

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Studium reaktivity významných amidů (močoviny a ethylkarbamátu) pro jejich
následné stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Toušková**
Osobní číslo: **C21440**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Studium reaktivity močoviny a ethylkarbamátu pro jejich následné stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na reaktivitu a možnosti stanovení močoviny a ethylkarbamátu v různých matricích. Dále se zaměřte na analýzu jejich derivátů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).
2. V rámci experimentální části najděte taková derivatizační činidla, která s cílovými analyty poskytují fluoreskující nebo absorbující deriváty.
3. Porovnejte vhodnost těchto činidel, a to s ohledem na časovou i manuální náročnost přípravy derivátů, množství přítomných vedlejších produktů, stabilitu výsledného derivátu a jeho využitelnost při HPLC analýzách.
4. Dosažené výsledky diskutujte a kriticky zhodnoťte.

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 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem studium reaktivity významných amidů (močoviny a ethylkarbamátu) pro jejich následné stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, 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 03. 05. 2023

Bc. Monika Toušková

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 studiem reaktivity významných amidů, konkrétně ethylkarbamátu a močoviny, pro jejich následnou analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Teoretická část je věnována především charakteristice ethylkarbamátu, včetně mechanismu a možnosti potlačení jeho vzniku, reaktivitě amidů i karbamátů a v neposlední řadě metodám vedoucím k jeho stanovení, přičemž značná část je věnována jeho předkolumnové derivatizaci. Experimentální část je pak zaměřena na studium reaktivity ethylkarbamátu a močoviny s vybranými derivatizačními činidly, mezi které patří fenylisothiokyanát, dansylchlorid, *p*-toluidin, *p*-nitrofenylhydrazin, 2,4-dinitrofenylhydrazin a *p*-dimethylbenzaldehyd.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ethylkarbamát, močovina, derivatizace, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TITLE

Study of the reactivity of important amides (urea and ethyl carbamate) for their subsequent determination using high-performance liquid chromatography.

ANNOTATION

The diploma thesis deals with the study of the reactivity of important amides, namely ethyl carbamate and urea, for their subsequent analysis using high-performance liquid chromatography. The theoretical part is mainly devoted to the characterization of ethyl carbamate, including the mechanism and the possibility of suppressing its formation, the reactivity of both amides and carbamates and the methods leading to its determination, with a considerable part devoted to its pre-column derivatization. Then, the experimental part focuses on the study of the reactivity of ethyl carbamate and urea with selected derivatization reagents, including phenylisothiocyanate, dansyl chloride, *p*-toluidine, *p*-nitrophenylhydrazine, 2,4-dinitrophenylhydrazine, and *p*-dimethylbenzaldehyde.

KEYWORDS

Ethylcarbamate, urea, derivatization, high-performance liquid chromatography

OBSAH

ÚVOD	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Ethylkarbamát	15
1.1.1 Charakterizace ethylkarbamátu.....	15
1.1.2 Mechanismus vzniku ethylkarbamátu	15
1.1.2.1 Vznik ethylkarbamátu při výrobě či zpracování potravin	16
1.1.2.2 Vznik ethylkarbamátu z aditiv.....	17
1.1.2.3 Vznik ethylkarbamátu při nevhodných podmínkách skladování	18
1.1.3 Výskyt ethylkarbamátu v potravinách a nápojích.....	19
1.1.4 Možnosti potlačení vzniku ethylkarbamátu v potravinách a nápojích	21
1.1.4.1 Šlechtění mikroorganismů.....	21
1.1.4.2 Zpracování surovin a řízení procesu výroby	22
1.1.4.3 Enzymatické metody	22
1.2 Reaktivita amidů a karbamátů	23
1.2.1 Reaktivita amidů	23
1.2.2 Reaktivita karbamátů	26
1.3 Stanovení ethylkarbamátu.....	29
1.3.1 Izolace ethylkarbamátu z matrice	30
1.3.1.1 Extrakce kapalina – kapalina.....	30
1.3.1.2 Extrakce tuhou fází.....	30
1.3.1.3 Head – space mikroextrakce tuhou fází.....	30
1.3.1.4 Extrakce podporovaná tlakem	31
1.3.2 Derivatizace	31
1.3.2.1 Derivatizace pro kapalinovou chromatografii	33
1.3.2.2 Derivatizace pro plynovou chromatografii.....	40
1.3.3 Samotné stanovení ethylkarbamátu	40
1.3.3.1 Plynová chromatografie.....	40
1.3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	41
1.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie s přímým vstřikováním.....	41
1.3.3.4 Infračervená spektrometrie	42
1.3.3.5 Enzymová imunoanalýza.....	42
1.3.3.6 Elektrochemický impedační senzor.....	43

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1	Přístrojové vybavení a pomůcky.....	44
2.2	Použité chemikálie a rozpouštědla.....	45
2.3	Pracovní postupy pro derivatizaci činidlem <i>p</i> -DMAB	45
2.3.1	Příprava zásobních roztoků EC a močoviny	45
2.3.2	Příprava zásobního roztoku derivatizačního činidla <i>p</i> -DMAB.....	46
2.3.3	Derivatizace	46
2.3.4	Chromatografická analýza	46
2.3.5	Validace	46
2.3.5.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti	46
2.3.5.2	Návratnost metody.....	47
2.3.5.3	Opakovatelnost metody	47
2.3.6	Zpracování experimentálních dat.....	48
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
3.1	Derivatizace s fenylisothiokyanátem	49
3.2	Derivatizace s dansylchloridem	55
3.3	Derivatizace aromatickými aminy a hydraziny	60
3.4	Derivatizace s <i>p</i> -dimethylaminobenzaldehydem	62
3.4.1	Optimalizace podmínek separace <i>p</i> -DMAB derivátů EC a močoviny pomocí RP-HPLC	66
3.4.2	Validace analytické metody	68
3.4.2.1	Příprava kalibrační křivky	68
3.4.2.2	Mez detekce a mez stanovitelnosti	70
3.4.2.3	Návratnost metody.....	70
3.4.2.4	Opakovatelnost.....	72
3.4.3	Analýza vzorků	74
	ZÁVĚR	76
	POUŽITÁ LITERATURA	78
	PŘÍLOHA	95

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1:	Chemická struktura ethylkarbamátu.	15
Obrázek 2:	Zjednodušené schéma hlavních mechanismů tvorby ethylkarbamátu ve víně (A) a v lihovinách z peckovin (B), jako jsou třešně či švestky [1].	16
Obrázek 3:	Reakce diethylkarbonátu s amoniakem za vzniku EC a ethanolu [9].	17
Obrázek 4:	Reakce azodikarbonamidu s ethanolem za vzniku EC [11].	18
Obrázek 5:	Schématické znázornění působení ureázy a urethanázy.	23
Obrázek 6:	Chemické struktury amidové skupiny a substituovaných amidů [49].	23
Obrázek 7:	Rezonanční struktury amidu [52].	24
Obrázek 8:	Obecné schéma aktivace karboxylové kyseliny pro následnou tvorbu amidu [52].	25
Obrázek 9:	Chemická struktura močoviny.	25
Obrázek 10:	Chemické struktury karbamové kyseliny (A), karbamátu (B) a keto-enolová tautomerie karbamátů (C) [66; 68].	27
Obrázek 11:	Reakce EC s amoniakem (A) a dikyandiamidem (B) [67; 69].	28
Obrázek 12:	Reakce EC s ethylacetoacetátem za vzniku enamínu [67; 70].	28
Obrázek 13:	Reakce EC s thionylchloridem v neutrálním prostředí za vzniku ethylallofanátu [67].	29
Obrázek 14:	Reakce amidů, močoviny a EC s 9-xanthidolem [89–93].	35
Obrázek 15:	Reakce činidla PIC s primárním aminem a alkoholem [95; 96].	36
Obrázek 16:	Reakce činidla PITC s primárními aminy [100].	36
Obrázek 17:	Reakce činidla p-DMAB s močovinou [106].	37
Obrázek 18:	Reakce činidla DNS-Cl s aminy, alkoholy a fenoly [109–112].	39
Obrázek 19:	Schématické znázornění stanovení EC [130].	43
Obrázek 20:	HPLC separace slepého pokusu (A) a PRO (B) po PITC derivatizaci.	50
Obrázek 20:	HPLC separace močoviny (C) a EC (D) po PITC derivatizaci.	51
Obrázek 21:	UV/VIS spektrum PRO, EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizační reakci s PITC.	52
Obrázek 22:	HPLC separace slepého pokusu (A) a PRO (B) po PITC derivatizaci se sušícími kroky.	53
Obrázek 22:	HPLC močoviny (C) a EC (D) po PITC derivatizaci se sušícími kroky.	54
Obrázek 24:	UV/VIS spektrum PRO, EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizační reakci s DNS-Cl.	56

Obrázek 23:	HPLC separace PRO, EC, močoviny a slepého pokusu po DNS-Cl derivatizaci.	56
Obrázek 25:	HPLC separace EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizaci s DNS-Cl v přítomnosti TEA.	58
Obrázek 26:	UV/VIS spektra močoviny, EC, PRO a slepého pokusu po reakci s DNS-Cl v přítomnosti TEA.	58
Obrázek 27:	HPLC separace EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizaci s DNS-Cl v přítomnosti pyridinu.	59
Obrázek 28:	Chemické struktury 2,4-dinitrofenylhydrazinu, p-nitrofenylhydrazinu a p-toluidinu.	60
Obrázek 29:	Spektra EC po reakci s p-nitrofenylhydrazinem (A) a p-toluidinem (B).	61
Obrázek 29:	Spektra EC po reakci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (C).	62
Obrázek 30:	UV/VIS spektra močoviny, EC, a slepého pokusu po reakci s p-DMAB dle literatury [139].	63
Obrázek 31:	UV/VIS spektra močoviny, EC, a slepého pokusu po reakci s p-DMAB dle literatury [141].	63
Obrázek 32:	Derivát močoviny po reakci s 183mM p-DMAB měřený po 2, 10 a 60 minutách.	64
Obrázek 33:	Derivát EC po reakci s 183mM p-DMAB měřený po 2, 10 a 60 minutách.	65
Obrázek 34:	Derivát močoviny po reakci s různě koncentrovanými roztoky činidla p-DMAB.	65
Obrázek 35:	Derivát EC po reakci s různě koncentrovanými roztoky činidla p-DMAB.	66
Obrázek 36:	HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s p-DMAB.	68
Obrázek 37:	Kalibrační závislosti sumy ploch obou píků derivátů močoviny a plochy derivátu EC na jejich koncentraci.	69
Obrázek 38:	Kalibrační závislost Absorbance na celkové koncentraci EC a močoviny.	70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Maximální přípustné koncentrace ethylkarbamátu ($\mu\text{g/l}$) ve vybraných alkoholických nápojích [4; 9].	20
Tabulka 2: Kolony používané pro jednotlivé derivatizační postupy.	44
Tabulka 3: Naměřené hodnoty ploch píků, vypočtené koncentrace, návratnosti a relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrační hladiny EC.	71
Tabulka 4: Naměřené hodnoty sumy ploch píků obou derivátů močoviny, vypočtené koncentrace, návratnosti a relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrační hladiny.	71
Tabulka 5: Intradenní a mezidenní opakovatelnost koncentrací, ploch píků a retenčních časů pro EC.	72
Tabulka 6: Intradenní opakovatelnost koncentrací, sumy ploch píků a retenčních časů pro močovinu.	73
Tabulka 7: Mezidenní opakovatelnost koncentrací, sumy ploch píků a retenčních časů pro močovinu.	73
Tabulka 8: Množství močoviny stanovené v ovocných pálenkách.	74
Tabulka 9: Množství EC stanovené v ovocných pálenkách.	75

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

9-XA	9-xanthydrol
ACN	acetonitril
ADA	azodikarbonamid
AOAC	Asociace analytických chemiků
AQC	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl- <i>N</i> -chinolin-6-ylkarbamát
AFID	plamenově ionizační detektor se solí alkalického kovu
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
BSA	bis(trimethylsilyl)acetamid
DEEMM	diethyl-ethoxymethylenemalonát
DNS-Cl	dansylchlorid
EC	ethylkarbamát
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ESI	ionizace elektrosprejem
ELISA	kompetitivní enzymová imunosorpční analýza
EtOH	ethanol
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FAO	Organizace spojených národů pro výživu a zemědělství
FMOC-Cl	9-fluorenylmethyl-chlorformiát
FID	plamenově ionizační detektor
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HS-SPME	head-space mikroextrakce tuhou fází
HMDS	hexamethyldisilazan
HECD	Hallův konduktometrický detektor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
JECFA	Mezinárodní vědecký výbor expertů pro potravinářská aditiva
LLE	extrakce kapalina - kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MetOH	methanol
MF	mobilní fáze

NADH	nikotinadenindinukleotid
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
PLE	extrakce podporovaná tlakem
PITC	fenyliothiokyanát
<i>p</i>-DMAB	<i>p</i> -dimethylbenzaldehyd
PRO	prolin
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
RSD	relativní směrodatná odchylka
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SPE	extrakce tuhou fází
SD	směrodatná odchylka
TEA	triethylamin
TMCS	trimethylchlorsilan
TMSI	trimethylsilylimidazol
WHO	Světová zdravotnická organizace
XEC	xantylethylkarbamát

ÚVOD

Ethylkarbamát je chemická sloučenina vyskytující se především v kvašených potravinách a alkoholických nápojích. Jelikož obvykle vzniká při procesu výroby daného produktu v důsledku fermentace potravin či destilace lihovin z přítomných prekurzorů, mezi které řadíme mimo jiné i močovinu, je ethylkarbamát často nazýván procesním kontaminantem. V roce 2007 byl Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny označen za látku potencionálně karcinogenní pro člověka, kvůli čemuž se stal středem pozornosti mnoha výzkumů po celém světě, zaměřených na eliminaci jeho vzniku i vývoj nových metod jeho stanovení či vylepšení již používaných.

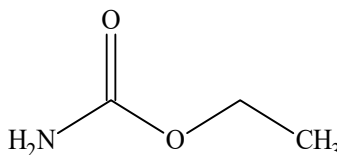
Ethylkarbamát lze chemicky popsat jako poměrně malou sloučeninu bez chromoforu či fluoroforu, což je také důvodem, proč je nutné ji před chromatografickou analýzou derivatizovat a tedy umožnit jeho následnou detekci. Cílem této diplomové práce bylo porovnat reaktivitu ethylkarbamátu i jeho prekurzoru močoviny s vybranými derivatizačními činidly pro následnou analýzu pomocí kapalinové chromatografie, jelikož doposud je v literatuře popsána pouze derivatizace s 9-xanthidolem. Protože obsahuje aminovou skupinu bylo předpokládáno, že by mohl reagovat s činidly používanými právě pro derivatizaci aminů či amidů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Ethylkarbamát

1.1.1 Charakterizace ethylkarbamátu

Ethylester kyseliny karbamové (Obrázek 1), jinak nazývaný jako urethan či ethylkarbamát (EC; $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$), je bezbarvá krystalická látka s molekulovou hmotností 89,09 g/mol, bodem varu 182–184 °C a bodem tání 48–50 °C, která je při pokojové teplotě těkavá a snadno sublimuje už při 103 °C a tlaku 7,2 kPa. Je dobře rozpustný ve vodě (až 2 g/ml při 25 °C), v níž vykazuje neutrální pH, a také např. v benzenu, ethanolu, chloroformu, etheru a glycerolu [1–4].



Obrázek 1: Chemická struktura ethylkarbamátu.

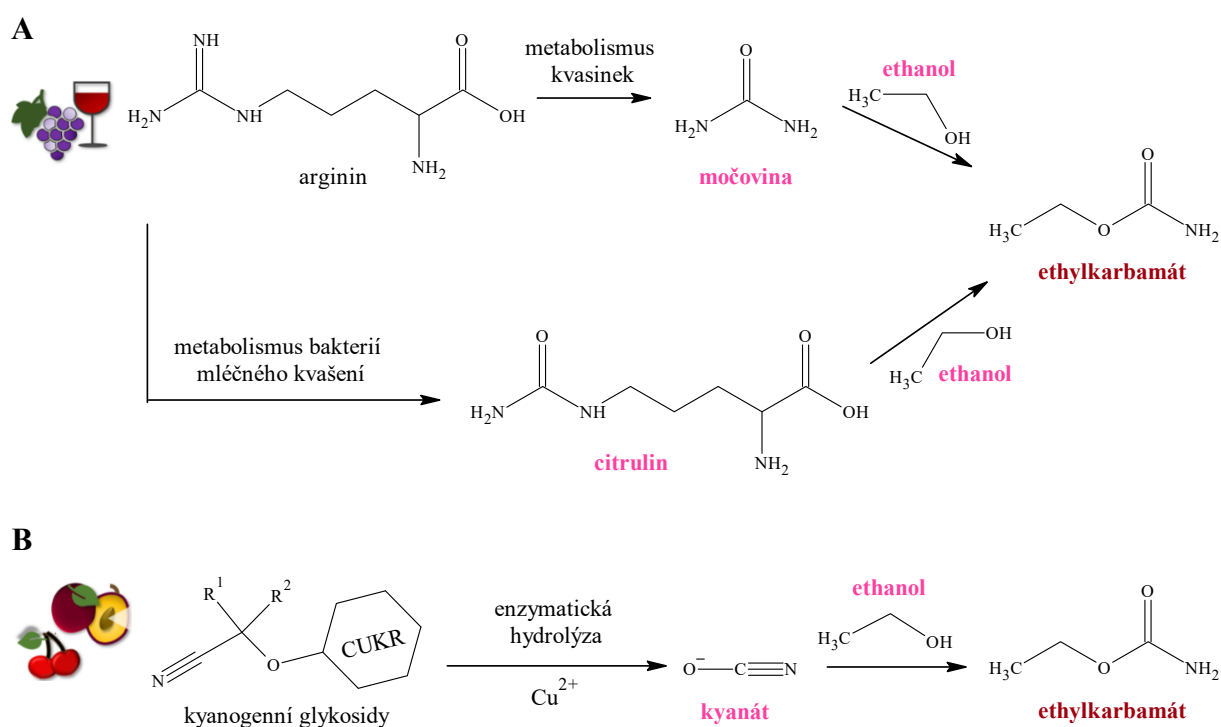
Jelikož EC vykazoval u pokusných zvířat (myši, krysy, křečci a opice) prokazatelné genotoxické a karcinogenní účinky, byl Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC), patřící pod Světovou zdravotnickou organizaci, v roce 2007 klasifikován jako karcinogen skupiny 2A, tedy pravděpodobný karcinogen pro člověka [3; 5–7].

1.1.2 Mechanismus vzniku ethylkarbamátu

Kvůli výše zmíněným zdravotním rizikům je EC stále předmětem značného výzkumu. Abychom mohli učinit patřičná opatření vedoucí ke snížení či zamezení vzniku EC v nápojích a potravinách, je zásadní znát mechanismus a podmínky jeho tvorby. EC může v potravinářských výrobcích vznikat především během jejich výroby či zpracování (např. při jejich fermentaci nebo destilaci), dále při použití některých aditiv, které mohou být prekurzory EC, a v neposlední řadě i při nevhodně zvolených podmínkách skladování. Zároveň jsou známy i faktory podporující vznik EC napříč celým zemědělsko-potravinářským řetězcem, mezi které patří zvýšená teplota, přítomnost přechodných kovů a také nízké pH či působení UV záření. Z těchto důvodů je EC považován za tzv. procesní kontaminant [1; 6; 7].

1.1.2.1 Vznik ethylkarbamátu při výrobě či zpracování potravin

EC může v potravinách či nápojích vznikat naprosto přirozeně, a to hned několika cestami, jež závisí na povaze sledovaných potravinářských produktů, jejich výrobním procesu a výskytu prekurzorů ve výchozích surovinách [7; 8]. Typickým příkladem jsou fermentované výrobky, v nichž EC vzniká reakcí ethanolu – produktu alkoholového kvašení – se sloučeninami odvozenými od kyseliny karbamové (tzv. karbamoyl sloučeniny), mezi něž patří třeba močovina či citrulin (Obrázek 2A), nebo reakcí s kyanáty, tedy estery kyseliny kyanaté (Obrázek 2B) [1; 7–9].



Obrázek 2: Zjednodušené schéma hlavních mechanismů tvorby ethylkarbamátu ve víně (A) a v lihovinách z peckovin (B), jako jsou třešně či švestky [1].

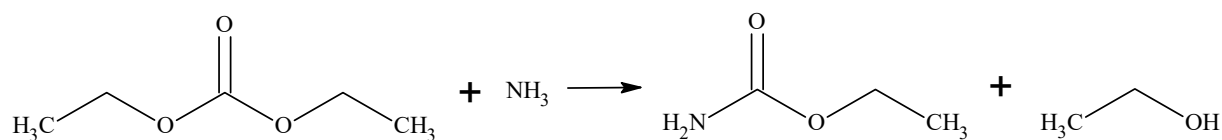
Zatímco citrulin je v malém množství obsažen třeba v hroznové šťávě, močovina se nachází v mnoha fermentovaných potravinách, jako je jogurt, sýry nebo chléb, ale také v nealkoholických i alkoholických nápojích. V poměrně vysokých koncentracích (až několik stovek mg/l) ji lze stanovit již v surovinách, například v mléce. Většina těchto prekurzorů však vzniká katabolismem mikrobů. Jak lze ale vidět na Obrázku 2A, močovina i citrulin vznikají z běžné aminokyseliny argininu, která se ve vysokých koncentracích nachází například v hroznech. Zatímco močovina je produktem metabolismu argininu kvasinkami, citrulin se

z něho produkuje v důsledku působení mléčných bakterií. Tyto prekurzory pak reagují s ethanolem za vzniku EC [1; 6]. Za běžné pokojové teploty je reakce močoviny či citrulinu s ethanolem poměrně pomalá, ale je dokázáno, že se kinetika této reakce dramaticky zvyšuje se zvyšující se teplotou. Proto tvorbu EC akceleruje tepelná úprava nápojů či potravin, ať už se jedná o pečení, vaření či restování [1; 6; 7].

