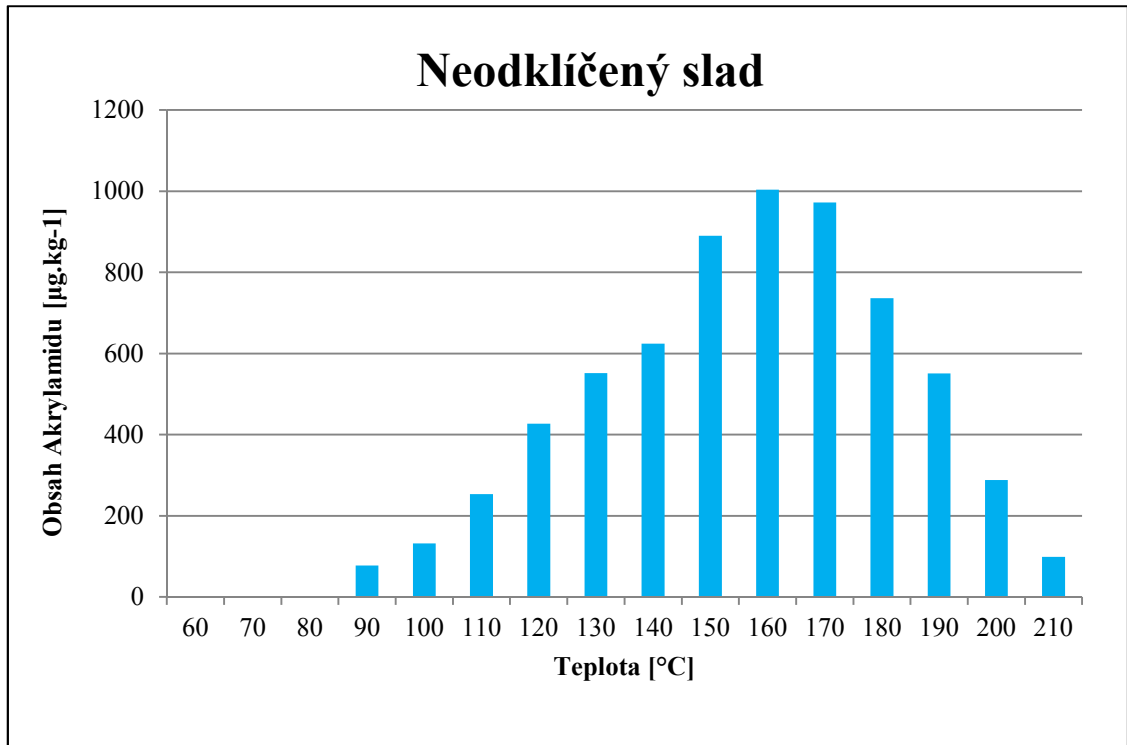
Tab. 3. Srovnání obsahu akrylamidu u sladu neodklíčeného a odklíčeného

Teplota Hvozdění	Akrylamid [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	
	Neodklíčený slad	Odklíčený slad
60 °C	0	0
70 °C	0	0
80 °C	0	30
90 °C	77	51
100 °C	132	63
110 °C	253	158
120 °C	427	351
130 °C	552	545
140 °C	624	633
150 °C	890	867
160 °C	1004	983
170 °C	972	1039
180 °C	736	750
190 °C	551	562
200 °C	288	283
210 °C	99	110

