

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Jan Hlávka

**Stanovení těkavých a netěkavých  
produktů dusitanu v uzeninách**

Determination of volatile and non-volatile nitrite products  
in sausages

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Odborný konzultant: RNDr. Tomáš Vrzal, Ph.D.

Praha 2023

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 03.05.2023

podpis:

## **Poděkování**

Chtěl bych touto cestou poděkovat mému odbornému konzultantovi RNDr. Tomáši Vrzalovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS) v Praze za jeho odborné vedení, ochotu a také trpělivost při vypracování této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. z katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy za možnost vypracování experimentální části této práce na VÚPS a za věcné poznámky a připomínky při kontrole diplomové práce.

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá problematikou stanovení produktů dusitanu v uzenářských výrobcích za pomoci plynové chromatografie. V první části této práce byla vyvinuta extrakční metoda pro stanovení 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu ve vzorcích uzenářských výrobků za pomoci plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Pro extrakci analytů ze vzorků uzeniny byl použit roztok 1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Z důvodu nižší těkavosti analytů bylo nutné před každou analýzou provést jejich derivatizaci pomocí *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu. Pomocí této metody bylo provedeno stanovení 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu ve vybraných vzorcích uzenin. Pro kvantifikaci těchto analytů byla, z důvodu silného matričního efektu, použita metoda přidavku standardu. U vybraných druhů uzeniny bylo sledováno, zda se koncentrace analytů ve výrobcích s různým obsahem masa liší či nikoliv.

V závěru této práce byla provedena validace metody pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích pomocí plynové chromatografie s chemiluminiscenční detekcí. Analyty byly N-nitrosodimethylamin, N-nitrosodiethylamin, N-nitrosodibutylamin, N-nitrosopiperidin, N-nitrosopyrolidin a N-nitrosomorfolin. Na základě výsledků zvolených výkonnostních charakteristik bylo zjištěno, že tuto metodu je možné použít pouze pro stanovení prvních dvou zmíněných analytů.

## Klíčová slova

Dusitan sodný, produkty dusitanu, nitroso sloučeniny, kyano sloučeniny, extrakce, plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.

## **Abstract**

This diploma thesis deals with the determination of nitrite products in sausages using gas chromatography. In the first part of this thesis, an extraction method was developed for the determination of 4-cyanophenol and N-nitrosoproline in samples of sausage products using gas chromatography with tandem mass spectroscopy. A 1% formic acid solution in acetonitrile was used to extract the analytes from the sausage samples. Due to the lower volatility of the analytes, derivatisation with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide was necessary before each analysis. Using this method, an indicative determination of the concentrations of 4-cyanophenol and N-nitrosoproline in selected sausage samples was carried out. The standard addition method was used for the quantification of these analytes because of the strong matrix effect. For the selected types of sausage, it was observed whether or not the concentrations of the analytes differed in products with different meat contents.

At the end of this diploma thesis, a validation of a method for the determination of volatile N-nitrosamines in sausage products by gas chromatography with chemiluminescence detection was performed. The analytes were N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodibutylamine, N-nitrosopiperidine, N-nitrosopyrrolidine and N-nitrosomorpholine. Based on the results of the selected performance characteristics, it was found that this method could only be used for the determination of the first two analytes mentioned.

## **Key words**

Sodium nitrite, volatile products of nitrite, non-volatile products of nitrite, nitroso compounds, cyano-compounds, extraction, gas chromatography with chemiluminescence detection, gas chromatography with mass spectrometric detection

## Seznam zkratek a symbolů

$A_{\text{prům}}$	Průměrná hodnota ploch píků analytu [A. U.]
ATNC	Apparent Total N-nitroso Compounds
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
$c_0$	Stanovená koncentrace analytu v nespikovaném vzorku [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
$c_g$	Hmotnotní koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
$c_{\text{prům}}$	Průměrná hodnota koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
$c_{\text{sk}}$	Skutečná koncentrace analytu ve spikovaném vzorku [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
$c_{\text{st}}$	Stanovená koncentrace analytu ve spikovaném vzorku [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GC-NCD	Plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$K$	Citlivost
LOQ	Mez stanovitelnosti
NCD	Chemiluminiscenční detektor selektivní pro dusíkaté látky (z ang. Nitroso Specific Chemiluminescence Detector)
NDBA	N-nitrosodibutylamin
NDEA	N-nitrosodiethylamin
NDMA	N-nitrosodimethylamin
NDPA	N-nitrosodipropylamin
NMOR	N-nitrosomorfolin
NMPhA	N-nitrosomethylfenylamin
NPIP	N-nitrosopiperidin
NPRO	N-nitrosoprolin
NPYR	N-nitrosopyrrolidin
$r_{r,95}$	Relativní opakovatelnost [%]
$s_A$	Směrodatná odchylka ploch píků analytu [A. U.]
$s_c$	Směrodatná odchylka hodnot stanovených koncentrací [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
$s_r$	Relativní směrodatná odchylka hodnot stanovených koncentrací [%]
$u_r$	Relativní nejistota [%]
$z$	Správnost stanovení [%]

## Obsah

1.	Teoretický úvod.....	9
1.1.	Dusitany v uzeninách.....	11
1.1.1.	Alternativa dusitanu jakožto konzervačního činidla .....	12
1.2.	Produkty dusitanu v masných výrobcích .....	13
1.2.1.	Nitrososloučeniny.....	13
1.2.1.1.	Toxikologie a metabolismus nitrososloučenin.....	14
1.2.1.2.	Vznik nitrososloučenin.....	16
1.2.1.3.	Metody stanovení nitrososloučenin.....	18
1.2.2.	Extrakce produktů dusitanu z masných výrobků.....	19
1.2.3.	Derivatizace netěkavých produktů dusitanu.....	19
1.3.	Chemiluminiscenční detektor .....	20
1.4.	Validace .....	22
2.	Experimentální část .....	24
2.1.	Metoda pro semi-kvantitativní stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzenářských výrobcích.....	24
2.1.1.	Použité chemikálie.....	24
2.1.2.	Přístroje a vybavení .....	24
2.1.3.	Postup přípravy vzorku.....	25
2.1.4.	Podmínky GC-MS/MS analýzy.....	25
2.1.5.	Zpracování dat .....	26
2.1.6.	Použité vzorky .....	27
2.1.7.	Extrakce analytů z uměle připravených vzorků masa .....	27
2.2.	Metoda pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích pomocí GC-NCD.....	28
2.2.1.	Použité chemikálie.....	28
2.2.2.	Přístroje a zařízení .....	28
2.2.3.	Postup přípravy vzorku.....	29
2.2.4.	Podmínky GC-NCD analýzy .....	29
2.2.5.	Zpracování dat .....	29
2.2.6.	Použité vzorky .....	30
3.	Výsledky a diskuse .....	31

3.1. Vývoj extrakční metody pro stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzeninách.....	31
3.1.1. Výběr vhodného extrakčního činidla.....	31
3.1.2. Extrahovatelnost analytů .....	32
3.1.3. Eliminace nežádoucích vyextrahovaných složek pocházejících z matrice vzorku uzeniny.....	35
3.1.3.1. Bílkoviny a mechanické nečistoty.....	35
3.1.3.2. Voda .....	36
3.1.3.3. Tuk .....	36
3.1.4. Odhalení případných ztrát analytů při extrakci .....	37
3.1.5. Modifikace dosavadního postupu extrakce .....	38
3.2. Aplikace vyvinuté metody na reálné vzorky uzenin.....	40
3.3. Validace metody pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích.....	48
3.3.1. Stanovení linearity .....	48
3.3.2. Určení správnosti, opakovatelnosti a meze stanovitelnosti jednotlivých analytů .....	50
3.3.3. Nejistota stanovení .....	51
4. Závěr.....	53
5. Použité informační zdroje.....	55

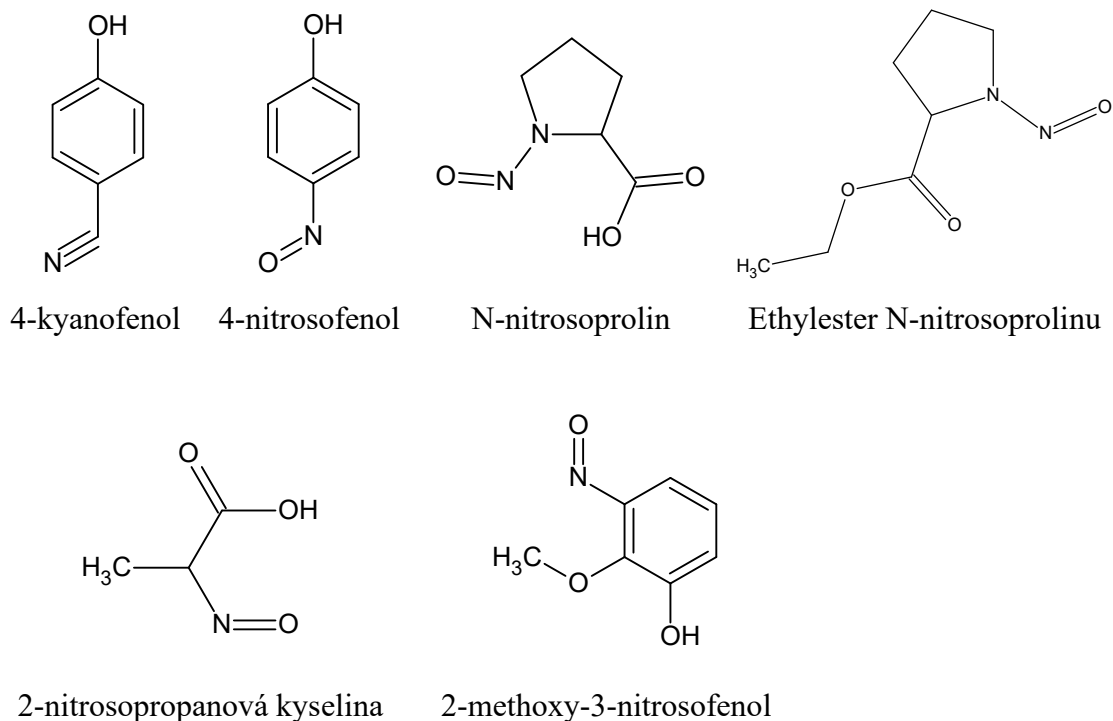


# 1. Teoretický úvod

Maso a masné výrobky jsou velice náchylné k oxidačním jevům, které ovlivňují kvalitu těchto produktů, což má obrovský vliv na jejich výslednou trvanlivost. Zejména jde o oxidaci lipidů, která způsobuje negativní změnu barvy či chuti daného výrobku [1]. Pro eliminaci těchto nežádoucích reakcí se při výrobě uzenářských výrobků, především při jejich zpracování, přidávají látky schopné jejich inhibice. Jde o tzv. aditiva, což jsou látky, které jsou schopny zajistit například požadovaný vzhled, vůni, chuť, či trvanlivost masného výrobku [2]. Velice často používaným aditivem je dusitan sodný (E250) či draselný (E249), který je svou přítomností schopen vytvořit ideální podmínky pro dosažení požadované kvality masných výrobků, je však nutné brát také v úvahu, že jde o látku klasifikovanou jako toxická. Pozornost je také věnována produktům reakce dusitanu s látkami v mase. Těmito produkty jsou sloučeniny ze skupiny nitrosloučenin, nitrososloučenin a kyanosloučenin, jež mohou být při nadměrné konzumaci pro člověka vysoce škodlivé [2, 3]. Vznik těchto látek v uzenářských výrobcích je ovlivňován mnoha faktory, například samotnou kvalitou masa, obsahem tuku nebo zpracováním, což zahrnuje použití určitých přísad, tepla při sušení či uzení, použité koření, podmínky skladování a následné balení [4]. Mnoho studií potvrdilo, že tyto sloučeniny, především nitrososloučeniny, mohou mít jak karcinogenní, tak mutagenní účinky [5, 6, 7]. Skutečnost, že produkty dusitanu mohou mít tyto negativní vlastnosti, byla zjištěna již v 60. letech 20. století [8]. Přítomnost těchto látek byla již prokázána v grilovaném mase, sušených rybách, uzeninách, sladu, pivu či také v kosmetických přípravcích [2, 9]. Vzhledem k těmto negativním vlastnostem je tedy nutné tyto látky v uzenářských výrobcích sledovat.

Prvním cílem této diplomové práce bylo vyvinout extrakční postup pro semi-quantitativní stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzenářských výrobcích, jež by měl být především univerzální pro všechny druhy uzenin. Touto metodou by mělo být možné sledovat sloučeniny, které byly identifikovány ve studii, *Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer*, jež byla provedena na Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze, viz kapitola 1.2.1.1. [10]. Struktury těchto sloučenin jsou uvedeny na Obrázku 1. Pro stanovení těchto analytů byla použita plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Tato vyvinutá metoda by měla

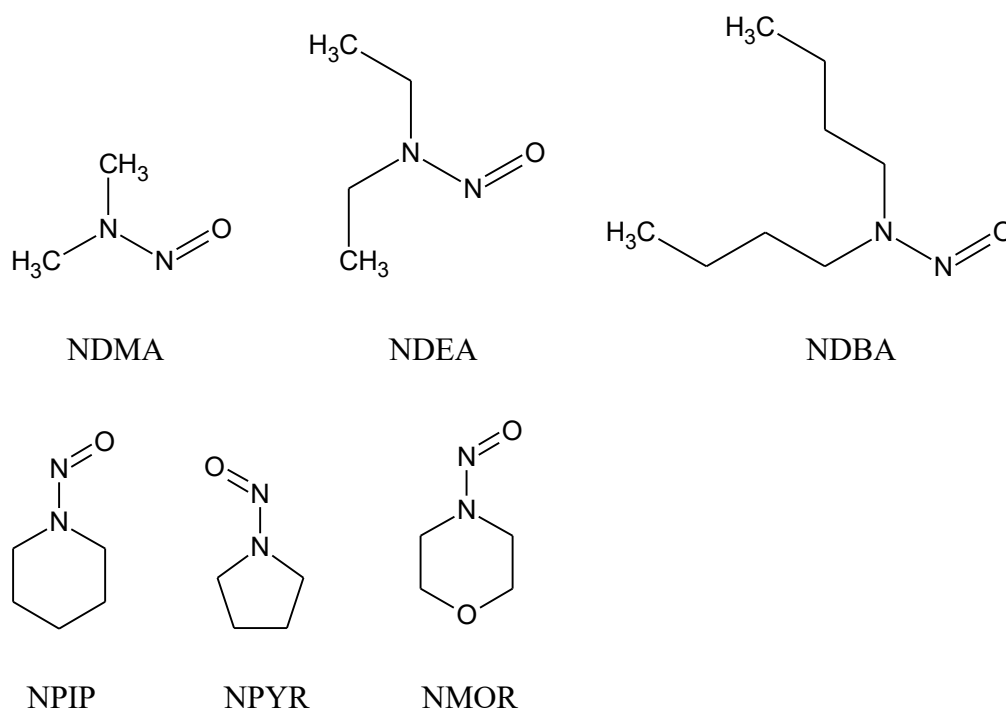
být následně aplikována na reálné vzorky uzenářských výrobků, u nichž by měly být porovnávány koncentrace analytů vzhledem k obsahu masa použitého při jejich výrobě.



**Obrázek 1** – Struktury molekul, jež byly identifikovány ve studii *Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer*, které v této práci vystupují jako analyty při vývoji metody pro stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzenářských výrobcích.

Druhým cílem této práce byla validace již vyvinuté metody pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích. Šlo o metodu vytvořenou Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a.s. v Praze. Analyty byly N-nitrosodimethylamin (NDMA), N-nitrosodiethylamin (NDEA), N-nitrosodibutylamin (NDBA), N-nitrosopiperidin (NPIP), N-nitrosopyrolidin (NPYR) a N-nitrosomorfolin (NMOR), viz Obrázek 2. Metoda využívá pro uvolnění analytů z matrice vzorku vakuovou destilaci. Po extrakci analytů z destilátu do dichlormethanu a po následném zakoncentrování jsou analyty stanoveny pomocí plynové chromatografie s chemiluminiscenční detekcí. Výkonnostními charakteristikami metody byly zvoleny:

správnost stanovení, opakovatelnost stanovení, linearita, mez stanovitelnosti a nejistota stanovení.



**Obrázek 2** – Struktury molekul, jež vystupují jako analyty v metodě pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích.

## 1.1. Dusitany v uzeninách

Dusitan je vědomě využíván již od počátku 20. století jako látka schopná zajistit požadovaný vzhled uzenářského výrobku a také pro své konzervační a antimikrobiální účinky [11]. Jde o účinný inhibitor růstu anaerobních bakterií, především bakterie *Clostridium botulinum*, jehož přítomností se výrazně snižuje riziko tvorby toxinů a tepelně odolných spor, což má významný vliv na výslednou trvanlivost daného masného výrobku [4, 12]. Dalším důvodem použití dusitanu je jeho schopnost vytváření růžovočerveného zbarvení uzeniny [3]. V přítomnosti dusitanu vzniká v mase nitrosylmyoglobin, který se při tepelném zpracování degraduje na nitroso-myochromogen, což je stabilní červený protein, který vytváří právě růžovočervené zbarvení. Pokud je však tento protein vystaven ultrafialovému záření či přítomnosti bakterií, červené zbarvení mizí [12, 13]. Dusitan se v mase rozkládá na oxid dusnatý, který se váže na železnaté ionty v hemu, čímž zpomaluje proces peroxidace lipidů [13].