EC je ale i produktem reakce ethanolu s kyanáty, jenž vznikají enzymatickou hydrolyzou kyanogenních glykosidů (Obrázek 2B). Existuje více než 2000 druhů rostlin, které produkují kyanogenní glykosidy a současně i příslušný hydrolytický enzym. Významné množství těchto substrátů nalezneme v ovocných peckách (nejčastěji meruněk, švestek či třešní), jejichž hlavním kyanogenním glykosidem je sloučenina zvaná amygdalin. Jelikož jsou pecky běžnou součástí kvasu pro výrobu pálenek, je právě tato potravinářská komodita hojným zdrojem EC v naší dietě. Dalšími plodinami bohatými na kyanogenní glykosidy jsou například obilná zrna, cukrová třtina a maniok, jež jsou rovněž i surovinami pro výrobu alkoholických nápojů, jako je whisky, rum či brazilská cachaça a tiquira. Jak lze vidět na Obrázku 2B, katalyzátorem vzniku kyanátů jsou ionty mědi, které se do procesu dostávají například z měděných nádob používaných při destilaci. Bylo zjištěno, že v destilátech vzniká cca 80 % EC již během destilace nebo do 48 hodin po ní, na což má vliv právě přítomnost kovových solí. EC poté vzniká jako produkt katalyzované reakce ethanolu s prekurzory EC vznikajícími v plynné fázi během destilačního procesu [1; 3; 6–8].

1.1.2.2 Vznik ethylkarbamátu z aditiv

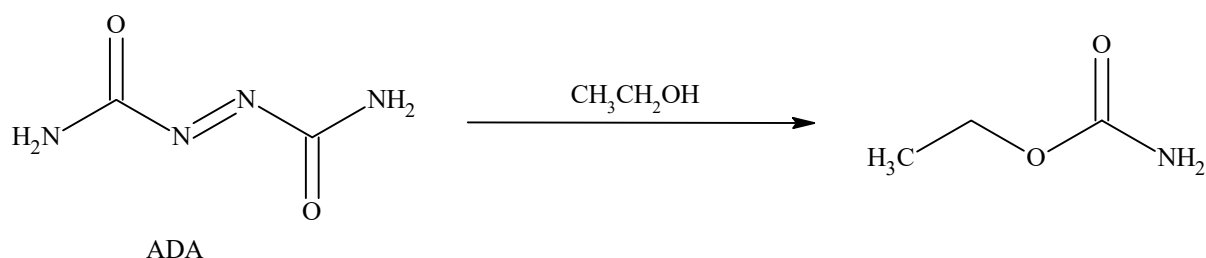
Některá potravinářská aditiva jsou zároveň i prekurzory EC. Jedním z nich je diethylkarbonát, který se přidává do potravin a nápojů jako stabilizátor zabraňující mikrobiálnímu kažení. Toto aditivum pak reaguje s amoniakem za vzniku EC (Obrázek 3) [7; 9].



Obrázek 3: Reakce diethylkarbonátu s amoniakem za vzniku EC a ethanolu [9].

Dalším aditivem, ze kterého EC vzniká ve vodně – alkoholickém prostředí, je azodikarbonamid (ADA). V těstě vzniká EC z ADA především v průběhu pečení, stejně jako další vedlejší produkty, mezi které patří semikarbazid či bimočovina. Toto aditivum se v potravinářském průmyslu používá nejen jako nadouvadlo ve vložkách uzávěrů pивních lahví, ale hlavně jako

bělící činidlo obilných mouk, které navíc zlepšuje kvalitu těsta v pekárenském průmyslu. Kvůli potenciálním zdravotním rizikům je jeho použití v Austrálii a Evropě již zakázáno, nicméně ve Spojených státech, Kanadě a Asii je stále ještě běžným aditivem mouk, jehož maximální povolené množství je stanoveno na 45 mg/kg mouky [7; 10; 11].



Obrázek 4: Reakce azodikarbonamidu s ethanolem za vzniku EC [11].

1.1.2.3 Vznik ethylkarbamátu při nevhodných podmínkách skladování

Bylo zjištěno, že tvorbu EC a jeho prekurzorů katalyzují i některé fyzikální faktory, mezi něž patří především zvýšená teplota a UV záření [7]. V jedné čínské studii například zkoumali změny obsahu EC a močoviny v čínském rýžovém víně Huangjiu skladovaném za různých podmínek. Obvykle bývá v Huangjiu více než 10 mg/l močoviny, což je více než v jiných fermentovaných alkoholických nápojích. Bylo zjištěno, že čím vyšší je skladovací teplota výrobku a delší doba skladování, tím větší množství EC se tvoří, přičemž toto tvrzení bylo ověřeno na reálných i simulovaných vzorcích [12]. Ve studii zaměřené na vznik EC ve vzorcích lihoviny cachaça skladované ve skleněných lahvích po dobu 6 měsíců byl jasně dokázán dopad světla a doby skladování na měřené vzorky. Až 70 % ze všech zkoumaných vzorků bylo ovlivněno právě přítomností světla. Nejmenší koncentrace EC vykazovaly tedy vzorky skladované ve tmě. U některých vzorků skladovaných za tmy došlo po 6 měsících dokonce k mírnému poklesu koncentrace EC. Naopak nejvyšší nárůst koncentrace EC pak byl naměřen u vzorků s významnou světelnou expozicí [13]. Fotochemické reakce totiž vedou ke vzniku reaktivních radikálů (např. hydroxylový radikál), jejichž působení vede mimo jiné i ke vzniku EC [8; 1]. Vliv světla a tepla na koncentraci EC byl zkoumán i ve vínech skladovaných po dobu 3–12 měsíců. Jelikož po 12 měsících skladování ve tmě při 43 °C se množství EC ve dvou červených vínech zvýšil až 30krát, bylo opět dokázáno, že zvýšená teplota významně ovlivňuje tvorbu EC. Naopak expozice světlu nijak markantně neovlivnila žádný z analyzovaných vzorků [14], což není v souladu s výsledky předchozích výzkumů. Obdobné závěry však prezentuje i další práce zaměřená na změny koncentrace EC, tentokrát ve vzorcích brazilské lihoviny cachaça skladované v lahvích různé barvy (a tedy i s různým působením světla). V této studii

nebyla zaznamenána žádná spojitost mezi barvou láhve a nalezenou koncentrací EC [15]. Pro porovnání vlivu UV záření a světla lze uvést další dvě studie, kdy v rámci první byly vzorky pálenek z peckovic vystaveny přímému UV záření za použití lampy po dobu čtyř hodin a byl zaznamenán průměrný nárůst koncentrace EC o 1300 $\mu\text{g/l}$ [16]. Ve druhé studii byly vzorky lihovin z cukrové třtiny vystaveny pouze okolnímu světlu po dobu šesti měsíců. V tomto případě došlo k mírnějšímu nárůstu koncentrace EC, konkrétně o cca 20 % [17]. Potravinářské produkty je tedy nutné chránit před expozicí zmíněných fyzikálních vlivů v průběhu celé výroby a skladování.

1.1.3 Výskyt ethylkarbamátu v potravinách a nápojích

Konzumace fermentovaných potravin a nápojů je rozšířená po celém světě. Popularita těchto produktů je částečně dána i tím, že díky fermentačnímu procesu obsahují významné množství zdraví prospěšných bioaktivních látek, které napomáhají snižovat krevní tlak, přispívají k prevenci chronických onemocnění a vykazují protizánětlivé a antioxidační účinky [18]. Na druhou stranu během fermentace dochází také k riziku vzniku nebezpečných sloučenin, mezi které patří mimo jiné právě i EC [3; 6; 18].

V alkoholických nápojích bývají detekovány mnohem vyšší koncentrace EC než v potravinách. Hlavním důvodem je výskyt většího množství prekurzorů, ze kterých EC následně vzniká [1; 7]. V rámci Evropské unie nebyly doposud stanoveny nejvyšší přípustné koncentrace EC v alkoholických nápojích, a tak si některé země stanovily tyto limity samy (Tabulka 1). Prvním průkopníkem v této problematice byla Kanada, která si na vybrané komodity stanovila vnitrostátní limity již v roce 1986. Česká republika ji následovala a zvolila stejné limity, které platily až do roku 2012, kdy byla tato vyhláška zrušena. V současné době platí vyhláška Evropské komise z roku 2010, která je však benevolentnější a u lihovin vyrobených z peckovin doporučuje dodržení maximálního limitu 1000 $\mu\text{g/l}$ [1; 4; 6; 9; 19; 20].

Tabulka 1: Maximální přípustné koncentrace ethylkarbamátu ($\mu\text{g/l}$) ve vybraných alkoholických nápojích [4; 9].

	Víno	Fortifikované víno	Destilovaná lihovina	Saké	Ovocná pálenka
Česká republika	30	100	150	200	1000
Německo	-	-	-	-	1000
Francie	-	-	150	-	1000
Švýcarsko	-	-	-	-	1000
USA	15	60	-	-	-
Kanada	30	100	150	200	400

Jeden z prvních průzkumů zaměřený na množství EC v alkoholických nápojích provedl americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) již v roce 1986. Tehdy bylo analyzováno 89 vzorků vín a destilovaných lihovin. U 77 analyzovaných vzorků byl EC kvantifikován v koncentracích pod $100 \mu\text{g/l}$. Tuto hranici překročily pouze vzorky fortifikovaných vín (sherry a portské), u kterých se koncentrace EC blížily až $500 \mu\text{g/l}$ [21]. Jelikož mezinárodní vědecký výbor expertů pro potravinářská aditiva (JECFA) řízený Organizací spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO) disponoval malým množstvím dat týkajících se přítomnosti EC v potravinách a nápojích, vydal Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) v roce 2006 výzvu členským státům EU k předložení údajů o obsahu EC v potravinách a nápojích. Na tuto výzvu reagovalo 7 států, které poskytly výsledky měření za období od roku 1998 do 2006. Většinu vzorků představovaly alkoholické nápoje, z nichž nejvyšší koncentrace EC obsahovaly ovocné pálenky, a to až $260 \mu\text{g/l}$ [6; 9].

Aktuálnější výzkum z roku 2021 provedený v Korei se zabýval analýzou 145 vzorků různých alkoholických nápojů, z nichž dokonce 90 % obsahovalo EC. Nejvyšší koncentrace EC byly opět pozorovány u alkoholických nápojů z peckovin. EC byl v největším množství stanoven ve švestkovém víně ($183 \mu\text{g/l}$). Vysoké koncentrace EC se vyskytovaly i v neovocných destilátech a saké. Koncentrace EC v pivu ($4,5 \mu\text{g/l}$), sodžu ($9,7 \mu\text{g/l}$) a rýžovém víně ($2,8 \mu\text{g/l}$) byly relativně nízké, ale kvůli globálně vysoké spotřebě těchto nápojů by i přesto mohly být hlavními zdroji expozice EC [22]. Další analýzy vzorků piva a stolního vína provedené v Asii, Evropě, Severní Americe a Jižní Africe rovněž prokázaly poměrně nízký obsah EC v těchto komoditách

(maximální naměřená koncentrace nepřekročila 60 µg/l) [23–28]. Pro porovnání lze zmínit studii z roku 2004, ve které byla ve Spojeném království prováděna analýza vzorků fortifikovaných vín a lihovin. Obohacená vína typu portské či sherry obsahovala EC v koncentracích mezi 14–60 µg/l, přičemž mezi nimi nebyl pozorován markantní rozdíl. Hladiny v lihovinách se však značně lišily. Pálenky z peckovin průměrně obsahovaly více EC než ostatní vzorky. Jeden vzorek třešňové pálenky v rámci dané studie ale naprosto vyčníval, jelikož obsahoval dokonce 6000 µg EC/l [29]. EC byl analyzován i napříč různými druhy lihovin. Například skotská a sladová whisky obsahovaly koncentrace EC v rozmezí 15–100 µg/l. Lihoviny z fermentované agáve (např. tequila) vykazovaly průměrnou hladinu EC 50 µg/l. Naopak v ginu a vodce nebyl EC detekován [30; 31].

Přestože je množství EC v potravinách obecně nižší než v alkoholických nápojích, jeho koncentrace jsou i tak sledovány. Jedná se především o pečivo, fermentované mléčné výrobky, nakládanou zeleninu, sójovou omáčku a ocet [1; 18]. V kvasových chlebech může ke vzniku EC docházet hned dvěma způsoby: buď reakcí ethanolu s kyanátem, který pochází již z obilných zrn použitých pro výrobu mouky, a nebo s močovinou vznikající z aminokyselin v důsledku působení kvasinek [1; 3]. U 104 zkoumaných vzorků chleba z Kanady, Německa, USA a Hong Kongu činila průměrná koncentrace EC 2,6 µg/kg [32–35]. V rámci jiných studií byly analyzovány vzorky chleba pořízené na korejské tržnici, v nichž byla průměrná koncentrace EC 1,7 ng/kg [36–38]. U sójových omáček se koncentrace EC lišila dle toho, zda daná omáčka prochází v rámci výroby procesem fermentace či nikoli [39]. U tradiční fermentované sojové omáčky byly naměřeny koncentrace EC vždy vyšší a dosahovaly až 130 µg/l [39]. U mléčných výrobků je množství nalezeného EC proměnlivé. Sýry a jogurty obvykle neobsahovaly EC vůbec nebo pouze ve velmi nízkých koncentracích (maximálně 16 µg/kg) [40; 41].

1.1.4 Možnosti potlačení vzniku ethylkarbamátu v potravinách a nápojích

Jak eliminovat nebo alespoň omezit tvorbu EC ve fermentovaných produktech je v posledních letech velmi populárním tématem. Příslušné strategie jsou založeny především na výběru vhodných surovin, správně optimalizovaném fermentačním procesu, šlechtění nových kmenů mikroorganismů nebo aplikaci enzymů, které degradují nebo eliminují vznik EC či jeho prekurzorů [1; 42; 43].

1.1.4.1 *Šlechtění mikroorganismů*

Hlavním důvodem vzniku EC ve fermentovaných potravinách a nápojích je právě činnost mikroorganismů. Proto je výběr vhodného druhu mikroorganismu jedním z důležitých faktorů

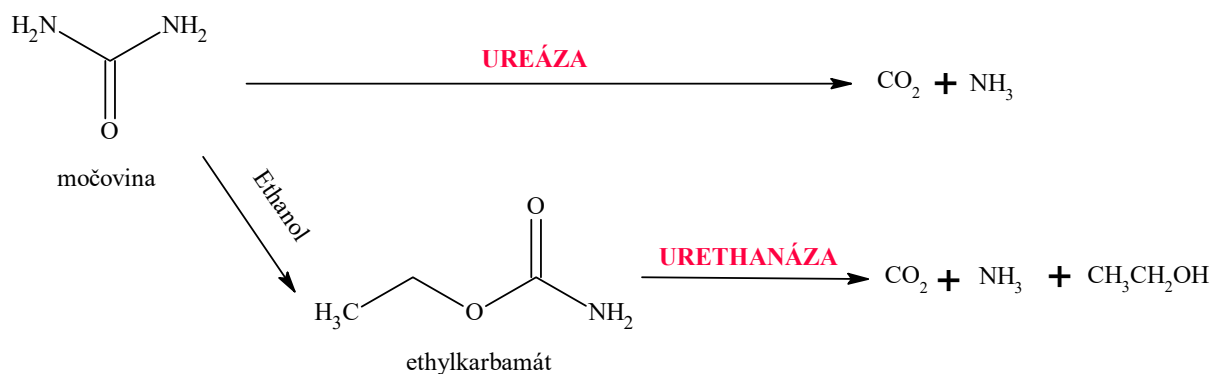
určujícím kvalitu daného fermentovaného produktu. Šlechtěním tradičně používaných mikroorganismů (jakým je zejména kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*) je navíc možné docílit menší produkce EC a močoviny během fermentace. Například nově vyvinutý kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* XZ-11 snížil tvorbu močoviny až o 50 % oproti klasickému průmyslovému kmenu [42]. Další možností je použití zcela jiných rodů kvasinek. Osvědčily se třeba kvasinky rodu *Schizosaccharomyces pombe* nebo *Zygosaccharomyces bailii*, které produkují mnohem menší množství močoviny, kterou následně i účinněji odbourávají [1; 42; 44].

1.1.4.2 Zpracování surovin a řízení procesu výroby

Způsobem pěstování daných plodin, rafinací surovin určených pro fermentaci či vhodně optimalizovaným výrobním postupem lze snížit obsah prekurzorů EC, a to včetně argininu, močoviny nebo kyseliny kyanovodíkové. Jelikož pecky obsahují velké množství kyanidu a kyanogenních glykosidů, je například odpeckování plodů před jejich rmutováním účinným nástrojem vedoucím ke snížení množství EC v ovocných destilátech [42; 43]. Během samotné fermentace lze pak eliminace prekurzorů docílit především řízenou fermentační teplotou nebo přidavkem exogenních inhibitorů, mezi které řadíme například kyselinu protokatechovou či gallovou, kvercetin a ornithin. Zmíněné inhibitory jsou využívány zejména při výrobě čínského rýžového vína nebo sójové omáčky [42].

1.1.4.3 Enzymatické metody

Enzymatické metody jsou výhodné v tom, že díky nim lze redukovat produkci či množství EC nebo přítomných prekurzorů EC i po fermentaci. Mezi takové enzymy patří ureáza či urethanáza. Ureázy se vyskytují v mnoha mikroorganismech a jsou schopné rozkládat močovinu až na oxid uhličitý a amoniak (Obrázek 4) [42; 43]. Pro rozklad močoviny v alkoholických nápojích je používána především ureáza aktivní v kyselém prostředí, tedy optimálně při pH 4 – 4,5. Tento druh enzymu je pak při 35 °C schopný rozložit až 85 % močoviny za týden [43]. Tento enzym je přidáván přímo do hotových výrobků, ať už se jedná o potraviny nebo alkoholické nápoje. Je ale třeba brát v úvahu přítomnost kyseliny jablečné, fluoridu a fenolických látek, které aktivitu ureázy snižují [45]. Druhým enzymem je urethanáza, která degraduje přímo EC na amoniak, ethanol a oxid uhličitý (Obrázek 4). Do alkoholických nápojů se přidávají urethanázy působící v alkalickém i kyselém prostředí, přičemž jejich účinek se u různých alkoholických nápojů značně liší. Oba enzymy musí být před jejich zavedením do výrobního procesu vždy řádně testovány [42–44].

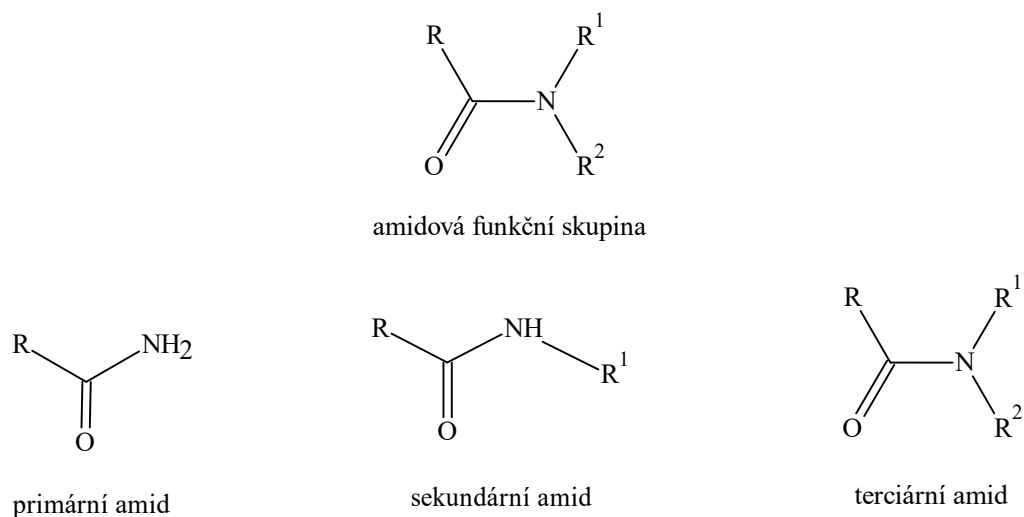


Obrázek 5: Schématické znázornění působení ureázy a urethanázy.

1.2 Reaktivita amidů a karbamátů

1.2.1 Reaktivita amidů

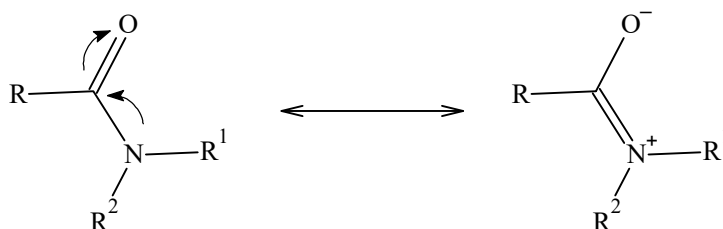
Jelikož EC ve své struktuře v podstatě obsahuje amidovou skupinu, mohl by být amidům podobný i z hlediska reaktivity. Amidy obsahují centrální atom uhlíku, který má dvojnou vazbu ke kyslíku a jednoduchou vazbu k dusíku. Pokud jsou zbývající dvě vazby na atomu dusíku vázány na vodíky, jedná se o jednoduchý amid. Pokud jsou jedna nebo obě zbývající vazby na dusíku vázány na alkylové nebo arylové skupiny, jedná se o substituovaný amid. Obecné struktury zmíněných amidů jsou znázorněny na Obrázku 6 [46–48].



Obrázek 6: Chemické struktury amidové skupiny a substituovaných amidů [49].