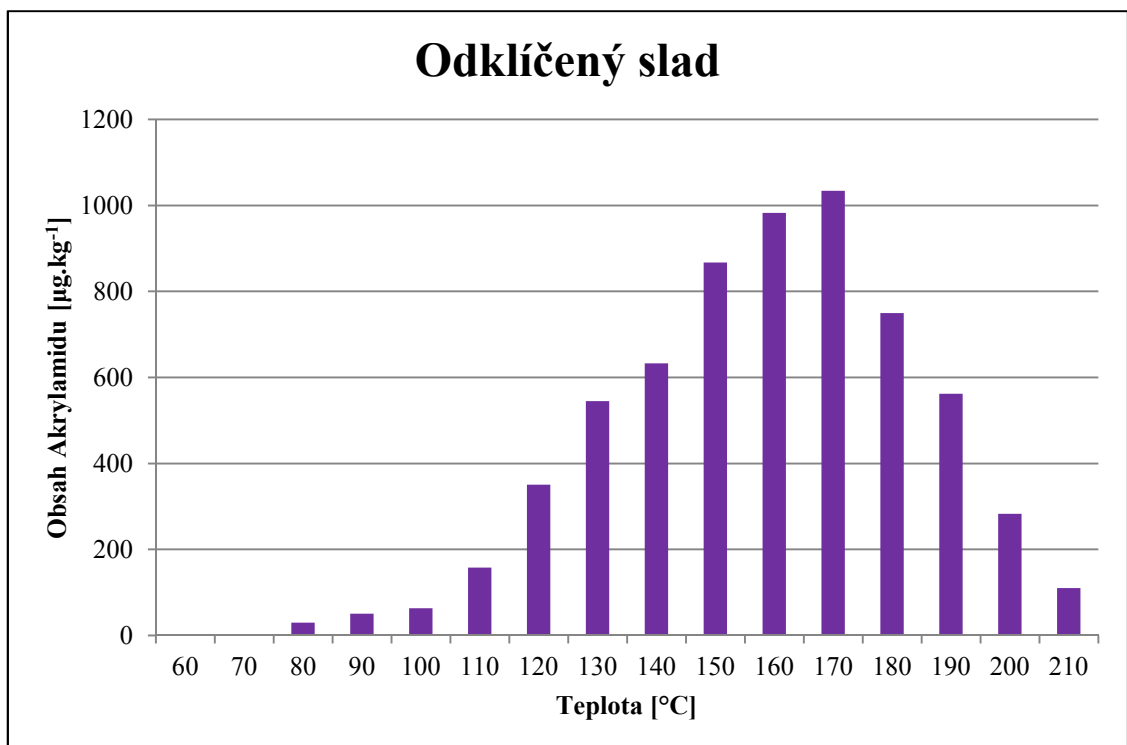
Z obr. 13 a obr. 14 je patrné, že přítomnost akrylamidu v odklíčeném sladu byla detekována již při teplotě 80 °C v množství 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , zatímco při téže teplotě u sladu neodklíčeného akrylamid detekován nebyl. Poté následuje zvýšení tvorby akrylamidu s rostoucí teplotou u obou typů sladů. Maximální tvorba akrylamidu byla zjištěna v teplotním intervalu 150 – 170 °C. Pak následuje pokles tvorby akrylamidu. Nejvyšší hodnoty 1004  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u sladu neodklíčeného bylo dosaženo při teplotě 160 °C, zatímco u sladu odklíčeného bylo nejvyšší množství akrylamidu 1039  $\mu\text{g}/\text{kg}$  detekováno při teplotě 170 °C.

Rozdílné hodnoty akrylamidu u sladu odklíčeného neodklíčeného v rozmezí teplot 80 – 120 °C jsou pravděpodobně způsobeny špatnou homogenizací vzorku. Dalším možným vysvětlením je fakt, že hodnoty jsou závislé na výtěžnosti nebo se jedná o nereprodukovatelné teploty.

Snížení tvorby akrylamidu při vyšších teplotách lze odůvodnit tím, že akrylamid jako meziprodukt Maillardovy reakce dále reaguje za vzniku dalších sloučenin reakcí neenzymatického hnědnutí (Mikulíková aj., 2008).



Obr. 13. Závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění u neodklíčeného sladu



Obr. 14. Závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění u odklíčeného sladu

Bartáčková aj. (2009) sledovali ve své práci vliv teploty pražení na obsah akrylamidu v různých odrůdách ječmene. Nejvyšších hodnot akrylamidu bylo dosaženo obdobně v rozmezí teplot 160 – 170 °C.

Dalšími autory, kteří se zabývali vlivem pražení na obsah akrylamidu v obilovinách a sladech, jsou Jirsa aj. (2008). V této práci analyzovali různé druhy obilovin včetně ječmene. Vzorky byly praženy po dobu 15 minut při různé teplotě. Obsah akrylamidu byl nejvyšší při teplotě 160 °C. Tyto výsledky se shodují s výsledky, jež byly zjištěny analýzou v této práci.

Dalšími vzorky, které byly analyzovány, byly vzorky světlého sladu, které byly vyrobeny z komerčního ječmene. Tento slad byl odebírán v průběhu sladování. 2 vzorky byly odebrány na začátku hvozdní při teplotě 60 °C. První vzorek byl odebrán z vrchní vrstvy lísky, druhý vzorek byl odebrán v témže čase a při téže teplotě ze spodní části lísky. Další 2 vzorky byly odebrány na konci hvozdní, opět byly odebrány z vrchní a spodní části lísky. Tyto 2 vzorky sladu byly dotahovány při teplotě 80 °C.