Toto aditivum bylo nevědomě používáno již od roku 3000 př. n. l., kdy se používala sůl přirozeně kontaminovaná dusitany a dusičnany [13]. Někdy okolo roku 200 př. n. l. Římané zjistili, že sůl z určitých zdrojů obsahuje jisté kontaminanty, jež přispívají k tvorbě červeného zbarvení a chuti uzeného masa. Přítomnou látkou, zodpovědnou za vznik tohoto zbarvení, byl s velkou pravděpodobností právě dusitan [8].

Při použití dusitanu je nutné brát také ohled na jeho negativní vlastnosti spojené s přílišnou konzumací masných výrobků, kvůli kterým může být i zdraví škodlivý [3]. Odhadovanou letální dávkou dusitanu sodného u dospělého člověka je 6000 mg, kdy takováto dávka může způsobit methemoglobinémii, koronární ischemii či cévní mozkovou příhodu v důsledku hypotenze, tachykardie a hypoxie [11].

Dle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/52/ES je reziduální obsah dusitanu sodného (nepřeměněného na oxid dusnatý) limitován hodnotou 50 mg/kg u tepelně neopracovaných, uzených nebo sušených masných výrobků. Dále je limitován hodnotou 100 mg/kg u ostatních uzených a masných výrobků a masných výrobků v konzervách a 175 mg/kg u anglické slaniny [14].

O problematiku dusitanů v masných výrobcích se velice zajímají například dánské úřady se snahou minimalizovat použití dusitanů, aniž by byla ohrožena mikrobiologická bezpečnost masných výrobků. Dánské úřady vytvořily předpisy pro používání dusitanů pro konzervaci masa, které umožňují přidání maximálně 60 mg dusitanu na 1 kg většiny masných výrobků [15].

### **1.1.1. Alternativa dusitanu jakožto konzervačního činidla**

Jednou z možných alternativ dusitanu je přímé použití určitých chemikálií, které jsou schopny inhibovat případné patogeny či oxidaci lipidů. Těmito látkami jsou například oxid siřičitý, ethylendiamintetraoctová kyselina, fumarátový ester či fosfornan sodný. Přímé použití těchto látek by mohlo mít velice dobré výsledky, co se týká zmíněné inhibice, avšak není vyloučeno, že nemohou vzniknout, zatím nepopsané, negativní účinky těchto látek [12]. Momentálně nejrelevantnějšími sloučeninami vhodnými pro konzervaci masných výrobků, jsou polyfenoly (např. kyseliny kávová či kvercetin) a esenciální oleje (např.  $\beta$ -pinen) [1].

Bezpečnějšími alternativami dusitanu by mohly být například různé přírodní látky. Bylo zjištěno, že některé vitamíny, jako například  $\alpha$ -tokoferol, mají schopnosti

inhibice růstu patogenů. Dále například koření je považováno za výbornou alternativu dusitanu, a to díky svým antibakteriálním a antioxidačním vlastnostem. Muškátový květ, oregano či rozmarýn mají antioxidační vlastnosti, kterými mohou zabraňovat žluknutí tuků. Dále je známo, že černý pepř, česnek, nové koření či zázvor mají schopnost stimulace bakterie *Lactobacillus* produkující kyselinu mléčnou, jež zvyšuje trvanlivost masných výrobků. Zmíněný česnek má rovněž silné antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, kdy v kombinaci s hřebíčkem je schopen inhibice veškerých patogenních bakterií. Nevýhodou použití koření může být však vliv na výslednou chuť dané potraviny při použití jejího nadměrného množství [12].

## 1.2. Produkty dusitanu v masných výrobcích

Nejvýznamnějšími produkty dusitanu v uzenářských výrobcích jsou již zmíněné nitrosloučeniny, nitrososloučeniny či kyanosloučeniny. Nejvíce studovanými sloučeninami jsou nitrososloučeniny. Důvodem je skutečnost, že těchto produktů dusitanu bylo doposud identifikováno nejvíce. Dále také proto, že u těchto látek byly zjištěny negativní účinky na lidský organismus. Oproti tomu produktů dusitanu ze skupin nitrosloučenin a kyanosloučenin bylo identifikováno jen velmi málo, proto jsou v mnohých studiích často opomíjeny. Přítomnost nitrosloučenin a kyanosloučenin byla však například prokázána ve studii *Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer*, v níž byly charakterizovány produkty reakce dusitanu sodného s látkami v pivu. Jako produkty reakce dusitanu, ze skupiny nitrosloučenin a kyanosloučenin, byly nalezeny 2-methoxy-5-nitrofenol a 4-kyanofenol [10]. V pivu s dusitanem reagují především přítomné fenoly, aminokyseliny, aminy či peptidy, což jsou látky, které se mohou rovněž nacházet v mase. Přítomnost produktů dusitanu nalezených v pivu je proto možná i v uzenářských výrobcích [10].

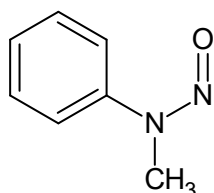
### 1.2.1. Nitrososloučeniny

Nitrososloučeniny jsou látky obsahující ve své struktuře navázanou nitroso skupinu. Podle toho, na jaký atom je nitroso skupina navázána, je možné rozlišit C-, N-, S- a O- nitrososloučeniny. Nejvýznamnějšími produkty dusitanu v potravinách jsou N-nitrososloučeniny, kdy jde o sekundární aminy nesoucí nitrososkupinu a dva uhlíkaté

zbytky, aromatické cykly, acyly či heterocyklus. [2]. Dle rozdílné tenze par lze nitrososloučeniny rozdělit na těkavé, málo těkavé a netěkavé [2,16].

Mezi těkavé nitrososloučeniny se řadí látky s kratšími uhlovodíkovými řetězci nebo jednoduchými nesubstituovanými heterocykly, například N-nitrosodimethylamin (NDMA), N-nitrosomorfolin (NMOR) nebo N-nitrosopiperidin (NPIP), viz Obrázek 2 [2]. Za těkavé nitrososloučeniny lze označit ty, které lze z matrice vzorku (potravin) vydestilovat s výtěžností minimálně 70 %, a to buď destilací s vodní parou nebo vakuovou destilací, případně také destilací za normálního tlaku [17].

Mezi málo těkavé nitrososloučeniny se řadí nitrosaminy jejichž jeden nebo dva řetězce jsou tvořeny fenylovou skupinou, například N-nitrosomethylfenylamin (NMPPhA) viz. Obrázek 3 [2].



**Obrázek 3** – Struktura NMPPhA.

Netěkavé nitrososloučeniny často obsahují polární skupiny nebo delší alkylové řetězce. Jde o nitrosoamino kyseliny, nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny, nitrosomočoviny či nitrosoamidy, jako například N-nitrosoprolin (NPRO), 2-nitrosopropanová kyselina nebo 4-nitrosifenol, viz Obrázek 1 [2, 10].

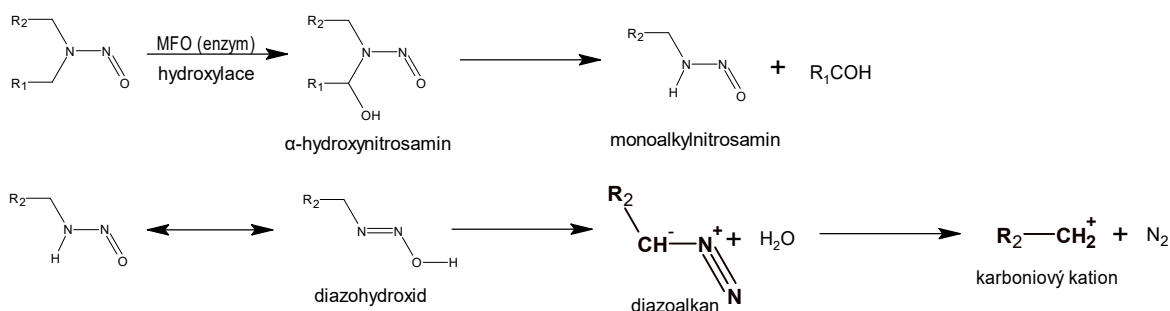
### **1.2.1.1. Toxikologie a metabolismus nitrososloučenin**

U nitrososloučenin bylo zjištěno, že jde o látky schopné, po vstupu do lidského organismu, vyvolat tvorbu nádorů. Zhoubné bujení vzniká především v játrech, plicích, ledvinách, tlustém střevě, močovém měchýři nebo také ve slinivce břišní, nikoliv však v kůži, mozku či kostech [16]. Z dosud asi 300 identifikovaných nitrososloučenin bylo u více než 90 % zjištěny karcinogenní účinky [18]. Míra toxicity závisí především na struktuře dané molekuly, přičemž molekuly s kratšími uhlovodíkovými zbytky jsou toxicitější, oproti tomu přítomnost delších uhlovodíkových zbytků či polárních skupin toxicitu molekuly snižuje. Vysvětluje to tedy tvrzení, že jsou těkavé nitrososloučeniny

svou přítomností mnohem nebezpečnější než netěkavé nitrososloučeniny [18]. Přípustná úroveň expozice člověka se pohybuje v rozmezí 5 až 10 µg/kg tělesné váhy [6, 9].

Teorie biotransformace N-nitrososloučenin v lidském organismu předpokládá, že hydrofilní molekuly je tělo schopné beze změny vyloučit, čímž nehrozí tak vysoké riziko toxického účinku. Oproti tomu lipofilní molekuly musí být v těle metabolizovány na hydrofilní, kdy touto metabolickou přeměnou dojde k aktivaci jejich karcinogenních vlastností a následné interakci s DNA [2, 19].

Metabolismus těchto látek probíhá především v játrech, také ale i v plicích a ledvinách. Je popisován různými teoriemi, například teorií alkylační. Tato teorie považuje za alkylační činidlo diazoalkan či příslušný karboniový kation. Schéma metabolismu dle alkylační teorie je uvedeno na Obrázku 4.



**Obrázek 4** – Metabolismus těkavých N-nitrososloučenin dle alkylační teorie.

Bylo zjištěno, že pokud nedojde k rozkladu těkavých nitrososloučenin, karcinogenní účinky se neprojeví. Pokud je však přítomen enzym schopný katalyzovat hydroxylační reakci, vzniká diazoalkan či karboniový kation, který následně alkyluje DNA či RNA, čímž může být vyvoláno zhoubné bujení [20, 21, 22].

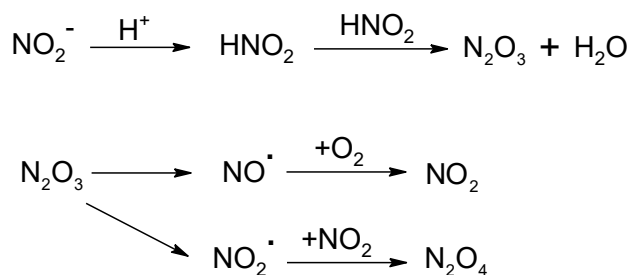
Tím nejnebezpečnějším z N-nitrososloučenin je, vzhledem k výše uvedeným informacím, NDMA [20]. Kromě karcinogenních účinků při expozici bylo také pozorováno zvracení, podráždění, křeče břicha, bolesti hlavy, slabost, kašel nebo také horečka. Karcinogenní účinky nejrozšířenějšího z nitrosaminů, kterým je právě NDMA, byly zjištěny pomocí pokusů na zvířatech. V roce 1961 se v Norsku vyskytla těžká rakovinná onemocnění jater přežvýkavců, krmených rybí moučkou ze sledů, obsahujících dusitany, kdy vznik tohoto onemocnění zapříčinil právě přítomný NDMA [16, 23].

Netěkavé nitrososloučeniny byly oproti těkavým a málo těkavým klasifikovány jako méně toxické. Důvodem je přítomnost polární skupiny, která způsobuje, že je daná molekula hydrofilní [18]. Dle výše uvedené teorie biotransformace je takováto molekula vyloučena z těla v nezměněné formě. U netěkavých nitrososloučenin je však riziko, že se mohou transnitrosační či dekarboxylační reakcí přeměňovat na těkavé nitrososloučeniny, čímž toxicita molekuly vzroste, viz kapitola 1.2.1.2. [2, 17].

O netěkavé produkty dusitanu se velice zajímají na Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s. v Praze. V již zmíněné studii (*Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer*) byly některé tyto sloučeniny charakterizovány. Ve vzorku piva bylo detekováno 19 produktů dusitanu, kdy mnohé vznikly reakcí s tyrosinem. Kromě toho byly identifikovány 4-kyanofenol, 4-nitrosfenol, ethylester N-nitrosoprolinu, N-nitrosoprolin, 2-methoxy-3-nitrosfenol, 2-methoxy-5-nitrosfenol a 2-nitrosopropanová kyselina [10].

### 1.2.1.2. Vznik nitrososloučenin

Nitrososloučeniny vznikají v mase působením nitrosačního činidla na příslušné prekursory. Tímto nitrosačním činidlem jsou oxidy dusíku (NO, NO<sub>2</sub>). Jde o substituci vodíkového atomu, navázaného na atomu dusíku (uhlíku, síry nebo kyslíku), nitrososkupinou [24]. Obecně vznikají tyto oxidy dle následujícího mechanismu, viz Obrázek 5.

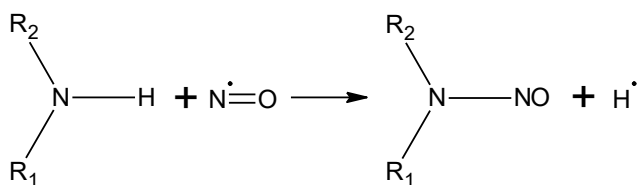


**Obrázek 5** – Mechanismus vzniku radikálů oxidů dusíku z dusitanu vystupující jako nitrosační činidla v uzenářských výrobcích.

Z výše uvedeného mechanismu je zřejmé, že vznik oxidů dusíku z dusitanu je ovlivňován pH daného prostředí, kdy nejprve vzniká kyselina dusitá reakcí dusitanu s vodíkovými ionty. Kyselina dále reaguje s již vzniklou kyselinou dusitou za vzniku oxidu dusitého,



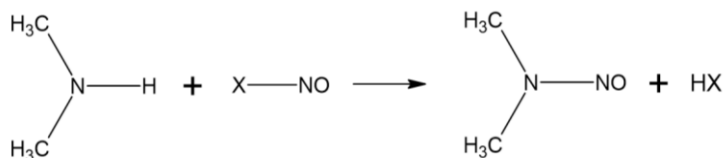
který se dále rozkládá na radikály oxidu dusnatého a oxidu dusičitého. Tyto radikály následně reagují s příslušným prekursorem dle následující rovnice, viz Obrázek 6:



**Obrázek 6** – Reakce radikálu oxidu dusnatého s příslušným prekursorem za vzniku nitrososloučeniny.

Faktory ovlivňující tvorbu těchto sloučenin jsou: povaha a koncentrace reagujících látek, pH prostředí, teplota nebo také přítomnost katalyzátoru či inhibitoru. Katalytické schopnosti vykazují například halogenidy, thiokyanátové ionty či kovové stříbrné a měďné ionty. Naopak inhibiční účinek má například kyselina askorbová, askorbát sodný, kyselina sorbová, cystein či různé hydrofilní a lipofilní antioxidanty [20, 25].

Další možností vzniku nitrososloučenin je také transnitrosační reakce, kdy dochází k přenosu nitroso skupiny z jedné molekuly na jinou, viz Obrázek 7. Touto reakcí mohou vznikat z netěkavých (nekarcinogenních) nitrososloučenin těkavé (karcinogenní) nitrososloučeniny [2, 26].



**Obrázek 7** – Vznik nitrososloučenin transnitrosační reakcí.

Konkrétní transnitrosační reakcí je například přenos nitroso skupiny z N-nitrosoprolinu, v kyselém prostředí za přítomnosti thiomočoviny, na N-methylmočovinu za vzniku N-nitroso-N-methylmočoviny. Thiomočovina v této reakci vystupuje jako katalyzátor. Tato reakce je přesným příkladem toho, že z nekarcinogenního N-nitrosoprolinu může vzniknout již prokazatelně karcinogenní N-nitroso-N-methylmočovina [22]. Dalším příkladem transnitrosační reakce je přenos nitrososkupiny z N-nitrosothioprolinu na glutathion za vzniku S-nitrosoglutathionu v kyselém prostředí [27, 28].

Příkladem reakce, kdy z netěkavé netěkavé nitrososloučeniny vzniká těkavá nitrososloučenina, je také například dekarboxylace N-nitrososprolinu nebo N-nitrososarkosinu. Při vyšší teplotě z těchto nekarcinogenních sloučenin vzniká karcinogenní N-nitrosopyrrolidin a N-nitrosodimethylamin [2, 29].

### 1.2.1.3. Metody stanovení nitrososloučenin

Většina moderních analytických postupů používá pro separaci produktů dusitanu plynovou chromatografií (GC) nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Koncentrace nitrososloučenin v potravinách je velmi nízká, v rozmezí  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) až  $\text{mg}/\text{kg}$  (ppm) [30].

Nejpoužívanější metodou pro stanovení těkavých a málo těkavých N-nitrososloučenin je plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí (GC-MS), jež se nejčastěji využívá pro stanovení N-nitrosaminů ve vodě [29]. Další velice často používanou metodou je také například plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí (GC-NCD), kdy tento typ detekce je velice selektivní pro nitrosaminy [2].