Amidy patří spolu s estery, acylhalogenidy, anhydridy a nitrily mezi nejběžnější funkční deriváty karboxylových kyselin. Z hlediska reaktivity jsou však z výše jmenovaných nejméně reaktivní. To je způsobeno výrazným zapojením elektronového páru atomu dusíku do

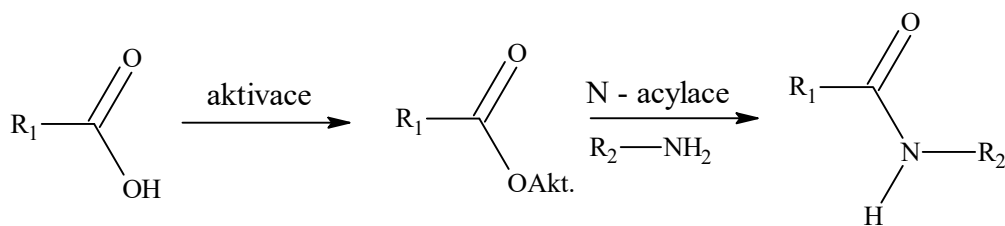
konjugace se sousedním acylovým zbytkem, což znesnadňuje nukleofilní acylové substituce. Atom dusíku v tomto uspořádání rovněž ztrácí svůj pyramidální charakter uspořádání vazeb, jež má v aminech, a zčásti přechází z sp^3 hybridizace na hybridizaci sp^2 . Následkem pak je rovinné uspořádání atomů vázaných v amidové vazbě a samotná vazba C-N má částečný charakter dvojné vazby (Obrázek 7) [50–52].



Obrázek 7: Rezonanční struktury amidu [52].

Na rozdíl od acylhalogenidů, anhydridů a esterů nepodléhají amidy snadno reakcím s alkoholy či aminy. Primární a sekundární amidy dokonce nereagují ani s tak silnými nukleofily, jako jsou Grinardova činidla, s nimiž dojde pouze k deprotonaci dusíku [48; 50].

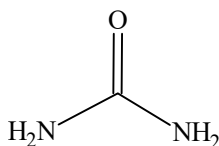
Amidové vazby jsou samy o sobě pro člověka velmi důležité, jelikož se uplatňují při reakci dvou aminokyselin, při níž tak vzniká peptidový řetězec. Této specifické vazbě se pak říká peptidová a slouží pro biosyntézu peptidů, potažmo bílkovin. Jak již bylo zmíněno, amidy jsou nejméně reaktivní funkční deriváty karboxylových kyselin, což je z hlediska stability bílkovin výhodné pro lidský organismus [52–53]. Amidové vazby jsou také nezbytnou součástí materiálového či medicínsko – agrochemického průmyslu. To dokazuje i průzkum z roku 2008 zabývající se molekulami syntetizovanými pro aplikace v lékařské chemii, který odhalil, že přes 50 % zkoumaných léčiv obsahovalo alespoň jednu amidovou vazbu [53]. Přímá syntéza amidů z karboxylových kyselin vyžaduje drastické reakční podmínky, a proto se současné výzkumy zabývají vývojem reakcí probíhajících za mírnějších podmínek. Za tímto účelem se nejprve provádí tzv. aktivace karboxylové kyseliny (Obrázek 8), které může být dosaženo acylovými, dekarboxylačními nebo radikálovými reakcemi. Příkladem aktivace karboxylové kyseliny pro tvorbu amidu je převedení na anhydrid či acylchlorid za příslušných reakčních podmínek. N-acylační reakce aminů s použitím aktivovaných karboxylových kyselin (Obrázek 8) se v současnosti stala jednou z nejvíce rozšířených reakcí ve farmaceutickém průmyslu [46; 48–52; 54].



Obrázek 8: Obecné schéma aktivace karboxylové kyseliny pro následnou tvorbu amidu [52].

Reakce močoviny

Močovina ((NH₂)₂CO; diamid kyseliny uhličitě) je nejrozšířenějším derivátem kyseliny uhličitě (Obrázek 9). Průmyslově se vyrábí zahříváním oxidu uhličitěho s amoniakem na 130 °C při tlaku 5 MPa, kdy v prvním kroku vzniká amonná sůl karbamové kyseliny, jež se následně dehydratuje na močovinu. Chemická struktura močoviny obsahuje dvě aminové skupiny, přičemž jedna z nich podléhá disperzním silám za vzniku dipólu a druhá tak zůstává volná, podobně jako v aminech. Z tohoto důvodu je pak močovina schopná tvořit soli se silnými kyselinami. S kyselinou dusičnou tak tvoří dusičnan močoviny, tedy jednu z nejnebezpečnějších výbušnin. Močovina je konečným produktem metabolických přeměn probíhajících v tělech savců, ryb i obojživelníků [55, 56].



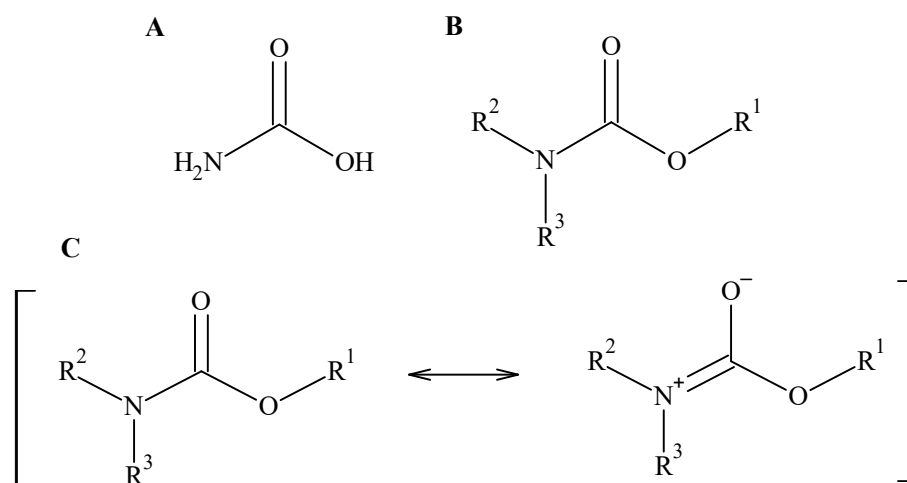
Obrázek 9: Chemická struktura močoviny.

Močovina byla v minulosti považována za velmi málo reaktivní, a tedy průmyslově ne příliš zajímavou sloučeninu. V posledních dvou desetiletích však mnohé výzkumy popsaly možnosti jejího využití v různých oblastech chemie [57]. Jelikož je močovina diamidem, poskytuje reakce charakteristické pro amidy karboxylových kyselin. Dobře se hydrolyzuje na uhličitán amonný, jehož následný rozklad pak závisí na pH [58]. Zatímco v kyselém prostředí dojde k jeho rozpadu na amoniak a oxid uhličitý [59], v alkalickém prostředí je produktem hydrolyzy uhličitán a amoniak [60]. Močovina, stejně jako ostatní amidy, podléhá diacylaci a vzniklé deriváty močoviny pak nazýváme ureidy. Mezi ureidy řadíme například kyselinu barbiturovou včetně jejich derivátů, nazývaných barbituráty. Tyto látky se používají jako léčiva a připravují se kondenzací diethylmalonátů s močovinou [61; 62]. Díky své rovinné struktuře se dvěma vazbami na primární amin (Obrázek 8) je močovina ideálním substrátem pro navázání dvou

karbonylových skupin za vzniku N,N-disubstituované močoviny. Toho je využíváno při výrobě organokatalyzátorů na bázi močoviny [57; 63]. Ve vodných roztocích reaguje močovina i s některými organickými kyselinami, jako je například kyselina citronová, s níž je výsledným produktem citrát močoviny. Studie zabývající se právě touto reakcí byla publikována za účelem optimalizace použití citrátu močoviny jako fyziologicky účinné látky či inhibitoru nitrifikace. Reakce močoviny s kyselinou citronovou je také využitelná při výrobě kapalných hnojiv obsahujících močovinu [64]. V jiné studii pak byla zkoumána syntéza dimethylkarbonátu, který je důležitým substrátem v reakčním inženýrství. Při této syntéze je močovina nejprve tepelně rozložena na kyselinu isokyanovou, která pak reaguje se ZnO za vzniku isokyanátu zinečnatého. Ten může být následně použit jako katalyzátor při methanolýze močoviny, při níž vzniká právě dimethylkarbonát [65].

1.2.2 Reaktivita karbamátů

Karbamová kyselina (H_2NCOOH , Obrázek 10A) je natolik nestabilní sloučeninou, že ve své volné formě nebyla nikdy izolována [66; 67]. Na druhou stranu karbamáty (Obrázek 10B), tedy sloučeniny vznikající substitucí atomů vodíku kyseliny karbamové, tvoří poměrně stabilní sloučeniny. Karbamáty jsou tedy kapaliny nebo krystalické látky s charakteristickým planárním uskupením $-\text{O}-\text{CO}-\text{N}=\text{}$. Jsou navíc schopny vytvářet pevné intermolekulární vodíkové vazby a snadno podléhají tautomerizaci za vzniku keto-enol tautomerního páru (Obrázek 10C) [66; 68]. Dle počtu alifatických či aromatických zbytků navázaných na atom dusíku rozlišujeme primární, sekundární a terciární karbamáty. Primární karbamát má na atomu dusíku navázané dva atomy vodíku – takovou sloučeninou je právě i EC. Pokud je jeden z těchto vodíků nahrazen dalším alifatickým či aromatickým zbytkem, pak se jedná o karbamát sekundární, a pokud dojde k substituci obou vodíkových atomů, hovoříme o terciárním karbamátu.



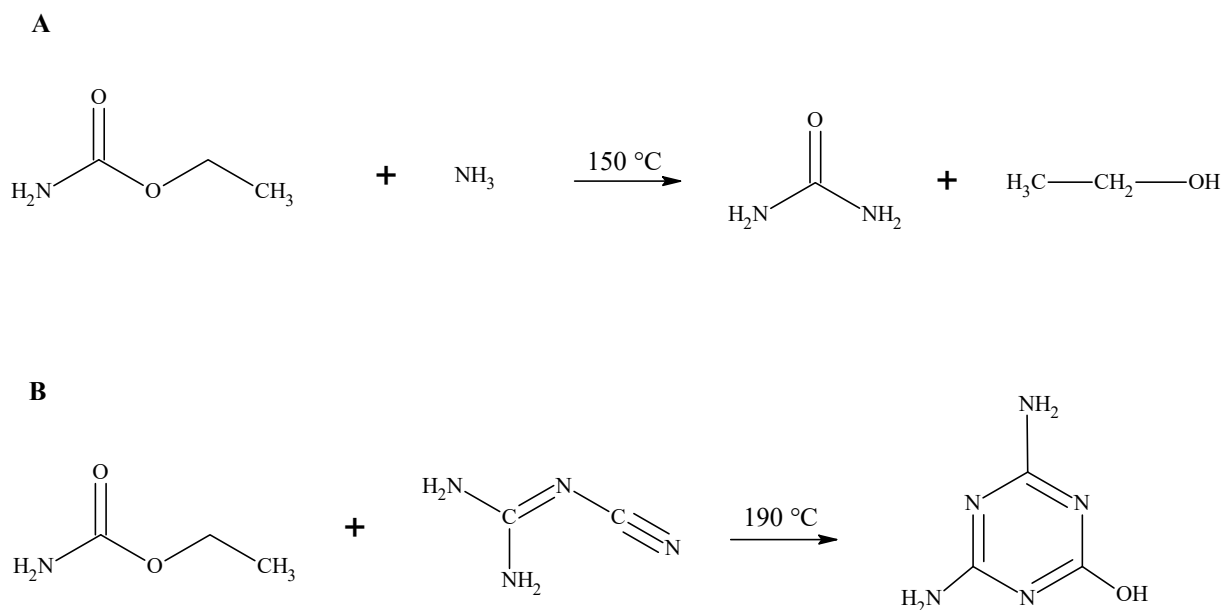
Obrázek 10: Chemické struktury karbamové kyseliny (A), karbamátu (B) a keto-enolová tautomerie karbamátů (C) [66; 68].

Některé alkyl nebo arylkarbamáty jsou termolabilní a po zahřátí dochází k jejich rozkladu. Většina primárních karbamátů se rozkládá na estery kyseliny allofanové, a to již při teplotách menších než je jejich bod varu. Sekundární karbamáty se štěpí při vyšších teplotách na isokyanáty, čehož se využívá i pro průmyslovou výrobu. Naopak alifatické terciární karbamáty jsou tepelně stabilní látky. Vyjímkou jsou terciální karbamáty mající na β -uhlíku alkoxykupiny vodík. Takové sloučeniny se při $350\text{ }^\circ\text{C}$ rozkládají na sekundární aminy a alkeny [66–68].

Díky své unikátní struktuře vykazují karbamáty vlastnosti karboxylových esterů i amidů, což se odráží i na jejich reaktivitě (některé z jejich reakcí jsou shodné s reakcemi esterů a amidů, ale i enolů či kyseliny kyanové). Karbamáty reagují za přítomnosti vhodných činidel s nukleofilními činidly, a podléhají tak transesterifikaci, aminolýze, hydrolyze i cyklizaci. Těmto reakcím snadněji podléhají karbamáty cyklické nežli alifatické, přičemž značný vliv na rychlost a mechanismus reakce má také přítomnost vodíku na dusíku a struktura odstupující skupiny [66; 67].

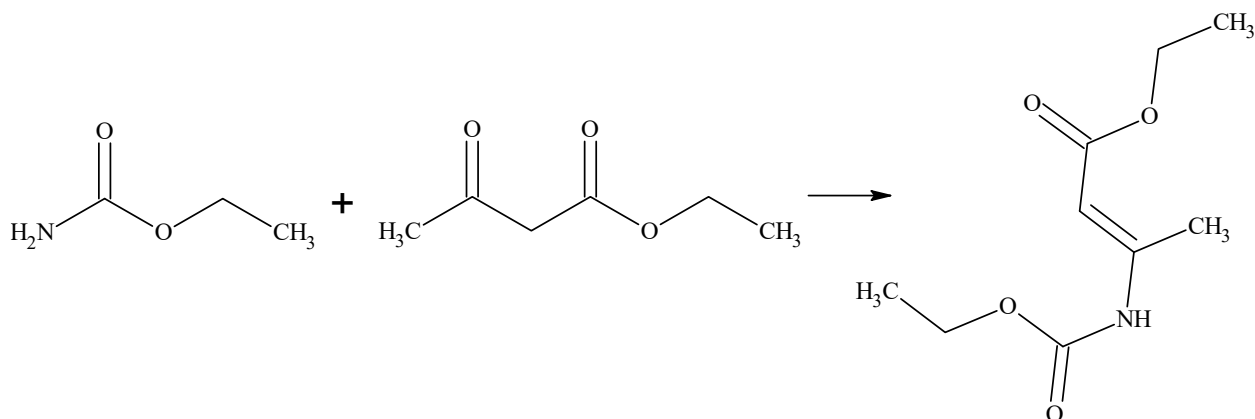
Reakce ethylkarbamátu

Za zvýšené teploty reaguje EC s alifatickými aminy či amoniakem za vzniku substituované močoviny. Katalyzátorem reakce jsou sloučeniny cínu. Po zahřátí směsi EC s amoniakem na $150\text{ }^\circ\text{C}$ v uzavřeném systému vznikla močovina ve výtěžku 33 % (Obrázek 11A). EC také reaguje při $190\text{ }^\circ\text{C}$ s dicyandiamidem za vzniku ammelinu (Obrázek 11B) [67; 69].



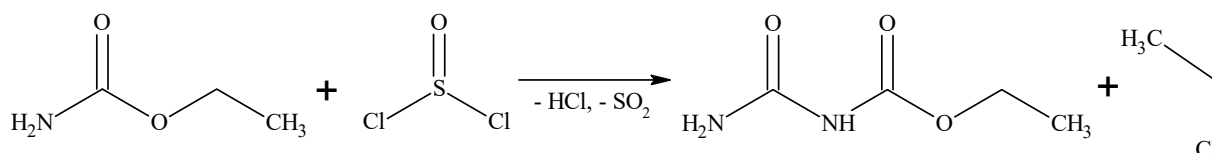
Obrázek 11: Reakce EC s amoniakem (A) a dikyandiamidem (B) [67; 69].

Obecně lze říci, že karbamáty jsou acylovány snadněji než běžné amidy, a to hlavně pomocí karboxylových esterů, anhydridů či halogenidů. Například reakcí EC s ethylacetoacetátem vzniká substituovaný enamin (Obrázek 12) [67; 70].



Obrázek 12: Reakce EC s ethylacetoacetátem za vzniku enamínu [67; 70].

Karbamáty dále reagují i s dichloridy anorganických kyselin, jejichž produkt závisí na podmínkách reakce. Zatímco v přítomnosti bází schopných neutralizovat uvolněnou kyselinu chlorovodíkovou vznikají N-substituované karbamátové deriváty, v neutrálním prostředí dochází k formování allofanátů. Příkladem může být reakce EC s thionylchloridem za vzniku ethylallofanátu, doprovázená vývinem oxidu siřičitého, kyseliny chlorovodíkové a ethylchloridu (Obrázek 13). Klasické amidy jsou přitom za podobných podmínek obvykle dehydratovány na nitrily [67; 70].



Obrázek 13: Reakce EC s thionylchloridem v neutrálním prostředí za vzniku ethylallofanátu [67].

Karbamáty se reaktivitou s pentachloridem fosforitým velmi podobají sulfonamidům. Produkt této reakce se opět liší v závislosti na daných podmínkách. Při 70 °C reaguje EC s pentachloridem fosforitým přímo na sloučeninu dichlorfosforylisokyanát, zatímco při teplotě do 10 °C je produktem reakce ethyltrichlorfosfokarbamát. Tento meziproduct je ale možné na dichlorfosforylisokyanát (a ethylechlorid) převést, a to jeho následným rozkladem při 60 °C [67; 71].

Opatrnou halogenací karbamátů pak můžeme vcelku snadno dostat N-halogenkarbamáty, jejichž reakce jsou velmi obdobné s reakcemi N-halogenamidů [67].

1.3 Stanovení ethylkarbamátu

Pro stanovení EC v potravinových matricích bylo vyvinuto již mnoho různých analytických metod, z nichž každá má své výhody i omezení. Lze je rozdělit na metody chromatografické, enzymatické, spektroskopické, elektrochemické a imunoanalytické. Analýza EC je však komplikována komplexní matricí vzorků s velkým množstvím interferentů, nízkou koncentrací analytu a jeho jednoduchou molekulární strukturou bez chromoforu či fluoroforu. Hlavní technikou používanou pro stanovení EC je plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, která je také oficiální technikou Asociace analytických chemiků (AOAC) pro jeho stanovení v alkoholických nápojích a sójové omáčce. Druhou nejpoužívanější technikou je pak kapalinová chromatografie. Bez ohledu na použitou analytickou techniku je však před vlastní analýzou daného vzorku obvykle nutná jeho předúprava, a to z důvodu zakoncentrování a odstranění rušivé matrice [1; 72; 73]. Příprava vzorku se liší v závislosti na jeho povaze, složení a na analytické technice, jež máme k dispozici. K jeho izolaci z potravinových matric se nejčastěji používají různě modifikované extrakční metody [73; 74]. Pro některé analytické metody je výhodné nebo dokonce nezbytné EC derivatizovat [75; 76].

1.3.1 Izolace ethylkarbamátu z matrice

1.3.1.1 *Extrakce kapalina – kapalina*

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) spočívá v přenosu látky ze vstupního roztoku do jiné kapalné fáze, která je s tou původní nemísitelná. Tuto metodu extrakce lze rozdělit do tří po sobě jdoucích kroků. Prvním z nich je smísení extrakčního činidla se vzorkem, následuje třepání pro podporu přenosu hmoty, a nakonec ustavení extrakční rovnováhy a oddělení extraktu. Finálním krokem je pak obvykle odpaření extrakčního rozpouštědla. Extrakčními činidly pro extrakci EC jsou organická rozpouštědla s podobnou polaritou jako má EC. Mezi takové řadíme například chloroform, dichlormethan, diethylether či ethylacetát. Velká nevýhoda LLE je pracnost, velká spotřeba organických rozpouštědel a špatná reprodukovatelnost [72–75].

1.3.1.2 *Extrakce tuhou fází*

Při extrakci tuhou fází (SPE) prochází vzorky kolonkou naplněnou vhodným adsorbentem, na něž je cílová sloučenina navázána. Po vymytí interferujících látek je analyt eluován adekvátním rozpouštědlem. Pro extrakci EC se obvykle používají kolonky plněné křemelinou [72], silikagelem s amino/imino skupinami (tzv. PSA sorbent), křemičitanem hořečnatým známým pod komerčním názvem Florosil [76] či zesít'ovaným hydroxylovaným kopolymerem polystyrenu a divinylbenzenu známým pod komerčním názvem ISOLUTE® ENV+, který má velký povrch a je ideální pro extrakci polárních analytů [77]. Elučními činidly může být dichlormethan [76] nebo ethylacetát [77]. SPE nevyžaduje tak velké množství rozpouštědla (u speciálních typů patronek je objem eluentu do 10 µl) jako LLE, je rychlejší a poskytuje vysoké výtěžky. Asociace AOAC navíc doporučuje SPE k úpravě vzorku před analýzou EC pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. SPE má však i své nevýhody, a to především poměrně vysoké ekonomické náklady z důvodu použití jednorázových patronek a špatnou reprodukovatelnost mezi nimi [72; 76; 77].

1.3.1.3 *Head – space mikroextrakce tuhou fází*

Další možností extrakce je tzv. head–space mikroextrakce tuhou fází (HS–SPME). Metoda HS–SPME využívá sorpce analytu na křemenné vlákno umístěné v prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě. HS–SPME je tedy založena na ustanovení rovnováhy analytu mezi stacionární fází (ukotvenou na vlákne) a vzorkovaným médiem. Jelikož je tato metoda kombinována téměř výhradně s plynovou chromatografií (GC), je vlákno po ukončení extrakce zavedeno přímo do dávkovače plynového chromatografu, kde dojde k tepelné desorpci

zachycených analytů. Tato metoda je vhodná pro kapalně vzorky, jako jsou saké, rýžová, hroznová a fortifikovaná vína nebo destiláty z peckového ovoce. Účinnost HS–SPME je ale velmi ovlivněna matricí daných vzorků, a proto je třeba daný proces důkladně optimalizovat. Obecně však platí, že nižší obsah alkoholu, vyšší teplota extrakce a delší extrakční čas vedou k vyšší účinnosti HS–SPME [72; 75]. Ve studii z roku 2006, která se zabývala automatizovanou analýzou EC v lihovinách pomocí GC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií, byla pro extrakci vzorku použita právě HS–SPME. V rámci studie zkoumali nejvhodnější vlákna pro extrakci EC. Byly zkoumány polární a bipolární povlaky vláken, přičemž největší výtěžky extrakce byly dosaženy s vlákny Carbowax/Divinylbenzen a Carboxen/Polydimethylsiloxan [78].

