

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLÍKOVÝCH V POTRAVINÁCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

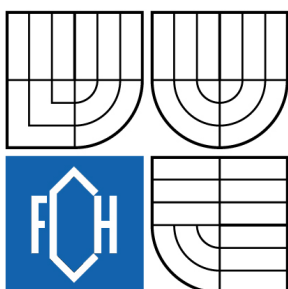
AUTHOR

JAN RYŠAVÝ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHĻOVODÍKŮ V POTRAVINÁCH

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN FOODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

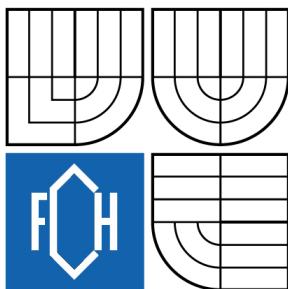
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JAN RYŠAVÝ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. PETER ŠIMKO, DrSc.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce	FCH-BAK0105/2006	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Ryšavý Jan	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí bakalářské práce	prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.	
Konzultanti bakalářské práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	

Název bakalářské práce:

Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v potravinách

Zadání bakalářské práce:

Příčiny vzniku a výskytu polycyklických aromatických uhlovodíků v potravinách

Izolačné postupy získavania polycyklických aromatických uhlovodíkov z potravinovej matrice

Analytické metódy stanovenia obsahu polycyklických aromatických uhlovodíkov v potravinách

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2007

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jan Ryšavý
student(ka)

prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v
potravinách

BRNO 2008

JAN RYŠAVÝ

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje problematice příčin vzniku a výskytu polycyklických aromatických uhlovodíků v potravinách. Cílem práce bylo zpracovat a porovnat izolační postupy získávání polycyklických aromatických uhlovodíků z potravinové matrice a diskutovat analytické metody stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v potravinách.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the problematics of origin and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. The objectives of my thesis were to summarise and compare isolating procedures for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from food matrix and discuss analytical methods applied to determination of content of polycyclic aromatic hydrocarbons in food.

KLÍČOVÁ SLOVA

polycyklické aromatické uhlovodíky, plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, potraviny

KEYWORDS

polycyclic aromatic hydrocarbons, gas chromatography, high performance liquid chromatography, food

RYŠAVÝ, J. *Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 57 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval prof. Ing. Peteru Šimkovi, DrSc. za maximálně odborné vedení, poskytnutí mnoha materiálů, pomoc při problémech a hlavně trpělivost a ochotu při zpracování této bakalářské práce.

Obsah:

1. ÚVOD	7
2. POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY, CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI	8
2.1 Vlastnosti	10
2.2 Použití	11
2.3 Dopady na zdraví člověka, rizika	11
3. VZNIK PAU V POTRAVINÁCH	13
3.1 Vznik PAU	13
3.2 Vznik derivátů PAU	15
3.3 Zdroje expozice člověka	15
3.4 Zdroje v potravinách	16
3.5 Výskyt v surovinách, zdroje v potravinách	17
3.6 Technologické a kulinární procesy	17
3.6.1 Uzení	17
3.6.2 Grilování	20
3.6.3 Pražení, sušení	22
4. LEGISLATIVNÍ ASPEKTY PAU V POTRAVINÁCH.....	23
5. METODY POUŽÍVANÉ KE STANOVENÍ PAU.....	25
5.1 Příprava vzorků	28
5.2 Chromatografie	30
5.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě	30
5.2.2 Plynová chromatografie	30
5.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí.....	38
6. ZÁVĚRY.....	48

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	50
8. SEZNAM SYMBOLŮ	55

1. ÚVOD

Za určitých podmínek mohou v potravinách vznikat nebo do nich z vnějšího prostředí pronikat látky, které mohou působit negativně na zdraví člověka. Pro látky, které se do potravy dostaly neúmyslně v zemědělské prvovýrobě, při skladování, dopravě, prodeji, ale i během technologického nebo kulinárního zpracování, případně v důsledku znečištění životního prostředí, se vymezuje pojem látky znečišťující, látky kontaminující nebo potravinové kontaminanty. Ty se často rozlišují na kontaminanty primární čili exogenní, pocházející z vnějších zdrojů, a kontaminanty sekundární neboli endogenní, vznikající v potravině vlivem různých fyzikálních a chemických vlivů.

V zásadě lze okolnosti, za kterých dochází k primární (exogenní) či sekundární kontaminaci potravního řetězce člověka organickými a anorganickými škodlivinami, shrnout do následujících bodů:

➤ zemědělská produkce

používání pesticidních přídatků (tzv. moderní pesticidy)

hnojení (toxické kovy, zvláště Cd)

imisní zátěž, tj. dálkový transport (perzistentní organochlorové sloučeniny jako PCB, PAU, aj., estery ftalové kyseliny, toxické kovy)

napadení mikroorganismy, zejména plísněmi (mykotoxiny)

veterinární ošetření (léčiva, pesticidy aj.)

➤ skladování a zpracování

posklizňová aplikace pesticidů (hlavně organofosfáty a pyrethroidy)

vznik toxických degeneračních produktů z relativně netoxických pesticidů

(ethylthiomočovina, *N,N*-dimethylhydrazin)

napadení mikroorganismy (mykotoxiny, bakteriální toxiny)

některé technologické či kulinární úpravy (např. PAU, *N*-nitrosaminy)

penetrace aditiv z plastů (např. estery ftalové kyseliny, bisfenol A). [1]

2. POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY, CHARAKTERISTIKA

A VLASTNOSTI

PAU představují největší skupinu známých karcinogenů s původem z prostředí. Některé, jenž nejsou karcinogenní, mohou mít vzájemně zesilující efekt. PAU můžeme najít ve vodě, vzduchu, zemi a především v potravinách, kam se dostávají z různých zdrojů jako je tabákový kouř, spalovací motory, destiláty ropy a produktů uhelného původu a produkty jejich termické degradace. PAU se také mohou objevovat při použití konzervace kouřem, spalování dřevěného uhlí, potravinářských aditiv, při balení, stejně jako při průmyslovém znečištění. [3]

Ne všechny PAU vykazují biologickou aktivitu a často existuje významná rozdílnost jen mezi izomery. Obecně platí, že všechny karcinogenní sloučeniny jsou mutagenní, avšak neplatí, že všechny mutagenní látky nutně musí být karcinogeny. Některé menší složky PAU, jako např. alkylderiváty, mohou velmi přispívat ke karcinogenní aktivitě celkové směsi. [3]

PAU se zařazují mezi enviromentální polutanty nacházející se ve vzduchu, vodě a půdě ve stopových množstvích. PAU byly detekované v celé řadě potravinářských surovin a potravin jako jsou zelenina, ovoce, rostlinné oleje připravované za tepla, obilí, mořské produkty, maso, uzené maso, káva, čaj aj. Je dokázáno, že PAU, i když jen v malém množství, vznikají v termických zásazích při technologickém zpracování potravin, uzením, sušením a pražením. Jejich přítomnost může být zapříčiněna i použitím organických rozpouštědel při extrakci, např. při získávání oleje ze semen. BaP může migrovat do potravin i z obalových materiálů jako jsou parafínové pohárky na mléko, obaly na maso aj. Typickým příkladem průniku PAU do potravin je uzení jako způsob konzervace a aromatizace potravin. Klasické uzení dřevěným dýmem, který obsahuje toxické kondenzační produkty se v dnešních podmínkách reguluje tak, že se minimalizuje konečný obsah PAU ve výrobcích. Pro některé výrobky se zavádějí syntetické udíací aditiva s velmi nízkým obsahem PAU. Pokud se jedná o povrchovou úpravu potravin, 60 – 70 % PAU se nachází v obalové vrstvě. [3]

Z toxikologického hlediska jsou PAU považované za kancerogeny s mutagenním a teratogenním účinkem. Toxické účinky akutní a chronické expozice PAU vyvolávají destrukci hematopoetických a lymfoidních buněk a kostní dřeně s následným krvácením a zvýšenou citlivostí k infekcím. Kromě vnějších vlivů životního prostředí, ve kterém se pohybujeme, se riziko nádorových onemocnění znásobuje i konzumováním kontaminované potravy. Kromě jiných faktorů, konzervace potravin uzením je toho též přímým důsledkem. Několik studií

bylo věnováno důkazům korelace mezi střevními nádory a konzumací uzených výrobků. Přitom se zjistilo, že jako karcinogenní látky tu spolupůsobí s PAU i alifatické uhlovodíky s C11 a alkoholy s C12. Z těchto důvodů vyplynula potřeba kontroly hladiny karcinogenních PAU v udicích aditivách, která v některých zemích funguje jako nepřímá kontrola obsahu PAU v uzených výrobcích. Mnohé epidemiologické studie pojednávají o frekvencích výskytu rakoviny kůže a plic po 20 roční a delší expozici, o karcinomech močového měchýře u lidí, kteří byli profesionálně exponováni. [3]

Tabulka č.1. Karcinogenita některých PAU [3]

Název PAU podle IUPAC	Zkratka PAU	Karcinogenita
Pyrén	P	inaktivní
Benzo[<i>a</i>]pyrén	BaP	vysoká
Benzo[<i>e</i>]pyrén	BeP	inaktivní
Perylén	Per	inaktivní
Benzo[<i>ghi</i>]perylén	BghiPer	mírná
Dibenzo[<i>ah</i>]pyrén	DBaHP	vysoká
Dibenzo[<i>ai</i>]pyrén	DBaIP	vysoká
Benzo[<i>c</i>]chrysen	BcC	mírná
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	BbF	vysoká
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	BkF	inaktivní
Benzo[<i>a</i>]antracén	BaA	mírná
Dibenzo[<i>ah</i>]antracén	DBaHA	vysoká
Indeno[123- <i>cd</i>]pyrén	I123-cdP	mírná

2.1 Vlastnosti

Fyzikálně-chemické vlastnosti PAU, a následně i jejich osud v abiotické složce prostředí i v živých organismech jsou bezprostředně podmíněny přítomností konjugovaných systémů dvojných vazeb, přičemž rozdíly mezi jednotlivými zástupci této skupiny jsou dány počtem a vzájemnou polohou kondenzovaných kruhů. PAU jsou vesměs málo reaktivní látky; stabilita lineárních kondenzovaných uhlovodíků obecně klesá s počtem *ortho*-kondenzovaných kruhů, stabilnější jsou PAU s angulárním uspořádáním molekuly a *peri*-kondenzované uhlovodíky. Se vzrůstající relativní molekulovou hmotností PAU roste jejich bod tání, bod varu i lipofilita (vyjádřená hodnotou rozdělovacího koeficientu K_{OW}). Tenze par a rozpustnost ve vodě naopak klesají. [1]

Tabulka č.2. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti významných PAU [1]

Název PAU	Mr [Da] ^{a)}	Bod tání [°C]	Bod varu [°C]	Rozpustnost [mg.dm ⁻³] ^{b)}	log K _{OW} ^{c)}	K _H ^{d)} [Pa.m ³ .mol ⁻¹]
Naftalen	128,2	80	218	30,00000	3,37	43,010
Acenaften	154,2	96	279	3,47000	3,92	12,170
Acenaftylen	152,2	92	265-275	3,93000	4,07	8,400
Fluoren	166,2	116	293	1,98000	4,18	7,870
Fenanthren	178,2	101	340	1,29000	4,46	3,240
Anthracen	178,2	216	340	0,07000	4,45	3,960
Fluoranthén	202,3	111	375	0,26000	5,33	1,040
Pyren	202,3	149	360	0,14000	5,32	0,920
Benzo[a]antracén	228,3	158	435	0,01400	5,61	0,581
Chrysen	228,3	255	448	0,00200	5,61	0,065
Benzo[a]pyren	252,3	179	496	0,00380	6,04	0,046
Benzo[b]fluoranthén	252,3	167	481	0,00120	6,57	-
Benzo[k]fluoranthren	252,3	217	481	0,00550	6,84	0,016

Dibenz[<i>a,h</i>]anthracen	278,4	262	524	0,00050	5,97	-
Benzo[<i>ghi</i>]perylén	276,3	277	-	0,00026	7,23	0,075
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrén	276,3	163	-	0,00620	7,66	-

^{a)}Mr = relativní molekulová hmotnost. ^{b)} Ve vodě při teplotě 25°C. ^{c)} Rozdělovací koeficient v systému oktanol – voda. ^{d)} Henryho konstanta [1]

2.2 Použití

PAU jsou látky, které se cíleně nevyrábějí, snad až na výjimky spojené s laboratorními výzkumy a analýzou (např. příprava standardů pro analýzu). Mezi PAU však patří mimo jiné i Naf a Ant, které využití mají. Tyto dvě látky jsou popsány separátně, protože jsou samostatně zařazeny do IRZ. PAU jako skupina látek obecně jsou ovšem obsaženy v celé řadě běžných produktů dnešního průmyslu, jako jsou například: motorová nafta, výrobky z černouhelného dehtu, asfalt a materiály používané při pokrývání střech a při stavbě silnic. [4]

2.3 Dopady na zdraví člověka, rizika

Celá řada látek ze skupiny PAU představuje závažné zdravotní riziko pro člověka. Jejich nebezpečí spočívá především v karcinogenitě a ohrožení zdravého vývoje plodu. Významným zdrojem BaP jsou cigarety. Jedna vykouřená cigareta vnese do kuřáka přibližně 25 ng této látky. Pro člověka kouřícího cca 20 cigaret denně představuje tato neřest ekvivalentní expozici BaP, jako kdyby se celý den pohyboval v prostředí kontaminovaném touto látkou o koncentraci 20 ng.m^{-3} .