Aby bylo možné stanovit pomocí plynové chromatografie i netěkavé nitrososloučeniny, je nutná jejich předchozí derivatizace. U netěkavých N-nitrososloučenin je však také možnost stanovení spolu s těkavými N-nitrososloučeninami, kdy jde o tzv. ATNC (Apparent Total N-nitroso Compounds), tedy o celkovou sumu N-nitroso skupin vyjádřenou jako koncentrace v jednotkách  $\mu\text{g}(\text{N-NO})/\text{l}$  nebo  $\mu\text{g}(\text{N-NO})/\text{kg}$ . Tato metoda je založena na detekci oxidu dusnatého, vzniklého předešlým štěpením N-NO vazby pomocí bromovodíku v kyselině octové. Jde o metodu vytvořenou již v 70. letech 20. století. Dosud však nebylo přesně objasněno, které látky se na ATNC podílejí. Je však známo, že v pivu větší část z celkového ATNC tvoří netěkavé N-nitrosaminy, jde asi o 90 % všech ATNC [2, 25].

Problematikou analýzy netěkavých nitrososloučenin se zabývala například studie s názvem „*Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation*“, ve které byly ze skupiny netěkavých N-nitrososloučenin sledovány: N-nitrososarkosin, N-nitrosohydroxyprolin, N-nitroso-2-methyl-thiazolidin-4-karboxylová kyselina, N-nitrosoprolin a N-nitrosothiazolidin-4-karboxylová kyselina. V této studii byla vyvinuta

metoda pro simultánní stanovení jak těkavých, tak netěkavých produktů dusitanu pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí za použití ionizace za atmosférického tlaku [2, 31].

### **1.2.2. Extrakce produktů dusitanu z masných výrobků**

Asi nejjednodušší, a tedy i nejpoužívanější metodou extrakce pro těkavé produkty dusitanu je vakuová destilace nebo také destilace s vodní parou. Analyty je možné díky své těkavosti vydestilovat z matrice vzorku a následně stanovit [32, 33, 34, 35]. Tyto uvedené metody jsou sice efektivní, ale jsou také dosti náročné, a to jak časově, tak energeticky. [34]. Oproti těkavým produktům dusitanu jsou netěkavé produkty polárnějšího charakteru, tudíž je tedy nelze z matrice vzorku jednoduše vydestilovat [36].

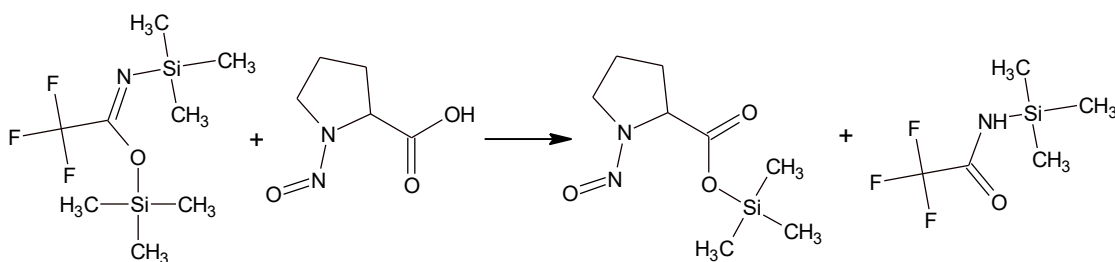
Pro uvolnění netěkavých produktů dusitanu z masných výrobků, byla v jedné studii použita například mikrovlnná extrakce. Jde o metodu využívanou pro extrakci sloučenin z komplexních matic. Při tomto typu extrakce dochází vlivem mikrovlnného záření k ohřevu polárního rozpouštědla v blízkosti vzorku, čímž se analyty do tohoto rozpouštědla uvolní. Doba extrakce v porovnání s ostatními metodami je mnohem kratší [36].

V rámci již zmíněné studie Národního potravinářského ústavu Technické univerzity v Dánsku byl vytvořen velice jednoduchý postup extrakce netěkavých produktů dusitanu. Analyty jsou extrahovány 1% kyselinou mravenčí v acetonitrilu po dobu 10 minut na třepačce. Tento postup extrakce byl použit i v mnoha dalších studiích této univerzity [4, 15, 31].

### **1.2.3. Derivatizace netěkavých produktů dusitanu**

Derivatizace je chemický proces prováděný za účelem vytvoření derivátu původní molekuly s lepšími chromatografickými vlastnostmi, především vytvoření sloučeniny s těkavostí vyhovující pro analýzu pomocí plynové chromatografie. Dále je také derivatizace používána pro zvýšení tepelné stability dané molekuly a/nebo zvýšení citlivosti detekce. Problematické jsou především sloučeniny obsahující polární funkční skupiny (-COOH, -OH, -NH a -SH). Tyto molekuly mohou díky přítomným vodíkům, na příslušné funkční skupině, mezi sebou vytvářet vodíkové můstky, což má za následek jejich nižší těkavost [37, 38].

Při derivatizační reakci jde nejčastěji o alkylaci, acylaci či silylaci dané molekuly. Alkylační reakce je založena na náhradě aktivního vodíku alifatickou či alifaticko-aromatickou skupinou. Vzniklý derivát má v porovnání s původní molekulou nižší polaritu. Alkylaci je možné použít například pro karboxylové kyseliny či fenoly, kdy produktem reakce je ester či ether. Alkylačním činidlem je například benzylbromid či pentafluorobenzylbromid. Acylační typ derivatizace je možné využít pro sloučeniny obsahující funkční skupiny s aktivním vodíkem (-OH, -SH, a -NH), nikoliv však pro molekuly s karboxylovou skupinou. Produkty reakce jsou estery, thioestery a amidy. Mezi acylační činidla se řadí anhydridy kyselin či acylderiváty, například acylované imidazoly. Posledním uvedeným typem derivatizace je silylace. Labilní vodík z kyseliny, alkoholu, thiolu či aminu nebo amidu je nahrazen trimethylsilylovou skupinou. Nejběžnějším silylačním činidlem je *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, neboli zkráceně BSTFA [37, 38, 39]. Právě toto derivatizační činidlo bylo použito v této diplomové práci. Příklad derivatizace *N*-nitrosoprolinu pomocí BSTFA je uveden na Obrázku 8.



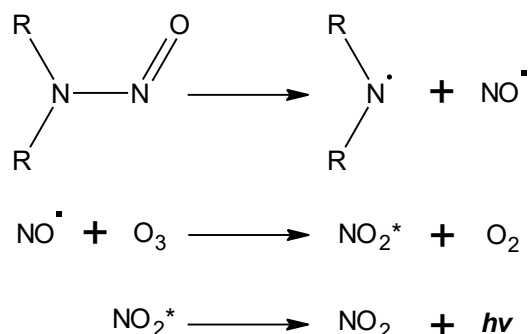
**Obrázek 8** – Derivatizace *N*-nitrosoprolinu pomocí BSTFA.

### 1.3. Chemiluminiscenční detektor

Ve starší literatuře je chemiluminiscenční detektor nazýván jako analyzátor tepelné energie (TEA - Thermal Energy Analyzer). Pro tento detektor se však v dnešní době užívá název NCD (z ang. Nitrogen Specific Chemiluminescence Detector) neboli chemiluminiscenční detektor selektivní pro dusíkaté látky [40].

Princip tohoto detektoru je následující. Po separaci látek v GC koloně následuje vstup do pyrolyzní pece. Zde dochází k termickému štěpení analytů za vzniku nitrosyl radikálů [41, 42]. Štěpení probíhá za přítomnosti katalyzátoru, kterým je směs  $\text{WO}_3$

a  $W_{20}O_{56}$ . Vazba mezi dusíky aminoskupiny a nitrososkupiny je relativně slabá. Její vazebná energie činí asi 40-210 kJ/mol, zatímco energie vazeb C-N, C-C a C-H činí 250-420 kJ/mol. Ke štěpení vazby N-N dochází při teplotě asi 450 °C [30]. Vzniklé radikály putují do reakční cely, která je evakuována. Zde dochází k reakci s ozónem za vzniku oxidu dusičitého. Vzniklý oxid se nachází v excitovaném stavu [41, 42]. Tento stav je nestálý, dochází tedy k přechodu do základního energetického stavu za uvolnění elektromagnetického záření o vlnové délce 600-3000 nm [30]. Emitované záření je snímáno vysoce citlivým fotonásobičem [42]. Koncentrace analytů je přímo úměrná intenzitě produkovaného záření [41, 30]. Reakce probíhající v NCD detektoru jsou znázorněny na Obrázku 9 [26].



**Obrázek 9** – Reakce probíhající uvnitř NCD detektoru.

NCD detektor je schopen detekovat maximálně vlnové délky do 800 nm, přičemž při použití tohoto detektoru je nutné odstranit případné interference, které způsobují například ethylen či oxid uhličitý vzniklé při pyrolýze, jelikož tyto molekuly reagují s ozónem za následné emise záření, která může zkreslovat výsledky analýzy. Pro eliminaci tohoto záření se využívá červený filtr, který je schopen odfiltrovat vlnové délky menší než 600 nm, což odpovídá právě interferujícímu záření. Rozmezí snímaných vlnových délek fotonásobičem se tedy nachází v oblasti mezi 600 až 800 nm, [41].

## 1.4. Validace

V příručce *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, vydávané společností Eurachem jsou uvedeny tři definice validace [43].

1. Potvrzení prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky pro konkrétní zamýšlené použití nebo aplikaci byly splněny.
2. Potvrzení prověřením a poskytnutím objektivních důkazů, že jsou splněny zvláštní požadavky pro konkrétní zamýšlené použití.
3. Ověření, že jsou specifikované požadavky dostatečné pro zamýšlené použití.

Validace je proces, při kterém se definují požadavky pro danou analytickou metodu. Cílem je získat potvrzení, že metoda má schopnost poskytovat to, co její aplikace vyžaduje. Validace obvykle úzce souvisí s vývojem metody, který je zakončen jejím výkonnostním hodnocením. Výsledkem validace je získání dokumentace, která dokazuje, že je daný proces schopen trvale poskytovat produkt odpovídající dříve učené specifikaci s vysokým stupněm jistoty [43].

Analytické laboratoře musí používat pouze takové postupy měření, které umožňují zvládnout požadavky, jež jsou pro daná měření stanoveny. Laboratoř musí validovat všechny nestandardní metody, metody vyvinuté laboratoři a standardní metody používané mimo určené použití. Rozsah validace musí být tak rozsáhlý, jak je to nezbytně nutné pro splnění potřeby dané aplikace [44].

Laboratoř může validovaný postup přijmout (jakožto standard) nebo si může koupit kompletní měřicí systém s konkrétní aplikací od komerčního výrobce. V obou těchto případech byly základní validační práce již provedeny. Laboratoř musí však potvrdit, že je schopna získanou metodu aplikovat. Jde o tzv. verifikaci analytické metody [44]. Aby bylo možné prokázat, že metoda v dané laboratoři funguje, musí být demonstrativně provedena [43].

Validací analytické metody se dokazuje, že je získaný výsledek dostatečně spolehlivý a důvěryhodný [45, 46]. Důkaz poskytuje zjištěná nejistota, která by měla být uvedena takovým způsobem, který je snadno interpretovatelný. Výhodou validované

metody je, že dává laboratoři a jejím zaměstnancům větší důvěryhodnost při produkci výsledků měření [43].

Existují dva možné typy validace metody, mezilaboratorní experiment (mezilaboratorní validace) nebo měření v jediné laboratoři (vnitrolaboratorní validace). Mezilaboratorní validace je použita, pokud má mít vyvinutá metoda širší použití. Tím je například myšleno, že bude daná metoda publikována jako norma. Oproti tomu vnitrolaboratorní validaci si laboratoř provádí sama [44].

Při validaci jsou zjišťovány výkonnostní charakteristiky dané metody. Laboratoř si vždy sama zvolí, které charakteristiky je nutné, vzhledem k dané aplikaci analytické metody, znát. Dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025 musí výkonnostní charakteristiky validovaných metod odpovídat potřebám zákazníků a musí být v souladu se stanovenými požadavky. Výkonnostními charakteristikami jsou například: selektivita stanovení, mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, pracovní rozsah, výtěžnost stanovení, robustnost, správnost stanovení či opakovatelnost stanovení [43, 45, 46, 47, 48].

## **2. Experimentální část**

### **2.1. Metoda pro semi-kvantitativní stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzenářských výrobcích**

#### **2.1.1. Použité chemikálie**

Methanol p.a. ( $\geq 99,9$  % Honeywell); Acetonitril p.a. ( $\geq 99,9$  % Honeywell); aceton p.a. (99,97 % Lach-Ner); dichlormethan p.a. ( $\geq 99,9$  % Honeywell); n-hexan p.a. ( $\geq 99,9$  % Honeywell); kyselina mravenčí (98-100 %, Sigma-Aldrich s r. o.); N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (for GC derivatization, 99 %, Sigma-Aldrich); pevný oxid uhličitý; dusík (Air Products, BIP); helium (Air Products, BIP), certifikované referenční materiály: 4-kyanofenol (95 %, Sigma-Aldrich) a N-nitrosoprolin ( $\geq 98,0$  % Glentham Life Sciences).

#### **2.1.2. Přístroje a vybavení**

Plynový chromatograf (Agilent Technologies, 7890B, GC Systém), kapilární kolona HP-5MS UI (délka 30 m, průměr 0,25 mm, tloušťka vrstvy stacionární fáze 0,25  $\mu\text{m}$ ), hmotnostní detektor (Agilent Technologies, 7000D, GC/MS Triple Quad), automatický dávkovač (Agilent Technologies, 7693, Autosampler), thermoblock (Thermo SCIENTIFIC, REACTI-VAP I #TS-18825, Evaporation Unit), FTIR spektrometr (Thermo scientific Nicolet iS5), analytické váhy (Artorius, 1602 MP), odstředivka (Hettich, ZENTRIFUGEN, Rotina 420), horizontální třepačka (IKA HS 260), centrifugační zkumavky (ART. 84011, Kartell S.p.A, Graduated conical test tube PP 50ml), skleněné vialky (2 ml, 20 ml), víčka, automatická pipeta (Transferpette S), automatická pipeta (Eppendorf Research plus), pipetovací špičky, Dewarova nádoba, injekční stříkačka, PTFE filtr (0,2  $\mu\text{m}$ , Chromofil Xtra PTFE-20/13), kádinky, kuchyňský mixér, kuchyňský nůž.



### 2.1.3. Postup přípravy vzorku

Do 50ml centrifugační zkušavky se odváží přesně asi 3,5 g homogenizovaného vzorku uzeniny a přidá se 10,5 ml 1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Zkušavka se uzavře a následuje 30minutová extrakce (při lab. teplotě). Prvních 10 minut je vzorek ručně protřepáván a poté je ponechán 20 minut na třepačce (210 kmitů/min). Vzorek je odstředěn na odstředivce (4500 ot/min po dobu 5 minut) a extrakt je převeden do nové centrifugační zkušavky. Zbylé vyextrahované analyty jsou ze vzorku uzeniny vymyty 1 ml acetonitrilu. Extrakt je ponechán v ledové lázni, vytvořené z methanolu a suchého ledu, po dobu 10 minut. Následně je vzorek odstředěn na odstředivce (4500 ot/min po dobu 5 minut) a extrakt je převeden do 20ml skleněné vialky. Zbylé analyty jsou z centrifugační zkušavky vymyty 1 ml acetonitrilu. Extrakční činidlo je následně odpařováno proudem dusíku na thermobloku při 70 °C. Extrakt se nechá odpařit do sucha. K odparku se přidá nejprve 1 ml a poté 0,5 ml acetonitrilu, kterými se analyty z vialky vymyjí a acetonitrilový extrakt je následně převeden do 2ml skleněné vialky. Acetonitril se nechá odpařit proudem dusíku. Po odpaření se přidá 350 µl derivatizačního činidla BSTFA a nechá se v uzavřené vialce probíhat derivatizace po dobu 30 minut při 70 °C. Následuje stanovení jednotlivých analytů pomocí plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

### 2.1.4. Podmínky GC-MS/MS analýzy

Pracovní podmínky plynového chromatografu:

Nástřík technikou split (5:1) s objemem nástříku 2 µl a teplotou 250 °C, oplach septa 5 ml/min, konstantní průtok mobilní fáze 1 ml/min (helium), teplotní program: 50 °C (1,5 min) – 20 °C/min – 150 °C (5 min) – 10 °C/min – 210 °C (3 min) – 10 °C/min – 320 °C (5 min), teplota rozhraní na výstupu z kolony 270 °C.

Pracovní podmínky hmotnostního detektoru:

Pro fragmentaci analytů bylo využito elektronové ionizace, teplota v iontovém zdroji 230 °C, ionizační energie 70 eV.

Pro analýzu analytů byl použit již vytvořený MRM mód z předešlé studie [10]. Hodnoty retenčních časů a hmot prekurzorových a produktových iontů analytů jsou uvedeny v Tabulce 1. Doba jedné analýzy činila 36,5 minuty.

