UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO–TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022 Bc. Veronika Šantrůčková

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Stanovení ethylkarbamátu v alkoholických nápojích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Bc. Veronika Šantrůčková

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Veronika Šantrůčková**
Osobní číslo:	**C20531**
Studijní program:	**N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce:	**Stanovení ethylkarbamátu v alkoholických nápojích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie**
Téma práce anglicky:	**Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages using high-performance liquid chromatography**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na možnosti stanovení ethylkarbamátu v potravinách a nápojích, zejména pak v lihovinách. Dále se zaměřte na analýzu derivátů ethylkarbamátu pomocí vyskoúčinné kapalinové chromatografie.

2. V rámci experimentální části optimalizujte derivatizaci ethylkarbamátu pomocí činidla 9-xanthydrol s ohledem na dobu přípravy derivátu, jeho stabilitu a množství přítomných vedlejších produktů.

3. Optimalizujte HPLC separaci derivatizovaného ethylkarbamátu a nalezené optimální podmínky využijte pro analýzu reálných vzorků alkoholických nápojů.

4. Porovnejte a diskutujte nalezený obsah ethylkarbamátu ve vzorcích.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jitka Klikarová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení ethylkarbamátu v alkoholických nápojích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 05. 05. 2022

Bc. Veronika Šantrůčková

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Jitce Klikarové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup, věnovaný čas a trpělivost. Dále bych také chtěla poděkovat i konzultantovi doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc. za věcné připomínky k této práci. Na závěr zvláštní poděkování patří i mé rodině a příteli za podporu po dobu studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá analýzou ethylkarbamátu ve fermentovaných potravinářských výrobcích, zejména v destilovaných alkoholických nápojích vyrobených z peckového ovoce. Teoretická část je věnována toxicitě, mechanismu vzniku, možnostem snížení tvorby ethylkarbamátu a analytickým metodám vedoucích k jeho stanovení v reálných vzorcích. Experimentální část je pak zaměřena na optimalizaci předkolonové derivatizace ethylkarbamátu pomocí činidla 9-xanthydrol a optimalizaci separace připraveného derivátu kapalinovou chromatografií v systému s obrácenými fázemi a fluorescenčním detektorem. Optimalizovaná metoda byla rovněž validována a následně aplikována na 50 vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ethylkarbamát, 9-xanthydrol, derivatizace, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, alkoholické nápoje

TITLE

Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages using high-performance liquid chromatography.

ANNOTATION

The diploma thesis deals with the analysis of ethyl carbamate in fermented food products, especially in distilled alcoholic beverages made from stone fruits. The theoretical part is devoted to the toxicity of ethyl carbamate, mechanism of its formation, possibilities of reducing the formation, and analytical methods leading to its determination in real samples. The experimental part is focused on the optimization of pre-column derivatization of ethyl carbamate using the reagent 9-xanthydrol and the optimization of separation of the prepared derivatives by reversed-phase liquid chromatography coupled with a fluorescence detector. The optimized method was also validated and subsequently applied to 50 samples.

KEYWORDS

Ethyl carbamate, 9-xanthydrol, derivatization, high-performance liquid chromatography, alcoholic beverages

Obsah

1 TEORETICKÁ ČÁST 14

1.1 Ethylkarbamát 14

1.1.1 Charakterizace 14

1.1.2 Toxicita 14

1.1.3 Výroba a použití 15

1.1.4 Metabolismus 15

1.2 Ethylkarbamát v potravinách a nápojích 16

1.2.1 Přítomnost ethylkarbamátu v potravinách a nápojích 16

1.2.2 Mechanismus vzniku ethylkarbamátu v potravinách a nápojích 19

1.2.3 Možnosti snížení tvorby ethylkarbamátu v alkoholických nápojích 24

1.3 Metody stanovení ethylkarbamátu v potravinách a nápojích 27

1.3.1 Plynová chromatografie 27

1.3.2 Kapalinová chromatografie 30

1.3.3 Spektrometrické metody 32

1.3.4 Enzymatické metody 33

1.3.5 Imunoanalýza 34

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 35

2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky 35

2.2 Použité chemikálie 35

2.3 Analyzované vzorky 36

2.3.1 Domácí ovocné pálenky 36

2.3.2 Komerčně dostupné ovocné pálenky 37

2.3.3 Ostatní alkoholické nápoje 38

2.3.4 Potraviny 39

2.4 Pracovní postupy 40

2.4.1 Příprava roztoku standardu EC 40

2.4.2 Příprava roztoku derivatizačního činidla 40
2.4.3 Příprava 1,5 mol/l kyseliny chlorovodíkové 40
2.5 Derivatizace 40
2.6 Optimalizované podmínky pro stanovení ethylkarbamátu 41
2.7 Zpracování experimentálních dat 41
3 VÝSLEDKY A DISKUZE 42
3.1 Optimalizace derivatizace 42
3.2 Optimalizace HPLC separace 45
3.3 Validace analytické metody 46
3.3.1 Příprava kalibrační křivky 47
3.3.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti 48
3.3.3 Návratnost metody 49
3.3.4 Opakovatelnost 50
3.4 Analýza vzorků 51
4 ZÁVĚR 56
POUŽITÁ LITERATURA 57
PŘÍLOHA 70

SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
ADA	Azodikarbonamid
ADI	Akceptovatelný denní příjem
BC	Butylkarbamát
BMDL	Dolní limit referenční dávky
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
EC	Ethylkarbamát
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	Enzymová imunosorpční analýza
FTIR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GC-MS/MS	Plynová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPLC-FLD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem
HPLC-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HS-SPME	Headspace mikroextrakce tuhou fází
IARC	Mezinárofní agentura pro výzkum rakoviny
JECFA	Společný výbor expertů organizací FAO/WHO
LD_{50}	Letální (smrtelná dávka)
LLE	Extrakce kapalina - kapalina
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
NADH	Nikotinamid adenindinukleotid

NIR	Spektrometrie v blízké infračervené oblasti
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PC	Propylkarbamát
PLE	Tlaková kapalinová extrakce
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SERS	Povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SPE	Extrakce tuhou fází
SPLE	Selektivní tlaková kapalinová extrakce
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
XEC	Ethyl-*N*-xanthylkarbamát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura ethylkarbamátu.

Obrázek 2: Metabolické cesty ethylkarbamátu.

Obrázek 3: Prekurzory a mechanismus vzniku EC.

Obrázek 4: Reakce činidla s ethylkarbamátem.

Obrázek 5: Kinetika derivatizační reakce s 1,5 mol/l HCl

Obrázek 6: Vliv světla a tmy na derivatizační reakci

Obrázek 7: Závislost relativní výtěžnosti derivatizace na koncentraci ethanolu při přípravě XEC derivátu ze standardního roztoku o koncentraci 1 300 µg/l.

Obrázek 8: Závislost relativní výtěžnosti derivatizační reakce na koncentraci ethanolu při přípravě XEC derivátu z reálného vzorku slivovice.

Obrázek 9: Chromatografická separace standardu EC a vzorku obsahující EC.

Obrázek 10: Kalibrační závislost plochy píku XEC derivátu na jeho koncentraci.

Obrázek 11: Kalibrační závislost výšky píku XEC derivátu na koncentraci, včetně rovnice regrese s příslušnými směrodatnými odchylkami.

Obrázek 12: Srovnání koncentrací EC u pozitivních vzorků.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Maximální doporučené koncentrace EC v alkoholických nápojích pro vybrané země [2].

Tabulka 2: Analyzované vzorky domácích ovocných pálenek včetně informací o jejich roku výroby a výrobci.

Tabulka 3: Analyzované vzorky komerčních pálenek, respektive lihovin.

Tabulka 4: Analyzované vzorky dalších alkoholických nápojů.

Tabulka 5: Seznam analyzovaných vzorků potravin.

Tabulka 6: Optimalizovaný gradientový program pro separaci derivátu ethylkarbamátu.

Tabulka 7: Plochy píku pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty ploch píků, naměřené koncentrace, návratnosti a relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrační hladiny

Tabulka 9: Intradenní a mezidenní opakovatelnost koncentrací, plochy píků a retenčních časů.

Tabulka 10: Množství EC stanovený v domácích ovocných pálenkách.

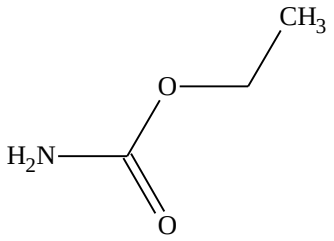
Tabulka 11: Množství EC nalezená v komerčně dostupných slivovicích.
Tabulka 12: Množství/koncentrace EC nalezená v ostatních alkoholických nápojích.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Ethylkarbamát

1.1.1 Charakterizace

Ethylkarbamát (EC; $NH_2COOC_2H_5$), známý také jako ethylester kyseliny karbamové, urethan či ethylurethan (Obrázek 1), byl poprvé objeven již v 19. století a je to bezbarvá krystalická látka s molekulovou hmotností 89,09 g/mol, bodem varu 182–184 °C a teplotou tání 48–50 °C. Rozpouští se v polárních (voda, ethanolu) i nepolárních rozpouštědlech (chloroform, ether, glycerol) a ve vodném roztoku má neutrální pH. Vzhledem ke své toxicitě a potenciální hrozbě pro lidské zdraví byla podrobně studována jeho tvorba a metabolismus a byly vyvinuty různé metody jeho stanovení [1].



Obrázek 1: Chemická struktura ethylkarbamátu.

1.1.2 Toxicita

Akutní orální toxicita EC je velmi nízká. Střední letální (smrtelná) dávka (LD_{50}), která vyjadřuje uhynutí 50 % testovaných jedinců do 24 hodin, se u hlodavců pohybuje přibližně kolem 2000 mg/kg tělesné hmotnosti, přičemž dávky okolo 1000 mg/kg jim již způsobují anestezii. Společný výbor expertů organizací FAO/WHO pro potravinářská aditiva (JECFA) určil dolní limit referenční dávky (BMDL) na 0,3 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Tato hodnota vyjadřuje dávku, u které lze pozorovat nepříznivý účinek u 10 % exponovaných jedinců. Akceptovatelný denní příjem (ADI), jež vyjadřuje maximální přijímané množství EC bez znatelného zdravotního rizika, byla pak tímto výborem ustanovena na 15 ng/kg tělesné hmotnosti za den.

Nebezpečnost EC tedy není při jednorázové perorální, transdermální či intravenózní expozici příliš vysoká, na rozdíl od opakované expozice, která způsobovala u řady živočišných druhů (myši, potkani, křečci a opice) mutagenezi či karcinogenitu. Z tohoto důvodu byl EC v roce

1974 klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako možný lidský karcinogen (skupina 2B).

V roce 2007 pak IARC dokonce přeřadila EC do skupiny 2A zahrnující látky, které jsou pravděpodobným lidským karcinogenem (skupina 2A). Studie na hlodavcích odhalily, že EC vyvolává nádory v různých typech tkání bez ohledu na způsob podání. Nejčastěji dochází k perorální expozici, která vede k vzniku lymfomů, leukémie, rakoviny plic, jater, mléčné žlázy, kůže a žaludku. EC se nachází v poměrně vysokých koncentracích zejména v alkoholických nápojích, a proto byly provedeny studie vzájemného působení EC a ethanolu. Výsledky naznačují, že ethanol dokonce zvyšuje karcinogenitu EC, a proto by nadměrná a dlouhodobá konzumace alkoholických nápojů (zejména pálenek z peckovin) mohla vést k vyššímu příjmu EC, a tak ohrozit lidské zdraví [2].

1.1.3 Výroba a použití

EC lze vyrobit reakcí ethanolu s močovinou nebo zahřátím dusičnanu močoviny s ethanolem a dusitanem sodným. Další možná metoda spočívá v přidání ethanolu k trichloracetylisokyanátu.

EC byl používán jako antineoplastikum při léčbě mnohočetného myelomu, kdy inhibuje mitózu, tudíž zpomaluje buněčný růst, a to zejména buněk kostní dřeně. V minulosti byl používán i pro další léčebné účely, například jako hypnotikum (později nahrazen barbituráty), anestetikum pro laboratorní zvířata nebo jako spolurozpouštědlo pro ve vodě nerozpustná analgetika. Užití našel ale i při výrobě kosmetiky, pesticidů, insekticidů či textilií [3,4]. Veškeré jeho aplikace však skončily poté, co bylo v roce 1943 zjištěno, že je karcinogenní. V současné době je ethylkarbamát používán pouze pro výzkumné účely [5-7].

1.1.4 Metabolismus

Ethylkarbamát se rychle vstřebává ze zažívacího traktu a kůže do krevního řečiště, kterým je rovnoměrně distribuován po těle a následně rychle eliminován. Metabolismus EC zahrnuje tři hlavní cesty: hydrolýzu, N- nebo C-hydroxylaci a oxidaci postranního řetězce (Obrázek 2). Tyto reakce jsou katalyzované cytochromem P450 2E1 (CYP2E1) či esterázou. Až 90 % EC je z těla odstraněno hydrolýzou katalyzovanou jaterní esterázou, což vede k tvorbě oxidu uhličitého, amoniaku a ethanolu, který je dále pomocí alkoholdehydrogenázy přeměněn na acetaldehyd a následně na oxid uhličitý. Oxidací postranního řetězce, N-hydroxylací a C-hydroxylací je odbouráváno pouze velmi malé množství EC (5 %). Tyto reakce jsou

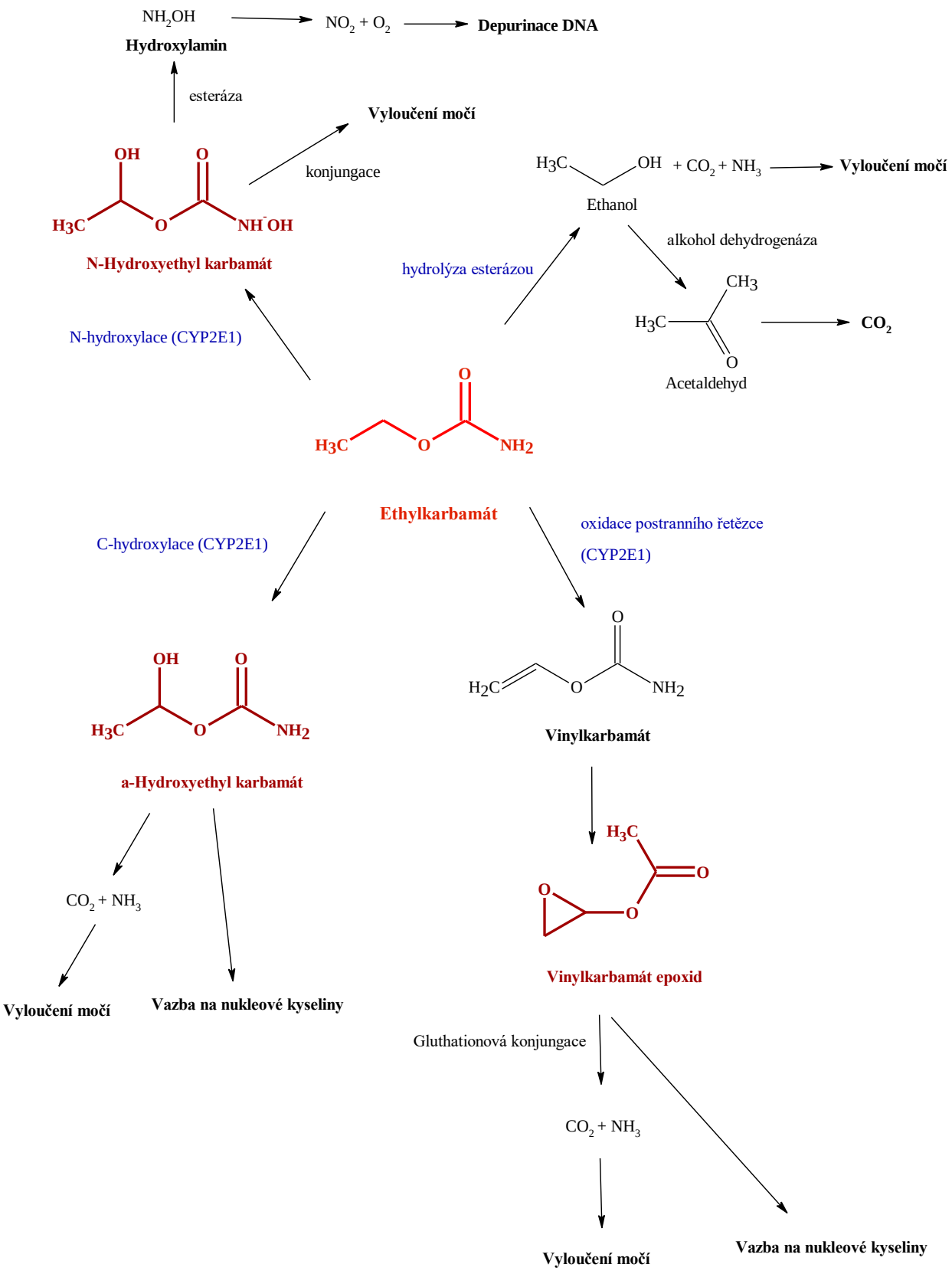
katalyzovány za vzniku více či méně nebezpečných meziproduktů. Oxidací postranního řetězce vzniká vinylkarbamát, který je dále oxidován na vinylkarbamát epoxid, jež je dále metabolizován konjungací s glutathionem na oxid uhličitý a amoniak. Bylo však zjištěno, že přibližně 0,5 % vinylkarbamát epoxidu se váže na nukleové kyseliny (DNA, RNA) a proteiny, a dochází tak k tvorbě aduktů zodpovědných za karcinogenní účinek [8]. Z tohoto důvodu byl vinylkarbamát epoxid označen za hlavní metabolit EC vyvolávající karcinogenezi a genotoxicitu. Během N-hydroxylace je EC přeměněn na N-hydroxyethyl karbamát, který je konjugován a vylučován močí. Avšak nepatrné množství N-hydroxyethyl karbamátu (0,1 %) je dále metabolizováno esterázou na hydroxylamin. Ten však vytváří kyslík a oxid dusnatý, což následně způsobuje oxidaci a depurinaci DNA. Poslední metabolickou cestou EC je C-hydroxylace za vzniku α-hydroxyethyl karbamátu, jež je metabolizován na amoniak a oxid uhličitý [2, 6].

1.2 Ethylkarbamát v potravinách a nápojích

Pro většinu lidí jsou hlavním zdrojem EC zejména destilované alkoholické nápoje vyráběné z peckového či jádrového ovoce. V nižších koncentrací ho pak přijímáme z fermentovaných potravin, jako jsou mléčné výrobky, chléb, sójová omáčka, nebo z jiných alkoholických nápojů vyráběných fermentací (pivo, víno).

1.2.1 Přítomnost ethylkarbamátu v potravinách a nápojích

Ačkoli neexistuje uzákoněná jednotná hodnota maximální možné koncentrace EC přítomného v potravinách a nápojích, a to ani v těch rizikových, tak některé země si vydaly vnitrostátní doporučení maximálního množství EC přítomného ve vybraných alkoholických nápojích (Tabulka 1). Prvním takovým státem byla v roce 1985 Kanada, jejíž limity se pohybovaly od 30 µg/l pro vína, až do 400 µg/l pro ovocné pálenky [2]. Česká republika ji následovala a zvolila stejné limity, kterými se řídila až do roku 2012 [9]. Tato vyhláška byla zrušena a nyní není stanoven závazný kontrolní limit. V současné době platí vyhláška Evropské komise z roku 2010 [10], která je však benevolentnější a u lihovin vyrobených z peckovin doporučuje dodržení maximálního limitu 1000 µg/l.



Obrázek 2: Metabolické cesty ethylkarbamátu.

Tabulka 1: Maximální doporučené koncentrace EC v alkoholických nápojích pro vybrané země [2].