Vezměme dále za konkrétní příklad BaP. Tato látka může být vdechnuta a prostupuje do organismu i pokožkou. Expozice může vést k následujícím rizikům pro zdraví člověka:

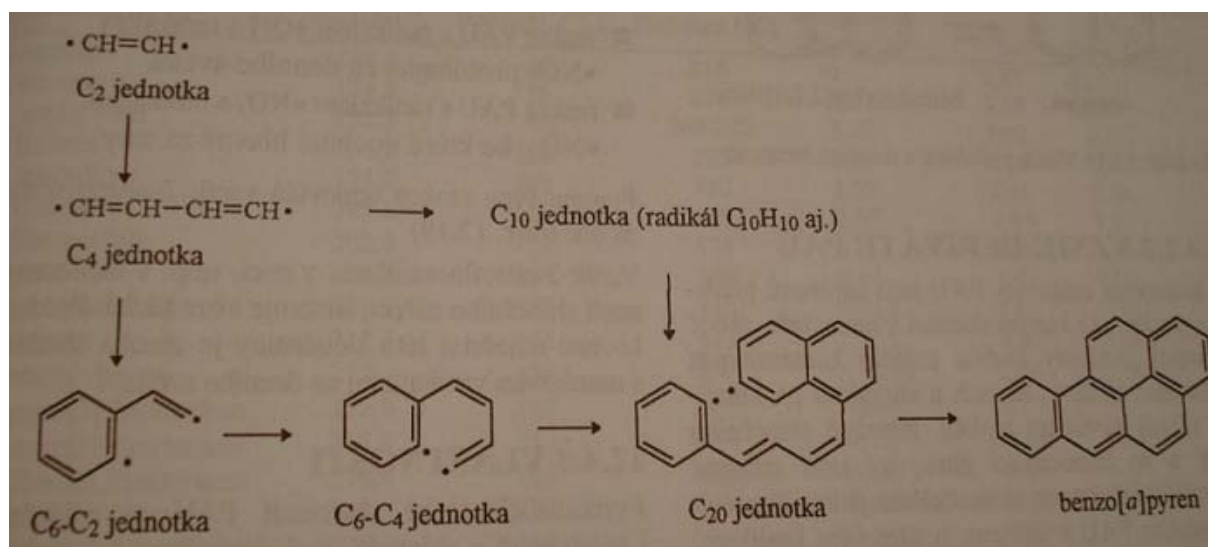
- ohrožení zdravého vývoje plodu;
- riziko onemocnění rakovinou;
- opakované expozice způsobují ztenčení a popraskání pokožky.

Je ale nutné zdůraznit, že běžně se vyskytující koncentrace PAU v životním prostředí jsou tak nízké, že nehrozí bezprostřední akutní ohrožení lidského zdraví. [4]

3. VZNIK PAU V POTRAVINÁCH

3.1 Vznik PAU

Jednou z nejdůležitějších cest vzniku PAU jsou procesy spalování (pyrolýza) organické hmoty probíhající za omezeného přístupu kyslíku při teplotách 500-900 °C, zejména pak nad 700 °C. Vlastní mechanismus jejich vzniku spočívá v pyrosyntéze z nízkomolekulárních nenasycených alifatických uhlovodíků. Na obr.1 je ilustrována tvorba BaP rekombinací volných uhlovodíkových radikálů. [1]

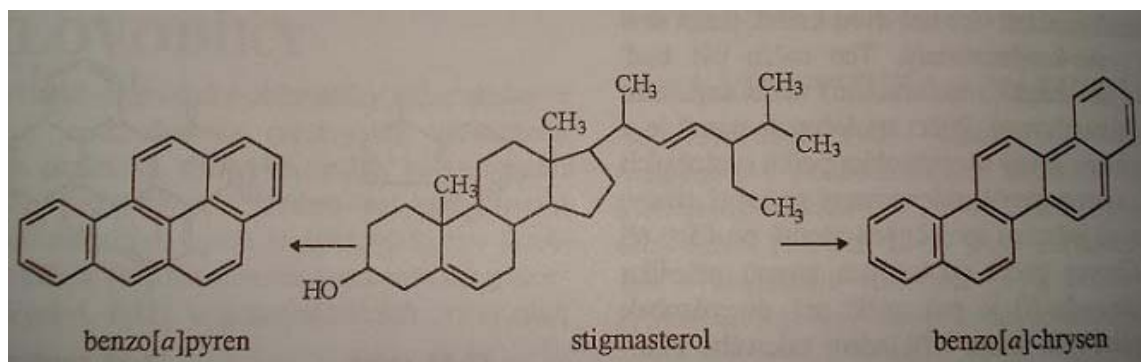


Obrázek 1. Vznik BaP pyrolýzou organické hmoty [1]

Takto vznikají PAU např. při spalování fosilních paliv. Teplota plamene a dostupnost kyslíku určují jejich složení. Mnohá paliva již některé PAU přímo obsahují a tyto, aniž by podlehly termické degradaci, mohou přímo přecházet do emisí. [1]

Prekurzorem látek ze skupiny PAU mohou být i další přirozené sloučeniny jako např. terpeny či steroidy. Na obr. 2 jsou pro ilustraci uvedeny hlavní produkty rozkladu stigmasterolu. Další významnou cestou vedoucí ke vzniku PAU jsou termické eliminační reakce benzenových derivátů. Např. eliminací molekuly vody z fenolových sloučenin (X = OH) vzniká přes 1,2-didehydrobenzen (nazývaný často nesprávně benzyn) další relativní meziprodukt benzobicyklo[2,2,2]trien a jako finální produkt Naf. [1]

Příspěvek endogenně vzniklých PAU k jejich celkovému dietálnímu příjmu však není významný. Ke kontaminaci potravin dochází vesměs exogenně. [1]



Obrázek 2. Vznik BaP a BaC termickým rozkladem stigmasterolu [1]

3.2 Vznik derivátů PAU

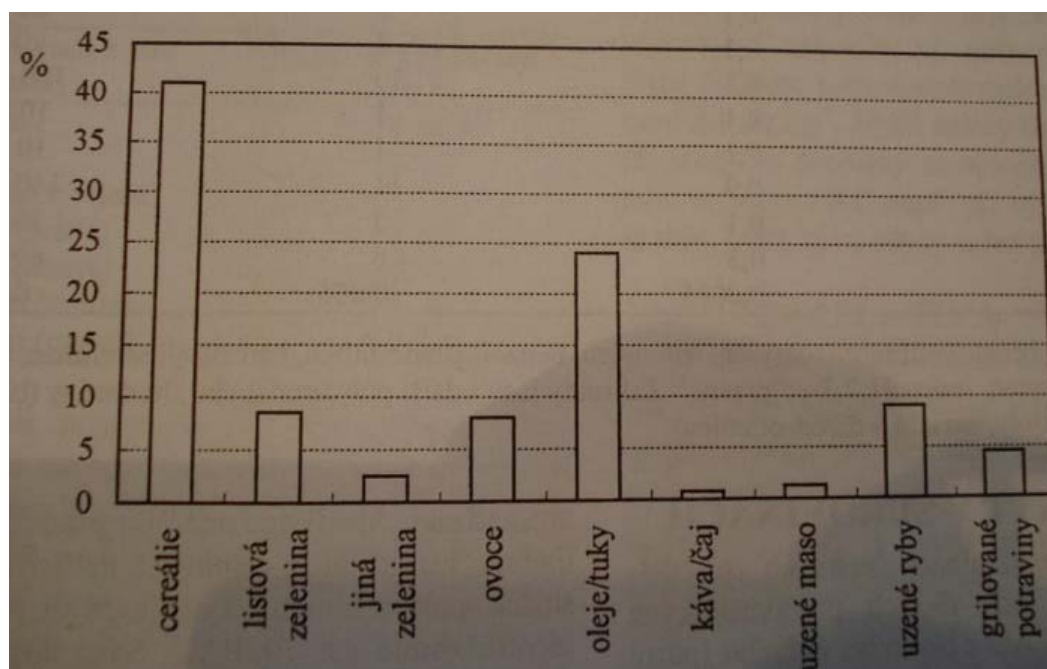
Při hodnocení reaktivity PAU jsou zajímavé především procesy, ke kterým dochází v atmosféře, neboť vznikající produkty mohou posléze kontaminovat zemědělské plodiny. Rozsah a charakter probíhajících reakcí závisí na teplotě, intenzitě slunečního záření a na koncentraci látek, jež jsou schopné elektrofilní substituce aromatického jádra. Popsány byly reakce PAU s ozónem, singletovým kyslíkem, oxidy dusíku či síry. S ohledem na vysokou toxicitu vznikajících produktů si zvláštní zmínku zasluhují reakce vedoucí k nitroderivátům PAU. Určité množství těchto kontaminantů je do atmosféry emitováno přímo z příslušných zdrojů. Ve kterých se tvoří při spalování. K jejich vzniku může docházet též radikálovými reakcemi v plynné fázi. [1]

3.3 Zdroje expozice člověka

K primární expozici člověka PAU dochází buď potravinami či vodou (tj. perorálně), případně vzduchem (inhalací). V úvahu přichází i přímý kontakt s kůží (dermálně). Je zřejmé, že potraviny jsou zřetelně dominantním zdrojem PAU u nekuřáků. Dermální expozice je vesměs považována za minoritní s výjimkou profesně exponovaných osob.

I když byla provedena řada studií zaměřených na odhad expozice PAU potravinami, srovnatelnost existujících dat je limitována rozdíly ve složení uvažovaného potravního koše i spektrem sledovaných sloučenin. Jejich výskyt je podmíněn zdrojem a mechanismem kontaminace. [1]

Pro ilustraci jsou na obr. 3 uvedeny příspěvky významných skupin potravinových komodit k dietárnímu příjmu reprezentativního vzorku populace.



Obrázek 3. Príspevek rôznych druhů potravinových komodit k celkovému příjmu PAU dietou
 % = PAU celkem, tj. obsah Fu, Pyr, BaA, Chr, Tph, BbF, BkF, BeP, BaP a I123-cdP [1]

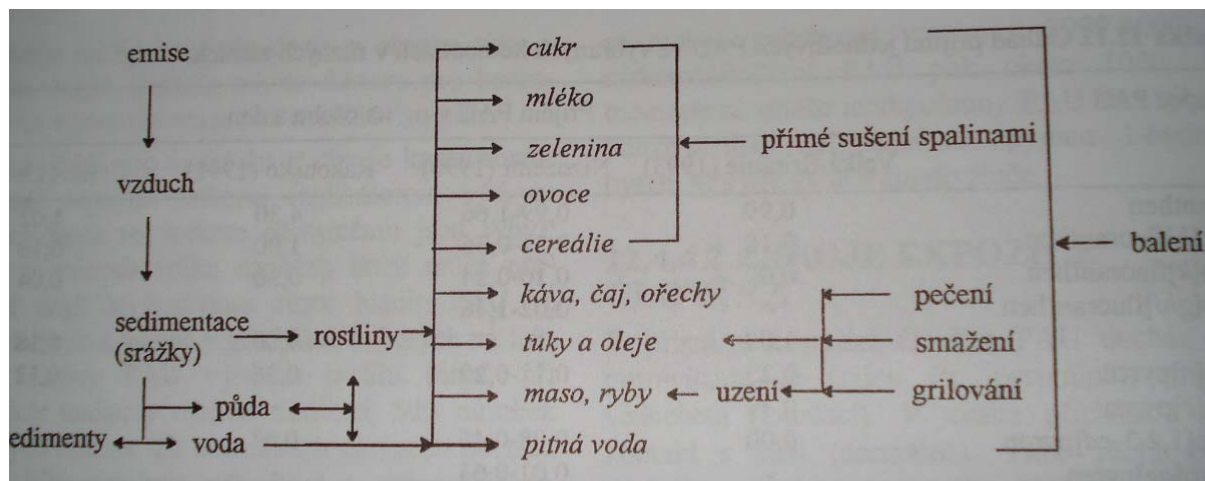
Přestože běžné hladiny PAU v cereáliích a tucích či olejích jsou oproti některým jiným komoditám (např. uzeným výrobkům) typicky relativně nízké, jejich příspěvek k celkovému příjmu PAU je díky vysoké spotřebě značný. Průměrný denní příjem 10 sledovaných PAU odhadnutý v dané studii byl 3 μg na osobu a den. Odhad EPA zohledňující nálezy celkem 16 PAU se pohybuje v rozsahu 1,6 – 16 μg na osobu a den.

Pokud jde o zastoupení jednotlivých PAU, často co do množství největší podíl na dietárním příjmu PAU vykazují Fu a Pyr, které jsou proto považovány za důležité indikátorové sloučeniny. Podíl PAU s karcinogenním potenciálem představuje podle odhadu některých autorů asi 30 % hm. z celkového příjmu těchto látek, přičemž za hlavní složky jsou považovány Chr a isomery BF (60 – 90 % hm.). Z pohledu expozice PAU je nejméně riziková dieta s vyrovnaným poměrem komponent rostlinného a živočišného původu.