**Tabulka 1:** Hodnoty retenčních časů analytů a hmot jejich prekurzorových a produktových iontů pro mód MRM.

Retenční čas [min]	Analyt	Prekurz. ion m/z	Produkt. ion m/z	CE [eV]	Prekurzorová sloučenina
8,6	neznámý	168	94	15	neznámá
8,9	Kys. 2-nitrosopropanová	204	131	25	neznámá
12,5	p-nitrofenol	195	180	5	neznámá
13,3	4-kyanofenol	191	176	10	tyrosin
13,5	neznámý	212	168	5	neznámá
13,7	Ethylester N-nitrosoprolinu	172	99	10	prolin
14,7	N-nitrosoprolin	201	157	5	prolin
15,6	Kys. nitrosopyroglutamová	200	156	5	neznámá
17,0	Nitrosogujakol	225	210	10	neznámá
17,4	neznámý	224	150	15	neznámá
17,7	Fenylalanin	295	205	15	neznámá
17,7	neznámý	218	203	10	neznámá
18,2	2-methoxy-5-nitrofenol	226	211	10	kys. vanilová
20,5	neznámý	306	191	15	tyrosin
21,3	neznámý	254	223	15	neznámá
22,1	neznámý	312	179	30	neznámá
23,0	neznámý	271	137	25	neznámá
23,2	neznámý	326	236	10	tyrosin
24,6	neznámý	342	223	25	tyrosin
25,9	neznámý	413	236	15	tyrosin
26,2	neznámý	338	219	25	tyrosin
26,4	neznámý	338	219	25	tyrosin

CE - kolizní energie

### 2.1.5. Zpracování dat

Výchozími daty byly při vývoji této metody plochy chromatografických píků a plochy píků FTIR spekter. Hodnota relativní opakovatelnosti stanovení byla vypočtena dosazením do rovnice 1,

$$r_{r,95} = \frac{2,8 \cdot s_A}{A_{\text{prům.}}} \cdot 100 \quad (1)$$

kde  $s_A$  je směrodatná odchylka ploch píků příslušného analytu a  $A_{\text{prům.}}$  je průměrná hodnota ploch píků analytu. Pro kvantifikaci analytů byla použita metoda přidavku standardu [43]. Zpracování dat bylo provedeno v MS Excel.

## 2.1.6. Použité vzorky

Jako modelový vzorek byl pro vývoj extrakčního postupu zvolen Lovecký salám (Kmotr, Masna Kroměříž a.s.). Tento typ uzeniny byl použit proto, že jde o masný výrobek s vyšším obsahem tuku (47 g/100 g), který by mohl vytvářet problémy při extrakci analytů. Dalším důvodem bylo použití dusitanu sodného jakožto konzervantu. Tím, že má být daná metoda univerzální, byla proto pro vývoj zvolena náročnější matrice vzorku. Před každou extrakcí byl vzorek uzeniny vždy pečlivě rozmixován pomocí kuchyňského mixéru, čímž bylo dosaženo jeho přijatelné homogenity.

Pro určení, jaká je přibližná extrahovatelnost analytů zvoleným extrakčním činidlem, byly připraveny čtyři vlastní vzorky masa. Pro přípravu vzorků byla použita rozemletá vepřová krkovice. Každý vzorek byl připraven odvážením 10 g masa, kdy k jednotlivým navážkám bylo přidáno 0,2; 1,8; 3,4 a 5,0 g dusitanu sodného a také vždy 2,5 ml deionizované vody. Takto připravené vzorky byly ponechány po dobu 24 hodin v lednici při 4 °C. Vzorky byly následně tepelně zpracovány při 70 °C ve vodní lázni po dobu jedné hodiny.

## 2.1.7. Extrakce analytů z uměle připravených vzorků masa

Pro důkaz, zda v mase skutečně vznikají očekávané analyty, byla provedena dvojnásobná extrakce 5 g uměle připravených vzorků masa 10 ml methanolu při 60 °C po dobu 1 hodiny ve 20ml skleněných vialkách. Po každé extrakci byl extrakt se vzorkem masa převeden do 50ml centrifugační zkumavky a následně odstředěn. Extrakt byl poté odebrán do nové centrifugační zkumavky a vzorek masa byl převeden zpět do skleněné vialky. Extrakty z obou extrakcí byly následně spojeny v jeden. Vzniklé extrakty jednotlivých vzorků byly ponechány v mrazáku po dobu 3 dnů, aby došlo k vymražení případných vyextrahovaných bílkovin, které by při odpařování methanolu mohly způsobovat problémy. Vysrážené bílkoviny byly poté odstraněny odstředěním na odstředivce (4500 ot/min po dobu 5 minut). Extrakty byly převedeny do 20ml skleněných vialek a extrakční činidlo bylo následně odpařováno proudem dusíku při 70 °C. Odpařování probíhalo do chvíle, kdy se na dně vialky začala vytvářet hmota, což byl vyextrahovaný tuk a voda. Pro vymytí analytů z vialky bylo ke každému vzorku přidáno po 5 ml ledového acetonitrilu. Vzorky byly protřepány a poté ponechány po dobu

třiceti minut v klidu. Poté byly odstředěny, vzniklý supernatant byl odebrán do nové skleněné vialky a acetonitril byl odpařován proudem dusíku. Extrakty se nyní podařilo odpařit do sucha. Na dně vialky se však stále nacházelo malé množství tuku, bylo proto přidáno ještě po 1 ml acetonitrilu ke každému odparku. Následovalo opět odstředění vzorků a poté odpaření odebraného extraktu do sucha. V tomto případě již došlo k odpaření činidla, aniž by na dně vialky zůstal tuk. Nakonec byla provedena derivatizace 300  $\mu$ l BSTFA (30 minut při 70 °C).

## **2.2. Metoda pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích pomocí GC-NCD**

### **2.2.1. Použité chemikálie**

Hydroxid sodný p.a. (Lach-ner); kyselina askorbová (99,7%, Lach-ner); tekutý parafin p.a. (Sigma-Aldrich s r. o.); ultra čistá voda (Milli-Q); vláknitá celulóza (VITACEL L 500); dichlormethan p.a. ( $\geq$  99,9 % Honeywell); n-hexan p.a. ( $\geq$  99,9 % Honeywell), methanol p.a. (Iso reagent); ethanol (96%, Lach-ner); pevný oxid uhličitý; argon (Air Products, BIP); kyslík (Air Products, BIP); dusík (Air Products, BIP); certifikované referenční materiály NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR a NMOR o koncentraci 100  $\mu$ g/ml v methanolu (DR EHRENSTORFER).

### **2.2.2. Přístroje a zařízení**

Plynový chromatograf (Agilent, 8890 GC Systém), křemenná kapilární kolona TR-WAR (délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1  $\mu$ m, opatřena na výstupu 1m restriktorem o vnitřním průměru 0,25 mm), injektor (opatřen splitless linerem o vnitřním průměru 4 mm), automatický dávkovač (Agilent, 7693A Autosampler), chemiluminiscenční detektor (Agilent 8255 Nitrogen, Chemiluminescence Detector), destilační aparatura pro vakuovou destilaci, topná hnízda s jemnou regulací výkonu (LTHS 100), skleněné vložky pro koncentrátor, koncentrátor (FMS - SuperVap 6), dělicí nálevky (100ml, opatřené PTFE kohoutem), plynotěsné injekční stříkačky (10, 250, 500 a 1000  $\mu$ l), váhy (s přesností 0,01 g, Sartorius), odměrné baňky (200 a 250 ml), zábrusová baňka (100 ml), skleněné pipety, automatické pipety, Pasteurovy pipety, vialky (2ml s insertem 350  $\mu$ l), víčka s teflonovým septem (průměr 8 mm).

### 2.2.3. Postup přípravy vzorku

Do 100ml zábrusové baňky se naváží 20,0 g homogenizovaného vzorku uzeniny, přidá se 20 ml ultra čisté vody, 1 ml vnitřního standardu NDPA o koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (roztok v ethanolu), 5 ml tekutého parafínu, 2 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 5 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci  $7,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Předloha destilační aparatury se vychladí pomocí chladicí lázně (methanol + pevný oxid uhličitý) na teplotu asi  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poté se aparatura nechá evakuovat po dobu 5 min a následně se zapne topné hnízdo. Destilace trvá přibližně 40 až 50 minut. Na konci destilace nesmí teplota překročit  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po ukončení destilace se nechá destilát roztát. Následně se k destilátu přidají 2 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a extrahuje se 4krát 5 ml dichlormethanu. Ke spojeným extraktům se přidají 2 ml n-hexanu. Při teplotě  $64 \text{ }^\circ\text{C}$  se extrakty zakoncentrují odpařením pod proudem dusíku v koncentrátoru na objem cca 0,5 ml. Zakoncentrovaný extrakt je přenesen Pasteurovou pipetou do vialek s insertem a ihned uzavřen. Pokud není možné bezprostřední měření, je nutné vzorek uložit do mrazáku, kde může být uchováván ve svislé poloze po dobu maximálně jednoho týdne.

### 2.2.4. Podmínky GC-NCD analýzy

Pracovní podmínky plynového chromatografu:

Teplota nástřiku:  $210 \text{ }^\circ\text{C}$ , objem nástřiku na kolonu  $5 \mu\text{l}$  metodou splitless, teplotní program pece:  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (2,5 min) –  $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  –  $210 \text{ }^\circ\text{C}$  (4 min), konstantní tlak nosného plynu (argon)  $35 \text{ kPa}$ , oplach septa  $3 \text{ ml}/\text{min}$ .

Pracovní podmínky chemiluminiscenčního detektoru:

Teplota v pyrolyzní peci  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ , teplota spojení GC-NCD  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , průtok kyslíku pro ozonizátor  $5 \text{ ml}/\text{min}$ , pracovní tlak v reakční komůrce  $347 \text{ Pa}$ , chlazení reakční komůrky na přibližně  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.2.5. Zpracování dat

Výchozími daty byly při validaci této metody plochy chromatografických píků. Pro vyhodnocení získaných chromatogramů jednotlivých vzorků byla využita

již vytvořená kalibrační závislost všech analytů. Tato kalibrační závislost byla převzata z principiálně stejné metody pro stanovení tíž analytů ve sladu. Hodnota správnosti stanovení byla vypočtena dosazením do rovnice 2,

$$z = \frac{c_{st} - c_0}{c_{sk}} \cdot 100 \quad (2)$$

kde  $c_{st}$  je stanovená koncentrace analytu ve spikovaném vzorku,  $c_0$  je stanovená koncentrace analytu v nespikovaném vzorku a  $c_{sk}$  je skutečná koncentrace analytu ve spikovaném vzorku [43]. Výsledná hodnota opakovatelnosti stanovení byla vypočtena dosazením do rovnice 3,

$$r_{r,95} = 2,8 \cdot s_r \quad (3)$$

kde  $s_r$  je relativní směrodatná odchylka hodnot stanovených koncentrací. Hodnota 2,8 odpovídá součinu odmocniny ze dvou (což představuje dva výsledky měření téhož vzorku) a hodnoty dvoustranného Studentova  $t$ -rozdělení pro nekonečný počet stanovení na 95% hladině spolehlivosti, kdy hodnota  $t \approx 2$  [43]. Mez stanovitelnosti byla vypočtena dosazením do rovnice 4,

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_c}{\sqrt{2}} \quad (4)$$

kde  $s_c$  je směrodatná odchylka hodnot koncentrace a  $\sqrt{2}$  představuje dva výsledky měření téhož vzorku [43]. Hodnota nejistoty stanovení byla vypočtena dosazením do rovnice 5,

$$u_r = \frac{2 \cdot s_c}{c_{prům}} \cdot 100 \quad (5)$$

kde  $c_{prům}$  je průměrná hodnota koncentrace [43].

Zpracování dat bylo provedeno v MS Excel.

## 2.2.6. Použité vzorky

Pro stanovení zvolených výkonnostních charakteristik byl jako vzorek použit uzenářský výrobek Kmotrova Vysočina (Kmotr, Masna Kroměříž a.s.). Tento ty uzeniny byl použit proto, že jde o masný výrobek s vyšším obsahem tuku (45 g/100 g) a současně z důvodu použití dusitanu při jeho výrobě, dle údajů na etiketě výrobku. Před analýzou byl vzorek uzeniny vždy pečlivě rozmixován pomocí kuchyňského mixéru, čímž bylo dosaženo jeho přijatelné homogenity.

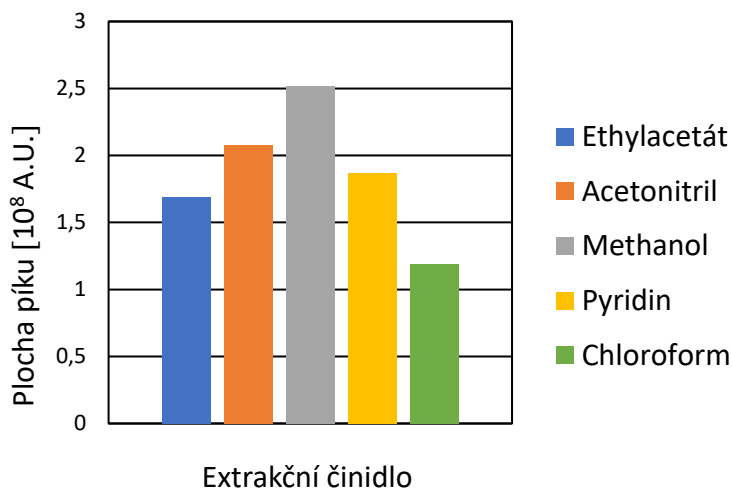
## 3. Výsledky a diskuse

### 3.1. Vývoj extrakční metody pro stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzeninách

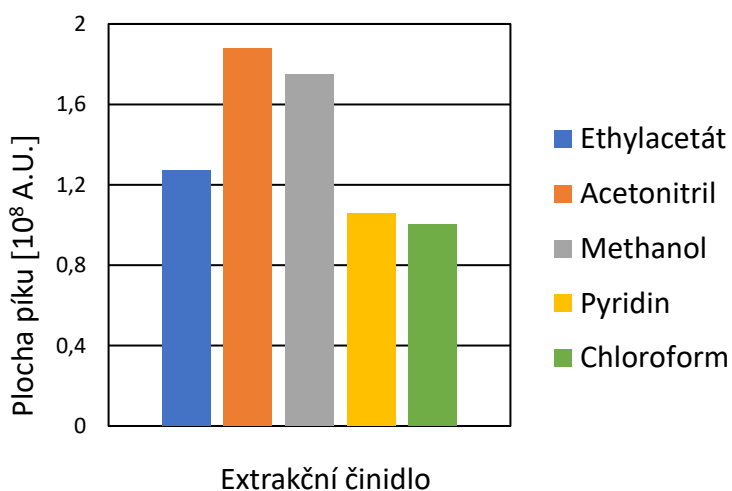
Úkolem bylo vyvinout extrakční postup, kterým bude možné analyty z matrice vzorku kvantitativně vyextrahovat a následně semi-kvantitativně stanovit. Při vývoji této metody byly dostupné pouze standardy N-nitrosoprolinu a 4-kyanofenolu, tudíž byl vývoj cílen především na tyto dva analyty. U zbylých analytů bylo pouze pozorováno, zda se ve vzorcích masa nacházejí či nikoliv. Derivatizace analytů byla vždy provedena pomocí BSTFA při 70 °C po dobu 30 minut.

#### 3.1.1. Výběr vhodného extrakčního činidla

Nejprve bylo nutné vybrat vhodné extrakční činidlo, schopné analyty z matrice vzorku extrahovat. Vybíráno bylo z následujících organických činidel: ethylacetát, acetonitril, methanol, pyridin a chloroform. Jednotlivými činidly, vždy 1 ml, byla provedena tříhodinová extrakce 0,24 g vzorku uzeniny při 60 °C na thermoblocku. Poté byly vzorky odstředěny při 12000 ot/min po dobu 3 minut a bylo odebráno 500 µl extraktu do skleněné 2ml vialky. Extrakční činidlo bylo odpařeno při 70 °C proudem dusíku. Analyty ve zbylém odparku byly derivatizovány 500 µl derivatizačního činidla BSTFA. Na základě velikostí ploch píků analytů (N-nitrosoprolinu a 4-kyanofenolu) v jednotlivých chromatogramech bylo zřejmé, že nejvíce analyty extrahují acetonitril a methanol, viz Obrázek 10 a 11. Současně bylo pozorováno, které činidlo extrahuje nejméně tuku. Z FTIR spekter extraktů jednotlivých činidel bylo patrné, že nejméně jej obsahuje methanolvý extrakt. Množství vyextrahovaného tuku bylo určeno z velikostí ploch píků při vlnočtu 1750 cm<sup>-1</sup>, což odpovídá odezvě karbonylu, který je součástí esteru. Jako extrakční činidlo byl tedy zvolen methanol.



**Obrázek 10** – Graf znázorňující velikosti ploch píků N-nitrosoprolinu při extrakci jednotlivými extrakčními činidly ze vzorku uzeniny.