1.3.1.4 Extrakce podporovaná tlakem

Pro izolaci EC z pevných fermentovaných potravin byla vyvinuta a validována metoda nesoucí název extrakce podporovaná tlakem (PLE), která je široce používána pro detekci více reziduí v komplexních matricích. PLE extrahuje analyty organickými rozpouštědly za zvýšené teploty a tlaku, čímž dochází k rychlé difúzi, zlepšení rozpustnosti analytu a snížení viskozity a povrchového napětí rozpouštědla, které vede k jeho snadnějšímu průchodu matricí, a tedy lepšímu přenosu hmoty. PLE je tedy rychlejší, účinnější a umožňuje použití menšího množství rozpouštědla [75; 76].

1.3.2 Derivatizace

Každá molekula má sice svoje specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, avšak ne vždy můžeme tyto vlastnosti použít k její přímé analýze požadovanou metodou. V takovém případě je tedy nutné zařadit derivatizační krok, kterým můžeme snížit vliv interferencí, zvýšit selektivitu a detekovatelnost analytů či zlepšit tvar, symetrii a rozlišení píků během jejich chromatografické separace. Principem derivatizace je změna základní chemické struktury analytu za vzniku produktu vhodnějšího pro požadovanou analýzu. Toho dosáhneme chemickou reakcí nebo fyzikálními faktory, jako je zahřívání, ozařování, působení elektrického pole, apod [79–81].

Volba vhodné derivatizační reakce závisí na mnoha faktorech. Vždy je nutné vzít v úvahu vlastnosti látky, zamýšlenou metodu separace a detekce a stabilitu připraveného derivátu. Dle toho pak i volíme, zda reakci provedeme před separací (předkolonová derivatizace) nebo až po ní (postkolonová derivatizace), přičemž oba způsoby mají své výhody, nevýhody i specifické požadavky a nároky na provedení. Oba typy derivatizace lze pak provádět ve dvou různých

režimech: mimo chromatografický systém (off-line) nebo v chromatografickém systému (on-line), kdy se do různých míst chromatografu zařazuje průtočný reaktor [79; 81–84].

Použití předkolonové derivatizace je výhodné především pro obtížně separovatelné sloučeniny nebo látky, které se během chromatografické separace rozkládají či reagují s ostatními složkami. Vznikající derivát však musí být dostatečně stabilní a derivatizační reakce musí proběhnout kvantitativně a s dostatečnou selektivitou. Derivatizační činidlo pak musí být dobře charakterizováno z hlediska struktury, musí být prokázána jeho čistota a musí mít jiné fyzikálně chemické vlastnosti než vznikající produkt, aby se dalo snadno odseparovat. On-line uspořádání předkolonové derivatizace probíhá v dávkovací smyčce nebo v reaktoru před kolonou, a vždy je zásadní rychlý průběh reakce za mírných podmínek (pH, teplota), stabilita a rozpustnost činidel i vznikajících derivátů v mobilní fázi a reakce bez vedlejších produktů ve formě plynu nebo sraženin. Off-line uspořádání předkolonové derivatizace naopak není svazováno specifickými reakčními podmínkami. Lze použít agresivnější činidla i širokou škálu rozpouštědel. Podmínky reakce mohou být náročnější a nevádí ani vedlejší produkty ve formě sraženin či plynů nebo větší časová náročnost reakce [79; 81; 83; 84].

Naopak při postkolonové derivatizaci není nutná naprosto kvantitativní a selektivní reakce či vysoká stabilita derivátu, které ani nemusí být jednoznačným chemickým individuem. Zásadní je dobrá reprodukovatelnost a rychlá reakce za mírných podmínek. V on-line uspořádání je však nutné zařadit těsně před detekci speciální reaktory, jež zároveň zajistí účinné smíchání derivatizačního činidla s eluátem z kolony (bez rozmytí rozseparovaných analytů). Dále musíme dbát na dobrou mísitelnost reakčního rozpouštědla s mobilní fází a zejména na výběr derivatizačního činidla, které nesmí za daných podmínek poskytovat signál na detektoru. Při off-line uspořádání postkolonové derivatizace se sbírají jednotlivé frakce vytékající z kolony, které se následně derivatizují mimo chromatografický systém. Kvůli častým komplikacím postkolonové derivatizace je v praxi upřednostňována derivatizace předkolonová [79; 81; 83; 84].

Nejběžnějším typem derivatizace je předkolonová off-line chemická reakce mezi analytem a derivatizačním činidlem, které se pro zajištění kvantitativního průběhu reakce přidává ve velkém přebytku. Kromě jeho spotřeby na samotnou reakci s analytem je totiž možná i jeho částečná degradace (vlivem např. hydrolýzy či termolýzy) nebo spotřeba na vedlejší reakce. V ideálním případě zůstane po derivatizační reakci pouze zbytek derivatizačního činidla (aby bylo jisté, že reakce proběhla kvantitativně) a požadovaný derivát bez jakéhokoli zbývajících výchozího analytu, vedlejších produktů či produktů hydrolýzy. K tomu však dochází pouze

velmi zřídka, a tak je často nutné před analýzou nebo během ní oddělit požadovaný derivát od ostatních reaktantů a produktů [79; 80; 82].

Pro správný průběh derivatizace je třeba optimalizovat reakční parametry, jako je teplota, pH, volba rozpouštědla, reakční čas a poměr činidla a substrátu, a to za účelem minimalizace spotřeby reaktantů za současného získání maximálního výtěžku derivátu a minimálního množství vedlejších produktů, které by mohly v závěrečných krocích separace a detekce interferovat. U předkolonové derivatizace je pak nutné optimalizovat chromatografickou separaci tak, aby byl derivát dostatečně oddělen od zbytků činidla, ostatních složek vzorku a vedlejších produktů reakce [79; 80; 83].

1.3.2.1 Derivatizace pro kapalinovou chromatografii

Jelikož velké množství organických látek neabsorbuje ani neemituje záření a jejich detekce běžně používanými detektory tak není možná, je většina derivatizačních reakcí používaných pro kapalinovou chromatografii založena na syntéze absorbujících nebo fluoreskujících derivátů. V poslední době však není výjimkou ani zařazení derivatizace před hmotnostně–spektrometrickou detekcí, a to zejména pro zlepšení ionizačních vlastností látky. Dle způsobu detekce tedy volíme derivatizační činidla [79; 82; 83].

Přestože spektrofotometrický detektor nedosahuje tak vysoké citlivosti, je pro svoji vyšší univerzálnost a příznivou cenu nejběžnějším detektorem v kapalinové chromatografii. Pro vnesení chromoforu do struktury různých analytů již bylo vyvinuto a úspěšně aplikováno velké množství derivatizačních činidel. Tato činidla jsou svou chemickou povahou obvykle konjugované aromatické sloučeniny obsahující funkční skupinu, která je schopná reagovat s funkční skupinou analytu. Nejpoužívanějšími derivatizačními činidly určenými pro spektrofotometrickou detekci jsou různé arylhalogenidy (např. fenacylbromid nebo 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen), malonáty (např. diethyl-ethoxymethylenemalonát; DEEMM), aryliso(thio)kyanáty (např. fenylisothiokyanát), arylhydraziny (např. 2,4-dinitrofenylhydrazin), případně tradiční činidlo ninhydrin [83; 85].

Po absorpci fotonu molekulou dojde ke změně energetického stavu ze základního na excitovaný, tedy k přechodu elektronů do vyšších energetických hladin. Tyto hladiny jsou ale nestabilní a elektrony se vrací do svého základního stavu. Přebytek energie je přitom vyzářen v podobě fotonu, který má však vyšší vlnovou délku (nižší energii) než foton původní. Této zářivé deexcitaci pak říkáme fluorescence. Fluorescenci vykazují zejména organické látky s vysoce konjugovaným systémem dvojných vazeb (např. naftalen, antracen, chinolin, indol

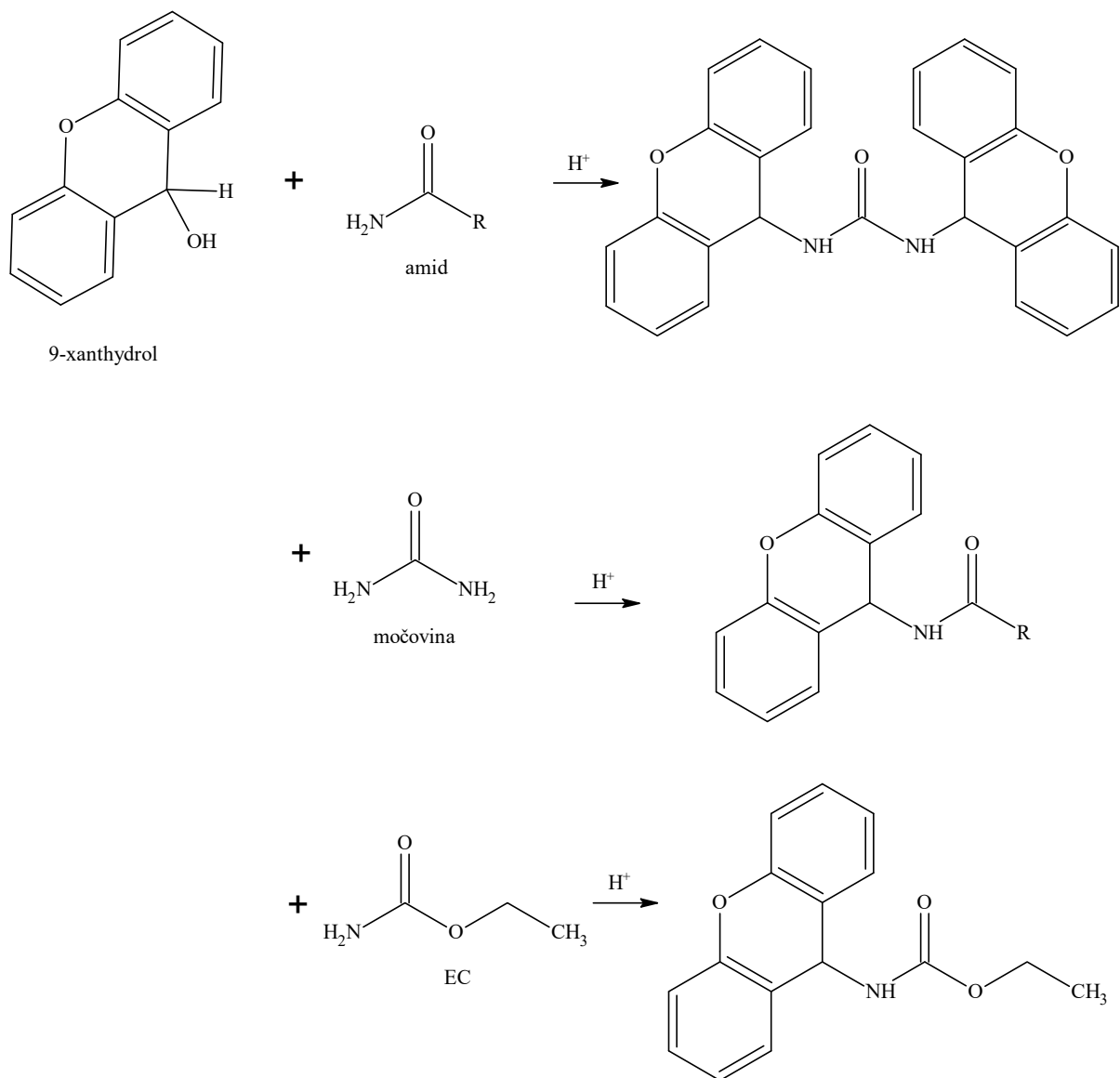
apod.). Čím více je v molekule konjugovaných vazeb, tím vyšší vlnovou délku má emitované záření. Fluorescenční schopnosti molekul nejsou až tak běžné, a proto je fluorescenční detektor oproti spektrofotometrickému mnohem více selektivní. Další velkou výhodou je i jeho vyšší citlivost. Mezi derivatizační činidla poskytující fluoreskující deriváty patří například fluorekamin, 9-fluorenylmethyl-chlorformiát (FMOC-Cl), *o*-ftaldialdehyd (OPA), 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-*N*-chinolin-6-ylkarbamát (AQC), a dále arylsulfonyly jako dansylhydrazin, dabsylchlorid nebo dansylchlorid, nebo halogenonitrobenzofurazany jako 4-fluor-7-nitrobenzofuran [83; 85].

Derivatizace sloučenin určených pro jejich následnou analýzu pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí se provádí za účelem zvýšení jejich ionizace či molekulové hmotnosti nebo pro potlačení interferencí matrice. Pro hmotnostní analýzu se většinou používají stejná činidla jako pro UV/VIS či fluorescenční detekci (OPA, FMOC-Cl, AQC a DEEMM) [85–87].

9-xanthydrol

9-xanthydrol (9-XA), neboli 9H-xanthen-9-ol, je organická sloučenina se sumárním vzorcem $C_{13}H_{10}O_2$ a molekulovou hmotností 198,221 g/mol. Používá se jako derivatizační činidlo při stanovení primárních amidů, aminů, močoviny a alkylkarbamátů (Obrázek 14). Pro derivatizaci je činidlo obvykle rozpuštěno v alkoholu. Pokud je tento roztok uchováván do teploty 0 °C a bez přístupu světla, je stabilní po dobu až dvou měsíců. Derivatizace xanthydrolem má mnoho výhod, jako jsou mírné reakční podmínky, možnost průběhu reakce ve vodném roztoku a vznik fluoreskujících derivátů. Průběh reakce je významně ovlivněn pH (vyžaduje kyselé prostředí) a teplotou. Při vhodném reakčním prostředí (pH 1–2,5) pak derivatizace proběhne při laboratorní teplotě do dvaceti minut za vzniku fluoreskujících xanthylamidů [88–91].

9-XA je možné použít pro předkolonovou [89; 91–93] i postkolonovou [90] derivatizaci, přičemž pro derivatizaci EC, kdy je produktem reakce xanthylethylkarbamát (XEC), byla doposud výhradně volena pouze předkolonová varianta [91–93]. Vždy je ale nutné dodržet dostatečně velký molární přebytek činidla a nízké pH [89–93]. Pro dosažení kyselého prostředí se běžně používá kyselina chlorovodíková [91], ale byla použita i kyselina chloristá, v jejímž prostředí byla kinetika reakce obdobná a deriváty vykazovaly dokonce lepší stabilitu [92]. Opravdu stabilní deriváty pak byly získány v prostředí fosfátového pufru při pH 2,5 [93].

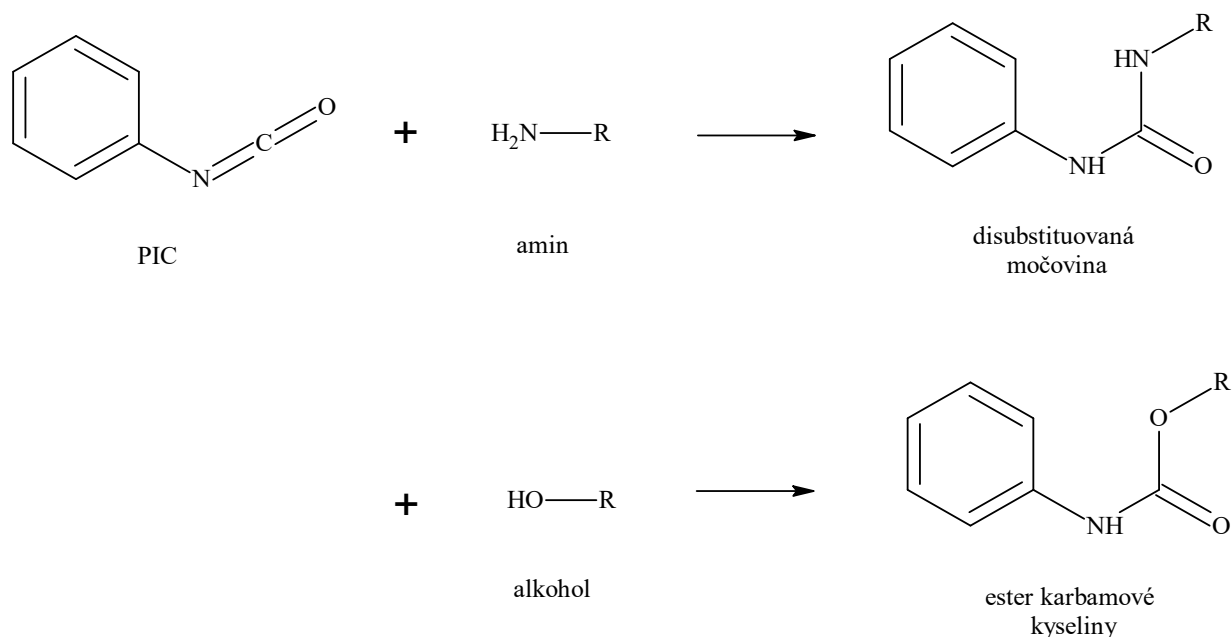


Obrázek 14: Reakce amidů, močoviny a EC s 9-xanthidrolem [89–93].

Fenylisokyanát

Fenylisokyanát (PIC) je činidlo používané především pro derivatizaci alifatických i aromatických primárních a sekundárních aminů, fenolů a alkoholů za vzniku substituované močoviny nebo karbamátů (Obrázek 15). Za určitých podmínek pak PIC reaguje dokonce i s volnou hydroxylovou skupinou cukrů a cukerných alkoholů. Jelikož je uhlík karbonylové skupiny silným nukleofilem, jedná se o nukleofilní substituci. Pro kvantitativní průběh derivatizace je třeba mírně alkalické prostředí (aby nedocházelo k protonaci aminových funkčních skupin), kterého je obvykle dosaženo přidávkem triethylaminu. Primární aminy poskytují nejstabilnější deriváty a vznikající produkty derivatizace detekujeme při 240–260 nm. Nadbytek činidla lze po proběhnutí reakce následně odstranit přidávkem alifatického alkoholu, např. methanolu. Zatímco pro dostatečně rychlou derivatizaci alifatických aminů a alkoholů

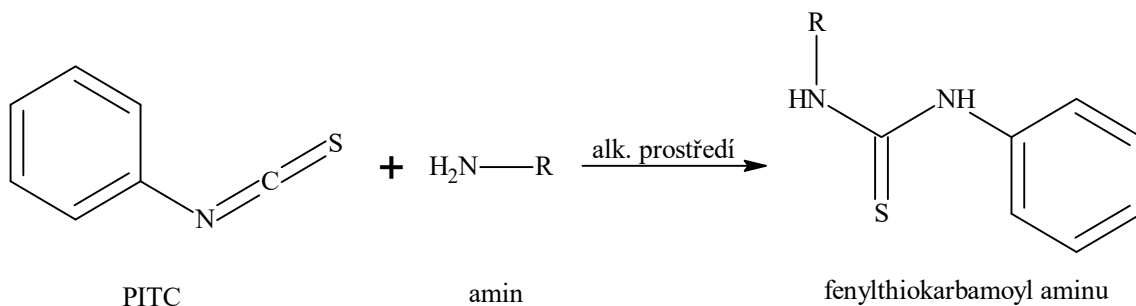
postačí pokojová teplota, reakce s cukry vyžaduje teplotu alespoň 50 °C, a i tak reakce neproběhne dříve jak za hodinu [94–98].



Obrázek 15: Reakce činidla PIC s primárním aminem a alkoholem [95; 96].

Fenylisothiokyanát

Isothiokyanáty jsou oproti isokyanátům sice méně reaktivní, ale výsledkem jsou stabilnější deriváty. Samotná reakce je přitom založena na totožném principu. Nejpoužívanějším isothiokyanátem je fenylisothiokyanát (PITC), který s aminovou skupinou poskytuje fenylthiokarbamoyl daného aminu absorbující při 254 nm (Obrázek 16). Nevýhodou tradičního postupu této derivatizace je nutnost vícenásobného sušení, což výrazně ovlivňuje celkový čas přípravy derivátu a reprodukovatelnost celé metody. Na druhou stranu mezi jeho výhody patří komerční dostupnost, mírné a snadno dosažitelné reakční podmínky a dobrá reakční selektivita s primárními a sekundárními aminy [98–100].



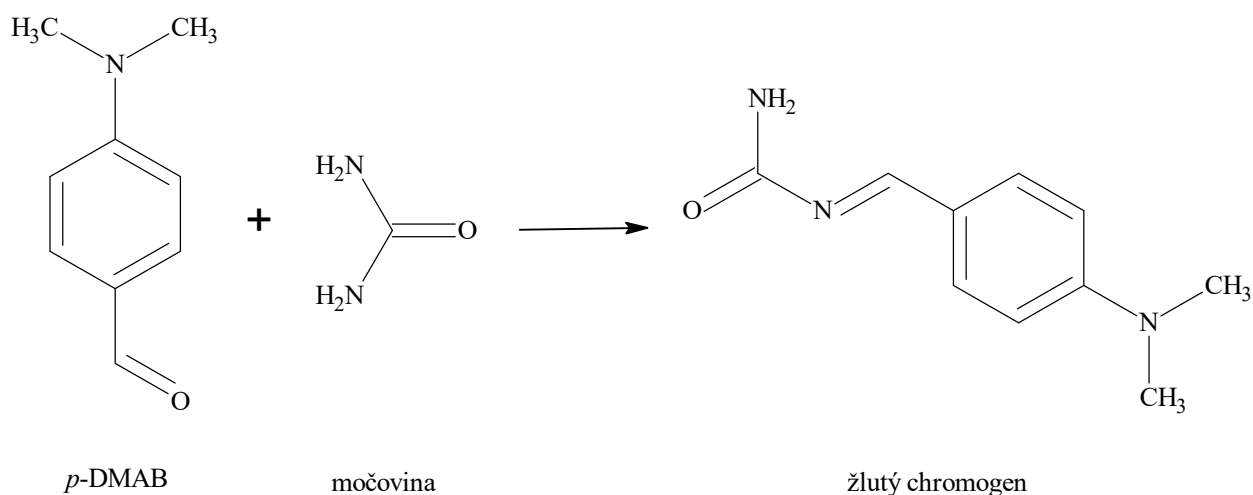
Obrázek 16: Reakce činidla PITC s primárními aminy [100].