Informace o výskytu derivátů PAU v potravinách jsou velmi omezené. [1]

3.4 Výskyt v potravinách

Sledování širokého spektra PAU v tak složitém materiálu jako jsou potraviny je náročné a proto se starší práce vesměs omezily pouze na stanovení BaP (s ohledem na jeho karcinogenní potenciál) jakožto indikátoru kontaminace potravin rizikovými PAU. [1]



Obrázek 4. Alternativní mechanismy kontaminace potravin PAU [1]

3.5 Výskyt v surovinách, zdroje v potravinách

Hlavním zdrojem kontaminace čerstvých zemědělských produktů a řady dalších potravinářských surovin je depozice PAU z okolního vzduchu (parní fáze, prachové částice), v menším rozsahu se pak uplatňuje sorpce z půdy, případně z vody. [1]

Některé aspekty vstupu PAU do potravního řetězce byly již dříve diskutovány. Souhrnné schéma zdrojů PAU v potravinách je zachyceno na obr. 4. Je zřejmé, že řada potravinových komodit může být kontaminována současně z více než jednoho zdroje. [1]

3.6 Technologické a kulinární procesy

Některé způsoby technologického zpracování potravinářských surovin a pokrmů mohou vést ke snížení, avšak někdy naopak ke značnému nárůstu obsahu PAU. [1]

3.6.1 Uzení

Přes velkou oblibu uzených výrobků je uzení hodnoceno kriticky vzhledem k obsahu zdraví škodlivých látek v kouři i vzhledem k úniku kouře do ovzduší. [2]

Kromě dehtových látek jsou v kouři zdravotně závadné i karbonylové látky, zejména Fad, pokud se vyskytuje ve vyšší koncentraci. [2]

Výrobky uzené studeným kouřem se neliší v obsahu BaP významně od výrobků uzených horkým kouřem. Při uzení horkým kouřem jsou těžké molekuly PAU i v důsledku termického pohybu molekul lépe rozptýleny v plynné fázi a za jednotku času se přijme více BaP. Obsah

BaP bývá vyšší u výrobku s menším kalibrem, které mají vyšší poměr povrchu ku objemu a které se navíc obvykle konzumují i s obalem. Naopak u výrobků uzených studeným kouřem bývá doba expozice podstatně delší. [2]

Vyšší obsahy PAU bývají při znečištění povrchu sazeří; kouř by proto měl být pokud možno zbaven pevné fáze, např. elektrofiltrací, filtrací přes porézní materiál (např. cihlovou drť) nebo ochlazením. Ke snížení obsahu PAU významně přispívá i vedení delším potrubím od vyvíječe k udírně, neboť se ukládají spolu s dehtem na stěny potrubí. Naopak se jejich obsah značně zvyšuje, kape-li tuk u díren s přímým vytápěním do hořící zóny, doporučuje se i používání střev z plastických hmot, která jsou pro PAU méně propustná než přírodní střeva a navíc se před konzumací odstraňují. Celulóзовá střeva u párků sníží obsah BaP až o 70 %. [2]

Zatímco při správném způsobu vyvíjení a úpravy kouře je možno udržovat obsah BaP v masných výrobcích pod $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, při nevhodném vyvíjení i uzení jsou jeho obsahy ve výrobcích vyšší. U výrobků uzených „černě“ („černé = tradiční“) bývají obsahy mnohem vyšší; i když ani zde obvykle nepřesahují hodnotu $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ a velmi zde záleží na způsobu vedení procesu. Při použití klimatizovaných udíren, kde se udí dlouhou dobu při nízkých teplotách, jsou obsahy PAU nízké, k vysokým obsahům dochází spíše v případě, že se výrobci snaží dosáhnout černé barvy rychle. Vyšší obsahy PAU bývají ve výrobcích také při uzení v „domácích“ neregulovatelných udírnách. [2]

Ukazuje se, že způsob uzení má velký vliv na obsah BaP. Srovnání několika způsobů uzení poskytlo čísla uvedená v tabulce 4. Ve všech typech udíren byly párky ze stejné výrobní partie. Je patrné, že parní kouř je „nejčistší“, zatímco v neregulované domácí udírně jsou obsahy značně vysoké. [2]

Tabulka č.3. Obsah BaP u různých typů udíren. [2]

Typ udírny	Způsob vyvíjení	Obsah BaP [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
Autotherm	parní kouř	0,1
KUM 4	doutnání pilin	1,4
„domácí“	doutnání/hoření pilin	12

Uzení masa a ryb představuje jeden z nejstarších způsobů zvýšení jejich údržnosti při jejich současné aromatizaci. Mezi více než 300 produkty pyrolýzy ligninu, hemicelulosy, celulosy a dalších přirozených složek spalovaného dřeva či dřevěných pilin bylo též identifikováno asi 70 PAU. Saze dispergované v uvolňovaném kouři obsahují největší podíl PAU (téměř 90 %) a jsou tak hlavním zdrojem kontaminace povrchu daného produktu. Z tohoto důvodu je vždy nutné jejich přímý kontakt s potravinami minimalizovat. [1]

Výsledný obsah PAU ovšem závisí na celé řadě faktorů jako je druh a vlhkost spalovaného dřeva, přívod kyslíku, technika tvorby a úpravy kouře, typ udicího procesu (ten se podle teploty v udicí komoře klasifikuje jako horký či studený) a vlastní délka uzení.

Za běžných podmínek vyvíjení kouře při spalovacích teplotách v rozmezí 500 – 700 °C obsahuje kouř značné množství Naf, frakce karcinogenních PAU se na celkovém obsahu škodlivin podílí zhruba z 5 %. [1]

Hladiny nejvíce sledovaného BaP v uzeném masa zásadně podmiňuje použitá udicí technika (Tab.5). Velké rozdíly jsou zjišťovány mezi výrobky uzenými v domácnosti a mezi průmyslovými produkty. Hladiny BaP a BaA v masa uzeném přímo nad ohněm mohou překročit i desítky $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, zatímco v obdobných komerčních výrobcích koncentrace těchto látek běžně nepřesahují $1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. V moderních provozech je dnes vývoj kouře řízen automaticky a většina PAU (až 90 %) se z kouře odstraňuje filtrací, praním a chlazením. Často se též používají udicí preparáty s kontrolovaným obsahem BaP. [1]

Tabulka č.4. Vliv podmínek uzení na koncentraci BaP v uzenářských výrobcích srovnatelných parametrů (povrch, obsah tuku, obal) [1]

Technika vyvíjení kouře (udicí technika)	Obsah BaP [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
doutnavý kouř	< 0,1-36,3
vlhký kouř	0,1-0,8
kouř z třecího vyvíječe	0,1-4,6
horké uzení (světlé)	< 0,1-2,1
horké uzení tmavé	0,236,2
studené uzení (světlé)	0,1-3,2
studené uzení (tmavé)	0,1-56

[1]

Značnou roli, pokud jde o výsledný obsah PAU, hraje i druh uzeného výrobku, konkrétně velikost exponovaného povrchu a obsah tuku. Nejvyšší množství PAU se běžně nachází na povrchu, jeho difuze do hlubších vrstev není významná. Tak např. v kůži uzených ryb bývají nálezy PAU 4 až 24 krát vyšší v podpovrchových vrstvách. Obdobnou bariérou proti průniku PAU do jedlého podílu jsou různé syntetické obaly. [1]

3.6.2 Grilování

BaP se však dostává do masa i mastných výrobků i při grilování nad dřevěným uhlím (vychází-li se z borového dřeva, bývá obsah až $190 \mu\text{g.kg}^{-1}$) nebo opékání přímo nad ohněm (pouliční stánky s opékanými uzeninami, opékání špekáčků „na táboráku“). [2]

Grilování (případně pečení na roštu) je další tepelnou úpravou, která může za určitých okolností vést k velmi závažnému nárůstu jak endogenních tak exogenních PAU v daném produktu. Zdrojem kontaminace jeho povrchu mohou být následující:

- produkty pyrolýzy tuku skapávajícího na horkou topnou plochu či žhoucí palivo
- produkty pyrolýzy použitého paliva

produkty pyrolýzy grilované suroviny vznikající při kontaktu s plamenem endogenně přítomných prekurzorů. [1]

Zásadní vliv způsobu grilování na hladiny BaP v grilovaných párcích ilustruje tab. 5. Je patrné, že z hygienicko-toxikologického hlediska je značně rizikové zejména opékání v přímém plameni. [1]

Tabulka č.5. Hladiny BaP v grilovaných párcích^{a)} [1]

Zdroj tepla	Průměrný obsah [μg.kg⁻¹]	Rozmezí hodnot [μg.kg⁻¹]
smažicí pánev	0,1	nedetegenováno-0,2
elektrická trouba	0,2	0,1-0,3
dřevěné uhlí	0,3	nedetegenováno-1,0
smrkové šišky	18	2-31
Polena	54	6-212
žhavé uhlíky	8	< 1-25

^{a)}Původní obsah 0,2 μg.kg⁻¹. [1]

3.6.3 Pražení, sušení

BaP však není jen v masných výrobcích, v rostlinných potravinách ho bývá zřetelně více, v ojedinělých případech až 100 μg.kg⁻¹. Byl nalezen např. v zelí (až 25 μg.kg⁻¹), špenátu (7,4 μg.kg⁻¹), hlávkovém salátu (12,8 μg.kg⁻¹), čaji (21,3 μg.kg⁻¹) a chlebu (1,27 μg.kg⁻¹). Nálezy BaP v produktech jako je káva, kávovinové náhražky aj. potraviny sušené nepřímým ohřevem jsou vesměs nízké, často pod hodnotami 0,1 μg.kg⁻¹. Vyšší nálezy lze očekávat v případě kontaktu suroviny se splodinami hoření. Možným zdrojem PAU např. při výrobě piva a whisky je slad, který bývá někdy sušen přímým ohřevem. [1]

4. LEGISLATIVNÍ ASPEKTY PAU V POTRAVINÁCH

vyhláška č.53/2002 Sb., část 15 PAU.

Pod pojmem PAU se rozumí BaA, BbF, BkF, Chr, DbahA, BaP, I123-cdP, DBaiP, DBahP. Příпустné množství je stanoveno pro jednotlivé látky jednotlivě. Celkový obsah vyjmenovaných látek v potravině nesmí překročit desetinásobek NPM. [13]

Tabulka č.6. Příпустné množství vybraných potravin [13]

Potravina	NPM [μg.kg ⁻¹]
masné výrobky, ryby uzené	3
káva pražená	2
obilí	2
ryby	1
ovoce	2
zelenina listová	2
tuky	2
látky určené k aromatizaci	1
nápoje, pivo, víno, čaj (výluh připravovaný dle návodu, případně podle ČSN ISO 3103 (580420) Čaj. Příprava nálevu pro senzorické hodnocení)	0,5
lihoviny	1

potraviny obecně A	1
potraviny obecně B	10

[13]

Pokud jde o přítomnost PAU v uzených výrobcích a problémech se správným stanovením a vyhodnocením u měnicích se koncentrací jednotlivých karcinogenů s různým biologickým efektem, pak byl BaP v Německu vybrán jako hlavní indikátor celkového množství PAU přítomných v uzených výrobcích, při maximální koncentraci 1 μg.kg⁻¹ BaP v uzených výrobcích, jenž byla dána v platnost od roku 1973 navzdory faktu, že BaP představoval pouze zhruba 1 až 20 % celkových karcinogenních PAU. Později v jiných zemích jako Rakousko, Česká republika, Švýcarsko, Itálie a Slovensko přijali stejné omezení, jenž platilo pouze do vydání Nařízení EC č.1881/2006. Pokud jde o SFA JECFA přijalo normy, které vyžadovaly, aby koncentrace BaP nepřesáhly limit 10 μg.kg⁻¹. Pro potraviny aromatizované SFA určila EU nejvyšší přípustný limit v BaP v EEC směrnici 88/388 na úroveň 0,03 μg.kg⁻¹. [10]

U pitné vody pak nesmí dojít k překročení koncentrace $0,02 \text{ mmol kg}^{-1}$. [11]

Pokud jde o polycyklické aromatické uhlovodíky, Vědecký výbor pro potraviny dospěl ve svém stanovisku ze dne 4. prosince 2002 k závěru, že řada PAU jsou genotoxické karcinogeny. Společný výbor odborníků FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky (JECFA) provedl v roce 2005 posouzení rizika PAU a určil hranice expozice (MOE) pro PAU jako vodítko při určování sloučenin, jež jsou genotoxické i karcinogenní. Podle Vědeckého výboru pro potraviny lze BaP využít jako indikátor výskytu a účinku karcinogenních PAU v potravinách, včetně BaA, BbF, BbF, BkF, BghiP, Chr, CPcdP, DBahA, DBaP, DbahP, I123cdP a 5-methylchrysenu. [22]

Aby se při příštím přezkoumání vědělo, zda je vhodné nadále využívat BaP jako indikátor, je třeba provést další analýzy příslušných podílů těchto PAU v potravinách. Rovněž by měl být s ohledem na doporučení JECFA analyzován BcF. [22]

Potraviny mohou být kontaminovány PAU během uzení, zahřívání nebo sušení, kdy může dojít k přímému kontaktu potravin s produkty spalování. Znečištění životního prostředí může rovněž způsobit kontaminaci PAU, zvláště v případě ryb a produktů rybolovu. [22]

V rámci směrnice 93/5/EHS byl v roce 2004 proveden samostatný úkol vědecké spolupráce „Sběr údajů o výskytu PAU v potravinách“. Vysoký výskyt byl zjištěn v sušeném ovoci, olivovém oleji z pokrutin, uzených rybách, oleji z hroznových jader, uzených masných výrobcích, živých mlžích, koření/omáčkách a chuťových přísadách. [22]

V zájmu ochrany veřejného zdraví je nezbytné stanovit maximální limity BaP v některých potravinách, které obsahují tuky a oleje, a v potravinách, u kterých uzení nebo sušení může způsobit vysokou úroveň kontaminace. Maximální limity jsou nezbytné rovněž u potravin, zejména u ryb a produktů rybolovu, u nichž vysokou úroveň kontaminace může vyvolat znečištění životního prostředí, například v důsledku úniku ropy z lodí. [22]

V některých potravinách, například v sušeném ovoci a potravinových doplncích, byl zjištěn BaP, ovšem dostupné údaje jednoznačně neprokazují, jaké limity jsou rozumně dosažitelné. Ke zjištění, jaké limity jsou v těchto potravinách rozumně dosažitelné, je třeba dalšího šetření. V mezidobí se použijí maximální limity pro BaP v příslušných potravinových složkách, např. v olejích a tucích užívaných v potravinových doplncích. [22]

Maximální limity PAU a vhodnost stanovení maximálního limitu PAU v kakaovém másle je třeba přezkoumat do 1. dubna 2007 s ohledem na pokrok ve vědeckých a technologických poznatcích o výskytu BaP a dalších karcinogenních PAU v potravinách. [22]