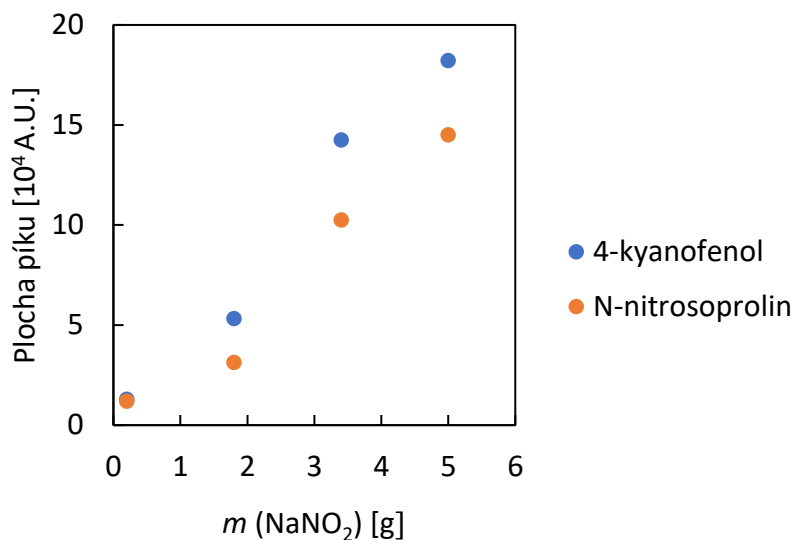
**Obrázek 11** – Graf znázorňující velikosti ploch píků 4-kyanofenolu při extrakci jednotlivými extrakčními činidly ze vzorku uzeniny.

### 3.1.2. Extrahovatelnost analytů

Pro představu, jaká je přibližná extrahovatelnost analytů zvoleným extrakčním činidlem, byl využit uměle připravený vzorek masa. Při přípravě tohoto vzorku bylo nejprve ověřováno, zda z dusitanu opravdu vznikají očekávané analyty a současně zda s rostoucím podílem přidaného dusitanu koncentrace těchto analytů roste. U vzorku s navážkou dusitanu 0,2 g bylo možné po jednodenním stání pozorovat vzniklé narůžovělé zbarvení. U zbylých vzorků masa bylo pozorováno žlutohnědé zbarvení.

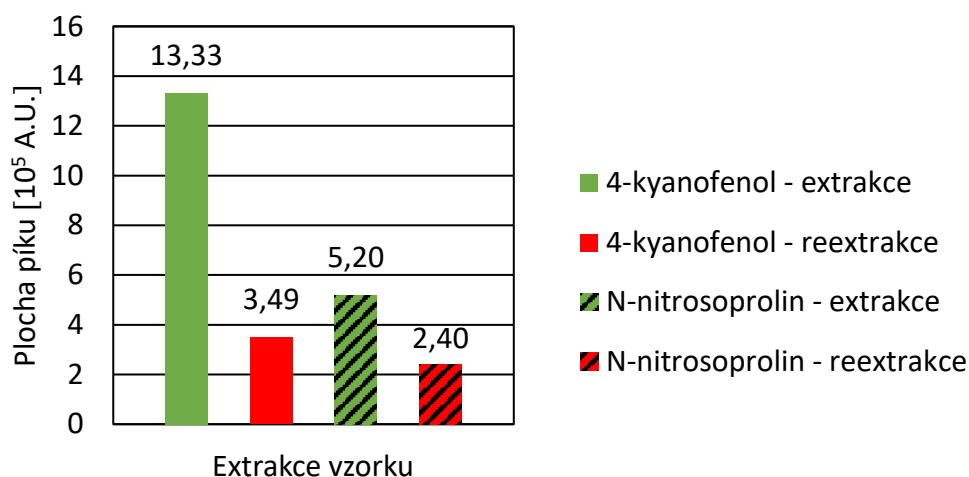


Z chromatogramů jednotlivých vzorků bylo patrné, že se zvyšujícím se podílem přidaného dusitanu koncentrace vzniklých produktů (N-nitrosoprolinu a 4-kyanofenolu) roste, viz Obrázek 12.



**Obrázek 12** – Graf znázorňující plochy píků 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu v závislosti na hmotnosti přidaného dusitanu ke vzorku uměle připraveného masa.

Pro základní odhad extrahovatelnosti analytů methanolem, byl použit uměle připravený vzorek masa s přidavkem 5,0 g dusitanu sodného. Nejprve byla provedena dvojnásobná extrakce a poté stejným způsobem reextrakce. Extrahovatelnost byla vypočtena jako podíl plochy píku analytu při extrakci a součtu ploch píků analytu při extrakci a reextrakci. Velikosti ploch píků obou analytů při extrakci a reextrakci jsou uvedeny na obrázku 13.

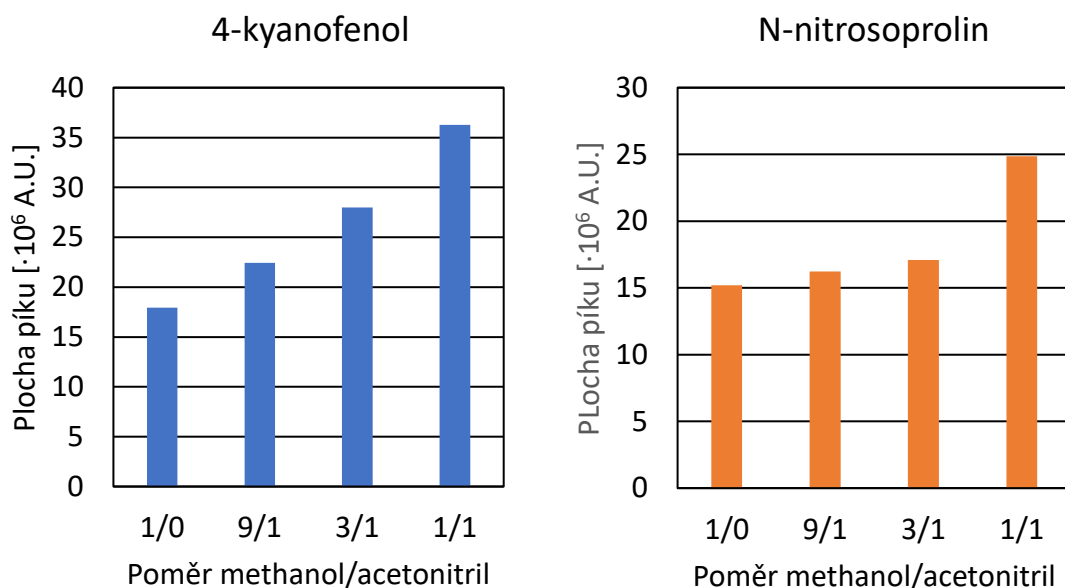


**Obrázek 13** – Graf znázorňující velikosti ploch píků 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu při extrakci a reextrakci z matrice uměle připraveného vzorku masa methanolem.

Výsledná extrahovatelnost N-nitrosoprolinu činila cca 70 % a 4-kyanofenolu cca 80 %.

Pro navýšení extrakční účinnosti byly testovány extrakce analytů methanolem v různém poměru s acetonitrilem. Acetonitril byl použit z důvodu srovnatelné schopnosti extrakce analytů jako měl methanol. Pro tento experiment byly připraveny včetně samotného methanolu, jakožto extrakčního činidla, ještě tři extrakční směsi methanol/acetonitril v poměru 9:1, 3:1 a 1:1 (v/v). I v tomto případě byl použit uměle připravený vzorek masa s přísadkou 5,0 g dusitanu. Pro extrakci analytů bylo použito vždy 10 ml extrakčního činidla.

Z vynesných závislostí velikosti ploch píků analytů na složení extrakční směsi na Obrázku 14 bylo patrné, že s rostoucím podílem acetonitrilu v extrakční směsi byla pro sledované analyty zaznamenána vyšší extrakční účinnost. Nejlepší výsledky poskytovala extrakční směs methanol/acetonitril (1:1). Při porovnání extrakcí pouhým methanolem a při použití této extrakční směsi bylo pozorováno, že plocha píků N-nitrosoprolinu vzrostla přibližně o 66 %, a plocha píku 4-kyanofenolu dokonce přibližně o 100 %. Jako extrakční činidlo byla tedy zvolena směs methanol/acetonitril (1:1).



**Obrázek 14** – Grafy znázorňující velikosti ploch píků 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu v závislosti na složení extrakční směsi methanol/acetonitril při extrakci 5 g uměle připraveného vzorku masa.

### 3.1.3. Eliminace nežádoucích vyextrahovaných složek pocházejících z matrice vzorku uzeniny

Aby bylo možné provést stanovení analytů, bylo nutné odstranit nežádoucí vyextrahované složky pocházející z matrice vzorku uzeniny.

#### 3.1.3.1. Bílkoviny a mechanické nečistoty

Při předchozích experimentech bylo pozorováno, že zvolená extrakční směs (methanol/acetonitril) extrahuje určité procento bílkovin, jež jsou obsaženy v mase. Proto bylo navrženo, že se vždy do vzniklých spojených extraktů přidá 2,5 ml srážecího činidla. Zkoušenými činidly byly ledový acetonitril a ledový aceton. Vzorky byly také navíc vkládány na 15 minut do ledové lázně (suchý led + methanol). Vysrážené bílkoviny byly následně odstraněny odstředěním (4500 ot/min po dobu 5 minut). Účinnost vysrážení byla hodnocena na základě vizuálního pozorování množství vysrážených bílkovin. Při použití ledového acetonu byla pozorována mnohem vyšší účinnost než u ledového acetonitrilu. Jako srážecí činidlo byl proto zvolen aceton, při jehož použití byla odstraněna drtivá většina bílkovin.

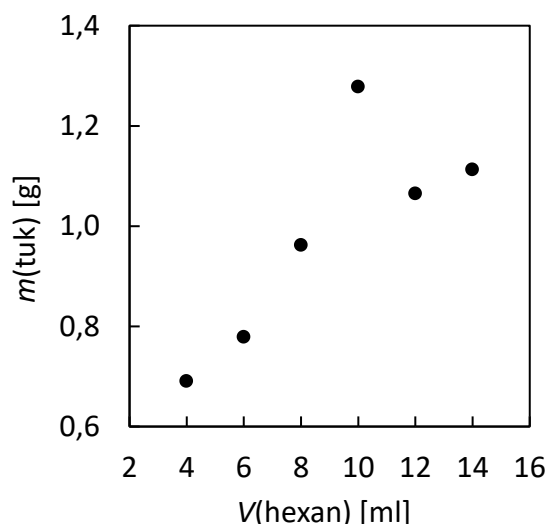
Pro zabránění přítomnosti případných mechanických nečistot v extraktu, bylo využito PTFE filtrů o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ . Před odpařením extrakční směsi byly tedy vzorky filtrovány přes tyto filtry pomocí injekčních stříkaček.

### **3.1.3.2. Voda**

Další nežádoucí vyextrahovanou složkou byla voda, která způsobovala zdlouhavá odpařování extrakční směsi. Vodu se podařilo z extraktu odstranit velice jednoduchým způsobem. Když při odpařování zbývalo na dně vialky cca 1,5 ml extrakční směsi s přítomnou vyextrahovanou vodou, bylo přidáno 1,5 ml dichlormethanu. Vzhledem k tomu, že měl dichlormethan vyšší hustotu a zároveň nižší těkavost než voda, docházelo při jeho odpařování k vyrážení molekul vody, které bylo díky tomu možné proudem dusíku odpařit.

### **3.1.3.3. Tuk**

Poslední nežádoucí vyextrahovanou složkou byl tuk, pro jehož odstranění byla testována extrakce hexanem. Pro stanovení, jaké množství hexanu je nutné použít, byl navržen experiment, ve kterém byl sledován podíl vyextrahovaného tuku ze vzorku uzeniny v závislosti na objemu hexanu. Připraveno bylo šest 3g vzorků uzeniny, ke kterým bylo přidáno 4; 6; 8; 10; 12 a 14 ml hexanu. Vzorky byly nejprve protřepány a poté ponechány v klidu při teplotě 50 °C po dobu 30 minut. Množství tuku extrahovaného hexanem bylo stanoveno gravimetricky. Závislost hmotnosti vyextrahovaného tuku z jednotlivých vzorků na objemu použitého extrakčního činidla (hexanu) je znázorněna na Obrázku 15.



**Obrázek 15** – Graf znázorňující závislost hmotnosti vyextrahovaného tuku ze 3 g uzeniny na objemu použitého extrakčního činidla (hexanu).

Ze získané závislosti na Obrázku 15 bylo patrné, že hmotnost vyextrahovaného tuku od 12 ml použitého hexanu již příliš nenarůstá. Hodnota hmotnosti vyextrahovaného tuku při použití 10 ml hexanu měla sice mnohem vyšší hodnotu, než by se očekávalo, nebylo však vyloučeno, že právě při tomto objemu hexanu dochází k takto vysoké extrakci tuku.

Na základě těchto pozorovaných extrakčních schopností hexanu bylo rozhodnuto, že před samotnou extrakcí analytů bude vždy provedena dvojnásobná extrakce tuku 12 ml hexanu po dobu 20 minut za občasného protřepání. Vždy po extrakci tuku bylo však nutné zbylý hexan ze vzorku odpařit proudem dusíku. Přítomnost zbylého hexanu obsahujícího tuk, byť jen v malé koncentraci, způsobovala opět zdlouhavá odpařování extrakční směsi.

### 3.1.4. Odhalení případných ztrát analytů při extrakci

Ověření, zda z v některém z kroků extrakčního postupu nedochází ke ztrátám analytů, bylo provedeno pomocí spikovacích roztoků 4-kyanofenolu o koncentraci  $3 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a N-nitrosoprolinu o koncentraci  $3 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (jako rozpouštědlo byl pro přípravu těchto dvou roztoků použit methanol). Pro tento experiment byly připraveny čtyři vzorky uzeniny (duplikáty). Spiky byly ke vzorkům přidávány následovně: u vzorku č. 1 přímo k navážce vzorku, u vzorku č. 2 po extrakci tuku hexanem, u vzorku č. 3 po extrakci analytů do přefiltrovaných spojených extraktů

a u vzorku č. 4 k odparce extraktu. Při každém spikování bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku 4-kyanofenolu a 500  $\mu$ l roztoku N-nitrosoprolinu.

Z velikostí píků analytů v získaných chromatogramech bylo bohužel na první pohled zřejmé, že při extrakci tuku hexanem dochází částečně k extrakci analytů, vzhledem k nejmenším plochám píků analytů u vzorku č. 1. Z chromatogramů bylo současně pozorováno, že reprodukovatelnost extrakčního postupu prozatím není dobrá, vzhledem k lišícím se velikostem ploch píků analytů v jednotlivých duplikátech. Na základě získaných dat bylo zjištěno, že opakovatelnost tohoto extrakčního postupu činila 35 %.

Pro ověření, zda jsou analyty skutečně hexanem extrahovány, byl proveden experiment, ve kterém byla testována extrahovatelnost analytů hexanem. Pro tento experiment byly připraveny dva vzorky, první z nich tak, že do 2ml vialky bylo pipetováno 200  $\mu$ l roztoku 4-kyanofenolu a 500  $\mu$ l roztoku N-nitrosoprolinu. Methanol byl odpařen a poté následovala derivatizace. Druhý vzorek byl připraven stejným způsobem, s tím rozdílem, že po odpaření methanolu bylo přidáno 1,5 ml hexanu, který byl ponechán v kontaktu s analyty po dobu 40 minut. Hexan byl převeden do nové vialky a poté odpařen. Následně byla provedena derivatizace případných vymytých analytů. Z chromatogramů bylo však bohužel patrné, že ke ztrátám analytů extrakcí hexanem skutečně dochází. Při porovnání ploch píků analytů u vzorků č. 1 a č. 2 bylo zřejmé, že 4-kyanofenol byl hexanem silně extrahován. U N-nitrosoprolinu byla taktéž zaznamenána ztráta, ne však v takové míře jako tomu bylo u 4-kyanofenolu, u kterého došlo k extrakci hexanem nejspíše z důvodu nižší polaroty oproti N-nitrosoprolinu, kdy tedy i nepolární hexan je schopen extrakce. Vzhledem k těmto skutečnostem bylo tedy zřejmé, že dosavadní extrakční postup je nutné přepracovat.

### **3.1.5. Modifikace dosavadního postupu extrakce**

Modifikace dosavadního postupu extrakce byla provedena na základě porovnání tohoto postupu s literaturou. Cílem bylo nalézt studii, zabývající se rovněž problematikou produktů dusitanu v uzeninách a případně dle ní stávající metodu modifikovat. Vyvinutý postup extrakce byl porovnáván s postupem, uvedeným ve studii Národního potravinářského ústavu technické univerzity v Dánsku, zabývající se rovněž problematikou stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzeninách [31]. V této studii

byl jako extrakční činidlo pro extrakci analytů použit 1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Tento extrakční postup byl zkoušen především kvůli schopnosti extrakce N-nitrosoprolinu, který byl v této studii rovněž jedním z analytů, tak jako je tomu v této diplomové práci. Testovaný postup extrakce bylo však nutné rozšířit o odpaření extrakčního činidla a derivatizaci analytů, jelikož pro stanovení analytů byla v původní studii použita nikoliv plynová chromatografie, ale vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Při provedení první extrakce tímto postupem bylo sledováno, jaké množství bílkovin, tuku a vody je při použití 1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu extrahováno. V tomto postupu extrakce bylo pro odstranění bílkovin použito pouze vymražení v ledové lázni (methanol + suchý led), po jejímž provedení bylo vizuálně pozorováno jen velmi malé množství sraženiny, jež bylo zcela odstraněno následným odstředěním. Použití ledového acetonu pro vysrážení bílkovin bylo tedy možné z původního postupu extrakce vypustit. Při aplikaci tohoto postupu bylo pozorováno, že doba odpařování byla, oproti původnímu postupu extrakce, mnohem kratší, přičemž po odpaření bylo na dně vialky pozorováno pouze zanedbatelné množství tuku. Vzhledem rychlosti odpařování nebyla voda zřejmě extrakčním činidlem extrahována vůbec, nebo pouze ve velmi malé míře. Vzhledem k takovýmto výsledkům bylo tedy možné z původního postupu vypustit také extrakci tuku hexanem, filtraci extraktu přes PTFE filtry i přidavek dichlormethanu pro odstranění vyextrahované vody. Celkový čas odpařování extrakčního činidla se, při porovnání s předchozím postupem extrakce, snížil přibližně na jednu třetinu, tedy na cca 50 minut.