Země	Koncentrace [µg/l]				
	Víno	**Fortifikované víno**	**Destilované lihoviny**	**Saké**	**Ovocná pálenka**
Francie	—	—	150	—	1000
Německo	—	—	—	—	800
Kanada	30	100	150	200	400
USA	15	60	—	—	—

JECFA provedla v roce 2005 výzkum zabývající se množstvím EC přítomného v běžných potravinách a nápojích. Analyzované vzorky přitom byly rozděleny do několika skupin dle jejich charakteru. Velmi vysoké koncentrace EC (přes 6000 µg/kg) byly nalezeny ve skupině likérů a brandy. Vzorky potravin obecně vykazovaly nízké hodnoty dosahující obvykle jen jednotek µg/kg. Výjimkou byly vzorky sójových omáček, kde maximální hodnota dosahovala až 84 µg/kg. Tento výzkum však zahrnoval velmi málo vzorků, a proto bylo stále třeba provést rozsáhlejší studii týkající se obsahu EC v různých potravinářských výrobcích. Toho si byl vědom i Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), který po přeřazení EC do skupiny 2A vydal výzvu k předložení bližších údajů o jeho obsahu v potravinách a nápojích. Sedm členských států EU na tuto výzvu odpovědělo a předložilo výsledky zahrnující analýzy za roky 1998 až 2006. EFSA zároveň obdržela výsledky i od Úřadu pro kontrolu lihovin v Ontariu (Kanada) a Kalifornského vinařského institutu (USA) zahrnující analýzy řady alkoholických nápojů, které byly buď přímo vyráběné v Severní Americe, nebo do ní byly dovážené z členských států EU. Jak se očekávalo, zvláště vysoké koncentrace EC byly shledány u lihovin z peckového ovoce. Celkem bylo analýze podrobeno přes 3 000 vzorků pálenek pocházejících z minimálně 18 zemí světa (u některých vzorků nebyl jejich původ znám). Nejvíce vzorků (2698) pocházelo z Německa, z nichž 90 % obsahovalo EC s průměrnou koncentrací 863 µg/kg. Ze 477 francouzských vzorků jich 97 % obsahovalo EC nad detekčním limitem, a to s průměrem 1 357 µg/kg. Rakousko poskytlo 197 vzorků, z nichž 81 % obsahovalo EC s průměrnou koncentrací 962 µg/kg. Z 69 italských vzorků jich 87 % obsahovalo průměrně 250 µg/kg. Co se týče tuzemských pálenek, tak bylo analyzováno celkem 83 vzorků. EC byl přitom nalezen v 76 % a to s průměrnou hodnotou 521 µg/kg.

Mimo pálenek bylo testováno i několik vzorků různě stupňovitých piv pocházejících z 23 zemí světa. Tyto vzorky vykazovaly obecně velmi nízké množství ethylkarbamátu, kromě jednoho vzorku z Belgie, který překročil 30 μg/kg. Koncentrace EC byla dále studována u klasických i fortifikovaných (dolihovaných) vín. Fortifikovaná vína obsahovala výrazně více EC (100−400 μg/kg), než vína klasická. Koncentrace u bílého a červeného vína dosahovala maximálně 30 μg/kg. V růžovém víně pak EC dokonce vůbec nebyl detekován. Do poslední skupiny lihovin byly zařazeny vzorky pestré škály alkoholických nápojů, jako je brandy, gin, různé likéry, rum, vodka a whisky. Víc jak 10 % těchto vzorků překročilo 100 μg/kg a necelé 1 % dokonce dosáhlo hodnoty 1000 μg/kg. Potravinářské výrobky měly převážně nedetekovatelné hladiny EC. Výjimkou byly vzorky kvasnicového extraktu (41 μg/kg) a octa (33 μg/kg), a dále vzorky chleba či kysaného zelí, jež trvale vykazovaly nízké, avšak detekovatelné koncentrace lehce nad 10 μg/kg [2].

1.2.2 Mechanismus vzniku ethylkarbamátu v potravinách a nápojích

EC je vzhledem ke své karcinogenitě považován za kontaminant potravin a nápojů. Z tohoto důvodu je tedy třeba eliminovat jeho vznik v těchto produktech, či jeho koncentraci alespoň cíleně snižovat. Abychom toho ale dosáhli, je nejprve třeba znát mechanismus jeho vzniku. Bylo zjištěno, že největší vliv na tvorbu EC v potravinářských výrobcích má jejich povaha, výrobní proces a prekurzory dostupné v daných surovinách, z nichž může být EC produkován. Takovými prekurzory je například kyselina kyanovodíková, močovina, citrulin, kyanogenní glykosidy a další sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové (karbamoyl sloučeniny). Obecně řečeno, EC může v potravinách a nápojích vznikat jak metabolickou aktivitou mikroorganismů během fermentace, tak i chemickou reakcí substrátů. Tvorba může být navíc urychlena tepelným zpracováním, přítomností přechodných kovů, podmínkami skladování, nízkým pH a UV zářením [11,12].

1.2.2.1 Vznik ethylkarbamátu během fermentace

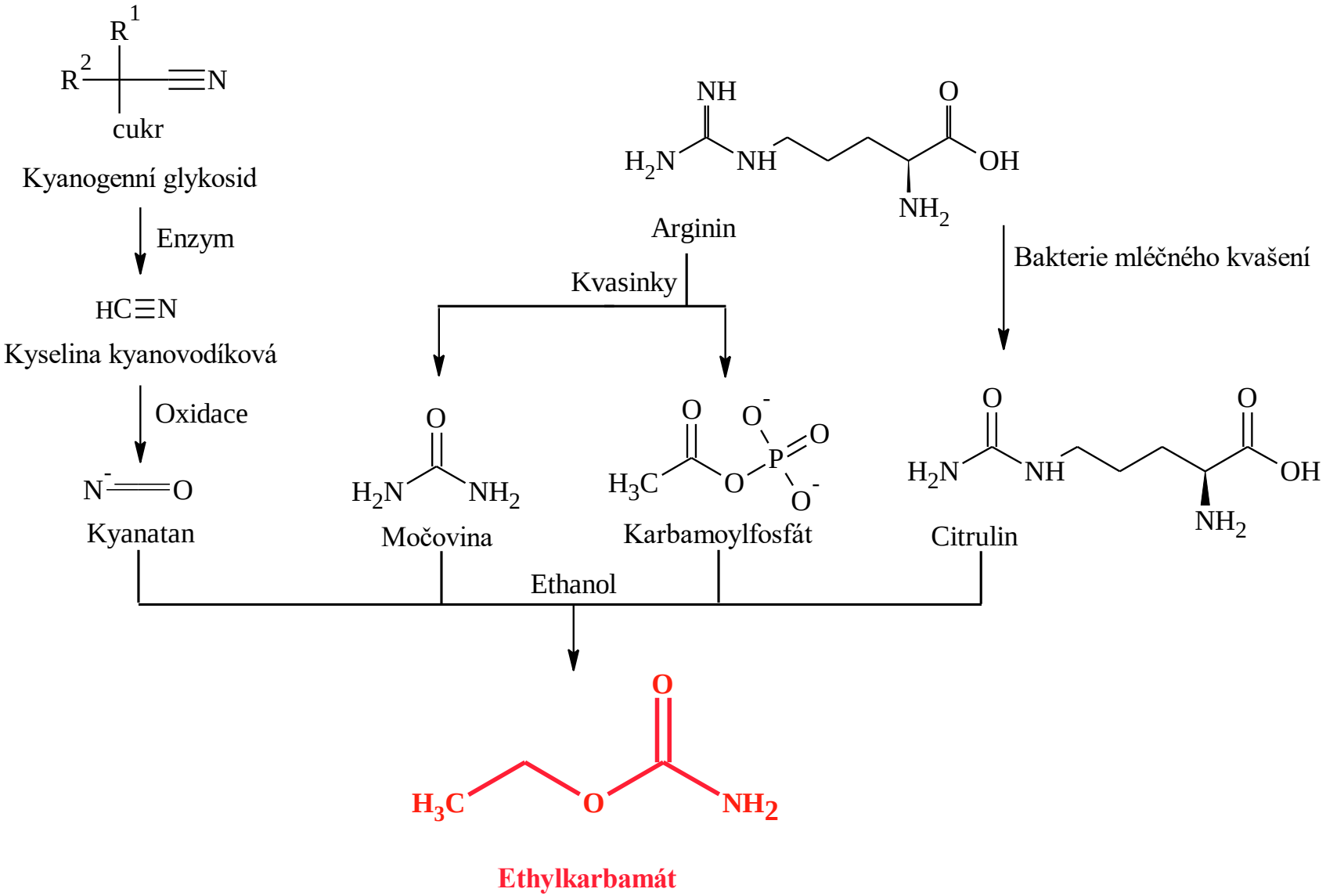
Mnoho prekurzorů EC, včetně kyanogenních glykosidů, močoviny, argininu a citrulinu, se může přirozeně generovat během fermentace (Obrázek 3), a tím ovlivnit tvorbu ethylkarbamátu. Přítomnost prekurzorů EC však závisí na povaze mikroorganismu použitého při fermentaci.

Některé kvasinky a bakterie běžně používané pro fermentaci mohou měnit koncentrace prekurzorových sloučenin EC. Typickým příkladem je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae,*

která katabolizuje aminokyselinu arginin na močovinu, jež následně reaguje s ethanolem za vzniku EC. Právě touto reakcí vzniká EC v potravinářských výrobcích nejčastěji. Tato kvasinka mimo jiné produkuje i další prekurzor EC, karbamoylfosfát. Ten po reakci s ethanolem opět poskytuje EC.

Další přirozený způsob syntézy EC je enzymatická hydrolýza různých kyanogenních glykosidů, jako je například amygdalin, při níž vzniká kyanid. Ten se dále oxiduje na kyanát reagující s ethanolem za vzniku EC. Kyanogenní glykosidy jsou nejdůležitějším prekurzorem EC právě v ovocných pálenkách, jelikož jsou obsaženy především v jádrech peckového ovoce. Jejich významné množství však obsahují i obiloviny, cukrová třtina či maniok.

Ethylkarbamát může být syntetizován i některými druhy bakterií během bakteriální fermentace. Typickým příkladem je mléčné kvašení, kdy bakterie mléčného kvašení přeměňuje jednoduché cukry na kyselinu mléčnou, a jablečno-mléčné kvašení, při němž bakterie mléčného kvašení přeměňuje kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou. Jablečno-mléčné kvašení je zvláště důležité pro výrobu červeného vína, který je tímto procesem mikrobiologicky stabilizováno, je snížena jeho kyselost a zároveň je zvýrazněno aroma. Během jablečno-mléčné fermentace bohužel dochází i k tvorbě EC. Bakterie *Lactobacillus brevis* například metabolizují arginin na aminokyselinu citrulin, která pak reaguje s ethanolem za vzniku EC. Tuto reakci katalyzují tři enzymy: arginindeiminása, ornitintranskarbamyláza a karbamátkináza. Důležitým parametrem bakteriální fermentace je ale slanost produktu, která může významně ovlivnit, jak bakteriální kmeny metabolizují prekurzory ethylkarbamátu [12,13].



Obrázek 3: Prekurzory a mechanismus vzniku EC.

1.2.2.2 Vznik ethylkarbamátu destilačním procesem

Destiláty mají často vyšší koncentrace EC než jiné alkoholické nápoje. Jejich nejvýznamnějším prekurzorem je kyanid. Jelikož je ethanol substrátem při tvorbě EC, může mít vyšší procento ethanolu v destilovaných lihovinách samo o sobě za následek zvýšené koncentrace EC. Je však třeba zároveň posoudit, zda tvorbu EC nepodporuje i samotný destilační proces. Srovnání vzorků destilovaných lihovin z různých lihovarů ukázalo, že typ destilačního procesu je zřejmě hlavním zdrojem rozdílů v koncentracích EC. Zvláště vysoké koncentrace EC byly nalezeny v lihovinách destilovaných s měděným chladičem. Bylo zjištěno, že se kovová měď (Cu^0) může při vysokých teplotách v kyselém prostředí oxidovat na Cu^{II+}, a tak dochází ke styku mědnatých iontů s konečným destilátem, kde katalyzují jak tvorbu kyanátu, tak i reakci kyanátu s ethanolem za vzniku EC (rovnice 1) [6].

(1)
$$2\ Cu^{II} + 4\ CN^- \rightarrow 2\ Cu(CN)_2$$

$$2\ Cu(CN)_2 \rightarrow 2\ CuCN + C_2N_2$$

$$C_2N_2 + 2\ OH^- \rightarrow NCO^- + CN^- + H_2O$$

$$NCO^- + CH_3CH_2OH + H^+ \rightarrow CH_3CH_2OCONH_2$$

1.2.2.3 Vznik ethylkarbamátu z aditiv

Pro zvýšení trvanlivosti či zlepšení vzhledu a chuti se do potravin a nápojů přidávají potravinářská aditiva. Jedním z aditiv je například azodikarbonamid (ADA), který se používal v pekárenském průmyslu pro zlepšení struktury a pevnosti chlebového těsta. I když ve srovnání s jinými potravinami a nápoji chleba neobsahuje vysoké koncentrace EC, tak je kvůli jeho vysoké spotřebě považován za jeho potenciální zdroj. ADA byl také používán jako tzv. nadouvadlo ve vložkách uzávěrů pivních lahví. Bylo však dokázáno, že ADA vede (zejména ve vodně-alkoholickém prostředí) k tvorbě EC. Doposud však nebylo určeno, zda je EC v chlebu tvořen přímo z rozkladných produktů ADA nebo zda ADA vytváří pouze podmínky, které podporují tvorbu EC z jiných prekurzorových sloučenin. ADA se především rozkládá na oxid dusný a uhelnatý spolu s menším množstvím oxidu uhličitého a amoniaku. Suchým rozkladem při 190 °C se může také tvořit kyanurová kyselina, která je rovněž prekurzorem EC. Vznikají z něj i netěkavé složky jako je urazol, což je další prekurzor EC. Nicméně použití ADA jako potravinářské přídatné látky je v Evropské unii zakázáno [6, 12, 14, 15].

Další potravinářskou přísadou a zároveň známým prekurzorem je diethylkarbonát, který se přidává do potravin a nápojů jako stabilizátor, a zabraňuje tak mikrobiálnímu kažení. Jeho reakcí s amoniakem vzniká EC (rovnice 2) [6, 16, 17].

(2) $$(CH_3CH_2O)_2CO + NH_3 \rightarrow CH_3CH_2OCONH_2 + CH_3CH_2OH$$

1.2.2.4 Vznik ethylkarbamátu skladováním

Koncentrace EC se může během skladování výrazně zvýšit, hlavně pokud jsou potravinářské výrobky skladovány při zvýšené teplotě. Vliv různých podmínek skladování na koncentraci EC přítomného v některých alkoholických nápojích byl zkoumán již mnoha autory. V jedné studii byly vzorky červeného a bílého vína skladovány při 43 °C po dobu 12 měsíců a bylo zjištěno, že se množství EC po této době zvýšilo až 30x [18]. Wu a kol. dělali obdobné pokusy se vzorky vína ze žluté rýže. Když byly tyto vzorky uchovávány při teplotě 37 °C po dobu 400 dnů, koncentrace vzrostly ze 74 na 509 µg/l, zatímco u vzorků skladovaných při 4 °C došlo ke zvýšení pouze o 10 µg/l [19].

Vystavení potravinářských výrobků světlu nebo UV záření během jejich skladování může rovněž ovlivnit tvorbu EC. Koncentrace EC ve vzorku lihovin vyrobených z peckovin vzrostla průměrně o 1 300 µg/l po pouhých 4 hodinách přímého UV záření [20]. Mírnější nárůst EC (cca o 20 %) byl pak zjištěn v lihovinách vyrobených z cukrové třtiny, které byly vystaveny okolnímu světlu po dobu 6 měsíců [21].

Při tvorbě EC může hrát roli také proces zrání (stažení) lihovin v dřevěných sudech. Dřevo totiž obsahuje lignin, který podporuje tvorbu EC. Vliv ligninu byl sledován na modelovém roztoku destilátu, ke kterému byl přidáván lignin. Bylo zjištěno, že koncentrace EC se s dobou skladování i s množstvím přidaného ligninu zvyšuje. V kontrolním modelovém roztoku destilátu bez přidaného ligninu přitom vznikalo pouze malé množství EC [22]. Koncentrace EC v obilných lihovinách, švestkové víně a brazilském rumu se může během zrání v sudech zvýšit až o šestinásobek jejich počáteční koncentrace [22, 23]. Například ve švestkovém víně nezrajícím v sudech byly koncentrace EC průměrně 80 µg/l. Pokud však toto víno v dřevěných sudech zrálo, koncentrace EC byla průměrně 300 µg/l [12, 22].

1.2.3 Možnosti snížení tvorby ethylkarbamátu v alkoholických nápojích

1.2.3.1 Vstupní ingredience

Kontrola kvality surovin je důležitá pro dosažení nízké koncentrace EC v potravinářských výrobcích. Příkladem může být použití příliš zralého ovoce pro výrobu pálenek. Přezrálé ovoce totiž obsahuje zvýšenou koncentraci argininu, což následně vede k vyšší koncentraci EC v konečném produktu. Problémem je i třeba nadměrné hnojení, které vede k vyššímu obsahu dusíku v zemědělských produktech, což rovněž zapříčiňuje vyšší koncentrace EC. Množství dusíku by proto mělo být před fermentací vždy kontrolováno, případně by se měla změnit strategie hnojení zemědělské půdy [12, 24].

1.2.3.2 Vypeckování ovoce

Zvýšená koncentrace EC v pálenkách z peckovin je zapříčiněna především přítomností kyanatanu v peckách. Ve studii v Německu měly lihoviny z malých lihovarů obecně vyšší koncentrace EC než ty z velkých lihovarů. Tento rozdíl může souviset s používáním správných výrobních postupů ve větších provozech, jako je například odstraňování pecek z peckovin před vlastním procesem kvašení [20]. Schehl a kolektiv testovali, do jaké míry je odstranění pecek účinné pro redukci tvorby EC. Vyrobili proto třešňové a švestkové destiláty ve dvou provedeních: v jedné šarži byly během fermentace pecky přítomny, v druhé šarži bylo použité ovoce před fermentací vypeckováno pomocí drtícího a odpeckovacího stroje, v němž je ovoce pasírováno přes síto. Jejich výsledky však nebyly průkazné, jelikož koncentrace EC byly (bez ohledu na typ ovoce) v obou šaržích pod limitem kvantifikace. Další pálenku ale vyrobili ze zbylého výlisku obsahující zejména pecky a malé množství dužiny. Množství EC v této pálence dosahovalo až 3 100 μg/l a pálenka navíc obsahovala i zvýšené koncentrace kyanatanu. Přesto, že je odpeckování jednoduchá a levná metoda, jak snížit množství EC v konečném výrobku, není často využívaná. Kromě časové náročnosti se vypeckováním totiž ztrácí i specifická chuť nápoje [12, 25].

1.2.3.3 Přidání enzymů

Přidáváním určitých enzymů do potravin a nápojů můžeme snížit množství prekurzorů EC, a tedy i koncentraci EC ve finálním produktu. Takovým enzymem může být například ureáza, která přeměňuje močovinu na CO_2 a amoniak, čímž snižuje její množství až o 95 % [26, 27]. Ureáza byla poprvé izolována v roce 1975 z fazolí rodu *Canavalia ensiformis*. Její maximální

aktivita byla detekována při pH 6,5−7,5, naopak v kyselém prostředí byla tato ureáza inaktivní. Vzhledem ke kyselé povaze kvasů (rmutů) bylo proto její použití v kvasném průmyslu obtížné. Z tohoto důvodu byla ureáza následně izolována z bakterie *Lactobacillus fermentum*. Tato ureáza vykazuje maximální aktivitu při pH 4, je nyní komerčně dostupná a její použití je povoleno například při výrobě červeného vína [6].