5. METODY POUŽÍVANÉ KE STANOVENÍ PAU

PAU jsou obvykle zastoupeny v potravinách v řádech $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Proto je postup analýzy následující: extrakce/hydrolýza, rozdělení fáze kapalina/kapalina, čistící proces, zakoncentrování, chromatografická separace a samozřejmě samotné stanovení. Ačkoliv jsou všechny kroky velmi důležité, chromatografická separace je nejdůležitější pro přesné vyhodnocení skutečných rizik, a to z důvodu, že např. BaP je velmi silná karcinogenní látka, avšak karcinogenní aktivita jeho izomeru BeP je naopak nízká. Metodika stanovení PAU byla silně ovlivněna stupněm vývoje chromatografických metod. Na počátku byla separace izomerů BaP pomocí papírové či kolonové chromatografie prakticky nemožná. S ohledem na komplex směsí PAU, přítomnost různých rušivých látek a potřebu vyhodnotit opravdu skutečné koncentrace nebezpečných látek, bylo nutné předejít problémům týkajících se tzv. „benzopyrenových frakcí“, jež se v této době skládaly z BaP a jeho izomerů BeP, BkF, BbF aj. [10]

V roce 1968 na společném zasedání IUCC a IUPAC společně pracující skupina specifikovala určité přípustné analytické metody, kterými mohou být separovány alespoň BaA, BaP, BeP, BghiP, Pyr, BkF a Kor. Studia specifických metod pro BaP a hlavní postup pro stanovení PAU byla určena pod záštitou AOAC a IUPAC. Proces spočíval v počátečním zmýdelnění vzorku v ethanolovém roztoku hydroxidu sodného, následoval částečný krok mezi DMSO a alifatickým rozpouštědlem a kolonová chromatografie na deaktivovaném Florisilu. [10]

Tato metoda byla přijata AOAC oficiální první činností metody v roce 1973 a byla uznána jako doporučená metoda IUPAC. Statistické vyhodnocení dat získaných laboratorními testy, v nichž vzorky šunky byly obohaceny o BaP, BeP, BaA, BghiP na úroveň $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a analyzovány pomocí zmíněné metody, vykazovaly chybu mezi 7,4 a 12 %. Na základě tohoto výsledku se stala tato metoda oficiální metodou AOAC. [10]

Výběr vhodné analytické metody pro finální stanovení PAU je ovlivněn především komplexností a koncentračními proporcemi analyzovaného vzorku. Nezahrnuje-li vzorek příliš široké spektrum PAU, lze obsah jednotlivých komponent stanovit přímo bez nutnosti separace s využitím vysoce citlivých fluorimetrických spektrálních metod. Většinou jsou však

analyzované vzorky natolik složité, že je nezbytné před vlastní identifikační a kvantifikační krok předřadit účinnou separační techniku, nejčastěji plynovou nebo kapalinovou chromatografii. Analýza PAU pomocí plynové chromatografie je v současnosti v převážné míře prováděna na vysoce účinných křemenných kolonách s chemicky vázanou, zpravidla středně polární polysiloxanovou, stacionární fází. Z detekčních technik nachází kromě univerzální plameno-ionizační detekce (FID) stále širší uplatnění přímé spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Vysoce perspektivní pro identifikaci izomerních PAU se ukazuje spojení plynové chromatografie s UV detektorem, schopným měřit UV absorpční spektra separovaných složek v plynné fázi. [9]

Významné místo v analytice PAU zaujímá kapalinová chromatografie, v současnosti provozovaná výhradně ve vysokoúčinné modifikaci na kolonových náplních s velikostí částic pod 10 µm nepolárního charakteru (RP-HPLC), nejčastěji silikagelu s chemicky vázanými C₁₈ řetězci, v kombinaci s vodnou polární mobilní fází (metanol-voda, acetonitril-voda). Podstatný význam pro úspěch analytické operace má rovněž volba selektivní a citlivé detekční koncovky. Z kapalinově chromatografických detektorů v případě PAU přicházejí do úvahy především ty, které pracují na principu absorpce UV záření a fluorescence. Nejmodernější a nejvýkonnější kapalinově chromatografickou identifikační techniku představují detektory schopné měřit UV absorpční nebo fluorescenční spektra separovaných složek "on-line" na výstupu z kolony, tzv. "diode array" detektory a detektory s rychle pohybujícím se monochromátorem. [9]

PAU v potravinách představují jen částečný problém z hlediska znečištění PAU v celém životním prostředí. Mnoho sloučenin PAU – zhruba 100 jich bylo izolováno a stanoveno v potravinách i životním prostředí – představuje skutečnou výzvu pro moderní analytické metody. [11]

Různé chromatografické postupy, včetně kolonové, papírové a TLC, byly použity na izolování těchto látek z kontaminovaných vzorků. Některé z těchto metod se osvědčily pro získání přijatelných výsledků, obzvláště při stanovení jednotlivých PAU (např. BaP). Jelikož se tyto kontaminanty vyskytují jakožto komplexní směs PAU, analytické metody jsou potřeba k oddělení a určení různých typů PAU. Spolehlivé určení kontaminace potravin a ostatních složek životního prostředí vyžaduje stanovení různých PAU hlavně z pohledu významných rozdílů v jejich mutagenním a karcinogenním potenciálu jednotlivých sloučenin. GC a HPLC jsou nejčastěji používanými technikami ke splnění analytických požadavků. Problémy

vznikají při odebírání vzorků, jejich přípravě a určení chromatografických podmínek. Analytické procesy na stanovení PAU v potravinách byly přezkoumávány a rozsáhle diskutovány. [11]

5.1 Příprava vzorků

Příprava vzorků a následné vyčištění jsou nezbytné kroky pro získání vhodných výsledků v analýze PAU v potravinách. Některé druhy vzorků (voda) vyžadují jen minimální zpracování, avšak jiné vzorky, jako např. potraviny, vyžadují před samotnou HPLC analýzou izolace PAU z celkové matrice. [11]

Nejvíce extrakčních metod použitých na PAU je založeno na metodě Grimmera a Böhnkeho (1975) s úpravami dle různých druhů vzorků materiálu. Hlavní postup (Obana *a kol.*, 1984) je popsán stručně. [11]

Rozemletý vzorek materiálu (potraviny) se zahřívá pod refluxem v ethanolovém nebo methanolovém roztoku KOH až do rozrušení tkáně či buněčných struktur a do zmýdelnění esterů mastných kyselin. [11]

PAU jsou poté extrahovány nepolárním rozpoštědlem (*n*-hexan) a přeneseny do vrstvy DMSO [úprava Haenni *a kol.* (1962)]. Po zředění vodou a re-extrakci v *n*-hexanu je vzorek promýván kolonovou chromatografií na oxidu křemičitém a/nebo oxidu hlinitém. Frakce takto promytá kolonou je dále analyzována pomocí HPLC nebo GC. Tento celý proces je ilustrován v tabulce 7. [11]

Deaktivovaný Florisil (Basu a Saxena, 1978) bývá používán v tomto kolonu promývajícím kroku v různých aplikacích. [11]

Tabulka č.7. Běžný proces na oddělení PAU [od Obana *a kol.*, (1984).] [11]

Vzorek (10 až 30 g) – zmýdelněn s 1,5 N KOH-EtOH a vody; extrakce pomocí *n*-hexanu

↓

Vrstva *n*-hexanu – promývání s vodou; extrakce s DMSO

↓

Vrstva DMSO – přidání vody, extrakce za pomoci *n*-hexanu

↓

Vrstva *n*-hexanu – promývání vodou; dehydrace pomocí bezvodého Na₂SO₄, zakoncentrování na 5 ml

↓

Kolonová chromatografie – nahoře, oxid křemičitý; dole oxid hlinitý. První frakce promývána *n*-hexanem, druhá frakce promývána 15 % diethyleterem v *n*-hexanu

↓

HPLC-FD – druhá frakce

Alternativní metoda přípravy vzorků zaměřená obzvláště na extrakci BaP byla objevena Gertzem *a kol.* (1981). Namísto zmýdelnění alkoholickým KOH, neiontovou povrchově aktivní látkou (Triton 100), je použita kombinace s petroleum etherem na extrakci PAU ze surového materiálu. Postupně se BaP – i ostatní PAU obohacují o kyselinu mravenčí – kofein až do vytvoření rozpustných komplexů. PAU jsou pak opět extrahovány petroleum etherem a dále čištěny chromatografií na Sep-Pak kazetě před podrobením HPLC analýze. Byly vyvinuty i další metody – bez zmýdelnění či jiného zpracování za pomoci tenzidů. [11]

5.2 Chromatografie

Princip chromatografie. Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto sestavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. [7]

5.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě

TLC představuje starší analytickou metodu pro stanovení PAU v různých potravinových matricích. Haenni aprojednával rozvoj analytických nástrojů jak pro kontrolu PAU v potravinářských aditivech, tak v samotných potravinách, použitím ultrafialové normy pohybující se uvnitř specifické sféry vlnových délek. Zato Schaad (1970) zhodnotil různé chromatografické dělicí postupy včetně TLC. White *a kol.* (1971) využíval 2 systémy pro oddělení jednotlivých PAU. První byl založen na použití 20% *N,N*-dimethylformamidu v ethyletheru jakožto stacionární fázi a isooktanu jako fází mobilní. Fluorescenční bod byl vyryt do celulózy vrstvy a vymýván horkým methanolem. Ve druhém systému využívajícím ethanol – toluen – vodu (17:4:4) byl vzorek po zakoncentrování využíván jako vyvíječ. Fluorescenční bod byl dále promýván na vrstvě acetylované celulózy a ultrafialové spektrum bylo zaznamenáváno oproti izooktanu ve zmíněné buňce. [10]

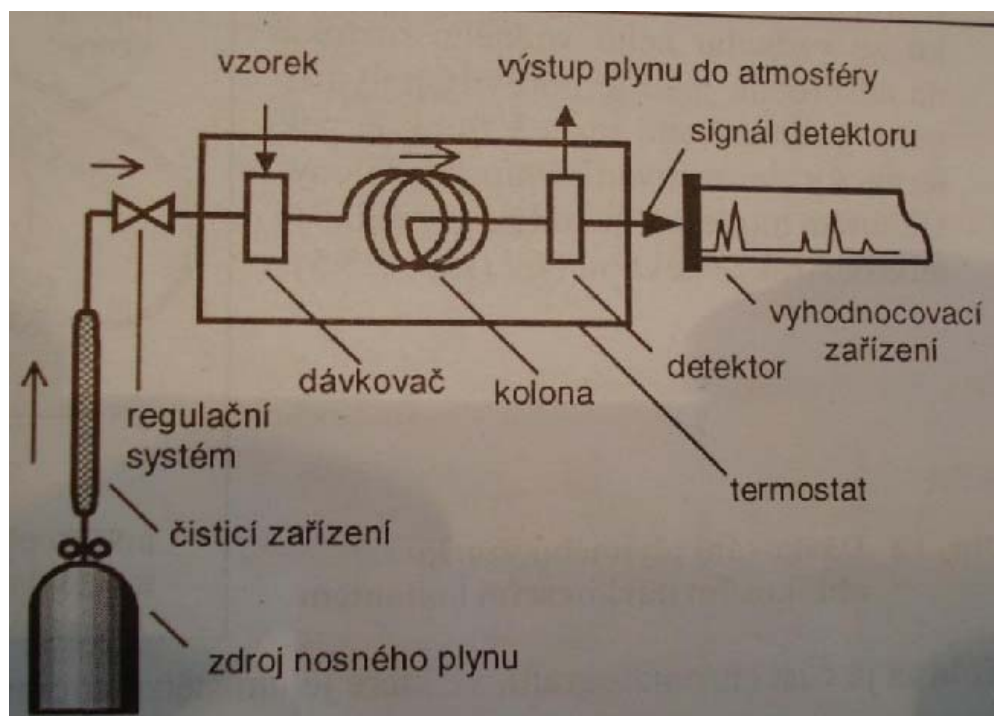
Dosažené maximum bylo srovnáno se známým spektrem PAU získaného ze stejného instrumentálního stanovení. Odhad množství určených sloučenin byl vytvořen na základě techniky základní čáry ve spojení se spektrem těchto PAU a jejich identifikace byla provedena na základě spektrofotofluorimetrie. Tato metoda se stala roku 1974 základní metodou AOAC. [10]

5.2.2 Plynová chromatografie

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá nosný plyn. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn.