Extrakční směs methanol/acetonitril (1:1) byla, vzhledem k takovýmto výsledkům, nahrazena 1% kyselinou mravenčí v acetonitrilu. Bylo však nutné prodloužit dobu extrakce z původních 10 minut na 30 minut. Důvodem tohoto navýšení byla nízká extrahovatelnost analytů (cca 50 %), kterou se tímto podařilo navýšit na cca 90 %. V původním postupu extrakce činila doba vymrazování bílkovin 15 minut, ta byla však, vzhledem k velmi malému množství vyextrahovaných bílkovin, zkrácena na 10 minut. Dále byla zvýšena navážka vzorku z původních 2,5 g na 3,5 g, s čímž souviselo také navýšení objemu extrakčního činidla z původních 7,5 ml na 10,5 ml. Navýšením navážky vzorku bylo dosaženo vyšší citlivosti stanovení. Výsledná hodnota opakovatelnosti

ze tří stanovení, při použití tohoto postupu extrakce, činila pro oba analyty 7 %, což bylo oproti původnímu postupu extrakce (opakovatelnost 35 %) naprosto přijatelné.

Tento postup extrakce byl testován i na jiné druhy uzenin, mající rozdílné složení a vlastnosti matrice. Extrakční postup byl aplikován, jak na suchý typ uzenářského výrobku, kterým byla Vysočina, tak na měkké druhy salámů, kterými byly výběrová šunka a jemný dětský šunkový salám. U žádného z těchto uzenářských výrobků žádné problémy během extrakce nenastaly. Vyvinutou metodu bylo tedy možné aplikovat na reálné vzorky uzenin.

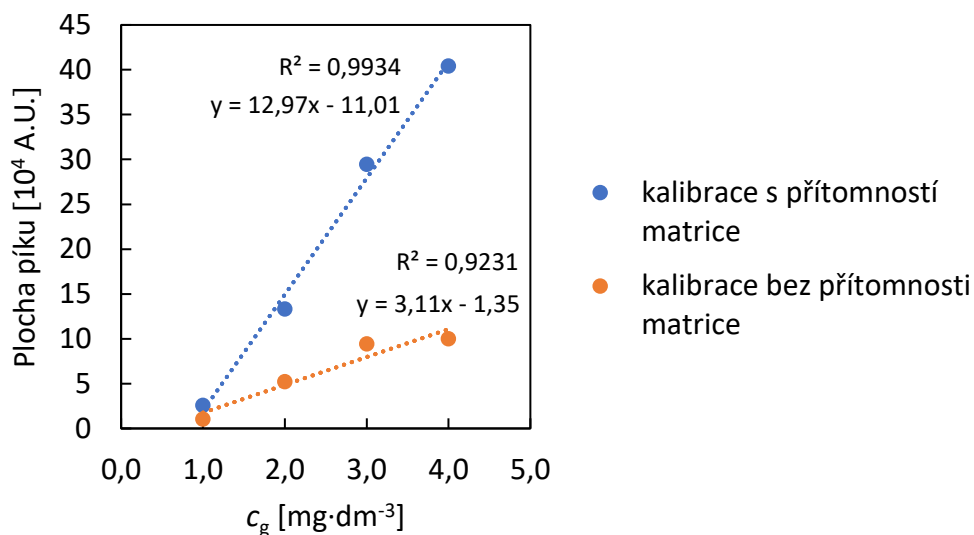
### **3.2. Aplikace vyvinuté metody na reálné vzorky uzenin**

Tato metoda byla sice určena pouze pro semi-kvantitativní stanovení analytů, avšak v této diplomové práci bylo navíc provedeno i kvantitativní stanovení N-nitrosopolinu a 4-kyanofenolu za účelem zjištění, zda koncentrace analytů nejsou zdravotně závadné. Aby bylo možné analyty stanovit, bylo nejprve nutné ověřit, zda nedochází k matričnímu efektu, který by mohl ovlivňovat výsledky stanovení. Byly proto vytvořeny dvě kalibrační řady vzorků. Obě kalibrační řady obsahovaly čtyři vzorky s postupně rostoucí koncentrací analytů. Pro přípravu těchto čtyř vzorků první kalibrační řady bylo k odparům extraktů vzorku postupně přidáno 100; 200; 300 a 400  $\mu\text{l}$  spikovacích roztoků 4-kyanofenolu o koncentraci  $3 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a N-nitrosopolinu o koncentraci  $3 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Poté byl odpařen methanol a následovala derivatizace. Druhá kalibrační řada byla připravena stejným způsobem, ale bez přítomnosti vyextrahované matrice. Pro vynesení kalibrační závislosti bylo nutné od hodnot velikostí ploch pík analytů ve vzorcích první kalibrační řady odečíst hodnoty ploch pík analytů v samotném vzorku uzeniny. Koncentrace analytů v jednotlivých vzorcích kalibrační řady byly vypočteny z hmotnosti přidaného analytu a objemu derivatizačního činidla (300  $\mu\text{l}$ ).

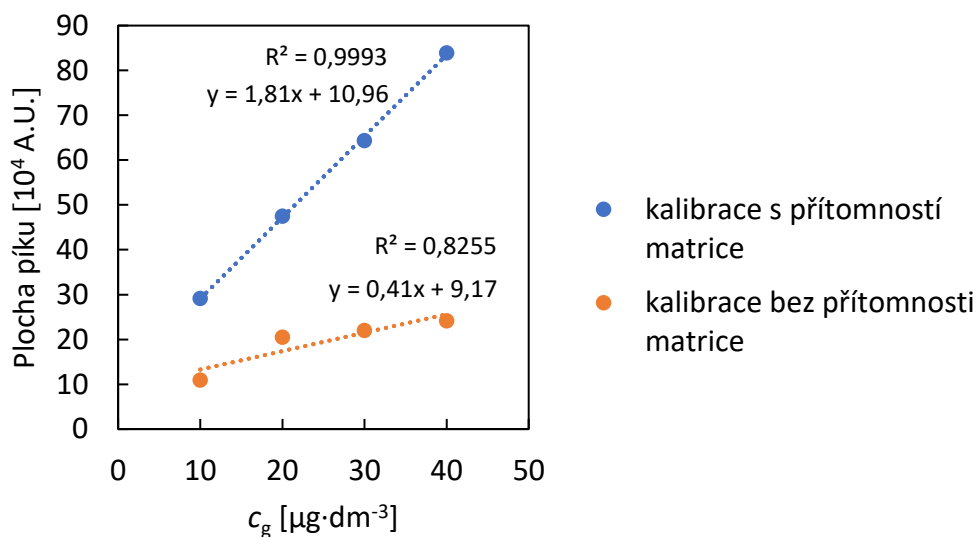
Pokud by byly velikosti ploch pík a hodnoty směrníc obou kalibračních řad stejné, znamenalo by to, že k matričnímu efektu nedochází. Na základě rozdílných velikostí ploch pík kalibračních závislostí (s přítomnou matricí a bez přítomnosti matrice) a současně rozdílných hodnot směrníc (viz Obrázek 16 a 17) u obou analytů bylo však zjištěno, že k matričnímu efektu zcela jistě dochází. V důsledku této skutečnosti bylo tedy nutné pro kvantifikaci analytů použít metodu přídavku standardu, s níž je vliv



matričního efektu do jisté míry eliminován. Tuto metodu stanovení je možné použít pouze pokud se hodnoty úseků rovnic kalibračních přímek statisticky neliší, což bylo v tomto případě pro oba analyty splněno.



**Obrázek 16** – Vliv matričního efektu na stanovení N-nitrosoprolinu.



**Obrázek 17** – Vliv matričního efektu na stanovení 4-kyanofenolu.

Pro stanovení analytů metodou přidavku standardu bylo vždy připraveno pět navážek (3,5 g) homogenizovaného vzorku uzenyiny. Na všechny tyto navážky vzorku

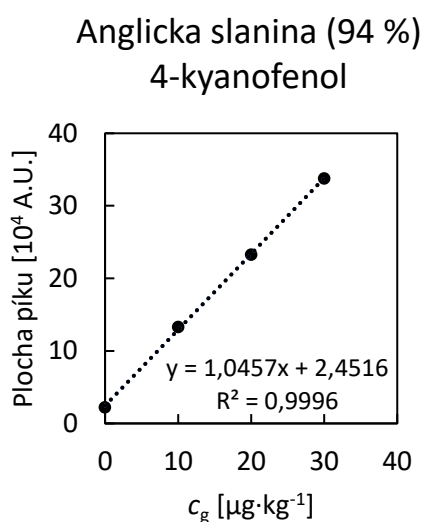
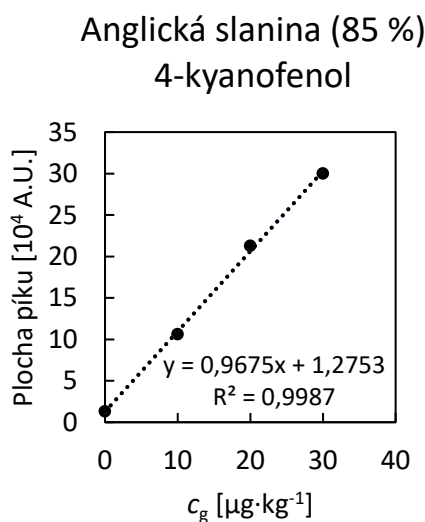
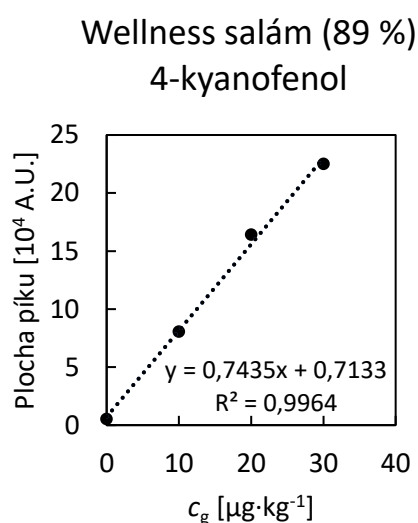
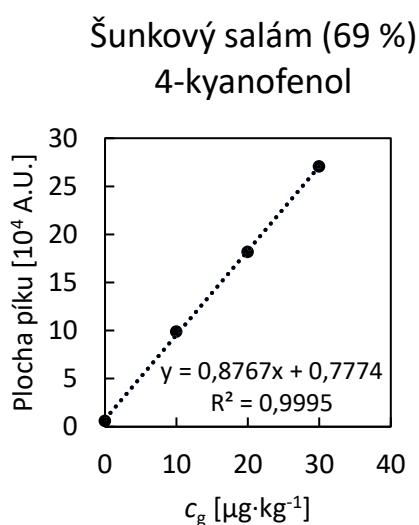
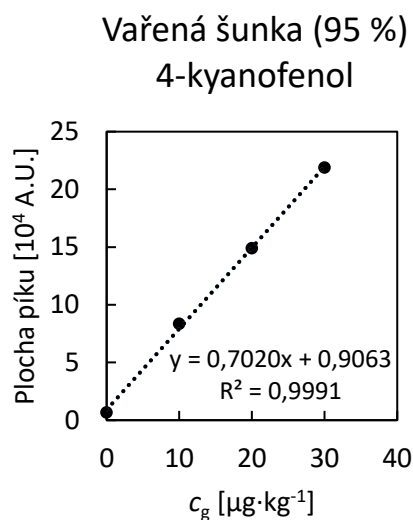
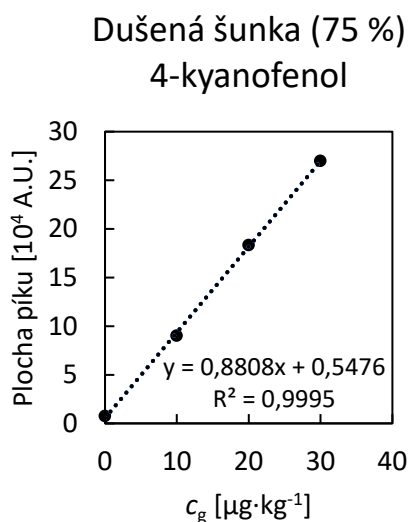
byl aplikován vyvinutý extrakční postup. Před přidavkem derivatizačního činidla (BSTFA) byly tři vzorky spikovány roztoky 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu na hodnoty koncentrací  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Zbylé dva vzorky byly ponechány bez spiku. Spikovací roztoky byly připraveny takovým způsobem, aby po přidavku  $100 \mu\text{l}$  daného roztoku bylo dosaženo požadované koncentrace. Jako rozpouštědlo byl při přípravě těchto spikovacích roztoků použit methanol. Po přidavku spiků a po následném odpaření methanolu následovala derivatizace a poté samotné stanovení. Z chromatogramů, všech pěti vzorků, byly následně odečteny velikosti ploch píků 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu. Z velikostí ploch píků analytů nespikovaných vzorků byla vždy vypočtena průměrná hodnota.

Při první aplikaci vyvinutého postupu extrakce byly porovnávány koncentrace 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu v uzenářských výrobcích vzhledem k obsahu masa použitého při jejich výrobě. Pro kvantifikaci analytů bylo zvoleno pět druhů nejběžnějších uzenářských výrobků, kterými byly vepřová šunka, šunkový salám, anglická slanina, vepřové párky a kuřecí salám (při výrobě všech analyzovaných výrobků byl použit dusitan). Od každého druhu uzeniny byly zakoupeny vždy dva výrobky, jeden s nízkým a druhý s co nejvyšším obsahem masa. Výsledné hodnoty stanovených koncentrací 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu jsou pro jednotlivé vzorky, včetně obsahu masa a výrobce dané uzeniny, uvedeny v Tabulce 2. Vynesené závislosti ploch píků analytů na koncentraci přidaného spiku, jež byly použity pro kvantifikaci analytů, jsou uvedeny na Obrázku 18, 19 a 20.

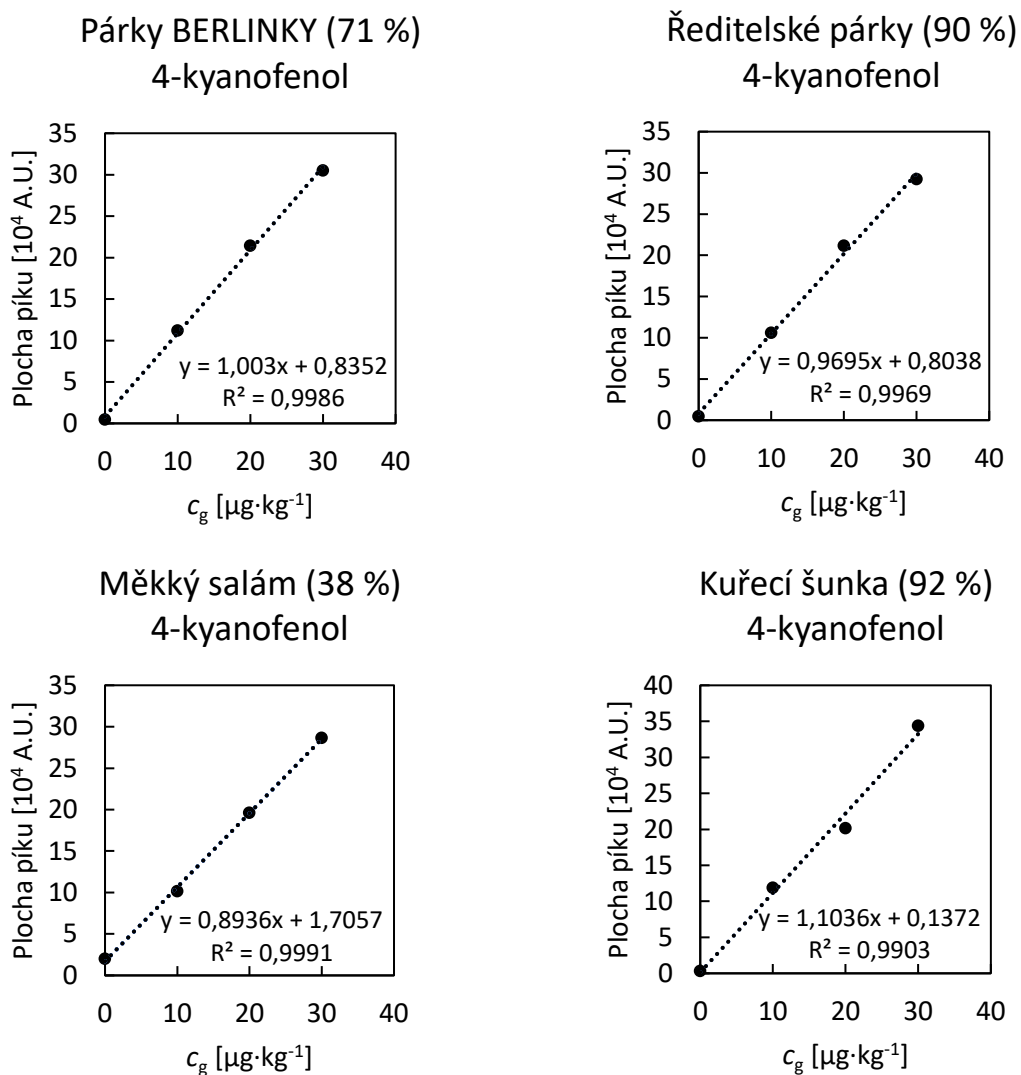
**Tabulka 2** - Stanovené hodnoty koncentrací 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu ve vybraných vzorcích uzenářských výrobků.