1.2.3.4 Geneticky upravené kvasinky

Pomocí moderního genetického inženýrství či tradičních šlechtitelských technik byly některé metabolické cesty kvasinek upraveny tak, aby produkovaly méně prekurzorů EC. Jednou z nejvíce používaných technologií, která je schopná modifikovat cílové geny v kvasinkách nebo bakteriích, je metoda CRISPR-Cas9. Touto technologií byl v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* odstraněn například gen CAR1, který kóduje enzym arginázu, čímž se zabrání metabolické přeměně argininu na močovinu. V experimentech využívajících k fermentaci vína a lihovin takto geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae* byla tvorba EC snížena až o 70 % [28, 29]. Geny se obecně mohou vyskytovat v různých formách. Konkrétní formy genu se nazývají alely. Pokud byla k výrobě rýžového vína použita kvasinka, v níž byla odstraněna pouze 1 alela genu CAR 1, snížilo se množství EC o 20 %. Odstraněním obou alel se pak množství EC ve výsledném produktu snížilo až o 74 % [30]. Genetické inženýrství bylo také použito k odstranění proteinů transportující močovinu, což má za následek akumulaci močoviny v buňce, kde může být následně degradována [31]. Nemůže se tedy účastnit reakcí, během nichž by mohl EC vznikat. Použitím takto upraveného kmene kvasinek, bylo tedy rovněž dosaženo snížení koncentrace EC ve výrobku [12].

1.2.3.5 Způsob destilace

Ačkoli ionty mědi mohou syntézu EC v destilátech podporovat (viz. kapitola 1.2.2.2), taky mohou za určitých podmínek zároveň i potlačovat. Eliminace prekurzorů EC, a to hlavně kyanidů a měďnatých iontů, lze dosáhnout během destilace pomocí katalyzátoru s měděnou výplní, jehož úkolem je navázání kyanidů dřív, než přejdou do destilátu. Pokud však není možně použit měděný katalyzátor, je potřeba do kvasu před destilací přidat činidla obsahující jednomocné ioty mědi (Cu^{I}), které vážou kyanidy. Dalším aspektem v destilační aparatuře vedoucím k zabránění tvorbě EC je použití chladiče z nerezové oceli [6].

Snížení množství EC v destilovaných lihovinách lze také dosáhnout frakční destilací. Dochází k oddělení jednotlivých frakcí. Jímají se tři frakce, a to úkap, prokap (jádro) a dokap.

Nežádoucí nebo dokonce toxické složky, včetně methanolu, se objevují na začátku (úkap) a na konci (dokap) destilačního procesu. Frakce mezi těmito dvěma konci (prokap) je nejžádanější s ohledem na kvalitu a čistotu. Při analýze EC v těchto třech hlavních frakcích bylo zjištěno, že průměrná koncentrace EC v úkapu dosahuje 60 000 µg/l, v dokapu 1600 µg/l, zatímco v prokapu pouhých 50 µg/l [32].

Z tohoto důvodu bylo doporučeno prodloužit dobu destilace a také provést vícenásobnou destilaci. Ve studii Silva a kol. byly koncentrace EC v jednou destilovaných lihovinách cca 60 µg/l. Tyto lihoviny byly následně znovu dvakrát destilovány, čímž došlo k redukci množství EC na nedetekovatelné koncentrace [33]. Tyto závěry potvrzuje i jiná studie, v níž bylo prokázáno, že dvojitou destilací dochází k odstranění 95 % EC [34].

1.2.3.6 Post-destilační odstranění měďnatých iontů

V některých destilovaných nápojích mohou měďnaté ionty dosahovat koncentrace až 10 mg/l. Jelikož měďnaté ionty ve vodně-alkoholickém prostředí působí jako katalyzátor při tvorbě EC, je třeba je odstranit. Jednou z možností je použití nerozpustných chelatačních činidel nebo katexových (měniče kationtů) [35] či anexových (měnič aniontů) [36] pryskyřic, kterýma sice dojde ke snížení kyanidových (<0,1 mg/l) a měďnatých iontů (<0,1 mg/l), ale organoleptické vlastnosti pálenek se zhorší. Tyto metody jsou navíc poměrně obtížné a závisí na pH, době kontaktu s pryskyřicí, teplotě a velikosti částic pryskyřice. Z tohoto důvodu byla vyvinuta nová metoda založená na přidání uhličitanu vápenatého nebo hořečnatého jako katexu, čímž se koncentrace měďnatých iontů sníží pod <0,01 mg/l, přičemž organoleptické vlastnosti zůstanou beze změny [6, 36].

1.2.3.7 Konzervační látky, vhodné podmínky skladování

Konzervanty obecně inhibují růst mikroorganismů, čímž potažmo mohou snížit vznik EC. Příkladem je široce používaný a bezpečný konzervant disiřičitan draselný, jehož použitím došlo ve švestkovém víně ke snížení EC o přibližně 30 % [37].

Vzhledem k tomu, že vysoké teploty a vystavení světlu a UV záření může urychlit tvorbu ethylkarbamátu (viz. kapitola 1.2.2.4), je třeba kontrolovat podmínky skladování hotových produktů. Maximální skladovací teploty však ještě stále nebyly stanoveny [12].

1.3 Metody stanovení ethylkarbamátu v potravinách a nápojích

Pro analýzu EC bylo vyvinuto již několik specifických analytických technik kombinovaných s různými metodami úpravy vzorků. Každá z nich má své výhody, ale i omezení. Nejčastěji se pro stanovení EC používá plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Méně často pak infračervená spektrometrie, povrchem zesílený Ramanův rozptyl, amperometrický biosenzor, enzymatické kaskádové reakce ve spojení s UV/VIS spektrometrií a imunoanalýza [38].

1.3.1 Plynová chromatografie

Naprosto nejvyužívanější technikou pro analýzu EC je plynová chromatografie (GC), často ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Plynová chromatografie slouží k separaci látek, které jsou následně detekovány pomocí hmotnostního spektrometru a identifikovány na základě fragmentace iontů. V několika posledních letech pokračují snahy o zlepšení citlivosti a specifičnosti GC-MS techniky, a proto se přechází od používání jednoduchého kvadrupólového analyzátoru na trojité kvadrupólové tandemové hmotnostní spektrometry (GC-MS/MS), které mají nejen vyšší citlivost, ale díky fragmentaci analytu poskytují i vyšší spolehlivost v jeho identifikaci a stanovení.

Bez jakékoli předchozí izolace EC ze vzorku či jeho zakoncentrování před vlastní chromatografickou analýzou je GC-MS však použitelná pouze pro vzorky s dostatečně vysokými koncentracemi EC a s jednoduchou matricí. Předúprava vzorků je proto nezbytnou součástí stanovení EC pomocí této techniky. Pro tyto účely se nejčastěji zařazují extrakční techniky, jako je extrakce kapalina-kapalina, extrakce na tuhé fázi či mikroextrakce na tuhé fázi [38].

1.3.1.1 Předúprava vzorku ke GC analýze

- **Extrakce kapalina-kapalina**

Extrakce kapalina – kapalina (LLE) je založena na distribuci analytů mezi 2 nemísitelné kapaliny. LLE je poměrně široce použitelná a je snadná na obsluhu. Má ovšem i své nevýhody, mezi něž se řadí časová náročnost, velká spotřeba vzorků a organických rozpouštědel a potřeba manuální práce operátora.

K extrakci EC se obvykle používají organická rozpouštědla, jako je chloroform, dichlormethan, diethylether a ethylacetát [39-41]. Aby byly potlačeny interference matrice,

tak je možně LLE doplnit o některé další čisticí kroky. Lze použít k čištění LLE extraktu kolonu s náplní Florisil a eluát poté ještě zahustit na odparce [42]. Pro odstranění nepolárních interferentů lze roztoky vzorků nejprve promýt nepolárními rozpouštědly, jako je n-pentan nebo hexan, a teprve poté provést extrakci analytu [43].

Podmínky LLE extrakce je však třeba vždy optimalizovat, jelikož její výtěžnost může ovlivnit mnoho faktorů, jako je pH roztoku, přidání solí (tzv. vysolovací efekt), doba třepání a teplota. Při použití chloroformu pro extrakci EC ze vzorku rýžového vína, které bylo předem zneutralizováno na pH 9, se například výtěžnost extrakce zvýšila téměř čtyřikrát, pokud byl k extrakci přidán chlorid sodný (čímž byla ovlivněna iontová síla) [41].

Vliv pH vzorku na výtěžnost extrakce EC byl zkoumán mnoha autory [40, 41, 43-47]. EC se za kyselých podmínek snadno přeměňuje na ionizovanou formu, což má za následek snížení distribuce analytu v organické fázi. Za hodně kyselých či alkalických podmínek je pak EC hydrolyzován [44]. Slabě alkalické pH (pH 7–9) je tedy optimální pro dosažení maximálního výtěžku extrakce [38, 39].

Pro zvýšení citlivosti a selektivity byla tradiční LLE metoda také kombinovaná s derivatizací EC, případně byly použity její modernější modifikace. Derivatizace EC pro GC-MS analýzu je obvykle založená na silylaci, kdy je EC ze vzorků nejprve extrahován, poté dehydratován a zakoncentrován pod proudem dusíku. Zakoncentrovaná směs je následně silylována, například pomocí bis(trimethylsilyl) trifluoracetamidu za katalýzy pyridinem [43]. Derivatizaci je možné provést i před LLE extrakcí, jen se využívají jiná než silylační činidla, a to například 9-xanthydrol [48].

Kromě klasické LLE byla k extrakci EC z fermentovaných potravin vyvinuta a validována i modernější metoda tlakové kapalinové extrakce (PLE) [49], která je vysoce efektivní z hlediska spotřebovaných rozpouštědel, krátké extrakční doby a práce operátora [50]. Extrakci cílového analytu a zároveň odstranění potenciálních interferentů pomocí adsorbentů v extrakční cele pak kombinuje metoda selektivní PLE (SPLE) [51, 52]. Tato technika nevyžaduje tolik kroků přípravy vzorku jako tradiční LLE a její výtěžnost dosahuje 98–107 % [49].

- **Extrakce tuhou fází**

U extrakce tuhou fází (SPE) procházejí kapalné vzorky kolonkou naplněnou vhodným sorbentem, na němž jsou zachyceny příslušné analyty, které jsou po promytí kolonky

následně eluovány vhodnými organickými rozpouštědly [53]. Eluát je možné následně zakoncentrovat či rozpouštědlo úplně odpařit pomocí rotační vakuové odparky nebo pod proudem dusíku.

Pro analýzu EC byla SPE aplikována na různé vzorky, jako jsou například octy [46], čínské likéry [54], vína [55], sója či kimči [56, 57]. Pro zvýšení výtěžnosti SPE je nezbytné vzorek před vlastní aplikací na kolonku neutralizovat. Ubeda a kol. uvedli, že odezva píku analytu se po neutralizaci octů zvýšila dvakrát, a zlepšil se i píku [46]. Podobný výsledek byl získán u čínského likéru, který se rovněž vyznačuje nízkým pH [54].

- **Mikroextrakce tuhou fází**

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je nejběžnější technika používaná pro extrakci EC z fermentovaných potravin a alkoholických nápojů. Principem je sorpce analytu ze vzorku na křemenné vlákno, které je po ukončení sorpce zavedeno většinou do dávkovače plynového chromatografu, kde dojde k tepelné desorpci zachycených analytů. SPME je tedy založena na ustanovení rovnováhy analytu mezi stacionární fází ukotvené na vlákně a vzorkovacím mediem. Extrakci je nutné optimalizovat, jelikož je ovlivněna řadou faktorů, jako je pH, teplota, míchání, iontová síla roztoku, obsah alkoholu či doba extrakce. Obecně lze říct, že neutrální pH roztoku vzorku, nižší obsah alkoholu, vyšší teplota extrakce a delší doba extrakce přispívají k vyšší účinnosti SPME. Tato technika je jednoduchá, časově nenáročná a lze ji provádět bez rozpouštědel, což nahrává trendu tzv. „zelené chemie“ [58-60].

Headspace mikroextrakce na tuhou fázi (HS-SPME) je extrakční technika vycházející z SPME, která je založená na sorpci EC z prostoru nad vzorkem na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno. HS-SPME je vhodná především pro kapalné vzorky, jako jsou například klasická vína, saké [61], rýžová vína [62], fortifikovaná vína [63] či pálenky z peckovin [38,45]. Pro extrakci EC z pevných vzorků je méně vhodná, protože mají větší odpor proti přenosu hmoty do plynné fáze. Složení vzorku přitom ovlivňuje přenos EC z matrice do jeho headspace prostoru (prostor nad vzorkem) [64]. Pro snížení vlivu matrice lze použít vícenásobné HS-SPME. Tato technika vykazuje schopnost úplně extrahovat EC z matrice vzorku [65, 66].

1.3.1.2 GC analýza EC

Tato metoda byla použita v řadě výzkumů pro stanovení EC ve fermentovaných potravinách (sójové omáčky, octy) a nápojích (pivo, víno, lihoviny, likéry). Standardně je vzorek

nadávkován do injektoru, jehož teplota se pohybuje mezi 200–220 °C, dále je unášen nosným proudem (héliem) při průtoku 1–1,5 ml/min na kapilární kolonu s vhodnou stacionární fází (například polyethylenglykol), kde dochází k separaci. Při separaci se používá teplotní gradient, kdy počáteční teplota termostatu je 40–70 °C a stoupá k 200–220 °C. Doba separace se pohybuje mezi 10–20 minutami. Ke kvalitativní analýze se při GC-MS využívají ionty s *m/z* (hmotnost ku náboji) 89, 74 a 62. Pro kvantifikaci EC se používá metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard může být použit propylkarbamát (PC) nebo butylkarbamát (BC). Nejintenzivnějším iontem v hmotnostním spektru EC, PC i BC je ion *m/z*=62, který je charakteristický pro karbamáty [6, 41, 67, 68].

1.3.2 Kapalinová chromatografie

Jelikož je před GC-MS analýzou EC vždy nutné provést jeho izolaci ze vzorku, což významně prodlužuje celkový čas potřebný k jeho stanovení, je k analýze EC využívaná vysokoúčinná kapalinovou chromatografie spojená často s fluorescenčním detektorem (HPLC-FLD). Tato metoda je vhodnější pro rutinní použití, jelikož nevyžaduje žádné kroky extrakce či zakoncentrování, což zkracuje dobu analýzy na méně než hodinu. Obě techniky přitom poskytují srovnatelné výsledky [38, 69].

1.3.2.1 Příprava vzorku k HPLC analýze

EC je ale sloučenina, která ve své struktuře neobsahuje žádný chromofor ani fluorofor, a je jí třeba tedy derivatizovat. Nejvíce používaným derivatizačním činidlem je 9-xanthydrol, který byl pro tyto účely poprvé popsán až v roce 2002 [70], přestože se k derivatizaci EC používal již mnohem dříve, avšak ve spojení s GC-MS [71]. Derivatizace může být prováděna v chromatografickém systému (online) nebo mimo něj (offline), nicméně téměř všechny studie používají předkolonovou derivatizaci v off-line provedení. Použité činidlo je specifické pro aminové a amidové skupiny a mechanismem derivatizace je nukleofilní substituční reakce. Kvůli dobré reaktivitě 9-xanthydrolu s primárními amidy je s výhodou používán pro současnou detekci EC a močoviny, hlavního prekurzoru EC, ve fermentovaných potravinách [72, 73]. Derivatizační činidlo připravené rozpuštěním potřebného množství 9-xanthydrolu v 1-propanolu je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováváno ve tmě a při teplotě nižší než 0°C. Samotná derivatizační reakce se obvykle provádí za tmy a v kyselém prostředí (HCl) za vzniku ethyl-*N*-xanthylkarbamátu (XEC) [70]. Kinetika tvorby EC derivátu závisí na mnoha faktorech, jako je pH, slanost vzorku či přítomnost interferentů [74, 75]. V silně

kyselém médiu (pH < 1) je reakční doba krátká, ale reakce poskytuje méně stabilní deriváty. Ajtony a spol. sledovali stabilitu XEC, pro jejichž syntézu byly použity roztoky vzorku okyselené na pH 0,94; 1,24 a 1,94. Nejrychleji docházelo k rozkladu XEC v nejvíce kyselém prostředí (63 % za hodinu), zatímco nejpomaleji se rozkládal při pH 1,94 (3 % za hodinu). Jelikož nižší hodnota pH podporuje degradaci vzniklého derivátu, doporučuje se nahradit kyselinu chlorovodíkovou slabšími kyselinami nebo tlumivým roztokem, například fosfátovým pufrem s nízkým pH. Právě s použitím fosfátového pufru o různém pH (pH 2–2,5) byla pozorována rychlost reakce a stabilita XEC po 12, 16 a 48 hodinách. Studie potvrdila, že při vyšším pH je reakce pomalejší, ale za to poskytuje stabilnější deriváty [74]. Stabilitu výsledného XEC tedy nelze přesně definovat. Některé studie uvádí, že je stabilní až 12 hodin [76], jiné tvrdí, že se rozkládá již po dvou hodinách [75]. Vždy totiž záleží na charakteru vzorku a derivatizačních podmínkách.

Bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem alkoholu ve vzorku roste i výtěžek XEC derivátu, přičemž maximální plocha píku byla získána při 38–42 % alkoholu [77]. Nicméně Zhang a kol. (2014) však získali zcela odlišný výsledek a uvádí, že výtěžek XEC klesá se zvyšujícím se obsahem alkoholu [73]. Je tedy nutné dodržet stejné podmínky derivatizace (% alkoholu) u vzorků i u standardů. Dle typu analyzovaného vzorku pak autoři volili 20 % [70], 24 % [78], 40 % [77] nebo i 50 % [74] a na tyto hodnoty pak upravili vzorky a derivatizační podmínky.

1.3.2.2 HPLC analýza EC

Separace EC pomocí HPLC probíhá v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Mobilní fáze je nejčastěji acetonitril (ACN) kombinovaný s octanem sodným. Na kvalitu píku a retenční čas látek má vliv pH, proto byla připravená mobilní fáze v rozmezí pH 6,5–7,6 a sledovala se retence XEC derivátu [77]. Při hodnotě pH 6,5 a 6,8 docházelo ke chvostování píku. Symetrický pík byl dosažen při pH 7,4 a 7,6 avšak analýza trvala zbytečně dlouho a byl zaznamenán vysoký šum základní linie. Hodnota pH 7,2 byla optimální, jelikož poskytovala kratší dobu separace a symetrický pík. Použití binárních systémů mobilní fáze založených na kombinaci methanol-voda a acetonitril-voda bez pufru vedlo k neuspokojivým výsledkům z důvodu asymetrie chromatografického píku a dlouhé retenční doby [70, 77, 78].

Pro chromatografickou separaci XEC se využívají oktadecylsilikagelové kolony, které mohou být spojené i s předkolonkami se stejnou stacionární fází. Teplota kolony při HPLC analýze nemá významný vliv na separaci a standardně se pohybuje v rozmezí 30–40 °C. Nejčastější

mobilní fází byla směs octanu sodného a acetonitrilu s průtokem od 0,8 ml/min po 1 ml/min. Gradienty začínaly na rozdílné koncentraci acetonitrilu (nejčastěji okolo 50 %) a měly různou strmost. Délka separace se pohybovala okolo 30–50 minut. Objem dávkovaného vzorku je 15 nebo 20 µl [70, 73-75, 77, 78].

K detekci XEC derivátu se často používá fluorescenční detektor o různých vlnových délkách excitace (λ_{ex}) a emise (λ_{em}). Zatímco excitační vlnové délky se ve studiích příliš neliší a pohybují se mezi 233–240 nm [70, 73-75, 79], emisní vlnové délky byly zvoleny buď kolem 300 nm [73-75] nebo 600 nm [70, 78]. Bylo sice prokázáno, že emisní maximum XEC je při 300 nm intenzivnější než při 600 nm [73-75], některé nečistoty však mohou při této vlnové délce interferovat, a proto je u některých vzorků výhodnější zvolit 600 nm [75].

Pro snížení interference matrice vzorku a zlepšení citlivosti byla ke stanovení EC v lihovinách či rýžovém nebo fortifikovaném víně použita i HPLC spojná s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) poskytující limit detekce (LOD) od 0,25 do 3 µg/kg [79-81]. Vzorky byly ale před samotnou analýzou rovněž derivatizovány 9-xanthydrolem [79], případně byly přečištěny pomocí SPE extrakce [80, 82] nebo mikroextrakce kapalina-kapalina [83]. K detekci EC v čínských rýžových vínech bez jejich jakékoliv úpravy pak byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie spojená s ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Ze všech analytických metod vyvinutých pro stanovení EC se se právě HPLC-MS dostala do popředí, a to díky své citlivosti, jednoznačné identifikaci a kvantifikaci EC ve stopových množství [82, 84].