V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek. [7]

Pro nutnost přeměny analytů v plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak nasycených par, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovaných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí. Častým postupem je chemická změna analytů nevyhovujících vlastností na deriváty, které mohou být v analýze plynovou chromatografií použitelné. [7]



Obrázek 5. Schéma plynového chromatografu [7]

Plynový chromatograf

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Druh plynu je určen jeho úkolem unášet vzorek kolonou a potřebou inertního chování vůči jeho složkám. Proto nemá přímý vliv na separaci. Při volbě plynu také hraje roli potřeba netoxicity, bezpečnosti práce a nižší ceny. Hojně využívaný vodík má zásadní nevýhodu – je hořlavý a

expolzivní, případně schopný hydrogenace některých látek, které pak detekuje navíc. Volba nosného plynu je často určena druhem kolony a detektoru. [7]

Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů. Zejména odstraňuje stopy reaktivního kyslíku, který nevratně poškozuje stacionární fázi v koloně. [7]

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Elektronickou regulací lze docílit stanoveného průtoku i při změnách teploty během separace. [7]

Dávkovač slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky dávkujeme injekčními stříkačkami (0,1 – 10 μ l) přes pryžové septum. Hovoříme o nástřiku vzorku. Pro plynné vzorky se používají plynotěsné injekční stříkačky nebo obtokové dávkovací kohouty různých konstrukcí. [7]

Známe různé metody nástřikování:

- Nástřik od kolony (*on column*) je základní metodou u náplňových kolon. Dávkuje se 1 až 10 μ l vzorku. Je preferován i pro kapilární kolony větší světlosti (od průměru 0,25 mm) s použitím nástřikové jehly pro 0,2 – 2 μ l vzorku. Horní část kolony je zahřívána na teplotu 10 – 30 °C nižší než je teplota varu rozpouštědla. Vzorek musí být rychle nástříknut a vytvořit kapalný film na stěně kolony. Po 30 – 60 s se teplota kolony prudce zvýší, aby nastalo odpaření.
- Nástřik pomocí děliče toku (*split injection*). Tenší kapilární kolony mají malou kapacitu, proto se zejména u koncentrovaných vzorků musí pomocí děliče toku (*splitter*) jeho část s nosným plynem oddělit. Do kolony se dostává jen definovaný zlomek nástřikovaného množství (zpravidla 0,1 – 10 %), které bývá v intervalu 0,1 – 2 μ l. Skleněná vata v odpařovací trubici zajišťuje homogenní odpařování a účinné promíchání vzorku před vstupem do kolony.
- Nástřik bez děliče toku (*splitless injection*). Metoda je vhodná pro relativně velké objemy (0,5 – 5 μ l), které je nutno použít pro stopovou analýzu. Používá se totéž zařízení jako s dělením toku, ale obvod děliče je uzavřen. Vzorek se dávkuje pomalu do odpařovací trubice a nechá se asi 60 s odpařovat. Poté se provede oplach septa. Dlouhá doba vstupu vzorku do kolony by vedla k rozšíření zón. Tomu se bráníme pomocí Grobovy metody. Tato metoda využívá rozpouštědla s vyšší teplotou varu

(např. oktanu), které kondenzuje a vytvoří kapalný film v hlavě kolony. V něm jsou pohlceny všechny analyty. Jakmile jsou analyty zachyceny a je proveden oplach septa, je zvýšena teplota kolony a separace může probíhat. [7]

- Koncentrátor na počátku kolony. Je oblíbenou metodou zachycování vzorku ze vzduchu nebo vodného roztoku na adsorbent, jako je pórovitý polymer nebo grafitizované saze. Vzorek je pak termicky desorbován přímo do kolony. Účinnou moderní metodou je aplikace mikroextrakce pevnou fází. [7]

Kolony v plynové chromatografii

- Náplňové kolony jsou trubice naplněné sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Jsou vyrobeny z oceli nebo skla. Vnitřní průměr kolony je 2 až 3 mm, délka 1 až 3 m. Mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Příklady náplní adsorbentů pro adsorpční chromatografii jsou silikagel, grafitizovaný uhlík a alumina (oxid hlinitý). Jako molekulová síta se používají hlinitokřemičitany. Nosiče kapalné fáze pro rozdělovací chromatografii bývají např. na bázi křemeliny (oxid křemičitý). Upravují se tak, aby se při separaci neuplatňovaly jejich adsorpční schopnosti, protože separace složek mezi nosným plynem a zakotvenou kapalnou stacionární fází má probíhat pouze na principu rozdělování. Mikronáplňové kolony jsou moderní účinné náplňové kolony, které mají malý průměr a obsahují velmi malé částice náplně (například průměru pouhých 10 μm i méně). Proto je při stejné délce jako u běžné délce jako u běžné náplňové kolony dosahováno vyšší účinnosti separace. [7]
- Kapilární kolony využívají jako nosiče stacionární fáze své vnitřní stěny. Vyrábějí se obvykle z taveného křemene. Vnitřní průměr kolony je v intervalu 0,1 – 0,6 mm, tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 – 5 μm , délka 15 – 60 m, kapacita 50 ng – 15 μg a účinnost 1000 – 3000 teoretických pater na 1 m. Pro většinu aplikací postačuje délka kapiláry 30 m. Větší průměr kolony dává možnost pojmout více vzorku. Použití menších průměrů kolon vede k vyšší účinnosti, ale nižší kapacitě. Užší kolony nemohou být tak dlouhé, protože by byl prodloužen čas separace. Obecně tedy platí, že roste-li vnitřní průměr a tloušťka stacionární fáze, účinnost separace se snižuje. Kapalina je obalena polymidovou vrstvou, která dává křehkému materiálu kolony pružnost a brání ho před zlomením. Kolonu chrání do teplot 350 °C; termicky stabilnější hliníková vrstva může být použita do 425 °C (maximální teplotu ale určuje stabilita zakotvené stacionární fáze a analytů). [7]

Stacionární kapaliny by měly dobře rozpouštět separované látky a samy být teplotně stálé a málo těkavé. Měly by pevně ulpívat na nosiči, aby nedocházelo k jejich vymývání z kolony. Hojně využívaným řešením je chemické zesíťování stacionární fáze a případné navázání kovalentní vazbou na nosič. [7]

Volba stacionární fáze je obvykle rozhodující pro výběr vhodné kolony pro náš vzorek. Důležitá je polarita separovaných složek. Nepochárny sloučeniny jsou obvykle složeny jen z uhlíkových a vodíkových atomů. Pro nejběžnější analýzy směsi alkanů použijeme nepochárny kapilární kolony. [7]

Detektory v plynové chromatografii

Nosný plyn z kolony protéká detektorem, který reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, jenž je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektor sleduje takovou vlastnost plynu z kolony, která závisí na druhu a koncentraci složek (analytická vlastnost). Musí mít dostatečnou citlivost (nízký detekční limit) a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. Citlivější detektor změny signálu při určité změně obsahu složky více než detektor méně citlivý a je schopen detekovat nižší nejmenší postřehnutelný obsah složky. Důležitým požadavkem je vysoká selektivita pro stanovované analyty. Nejpoužívanější jsou tepelně-vodivostní detektor, plamenový ionizační detektor a detektor elektronového zachytu. [7]

➤ Ionizační detektory

Funkce ionizačních detektorů je založena na vedení elektřiny v plynech. Základem aparatury je izolovaná nádoba, kterou proudí plyn přes dvě kovové desky (elektrody), mezi nimiž je elektrické pole.

- Plamenový ionizační detektor (*Flame Ionization Detector* – FID). Molekuly plynu se ionizují v kyslíkovodíkovém plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami. Nosný plyn se před vstupem do hořáku mísí s vodíkem, vzduch je přiváděn z vnějšku. Přítomnost složek zvýší ionizaci a elektrický proud se zvětší. Detektor je velmi citlivý. Detekční limity jsou v pikogramech analytu. Jako nosný plyn se hodí nejlépe dusík, ale použitelné jsou i ostatní nosné plyny. Detekuje prakticky vše, s výjimkou anorganických par a plynů (necitlivost na vodu sice nabízí možnost jejího použití jako rozpouštědla, ale voda snižuje odezvu detektoru a může až zhasnout hořák).

Organické látky se teplem plamene štěpí na radikály, které s vodíkem v redukční části plamene dávají radikály $\cdot\text{CH}$. Ty se oxidují za vzniku iontů CHO^+ a elektronů, což je rozhodující pro odezvu detektoru. Ionty zanikají rekombinačními reakcemi, např. s vodou (vznik iontu H_3O^+ , který posléze zachytí elektron za vzniku vody a radikálu $\cdot\text{H}$) a s heteroatomy molekul organických sloučenin. Odezva detektoru roste s počtem uhlíkových atomů poskytujících ionty CHO^+ a klesá s přítomností heteroatomů v molekule. Proto je detektor velmi citlivý na uhlovodíky. [7]

Pracovní techniky plynové chromatografie

Eluční metoda je založena na vymývání jednorázově dávkovaného vzorku nosným plynem. Vzorek se dávkuje najednou do proudu nosného plynu před vstupem do kolony. Z kolony vychází nejdříve ta složka, která se nejméně zachycuje na stacionární fázi. Čas, za který složka vyjde z kolony, je za daných experimentálních podmínek pro ni charakteristický. Proto se tento údaj využívá pro její identifikaci. Vzniklý chromatogram je tvořen sérií elučních křivek neboli píků. Zaznamenává se signál z detektoru v závislosti na čase nebo proteklém objemu nosného plynu. Kvantitativní zastoupení složky určuje plocha uzavřená jejím píkem. Mobilní fázi při eluční metodě označujeme jako eluent, z kolony vychází eluát. [7]

Tato technika je zdaleka nejběžnější. Provádění za stálých podmínek je vhodné pro směsi, jejichž složky se jen málo liší svými fyzikálními charakteristikami. Při velkých odlišnostech mohou některé složky opustit kolonu rychle, jiné se v ní zdržovat příliš dlouho. Pro tyto příklady se používá programová plynová chromatografie, v níž se během separace mění teplota nebo průtok nosného plynu podle určitého programu. [7]

Popis chromatogramu

Popišme ideální chromatogram, který vznikl použitím eluční metody pro vzorek složený z inertu a složky A. Inert je látka, která se vůbec nezachycuje v koloně a pohybuje se kolonou stejnou rychlostí jako nosný plyn.

hvýška píku

Yšířka píku v základně

$Y_{1/2}$šířka píku v polovině výšky

Aplocha píku

Y a $Y_{1/2}$ souvisí s účinností separace, A a h s kvantitativním zastoupením složky. Zadržování rozpuštěné látky stacionární fází způsobuje, že kolonou migruje menší rychlostí než je průměrná rychlost mobilní fáze. Molekula složky stráví v koloně určitou dobu, která se nazývá retenční čas t_R . Tato doba se dělí na čas, který molekula setrvává v mobilní fázi – mrtvý retenční čas t_M a čas strávený ve stacionární fázi – redukovaný retenční čas t'_R . Tyto časy splňují retenční rovnici:

Rovnice 1
$$t_R = t_M + t'_R$$

Pro inert, který se nepoutá na stacionární fázi a putuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze, je retenční čas totožný s mrtvým retenčním časem. Retenční charakteristiky se používají ke kvalitativní analýze, protože v daných podmínkách můžeme konkrétní složku charakterizovat jejím retenčním nebo redukovaným retenčním časem. [7]

Vlastní stanovení pomocí GC

V dnešní době je GC široce používaná metoda, co se stanovení PAU v potravinách týče. Stanovení velkého množství PAU ve vzorku vyžaduje kolony s vysokou účinností. K oddělení některých rozhodujících dvojic PAU stejně tak jako isomerů methylderivatů určitých PAU slouží kapilární kolony (50 m×0,3 až 0,5 mm), které mohou docílit až 50 000 – 70 000 HETP, a jsou pro daný krok obzvláště vhodné. Sériově vyráběné kolony používané na stanovení PAU mají nižší HETP hodnocení, konkrétně mezi 20 000 a 30 000. Dvě stacionární fáze, OV-17 a OV-101 byly použity pro oddělení BaP od BeP, DajA od DahA a Phe od Ant. Úspěšné oddělení Chr od BaA se zdařilo použitím stacionární fáze OV-17. Oddělení BbF, BjF a BkF izomerů pomocí sériově vyráběných kolon nebylo možné. Radecki *a kol.* (1978) Testoval různé stacionární fáze (GE SE 30; OV-1; SE-52; OV-7; OV-101; BMBT; BBBT) na chromosorb W, chromosorb W HP, Gas Chrom a Diatomit CQ podpory sériově vyráběných kolon ke zdokonalení přesné GC metody na analýzu BaP v SFA. Následujícím experimentem byla separace BaP od BeP a Per, přičemž bylo zjištěno, že není možné použít stacionární fázi SE 30, OV-1, SE-52, OV-7 a OV-101. Nematické fáze poskytují dobrou separaci BaP od jeho izomerů, avšak nejsou vhodné pro analýzu s ohledem na jejich špatnou termickou stabilitu. Detekce PAU nepředstavuje žádný problém, neboť FID odezva je stejná pro všechny sloučeniny a je lineární v poměrně velkém koncentračním rozsahu (okolo 1 až 10⁶) dle jejich uhlíkatého obsahu. Nicméně použití FID je někdy podmíněno potřebou velmi dokonalého

čistího procesu s doprovázejícím rizikem velkých ztrát a neproveditelnosti kladné identifikace. [10]

MSD se rovněž používá pro stanovení PAU v mnoha případech. Obzvláště použití MSD v SIM módu zkracuje časovou stránku čistícího procesu a je doporučena zejména pro kvantitativní analýzu. [10]

ITD má oproti dříve tradičnímu MSD řadu výhod. ITD využívá elektrického pole k zadržení iontů uvnitř tzv. *storage regions*. ITD je potom snímá až do hmotnostní oblasti způsobující, že ionty se následně katapultují ze své sféry od nízké do vysoké hmotnosti. Vystřelené ionty jsou pak detekovány klasickým elektronovým násobičem. Charakteristika ITD je založena na ionizaci a hmotnostní analýze ve stejnou dobu. Tím se liší od obvykle používaného MSD, který vyžaduje oddělené místo pro vznik ionizace, zaostřující zařízení a analyzátor s příslušnou malou chemickou výchylnou. [10]

Mnohdy je prosté oddělení izomerů celkem závažný problém a to do té doby, dokud se nepoužijí kapilární kolony. [10]

Dennis *a kol.* (1984) neodseparoval BjF od BkF, Speer *a kol.* (1990) neoddělil Chr od Tph, BbF, BjF a BkF a ostatních, ani DahA od DacA. Problému oddělení Chr od Tph se rovněž ve své práci věnuje Gullián *a kol.* (2000) Wise *a kol.* (1993) psal zase o roznostech v oddělování izomerů BbF a BkF. [24]

Tabulka č.8. Postupy izolace a GC podmínky používané pro stanovení PAU v uzených masových výrobcích [10]