Název uzeniny	Druh masa	Výrobce	Obsah masa [%]	$C_g$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]	
				4-kyanofenol	N-nitrosoprolin
Dušená šunka	vepřové	LE&CO-Ing. Jiří Lenc, s.r.o.	75	0,6	ND
Vařená šunka	vepřové	TESCO	95	1,3	1,7
Šunkový salám	vepřové	Kostelecké uzeniny a.s.	69	0,9	0,2
Wellness šunkový salám	vepřové	Fleischwaren Berger GesmbH & CoKG	89	1,0	ND
Anglická slanina	vepřové	Kostelecké uzeniny a.s.	85	1,3	0,9
Anglická slanina	vepřové	TESCO	94	2,3	*
Párky BERLINKY	vepřové	AnimexFoods sp.	71	0,8	*
Ředitelské párky	vepřové	PEJSKAR & spol, spol. s r.o.	90	0,8	2,9
Měkký salám	kuřecí	Kostelecké uzeniny a.s.	38	1,9	*
Kuřecí šunka	kuřecí	Clever	92	0,1	*

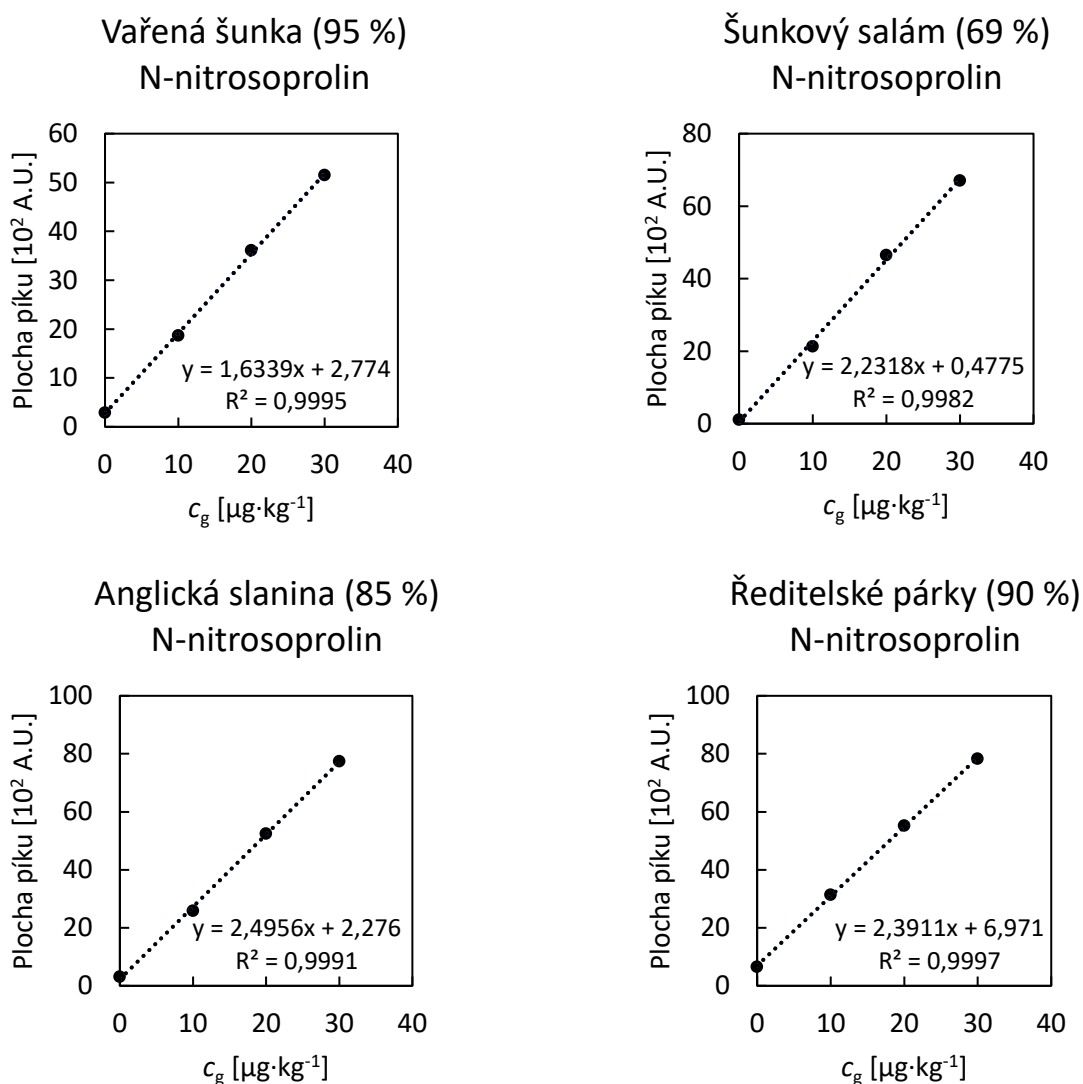
$c_g$  – koncentrace analytu, ND – nebylo detekováno, \*výslednou hodnotu koncentrace analytu nebylo možné stanovit



**Obrázek 18** – Závislosti ploch píků analytu na koncentraci přidaného spíku pro kvantifikaci 4-kyanofenolu ve vybraných vzorcích uzenářských výrobků (1. část).



**Obrázek 19** – Závislosti ploch píků analytu na koncentraci přidaného spiku pro kvantifikaci 4-kyanofenolu ve vybraných uzenářských výrobcích (2. část).



**Obrázek 20** - Závislosti ploch píků analytu na koncentraci přidaného spíku pro kvantifikaci N-nitrosoprolinu ve vybraných vzorcích uzenářských výrobků.

Dle výsledků stanovení byl 4-kyanofenol nalezen ve všech vybraných vzorcích uzenin. U tohoto analytu bylo zjištěno, že ve vzorcích šunky, šunkového salámu a anglické slaniny je jeho koncentrace vyšší (při porovnání absolutních koncentrací z tabulky) ve kvalitnějších uzenářských výrobcích, obsahujících více masa. Důvodem této skutečnosti byl nejspíše samotný obsah masa, s čímž souviselo i množství tyrosinu obsaženého v něm. Právě tyrosin vystupuje jako prekurzor pro vznik 4-kyanofenolu. U obou vzorků vepřových párek byly koncentrace tohoto analytu stejné. Oproti tomu u vzorků kuřecího salámu byla koncentrace vyšší u méně kvalitního výrobku. Stanovené koncentrace 4-kyanofenolu se ve všech vzorcích uzenin nacházely řádově v desetinách

či jednotkách  $\mu\text{g}$  na kilogram vzorku. Nejvyšší koncentrace 4-kyanofenolu byla stanovena u anglické slaniny s 94 % masa, jejíž hodnota činila  $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Oproti tomu nejnižší koncentrace 4-kyanofenolu byla stanovena v kuřecí šunce s obsahem masa 92 %, kdy výsledná hodnota činila  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pro tento analyt byla nalezena střední letální dávka (myš, orálně)  $450 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  [49]. Pokud bychom uvažovali takovéto množství i pro člověka (70 kg), činila by letální dávka 31,5 g. Vzhledem ke stanoveným koncentracím 4-kyanofenolu v jednotlivých vzorcích by však člověk fyzicky odpovídající množství uzeniny nikdy nedokázal pozřít. Člověk by se pravděpodobně dříve otrávil jinými látkami než produkty dusitanu. Množství stanoveného 4-kyanofenolu je tedy z pohledu letální dávky v pořádku. Z důvodu nedostatku toxikologických vlastností této sloučeniny prozatím však není možné přesně říci, zda jsou hodnoty stanovených koncentrací pro člověka nebezpečné či nikoliv.

Obsah N-nitrosoprolinu bohužel nebylo možné u jednotlivých vzorků porovnat, jelikož se u některých uzenin vyskytly problémy při jeho stanovení. Velikosti ploch píků analytu v jednotlivých kalibračních roztocích neměly očekávanou postupně rostoucí tendenci, kdy napříč plochami píků nebyla dodržena lineární závislost. Použití metody přidavku standardu tedy zřejmě u některých druhů uzenin není pro eliminaci matričního efektu dostatečné. Koncentrace N-nitrosoprolinu byla stanovena pouze u jednoho vzorku šunky (95 %), šunkového salámu (69 %), anglické slaniny (85 %) a vepřových párků (90 %). Ovlivnění matričním efektem je například patrné z rozdílné hodnoty směrnice u vzorku vařené šunky oproti zbylým vzorkům (u nichž byl N-nitrosoprolin stanoven). Ve vzorcích kuřecího salámu se koncentraci N-nitrosoprolinu stanovit nepodařilo. Hodnoty koncentrací N-nitrosoprolinu byly řádově srovnatelné s koncentracemi 4-kyanofenolu. Ve vzorcích, u nichž bylo možné koncentraci N-nitrosoprolinu stanovit, byla nejvyšší koncentrace zjištěna v Ředitelských párcích, jejíž hodnota činila  $2,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Oproti tomu ve vzorku dušené šunky a Wellness šunkového salámu nebyl N-nitrosoprolin detekován vůbec.

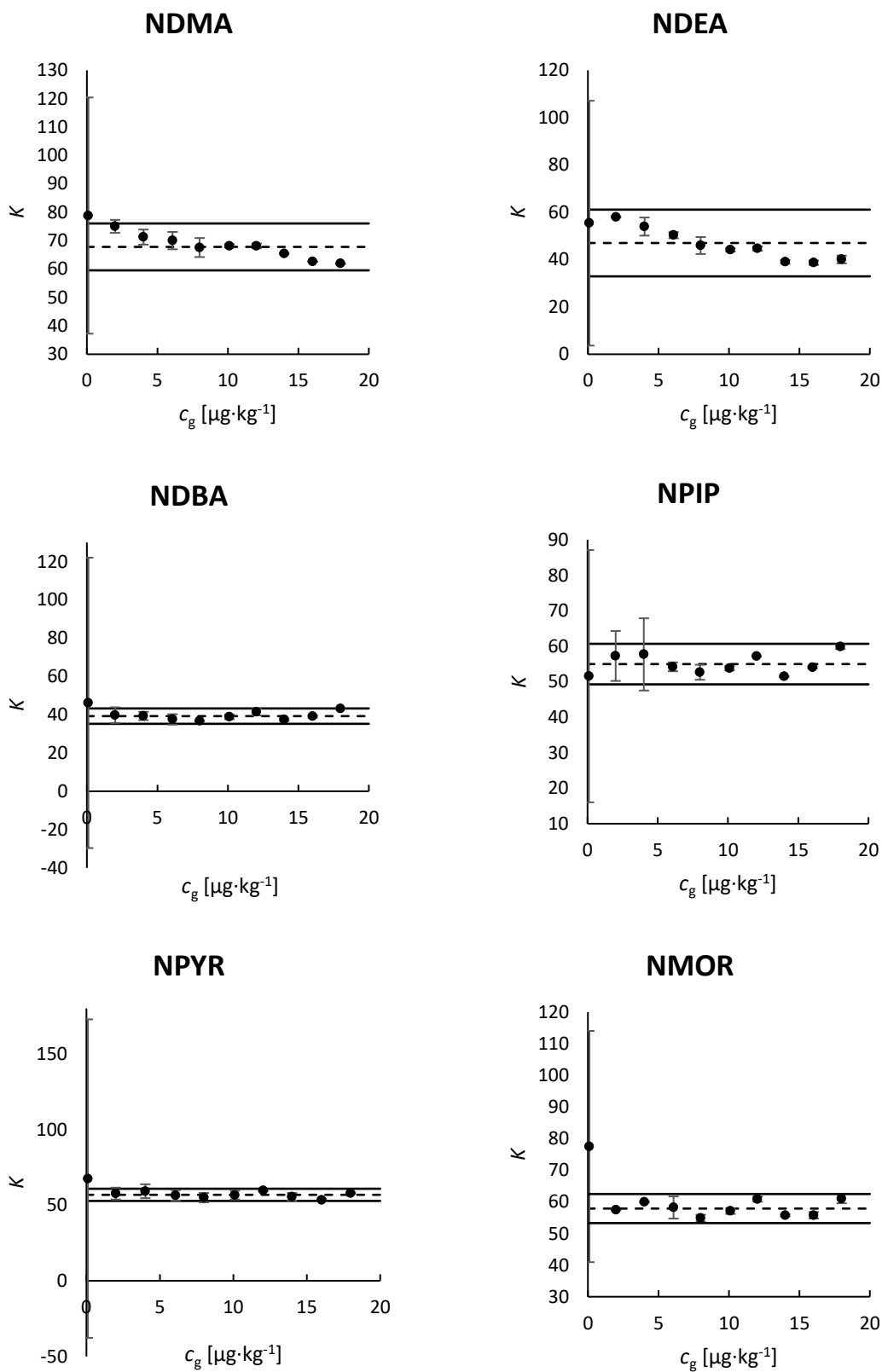
### 3.3. Validace metody pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích

#### 3.3.1. Stanovení linearity

Linearita metody byla testována v rozsahu koncentrací  $0,1 - 18 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , bylo proto připraveno 10 směsných kalibračních roztoků. Z důvodu dvacetinásobného zakoncentrování analytů při extrakci, bylo však nutné připravit kalibrační roztoky jež budou 20krát koncentrovanější. Hodnoty koncentrací analytů ve směsných roztocích byly proto:  $2 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $80 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $122 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $160 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $202 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $240 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $280 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $320 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $360 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tyto roztoky byly připraveny ze standardů jednotlivých analytů o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jako rozpouštědlo byl použit hexan. Pro každý kalibrační roztok byly vždy provedeny dvě analýzy. Z průměru ploch pík analytu z obou měření a koncentrace analytu byla vypočtena citlivost  $K$ , jakožto podíl těchto dvou hodnot. Lineární rozsah byl pro jednotlivé analyty stanoven vynesemím závislosti citlivosti  $K$  na koncentraci analytu. Do jednotlivých grafů byla také zanesena horní a dolní hranice udávající toleranci akceptovaného rozptylu výsledků kolem centrální přímky odpovídající průměru citlivostí napříč jednotlivými koncentracemi daného analytu. Pro vymezení horní i dolní hranice byla vypočtena směrodatná odchylka hodnot citlivostí (výsledná hodnota citlivosti pro koncentraci  $0,10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  nebyla do tohoto výpočtu zahrnuta), jež byla následně rozšířena vynásobením dvojkou. Pro výpočet chybových úseček byla použita rozšířená směrodatná odchylka (rozšířeno hodnotou 2) citlivostí dvou paralelních stanovení.

Výsledné závislosti citlivostí  $K$  na koncentraci pro jednotlivé analyty, znázorňující výsledky stanovení linearity, jsou uvedeny na Obrázku 21.





**Obrázek 21** - Výsledné závislosti citlivostí  $K$  na koncentraci příslušného analytu znázorňující výsledky stanovení lineární odezvy detektoru.

Z vynesných grafických závislostí citlivosti  $K$  na koncentraci příslušného analytu na Obrázku 21 bylo patrné, že detektor poskytuje pro všechny analyty lineární odezvu v rozsahu koncentrací 2,0-18,0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , jelikož všechny hodnoty citlivostí jednotlivých koncentrací se v tomto koncentračním rozsahu nacházely uvnitř stanovené tolerance. Koncentrace 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  do lineárního rozsahu započtena nebyla, a to z důvodu příliš velké nejistoty stanovení, jež byla zaznamenána u všech analytů. Takto vysoká nejistota vznikla pravděpodobně z důvodu, že se tato hodnota koncentrace nacházela pod mezí stanovitelnosti (viz Tabulka 3).

### **3.3.2. Určení správnosti, opakovatelnosti a meze stanovitelnosti jednotlivých analytů**

Pro určení hodnot správnosti stanovení jednotlivých analytů bylo připraveno osm vzorků uzeniny, kdy čtyři z nich byly spikovány na hodnotu koncentrace 3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  vzorku. V chromatogramech nespikovaných vzorků byl detekován pouze NDMA. Z hodnot koncentrací NDMA v jednotlivých nespikovaných vzorcích byla proto vypočtena průměrná hodnota, která byla následně od koncentrace NDMA ve skipovaných vzorcích odečtena. Z hodnot správností stanovení analytu, ze čtyř spikovaných vzorků, byl vypočítán průměr odpovídající výsledné správnosti stanovení. Správnosti stanovení jednotlivých analytů jsou uvedeny v Tabulce 3.

Pro určení hodnoty opakovatelnosti stanovení bylo připraveno 6 vzorků uzeniny spikovaných rovněž na hodnotu koncentrace 3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  vzorku. Výsledná hodnota opakovatelnosti byla stanovena pouze pro NDMA a NDEA, jelikož u zbylých analytů byla stanovena příliš nízká hodnota správnosti stanovení (viz Tabulka 3). Výsledné hodnoty opakovatelnosti stanovení NDMA a NDEA jsou uvedeny v Tabulce 3.

Pro určení hodnoty meze stanovitelnosti bylo připraveno 8 vzorků uzeniny spikovaných na hodnotu koncentrace 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  vzorku. Výsledná hodnota meze stanovitelnosti byla taktéž, s ohledem na hodnoty správností stanovení, stanovena pouze pro NDMA a NDEA. Výsledné hodnoty mezí stanovitelnosti NDMA a NDEA jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3** – Hodnoty správnosti stanovení, opakovatelnosti stanovení a meze stanovitelnosti jednotlivých analytů.