1.3.3 Spektrometrické metody

Jak již bylo zmíněno, chromatografické metody mají sice vysokou citlivost, ovšem zahrnují i rozsáhlé a časově náročné úpravy vzorků. To komplikuje jejich použití v praxi, zejména v rutinních analýzách a při monitorování v terénu. Proto byla použita metoda infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), která byla často kombinovaná s vícerozměrnou analýzou dat. Byla studována spektra pálenek z peckovin v rozsahu 926–5011 cm^{-1} a bylo zjištěno, že pro EC je charakteristická oblast mezi 926 a 1878 cm^{-1}. FTIR sice není dostatečně robustní pro klasickou kvantitativní analýzu, ale je vyhovující pro rychlý screening (2 minuty na vzorek) a semikvantitativní analýzu [85]. Pomocí FTIR byl EC analyzován v moštech, vínech [86] i v pálenkách [85], a to bez jakékoliv předchozí úpravy vzorku.

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (NIR) při analýze vzorků často vykazuje nižší citlivost, což komplikuje stanovení stopových koncentrací EC. Proto EC ze vzorku je tedy nutné před jeho NIR analýzou zakoncentrovat pomocí SPE extrakce. Tato metoda je velmi dobře aplikovatelná na čisté standardy EC již od 100 µg/l, ale její použití na potraviny a nápoje s komplexní matricí je stále ještě omezené [87].

V posledních letech byla pro stanovení EC v kapalných vzorcích vyvinuta spektrometrická metoda povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), která poskytuje rychlé, reprodukovatelné kvalitativní i kvantitativní výsledky. SERS je citlivá metoda [88], avšak je významně ovlivněna matricí vzorku. Například při použití zlatých nanočástic potažených stříbrem (jako zesilovačů SERS) a charakteristického pásu při 1003 cm^{-1} bylo LOD EC pro vodku pouhých 0,8 µg/kg, zatímco pro ovocný destilát 11,6 µg/kg a pro bílý rum 6,9 µg/kg. Kromě toho byla odezva Ramanova spektra ovlivněna tloušťkou nanočástice [89]. Pomocí kvantových výpočtů byly přiřazeny všechny vibrační pásy charakteristické pro EC [90]. Nicméně ve všech studiích chybí informace o návratnosti metody a stabilitě povrchů SERS. Současný výzkum SERS je v oblasti chemické analýzy potravin a nápojů stále v počáteční fázi, a je třeba dále zkoumat a optimalizovat jeho aplikaci na skutečné komplexní matrice vzorků.

Pro stanovení EC v lihovinách byla využita i nukleární magnetické rezonance (NMR). Bohužel kvůli omezené citlivosti a interferenci matrice nelze EC přímo kvantifikovat, což omezuje použití NMR v tomto odvětví [91].

1.3.4 Enzymatické metody

Enzymově katalyzované reakce mají ve stopové analýze široké využití, jelikož jsou vysoce specifické, citlivé (LOD těchto metod se pro EC pohybují od jednotek µg/kg až po desítky µg /kg) a rychlé. Tím se dostávají do popředí zájmu zejména u fermentovaných potravin, které jsou charakteristické svým komplexním složením.

EC je znám svými inhibičními účinky na enzym acetylcholinesterázu. Proto mohl být stanoven kvantitativní vztah mezi hladinami EC a mírou inhibice aktivity acetylcholinesterázy, a tím následně odhadnout koncentraci EC v předložených vzorcích alkoholických nápojů [92].

EC může být také hydrolyzován enzymem urethanáza za vzniku amoniaku, jež je substrátem pro syntézu glutamátu katalyzovanou enzymem glutamátdehydrogenáza. Během procesu se

redukovaný nikotinamid adenindinukleotid (NADH) přeměňuje na svou oxidovanou formu (NAD^+). Změny hladiny NADH mohou být detekovány pomocí UV/VIS spektrofotometru a představují obsah EC v systému. Tato metoda je poměrně citlivá, přesná a s vysokou výtěžností mezi 96,7 % a 100,01 %. Rychlost této kaskádové reakce však byla výrazně ovlivněna pH reakčních roztoků a koncentrací urethanázy a glutamátdehydrogenázy [93]. Nedávno byl na tomto principu vyvinut i amperometrický biosenzor, v němž byla elektroda modifikovaná urethanázou a glutamátdehydrogenázou [94]. Tato metoda vykazovala vysokou citlivost, nízké náklady a úsporu času. Aby však mohla být použita pro rutinní analýzy, je stále nutné vyřešit vliv matrice na aktivitu enzymů a kompatibilitu optimálních reakčních podmínek pro oba použité enzymy [12].

1.3.5 Imunoanalýza

Pro stanovení XEC derivátu byla využita kompetitivní enzymová imunosorpční analýza (ELISA), která je založena na reakci antigenu a protilátky. Na základě struktury XEC byly navrženy syntetické antigeny nazývané také jako haptény, které byly následně navázány na nosné proteiny za získání imunogenů. Derivát vytvořený ve vzorku pak působil jako kompetitivní antigen. Vyrobená polyklonální protilátka dokázala citlivě a velmi specificky rozpoznat XEC (analogy XEC, jako je například xanthylakrylamid, či samotné činidlo 9-xanthydrol měly zanedbatelnou vazebnou schopnost na protilátku), čímž mohl být EC kvantifikován. I přes její specifičnost a vhodnost pro velkokapacitní analýzu se její praktické použití omezuje kvůli vysoké hodnotě LOD [12, 95].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

Chemikálie byly váženy na analytických digitálních váhách (Sartorius, Ústí nad Labem, ČR). Pro přípravu standardu a vzorků byly použity automatické pipety (Sartorius) a běžné laboratorní pomůcky (navažovací lodičky, lžičky, vialky, odměrné baňky, kádinky, odměrné válce a zásobní láhve na mobilní fázi). Samotná derivatizační reakce byla provedena v 1,5ml plastových mikrozkumavkách Eppendorf (Hamburg, Německo).

Před HPLC analýzou byla proměřena excitační a emisní spektra připravených derivátů na spektrofluorimetru FLUORAT-02-Panorama (Lumex, St. Peterburg, Rusko) a absorpční spektra na UV/VIS spektrofotometru UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

K vlastní analýze EC byl použit kapalinový chromatograf složený z vysokotlakých čerpadel LC-30AD, fluorescenčního detektoru RF-20A XS a degaseru DGU-20 A_5 (vše Shimadzu). K separaci byla použita kolona LUNA C18 o délce 150 mm, s vnitřním průměrem 3 mm a velikostí částic 3 µm (Phenomenex, Torrance, USA), která byla umístěna v termostatu kolon LCO 102 (Ecom, Praha, ČR). Dávkovací systém byl tvořen šesticestným ventilem s vnější dávkovací smyčkou o objemu 20 µl (Valco-Vici, Schenkon, Švýcarsko). Vzorky byly dávkovány mikrostříkačkou značky Hamilton o objemu 100 µl (Reno, USA).

Pro přípravu mobilní fáze se používala redestilovaná voda, která byla čištěná pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Darmstadt, Německo). Homogenizace mobilní fáze se prováděla pomocí magnetického míchadla Color Squid White (IKA, Staufen, Německo) a hodnota pH mobilní fáze byla měřena pomocí pH metru (827 pH Lab, Metrohm, Herisau, Švýcarsko). Mobilní fáze byla zbavena mechanických nečistot přefiltrováním přes nylonový membránový filtr o velikosti pórů 0,2 µm a průměru 47 mm (Supelco, Belfonte, USA). Připravené deriváty byly před analýzou filtrovány přes stříkačkový filtr s teflonovou membránou o velikosti pórů 0,45 µm a průměru 4 mm (Labstore, HPST, Praha, Česká republika).

2.2 Použité chemikálie

- Ethylkarbamát — Sigma-Aldrich, Německo
- 9-xanthydrol, 98 % — Sigma-Aldrich
- 1-propanol, 99 %, p.a. — Sigma-Aldrich
- Ethanol, 96 % — Lach-Ner, Neratovice, ČR

- Kyselina chlorovodíková, 35 %, p.a. Lach-Ner
- Kyselina octová, 99 % Penta, Praha, ČR
- Kyselina o-fosforečná, 85 %, p.a. Penta
- Fosforečnan sodný, 96 % Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný, p.a. Penta
- Acetonitril pro HPLC Sigma-Aldrich
- Octan sodný, p.a. Lach-Ner

2.3 Analyzované vzorky

2.3.1 Domácí ovocné pálenky

Celkem bylo analyzováno 21 domácích ovocných pálenek vyrobených mezi lety 2013 až 2021 v malých palírnách v ČR. Jednalo se o vzorky pocházející ze sedmi různých českých pálenic a jejich ovocný základ tvořily převážně švestky, třešně či hrušky. Byly však analyzovány i méně běžné pálenky, jejichž základem byly broskve, rybíz nebo jablka, a pak i pálenky vyrobené z minimálně dvou druhů ovoce či dokonce zeleniny, jako je například švestka-ryngle, hruška-mrkev a stařená pálenka vyrobená z neznámé směsi ovoce. Pro porovnání byly rovněž analyzovány i dva vzorky první destilační frakce (úkapu), která není určena ke konzumaci a měla by být z hlavního destilačního podílu vždy odstraněna. Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v tabulce 2. Množství alkoholu bylo známo pouze u dvou vzorků (č. 3 a 4) a pohybovalo se kolem 50 %.

Tabulka 2: Analyzované vzorky domácích ovocných pálenek včetně informací o jejich roku výroby a výrobci.

Číslo vzorku	Druh ovoce, procento alkoholu	Rok výroby	Výrobce
1	Švestka-tělo	—	—
2	Švestka-úkap	—	—
3	Švestka-úkap z jiné pálenky	—	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
4	Hruška 50 %	2013	Pěstitelská pálenice BaKaB, Hornice
5	Švestka 51 %	2013	Pěstitelská pálenice BaKaB, Hornice
6	Třešeň 50 %	2019	Pěstitelská pálenice, sběr Veltruby
7	Švestka 50 %	2020	Pěstitelská pálenice, sběr Malé Hradisko

Číslo vzorku	Druh ovoce, procento alkoholu	Rok výroby	Výrobce
8	Jablka 50 %	2018	Pěstitelská pálenice, sběr Křinec
9	Hruška 50 %	2018	Pěstitelská pálenice, sběr Veltruby
10	Švestka 50 %	2016	Pěstitelská pálenice, sběr Malé Hradisko
11	Švestka	2020	Pěstitelská pálenice, sběr Přerov
12	Směs ovoce stařená pálenka 45 %	2021	Pěstitelská pálenice Bohdaneč
13	Mirabelka 50 %	2013	Pěstitelská pálenice, sběr Veltruby
14	Švestka + Ryngle	2014	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
15	Hruška + Mrkev	—	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
16	Rybíz	—	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
17	Broskev	2014	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
18	Broskev	2018	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
19	Třešeň	2018	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
20	Hruška	2021	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně
21	Švestka	2021	Palírna a moštárna Johanna Schrotha: Lipová-lázně

2.3.2 Komerčně dostupné ovocné pálenky

Dále bylo analyzováno 6 běžně komerčně dostupných vzorků slivovice od pěti různých českých výrobců (Tabulka 3). Jejich deklarované množství ethanolu bylo 40 % (č. 23, 24, 25, 27), 47 % (č. 26) či 50 % (č. 22).

Tabulka 3: Analyzované vzorky komerčních pálenek, respektive lihovin

Číslo vzorku	Název	Množství alkoholu	Výrobce
22	Slivovica Žufánek	50 %	Lihovar Žufánek
23	Moravská švestka	40 %	Rudolf Jelínek
24	Alliance Švestka	40 %	Rudolf Jelínek
25	Jubilejná Slivka	40 %	St. Nicolaus, Liptovský Mikuláš
26	Bartida Slivovice	47 %	Bartida Original

Číslo vzorku	Název	Množství alkoholu	Výrobce
27	Baron Hildprandt ze zralých švestek	40 %	Liqui B-Zámecký lihovar a pivovar Blatná

2.3.3 Ostatní alkoholické nápoje

Kromě klasických pálenek byly analyzovány i další druhy běžně dostupných alkoholických nápojů, v nichž by se EC mohl vyskytovat. Zaměřili jsme se na domácí i komerčně dostupné medoviny (6 vzorků), rum (1 vzorek), vodku (2 vzorky), whisky (2 vzorky), brandy (1 vzorek), tequillu (1 vzorek), gin (1 vzorek), borovičku (1 vzorek), potravinářský líh (1 vzorek) i bílá vína (3 vzorky). Jejich seznam je přehledně uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Analyzované vzorky dalších alkoholických nápojů.

Číslo vzorku	Druh alkoholu	Množství alkoholu	Výrobce/distributor
28	Přibyslavská medovina jarní (od včelaře)	11,5 %	Miroslav Zelený, Přibyslav
29	Přibyslavská medovina lesní (od včelaře)	13,5 %	Miroslav Zelený, Přibyslav
30	Přibyslavská medovina luční (od včelaře)	13,5 %	Miroslav Zelený, Přibyslav
31	Hromčíkova hořká medovina Elisa (kupovaná)	11 %	Dalibor Hromčík, Nivnice
32	Medovina z lesního medu, Pleva (od včelaře)	12,88 %	Milan Pleva, Potštejn
33	Medvědí objetí (kupovaná)	14,5 %	Medovinka
34	Metaxa 7* (Brandy)	40 %	Mast-Jaegermeister CZ
35	Finlandia (Vodka)	40 %	Brown-Forman Czechia
36	Red Label (Whisky)	40 %	Stock Plzeň-Božkov
37	Tullamore Dew (Whisky)	40 %	Mast-Jaegermeister
38	Pepe Lopez (Tequila)	40 %	Brown-Forman Czechia
39	Pampero (Rum)	40 %	Stock Plzeň-Božkov

Číslo vzorku	Druh alkoholu	Množství alkoholu	Výrobce/distributor
40	Dynybyl Gin Violet	37,5 %	Stock Plzeň-Božkov
41	Borovička Borec	38 %	St. Nicolaus, Liptovský Mikuláš
42	Božkov vodka	37,5 %	Stock Plzeň-Božkov
43	Potravinářský líh	—	Lihovar Kolín
44	Pálava (bílé víno)	11,5 %	Vinice Hnanice
45	Cuvéé (bílé víno)	11,5 %	Annovino Vinařství Lednice
46	Tokaji (bílé víno)	10,5 %	Grand Tokaj

2.3.4 Potraviny

Pro zajímavost byly analyzovány i vybrané potraviny, v nichž byla dle literatury [68, 96, 97] nalezena významná množství EC. Jednalo se o 2 vzorky balzamikových octů, jeden vzorek běžného kvasného octa a jeden vzorek sójové omáčky. Seznam vzorků potravin shrnuje tabulka 5.

Tabulka 5: Seznam analyzovaných vzorků potravin.

Číslo vzorku	Druh potraviny	Výrobce/distributor
47	Sojová omáčka Tamari	**Countrylife**
48	Ocet Benita	**Kaufland**
49	Balzamikový ocet Ortalli	**Lidl**
50	Balzamikový ocet-Aceto Balsamico di Modena I.G.P.	**Lidl**

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Příprava roztoku standardu EC

Pro přípravu zásobního roztoku EC o koncentraci 4455 mg/l bylo do odměrné baňky o objemu 50 ml naváženo 223 mg standardu EC. Navážka byla následně rozpuštěna a doplněna po rysku 40% vodným roztokem ethanolu (*v/v*). Tento roztok byl uchováván v lednici při teplotě 5–8 °C. K derivatizaci byl pak použit roztok EC o koncentraci 4455 µg/l, který byl připraven naředěním zásobního roztoku 40% ethanolem.

2.4.2 Příprava roztoku derivatizačního činidla

Jako derivatizační činidlo byl použit 9-xanthydrol o koncentraci 20 mmol/l. Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo naváženo 200 mg xanthydrolu, který byl rozpuštěn v 1-propanolu. Po rozpuštění byla odměrná baňka doplněna propanolem po rysku. Takto vzniklý roztok byl uchováván ve tmě v lednici při teplotě 5–8 °C.

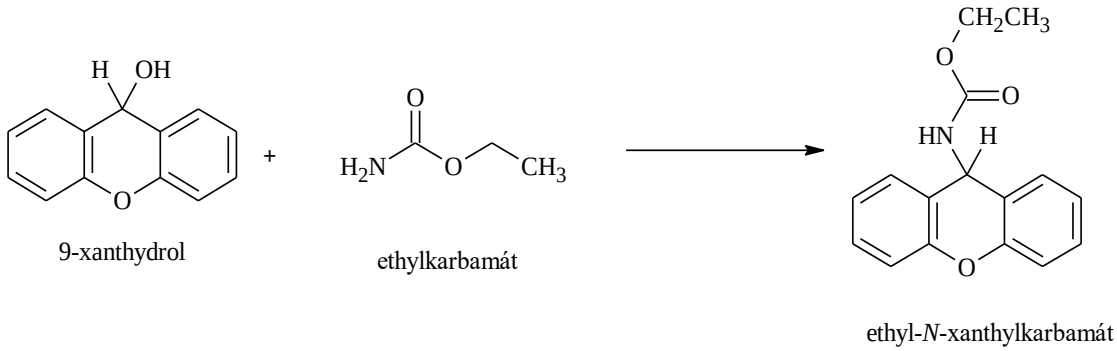
2.4.3 Příprava 1,5 mol/l kyseliny chlorovodíkové

Pro přípravu 1,5 M kyseliny chlorovodíkové bylo do odměrné baňky o objemu 25 ml napipetováno 3,3 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a obsah baňky byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

2.5 Derivatizace

Derivatizační reakce ethylkarbamátu vycházela z částečně upraveného postupu uvedeného v literatuře [77]. Schéma reakce činidla s ethylkarbamátem je zobrazena na obrázku 4. Vzorky ovocných pálenek nebylo třeba před derivatizací nějak upravovat či ředit.

Derivatizace byla provedena v 1,5ml plastových mikrozkumavkách, ve kterých bylo smícháno 600 µl roztoku 9-xanthydrolu o koncentraci 20 mmol/l, 100 µl 1,5 mol/l kyseliny chlorovodíkové a 400 µl vzorku. V případě standardů bylo k derivatizaci použito 12–345 µl roztoku EC o koncentraci 4455 µg/l (pouze pro nejnižší bod kalibrace bylo pipetováno 220 ul roztoku EC o koncentraci 4,46 µg/l) a pro zachování stejného výsledného objemu derivatizační směsi ještě 55–388 µl 40% vodného roztoku ethanolu (*v/v*). Po důkladném protřepání se derivatizační směs nechala reagovat při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.



Obrázek 4: Reakce činidla s ethylkarbamátem.

2.6 Optimalizované podmínky pro stanovení ethylkarbamátu

Pro HPLC separaci XEC byla použita binární mobilní fáze sestávající z 20mmol/l octanu sodného o pH 7,2 (složka A) a 100% acetonitrilu (složka B). Pro přípravu vodné složky mobilní fáze bylo 820 mg octanu sodného rozpuštěno v 500 ml redestilované vody. Následně bylo pH roztoku upraveno pomocí kyseliny octové na hodnotu 7,2. Vzniklý pufr byl před použitím zfiltrován přes nylonový membránový filtr. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a optimalizovaný program gradientové eluce je uveden v tabulce 6. K separaci byla použita kolona Luna C18 temperovaná na teplotu 35 °C, která byla před samotnou analýzou alespoň 10 minut promyta a mezi jednotlivými analýzami byla vždy 8–10 minut ekvilibrována. Na konci dne byla kolona vždy promyta 100% acetonitrilem po dobu alespoň 15 minut. Objem dávkovaného vzorku činil 20 µl a detekce proběhla při λ_{ex}= 233 nm a λ_{em}=600 nm.

Tabulka 6: Optimalizovaný gradientový program pro separaci derivátu ethylkarbamátu.