Vzorek	Příprava vzorku	Kolona/stacionární fáze	Teplotní program	Detekce	Zdroj
grilované párky	Zmýdelnění směsí ethanolu, vody a KOH, extrakce cyklohexanem, předrozdělení SPE na Isolute aminopropyl a C ₁₈ kolonách	25 mx 0,2 mm kapilární kolona/SPB-5	80°C po 0,5 min → 230°C po 8°C/min → 300°C po 5°C/min	MSD	[25]
uzené ryby	Extrakce pentanem, předčištění na silikagelu a Sephadex LH-20	25 m x 0,2 mm křemenná kapilární kolona/SE-54	100 → 260°C, 3°C/min	MSD	[26]
uzené ryby	Zmýdelnění methanolickým KOH, extrakce kapalina-kapalina (methanol-voda-cyklohexan a DMF-voda-cyklohexan) a GPC na Sephadex LH 20	10 mx 2 mm sériové kolony/5% OV-101 a OV-17 na sorbentu Gas Chrom	1. 120 → 250°C, 1°C/min, 2. 250°C izotermicky	FID, MSD	[27]
uzené párky	Zmýdelnění methanolickým KOH, extrakce kapalina-kapalina (methanol-voda-cyklohexan a DMF-voda-cyklohexan) předčištění na silikagelu a GPC na Sephadex LH 20	10 mx 2 mm sériové kolony/5% OV-101 na sorbentu Gas Chrom	260°C izometrický	FID	[28]
uzené masové produkty	Zmýdelnění směsí methanolu, vody a KOH, rozdělení pomocí DMF, předčištění na Kiesel gelu 60	25 m x 0,28 kapilární kolona/SE-54	240°C izotermicky	MSD	[29]
uzené ryby a rybí produkty	Zmýdelnění v methanolicčím KOH, extrakce kapalina-kapalina (methanol-voda-cyklohexan a DMF-voda-cyklohexan) předčištění pomocí CC na silikagel a GPC na Sephadex LH 20	55 mx0,3 mm skleněná kapilární kolona	165°C po 6 min, 165 → 255°C po 4°C/min	FID	[30]
uzené ryby, uzené masové pomazánky	Zmýdelnění směsí methanolu, vody a KOH, extrakce cyklohexanem, pročištění na Florisil, rozdělení pomocí DMSO/hexan	30 mx0,25 mm kapilární kolona/DB-5	25°C, → 180°C rychle, → 320°C po 8°C/min	FID, MSD	[31]
uzené ryby	Zmýdelnění pomocí směsí methanol-voda-KOH pod refluxem, extrakce do cyklohexanu, extrakce PAU pomocí kofeinu/kys. Mravenčí, vymývání roztokem NaCl, extrakce do cyklohexanu, předrozdělení na silikagelu	30 mx0,25 mm kapilární kolona z taveného křemenu/DB-5	110°C izotermicky po 1,5 min → 210°C po 30°C/min → 290°C po 3°C/min po 10°C/min	MSD	[32]
Uzený losos, párky, vepřové maso	Přímá extrakce rozpouštědlem (ASE), vyčištění na Florisil	30 mx0,25 mm kapilární kolona/zesíťovaný 5% fenylmethylsiloxan HP-5MS	40°C izotermicky po 1 min → 250°C po 12°C/min → 310°C po 5°C/min	MSD	[33]
uzená masa	Zmýdelnění methanolickým KOH, extrakce cyklohexanem, rozdělení DMF/voda, vyčištění silikagelem a GPC na Bio Beads S-X3	50 m kapilární kolona/DB-5	70°C, → 280°C po 5°C/min	MSD	[34]
uzená masa	Zmýdelnění methanolickým KOH, extrakce n-hexanem, vyčištění pomocí SPE na Florisilu	30 mx0,32 mm/DB-5	70°C izotermicky po 1 min → 150°C po 10°C/min → 280°C po 4°C/min	ITD	[35]
uzené kuře	Extrakce methanolem v Soxhletově ap., +KOH, extrakce do n-hexanu, vyčištění na Pep-Pak Florisil	30 mx0,32 mm/DB-5	70°C izotermicky po 1 min → 150°C po 10°C/min → 280°C po 4°C/min držené po 14 min	ITD	[36]
uzené rybí produkty	Zmýdelnění KOH, extrakce cyklohexanem, pročištění na silikagelu	DBI kolona	150°C; 180°C po 3°C/min, 230°C po 5°C/min a 290°C po 9 min po 10°C/min	jednoduchý iontový monitoring	[21]
kachní	Zmýdelnění KOH, extrakce CH ₂ Cl ₂ , přčištění Sep-Pak Florisil	60 m x 0,32 mm/DB-1 kolona z taveného křemenu	35°C po 2 min, poté 130°C po 10°C/min, 2,5°C/min do 280°C po 40 min	FID	[20]

5.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fází. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fází, závisí na afinitě analytu ke každé

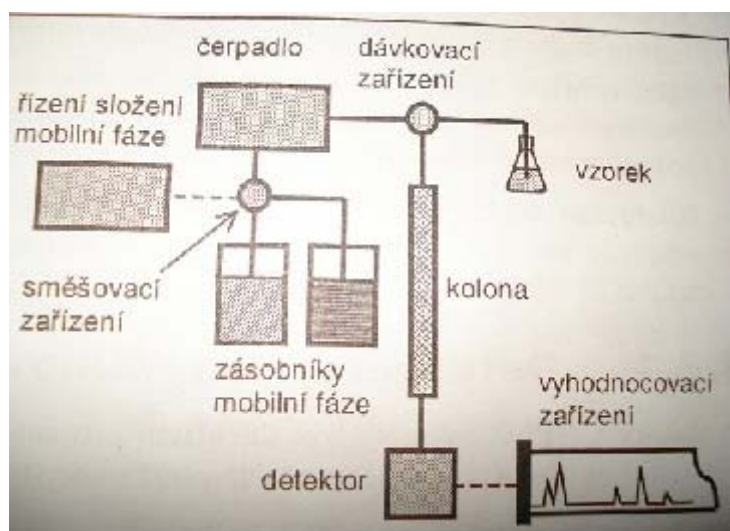
z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii. [7]

Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých netěkavých sloučenin. Pracujeme obvykle eluční metodou. [7]

Srovnáme-li kapalinovou a plynovou chromatografii z hlediska účinnosti, je v kapalinové chromatografii nižší příspěvek molekulární difuze složky, protože kapalina má o hodně vyšší viskozitu než plyn. Ve van Deemeterově rovnici je tento příspěvek možno zanedbat. Naopak, v plynové chromatografii je zanedbatelný příspěvek odporu převodu hmoty v mobilní fázi, ale v kapalinové chromatografii se projevuje a počítá se s příspěvkem odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi. [7]

Kapalinový chromatograf

V klasické kapalinové chromatografii naplníme skleněnou trubici délky asi 0,5 m a průměru asi 2 cm, dole zakončenou fritou a kohoutem, zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic (např. oxidem hlinitým). Na horní vrstvu náplně dávkuje malé množství vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi (eluent). Působením gravitační síly mobilní fáze postupuje kolonou, složky vzorku se od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony. [7]



Obrázek 6. Schéma kapalinového chromatografu [7]

Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*). K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku. [7]

- Čerpadlo. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobré čerpadlo docílí průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku až 35 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru. Princip pístového čerpadla je zřejmý z obr. 28. Membránové čerpadlo má prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou, který je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou. Jednočinné pístové čerpadlo by způsobovalo rušivé tlakové rázy. Proto jsou používána dvojčinná čerpadla, v sérii zapojená čerpadla a čerpadla využívající dvou nebo více pístů. Řízení čerpadla mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulzů. Levnější alternativou k čerpadlům s kmitavým pohybem pístu je jejich náhrada čerpadlem založeným na principu injekční stříkačky naplněné zásobou mobilní fáze. Nevýhodou je sice omezený objem mobilní fáze vyžadující časté naplňování, ale pracuje bez pulzů, s velmi stálým nízkým průtokem rozpouštědla.

- Směšovací zařízení. Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace měnit (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.
- Dávkovací zařízení. Dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Pokud je použito injekčních zařízení, musí být zhotovena z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery). Injekční zařízení může být ovládáno ručně i automaticky. Byly vyvinuty techniky označované jako dávkování při zastavení toku (*stop-flow injection*), které odstraňují některé tyto nedostatky. Injekční dávkování v nich provádíme za běžného tlaku při přerušení toku eluentu.

V současné době bývají injekční systémy nahrazeny dávkováním obtokovým dávkovacím kohoutem. Dávkovací smyčka má obsah 10 nebo 20 μl . Smyčka je připojena na kohout a plněna pomocí injekční stříkačky. Větší vzorek (řádově stovky μl) může být dávkován, je-li použit slabý eluent. Za tohoto předpokladu se vzorek zachytí v hlavě kolony, zatímco eluent postupuje dále. Změnou za silnější eluent dosáhneme eluce analytů. Menší vzorky řádu zlomků mikrolitrů jsou aplikovány v kolonách malých vnitřních průměrů (*micro-bore columns*) pomocí speciálních mikroinjektorů.

- Kolony používáme pouze náplňové. Mnoho rozličných aplikací kapalinové chromatografie podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně.

Pro většinu rutinních analýz jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (zpravidla 10, 15 nebo 25 cm). Vnitřní průměr je 4,6 nebo 5 mm, vnější průměr $\frac{1}{4}$ palce (palec = coul = 2,54 cm). Běžný průtok eluentu je 1 – 2 ml za minutu. Pro rychlé separace, stačí-li účinnost do 4000 teoretických pater, jsou vhodné krátké analytické kolony délky jen 3 cm. Jsou levnější a spotřebují malé množství mobilní fáze. Objemový průtok eluentu je 4 ml za minutu. Náplňový materiál pro analytické kolony má průměr 3 až 10 μm (kratší kolony jsou plněny jemnější náplní). Kolony s velmi malým vnitřním průměrem mají vnitřní průměr 1 – 2 mm a délku 25 – 50 cm. Mají vysokou účinnost, nejsou drahé a spotřebují málo rozpouštědla (10 – 100 μl za minutu).

Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně používány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření pásů a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály.

- Nastavení teploty. Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje termostatování. Některé separace se významně zlepší zvýšením teploty, což většina nových chromatografů umožňuje. Programová změna teploty se však v HPLC nevyužívá.

Detektory v kapalinové chromatografii

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční.

Fluorimetrické detektory umožňují měřit v průtokové kyvetě detektoru excitační fluorescenční spektra při konstantní vlnové délce emitovaného fluorescenčního záření, nebo emisní fluorescenční spektra při nastavené vlnové délce excitačního záření. Měření spekter se uskutečňuje buď v systému "stop-flow" nebo u některých detektorů i bez zastavení toku mobilní fáze a jsou pak obdobou detektorů diodového pole spektrofotometrických detektorů. [8]

Vlastní HPLC stanovení PAU

Identifikace BaP ve smyslu HPLC byla zavedena jako běžná metoda v analýze potravin od té doby, co probíhá dostatečně rychle a s opakovaně přesnými výsledky. HPLC separace více jak 20 PAU a jejich stanovení v extraktech organických materiálů byly názorně provedeny (Crosby *a kol.*, 1981). Nicméně jedním z hlavních problémů je chromatografické řešení pěticyklických sloučenin zahrnující tzv. benzpyrénových frakci (BaP, BeP, BkF a Per). [11]

Stanovení PAU sloučenin fluorescencí bylo upřednostňováno od rozběhnutí různých chromatogramů při kombinaci různých vlnových délek. Všechny PAU – obzvláště pak Per – mohou být detekovány při $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 300/408 nm a 280/395 nm, kde λ_{ex} značí excitační vlnovou délku a λ_{em} vlnovou délku emisí. Per byl detekován při 440/475 nm. Ostatní

kombinace vlnových délek je využívána pro další vybraná stanovení (Ant, Fu, BbP, BkF, BaP, BghiP a I123cdP) a 258/380 nm (Phe, Ant, Pyr a Chr). [19]

Fluorescenční spektra vzorků uzených ryb nedovolují aplikaci programovacích fluorescenčních detektorů, jenž mohou poskytovat lepší citlivost pro některé PAU. K získání přesných výsledků u ostatních PAU musí být přesně měřen retenční čas a píky se musí oddělit základní čarou dost dlouhou na uskutečnění důkazů u všech automatických kroků pro změny vlnových délek. Délka základní čáry by měla být dvoj- až trojnásobkem šířky píku, který může být určen jen při analýze několika PAU, avšak nedá se použít při analýze komplexních matric u vzorků uzených ryb, obzvláště pak u vzorků z tradičně zakuřovaných sušáren. UV detektor byl dodatečně použit pro stanovení množství Ant, Phe, Flu, Pyr a Chr (240 nm, 254 nm, 260 nm). (Tabulka 9). Externí směs standardů byla použita pro výpočet koncentrace PAU, i vzhledem k obnově interního standardu. Lineární závislost fluorescenční detekce a detekce UV byly měřeny pro kombinaci všech vlnových délek. S výjimkou BkF všechny PAU sloučeniny vykazovaly lineární závislost v celé testované oblasti. Sledované regresní koeficienty pro $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 300/408 jsou v tabulce 9. [19]

Tabulka 9. Linearita a limity detekce pro PAU po HPLC izolaci a fluorescenční detekci při různých kombinacích vlnových délek ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) a UV detekce u různých vlnových délek (nm). [19]

Sloučenina ^a	regresní koeficient (n=4)	Limit detekce [μg/kg] rybího vzorku						
	(300/408)	Fluorescenční detekce [λ _{ex} / λ _{em} nm]				UV detekce [nm]		
		300/408	280/395	360/460	258/380	240	254	260
Phe	0,9978	2,000	0,40		0,80	0,6	0,4	0,8
Ant	0,9998	0,500	0,50	1,00	0,02	0,4	0,2	0,8
Fu	0,9904	0,500	0,50	0,20		0,8	1,4	1
Pyr	0,9988	0,500	0,10		0,04	0,4	1,2	1
BaA	0,9994	0,060	0,02					0,6
Chr	0,9999	0,400	0,08		0,10			0,4
BbF	0,9999	0,040	0,08	0,04				
BkP	0,9787	0,004	0,02	0,10				
BaP	0,9988	0,020	0,02	0,20				
DBahA	0,9995	0,020	0,04					
BghiP	0,9992	0,040	0,10	1,00				
I123cdP	-	-	-	0,40				
Per	0,9997	0,040	při					