Analyt	Správnost stanovení [%]	Opakovatelnost [%]	Mez stanovitelnosti [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
NDMA	127,9	16,3	0,4
NDEA	127,3	16,5	0,2
NDBA	32,9	---	---
NPIP	53,8	---	---
NPYR	28,9	---	---
NMOR	20,8	---	---

Hodnoty správností stanovení jednotlivých analytů se velice lišily. U NDMA a NDEA se hodnota správnosti stanovení nacházela dokonce nad sto procenty, oproti tomu u zbylých analytů byly hodnoty správností stanovení velice nízké, a tedy naprosto nedostačující. Hodnoty správností stanovení NDMA a NDEA se nacházely nad sto procenty zřejmě z důvodu, že analyty a interní standard nemají stejnou extrahovatelnost. Analyty byly zřejmě extrahovány zcela, zatímco interní standard nikoli. Důvodem této rozdílné extrahovatelnosti byla nejspíše rozdílná polarita molekul analytů a interního standardu. Z výsledků správností bylo tedy zřejmé, že tuto metodu je prozatím možné použít pouze pro stanovení NDMA a NDEA. Hodnota meze stanovitelnosti byla proto stanovena pouze pro tyto dva analyty, kdy bylo nutné, vzhledem k jejich hodnotám správnosti stanovení, provést korekci na výtěžnost. Výsledná hodnota meze stanovitelnosti NDMA byla  $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a pro NDEA činila  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pro oba analyty byla stanovena srovnatelná opakovatelnost cca 16 %. Opakovatelnost dané metody nám říká, že při provedení dvou paralelních stanovení bude hodnota rozdílu koncentrací v 95 % menší nebo rovna její hodnotě.

### 3.3.3. Nejistota stanovení

Z důvodu velmi nízkých hodnot koncentrací (většinou pod mezí detekce) stanovovaných analytů v uzenářských výrobcích byla hodnota nejistoty stanovení vypočtena z hodnot koncentrací NDMA v pravidelně sledovaných vzorcích sladu, tedy konkrétně ze 75 pravidelných stanovení provedených v časovém rozmezí od 21.3. 2013 do 1.1. 2023. Vzhledem k tomu, že tato validovaná metoda byla principiálně shodná s metodou pro stanovení tých analytů ve sladu, ve kterém je koncentrace analytů

srovnatelná s koncentracemi v uzeninách, bylo možné takto hodnotu nejistoty stanovení získat. Průměrná hodnota koncentrace NDMA činila  $5,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Hodnota relativní směrodatné odchylky byla  $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Hodnota relativní nejistoty stanovení tedy činila 27 %. Tato hodnota nejistoty byla uvažována i pro zbylé analyty. Není samozřejmě vyloučeno, že u vzorků uzenářských výrobků může být výsledná hodnota nejistoty stanovení větší.

## 4. Závěr

V první části této diplomové práce bylo cílem vyvinout univerzální extrakční metodu pro stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzeninách. Bohužel z důvodu nedostatku standardů jednotlivých analytů nebylo možné požadovaný cíl splnit. Podařilo se však vyvinout extrakční metodu pro stanovení 4-kyanofenolu a N-nitrosoprolinu pomocí plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí, jež pro kvantifikaci analytů využívá metodu přidavku standardu. Pro extrakci analytů byl použit 1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Výsledná výtěžnost tohoto extrakčního postupu je přibližně 90 % a hodnota relativní opakovatelnosti činí přibližně 7 %. Vyvinutá metoda byla následně aplikována na reálné vzorky uzenářských výrobků. Přítomnost 4-kyanofenolu byla prokázána ve všech analyzovaných vzorcích. Vzhledem k tomu, že byl tento analyt přítomen, mohou být přítomny i jiné produkty tyrosinu, jež byly detekovány ve studii, z níž vycházela tato diplomová práce [10]. Jde nejspíše o první studii, jež se stanovením tohoto analytu v uzeninách zabývala. Při stanovení N-nitrosoprolinu se však u některých vzorků, z důvodu silného matričního efektu, vyskytly problémy znemožňující kvantifikaci tohoto analytu. U zbylých analytů, pro něž nebyly dostupné standardy, bylo pouze pozorováno, zda se ve vzorcích uzenin nacházejí či nikoliv. V žádném ze vzorků uzeniny však nalezeny nebyly. Tyto sloučeniny zřejmě v mase nevznikají vůbec, nebo pouze ve velmi malé míře.

Ve druhé části této práce byla provedena validace metody pro stanovení těkavých N-nitrosaminů v uzenářských výrobcích za pomoci plynové chromatografie s chemiluminiscenční detekcí, při níž byly stanoveny hodnoty zvolených výkonnostních charakteristik. Na základě výsledků těchto charakteristik bylo zjištěno, že danou metodu bylo možné použít pouze pro stanovení N-nitrosodimethylaminu a N-nitrosodiethylaminu. Důvodem byly nedostačující hodnoty správnosti stanovení zbylých analytů. Jak pro N-nitrosodimethylamin, tak pro N-nitrosodiethylamin byla stanovena správnost stanovení přibližně 127 % a relativní opakovatelnost 16 %. Meze stanovitelnosti pro tyto dva analyty činily  $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Detektor poskytoval pro oba analyty, v rámci testovaného rozsahu koncentrací, lineární odezvu v rozsahu 2 -  $18 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejnižší testovaná hodnota koncentrace  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  se nacházela pod mezí stanovitelnosti, tudíž do rozsahu lineární odezvy detektoru zahrnuta nebyla. Hodnoty mezí stanovitelnosti

se sice nacházely pod nejnižší hodnotou stanoveného lineárního rozsahu detektoru, neznamená to však, že by v oblasti LOQ nebyla odezva detektoru lineární.

## 5. Použité informační zdroje

- [1] P. E. Smunekata, G. Rocchitti, M. Pateiro, L. Lucini, R. Domínguez a J. Manuellorenzo, „Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: an overview“, *Current Opinion in Food Science*, 31, 81-87 (2020). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.003>
- [2] T. Vrzal, a J. Olšovská, „N-nitrosaminy v 21. století“, *Kvasný Průmysl*, 62(1), 2-8 (2016). Dostupné z: [doi:10.18832/kp2016001](https://doi.org/10.18832/kp2016001)
- [3] Dusitany v českých uzeninách. *INFORMAČNÍ CENTRUM BEZPEČNOSTI POTRAVIN*. Praha 1, 110 00: Ministerstvo zemědělství, 2021. [cit. 2022-12-29] Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/dusitany-v-ceskych-uzeninach.aspx>
- [4] S. S. Herrmann, K. Granby a L. Duedahl-Olesen, „Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages“, *Food Chemistry*, 174, 516-526 (2015). Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.101](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.101)
- [5] H. B. Bartsch a R. Montesano, „Relevance of nitrosamines to human cancer“, *Carcinogenesis*, 11(5), 1381–1393 (1984). Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/carcin/5.11.1381>
- [6] S. Ventanas a J. Ruiz, „On-site analysis of volatile nitrosamines in food model systems by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device“, *Talanta*, 70, 1017-1023 (2006). Dostupné z: [doi:10.1016/j.talanta.2006.02.031](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.02.031)
- [7] A. R. Tricker a R. Preussmann, „Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3-4), 277–289 (1991). Dostupné z: [doi:10.1016/0165-1218\(91\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90123-4)
- [8] W. Bedale, J. J. Sindelar a A. L. Milkowski, „Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions“, *Meat Science*, 120, 85-92 (2016). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.009>
- [9] D. Kocak, M. Z. Ozel, F. Gogus, J. F. Hamilton a A. C. Lewis, „Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography – Nitrogen chemiluminescence detection“, *Food Chemistry*, 135(4), 2215-2220 (2012). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.002>

- [10] M. Malečková, T. Vrzal, J. Olšovská a J. Sobotníková, „Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**(39), 11687–11695 (2021). Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.1c04421
- [11] D. Cvetković, V. Živković, V. Lukić a S. Nikolić, “Sodium nitrite food poisoning in one family. *Forensic Science*“, *Medicine and Pathology*, **15**, 102–105 (2019). Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12024-018-0036-1>
- [12] F. Gassara, A. P. Kouassi a S. K. Brar, „Green Alternatives to Nitrates and Nitrites in Meat-based Products—A Review“, *Food Science and Nutrition*, **56**(13), 2133–2148 (2016). Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.812610>
- [13] K. Ferysiuk a K. M. Wojciak, „Reduction of Nitrite in Meat Products through the Application of Various Plant-Based Ingredients“, *Antioxidants*, **9**(8), 711 (2020). Dostupné z: doi:10.3390/antiox9080711
- [14] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/52/ES ze dne 5. června 2006, kterou se mění směrnice 95/2/ES o potravinářských přídatných látkách jiných než barviva a náhradní sladidla a směrnice 94/35/ES o náhradních sladidlech pro použití v potravinách. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0052&from=HU>
- [15] S. S. Herrmann, L. Duedahl-Olesen a K. Granby, „Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment“, *Food Control*, **48**, 163–169 (2015). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.030>
- [16] W. Lijinsky, „N-Nitroso compounds in the diet“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **443**(1-2), 129–138 (1999). Dostupné z: doi:10.1016/S1383-5742(99)00015-0
- [17] V. Kellner, J. Čulík, L. Veselý a B. Špinar, „Problematika celkových N-nitrososloučenin“, **37**(7), 193–196 (1991). Dostupné z: doi:10.18832/kp1991020
- [18] A. M. Helguera, M. P. González, M. N. D. S. Cordeiro a M. Á. C. Pérez, „Quantitative structure carcinogenicity relationship for detecting structural alerts in nitroso-compounds“, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **221**(2), 189–202 (2007). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.021>
- [19] L. Heinz, M. Klaus a H. Lutz, *Barevný atlas farmakologie*, 5. vydání. Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-3908-3.
- [20] G. Basařová, V. Kellner a J. Čulík. *Rešeršní práce: Problematika N-nitrosaminů*. Praha: Výzkumný ústav pivovarská a sladařský (1980).



- [21] V. Kellner, J. Čulík a G. Basařová, „Problematika N-nitrosaminů - vznik a vlastnosti“, *Výzkumný ústav pivovarský a sladařský*, **28**(1), 7-11 (1982). Dostupné z: doi:10.18832/kp1982002
- [22] K. Inami, J. Shiino, S. Hagiwara, K. Takeda a M. Mochizuki, „Transnitrosation of non-mutagenic N-nitrosoproline forms mutagenic N-nitroso-N-methylurea“, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**(13), 3297-3302 (2015). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.058>
- [23] W. Fritz a W. J. Uhde, „K určování nitrosaminů ve sladu a pивě“, *Kvasný Průmysl*, **28**(7), 149-152 (1982). Dostupné z: doi:10.18832/kp1982030
- [24] J. Čulík, T. Horák, M. Jurková a P. Čejka, „Non-volatile N-nitrosamines in brewing industry. Part II. – Study of the Effect of UV Irradiation on the ATNC and Some Representatives of N-nitrosoaminoacids in Beer“, *Kvasný Průmysl*, **58**(1), 26-29 (2012). Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/236839107\\_Non-volatile\\_N-nitrosamines\\_in\\_brewing\\_industry\\_Part\\_II\\_Study\\_of\\_the\\_Effect\\_of\\_UV\\_Irradiation\\_on\\_the\\_ATNC\\_and\\_Some\\_Representatives\\_of\\_N-nitrosoaminoacids\\_in\\_Beer](https://www.researchgate.net/publication/236839107_Non-volatile_N-nitrosamines_in_brewing_industry_Part_II_Study_of_the_Effect_of_UV_Irradiation_on_the_ATNC_and_Some_Representatives_of_N-nitrosoaminoacids_in_Beer)
- [25] V. Kellner, „Nejvýznamnější kontaminanty z pohledu pivovarského a sladařského oboru“, *Kvasný Průmysl*, **40**(2), 42-45 (1994). Dostupné z: doi:10.18832/kp1994004
- [26] T. Wainright, „THE CHEMISTRY OF NITROSAMINE FORMATION: RELEVANCE TO MALTING AND BREWING“, *Journal of The institute of Brewing*, **92**(1), 49-64 (1986). Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04373.x>
- [27] K. Inami, S. Kondo, Y. Ono, C. Saso a M. Mochizuki, „Transnitrosation of alicyclic N-nitrosamines containing a sulfur atom“, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**(24), 7853-7857 (2013). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.008>
- [28] K. Inami, Y. Ono, S. Kondo, I. Nakanishi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi a M. Mochizuki, „Effect of alkyl group on transnitrosation of N-nitrosothiazolidine thiocarboxamides“, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**(20), 6733-6739 (2015). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.008>

- [29] J. R. A. Pollock, „Aspects of nitrosation in malts and beers. I. Examination of malts for the presence of N-nitrosoproline, N-nitrososarcosine and N-nitrosopipicolinic acid“, *Journal of the Institute of Brewing*, **87**(6), 356-359 (1981). ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1981.tb04050.x
- [30] V. Kellner, J. Čulík a G. Basařová, „Analytika N-nitrosaminů“, *Kvasný Průmysl*, **28**(5), 99-103 (1982). Dostupné z: doi:10.18832/kp1982020
- [31] S.S. Herrmann, L. Duedahl-Olesen a K. Granby, „Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation“, *Journal of Chromatography A*, **1330**, 20-29 (2014). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.009>
- [32] P. J. S. Filho, A. Rios, M. Varcárcel, K. D Zanin a E. B. Caramão, „Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction–micellar electrokinetic chromatography“, *Journal of Chromatography A*, **985** (1-2), 503-512 (2003). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01825-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01825-3)
- [33] M. W. Byun, H. J. Ahn, J.H. Kim, J.W. Lee, H.S. Yook a S.B. Han, „Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer“, *Journal of Chromatography A*, **1054**(1-2), 403-407 (2004). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.096>
- [34] O. Chienthavorn, P. Subprasert a W. Insuan, „Nitrosamines Extraction from Frankfurter Sausages by using Superheated Water“, *Separation Science and Technology*, **49**(6), 838-846 (2014) Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01496395.2013.863338>
- [35] S. Raoul, E. Gremaun, H. Biaudet a R. J. Turesky, „Rapid Solid-Phase Extraction Method for the Detection of Volatile Nitrosamines in Food“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(12), 4706-4713 (1997). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf970232q>,
- [36] H. Ramezani, H. Rosseini, M. Kamankesh, V. Ghasemzadeh-Mohammadi a A. Mohammadi, „Rapid determination of nitrosamines in sausage and salami using microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spektrometry“, *European Food Research and Technology*, **240**, 441–450 (2015). Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2343-4>
- [37] C. Schummer O. Delhomme, M. R. Appenzeller, R. Wennig a M. Millet, „Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar

- compounds prior to GC/MS analysis“, *Talanta*, **77**(4), 1473-1482 (2008).  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.043>
- [38] F. Orata, „Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis“, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* (2012). ISBN 978-953-51-0298-4.  
Dostupné z: doi:10.5772/33098
- [39] D. R. Parkinson, „Analytical Techniques for Scientists“, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (2014). Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.11454-4
- [40] D. H. Fine, D.P. Rounbehler, N. P. Sen, „A comparison of some chromatographic detectors for the analysis of volatile N-nitrosamines“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **24**(5), 980–984 (1976). Dostupné z: doi:10.1021/jf60207a036
- [41] D. H. Fine, F. Rufeh, D. Lieb a D. P. Rounbehler, „Description of the thermal energy analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds“, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **47**(7), 1188–1191 (1975).  
Dostupné z: doi:10.1021/ac60357a073
- [42] J. Wang, W. Geoffrey-Chan, S. A. Haut, M. R. Krauss, R. R. Izac a W. P. Hempfling, „Determination of Total N-Nitroso Compounds by Chemical Denitrosation Using CuCl“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4686–4691 (2005). Dostupné z: doi:10.1021/jf0481709
- [43] B. Magnusson a U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Dostupné z: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).”
- [44] *KVALIMETRIE 23*, Ústí nad Labem: Eurachem-ČR, 2018. ISBN 978-80-86322-11-7. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/wp-content/uploads/2022/07/Kvalimetrie23-fin.pdf>
- [45] Význam validace metody. *EURACHEM-ČR*, 2022. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/user-files/files/ml24-mv-leaflet-cz.pdf>
- [46] *KVALIMETRIE 16*, 2. vydání. Praha: EURACHEM-ČR, 2009. ISBN 80-86322-04-1. Dostupné z: <http://www.eurachem.upol.cz/user-files/files/kvalimetrie-16.pdf>
- [47] Metodický list 7 - Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti. *EURACHEM-ČR*, 2011. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/user-files/files/metodicky-list-7-2018.pdf>

- [48] M Křížek a J. Šíma, „ANALYTICKÁ CHEMIE“. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5. Dostupné z: [http://kch.zf.jcu.cz/vyuka/download/Analyticka\\_chemie\\_komplet.pdf](http://kch.zf.jcu.cz/vyuka/download/Analyticka_chemie_komplet.pdf)
- [49] SAFETY DATA SHEET - *Thermo Fisher Scientific: 4-Cyanophenol*. Vznik dokumentu 2009. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC110835000&productDescription=4CYANOPHENOL%2C+99%25+500GR&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en>