***p*-Dimethylaminobenzaldehyd**

Činidlo *p*-dimethylaminobenzaldehyd (*p*-DMAB) známé spíše jako Ehrlichovo činidlo reaguje s aminy, močovinou a sulfonamidy v kyselém prostředí za vzniku barevného kondenzátu typu Schiffovy báze (Obrázek 17) [101; 102]. Jelikož je reakce poměrně rychlá, je vhodná pro předkolonovou [103] i postkolonovou [104] derivatizaci.

Močovina reaguje s *p*-DMAB za vzniku žlutě zbarveného derivátu, který je tradičně analyzován buď přímo spektrofotometricky nebo pomocí kapalinové chromatografie spojené se spektrofotometrickou detekcí při 422 nm [105]. Pro stanovení tohoto derivátu ale byly použity i jiné techniky, jako je vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie s následnou denzitometrickou detekcí [106] nebo ultra-rychlá vysokoúčinná kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí [107].

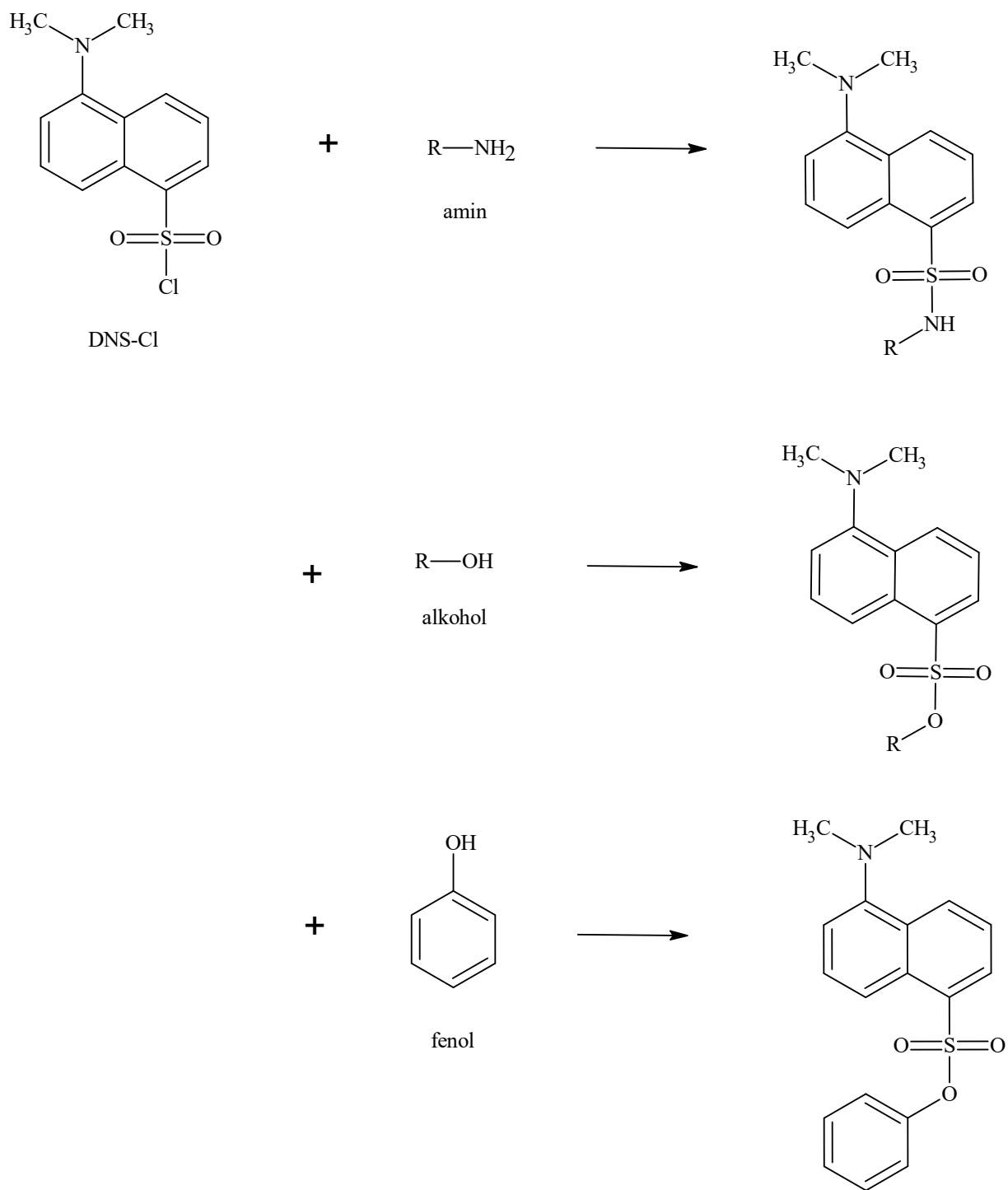
Činidlo *p*-DMAB bylo použito pro stanovení močoviny v tělních tekutinách hospodářských zvířat [107] či ve farmaceutických přípravcích [105]. Tato derivatizace byla zvolena i pro analýzu fenylpropanolaminu ve farmaceutických přípravcích [106] či pro analýzu sulfonamidů (jakožto reziduí pocházejících z veterinárních léčiv) ve vejcích, mase a mléce [108]. Vznikající deriváty pak absorbovaly při 420 nm [106; 108].



Obrázek 17: Reakce činidla *p*-DMAB s močovinou [106].

Dansylchlorid

Dansylchlorid (DNS-Cl), chemicky 5-N,N'-dimethylaminonafalen-1-sulfonylchlorid, je jedno z nejstarších a nejrozšířenějších, výhradně předkolonových derivatizačních činidel poskytující fluoreskující deriváty detekovatelné při excitačních vlnových délkách 340–380 nm a emisních vlnových délkách 470–530 nm. V mírně alkalickém prostředí (pH 9,5–10) reaguje s primárními i sekundárními aminy (Obrázek 18). Rychlost dansylační reakce sice vzrůstá se vzrůstajícím pH prostředí, ale současně dochází také k rychlejší hydrolyze vzniklých derivátů. Při vyšším pH pak DNS-Cl reaguje i s fenoly, imidazoly a pomalu dokonce i s alkoholy. Dansylační reakce se obvykle provádí při zvýšených teplotách od 60 do 100 °C a probíhá po dobu 90–120 min. Vznikající deriváty jsou pak při teplotě do 4 °C stabilní až dva týdny. Velkou nevýhodou DNS-Cl a jeho derivátů je však jejich citlivost na světlo. Aby tedy nedocházelo k rozkladným reakcím, musí derivatizační reakce probíhat ve tmě [87; 109–112].



Obrázek 18: Reakce činidla DNS-Cl s aminy, alkoholy a fenoly [109–112].

1.3.2.2 *Derivatizace pro plynovou chromatografii*

Derivatizace před GC analýzou se provádí pro zvýšení těkavosti či tepelné stability cílových analytů, zlepšení separace, odezvy detektoru či symetrie píků, a také pro snížení adsorpce látek na GC koloně. Mezi tradiční derivatizační reakce se řadí silylace, při které je pomocí silylačních činidel zavedena do molekuly analytu silylová skupina. Silylací je tedy nahrazen aktivní vodík (vyskytující se v původní sloučenině jako součást funkční skupiny –OH, –COOH, –SH, –NH₂) silylovou skupinou, což vede ke snížení polaritě dané látky. Nejpoužívanějšími silylačními činidly jsou hexamethyldisilazan (HMDS), trimethylchlorsilan (TMCS), trimethylsilylimidazol (TMSI) nebo bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) [113; 114].

Před GC analýzou musí být EC (stejně jako před analýzou pomocí kapalinové chromatografie) derivatizován. Kromě klasických silylačních činidel [115] je i v tomto případě často volena derivatizace 9-xanthidolem [89; 91; 116; 117].

1.3.3 Samotné stanovení ethylkarbamátu

1.3.3.1 *Plynová chromatografie*

Plynová chromatografie ve spojení s různými typy detekce představuje v současné době nejpoužívanější techniku pro stanovení EC v různých typech alkoholických nápojů i v některých potravinách, a to především v pečivu a fermentované zelenině. Kromě tradičního plamenového ionizačního detektoru (FID) byl pro tyto účely použit i Hallův konduktometrický detektor (HECD) nebo FID se solí alkalického kovu (AFID) [73]. I přes vysoké pořizovací i provozní náklady a potřeby kvalifikovaného personálu je dnes však naprosto nejčastěji voleno spojení GC s hmotnostní (GC/MS) či tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC/MS/MS), a to pro svou vysokou citlivost, spolehlivost a možnost plně automatizovaných analýz. Pro odstranění matrice a dosažení požadované citlivosti a přesnosti je však i v tomto případě obvykle nutná izolace EC ze vzorku. Tento krok lze vynechat pouze u matričně jednoduchých, čistých vzorků s vysokou koncentrací EC, mezi které patří například pálenky z peckovin. Jak již bylo zmíněno, pro zvýšení citlivosti metody je vhodné EC před analýzou derivatizovat [118–121]. Na počátku GC analýzy je vzorek nadávkován do injektoru vyhřátého na 200–220 °C a dále je unášen nosným plynem – nejčastěji héliem – při průtoku 1–1,5 ml/min na kapilární kolonu, kde dochází k separaci. Pro GC analýzu EC se využívají polární stacionární fáze na bázi methylpolysiloxanu [119], polyethylenglykolu [120] nebo kolony z taveného křemene [118]. Při separaci je volen teplotní gradient, při němž teplota stoupá až k 200–220 °C. Doba

separace se pohybuje mezi 10–20 minutami. Při GC/MS se při kvalitativní analýze využívají ionty s m/z (hmotnost ku náboji) 89, 74 a 62. Právě iont s m/z 62 je nejintenzivnějším iontem ve spektru a je charakteristický pro karbamáty. Pro kvantifikaci EC se používá metoda vnitřního standardu, přičemž jako vnitřní standard může být použit propylkarbamát nebo butylkarbamát [1; 18; 73; 118].

1.3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je pro analýzu EC v potravinách a nápojích poměrně novou záležitostí. Zásadní výhodou HPLC ve srovnání s GC je především možnost analýzy bez jakýchkoli kroků extrakce či zakoncentrování, což zkracuje dobu analýzy na méně než jednu hodinu. Pro analýzu EC pomocí HPLC je ale nutné zařadit krok derivatizace, který nám umožní EC citlivě detekovat a eliminuje matricové interferenty. Derivatizačním činidlem EC je doposud výhradně 9-xanthydrol, poskytující XEC derivát [1; 122–126]. Separace XEC pomocí HPLC probíhá v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Jako mobilní fáze (MF) je nejčastěji volen acetonitril v kombinaci s octanem sodným o pH 7,2 [123–125], případně methanol a voda s neutrálním pH [126]. Průtok MF se pohybuje mezi 0,8–1 ml/min. Pro chromatografickou separaci XEC se využívají oktadecylsilikagelové kolony, které mohou být spojené i s předkolonkami se stejnou stacionární fází. Teplota kolony významně neovlivňuje HPLC separaci a standardně se pohybuje v rozmezí 30–40 °C. Pro analýzu XEC se využívá výhradně gradientové eluce s různou počáteční koncentrací organické složky MF a rozdílnou strmostí gradientu. Od toho se odvíjí i délka separace, která bývá okolo 30–50 minut [123–125]. K detekci XEC derivátu se často používá fluorescenční detektor (FLD) při vlnové délce excitace (λ_{ex}) 240 nm a emise (λ_{em}) 600 nm [123–127]. Kromě HPLC/FLD je v některých studiích používáno spojení HPLC s hmotnostní detekcí (HPLC/MS) využívající ionizaci elektrosprejem (ESI) nebo chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Při analýze vín a lihovin původem z jižní Afriky bylo pomocí HPLC/MS/MS s APCI ionizací dosaženo detekčních limitů, které jsou srovnatelné s GC/MS analýzami [1; 128].

1.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie s přímým vstřikováním

Jedná se o metodu, při které je vynechána chromatografická separace a vzorek je nastříknut rovnou do hmotnostního spektrometru. Stanovení EC touto technikou je vhodné především pro screeningové analýzy, jelikož analýza může při vhodně zvolených podmínkách trvat pouhé dvě minuty. Nevýhodou je pak vysoká citlivost na matriční efekty a nepřesnost stanovení v přítomnosti sloučenin, jež mají s analytem identickou nominální hmotnost (tzv. izobarických

sloučenin), a mohly by proto ovlivňovat výsledek analýzy. Touto metodou byl brazilskými vědci stanoven EC v lihu z cukrové třtiny. Vzorek byl ionizován elektrosprejem a následně analyzován trojitým kvadrupólem [1; 129].

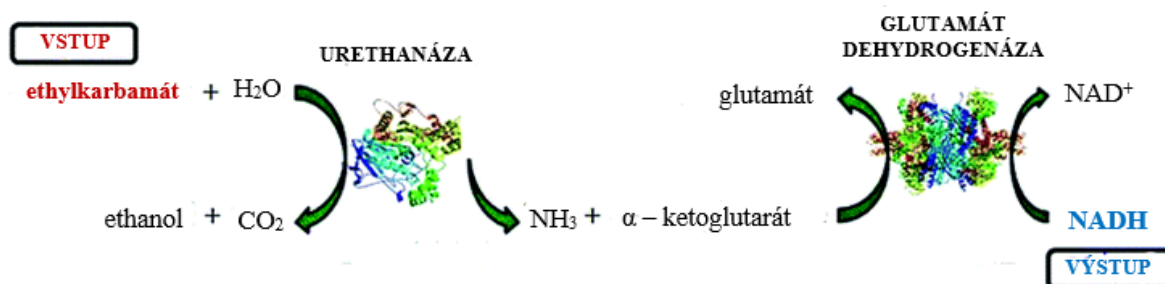
1.3.3.4 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektroskopie využívá změn vibračně-rotačních energetických pásů molekuly při jejím vystavení infračervenému (IČ) záření, a tedy absorpci IČ záření touto molekulou. Jelikož přesnost a citlivost infračervené spektrometrie pro kvantifikaci EC v potravinářských výrobcích není dostačující, je vhodná pouze pro semikvantitativní screeningovou analýzu. Výhodou je ale velmi krátká doba analýzy, jež při vhodně zvolených podmínkách trvá pouhé dvě minuty [1; 73], její nedestruktivní charakter a poměrně přijatelné pořizovací a provozní náklady [1; 72; 73]. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) byla použita například ve studii z roku 2005, kde byl EC analyzován ve 122 destilovaných lihovinách z peckovin [117]. Mezi vibračně-rotační molekulovou spektrometrii patří kromě klasické infračervené spektrometrie i Ramanova spektrometrie, v níž se sleduje přechod molekuly mezi jednotlivými vibračními hladinami (tzv. Ramanův jev neboli Ramanův rozptyl). Modifikovanou metodou Ramanovy spektrometrie je pak technika využívající povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS), v níž se pro zesílení rozptylu používají stříbrem nebo zlatem potažené nanosubstráty (např.: koloidy). Právě tato technika byla aplikována na stanovení EC ve vodných vzorcích a poskytla reprodukovatelné výsledky s opravdu velmi nízkými limity detekce [1; 18].

1.3.3.5 Enzymová imunoanalýza

Ve stopové analýze mají enzymově katalyzované reakce široké využití, a to především díky své vysoké specifitě, citlivosti a rychlé odezvě. Pro odhad koncentrace EC v alkoholických nápojích je například využíváno jeho inhibičního účinku na aktivitu enzymu acetylcholinesterázy. Je tedy stanoven kvantitativní vztah mezi hladinami EC ve vzorku a mírou inhibice aktivity tohoto enzymu [18]. Další možností enzymaticky katalyzovaného stanovení EC je využití glutamátdehydrogenázové-urethanázové kaskádové reakce (Obrázek 18) s následnou spektrofotometrickou detekcí. V tomto případě je ethylkarbamát nejprve hydrolyzován enzymem urethanáza na ethanol, oxid uhličitý a amoniak. Právě amoniak je spolu s α -ketoglutarátem substrátem reakce katalyzované enzymem glutamátdehydrogenázou, jež vede k tvorbě glutamátu. Během tohoto procesu se redukovaná forma koenzymu nikotinamidadeninukleotidu (NADH) poskytující specifickou absorpci záření při 340 nm

přemění na svou oxidovanou formu (NAD^+). Změna koncentrace NADH tedy způsobí změnu absorbance, jež je ekvivalentní množství EC v systému [18; 130; 131]. Tato metoda je poměrně citlivá a přesná, nicméně rychlost kaskádové reakce je výrazně ovlivněna pH reakčních roztoků a také koncentrací urethanázy, glutamátdehydrogenázy a α -ketoglutarátu [18; 130].



Obrázek 19: Schematické znázornění stanovení EC [130].

Kompetitivní enzymová imunosorpční analýza známá pod zkratkou ELISA je sice nejčastěji využívána k detekci a kvantifikaci proteinů, ale můžeme pomoci ní detekovat i kontaminanty s malými molekulami. Bohužel zatím ještě nebyl vyvinut způsob, jakým by bylo možné provést imunoanalýzu EC bez předchozí úpravy vzorku. V některých studiích je tento problém řešen již zmíněnou derivatizací činidlem 9-XA, jelikož XEC lze již identifikovat bez větších potíží [1; 132; 133]. Pro analýzu EC ve víně byla již použita i metoda nekompetitivní imunoanalýzy [133].

V současné době se imunoanalytické testy v běžném provozu zatím nepoužívají, ale pokud by se ukázalo, že jsou účinné v širokém rozsahu koncentrací EC, tak by se mohly stát efektivním nástrojem pro rychlý screening EC v různých potravinových matricích [1; 132; 133].

1.3.3.6 Elektrochemický impedenční senzor

V roce 2020 byla publikována studie zabývající se vývojem elektrochemického impedenčního senzoru, který je schopen současné detekce EC a jeho prekurzorů, včetně močoviny, argininu a citrulinu. Princip tohoto senzoru je založený na protonační prioritě aminové funkční skupiny v EC a jeho prekurzorech způsobené pufrům o určitém pH, v němž je pracovní modifikovaná nano MnO elektroda nabitá záporně, a je tak pomocí elektrostatických interakcí schopna specifického rozpoznání zmíněných analytů. Tato metoda byla aplikována na vzorky čínského rýžového vína a nevyžadovala žádný přípravný krok před vlastní analýzou [1; 134].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

Pro vážení chemikálií byly používány analytické digitální váhy Sartorius (Ústí nad Labem, ČR). Při přípravě derivátů, standardů i vzorků byly používány automatické pipety (Sartorius) a běžné laboratorní pomůcky (navažovací lodičky, lžičky, vialky, odměrné baňky, kádinky, odměrné válce a zásobní láhve na mobilní fázi). V rámci derivatizačních postupů byla používána laboratorní odstředivka Centrifuge 5424, třepačka Promax 1020, vaříč MR2002 a magnetická míchačka REAX top (vše Heidolph, Německo). Samotné derivatizační reakce byly prováděny v 1,5ml plastových mikrozkuškových Eppendorf (Hamburg, Německo), skleněných vialkách o objemu 20 ml nebo v zábrusové baňce, kdy se při daných postupech používalo také topné hnízdo a chladič. Deriváty byly před analýzou filtrovány přes stříkačkový filtr s teflonovou membránou (PTFE) o průměru 4 mm a velikosti pórů 0,45 μm (Labstore, HPST, Praha, Česká republika).

Před HPLC analýzou byla vždy proměřena absorpční spektra připravených derivátů, a to na spektrofotometru UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s využitím křemenných kyvet o standardní šířce 1 cm (Fisher Scientific, Pardubice, ČR).

K analýze derivátů byl používán kapalinový chromatograf složený ze dvou vysokotlakých čerpadel LC-30AD, detektoru s diodovým polem SPD-M30A a degaseru DGU-20 A5 (vše Shimadzu). Dávkovací systém sestával z šesticestného ventilu s vnější dávkovací smyčkou o objemu 2 μl (Valco-Vici, Schenkon, Švýcarsko) a vzorky byly dávkovány mikrostříkačkou značky Hamilton o objemu 100 μl (Reno, USA). K separaci bylo použito několik kolon v závislosti na měřeném derivátu (Tabulka 2). Vybraná kolona byla vždy umístěna v termostatu LCO 102 (Ecom, Praha, ČR).

Tabulka 2 Kolony používané pro jednotlivé derivatizační postupy.

Derivatizační činidlo	Kolona
PITC	Zorbax SB-Aq (150 x 3,0 mm; 3,5 μm částice, Agilent, Santa Clara, USA)
DNS-Cl	Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm částice, Supelco, Belfonte, USA)
<i>p</i> -DMAB	Ascentis Express RP-Amide (150 x 3,0 mm; 2,7 μm částice, Supelco) Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm částice, Supelco)

Pro přípravu mobilní fáze byla používána redestilovaná voda čištěná pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Darmstadt, Německo) a pH mobilní fáze bylo měřeno pH metrem 827 pH Lab (Metrohm, Herisau, Švýcarsko). Případné mechanické nečistoty nacházející se v mobilní fázi byly odstraněny přefiltrováním přes nylonový membránový filtr o průměru 47 mm a velikosti pórů 0,2 μm (Supelco, Belfonte, USA), a to pomocí vakuové jednotky Labobase SBC860 s regulátorem vakua CVC 3000 (vacuubrand).