Analýzou nebyla prokázána přítomnost akrylamidu u žádného z použitých vzorků nebo se obsah akrylamidu pohyboval pod mezí detekce.

Posledními slady, které byly použity pro analýzu, byly speciální a barevné slady (Tab. 4). Obr. 15 znázorňuje obsah akrylamidu v těchto sladech. U vzorku plzeňského sladu nebyla prokázána přítomnost akrylamidu nebo se její hodnoty pohybovaly pod mezí detekce. Absence přítomnosti akrylamidu u plzeňského sladu je pravděpodobně způsobena nízkou teplotou předsoušení (40 – 50 °C) a dotahovací teplotou (80 – 85 °C). Dalším vzorkem světlého sladu, který byl použit k analýze, byl mnichovský slad. Tento typ sladu obsahoval vyšší množství akrylamidu ve srovnání s plzeňským sladem, což je způsobeno vyšší teplotou dotahování (100 – 105 °C). Stanovená hodnota akrylamidu je v souladu s teplotní závislostí tvorby akrylamidu v průběhu sladování.

Žitný fermentovaný slad má nižší hodnoty akrylamidu než ječný slad připravovaný při stejné teplotě. Nižší obsah akrylamidu je pravděpodobně způsoben odlišným obsahem asparaginu a redukujících cukrů v rozluštěném žitném sladu.

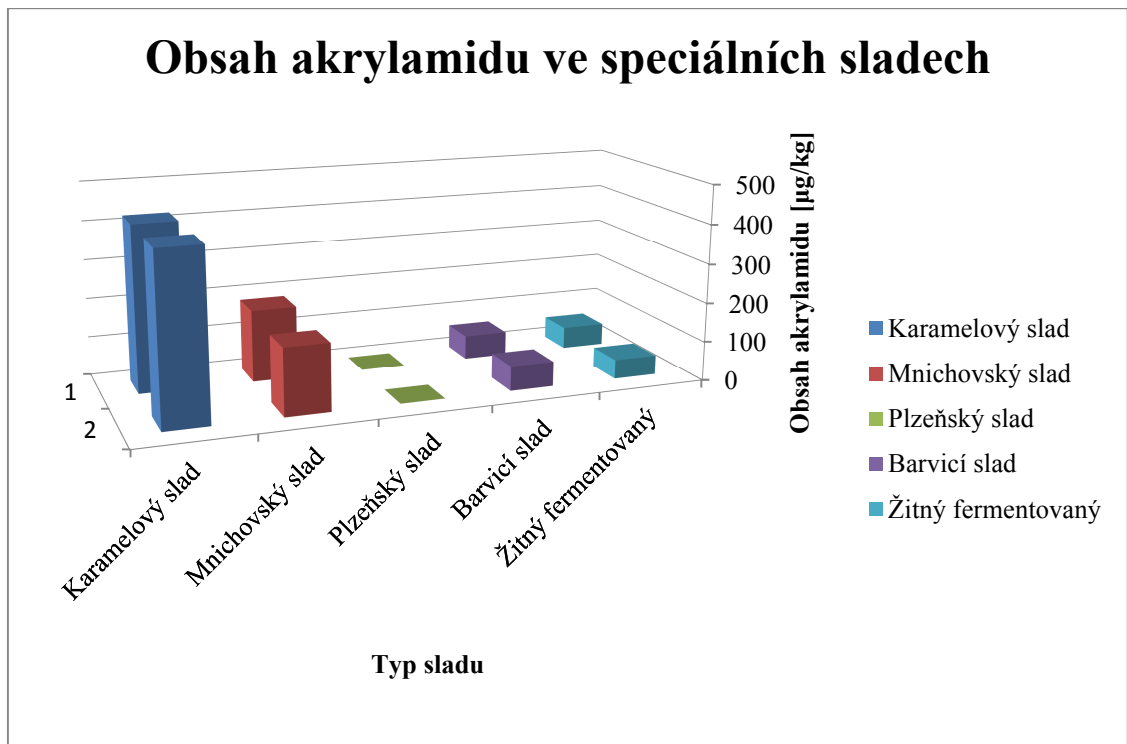
Tab. 4. Obsah akrylamidu ve speciálních sladech