			440/475					
--	--	--	---------	--	--	--	--	--

^a Koncentrace jsou následující: Phe: 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Ant, Fu, Pyr, Chr: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, BaA, BbF, Per, BkF, BaP, DBaA: 0,001; 0,01; 0,025; 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. [19]

HPLC má jisté výhody v analýze PAU, jsou shrnuty v následujících bodech:

- izolace izomerů vykazuje velmi dobré výsledky
- vhodná citlivost a specifita UVD a FLD
- velikosti molekul PAU mohou být odhadovány na základě retenčního času použité reverzní fáze kolony
- možnost stanovení sloučenin s vysokou molekulovou hmotností
- analýza je povětšinou uskutečněna za teploty okolí, nehrozí riziko termálního rozkladu analytu [10]

HPLC fáze při stanovení PAU

Nejčastěji používané jsou nepolární, chemicky vázané stacionární fáze, obzvláště C_{18} (oktandecyl) na obrácené fázi. V kombinaci s gradientem elučních technik mohou být získány dostačující výsledky různých PAU. Četné komerčně dostupné obrácené fáze se liší v jejich selektivitě směrem k PAU kvůli velikosti částic, tvaru a druhu vázaných fází (Ruepert *a kol.*, 1985; Jinno a Kawasaki, 1983). [11]

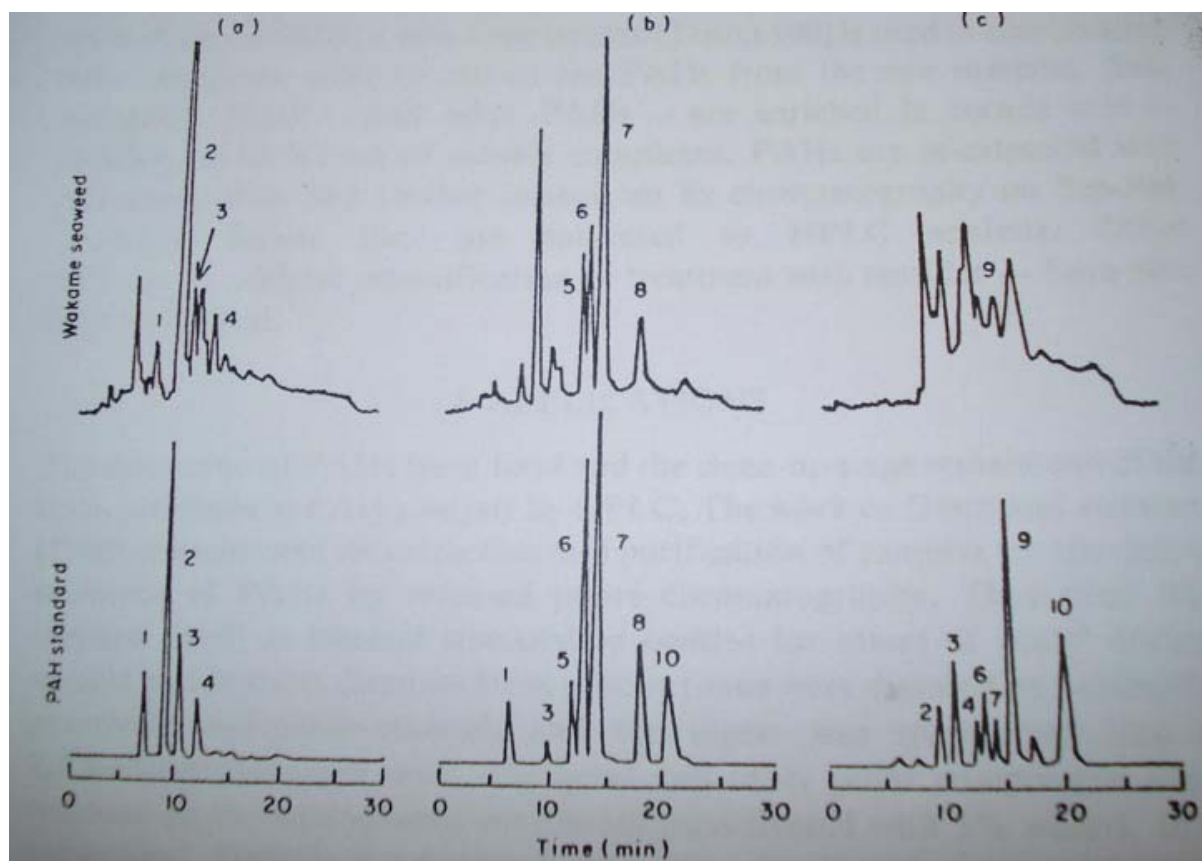
Lehce komerčně dostupné C_{18} kolony nejsou schopny zajistit jinou separaci kromě benzyprénové frakce. Pouze šest ze 30 testovaných komerčních kolon bylo schopno oddělit Per od BaP. [11]

Detektory u stanovení PAU

Pro stanovení PAU na množstevní křivce je nezbytné použití vysoce citlivých a vysoce selektivních detektorů. UV a fluorescenční detektory se postupně ukázaly být nejvíce vhodnými. PAU vykazují silnou absorpci v UV spektru a mnoho z nich je silně fluorescenční v celém rozsahu oblasti vlnové délky. [11]

Selektivita detekce UV absorpce může narůstat nastavením vlnové délky detektoru na příslušnou maximální absorpci jednotlivých PAU. Chromatografické píky, které nejdou zcela jednoznačně rozpoznat, mohou být rozlišeny za pomoci dvou a více rozdílných vlnových délek. Tak bylo popsáno stanovení množství BaP a rozlišení BaP od Per bez vzájemného působení při 290 nm (Krstulovic *a kol.*, 1977). Optimalizace odezvy detektoru pro jednotlivé PAU vede ke zvýšení citlivosti. Fluorescenční detektory vykazují vyšší citlivost i selektivitu. Vzájemné působení s ostatními ne-PAU sloučeninami jsou proto sledovány méně často, neboť je méně fluorescenčních sloučenin než UV absorbentů. Záleží na jejich struktuře, každý jednotlivý PAU vykazuje rozdílné fluorescenční charakteristiky. Ty mohou být použity na klasifikaci a identifikaci jednotlivých látek jako např. snímáním excitace a emisního spektra píků promývaných přes kolonu HPLC. [11]

Mimo techniky zastavení toku, kde je fluorescenční spektrum měřeno až po zastavení HPLC pumpy byly objeveny rovněž techniky měřící tzv. „za letu“. Fluorometrická fotodiody sady detektorů, jenž je připojena na HPLC je novým a slibným nástrojem k analýze PAU v komplexních matricích (Jadamec a Saner, 1977; Gluckman *a kol.*, 1985). Často se využívá dvou či více detektorů zároveň pro zabezpečení detekce širokého spektra PAU ve vzorku, bez ohledu na nejvhodnější detekční vlnovou délku, příkladem může být obrázek 6. [11]



Obrázek 7. HPLC chromatogramy 10 různých PAU detekovaných pomocí fluorescenčního sledování různé excitace a záření vlnové délky. a) excitace 334 nm, záření 384 nm; b) ex. 365 nm, zář. 430 nm; ex. 300 nm, zář. 393 nm. [23]

Tabulka č.10. Postupy izolace a HPLC podmínky používané pro stanovení PAU v uzených masových výrobcích [10]

Vzorek	Příprava vzorku	Kolona/stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Zdroj
SFA, Uzená masa	Zmýdelnění ethanolickým KOH, extrakce cyklohexanem, promývání nasyceným roztokem NaCl, vyčištění silikagelem	25 cm × 4 mm, Lichrosorb RP 18	Acetonitril - voda 8:2, izokratická 1,5 ml min ⁻¹	FLD, Ex: 305, 381 nm, Em: 389, 430, 520 nm	[37]
Uzené masové výrobky	Zmýdelnění směsí methanolu, vody a KOH, extrakce cyklohexanem, vymývání pomocí roztoku Na ₂ WO ₄ , vyčištění Florisilem	30 cm × 3 mm, Separon SGX C ₁₈ RP, 5 µm	Acetonitril - voda 3:1, izokratická 1,5 ml min ⁻¹	FLD, Ex/Em 310/410 nm	[38-41]
Uzené ryby, uzené masové pomazánky	Zmýdelnění směsí methanolu, vody a KOH, extrakce cyklohexanem, vyčištění Florisilem, rozdělení za pomoci DMSO/hexanu	25 cm × 4,6 mm, RP-18, 5 µm	Acetonitril-voda 7:3, izokratická, 3 ml min ⁻¹	UVD 254 nm, FLD Ex/Em 250/370 nm	[42]
Ryby, měkkýši	Zmýdelnění za pomoci směsí methanolu-vody-KOH pod refluxem, extrakce do n-hexanu, přečištění na silikagelu	Radial-Pak PAH	Acetonitril-voda 8:2, izokratická, 1 ml min ⁻¹	FLD Ex/Em 370/410	[43]
Uzené ryby	Zmýdelnění pod refluxem pomocí směsí methanol-voda-KOH, extrakce do cyklohexanu, extrakce PAU pomocí kofeinu/kys. Mravenčí, vymývání pomocí NaCl roztoku, extrakce cyklohexanem, přečištění na silikagelu	ET 15 cm × 4 mm, Nucleosil 5 C10 PAH	Acetonitril-voda 7:3 za min, poté gradient lineárně zvýšit na 9:1, v 19. minutě, poté 100 % acetonitril od 20 do 40 min, poté izokratická do 55 min	UVD 240, 254, 260 nm, FLD Ex/Em 300/408 a 280/395 nm	[44]
Uzené párky, uzené maso	Extrakce směsí chloroform-methanol, Předseparace GPC na Bio Beads S-X3	15 cm × 4,6 mm Supelcosil LC PAH, 5 µm	A: methanol-acetonitril-voda 50:25:25; B: acetonitril; 1 min 100% A, 25. min 100% B.	FLD proměnlivý Ex (240-293) Em (340-498) nm	[45]
Uzené párky, uzené maso	Extrakce methanolem ve Soxhletově ap., + KOH, extrakce v n-hexanu, vyčištění na Pep-Pak Florisilu	12,5 cm × 4,6 mm Envirosep-pp C ₁₈ 5 µm	I. Acetonitril-voda 7:3, izokratická, 2 ml min ⁻¹ , II. Acetonitril-voda 40:60, gradient do 100% acetonitrilu během 25 min, III. Acetonitril-voda 55:45, gradient do 100% acetonitrilu během 23 min	UVD 230-360 nm FLD proměnlivý Ex (232-302) Em (330-484) nm	[46]
Uzená ryba	Přímá extrakce chloroformem, předseparace na upravené křemičité koloně	Upravená kolona: 25 cm × 4,6 mm, sílica 5 MIKRO, analytická kolona: 15 × 4,6 mm 5 µ částice, Supelcosil LC-PAH	Upravená kolona: Pentan/5% DCM, 0,8 ml min ⁻¹ , analytická kolona: voda/acetonitril 6:4 po 5 min, poté do 100% acetonitrilu do 40 min, 1,5 ml min ⁻¹	FLD, různé nm	[47]
Uzené ryby, šunka	Zmýdelnění pomocí směsí methanol, voda a KOH, extrakce cyklohexanem, rozdělení za pomoci DMSO/hexan	15 cm × 6 mm, ODS, 5 µ částice	Acetonitril-voda 8:2, izokratický, 1 ml min ⁻¹	FLD, Ex/Em 370/410 nm	[48]
Uzené masové výrobky	Zmýdelnění methanolickým KOH, extrakce n-hexanem, rozdělení za pomoci SPE na CN váženém oxidu křemičitém	Nucleosil 100-5 C18 PAK	Acetonitril-voda 8:2, izokratický, 0,5 ml min ⁻¹	FLD, Ex/Em 290/430 nm	[49]
Uzené ryby	Zmýdelnění pomocí směsí methanol-voda-KOH pod refluxem, extrakce n-hexan, vyčištění silikagelem	15 cm × 6 mm, ODS, 5 µ částice	Acetonitril-voda 8:2, izokratický, 1 ml min ⁻¹	FLD Ex/Em 370/410	[50]
Uzené kuřata	Extrakce methanolem ve Soxhletově ap., + KOH, extrakce v n-hexanu, vyčištění na Pep-Pak Florisilu	12,5 cm × 4,6 mm Envirosep-pp 5 µm C ₁₈	Acetonitril-voda 55:45, gradient na 100%, acetonitril během 23 min 1,2 ml min ⁻¹	FLD různé nm	[51]

6. ZÁVĚRY

PAU představují důležitou skupinu chemických sloučenin, některé z nich se řadí mezi potencionální karcinogeny. Pyrolýzou nebo spalováním dřeva a pohoných látek dochází ke tvoření PAU. Kontaminace potravin je povětšinou příčinou úpravy potravin kouřem, kontaminace z půdy, znečištění vody a vzduchu, různých způsobů vaření a přípravy jídel, dalšími důvody bývají potravinová aditiva, zpracování potravin aj.

PAU, včetně BaP, se v nízkých koncentracích vyskytují ve vzorcích životního prostředí a byly nalezeny v uzených rybách a masech, rostlinných olejích, obilí, ovoci, mořských plodech, whisky atd.

Kontrolní orgány soustavně zjišťují, zda jsou splněny požadavky stanovené Nařízením 1881/2006/ES.