2.2 Použité chemikálie a rozpouštědla

- Ethylkarbamát; ≥ 98 % (Merck)
- Močovina; $\geq 99,5$ % (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- L-prolin; ≥ 99 % (Merck)
- Ethanol; 96 % (Lach-Ner)
- Methanol; $\geq 99,9$ % (Merck)
- Acetonitril; p.a. (Merck)
- Kyselina chlorovodíková; 35 % (Lach-Ner)
- Kyselina mravenčí; 98 % (Penta, Praha, ČR)
- Kyselina octová; 99 % (Penta)
- Uhličitan lithný; $\geq 99\%$ (Merck)
- Octan amonný; ≥ 98 % (Lachema, Brno, ČR)
- Octan sodný; $\geq 99,5$ % (Fluka, Německo)
- Pyridin; ≥ 99 % (Penta)
- Triethylamin; 99,8 % (Lach-Ner)
- Dansylchlorid; ≥ 98 % (TCI, Japonsko)
- Fenyliothiokyanát; ≥ 98 % (Merck)
- *p*-dimethylbenzaldehyd; ≥ 99 % (Merck)
- *p*-nitrofenylhydrazin; čistota; ≥ 97 % (Merck)
- 2,4-dinitrofenylhydrazin; $\geq 96,5$ (Merck)
- *p*-toluidin; čistota, ≥ 99 (Merck)

2.3 Pracovní postupy pro derivatizaci činidlem *p*-DMAB

2.3.1 Příprava zásobních roztoků EC a močoviny

Pro přípravu zásobního roztoku EC ($c_{\text{EC}} = 0,303 \text{ mol/l}$) bylo naváženo 270 mg EC do odměrné baňky o objemu 10 ml, která byla doplněna redestilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem

byl připraven i zásobní roztok močoviny ($c_{\text{močovina}} = 0,308 \text{ mol/l}$), pouze navážka v tomto případě činila 185 mg. Takto připravené roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

2.3.2 Příprava zásobního roztoku derivatizačního činidla *p*-DMAB

Pro přípravu zásobního roztoku *p*-DMAB o $c = 0,183 \text{ mol/l}$ bylo 300 mg pevného činidla rozpuštěno v 10 ml ethanolu a 1 ml 35% HCl. Takto připravený roztok byl uchováván v lednici při 4 °C.

2.3.3 Derivatizace

Derivatizace močoviny a EC byla provedena podle částečně modifikovaného postupu uvedeného v literatuře [135]. Pro derivatizační reakci bylo smícháno 100 μl standardního roztoku EC ($c = 0,303 \text{ mol/l}$) nebo močoviny ($c = 0,308 \text{ mol/l}$) a 500 μl derivatizačního činidla *p*-DMAB ($c = 0,183 \text{ mol/l}$). Po desetiminutové reakci byly připravené deriváty nejprve zfiltrány přes stříkačkový PTFE filtr a 2 μl byly následně vstříknuty do chromatografu.

2.3.4 Chromatografická analýza

Optimalizovaná separace připravených derivátů proběhla na koloně Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm částice) temperované na teplotu 30 °C. Binární mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem kyseliny mravenčí o pH 3 (A) a 100% methanolem (B). Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. Pro separaci byla využita gradientová eluce s následujícím programem: 0 min – 20 % B, 2 min – 25 % B, 5 min – 61 % B, 10 min – 62 % B, 11 min – 100 % B. Po eluci následoval návrat na počáteční podmínky a ekvilibrace kolony. Deriváty byly detekovány spektrofotometricky při 420 nm.

2.3.5 Validace

Metoda byla validována pomocí základních parametrů, mezi které patří mez detekce a stanovitelnosti, správnost (návratnost) a přesnost (intradenní a mezidenní opakovatelnost).

2.3.5.1 *Mez detekce a mez stanovitelnosti*

Mez detekce (LOD) lze definovat jako nejmenší koncentraci analytu ve vzorku, kterou můžeme ještě spolehlivě detekovat, a tedy odlišit signál analytu od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou ještě lze přesně a správně kvantitativně stanovit. LOD i LOQ lze vypočítat ze šumu základní linie a výšky vybraného píku při určité koncentraci (rovnice 1 a 2) [136].

$$LOD = \frac{c_{analyt} \cdot 3 \cdot h_{\text{sum}}}{h_{analyt}} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{c_{analyt} \cdot 10 \cdot h_{\text{sum}}}{h_{analyt}} \quad (2)$$

, kde h_{sum} odpovídá výšce šumu základní linie, h_{analyt} je výška píku analytu a c_{analyt} je koncentrace analytu.

2.3.5.2 Návratnost metody

Návratnost neboli správnost metody udává rozdíl mezi experimentálně zjištěnou koncentrací od koncentrace reálné a je vyjádřena v procentech (rovnice 3). Pro vyjádření výsledků byla vypočtena také směrodatná odchylka (SD). [136].

$$\text{Návratnost [\%]} = \frac{c_{\text{vypočtená}}}{c_{\text{skutečná}}} \cdot 100 \quad (3)$$

, kde $c_{\text{vypočtená}}$ odpovídá koncentraci, která byla experimentálně naměřená a vypočtená z rovnice kalibrační křivky a $c_{\text{skutečná}}$ vyjadřuje skutečnou koncentraci EC, která byla použita pro derivatizaci.

Pro zjištění návratnosti metody byly vybrány dvě koncentrační hladiny – jedna ze začátku kalibrační závislosti ($c_{\text{EC}} = 50 \text{ mg/l}$ a $c_{\text{močovina}} = 30, 43 \text{ mg/l}$) a druhá z jejího konce ($c_{\text{EC}} = 2600 \text{ mg/l}$ a $c_{\text{močovina}} = 1582 \text{ mg/l}$). Pro každou koncentraci pak byly připraveny tři deriváty, které byly jednou změřeny.

2.3.5.3 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost udává, jaká je shoda mezi naměřenými výsledky, a to v rámci jednoho dne (intradenní opakovatelnost) i během několika po sobě jdoucích dnů (mezidenní opakovatelnost). Vždy je podmínkou, aby tato měření probíhala na stejném přístroji, za stejných podmínek a byla prováděna stejným pracovníkem. Chyba vypočítané hodnoty opakovatelnosti je pak vyjádřena v procentech pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD). RSD lze vypočítat jako poměr směrodatné odchylky (SD) a průměru naměřených hodnot (\bar{x}), který je následně stokrát vynásoben (rovnice 4) [136].

$$RSD [\%] = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

, kde SD je směrodatná odchylka a \bar{x} odpovídá průměru naměřených hodnot.

Pro určení intradenní opakovatelnosti bylo měřeno pět derivátů jedné koncentrační hladiny ($c_{EC} = 400 \text{ mg/l}$ a $c_{močovina} = 243,5 \text{ mg/l}$) během jednoho dne. Pro zjištění mezidenní opakovatelnosti bylo měřeno také 5 derivátů o zvolené koncentraci ($c_{EC} = 2700 \text{ mg/l}$ a $c_{močovina} = 1850 \text{ mg/l}$), nicméně tyto deriváty byly připraveny a analyzovány v různé dny. U mezidenní i intradenní opakovatelnosti byly sledovány plochy píků i jejich retenční časy.

2.3.6 Zpracování experimentálních dat

Ke sběru dat byl používán software Clarity (DataApex, Praha). Po vyhodnocení chromatogramů byla naměřená data dále zpracovávána v programu Office Excel 2016.

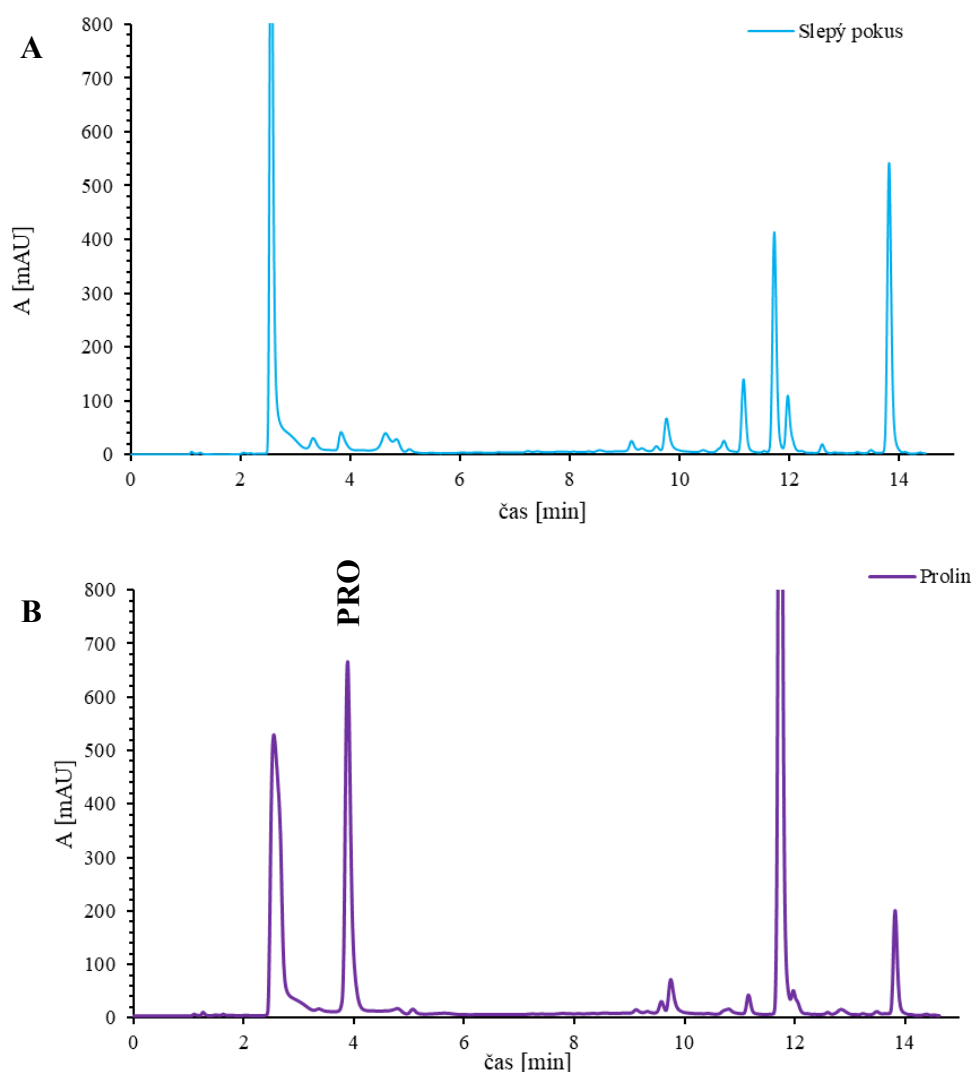
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části diplomové práce bylo zkoumáno, zda je EC možné derivatizovat běžně dostupnými derivatizačními činidly pro jeho následnou HPLC analýzu, a nahradit tak doposud výhradně používané činidlo 9-xanthidrol. Současně s EC byla pomocí zvolených činidel zkoumána také derivatizace močoviny, jakožto strukturně blízkého analogu a zároveň i důležitého EC prekurzoru. Derivatizační činidla byla vybírána na základě jejich komerční dostupnosti, ceny a zejména teoretické možnosti průběhu reakce s ne příliš reaktivním EC a močovinou.

3.1 Derivatizace s fenylisothiokyanátem

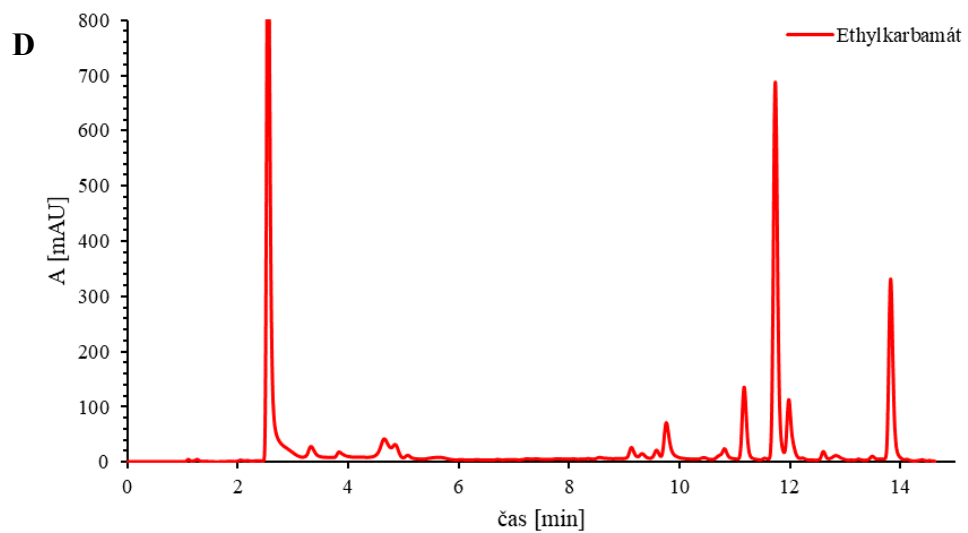
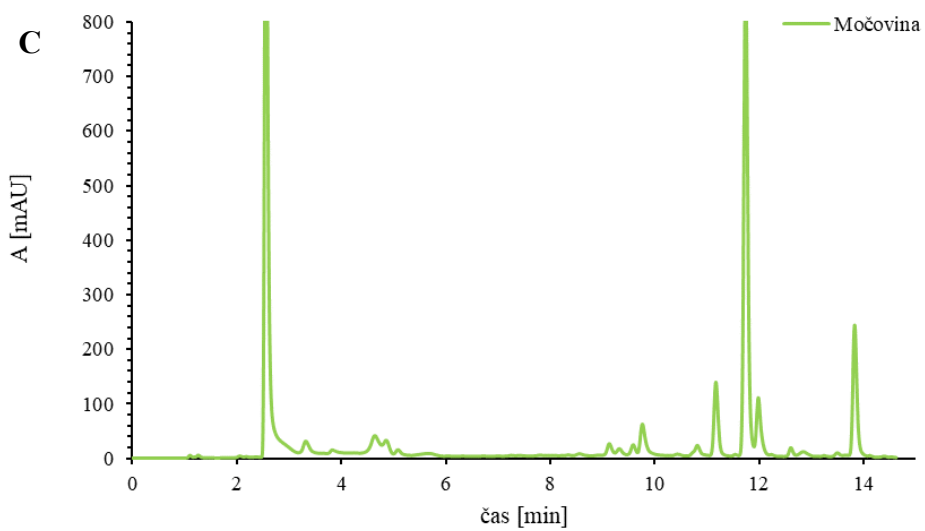
Jelikož PITC je běžné derivatizační činidlo aminů či aminokyselin, a mohl by tak být i potenciálním činidlem EC či močoviny, byla testována jeho reaktivita s těmito analyty. Pro PITC derivatizaci EC a močoviny bylo zkoušeno několik postupů vycházejících z literatury [137; 138]. Jako referenční látka průběhu reakce byla zvolena aminokyselina prolin (PRO). Jako první byl zkoušen kratší postup [138], kdy bylo do 1,5ml Eppendorfovy mikrozkušavky napipetováno 200 μ l standardního vodného roztoku EC, močoviny nebo PRO o $c = 1$ g/l (v případě slepého pokusu bylo pipetováno pouze 200 μ l vody), 50 μ l triethylaminu (TEA), 50 μ l 1M octanu sodného a 50 μ l PITC. Směs byla řádně promíchána a ponechána 20 min při laboratorní teplotě. Po reakci došlo k rozdělení na dvě fáze a následovalo odstředění (2 min, 10 000 ot/min). Pro analýzu pomocí systému HPLC/UV/VIS byla odebrána horní organická fáze. Separace proběhla na koloně Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m) temperované na teplotu 30 °C. Mobilní fází byla směs 70mM octanu amonného o pH 6,55 (složka A) a 60 % vodného acetonitrilu (ACN; složka B), pro kterou byl zvolen průtok 0,6 ml/min. Pro separaci byla zvolena gradientová eluce s následujícím programem: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B; 14 min – 100 % B. Na kolonu byly dávkovány 2 μ l a detekce probíhala při 254 nm. Na stejné koloně a za stejných podmínek byla zkoušena také separace, při které byla používána mobilní fáze sestávající z vody o pH 8 (A) a 100% ACN (B). Kromě výše zmíněného gradientu byla zkoušena i separace pomocí izokratické eluce, v níž byla koncentrace MF B 60–70 %. EC i močovina však poskytovaly stejné chromatografické záznamy jako slepý pokus. V další analýze byl zvýšen průtok MF na 1 ml/min a připravené deriváty byly analyzovány za pomoci gradientové eluce s následujícím průběhem: 0 min – 15 % B, 6,5 min – 23 % B, 7 min – 100 % B. Bez ohledu na zvolené podmínky byly ale chromatogramy EC a močoviny opět shodné s chromatogramem slepého pokusu (Obrázek 20A, C, D). EC ani močovinu se tedy nepodařilo

výše zmíněným derivatizačním postupem zderivatizovat. Naopak PRO s činidlem dle očekávání bez problému zreagoval (Obrázek 20B) a výsledný derivát poskytuje pík odpovídající retenčnímu času $t_R = 3,97$ min (podmínky separace jsou uvedené v popisku Obrázku 20). Kromě chromatografické analýzy byly také změřeny UV/VIS spektra derivatizačních směsí, včetně slepého pokusu, a to v rozmezí vlnových délek 200–800 nm. Z Obrázku 21 je patrné, že u žádného analytu nedošlo derivatizací k posunu absorpčních pásů. Absorpční pásy EC po PITC derivatizaci se naprosto shodují s pásy slepého pokusu a u derivátu prolinu a močoviny došlo oproti slepému pokusu pouze ke zvýšení maxim absorpčních pásů ($\lambda_{MAX} = 206, 280$ a 320 nm).



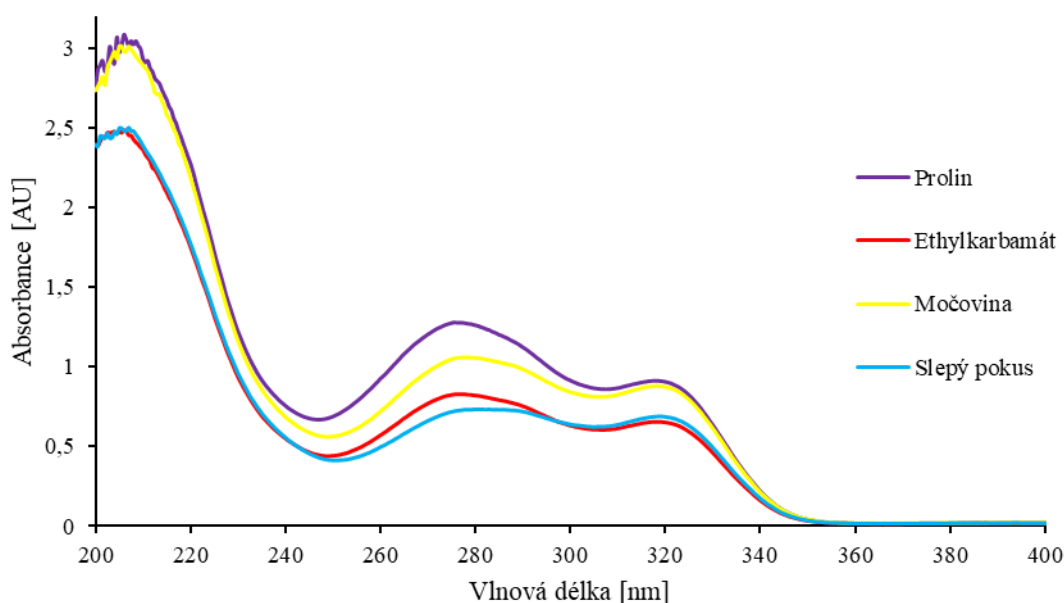
Obrázek 20: HPLC separace slepého pokusu (A) a PRO (B) po PITC derivatizaci.

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; MF A: 70mM octan amonný (pH 6,55), MF B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B; 14 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 254 nm.



Obrázek 21: HPLC separace močoviny (C) a EC (D) po PITC derivatizaci.

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 °C; MF A: 70mM octan amonný (pH 6,55), MF B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 6% B, 1 min – 10% B, 4 min – 18% B; 14 min – 100% B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 254 nm.

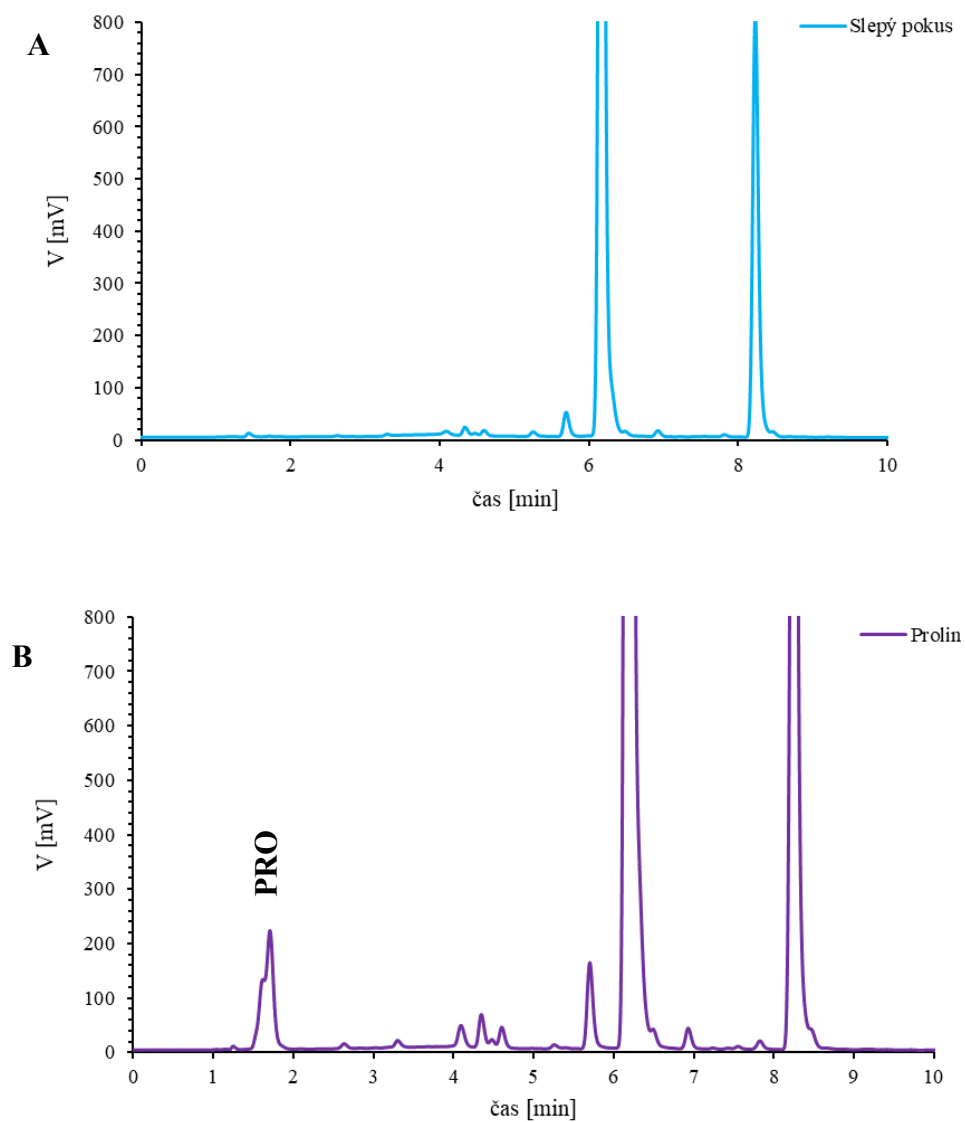


Obrázek 22: UV/VIS spektrum PRO, EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizační reakci s PITC.