Typ sladu	Akrylamid [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]		
	Vzorek A	Vzorek B	Průměr
Karamelový slad	424	427	425
Mnichovský slad	184	171	177
Plzeňský slad	0	0	0
Barvicí slad	61	63	62
Žitný fermentovaný slad	56	49	53

Tvorbu akrylamidu v barevných sladech, které se typicky připravují pražením sušeného sladu, je možné srovnávat s procesem pražení kávy. Nejvyšší obsah akrylamidu byl stanoven ve sladu karamelovém 425  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Karamelový slad je typický vysokým obsahem aromatických a barevných složek. Vyrábí se z dobře rozluštěného zeleného sladu nebo hotového sladu jeho ovlhčením, aby se při zahřívání v rychlopražičích vytvořilo dostatečné množství vodní páry, potřebné ke zcukření endospermu při teplotě 70 – 75 °C. Pak následuje vlastní karamelizační proces při teplotě 120 – 180 °C (Pelikán aj., 2002). Stanovená vysoká hodnota akrylamidu odpovídá způsobu výroby karamelového sladu a je v souladu se zjištěním teplotní závislosti tvorby akrylamidu v průběhu hvozdění.

Barvicí slad se vyrábí z hotového sladu po ovlhčení v rychlopražičích tak, že se nechá nejprve zcukřit při teplotě 60 – 80°C, poté se zvyšuje teplota hvozdění až na 200 – 225 °C. Nízkou hodnotu obsahu akrylamidu u tohoto typu sladu lze zdůvodnit, že vzniklý akrylamid je v průběhu Maillardovy reakce odbouráván za vzniku dalších sloučenin neenzymatického hnědnutí. Detekované množství opět koreluje s hodnotami teplotní závislosti tvorby akrylamidu v průběhu sladování.

Mikulíková a Sobotová (2007) se ve své práci zabývaly stanovením akrylamidu ve speciálních sladech. V této práci obdobně analyzovaly světlé slady, žitný slad a karamelový slad. Výsledky žitného a karamelového sladu jsou srovnatelné s výsledky uvedenými v této práci. Hodnoty pro světlé slady uvádějí vyšší než hodnoty, jež byly stanoveny v této práci.



Obr. 15. Obsah akrylamidu ve speciálních sladech



## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledování obsahu akrylamidu v průběhu hvozdění u sladu odklíčeného a neodklíčeného. Z výchozí suroviny ječmene byly za stejných podmínek připraveny slady odklíčené a neodklíčené. Tyto slady byly sušeny a praženy v laboratorní sušárně v rozmezí teplot od 60 °C do 210 °C. Poté byly vzorky analyzovány metodou plynové chromatografie v kombinaci s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru.

Analýzou vzorků sladu odklíčeného a neodklíčeného byla prokázána závislost obsahu akrylamidu na teplotě hvozdění. Výskyt akrylamidu byl prokázán od teploty 80 °C. Se zvyšující se teplotou narůstal obsah akrylamidu. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo v rozmezí teplot 160 – 170 °C. Při ještě vyšších teplotách obsah akrylamidu začal klesat. Tento fakt je způsoben vstupem akrylamidu do dalších reakcí neenzymatického hnědnutí. Analýzou výchozí suroviny ječmene nebyla prokázána přítomnost akrylamidu.

Další vzorky, které byly použity pro analýzy, byly vzorky z komerčně vyráběného sladu ze sladovny Bernard. U těchto vzorků se hodnoty pohybovaly pod mezí detekce této metody (< 25 µg/kg).

Posledními vzorky, které byly použity pro analýzy, byly komerčně vyráběné speciální slady: karamelový, mnichovský, plzeňský, barvicí a žitný fermentovaný. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny u sladu karamelového. Vyšší hodnoty u tohoto typu sladu korelují s vyššími teplotami hvozdění při přípravě tohoto sladu. Naopak u sladu Plzeňského typu se hodnoty pohybovaly pod mezí detekce této metody (< 25 µg/kg).