Různé chromatografické postupy, včetně kolonové, papírové a TLC, byly použity na izolování těchto látek z kontaminovaných vzorků. Některé z těchto metod se osvědčily pro získání přijatelných výsledků, obzvláště při stanovení jednotlivých PAU (např. BaP). Jelikož se tyto kontaminanty vyskytují jakožto komplexní směs PAU, analytické metody jsou potřeba k oddělení a určení různých typů PAU. Spolehlivé určení kontaminace potravin a ostatních složek životního prostředí vyžaduje stanovení různých PAU hlavně z pohledu významných rozdílů v jejich mutagenním a karcinogenním potenciálu jednotlivých sloučenin. GC a HPLC jsou nejčastěji používanými technikami ke splnění analytických požadavků. Problémy vznikají při odebrání vzorků, jejich přípravě a určení chromatografických podmínek.

Stanovení PAU v uzených masových produktech je permanentní proces. Realizace odhadu skutečného rizika bude v budoucnu vyžadovat jednoduchou, přizpůsobivou a hlavně přesnou metodu na určení PAU v potravinách, protože hlavním lidským zdrojem příjmu PAU jsou potraviny. Tudíž je a bude nezbytné pokračovat v rozvoji a sjednocování analytických metod použitelných pro on-line analýzy, souhrnně po celém světě, což umožní určení skutečného rizika dávky rezultující z permanentní přítomnosti PAU v potravním řetězci.

V mnoha pracích, stejně jako v této, autoři porovnávali výhody a nevýhody obou metod (GC a HPLC), když studia byla zaměřena zejména na obnovu stanovení, kvalitu izolačního procesu, dobu analýzy, cenu aparatury atd. Byly srovnány výsledky analýzy některých potravin získané GC a HPLC. Třicet pět párů analýz bylo testováno použitím statistického

procesu (tzv. Studentský *t*-test). Z toho 25 párů nebylo výrazně odlišných v rozsahu 95 % spolehlivosti použitého limitu. Ale data BkF/benzofluoranténů a DBaH/dibenzoantracénů nebyly porovnány, neboť se měřily jiné analyty. Standardní odchylky ukázaly, že opakovatelnost obou metod byla velmi dobrá, pohybovala se v rozmezí 10 %. Metody byly určeny jako vhodné k určení po celé šíři stanovovaného rozsahu (0,2 – 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). V závěru bylo zdůrazněno, že kapilární GC vykazuje větší sílu odezvy, je výhodnější co se týče počtu stanovení na základě podmínek stanovení, tudíž touto metodou může být separováno a určeno více PAU. Naopak HPLC byla určena jako vhodná metoda k separování jednotlivých izomerů (BbF a BkF; Chr a Tph), což znamená lepší selektivitu. Byla srovnávána izolace a detekční podmínky obou metod analýzou uzeného kuřete. Dospělo se k závěru, že 16 předních PAU polutantů může být současně izolováno pomocí HPLC užívající gradientovou eluci a detekci FLD se sedmi nastaveními programovatelných vlnových délek. S GC, tedy teplotně programovatelnou metodou, se dokázalo oddělit taktéž 16 PAU. Přítomnost nečistot v uzených masových výrobcích může rušit stanovení množství PAU pomocí HPLC. S ITD mohou být PAU identifikovány i v přítomnosti tuků – nebo PAU – stejně tak jako nečistoty. Retenční časy HPLC bývají kratší než u GC, zatímco HPLC vykazuje lepší izolaci pro více sloučenin než GC. Byly srovnány GC a HPLC metody analyzováním 16 PAU polutantů. Poukázáno bylo na to, že chromatografické výsledky mohou být děleny dle kombinace kolonové kapacity, kolonové kapacity a selektivity dělení. Ve výsledcích měla GC vyšší kolonovou efektivitu a získala tak výhodu, co se analýzy komplexních směsí týče, ale HPLC měla častěji vyšší kolonovou selektivitu, která je důležitá pro oddělení izomerických sloučenin. Na základě těchto výsledků jsou dané metody vhodné pro vzájemné doplnění při stanovení PAU a jsou tedy nezbytnými pro precizní a spolehlivou analýzu.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999, 368 str. ISBN 80-902391-5-3
- [2] PIPEK, P. *Technologie masa II*. 1. vyd. Praha : Karmelitánské nakladatelství v Kostelním Vydří, 1998. 360 s. ISBN 80-7192-283-8.
- [3] SUHAJ, M. – KOVÁČ, M. *Prírodné toxikanty a antinutričné látky v potravinách*. 1. vyd. Bratislava : Výskumný ústav potravinársky, Bratislava a Slovenská poľnohospodárska a potravinárska komora, 1996. 140 s. ISBN 80-967064-8-9.
- [4] Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Integrovaný registr znečišťování* [online]. 2006 [cit. 2007-05-16]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/látky/polycyklicke_aromati>.
- [5] Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs). *Budoucnost bez jedů* [online]. 2007 [cit. 2007-05-16]. Dostupné z: <<http://bezjedu.arnika.org/chemicka-latka.shtml?x=610570>>.
- [6] Polycyklické aromatické uhlovodíky. *News for HPLC analysis* [online]. 2004 , [cit. 2007-05-16]. Dostupné z: <<http://www.sweb.cz/hplc1/Kontaminant/pah.htm>>.
- [7] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [8] Fluorescenční HPLC detektory. *hplc.cz* [online]. 1999 [cit. 2008-02-03]. Dostupné z: <<http://www.hplc.cz/>>.
- [9] Analytické stanovení polyaromatických uhlovodíků v ovzduší. *VŠCHT* [online]. 2008 [cit. 2008-01-03]. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/homepage>>.
- [10] ŠIMKO, P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B*. 2002, 770, pp. 4.
- [11] STAHL, W. – EISENBRAND, G. Determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and Nitrosamines. *Academic Press*. 1988, 10, pp. 377.

- [12] Polyaromatické uhlovodíky. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2002, [cit. 2008-05-03]. Dostupné z: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/default.asp>>.
- [13] Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Ministerstvo vnitra a Policejní prezidium ČR* [online]. 2005, [cit. 2008-05-03], pp. 103-104. Dostupné z: <<http://www.mvcr.cz/>>.
- [14] POTTHAST, K. – EIGNER, G. A new method for the rapid isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat products. *Journal of chromatography*. 1974, 103, pp. 173.
- [15] STOLYHWO, A. – SIKORSKI, Z.E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish - a critical review. *Food Chemistry*. 2004, 91, pp. 303.
- [16] RIHA, W.E. – WENDORFF, W.L.; RANK, S. Benzo(a)pyrene Content of Smoked and Smoke-Flavored Cheese Products Sold in Wisconsin. *Journal of Food Protection*. 1992, 55, pp. 636.
- [17] CEJPEK, K. – HAJŠLOVÁ, J. – JEHLÍČKOVÁ, Z. – MERHAUT, J. Simplified extraction and cleanup procedure for the determination of PAHs in fatty and protein-rich matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 1995, 61, pp. 65.
- [18] YABIKU, H.Y. – MARTINS, M.S. – TAKAHASHI, M.Y. Levels of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. *Food Additives and Contaminants*. 1992, 4, pp. 399.
- [19] KARL, H. – LEINEMANN, M. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fishery products from different smoking kilns. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1995, 202, pp. 458.
- [20] CHEN, J. – CHEN, S. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by low density polyethylene from liquid model and roasted meat. *Food Chemistry*. 2004, 90, pp. 461.
- [21] HUSAIN, A. – NAEEMI, E. – DASHTI, B. – AL-OMIRAH, H; AL-ZENKI, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in Kuwait. *Food Additives and contaminants*. 1996, 3, pp. 295.
- [22] KYPRIANOU, M. Commission regulation (EC) No 1881/2006

of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 2006, 364, pp. 11.

[23] OBANA, H. – HORI, S. – TANAKA, R. – KASHIMOTO, T. Dietary intakes of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 1984, 10, pp. 35.

[24] WISE, A.S., a kol. *Journal of chromatography*, 1996, 642, pp. 329

[25] MOTTIER, P. – PARISOD, V. – TURESKY, R.J. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2000, 48, pp. 1160.

[26] AFOLABI, A.O. – ADESULU, E.A. – OKE, O.L. Oke, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1983, 31, pp. 1083

[27] GRIMMER, G. – BÖHNKE, H., *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1975, 58, pp. 725.

[28] FRETHEIM, K. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1976, 24, pp. 976.

[29] BINNNEMANN, P.H. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1979, 169, pp. 447 – 452.

[30] LARSSON, B.K. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1982, 174, pp. 101.

[31] LAWENCE, J.F. – WEBER, D.F. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1984, 32, pp. 795.

[32] KARL, H. – LEINEMANN, M. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1996, 202, pp. 458.

[33] WANG, G. – LEE, A.S. – LEWIS, M. – KAMATH, B. – ARCHER, R.K. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1999, 47, pp. 1062.

[34] SPEER, K. – STEEG, E. – HORSTMANN, P. – KUEHN, T. – MONTAG, A. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*. 1990, 13, pp. 104.

- [35] CHEN, B.H. – LIN, Y.S. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1997, 45, pp. 1394.
- [36] CHIU, C.P. – LIN, Y.S. – CHEN, B.H. *Chromatographia*. 1997, 44, pp. 497.
- [37] STIJVE, T. – HISCHENHUBER, C. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*. 1987, 83, pp. 276.
- [38] ŠIMKO, P. – GOMBITA M. – KAROVIČOVÁ, J. *Nahrung*. 1991, 35, pp. 103.
- [39] ŠIMKO, P. – GERGELY Š. – KAROVIČOVÁ, P. – DRDÁK, M. – KNEZO, J. *Meat Science*. 1993, 34, pp. 301.
- [40] ŠIMKO, P. *Food Chemistry*. 1991, 40, pp. 293.
- [41] ŠIMKO, P. – KAROVIČOVÁ – KUBINCOVÁ, M. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1991, 192, pp. 538.
- [42] LAWRENCE, J.F. – WEBER, D.F. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1984, 32, pp. 795.
- [43] TAKATSUKI, K. – SUZUKI, S. – SATO, N. – USHIZAWA, I. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1985, 68, pp. 945.
- [44] KARL, H. – LEINEMANN, M. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1996, 202, pp. 458.
- [45] CEJPEK, K. – HAJŠLOVÁ, J. – JEHLIČKOVÁ, Z. – MERHAUT, J. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 1995, 61, pp. 65.
- [46] ŠIMKO, P. – PETRÍK, J. – KAROVIČOVÁ, J. *Acta Alimentaria*. 1992, 21, pp. 107.
- [47] MORET, S. – CONTE, L. – DEAN, D.J. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1999, 47, pp. 1367.
- [48] DENNIS, M.J. – MASSEY, R.C. – MCWEENY, D.J. – LARSSON, B. – ERIKSSON, A. *Journal of Chromatography*. 1984, 285, pp. 127.
- [49] HARTMANN, K. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*. 2000, 96, pp. 163.
- [50] OVA, G. – ONARAN, S. *Advanced Food Science*. 1998, 20, pp. 168.

- [51] CHIU, C.P. – LIN, Y.S. - CHEN, B.H., *Chromatographia*. 1997, 44, pp. 497.
- [52] Benzpyren. *Bezpečnost potravin* [online]. 2008 [cit. 2008-04-22]. Dostupné z: <<http://www.agronavigator.cz/az/index.htm>>.
- [53] SIM, P.G. – BOYD, R.K. – GERSHEY, B.M. – GUEVREMONT, R. – JAMIESON, W.D. – QUILLIAN, M.A. – GERGELY, R.J. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*. 1987, 14, pp. 375.

8. SEZNAM SYMBOLŮ

Ant ... Antracén

AOAC ... Asociace oficiálních analytických metod (*Association of Official Analytical Methods*)

BaA ... Benzo[*a*]antracén

BaC ... Benzo[*a*]chrysén

BaP ... benzo[*a*]pyrén

BbF ... Benzo[*b*]fluorantén

BcC ... Benzo[*c*]chrysén

BCF ... biokoncentrační faktor

BeP ... benzo[*e*]pyrén

BF ... benzo[*f*]fluoranthén

BjF ... Benzo[*j*]fluoranthén

BkF ... Benzo[*k*]fluorantén

BghiP ... Benzo[*g,h,i*]perylén

CC ... kolonová chromatografie (*column chromatography*)

DBahA ... Dibenzo[*a,h*]antracén

DBahP ... Dibenzo[*a,h*]pyrén

DBaiP ... Dibenzo[*a,i*]pyrén

DCM ... Dichlormethan

DDT ... Dichlor-difeny-trichlorethan

DMSO ... Dimethylsulfoxid

EPA ... Úřad enviromentální ochrany (*Environmental Protection Agency*)

EU ... Evropská unie (*European union*)

Fad ... Formaldehyd

FID ... plameno ionizační detekce (*flame ionization detector*)

FLD ... fluorimetrický detektor (*Fluorimetric detector*)

Fu ... Fluoranthén

GC ... plynová chromatografie (*Gas Chromatography*)

GPC ... gelová permeační chromatografie

HPLC ... vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*high performance liquid chromatography*)

Chr ... Chrysén

I123-cdP ... Indeno[1,2,3-cd]pyrén

IARC ... mezinárodní úřad pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research on Cancer*)

IRZ ... integrovaný registr znečišťování

ITD ... detektor jontového záchytu (*Ion trap detection*)

IUCC ... mezinárodní liga proti rakovině (*International Union against Cancer*)

IUPAC ... Mezinárodní unie čisté a užité chemie (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

JECFA ... setkání FAO/WHO expertů výboru pro potravinová aditiva (*Joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives*)

Kor ... Koronen

MSD ... detektor hmotnostní spektrometrie (*Mass spectrometry detector*)

Naf ... Naftalén

NPM ... nejvyšší přípustné množství

ODS ... Oktadecylsilan

PAU ... polycyklické aromatické uhlovodíky

PCB ... polychlorované bifenyly

Phe ... Fenanthrén (*Phenanthrene*)

Per ... Perylén

SFA ... kouřem ochucená aditiva (*Smoke Flavouring Additives*)

Tph ... Trifenylén