Jelikož by derivatizace EC, potažmo močoviny, měla s PITC činidlem teoreticky proběhnout i za neutrálních podmínek, byla následně zkoušena modifikace výše zmíněné derivatizační reakce, při které byl vynechán bazický TEA a octan sodný. Do Eppendorfovy mikrozkušavky bylo tedy napipetováno 200 μ l vodného roztoku EC nebo močoviny o $c = 1$ g/l (u slepého pokusu bylo pipetováno 200 μ l vody), 50 μ l vody, 50 μ l ACN a 50 μ l PITC. Derivatizační směsi byly upraveny stejným způsobem jako u předchozího postupu, včetně podmínek následné analýzy. Bohužel ani v tomto případě nebyla derivatizace úspěšná.

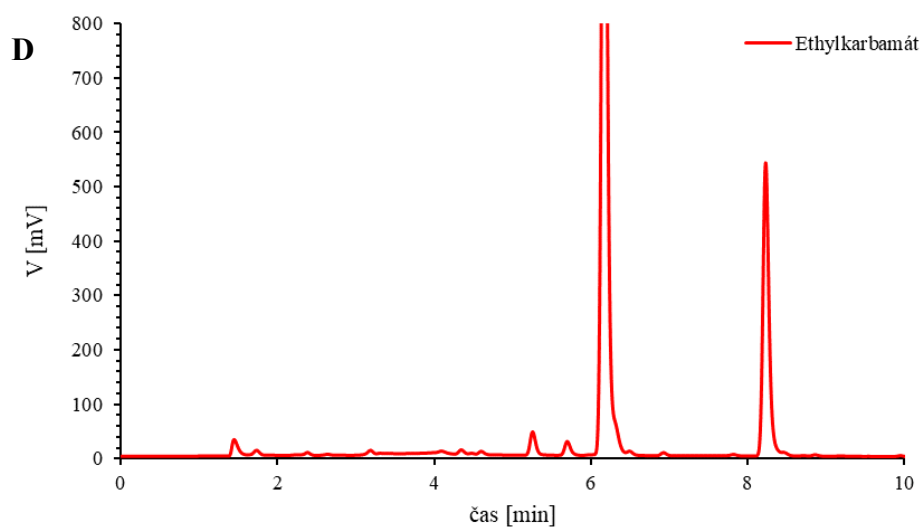
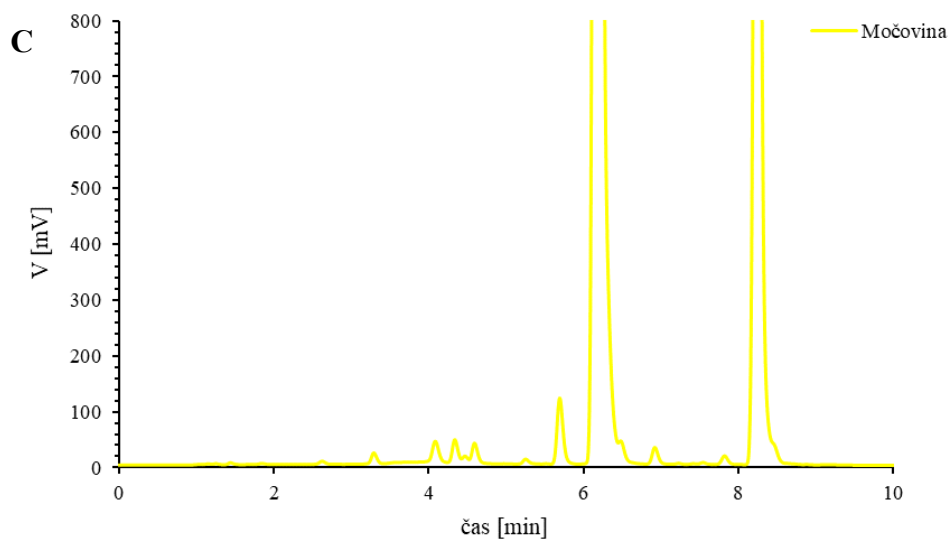
Nakonec byl testován tradiční postup PITC derivatizace [137], který je kvůli několikanásobnému sušení poměrně časově náročný. Do Eppendorfovy mikrozkušavky bylo pipetováno 60 μ l vodného roztoku PRO, EC nebo močoviny o $c = 1$ g/l a následovalo sušení pod proudem dusíku. Po vysušení bylo přidáno 40 μ l první derivatizační směsi, která se skládala z MetOH, 1 M octanu sodného a TEA v poměru 2:2:1 (v/v/v). Po promíchání byla směs opět vysušena pod proudem dusíku. K sušině bylo napipetováno 100 μ l druhé derivatizační směsi, která obsahovala MetOH, redestilovanou vodu, TEA a PITC v objemovém poměru 7:1:1:1. Tato směs byla promíchána, ponechána 20 minut při laboratorní teplotě a poté byla opět vysušena. Sušina byla rozpuštěna ve 200 μ l MetOH a následovalo odstředění (2 min, 10 000 ot/min). Horní organická vrstva byla následně analyzována pomocí HPLC/UV/VIS systému za stejných podmínek jako derivatizace bez sušících kroků. U slepého pokusu byl vynechán pouze první krok, jinak byl výše zmíněný postup dodržen. Jak dokazují

Obrázky 22A, C, D, ani tímto postupem se nepodařilo EC či močovinu zderivatizovat. Naopak PRO (Obrázek 22B) opět bez problému zreagoval.



Obrázek 23: HPLC separace slepého pokusu (A) a PRO (B) po PITC derivatizaci se sušícími kroky.

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; MF A: 70mM octan amonný (pH 6,55), MF B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 30% B, 3 min – 60 % B, 9 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 254 nm.

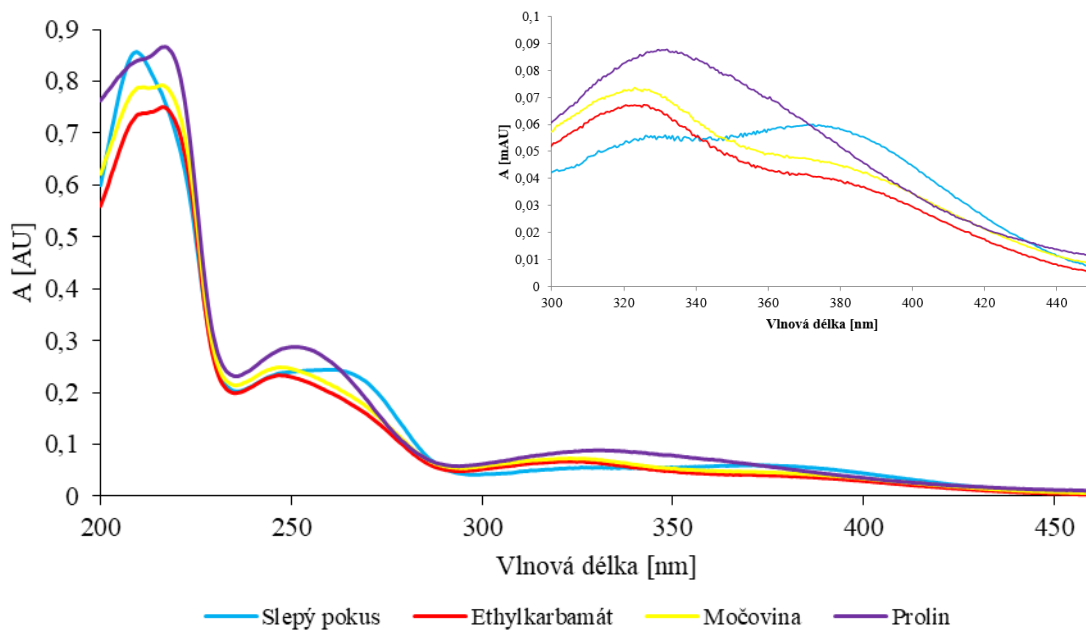


Obrázek 24: HPLC močoviny (C) a EC (D) po PITC derivatizaci se sušícími kroky.

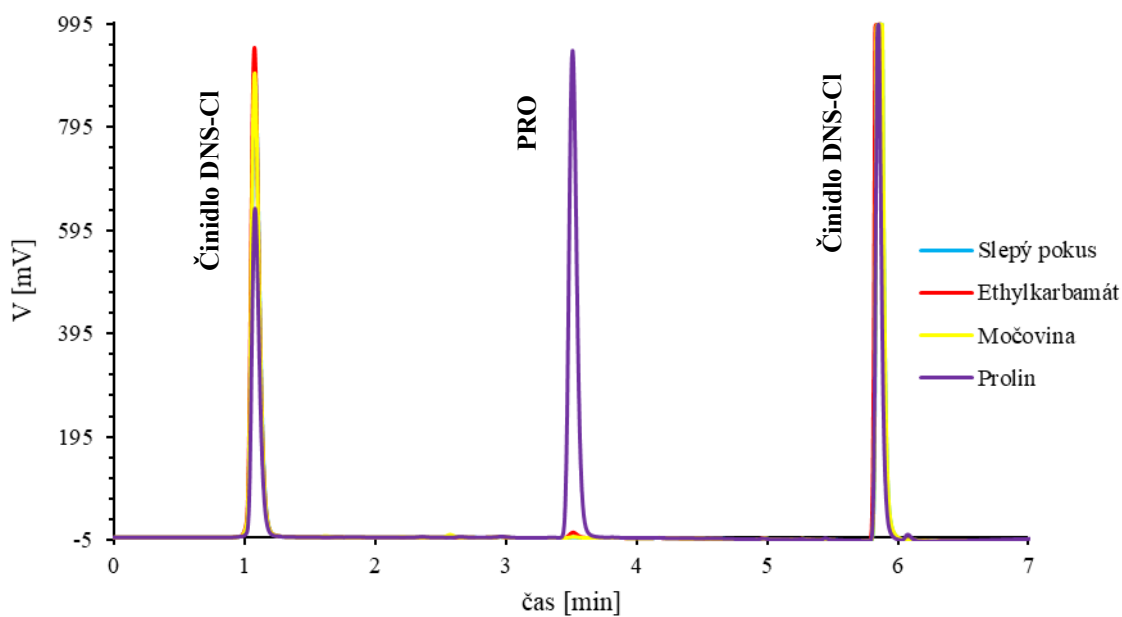
Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (150 x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 °C; MF A: 70mM octan amonný (pH 6,55), MF B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 30% B, 3 min – 60 % B, 9 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 254 nm.

3.2 Derivatizace s dansylchloridem

Dansylchlorid je jedno z nejstarších a nejvíce používaných derivatizačních činidel, které v mírně alkalickém prostředí reaguje nejen s aminy, ale i alkoholy či fenoly. Z tohoto důvodu byl DNS-Cl testován i pro derivatizaci EC a močoviny. Stejně jako u PITC derivatizace byl i v tomto případě použit prolin jako referenční látka. Derivatizační reakce vycházela z literatury [139]. V Eppendorfově mikrozkušovací skleničce bylo smíseno 500 μ l standardního roztoku EC, močoviny nebo PRO (všechny o $c=1$ g/l ve vodě), 1 ml 0,01M DNS-Cl v ACN a 5 mg pevného uhličitanu lithného, který slouží jako katalyzátor reakce a také zvyšuje pH reakční směsi. Zároveň byl připraven také slepý pokus, kde bylo 500 μ l standardního roztoku analytu nahrazeno redestilovanou vodou. Tyto derivatizační směsi byly promíchány a ponechány 20 minut ve vodní lázni vyhřáté na 40 °C. Po vhodném naředění byly derivatizační směsi měřeny spektrofotometricky (spektra v rozsahu $\lambda = 200\text{--}800$ nm) i chromatograficky pomocí HPLC/UV/VIS (podmínky chromatografické separace vycházely z literatury [139]). Látky byly separovány na koloně Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m) temperované na teplotu 30 °C. Mobilní fázi s průtokem 0,6 ml/min tvořil 0,1% vodný roztok TEA o pH 3, kterého bylo dosaženo pomocí kyseliny mravenčí (A), a 100% ACN (B). Na kolonu byly dávkovány 2 μ l a detekce probíhala nejprve při 270 nm a po změření absorpčních spekter i při 320 nm. Pro separaci byla zvolena gradientová eluce s následujícím průběhem: 0 min – 40 % B, 3 min – 50 % B, 5 min – 100 % B. Jak lze vidět na spektrech (Obrázek 23), absorpční pás slepého pokusu kolem 380 nm je intenzivnější než absorpční pásy derivátů, což bylo potvrzeno také zbarvením směsi. U blanku – na rozdíl od ostatních látek – žluté zbarvení přetrvávalo i po zahřátí. Ostatní derivatizační směsi se v průběhu reakce odbarvily. Pokud se zaměříme na pásy kolem 250 nm a 330 nm, tak vidíme, že se jejich průběhy či intenzity ve srovnání se slepým pokusem změnilly nejen u prolinu, ale i u EC a močoviny. Na základě těchto poznatků byl předpoklad, že dansylace všech analytů proběhla. Po chromatografické analýze byly však chromatogramy EC a močoviny totožné s chromatogramem slepého pokusu, a to i při různých programech gradientové eluce (Obrázek 24). Tímto derivatizačním postupem zreagoval pouze prolin.



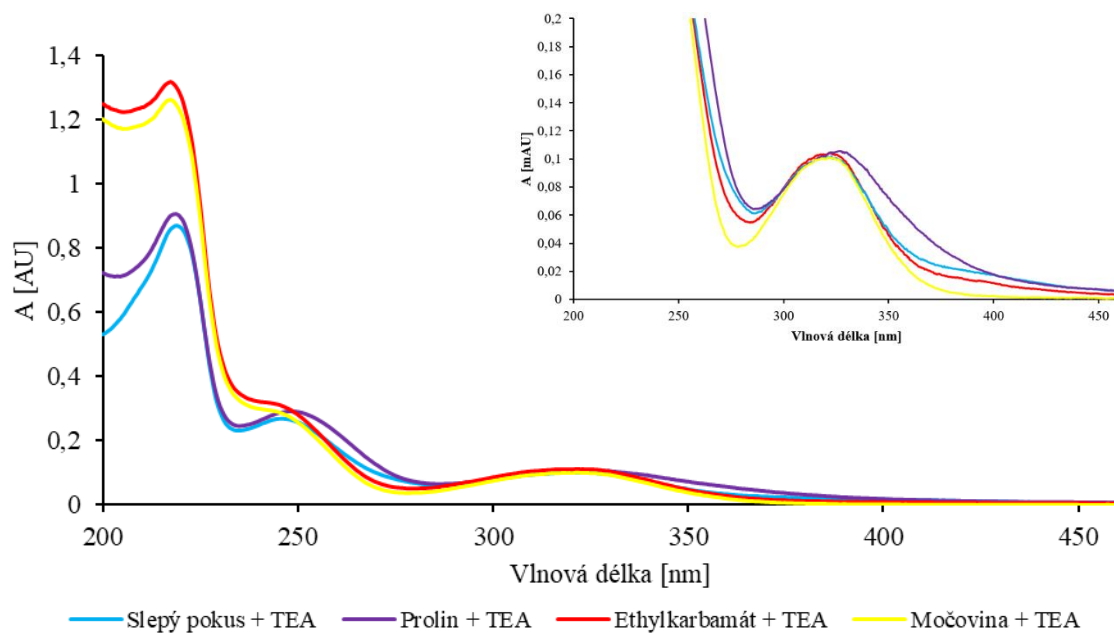
Obrázek 26: UV/VIS spektrum PRO, EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizační reakci s DNS-Cl.



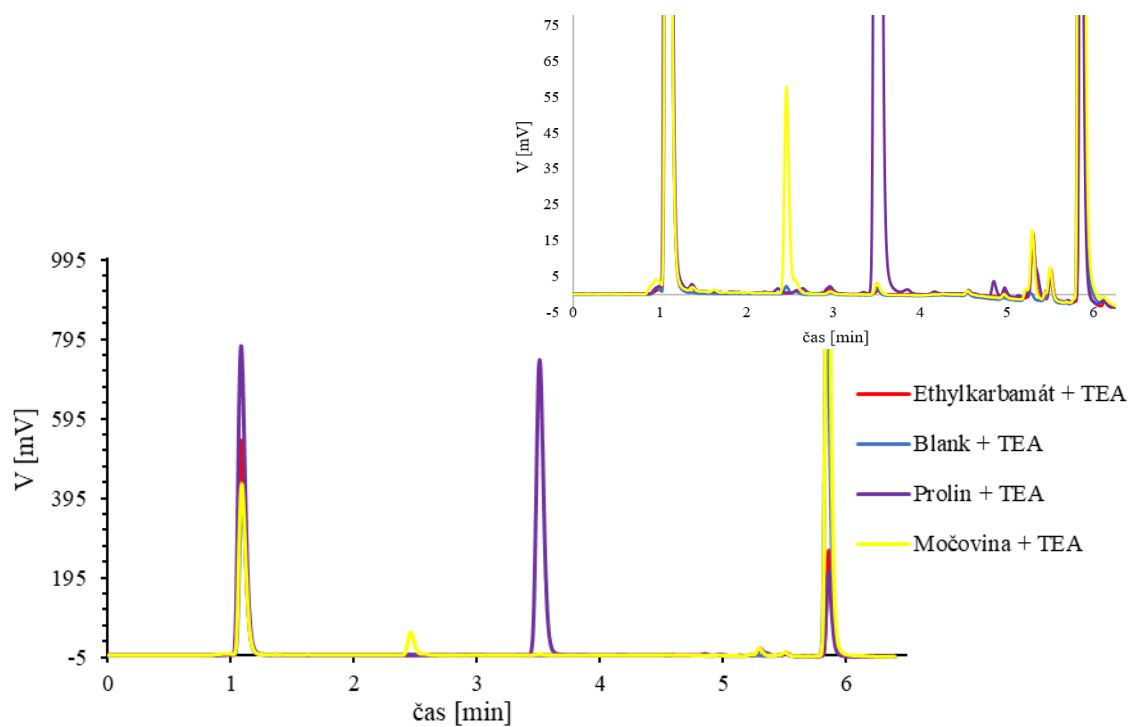
Obrázek 25: HPLC separace PRO, EC, močoviny a slepého pokusu po DNS-Cl derivatizaci.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; MF A: 0,1% vodný roztok TEA o pH 3 (pomocí HCOOH); MF B: 100% ACN; gradient: 0 min – 40 % B, 3 min – 50 % B, 5 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 270 nm.

Tradičně se dansylace provádí bez přístupu světla a s využitím bazických látek [110], které neutralizují vznikající HCl. Z tohoto důvodu proběhly další derivatizační reakce za tmy a v prostředí mírně bazického TEA nebo pyridinu. Reakční směsi analytů byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě, jen byly navíc přidány 2 μ l TEA nebo 1,5 μ l pyridinu. Absorpční spektra derivátů připravených v přítomnosti TEA se od těch původních značně liší (Obrázek 23 a 25), nicméně se zásadně nelišily od spektra obdobně připraveného slepého pokusu. Pouze absorpční pásy prolinu jsou kolem 270 nm a 350 nm širší než u ostatních derivatizačních směsí. Narozdíl od původní derivatizace, při níž došlo k odbarvení reakčních směsí všech analytů a pouze u slepého pokusu žluté zbarvení přetrvávalo, se při derivatizaci s přidavkem TEA odbarvily všechny derivatizační směsi, včetně slepého pokusu. To je potvrzeno i spektrem (Obrázek 25), ve kterém má absorpční pás kolem 380 nm mnohem menší intenzitu než u derivatizace původní (Obrázek 23). Chromatografickou analýzou bylo zjištěno, že při použití TEA docházelo k větší hydrolyze činidla a pík derivátu prolinu měl menší intenzitu (Obrázek 24 a 26). U chromatogramů derivatizačních směsí EC a močoviny byly zaznamenány malé píky (zejména v případě močoviny, a to v retenčním čase $t_R = 2,5$ min a $t_R = 5,29$ min), jež se u chromatogramu slepého pokusu nenacházely (Obrázek 26). Pro ověření, zda tyto píky opravdu patří derivátům těchto analytů, byly připraveny koncentrovanější vodné roztoky EC ($c = 27$ g/l) a močoviny ($c = 18,5$ g/l), které byly použity pro výše popsanou derivatizační reakci s přidavkem TEA. Nedošlo však ke zvětšení plochy sledovaných píků, a tak lze konstatovat, že derivatizace neproběhla. Chromatografické analýzy všech derivatizačních směsí byly následně provedeny při 325 nm, avšak i v tomto případě se v chromatogramech vyskytoval vedle píků činidla pouze pík derivátu prolinu.