Provedenými analýzami za použití metody plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií byla prokázána závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění sladu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- (1) BARTÁČKOVÁ, V., JIRSA, O., BUCHER, P. aj. Akumulace akrylamidu v praženém zrně různých druhů obilovin. *Acta fytotechnica et zootechnica Mimořádné číslo*. 2009, s. 30-36.
- (2) BASAŘOVÁ, G., *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 2010. 863 s. ISBN 978-807080-734-7.
- (3) CIESAROVÁ, Z. Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 7, s. 483 – 491.
- (4) CLAUS, A., CARLE, R., SCHIEBER, A. Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*. 2008, vol. 47, no. 3, p. 118 – 133.
- (5) DOHNAL, J., BRUSOVÁ, H. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. 1.vyd. Praha: Farmaceutická fakulta VFU Brno, 2010. 500 s. ISBN 978-80-7305-085-6.
- (6) ERIKSSON, S. *Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology*, Ph.D. Thesis. Stockholm: Stockholm University, Department of Environmental Chemistry, 2005, 91 p.
- (7) EVROPSKÁ KOMISE: Doporučení Komise ze dne 10. ledna 2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách, K (2010), Brusel, 2011
- (8) EVROPSKÁ KOMISE: Doporučení Komise ze dne 2. června 2010 o monitorování množství akrylamidu v potravinách
- (9) EVROPSKÁ KOMISE: Doporučení Komise ze dne 3. května 2007 o monitorování množství akrylamidu v potravinách
- (10) FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, no. 16, p. 4504 – 4526.

- (11) FUKAL, L., *Bioanalytické metody pro fyziky*. Praha: VŠCHT, 2006. 309 s. ISBN 80-7080-611-7.
- (12) GILBERT, J., SENYUVA, H. *Bioactive compounds in foods*. 1. ed., Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 409, ISBN 978-1-4051-5875-6.
- (13) CHLÁDEK, L., *Pivovarnictví*. 1.vyd. Praha: Grada, 2007, 207 s., 8 s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-1616-9.
- (14) JIRSA, O., BARTÁČKOVÁ, V., BUCHER, P., Vliv pražení na obsah akrylamidu v obilovinách a sladech. XXI. *biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu*. 2008. s. 90.
- (15) KARLÍČEK, R. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3.vyd. Praha: Karolinum, 2007. 281 s. ISBN 978-80-246-1453-3.
- (16) KERAMAT, J., LEBAIL, A., PROST, C., et al. Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food Bioprocess Technology*, 2011, vol. 4, no. 3, p. 340-363.
- (17) KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- (18) KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva*. 1.vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- (19) MIKULÍKOVÁ, R., SOBOTOVÁ, K., Determination of Acrylamide in Malt with GC/MC. *Acta Chimica Slovenica*. 2007, vol. 54, no. 1, p. 98-101.
- (20) MIKULÍKOVÁ, R., SVOBODA, Z., BĚLÁKOVÁ, S., aj. Sledování akrylamidu v průběhu sladování a v pivu. *Kvasný průmysl*. 2008, roč. 54, č. 6, s. 181 – 185.

- (21) MOTTRAM, D.S., WEDZICHA, B.L., DODSON, A.T. Acrylamide is formed in Maillard reaction. *Nature*, 2002, vol. 419, no. 6906, p. 448.
- (22) MOTYKA, K., HLAVÁČ, J. *Stručný přehled separačních metod*. 1.vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- (23) *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme: Acrylamide*, Australia, 2002, [cit. 2013-26-05] <<http://www.nicnas.gov.au/>>. ISBN 0-642-50189-0.
- (24) OPEKAR, F. *Základní analytická chemie*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2010. 203 s. ISBN 978-80-246-1775-6.
- (25) ORACZ, J., NEBESNY, E., ŻYŻELEWICZ, D. New trends in quantification of acrylamide in foods products. *Talanta*. 2011, vol. 86, no. 1, p. 23 – 34.
- (26) OTHMER, D.F., KIRK, R.E. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2. ed., New York: John Wiley & Sons, 1972. vol. 1, p. 274 – 284.
- (27) PAPOUŠEK, R. NOVÁKOVÁ, P., MARKOVÁ E., aj. Analýza akrylamidu metodu GC-MS. *Chemické listy*. 2013, roč. 107, č . 3, s. 255 – 260.
- (28) PELIKÁN, M., DUDÁŠ, F., MÍŠA, D. *Technologie kvasného průmyslu*. 2.nezm. vyd. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2002. 129 s. ISBN 80-7157-578-X.
- (29) PITTET, A. PÉRISSET A., OBERSON, J.M. Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1035, no. 1, p. 123 – 130.
- (30) ROP, O., HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1.vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.