Čas [min]	**Koncentrace mobilní fáze B [%]**
0	62
4	70
5	100
6	100
7	62

2.7 Zpracování experimentálních dat

K řízení chromatografu a sběru dat sloužil software LabSolution (Shimadzu). Po vyhodnocení chromatogramů byly poté naměřená data zpracována v programu Office Excel 2016 a QC Expert 2.9 (Trilobyte, Pardubice, ČR).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

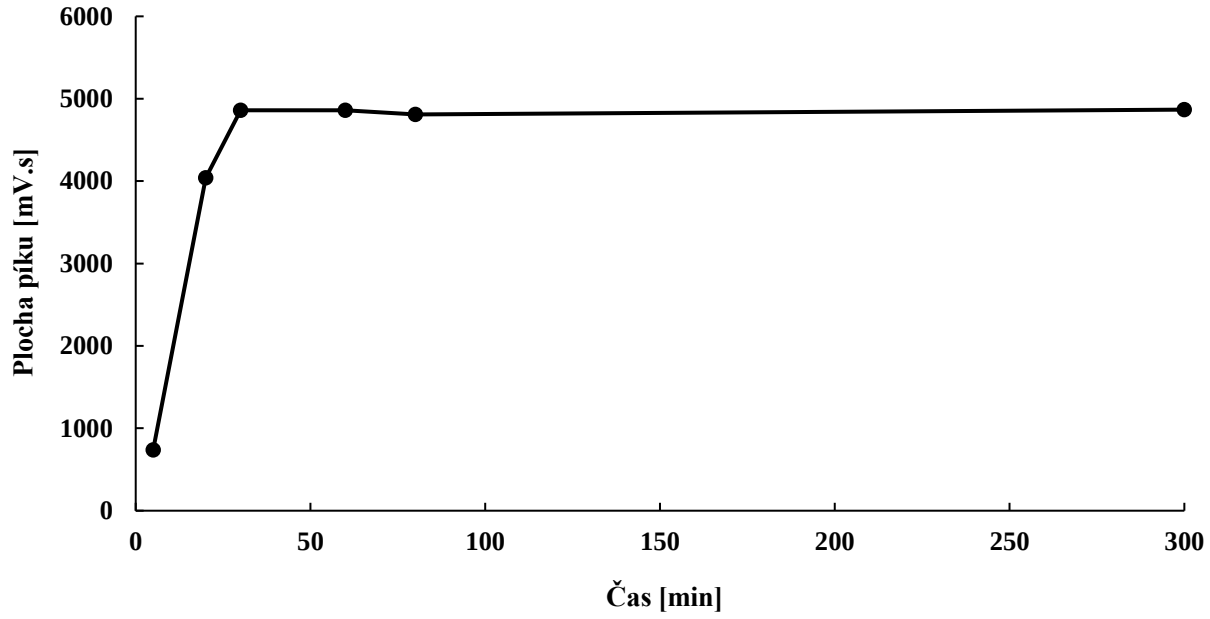
Množství ethylkarbamátu bylo sledováno v potravinových výrobcích, a to hlavně v ovocných destilátech z peckového ovoce. Za tímto účelem byla nejdříve provedena optimalizace derivatizace EC činidlem 9-xanthydrol s následnou HPLC separací. Vyvinutá metoda byla poté validována.

3.1 Optimalizace derivatizace

Vzhledem k tomu, že EC ve své struktuře nemá žádný fluorofor ani chromofor, je třeba jej derivatizovat. Nejběžnějším derivatizačním činidlem je 9-xanthydrol, s nímž EC reaguje v kyselém prostředí za vzniku ethyl-*N*-xanthylkarbamátu (Obrázek 4). Při přípravě XEC derivátu se vycházelo z již publikovaného postupu [77], který byl částečně modifikován. Optimalizace derivatizace je obvykle poměrně časově náročný proces. Během derivatizace by však mohlo docházet k posunům absorpčních maxim v UV/VIS spektrech, a kinetika celé reakce by tak mohla být sledována jednoduše a rychle spektrofotometricky (místo chromatografické koncovky). Z tohoto důvodu byla na UV/VIS spektrofotometru proměřena absorpční spektra, kdy nejprve bylo proměřeno pouze rozpouštědlo (40% ethanol), následně pak slepý vzorek, který byl připravený smícháním všech derivatizačních roztoků, avšak bez EC (ten byl pro zachování stejného výsledného objemu nahrazen 40% ethanolem), a na závěr bylo zaznamenáno absorpční spektrum kompletní derivatizační směsi, tedy včetně EC (Obrázek P1). Jelikož slepý vzorek, potažmo činidlo, poskytovalo obdobné spektrum jako derivát, a nedocházelo tedy k požadovanému posunu vlnových délek, nebylo možné provést optimalizaci derivatizace na UV/VIS spektrometru. Objemy a druhy jednotlivých činidel potřebných pro derivatizaci byly včetně celé kinetiky reakce a stability výsledných derivátů optimalizovány pomocí HPLC.

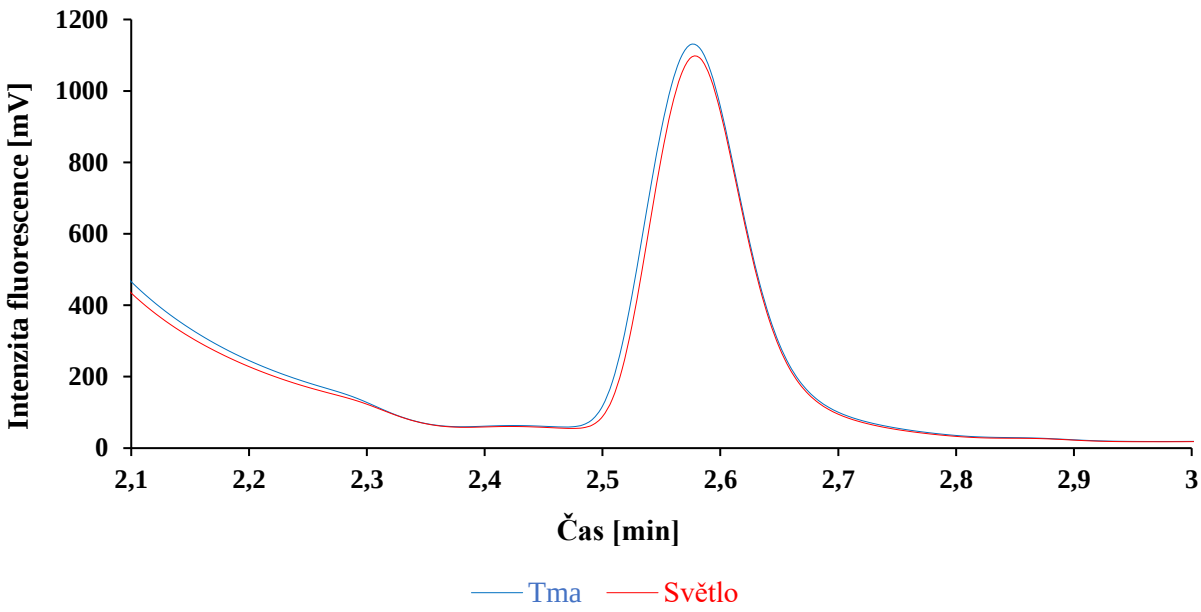
Derivatizační reakce EC s 9-xanthydrolem je standardně prováděna za přítomnosti 1,5 mol/l HCl a za tmy. Jelikož je v literatuře [74] uvedené, že je tato reakce v silně kyselém prostředí rychlejší, ale výsledkem je méně stabilní derivát, byla studována kinetika reakce a stabilita výsledných derivátů v prostředí 0,15–1,5 mol/l HCl, 1,5 mol/l kyseliny octové a 0,1 mol/l fosfátového pufru o pH 2,5 (který byl připraven smícháním kyseliny fosforečné a fosforečnanu sodného). Při použití pufru, kyseliny octové i méně koncentrované HCl byla reakce velmi pomalá a kvantitativně neproběhla ani během 3 dnů (Obrázek P2). Při použití 1,5 mol/l HCl došlo ke kvantitativní reakci během 30 minut při laboratorní teplotě (Obrázek 5), přičemž získaný derivát byl stabilní po dobu minimálně pěti dní (Tabulka P1).

Díky relativně krátké době derivatizační reakce a vysoké stabilitě XEC derivátů byla 1,5 mol/l HCl nadále používána pro další experimenty. Informace o reakční době a stabilitě XEC derivátů se ve studiích však liší. Zdroj uvádí [74], že při použití 1,5 mol/l HCl byla reakční doba jen 5 minut a získaný XEC derivát se rychle rozkládal (63 % za hodinu). V jiném zdroji je uvedena reakční dobu 30 minut a stabilita ± 5 % po dobu 11 hodin [76]. Délka reakce ale vždy závisí na matrici analyzovaného vzorku, zejména na přítomnosti aromatických látek [77].



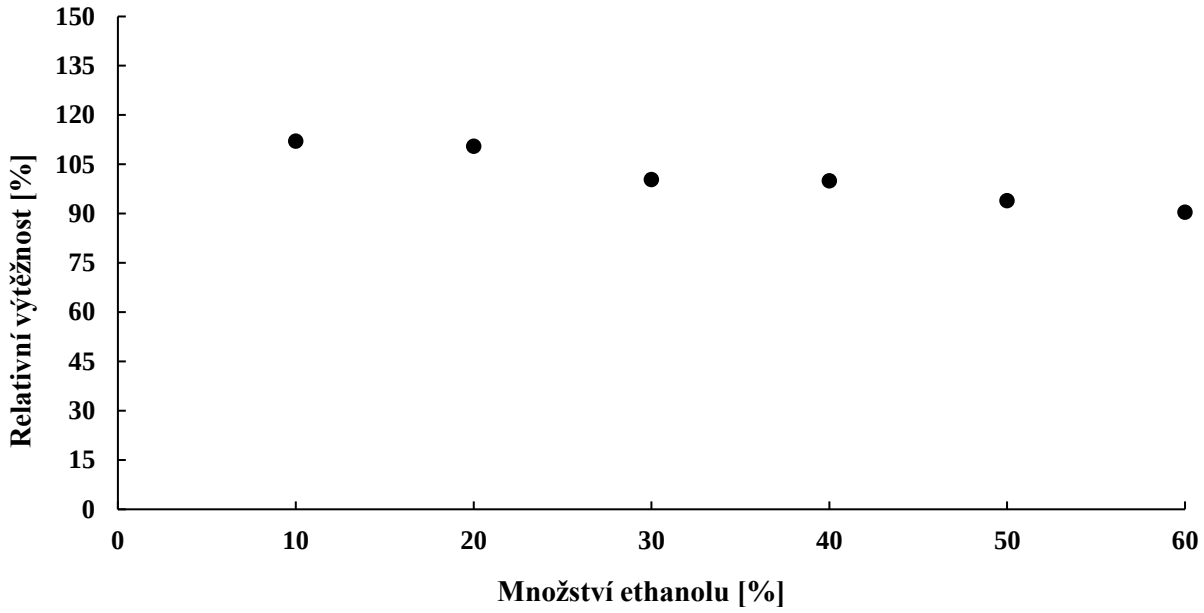
Obrázek 5: Kinetika derivatizační reakce v prostředí 1,5 mol/l HCl.

Jelikož popsaná derivatizační reakce [70, 77] probíhá za tmy, což vyžaduje vyšší nároky na operátora, byl sledován i vliv světla a tmy na derivatizační reakci. Bylo zjištěno, že derivatizační reakce poskytuje za tmy i za světla srovnatelné výsledky (Obrázek 6). Eliminace světla tedy nevede k vyšším výtěžkům či rychlejší reakci, proto byly následné derivatizační reakce provedeny za světla.

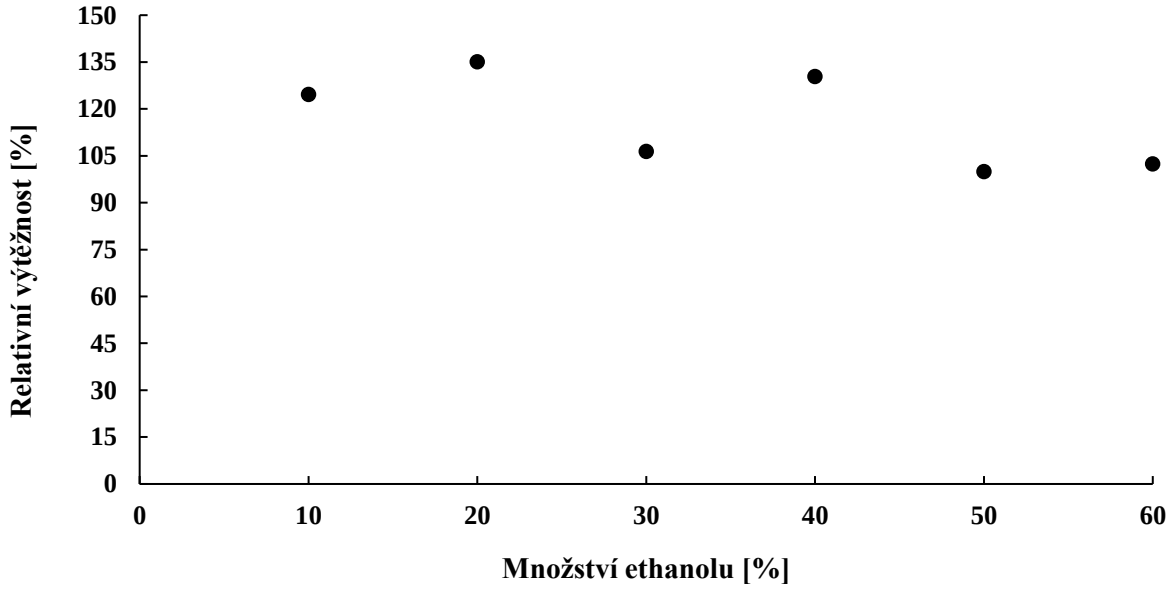


Obrázek 6: Vliv světla a tmy na derivatizační reakci

Literatura rovněž uvádí, že výtěžek derivatizace ovlivňuje množství přítomného ethanolu [73,77], proto byl jeho vliv sledován na derivatizaci standardu EC i na vzorku slivovice. Byla připravena série vzorků/standardů, v nichž byl obsah EC stejný, ale obsah alkoholu se lišil a pohyboval se v rozmezí 10–60 % (při zachování stejného celkového objemu derivatizační směsi). Připravené deriváty byly proměřeny a byly odečteny plochy píků, z kterých se pomocí rovnice regrese kalibrační křivky vypočítaly koncentrace. Vzhledem k tomu, že kalibrace byla provedena v prostředí 40% alkoholu, byl vliv ethanolu vyjádřen pomocí relativní výtěžnosti derivatizační reakce, kdy byl vypočten poměr nalezené koncentrace XEC derivátu ve vzorku s daným obsahem ethanolu a nalezené koncentrace XEC v roztoku s 40% ethanolem jako referenční hodnotou. Obdobným způsobem bylo postupováno i v zjišťování relativní výtěžnosti u reálného vzorku slivovice s obsahem 51 % alkoholu. V případě standardu EC o koncentraci 1300 µg/l (Obrázek 7) se relativní výtěžnost postupně snižovala od 112 % pro 10% obsah ethanolu ve vzorku do 90 % pro 60% obsah alkoholu ve vzorku. U obdobného pokusu s reálným vzorkem slivovice (Obrázek 8) relativní výtěžnost kolísala mezi 135 % (při naředění slivovice na 20 %) a 100 % (neředěná slivovice). Podobná závislost tvorby XEC derivátu standardu na množství ethanolu bylo již prezentována skupinou čínských vědců [73], a však podle jiných autorů plocha píku derivátu rostla do 42 % ethanolu a pak do 60 % opět klesala [77].



Obrázek 7: Závislost relativní výtěžnosti derivatizace na koncentraci ethanolu při přípravě XEC derivátu ze standardního roztoku o koncentraci 1 300 µg/l.

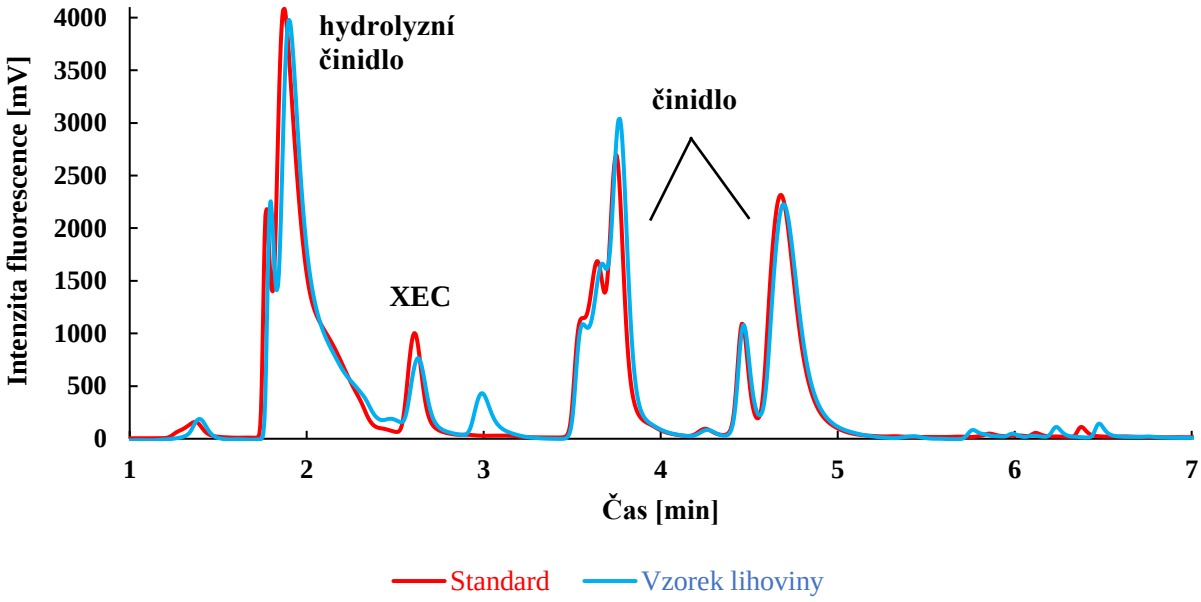


Obrázek 8: Závislost relativní výtěžnosti derivatizační reakce na koncentraci ethanolu při přípravě XEC derivátu z reálného vzorku slivovice.

3.2 Optimalizace HPLC separace

XEC derivát připravený ze standardního roztoku EC optimalizovaným postupem byl následně použit pro optimalizaci HPLC-FLD separace. Jelikož vlnové délky excitace a emise nebyly v literatuře jednotné, bylo nejprve třeba proměřit excitační a emisní (Obrázek P3) spektra

derivátu pomocí spektrofluorimetru. Na základě získaných spekter byla na detektoru nastavena vlnová délka excitace λ_{ex}= 233 nm a emise λ_{em}= 600 nm. Volba typu kolony a mobilní fáze vycházela z již publikovatelných poznatků [77]. Naopak optimalizaci gradientové eluce byla věnována největší pozornost. Cílem bylo co nejvíce zkrátit čas analýzy, aby byla metoda vhodná i pro rychlý screening a rutinní použití, a zároveň mít dostatečně rozseparované píky. Byly tedy testovány gradienty s různou počáteční koncentrací acetonitrilu (50–62 %) a různou strmostí. Bylo vždy nutné oddělit píky činidla a jeho hydrolyzních produktů od píku vlastního XEC derivátu. Optimalizovaný gradient pak začínal na 62 % acetonitrilu a trval pouhých 7 minut (viz. kapitola 2.6) Došlo tedy k výraznému zkrácení doby analýzy, která se doposud pohybovala mezi 30-50 minutami [70; 73-75; 77-78]. Příklad chromatografické separace XEC derivátu standardu a vzorku je znázorněn na obrázku 9.



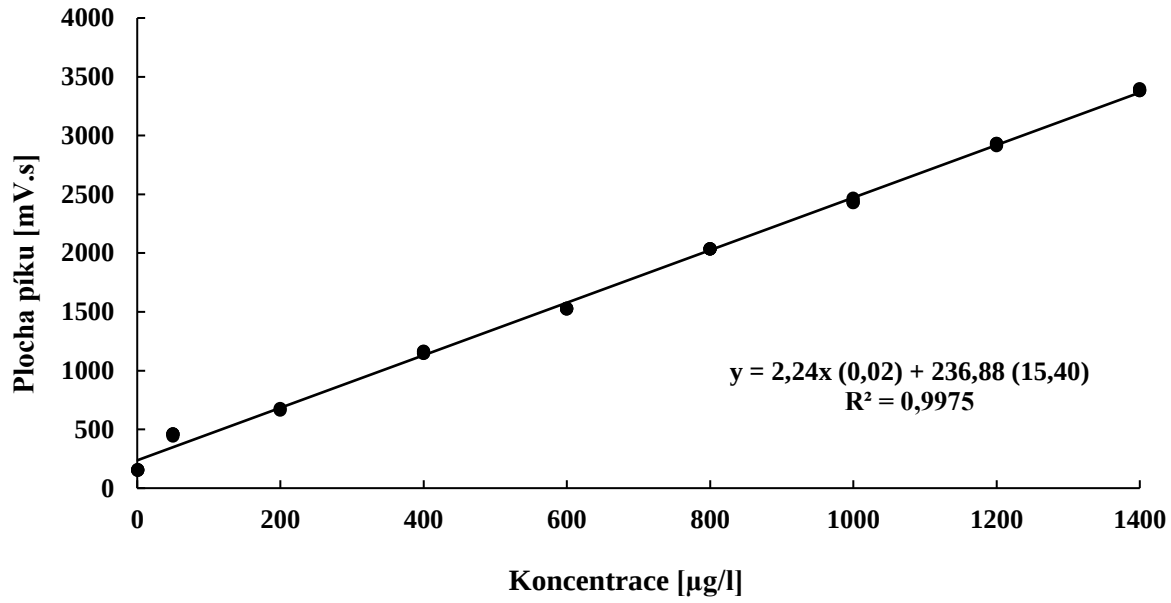
Obrázek 9: Chromatografická separace standardu EC a vzorku obsahující EC.

3.3 Validace analytické metody

Validace je proces sloužící k charakterizaci a ověření platnosti a kvality dané analytické metody. Z tohoto důvodu byla vyvinutá analytická metoda stanovení EC v potravinových výrobcích validována v základních parametrech, jako je mez detekce, mez stanovitelnosti, správnost (návratnost) a přesnost (intradenní a mezidenní opakovatelnost).

3.3.1 Příprava kalibrační křivky

Pro kvantitativní stanovení EC ve vybraných alkoholických nápojích a potravinách byla použita metoda vnějšího standardu, konkrétně metoda kalibrační křivky. Bylo připraveno devět roztoků standardu EC v koncentračním rozsahu 0,9–1400 µg/l, které byly zderivatizovány a následně analyzovány již optimalizovanými postupy. Každý kalibrační bod byl zhotoven dvakrát a dvakrát analyzován (n=4). Z odečtených ploch příslušných píků XEC derivátu byla sestrojena kalibrační závislost plochy píku XEC na jeho koncentraci. Kalibrační křivka byla v celém koncentračním rozsahu lineární a je spolu s rovnicí regrese, příslušnými směrodatnými odchylkami a koeficientem determinace uvedena na obrázku 10. Konkrétní plochy píku jsou pro jednotlivé koncentrace uvedeny v tabulce 7.



Obrázek 10: Kalibrační závislost plochy píku XEC derivátu na jeho koncentraci.

Tabulka 7: Plochy píku pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady.

Koncentrace [µg/l]	Plocha píku 1 [mV.s]	Plocha píku 2 [mV.s]	Plocha píku 3 [mV.s]	Plocha píku 4 [mV.s]
0,9	158	156	150	150
50	460	462	460	444
200	664	678	675	673
400	1147	1165	1163	1149
600	1525	1530	1525	1530
800	2035	2033	2035	2037
1 000	2448	2467	2429	2430
1 200	2912	2931	2932	2922
1 400	3382	3398	3381	3388

3.3.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je definována jako nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze ještě spolehlivě detekovat, a tedy odlišit signál analytu od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) se pak definuje jako nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou ještě lze přesně a správně kvantitativně stanovit. LOD i LOQ je možné určit několika způsoby, z nichž nejběžnější je jejich výpočet ze šumu základní linie a výšky příslušného píku při dané koncentraci (rovnice 3, 4) [101].

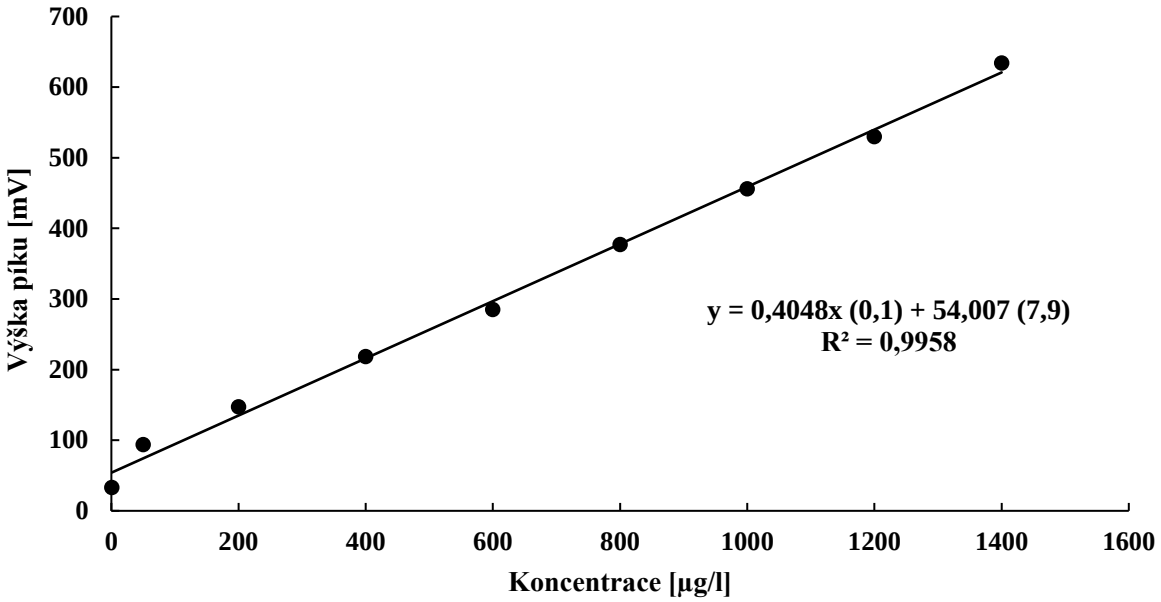
(3) $$LOD = \frac{c_{analyt} * 3 * h_{šum}}{h_{analytu}}$$ (4) $$LOQ = \frac{c_{analyt} * 10 * h_{šum}}{h_{analyt}}$$

, kde $h_{šum}$ je výška šumu základní linie, h_{analyt} je výška píku analytu a c_{analyt} je koncentrace analytu.

Po proměření standardu se tedy z chromatogramu odečetla výška šumu základní linie a výška píku XEC při dané koncentraci. Na základě výše zmíněných vztahů pak bylo vypočteno příslušné LOD a LOQ. Hodnota LOD činila 0,2510 µg/l a hodnota LOQ 0,8429 µg/l. LOD a LOQ bylo následně vypočteno i ze směrnice kalibrační křivky, která byla zkonstruována z výšek píků a jejich příslušných koncentrací (Obrázek 11), a to dle vztahů uvedených v rovnici 5 a 6. Pomocí tohoto výpočtu pak bylo dosaženo hodnoty LOD 0,2668 µg/l a LOQ 0,8893 µg/l, které se zásadně neliší od hodnot získaných pomocí předchozích vztahů.

(5) $$LOD = \frac{3 * h_{šum}}{a}$$ (6) $$LOD = \frac{3 * h_{šum}}{a}$$

, kde *h* je výška šumu základní linie a *a* je směrnice kalibrační křivky.



Obrázek 11: Kalibrační závislost výšky píku XEC derivátu na koncentraci, včetně rovnice regrese s příslušnými směrodatnými odchylkami.

3.3.3 Návratnost metody

Návratnost (správnost) metody udává, jak se liší experimentálně zjištěná koncentrace od reálné koncentrace a vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka (RSD) v % [101]. Jedná se tedy o poměr mezi experimentálně naměřenou a z kalibrace vypočítanou koncentrací EC a skutečnou koncentrací EC, z které byl připravený derivát. Pro zjištění návratnosti metody byly vybrány tři koncentrační hladiny, a to ze začátku, uprostřed a z konce kalibrační závislosti (150 µg/l, 700 µg/l a 1300 µg/l). Pro každou koncentrační hladinu byly připraveny dva XEC deriváty, které byly následně dvakrát změřeny (n=4 pro každou koncentrační hladinu). Pomocí rovnice regrese kalibrační křivky byly vypočteny experimentální koncentrace EC, které byly porovnány s reálnou koncentrací připravených derivátů. Následně pak byla vypočtena návratnost (Tabulka 8). Podle validačních tabulek by se návratnost pro náš koncentrační rozsah měla pohybovat v rozmezí 80–110 % [102]. Návratnost pro koncentraci 700 µg/l dosahovala 84,2 % ± 1,1 % a pro 1300 µg/l činila 82,0 % ± 0,8 %. Obě hodnoty jsou tedy v souladu s validačními tabulkami. Průměrná návratnost na koncentrační hladině 150 µg/l byla ale pod hranicí 80 % a dosahovala pouhých 61,3 % ± 6,8 %. Při této koncentraci však docházelo k větším odchylkám, což potvrzuje i vysoká hodnota RSD, a důvodem může být i fakt, že kalibrační závislost neprochází počátkem.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty ploch píků, naměřené koncentrace, návratnosti a relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrační hladiny

Skutečná koncentrace [µg/l]	Průměrná plocha píků [mV.s]	Průměrná vypočítaná koncentrace [µg/l]	Návratnost [%]	RSD [%]
150	442,4	91,9	61,3	6,8
700	1554,6	589,6	84,2	1,1
1 300	2620,4	1066,4	82,0	0,8

3.3.4 Opakovatelnost

Dalším testovaným validačním parametrem byla intradenní a mezidenní opakovatelnost (přesnost) metody, která je definována jako těsnost shody mezi takto naměřenými hodnotami. Provádí se opakovaným měřením vzorků na stejném přístroji, za stejných podmínek a stejným pracovníkem a vyjadřuje se opět jako RSD v % [101].

Pro stanovení intradenní opakovatelnosti bylo připraveno pět derivátů jedné koncentrační hladiny (1200 µg/l), které byly proměřeny během jednoho dne (n=5), a bylo pozorováno, jak se jednotlivá měření od sebe liší v rámci ploch píků (a následné koncentrace EC) (Obrázek P4) a retenčního času XEC derivátu. RSD pro koncentraci získané z pěti měření činilo 5,7 % Dále bylo vypočítáno i RSD pro retenční čas, které bylo pouhých 0,02 % (Tabulka 9).

Mezidenní opakovatelnost byla rovněž stanovena na základě měření XEC derivátů jedné koncentrační hladiny (1200 µg/l), avšak připravených a analyzovaných v různé dny. Ze šesti měření (n=6) byla získaná hodnota RSD pro koncentraci EC 6,5 %. Opět bylo vypočítáno i RSD pro retenční čas, které činilo 0,54 % (Tabulka 9).

Podle validačních tabulek [102] by pro danou koncentraci nemělo být RSD větší než 7,3 %, což je splněno v intradenní i mezidenní opakovatelnosti, a metoda tak může být považována za dostatečně přesnou.

Tabulka 9: Intradenní a mezidenní opakovatelnost koncentrací, plochy píků a retenčních časů.

Počet měření	Intradenní opakovatelnost			Mezidenní opakovatelnost		
	Retenční čas [min]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [µg/l]	Retenční čas [min]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [µg/l]
1.	2,58	3164	1307	2,61	3523	1467
2.	2,58	3169	1309	2,59	3227	1335
3.	2,58	3283	1360	2,61	3561	1484
4.	2,58	3485	1450	2,59	3301	1368
5.	2,58	3537	1473	2,58	3827	1603
6.	—	—	—	2,58	3536	1473
Průměr	2,58	3327	1380	2,59	3496	1455
SD	0,00	175,0	78,0	0,01	212,8	95,1
RSD	**0,02**	**5,3**	**5,7**	**0,54**	**6,1**	**6,5**

3.4 Analýza vzorků

Množství EC bylo stanovováno celkem u 50 vzorků, které byly rozděleny do čtyř skupin: domácí ovocné pálenky, komerčně dostupné ovocné pálenky, ostatní alkoholické nápoje a potraviny. Každý vzorek ze skupiny domácích ovocných pálenek byl třikrát připraven a jedenkrát zanalyzován (n=3). Ve zbylých třech skupinách byl každý vzorek připraven dvakrát a jedenkrát zanalyzován (n=2). Pomocí experimentálně naměřených ploch píků a rovnice regrese kalibrační přímky byla pak vypočítána koncentrace EC ve vzorcích. Nejvíce vzorků s obsahem EC nad limit detekce bylo pozorováno u domácích pálenek z peckového ovoce z malých pěstitelských pálenic. Z celkem 21 analyzovaných vzorků jich 9 (vzorek č. 1, 4–6, 11–13 a 18–19) obsahovalo EC (Tabulka 10), jehož koncentrace se pohybovaly od 14 µg/l až po 1500 µg/l. Pod 100 µg/l EC obsahovaly vzorky č. 1 a 6. Koncentrace EC do 150 µg/l pak obsahovaly i vzorky č. 12 a 19, do hodnoty 400 µg/l byl EC nalezen ve vzorku č. 11, 13 a 18. Vysoké množství pak obsahovaly dva vzorky, a to č. 4 (516 µg/l) a č. 5, v kterém byla kvantifikováno dokonce 1503 µg/l. Tento vzorek překročil maximální doporučené množství EC, které bylo stanoveno Evropskou komisí na 1000 µg/l, a je tedy považován za nebezpečný. Oba tyto vzorky byly vyrobeny již v roce 2013, a jejich vysoké množství EC tak může být způsobeno dlouhým skladováním. Další 3 vzorky (č. 17, 20 a 21) prokazatelně obsahovaly EC (> LOD), nicméně jejich množství bylo pod limitem

kvantifikace. Jelikož v dřívější studii [32] bylo v první frakci destilátu (úkapu) nalezeno velké množství EC (až 60 000 μg/l), byly kromě hotových pálenek analyzovány i 2 vzorky úkapu (č. 2 a 3). Ani v jednom z těchto vzorků však nebyl nalezen EC. Úkap je bohatý na nízkovroucí látky, jako jsou těkavé estery, methanol či acetaldehyd, zatímco EC má poměrně vysoký bod varu (182–184 °C), a byl by tak destilován v prokapu či na konci destilace (dokapu) spolu s přiboudlinami, jako je například kyselina octová a vyšší alkoholy [10]. To je zároveň potvrzeno i faktem, že od jednoho úkapu bylo analyzováno zároveň i jádro, které EC obsahovalo. Ve výše zmiňované studii nebyl jejich vysoký nález blíže komentován či vysvětlen.

V obchodních řetězcích se převážně prodávají ovocné pálenky, které nejsou 100% ovocnými destiláty. Tyto pálenky obsahují obvykle pouze malé množství ovocného destilátu, jsou dolihované a obsahují aromatizující látky a barviva. Dle legislativy se za ovocný destilát považuje nápoj, který byl vyroben výhradně alkoholovým kvašením a destilací ovocného kvasu, nebyl aromatizován a nebyl do něj přidán líh jiného původu [99]. Výjimkou, je však přidání lihu do ovocného destilátu před konečnou destilací. Konečný výrobek však musí obsahovat minimálně 70 % ovocného destilátu, tudíž může být přidáno maximálně 30 % lihu nevyrobeného destilací ovoce. Takto vyrobené komerční produkty lze od méně kvalitních rozeznat nejen podle složení, které musí být uvedeno na etiketě, ale také dle názvu. Příponu „ ice“ (slivovice, hruškovice, meruňkovice atd.) mohou nést totiž pouze ovocné pálenky bez přidaného lihu (až na již výše zmíněnou výjimku) [99]. Pro porovnání bylo vedle domácích ovocných pálenek z malých pěstitelských pálenic analyzováno 6 komerčně dostupných vzorků lihovin z velkých (i menších) lihovarů (Tabulka 11). Z těchto vzorků byly ale 2 čistým ovocným destilátem (č. 22 a 26), zbylé 4 obsahovaly pouze minimální množství ovocného destilátu (č. 23, 24, 25, 27), v nichž se nepředpokládá významný výskyt EC, což se i potvrdilo. EC byl nalezen pouze u jednoho vzorku čistého ovocného destilátu (č. 22) a jeho koncentrace byla 380 μg/l, což splňuje doporučený limit Evropské komise. Jednalo se o slivovici z rodinného lihovaru Žufánek, který již jednu kauzu ohledně zvýšené koncentrace EC celkem nedávno měl, a to v srpnu roku 2012. V jedné jejich meruňkovici vyrobené v roce 2010 bylo nalezeno 800 μg/l EC, tudíž překročila limit České normy, který povoloval maximálně 400 μg/l. Tato norma byla v říjnu roku 2012 zrušena, a tak meruňkovice, která byla po dobu vyšetřování označena za nebezpečnou, se jenom dva měsíce poté stala bezpečnou a mohla být opět uvedena do oběhu [100].

Byla analyzována i rozmanitá skupina dalších alkoholických nápojů, která sestávala ze vzorků rumu, ginu, borovičky, vodky, tequily, whisky, brandy, vín a medovin. Z celkového počtu 19 vzorků byl EC kvantifikován pouze v jednom (č. 31), a to s koncentrací 468 µg/l. Jednalo se o vzorek kupované Hromčíkovy hořké medoviny Elisa. Vzorek kupované medoviny Medvědí objetí (č. 33) pak obsahoval EC pod limitem kvantifikace. Z dostupné literatury je zřejmé, že se ještě nikdo nezabýval stanovením EC v medovinách, a proto naše nálezy nebylo možné porovnat. V ostatních analyzovaných vzorcích pak EC nebyl detekován (Tabulka 12), přestože dle výsledků předložených EFSA se koncentrace EC u vzorků bílých vín pohybovala do 30 µg/l, pro gin, vodku a rum byly koncentrace EC od nedetekovatelných po 55 µg/l a pro whisky, tequilu a brandy byly v rozmezí 0–520 ug/l [2].

Ve fermentovaných potravinách se všeobecně nachází velmi malé koncentrace EC, ale najdou se i výjimky jako jsou zejména sójové omáčky a octy, kde byl EC v dřívějších studiích již kvantifikován, a to v koncentracích 0–130 µg/l pro sójové omáčky [68, 96-97] a 0–17 µg/l pro octy [98]. Proto byly pro zajímavost analyzovány i 2 balzamikové octy, 1 kvasný ocet a 1 sójová omáčka. EC ale nebyl ani u jednoho vzorku detekován.

Na obrázku 12 jsou přehledně zobrazeny koncentrace EC u všech pozitivních vzorků.

Tabulka 10: Množství EC stanovený v domácích ovocných pálenkách.

Číslo vzorku	**Koncentrace [µg/l]**			**Průměrná koncentrace ± interval spolehlivosti**
	1. měření	**2. měření**	**3. měření**	
1	79,6	80,9	83,0	81,2 ± 2,1
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	514,7	518,7	514,8	516,1 ± 2,3
5	1500,6	1506,5	1503,2	1503,4 ± 2,9
6	13,5	16,1	12,9	14,2 ± 1,7
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
11	381,3	378,7	374,6	378,2 ± 3,3
12	154,9	155,9	140,4	150,4 ± 8,7
13	318,6	314,3	316,0	316,3 ± 2,2
14	—	—	—	—
15	—	—	—	—
16	—	—	—	—
17	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Číslo vzorku	Koncentrace [µg/l]			Průměrná koncentrace ± interval spolehlivosti
	1. měření	2. měření	3. měření	
18	355,3	353,5	353,2	354,0 ± 1,2
19	139,0	142,0	140,3	140,4 ± 1,5
20	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
21	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Poznámka: Kde není uvedena číselná hodnota byla koncentrace ethylkarbamátu pod LOD.