- (31) Směrnice Rady: 98/83/ES ze dne 3. Listopadu 1998 o jakosti vody určené k lidské spotřebě
- (32) STADLER, R.H., BLANK, I., VARGA, N., et al. Acrylamide from Maillard reaction product. *Nature*. 2002, vol. 419, no. 6906, p. 449 – 450.
- (33) STADLER, R.H., ROBERT, F., RIEDIKER, S. et al. In-Depth Mechanistic Study on the Formation of Acrylamide and Other Vinylogous Compounds by the Maillard Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, vol. 52, no. 17, p. 5550-5558.
- (34) STUDER, A., BLANK, I., STADLER, R.H. Thermal Processing Contaminants in Foodstuffs and Potential Strategies of Control. *Czech Journal of Food Science*. 2004, vol. 22, special no., p. 1-10.
- (35) ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- (36) ŠUCMAN, E., VESELÁ, H. Akrylamid – endogenní kontaminant potravin. *Veterinářství*. 2012, roč. 62, č. 10, s. 644-646.
- (37) TAEYMANS, D. WOOD, J., ASHBY, P. et al. A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation, and Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, vol. 44, no. 5, p. 323 – 347.
- (38) VATTEM, D.A., SHETTY, K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2003, vol. 4, no. 3, p. 331 – 338.
- (39) VELÍŠEK, J. *Chemie potravin II.*, rozš. a přep. 3.vyd. Tábor: OSSIS 2009. 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

- (40) Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004Sb. Kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody
- (41) Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy
- (42) YASUHARA, A., TANAKA, Y., HENGEL, M., et al. Gas Chromatographic Investigation of Acrylamide Formation in Browning Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, no. 14, p. 3999 – 4003.
- (43) YAYLAYAN, V.A, WNOROWSKI, A., LOCAS, C.P. Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, no. 6, p. 1753 – 1757.
- (44) YONG HONG, CH., EN-QUI, X., XIANG-RONG, X. et al. Evaluation of Acrylamide in Food from China by a LC/MS/MS Method, *International Journal of Environmental Research Public Health*. 2012, vol. 9, no. 11, p. 4150 – 4158.
- (45) ZHANG, Y., ZHANG, G., ZHANG, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1075, no. 1-2, p. 1 – 21.
- (46) ZYZAK, D.V., SANDERS, R.A, STOJANOVIC, M. et al. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, no. 16, p. 4782 – 4787.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

LC	Kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
MS	Hmotnostně spektrofotometrický detektor
JIFSAN	Spojený ústav pro bezpečnost potravin a aplikovanou výživu
NCFST	Národní centrum pro bezpečnost potravin a technologie
3 – APA	3 – aminopropanamid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GSC	Chromatografie v systému plyn – pevná látka
GLC	Chromatografie v systému plyn – kapalina
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Strukturální vzorec Akrylamidu.....	12
Obr. 2. Mechanismus tvorby akrylamidu z asparaginu v přítomnosti $\alpha$ – hydroxykarbo- nylových sloučenin.....	15
Obr. 3. Termální degradace asparaginu.....	16
Obr. 4. Hypotetický mechanismus vzniku akrylamidu z lipidů.....	17
Obr. 5. Sladovnický ječmen.....	22
Obr. 6. Příklad chromatogramu.....	34
Obr. 7. Schéma plynového chromatografu.....	35
Obr. 8. Schéma kapalinového chromatografu.....	39
Obr. 9. Hmotnostní spektrum 2 – brompropenamidu.....	47
Obr. 10. Hmotnostní spektrum značeného akrylamidu (1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ ).....	47
Obr. 11. Iontový chromatogram.....	48
Obr. 12. Derivatizace akrylamidu.....	49
Obr. 13. Závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění u neodklíčeného sladu.....	53
Obr. 14. Závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění u odklíčeného sladu..	53
Obr. 15. Obsah akrylamidu ve speciálních sladech.....	56



**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Rozpustnost akrylamidu při 30 °C.....	12
Tab. 2. Obsah akrylamidu v ječmeni.....	51
Tab. 3. Srovnání obsahu akrylamidu u sladu neodklíčeného a odklíčeného.....	52
Tab. 4. Obsah akrylamidu ve speciálních sladech.....	55