Tabulka 11: Množství EC nalezená v komerčně dostupných slivovicích.

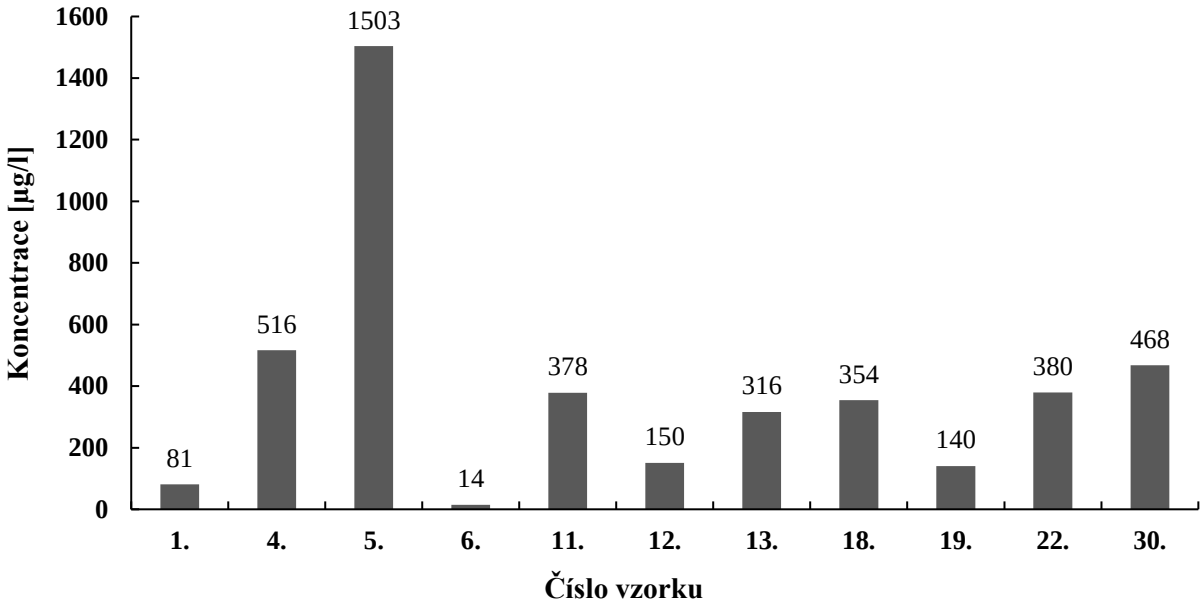
Číslo vzorku	Koncentrace µg/l		Průměrná koncentrace ± interval spolehlivosti
	1. měření	2. měření	
22	380,0	379,0	379,5 ± 6,8
23	—	—	—
24	—	—	—
25	—	—	—
26	—	—	—
27	—	—	—

Poznámka: Kde není uvedena číselná hodnota byla koncentrace ethylkarbamátu pod LOD.

Tabulka 12: Množství/koncentrace EC nalezená v ostatních alkoholických nápojích.

Číslo vzorku	Koncentrace µg/l		Průměrná koncentrace ± interval spolehlivosti
	1. měření	2. měření	
28	—	—	—
29	—	—	—
30	—	—	—
31	467,3	467,8	467,5 ± 3,0
32	—	—	—
33	< LOQ	< LOQ	< LOQ
34	—	—	—
35	—	—	—
36	—	—	—
37	—	—	—
38	—	—	—
39	—	—	—
40	—	—	—
41	—	—	—
42	—	—	—
43	—	—	—
44	—	—	—
45	—	—	—
46	—	—	—

Poznámka: Kde není uvedena číselná hodnota byla koncentrace ethylkarbamátu pod LOD.



Obrázek 12: Srovnání koncentrací EC u pozitivních vzorků.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovení ethylkarbamátu v alkoholických nápojích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenčním detektorem. V první řadě bylo nutné provést optimalizaci derivatizační reakce ethylkarbamátu s derivatizančním činidlem 9-xanthydrol. Běžně prováděná metoda derivatizace byla zjednodušena a zkrácena, přičemž stabilita získaného derivátu byla maximálně 5 dní. Následovala optimalizace HPLC separace, kdy se vhodně zvolenými podmínkami podařilo zkrátit dobu analýzy na pouhých 7 minut. Součástí práce byla i validace vyvinuté metody, a to z hlediska meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti (návratnost) a přesnosti (intradenní a mezidenní opakovatelnost).

Optimalizovaná metoda byla následně aplikována na reálné vzorky, které byly rozděleny do čtyř skupin. První skupina tvořila domácí pálenky z malých pěstitelských pálenic. Pro porovnání koncentrací ethylkarbamátu byly analyzovány i komerčně dostupné ovocné pálenky, které byly zařazeny do druhé skupiny. Třetí skupina obsahala různé druhy alkoholu, u kterých by se mohl vyskytovat ethylkarbamát. Pro zajímavost byly také analyzovány vybrané vzorky potravin, které tvořily poslední, čtvrtou skupinu. Z celkového počtu 50 vzorků byl ethykarbamát kvantifikován v 10 vzorcích. V dalších 4 byl ethylkarbamát detekován, ale jeho množství bylo pod limitem kvantifikace. Nejvíce pozitivních vzorků na ethylkarbamát bylo u domácích ovocných pálenek. Nejvyšší koncentraci pak měla slivovice z pěstitelské pálenice BaKaK Hornice, která obsahovala 1503 µg/l, a překročila tak doporučené množství ethylkarbamátu přítomného v pálenkách z peckového ovoce, který byl Evropskou komisí stanoven na 1000 µg/l. Z šesti komerčně dostupných ovocných pálenek z malých i velkých lihovarů pouze jedna obsahovala ethylkarbamát a to s koncentrací 380 µg/l. V ostatních alkoholických nápojích byl ethylkarbamát stanoven pouze v jedné medovině, a to s koncentrací 468 µg/l. Ve fermentovaných potravinách pak ethylkarbamát nebyl vůbec detekován.

POUŽITÁ LITERATURA

[1] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. ISBN 978-92-832-1296-6.

[2] Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants. *EFSA Journal* [online]. 2007, **5**(10). ISSN 18314732.

[3] HADDOW, A.; SEXTON, W. A. Influence of carbamic esters (urethanes) on experimental animal tumours. *Nature* [online]. 1946, **157**(3990), 500-503. ISSN 0028-0836.

[4] HOLLAND, J. F.; HOSLEY H.; SCHARLAU C. et al. A Controlled Trial of Urethane Treatment in Multiple Myeloma. *Blood* [online]. 1966, **27**(3), 328-342 ISSN 0006-4971. 5933438.

[5] GOTOR, V. Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* [online]. 1999, **7**(10), 2189-2197. ISSN 09680896.

[6] WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2009, **7**(3), 233-247. ISSN 1610-3653.

[7] WANG, Ch.; WANG, M.; ZHANG, M. P. Ethyl carbamate in Chinese liquor (Baijiu): presence, analysis, formation, and control. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2021, **105**(11), 4383-4395. ISSN 0175-7598

[8] PARK, K. K.; LIEM, A.; STEWART, B. C.; MILLER, J.A. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis* [online]. 1993, **14**(3), 441-450. ISSN 0143-3334.

[9] Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách

[10] DOPORUČENÍ KOMISE ze dne 2. března 2010 o prevenci a snížení kontaminace lihovin z peckovin a lihovin z výlisků peckovin ethylkarbamátem a o monitorování

obsahu ethylkarbamátu v těchto nápojích: (2010/133/EU).

[11] KIM, Y. G.; LYU, J.; KIM, M. K.; LEE, K. G. Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl carbamate in soybean paste model system. *Food Chemistry* [online]. 2015, **189**, 74-79. ISSN 03088146.

[12] ABT, E.; INCORVATI, V.; POSNICK ROBIN, L.; REDAN, B. W. Occurrence of Ethyl Carbamate in Foods and Beverages: Review of the Formation Mechanisms, Advances in Analytical Methods, and Mitigation Strategies. *Journal of Food Protection* [online]. 2021, **84**(12), 2195-2212. ISSN 0362-028X.

[13] ZHANG, J.; FANG, F.; CHEN, J.; DU, G. The arginine deiminase pathway of koji bacteria is involved in ethyl carbamate precursor production in soy sauce. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2014, **358**(1), 91-97. ISSN 03781097.

[14] DENNIS, M. J., MASSEY, R. C.; GINN, R.; WILLETTS, P.; CREWS, C.; PARKER, I. The contribution of azodicarbonamide to ethyl carbamate formation in bread and beer. *Food Additives and Contaminants* [online]. 1997, **14**(1), 101-108. ISSN 0265-203X.

[15] *Azodicarbonamide (ADA) Frequently Asked Questions* [online]. Dostupné z: https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/azodicarbonamide-ada-frequently-asked-questions

[16] OUGH, C. S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1976, **24**(2), 323-328. ISSN 0021-8561.

[17] ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper(II) Catalysis in Cyanide Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits and Relevant Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(6), 2819-2824. ISSN 0021-8561.

[18] TEGMO-LARSSON, I. M.; SPITTLER, T. D. Temperature and Light Effects on Ethyl Carbamate Formation in Wine During Storage. *Journal of Food Science* [online]. 1990, **55**(4), 1166-1167. ISSN 0022-1147.

[19] WU, P.; CAI, Ch.; SHEN, X.; WANG, L.; ZHANG, J.; TAN, Y.; JIANG, W.; PAN,

X. Formation of ethyl carbamate and changes during fermentation and storage of yellow rice wine. *Food Chemistry* [online]. 2014, **152**, 108-112. ISSN 03088146.

[20] LACHENMEIER, D. W.; SCHEHL, B.; KUBALLA. T.; FRANK, W.; SENN, T. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2005, **22**(5), 397-405. ISSN 0265-203X.

[21] ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SANTIAGO, W. D.; DE SOUZA GOMES, M.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Effect of light on the concentration of ethyl carbamate in cachaça stored in glass bottles. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2015, **121**(2), 238-243. ISSN 00469750.

[22] HASHIGUCHI, T.; IZU, H.; SUDO, S. Lignin Is Linked to Ethyl-Carbamate Formation in Ume (Prunus mume) Liqueur. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2014, **76**(1), 148-152. ISSN 0916-8451.

[23] SANTIAGO, W. D.; CARDOSO, M. G.; LUNGUINHO, A. S.; BARBOSA, R. B.; CRAVO, F. C.; GONCALVES, G. S.; NELSON, D. L. Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in newly made oak, amburana, jatobá, balsa and peroba vats and in glass containers. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2017, **123**(4), 572-578. ISSN 00469750.

[24] POZO-BAYÓN, M. A.; MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Wine Features Related to Safety and Consumer Health: An Integrated Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2012, **52**(1), 31-54. ISSN 1040-8398.

[25] SCHEHL, B.; LACHENMEIER D. W.; SENN, T.; HEINISCH, J. J. Effect of the Stone Content on the Quality of Plum and Cherry Spirits Produced from Mash Fermentations with Commercial and Laboratory Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(21), 8230-8238. ISSN 0021-8561.

[26] FIDALEO, M.; ESTI, M.; MORESI, M. Assessment of Urea Degradation Rate in Model Wine Solutions by Acid Urease from Lactobacillus fermentum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, **54**(17), 6226-6235. ISSN 0021-

8561.

[27] JIA, Y.; ZHOU, J.; DU, G.; CHEN, J.; FANG, F. Identification of an urethanase from Lysinibacillus fusiformis for degrading ethyl carbamate in fermented foods. *Food Bioscience* [online]. 2020, **36**. ISSN 22124292.

[28] SCHEHL, B.; SENN, T.; LACHENMEIER, D. W.; RODICIO, R.; HEINISCH, J. J. Contribution of the fermenting yeast strain to ethyl carbamate generation in stone fruit spirits. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **74**(4), 843-850. ISSN 0175-7598.

[29] WU, D.; LI, X.; SHEN, Ch.; LU, J.; CHEN, J.; XIE, G. Decreased ethyl carbamate generation during Chinese rice wine fermentation by disruption of CAR1 in an industrial yeast strain. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, **180**, 19-23. ISSN 01681605.

[30] GUO, X. W.; LI, Y. Z.; GUO, J.; WANG, Q.; HUANG, S. Y.; CHEN, Y. F.; DU, L. P.; XIAO, D. G. Reduced production of ethyl carbamate for wine fermentation by deleting CAR1 in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **43**(5), 671-679. ISSN 1476-5535.

[31] WU, D.; LI, X; LU, J.; CHEN, J.; ZHANG, L.; XIE, G.; POEGGELER, S. Constitutive expression of the DUR1,2 gene in an industrial yeast strain to minimize ethyl carbamate production during Chinese rice wine fermentation. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2015, **363**(1). ISSN 1574-6968.

[32] BAFFA JÚNIOR, J. C.; MENDONCA, R. C. S.; PEREIRA, José Antonio MARQUES PEREIRA J. M.; SOARES, N. F. F. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. *Food Chemistry* [online]. 2011, **129**(4), 1383-1387. ISSN 03088146.

[33] SILVA, F. A.; VENDRUSCOLO, F.; CARVALHO, W. R.; SOARES JÚNIOR M. S.; PINHEIRO M. V. M.; CALIARI, M. Influence of the number of distillations on the composition of organic sugarcane spirit. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2013, 119(3), 133-138. ISSN 00469750.

[34] ALCARDE, A. R.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. Part 2: influence of type of pot still. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2012, **118**(4), 352-355. ISSN 00469750.

[35] LU, S.; GIBB, S.W. Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(6), 1509-1517. ISSN 09608524.

[36] NEVES, E. A.; OLIVEIRA, A.; FERNANDES, A. P.; NÓBREGA, J. A. Simple and efficient elimination of copper(II) in sugar-cane spirits. *Food Chemistry* [online]. 2007, **101**(1), 33-36. ISSN 03088146.

[37] HASHIGUCHI, T.; HORII, S.; IZU, H.; SUDO, S. The Concentration of Ethyl Carbamate in Commercial Ume (Prunus mume) Liqueur Products and a Method of Reducing It. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2010, **74**(10), 2060-2066. ISSN 0916-8451.

[38] XIA, Q.; YANG, C.; WU, Ch.; ZHOU, R.; LI, Y. Quantitative strategies for detecting different levels of ethyl carbamate (EC) in various fermented food matrices: An overview. *Food Control* [online]. 2018, **84**, 499-512. ISSN 09567135.

[39] AYLOTT, R. I.; MCNEISH, A. S.; WALKER, D. A. Determination of ethyl carbamate in distilled spirits using nitrogen specific and mass spectrometric detection. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1987, **93**(5), 382-386. ISSN 00469750.

[40] LE KIM, Y. K.; KOH, E.; CHUNG, H. J.; KWON, H. Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2000, **17**(6), 469-475 [cit. 2022-04-11]. ISSN 0265-203X.

[41] WOO, I. S.; KIM I. H.; YUN, U. J.; CHUNG, S. K.; RHEE, I. K.; CHOI S. W.; PARK, H. D. An improved method for determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2001, **26**(6), 363-368 [cit. 2022-04-05]. ISSN 1367-5435.

[42] OUGH, C. S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1976, **24**(2), 328-331. ISSN 0021-8561.

[43] XU, X.; GAO, Y.; CAO, X.; WANG, X.; SONG, G.; ZHAO, J.; HU, Y. Derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for quantification of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Journal of Separation Science* [online]. 2012, **35**(7), 804-810. ISSN 16159306.

[44] LIAO, Q. G.; LI, W. H.; LUO, L. G. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction for the sensitive determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, **405**(21), 6791-6797. ISSN 1618-2642.

[45] LACHENMEIER, D. W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1108**(1), 116-120. ISSN 00219673.

[46] UBEDA, C.; BALSERA, C.; TRONCOSO, A. M.; CALLEJÓN, R. M.; MORALES, M. L. Validation of an analytical method for the determination of ethyl carbamate in vinegars. *Talanta* [online]. 2012, **89**, 178-182. ISSN 00399140.

[47] XIA, Q.; WU, Ch.; HUANG, J.; ZHOU, R. Selection and application of potential whole-cell enzymes in the esterification of Huangshui , a by-product formed during Chinese liquor-making. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2014, **120**(1), 45-51. ISSN 00469750.

[48] SHIN, H. S.; YANG, E. Y. Simultaneous determination of methylcarbamate and ethylcarbamate in fermented foods and beverages by derivatization and GC-MS analysis. *Chemistry Central Journal* [online]. 2012, **6**(1) ISSN 1752-153X.

[49] LIAO, Q. G.; LUO, L. G. Fast and Selective Pressurized Liquid Extraction with Simultaneous In-Cell Cleanup for the Analysis of Ethyl Carbamate in Fermented Solid Foods. *Chromatographia* [online]. 2014, **77**(13-14), 963-967. ISSN 0009-5893. 0004-5756.

[50] SUBEDI, B.; AGUILAR, L.; ROBINSON, E. M.; HAGEMAN, K. J.; BJÖRKLUND, E.; SHEESLEY, R. J.; USENKO, S. Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of

emerging concern. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **68**, 119-132. ISSN 01659936.

[51] CHOI, M.; LEE, I. S.; JUNG, R. H. Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2016, **205**, 1-8. ISSN 03088146.

[52] WU, H.; WANG, J.; YANG, H.; LI, G.; ZENG, Y.; XIA, W.; LI. Z.; QIAN, M. Development and application of an in-cell cleanup pressurized liquid extraction with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to detect prohibited antiviral agents sensitively in livestock and poultry feces. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1488**, 10-16. ISSN 00219673.

[53] BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2012, **42**(3), 198-213. ISSN 1040-8347.

[54] XIA, Q.; YUAN, H.; WU, Ch.; ZHENG, J.; ZHANG, S.; SHEN, C.; YI, B.; ZHOU, R. An Improved and Validated Sample Cleanup Method for Analysis of Ethyl Carbamate in Chinese Liquor. *Journal of Food Science* [online]. 2014, **79**(9), 1854-1860. ISSN 00221147.

[55] NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, G. E.; SILVA, M. et al. Improved sample preparation for GC–MS–SIM analysis of ethyl carbamate in wine. *Food Chemistry* [online]. 2015, **177**, 23-28 [cit. 2022-04-11]. ISSN 03088146.

[56] LIM, H. S.; LEE, K. G. Development and validation of analytical methods for ethyl carbamate in various fermented foods. *Food Chemistry* [online]. 2011, **126**(3), 1373-1379. ISSN 03088146.

[57] RYU, D.; CHOI, B.; KIM, N.; KOH, E. Validation of analytical methods for ethyl carbamate in nine food matrices. *Food Chemistry* [online]. 2016, **211**, 770-775. ISSN 03088146.

[58] DING, X.; WU, Ch.; HUANG, J.; ZHOU, R. Characterization of interphase volatile compounds in Chinese Luzhou-flavor liquor fermentation cellar analyzed by head space-solid phase micro extraction coupled with gas chromatography mass

spectrometry (HS-SPME/GC/MS). *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2016, **66**, 124-133. ISSN 00236438.

[59] GRACIA-MORENO, E.; LOPEZ, R.; FERREIRA, V. Quantitative determination of five hydroxy acids, precursors of relevant wine aroma compounds in wine and other alcoholic beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(26), 7925-7934. ISSN 1618-2642.

[60] XIA, Q.; MEI, J.; YU, W.; LI, Y. High hydrostatic pressure treatments enhance volatile components of pre-germinated brown rice revealed by aromatic fingerprinting based on HS-SPME/GC–MS and chemometric methods. *Food Research International* [online]. 2017, **91**, 103-114. ISSN 09639969.

[61] HORII, S.; GOTO, K. Determination of Ethyl Carbamate in Sake Using Headspace Solid Phase Microextraction. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2010, **116**(2), 177-181. ISSN 00469750.

[62] LIU, J.; XU, Y.; ZHAO, G. Rapid determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2012, **118**(2), 217-222. ISSN 00469750.

[63] PERESTRELO, R.; PETRONILHO, S.; CAMARA, J. S.; ROCHA, S. M. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of Madeira wine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(20), 3441-3445. ISSN 00219673.

[64] LEE, Ch.; LEE, Y.; LEE, J. G.; BUGLASS, A. J. Development of a reduced pressure headspace solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometric (rpHSSPME-GC/MS) method and application to aroma analysis. *Analytical Methods* [online]. 2015, **7**(16), 6504-6513. ISSN 1759-9660.

[65] YE, Ch. W.; ZHANG, X. N.; HUANG, J. Y.; LI, S. S.; PAN, S. Y.; WANG, Y. L.; LI, X. J. Multiple headspace solid-phase microextraction of ethyl carbamate from different alcoholic beverages employing drying agent based matrix modification.

Journal of Chromatography A [online]. 2011, **1218**(31), 5063-5070. ISSN 00219673.

[66] YE, Ch. W.; ZHANG, X. N.; GAO, Y. L.; WANG, Y. L.; PAN, S. Y.; LI, X. J. Multiple headspace solid-phase microextraction after matrix modification for avoiding matrix effect in the determination of ethyl carbamate in bread. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, **710**, 75-80. ISSN 00032670.

[67] UTHURRY, C.A.; LEPE, J. A. S.; LOMBARDERO, J.; GARCÍA DEL HIERRO, J. R. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry* [online]. 2006, **94**(2), 262-270. ISSN 03088146.

[68] HASNIP, S.; CREWS, C.; POTTER, N. et al. Survey of Ethyl Carbamate in Fermented Foods Sold in the United Kingdom in 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, **55**(7), 2755-2759. ISSN 0021-8561.

[69] DE MELO ABREU, S.; ALVES, A.; OLIVEIRA, B.; HERBERT, P. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2005, **382**(2), 498-503. ISSN 1618-2642.

[70] HERBERT, P.; SANTOS, L.; BASTOS, M.; BARROS, P.; ALVES, A. New HPLC Method to Determine Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages Using Fluorescence Detection. *Journal of Food Science* [online]. 2002, **67**(5), 1616-1620. ISSN 0022-1147.

[71] GIACHETTI, C.; ASSANDRI, A.; ZANOLO, G. Gas chromatographic—mass spectrometric determination of ethyl carbamate as the xanthylamide derivative in Italian aqua vitae (grappa) samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 1991, **585**(1), 111-115. ISSN 00219673.

[72] WANG, R.; WU, H.; ZHOU, X.; CHEN, L. Simultaneous detection of ethyl carbamate and urea in chinese yellow rice wine by HPLC-FLD. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2013, **37**(1), 39-47. ISSN 1082-6076.

[73] ZHANG, J.; LIU, G.; ZHANG, Y.; GAO, Q.; WANG, D.; LIU, H. Simultaneous Determination of Ethyl Carbamate and Urea in Alcoholic Beverages by High-

Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(13), 2797-2802. ISSN 0021-8561.

[74] AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; BENCS, L.; VISZKET, E.; MIHUCZ, V. G. Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2013, **141**(2), 1301-1305. ISSN 03088146.

[75] ZHOU, K.; LIU, Y.; LI, W. Q.; LIU, G. L.; WEI, N.; SUN, Y. M.; BAI, W. D.; XU, Z. L. An Improved HPLC-FLD for Fast and Simple Detection of Ethyl Carbamate in Soy Sauce and Prediction of Precursors. *Food Analytical Methods* [online]. 2017, **10**(12), 3856-3865. ISSN 1936-9751.

[76] MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. *Food Control* [online]. 2009, **20**(2), 139-143. ISSN 09567135.

[77] LI, G.; ZHONG, Q.; WANG, D.; ZHANG, X.; GAO, H.; SHEN, S. Determination and formation of Ethyl Carbamate in Chinese spirits. *Food Control* [online]. 2015, **56**, 169-176 [cit. 2022-04-11]. ISSN 09567135.

[78] DE RESENDE MACHADO, A. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; DOS ANJOS, J. P.; ZACARONI, L. M.; DÓREA, H. S.; NELSON, D. L. Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC. *Food Chemistry* [online]. 2013, **138**(2-3), 1233-1238. ISSN 03088146.

[79] DEÁK, E.; GYEPES, A.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; DERNOVICS, M. Determination of ethyl carbamate in pálinka spirits by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry after derivatization. *Food Research International* [online]. 2010, **43**(10), 2452-2455. ISSN 09639969.

[80] ALBERTS, P.; STANDER, M. A.; DE VILLIERS, A. Development of a novel solid-phase extraction, LC-MS/MS method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages: application to South African wine and spirits. *Journal of Food and Nutrition Research* [online]. 2011, **28**(7), 826-839. ISSN 1944-0049.

[81] STEPAN, H.; PANI, J.; PUMMER, S.; WEBER, M. T.; HOFBAUER, L.; POUR, G.; MAYER-HELM, B.; WERNETH, M. Sensitive Determination of Ethyl Carbamate in

Smokeless Tobacco Products and Cigarette Smoke Using SPE and HPLC–APCI–MS/MS. *Chromatographia* [online]. 2015, **78**(9-10), 675-681. ISSN 0009-5893.

[82] ZHAO, X.; JIANG, Ch. Determination of ethyl carbamate in fermented liquids by ultra high performance liquid chromatography coupled with a Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Food Chemistry* [online]. 2015, **177**, 66-71. ISSN 03088146.

[83] LECA, J. M.; PEREIRA, V.; PEREIRA, A. C.; MARQUES, J. C. Rapid and sensitive methodology for determination of ethyl carbamate in fortified wines using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, **811**, 29-35. ISSN 00032670.

[84] LECA, J. M.; PEREIRA, V.; PEREIRA, A. C.; MARQUES, J. C. A Sensitive Method for the Rapid Determination of Underivatized Ethyl Carbamate in Fortified Wine by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* [online]. 2018, **11**(2), 327-333. ISSN 1936-9751.

[85] LACHENMEIER, D. W. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2005, **382**(6), 1407-1412. ISSN 1618-2642.

[86] MANLEY, M.; VAN ZYL, A.; WOLF, E. E. H. The Evaluation of the Applicability of Fourier Transform Near-Infrared (FT-NIR) Spectroscopy in the Measurement of Analytical Parameters in Must and Wine. *South African Journal of Enology and Viticulture* [online]. 2017, **22**(2). ISSN 22247904.

[87] WEI, X.; HUANG, Z.; ZHANG, W.; DU, Y. Improving the Sensitivity of NIR Spectroscopy with an Enrichment Technique: Determining a Trace Analyte of Ethyl Carbamate. *Analytical Sciences* [online]. 2007, **23**(7), 853-856. ISSN 0910-6340.

[88] DOERING, W. E.; NIE, S. Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2002, **106**(2), 311-317. ISSN 1520-6106.

[89] YANG, D.; ZHOU, H.; YING, Y.; NIESSNER, R.; HAISCH, Ch. Surface-enhanced Raman scattering for quantitative detection of ethyl carbamate in alcoholic beverages.

Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2013, **405**(29), 9419-9425. ISSN 1618-2642.

[90] YANG, D.; MIRCESCU, N. E.; ZHOU, H.; LEOPOLD, N.; CHIS, V.; OLTEAN, M.; YING, Y.; HAISCH, Ch. DFT study and quantitative detection by surface-enhanced Raman scattering (SERS) of ethyl carbamate. *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2013, **44**(11), 1491-1496. ISSN 03770486.

[91] MONAKHOVA, Y. B.; KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D. W. Rapid Quantification of Ethyl Carbamate in Spirits Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. *ISRN Analytical Chemistry* [online]. 2012, 1-5. ISSN 2090-732X.

[92] ZHANG, J.; Liu, Z.; Huang, Q.; Huang, H. Determination of ethyl carbamate in ethanol system based on enzyme inhibition metod. *Science and Technology of Food Industry* [online]. 2015, **36**(2), 65-69.

[93] LU, X.; ZHOU, N.; TIAN, Y. Spectrophotometric determination of ethyl carbamate through bi-enzymatic cascade reactions. *Analytical Methods* [online]. 2015, **7**(4), 1261-1264. ISSN 1759-9660.

[94] ZHANG, Z.; LU, X.; TIAN, Y.; ZHOU, N. High-sensitive Electrochemical Determination of Ethyl Carbamate Using Urethanase and Glutamate Dehydrogenase Modified Electrode. *Electroanalysis* [online]. 2017, **29**(2), 481-488. ISSN 10400397.

[95] LUO, L.; LEI, H. T.; YANG, J. Y. et al. Development of an indirect ELISA for the determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, **950**, 162-169. ISSN 00032670.

[96] KOH, E.; KWON, H. Quantification of ethyl carbamate in soy sauce consumed in Korea and estimated daily intakes by age. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2007, **87**(1), 98-102. ISSN 00225142.

[97] WU, P.; PAN, X.; WANG, L.; SHEN, X.; YANG, D. A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China. *Food Control* [online]. 2012, **23**(1), 286-288. ISSN 09567135.

[98] LEE, K. G. Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented

foods. *European Food Research and Technology* [online]. 2013, **236**(5), 891-898. ISSN 1438-2377.

[99] DOPORUČENÍ KOMISE ze dne 2. března 2010 o prevenci a snížení kontaminace lihovin z peckovin a lihovin z výlisků peckovin ethylkarbamátem a o monitorování obsahu ethylkarbamátu v těchto nápojích: (2010/133/EU).

[100] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/787 ze dne 17. dubna 2019 o definici, popisu, obchodní úpravě a označování lihovin, používání názvů lihovin v obchodní úpravě a při označování jiných potravin, ochraně zeměpisných označení lihovin, používání lihu a destilátů zemědělského původu při výrobě alkoholických nápojů a o zrušení nařízení (ES) č. 110/2008.

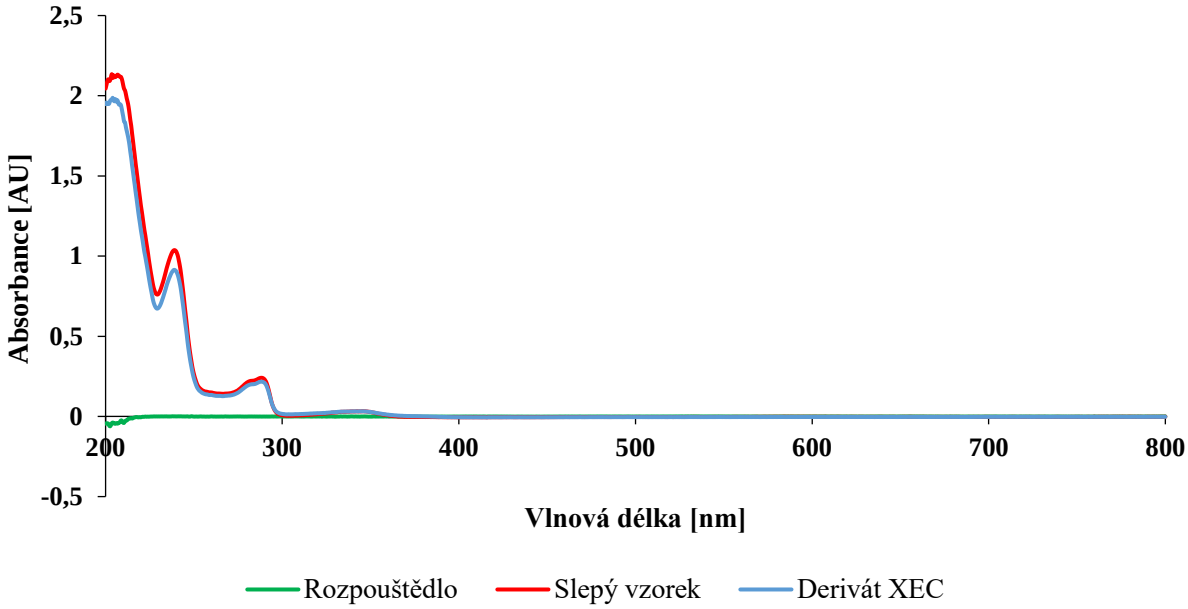
[101] *Žufánek* [online]. 2022 . Dostupné z: https://www.zufanek.cz/

[102] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M.; ČESLA, P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.

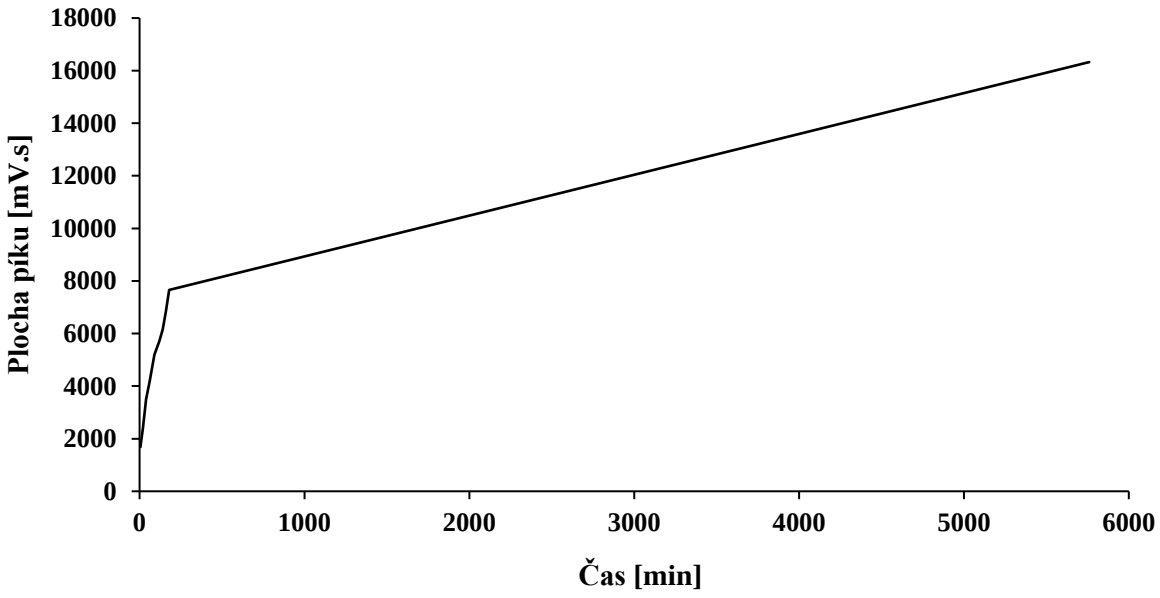
[103] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Journal of AOAC International* [online]. 2016, (1), 1-16.

PŘÍLOHA

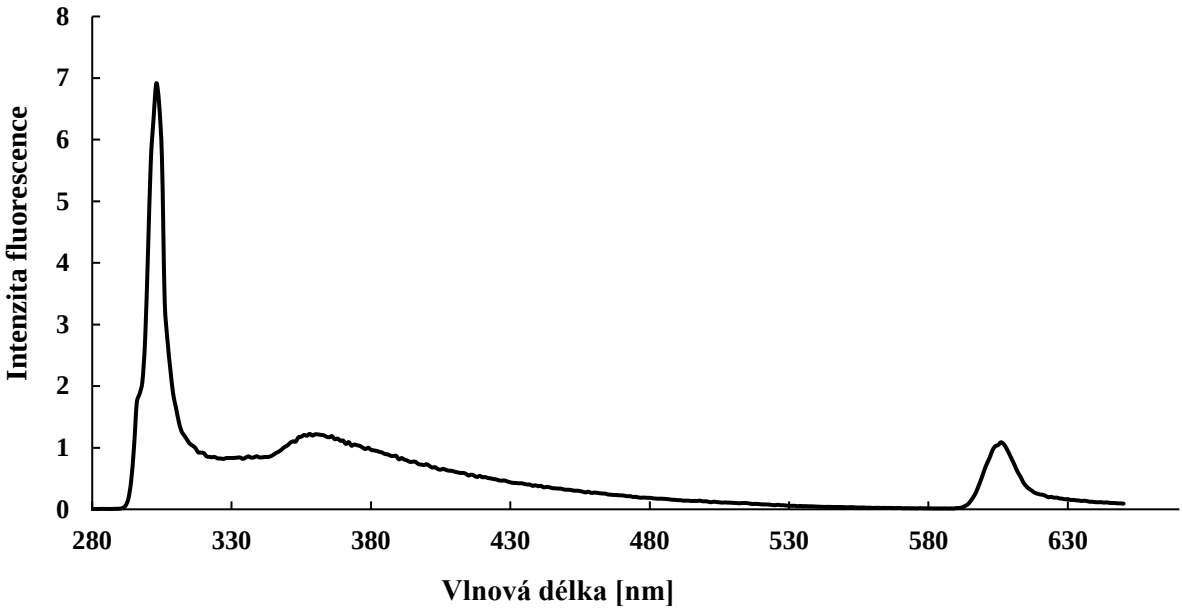
OBRÁZKY



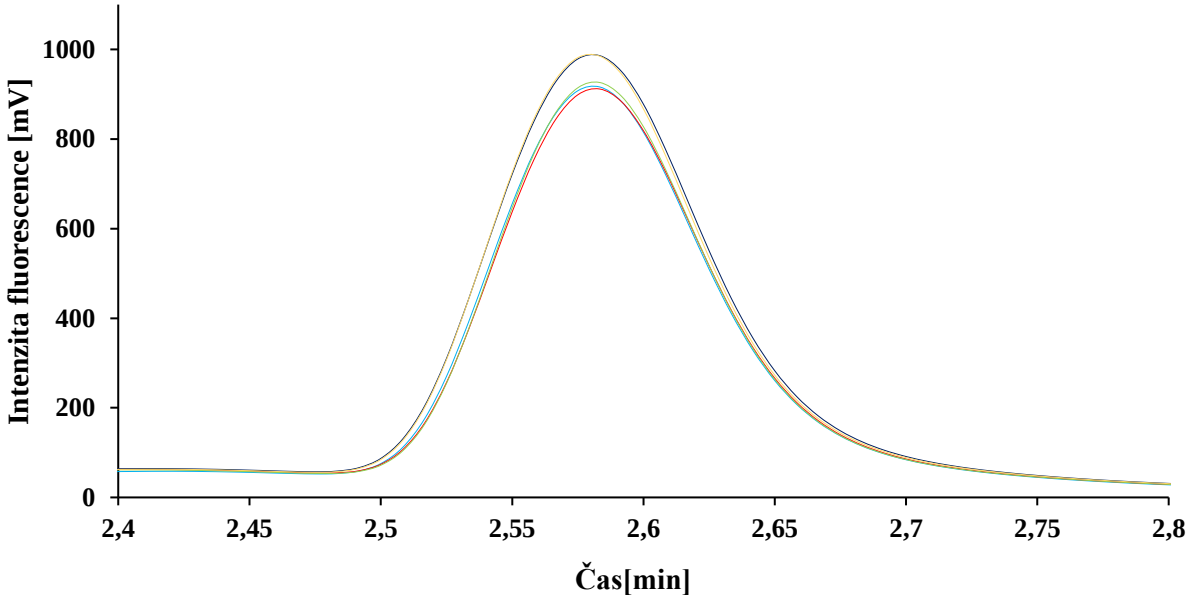
Obrázek P1: UV/VIS spektrum rozpouštědla, slepého vzorku a XEC derivátu.



Obrázek P2: Kinetika derivatizační reakce v prostředí 0,15 mol/l HCl.



Obrázek P3: Emisní spektrum XEC derivátu měřené při λ_{EX}= 300 nm.



Obrázek P4: Chromatografický záznam píků XEC při měření intradenní opakovatelnosti.

TABULKY

Tabulka P1: Stabilita XEC derivátu po dobu 5 dní

Čas měření [min; hod; dny]	**Plocha píku [mV.s]**	**Koncentrace [µg/l]**
5 minut	739,5	224,9
30 minut	4861,6	2069,1
60 minut	4859,0	2068,0
80 minut	4810,7	2021,3
5 hodin	4867,5	2071,8
1 den	4744,8	2016,9
2 dny	4761,7	2024,4
5 dní	4560,6	1984,5