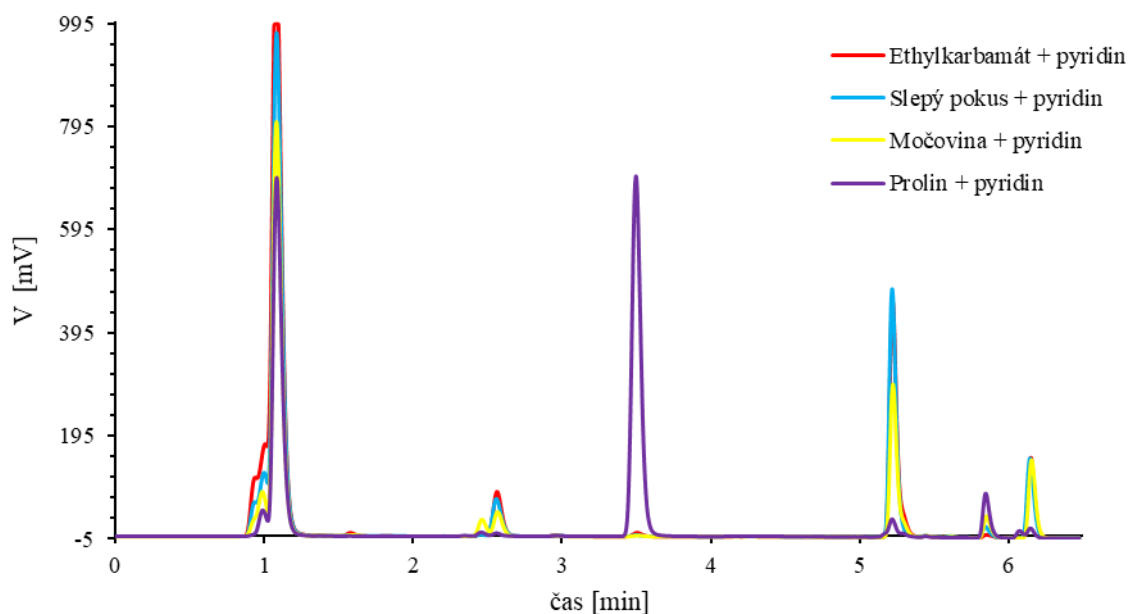
Obrázek 28: UV/VIS spektra močoviny, EC, PRO a slepého pokusu po reakci s DNS-Cl v přítomnosti TEA.



Obrázek 27: HPLC separace EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizaci s DNS-Cl v přítomnosti TEA.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; MF A: 0,1% vodný roztok TEA o pH 3 (pomocí HCOOH); MF B: 100% ACN; gradient: 0 min – 40 % B, 3 min – 50 % B, 5 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 270 nm.

Při použití pyridinu došlo nejspíš k rozkladu činidla nebo k reakcím s pomocnými derivatizačními komponenty, jelikož se v chromatogramu slepého pokusu objevilo větší množství píků (Obrázek 27). Pyridinové prostředí navíc k tvorbě DNS-Cl derivátu EC či močoviny stejně nevedlo.



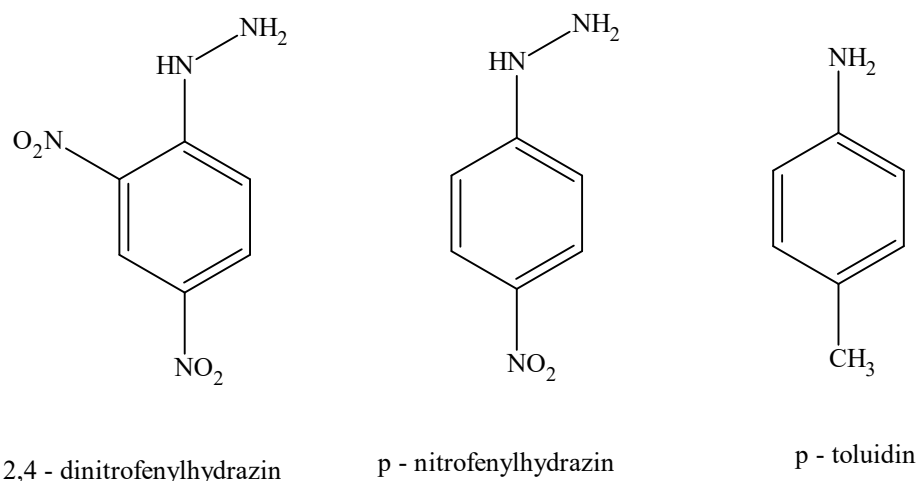
Obrázek 29: HPLC separace EC, močoviny a slepého pokusu po derivatizaci s DNS-Cl v přítomnosti pyridinu.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm); teplota 30 $^{\circ}\text{C}$; MF A: 0,1% vodný roztok TEA o pH 3 (pomocí HCOOH); MF B: 100% ACN; gradient: 0 min – 40 % B, 3 min – 50 % B, 5 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; dávkování: 2 μl ; detekce při 270 nm.

Jelikož zvýšená teplota obvykle podporuje průběh reakce či zvyšuje její kinetiku, byla derivatizace analytů dále prováděna ve vodní lázni temperované na teplotu 60 $^{\circ}\text{C}$ a posléze i 80 $^{\circ}\text{C}$. Derivatizační směsi analytů byly měřeny po 60 minutách (Obrázek P1A) a 120 minutách (Obrázek P1B) při 60 $^{\circ}\text{C}$ a po 30 minutách při 80 $^{\circ}\text{C}$ (Obrázek P1C). Zvýšená teplota však průběh reakce nepodpořila a docházelo pouze k větší hydrolyze činidla.

3.3 Derivatizace aromatickými aminy a hydraziny

Jelikož by reakcí EC s hydraziny či aminy mohlo za vyšších teplot docházet k syntéze substituované močoviny, byly dalšími testovanými činidly *p*-nitrofenylhydrazin, 2,4-dinitrofenylhydrazin a *p*-toluidin (Obrázek 28).

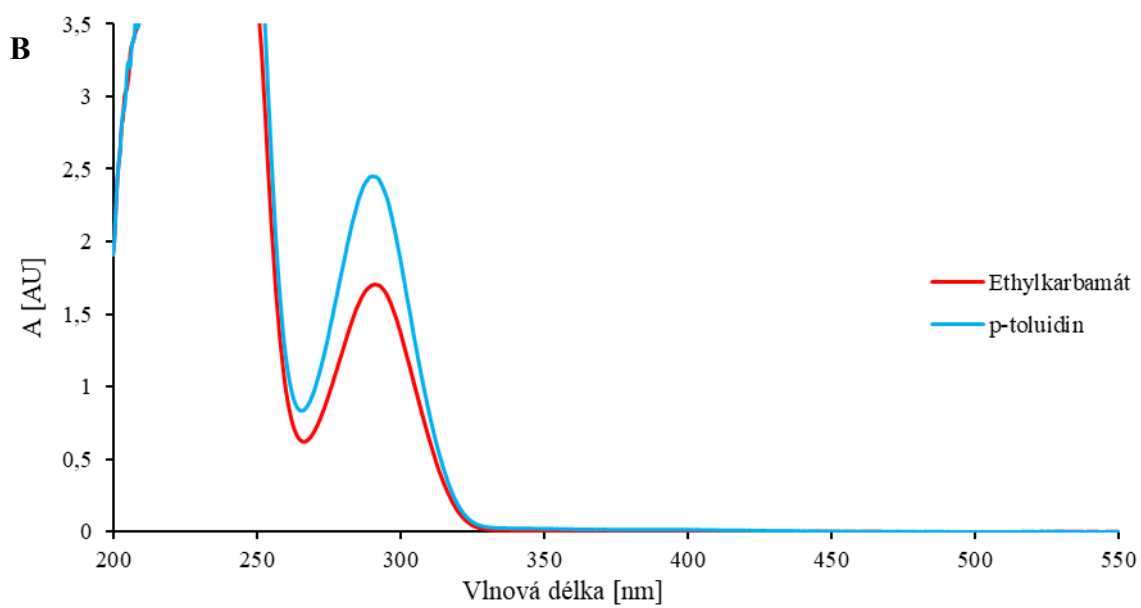
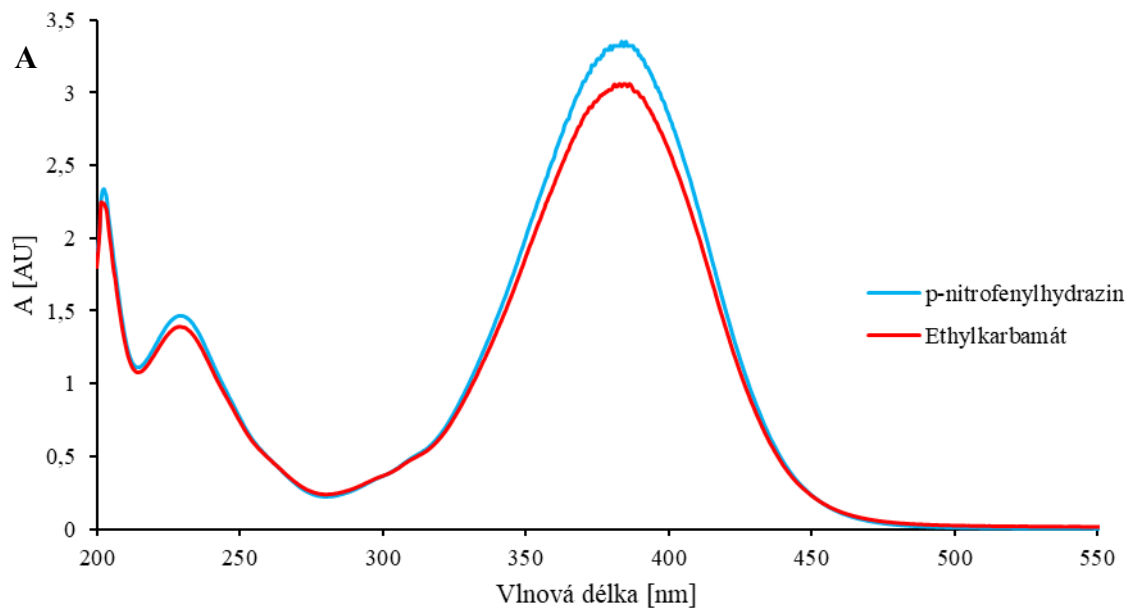


Obrázek 30: Chemické struktury 2,4-dinitrofenylhydrazinu, *p*-nitrofenylhydrazinu a *p*-toluidinu.

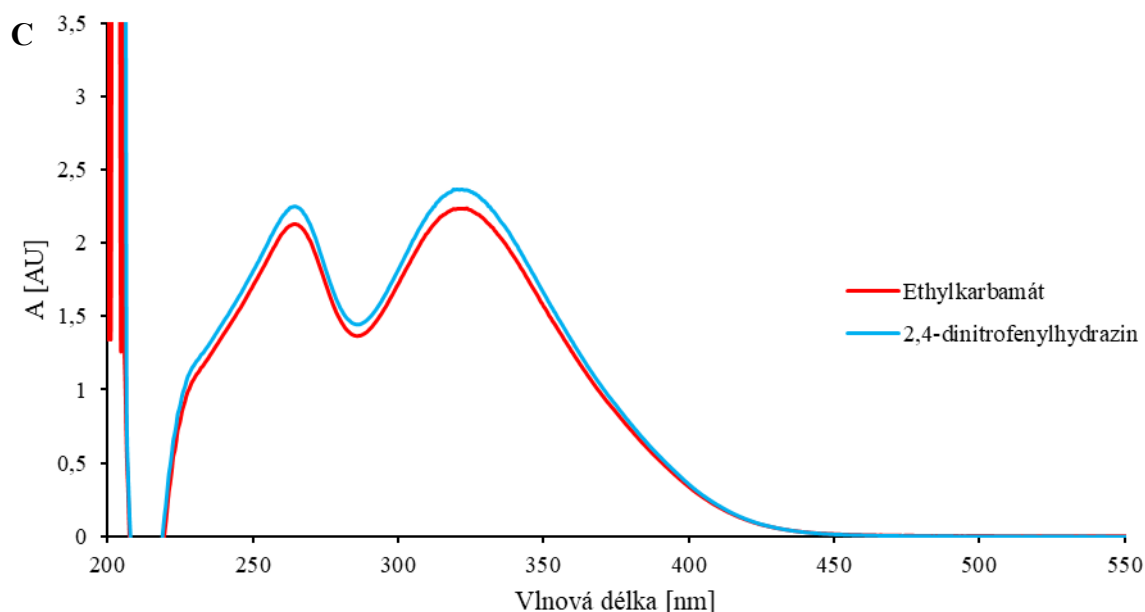
Derivatizační reakce EC s *p*-nitrofenylhydrazinem byla provedena v molárním poměru 1:1. K reakci byl navážen 1 g činidla a 0,5817 g EC. Obě komponenty byly rozpuštěny v ethanolu, smíchány a následně vařeny pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Derivatizační směs byla ochlazená, 100x naředěna ethanolem a proměřena na spektrofotometru. Pásky činidla se ale shodovaly s pásky potenciálního derivátu (Obrázek 29A).

Obdobně se postupovalo i v případě *p*-toluidinu, kdy byl do zábrusové baňky navážen 1 g činidla a 0,8313 g EC a pro rozpuštění derivatizačních komponent byl přidán ethanol. Tato směs byla opět vařena pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny, následně ochlazená, 100x naředěna ethanolem a bylo proměřeno UV/VIS spektrum. Pásky samotného činidla odpovídaly i v tomto případě pásům derivatizační směsi (Obrázek 29B).

V případě 2,4-dinitrofenylhydrazinu byla tímto činidlem naplněna plná zkumavka, do které byl přidán jak pevný EC (či močovina), tak i jejich vodné roztoky a směsi bylo třepáno. Nedošlo ke vzniku sytě oranžové sraženiny ani emulze, což naznačuje, že reakce neproběhla. I tak bylo proměřeno spektrum dané směsi, které bylo stejné jako spektrum činidla (Obrázek 29C).



Obrázek 31: Spektra EC po reakci s *p*-nitrofenylhydrazinem (A) a *p*-toluidinem (B).

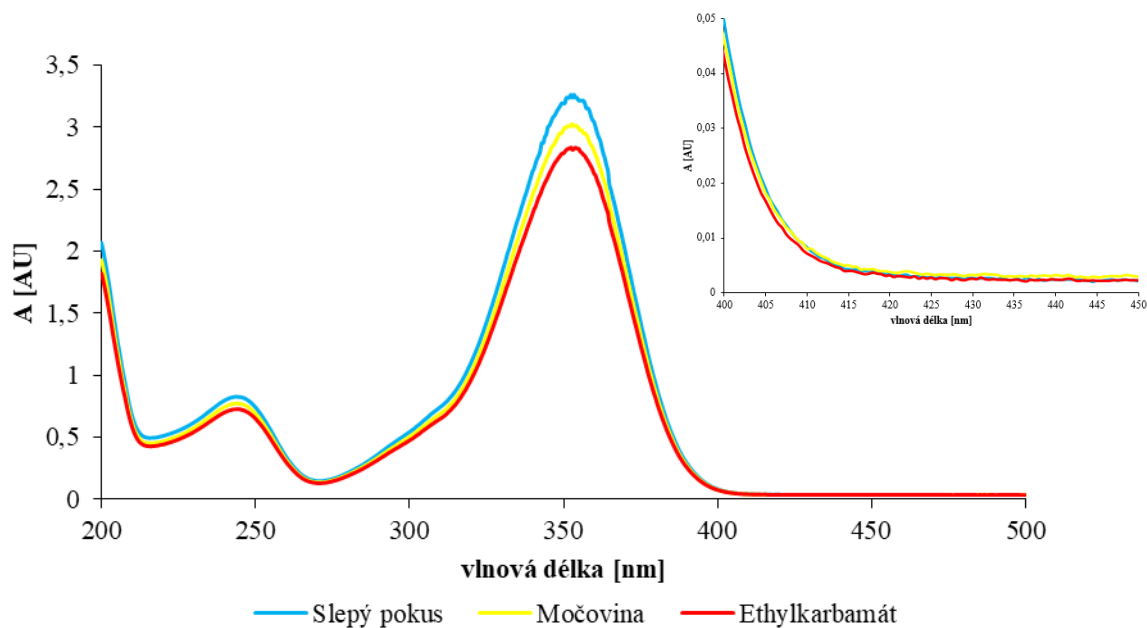


Obrázek 32: Spektra EC po reakci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (C).

Z časových důvodů již nebyly tyto látky proměřeny na HPLC, avšak dle doložených spekter se zdá, že k reakci EC s vybranými činidly nedošlo.

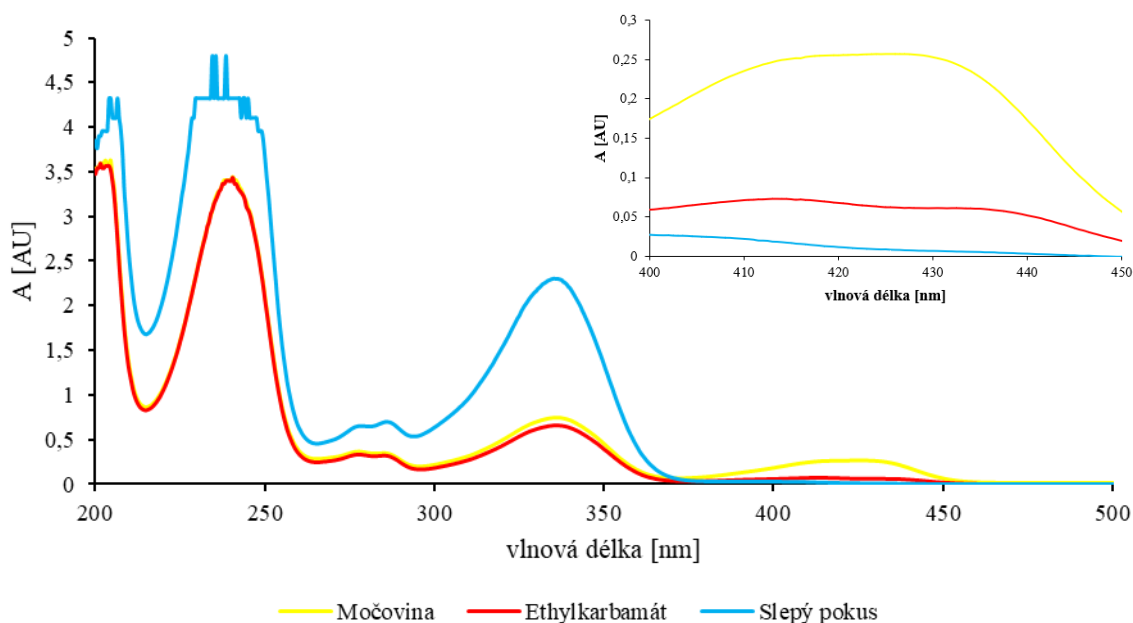
3.4 Derivatizace s *p*-dimethylaminobenzaldehydem

Jelikož je reakce *p*-DMAB s močovinou již popsána, bylo zkoušeno za stejných podmínek zderivatizovat také EC. Nejdříve byl zkoušen modifikovaný derivatizační postup převzatý z literatury [140], kdy bylo smíšeno 1800 μ l 20mM roztoku *p*-DMAB v ACN, 64 μ l 35% HCl a 1000 μ l 10mM roztoku EC nebo močoviny ve vodě (v případě slepého pokusu pouze 1000 μ l vody). Připravené derivatizační směsi byly řádně protřepány a po vhodném zředění acetonitrilem byly změřeny spektra, přičemž hlavní důraz byl kladen na pás v oblasti 420 nm. Jak lze vidět na Obrázku 30, přestože se derivatizační směsi zbarvily zeleno-žlutě (reakce tedy proběhla), při 420 nm nedocházelo k tvorbě nového absorpčního pásu derivatizačních směsí, a nebylo tak možné vznikající derivát močoviny ani EC odhalit.



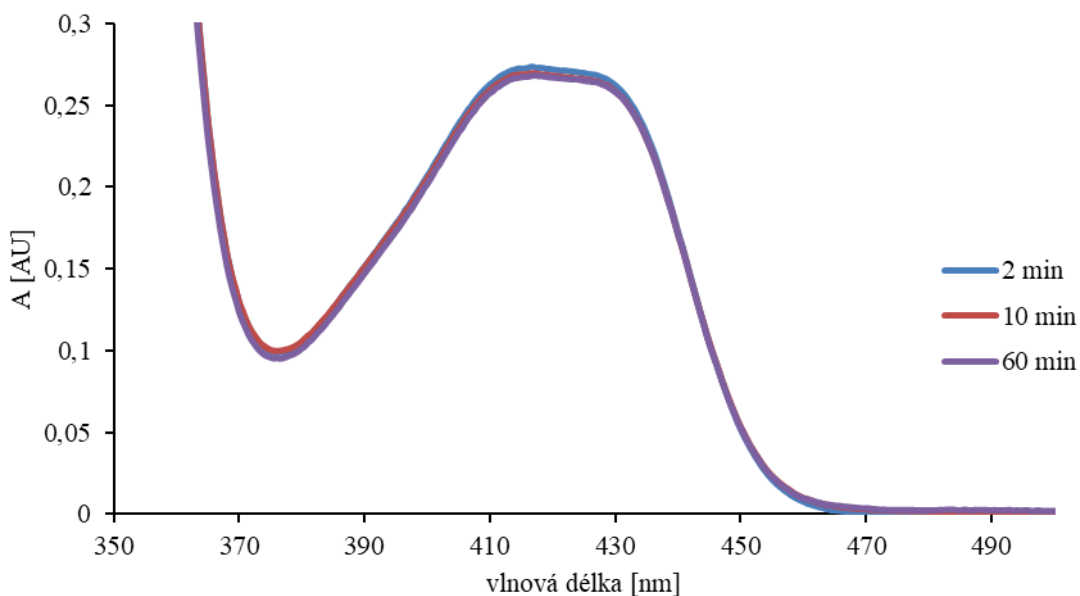
Obrázek 33: UV/VIS spektra močoviny, EC, a slepého pokusu po reakci s *p*-DMAB dle literatury [139].

Jako druhá byla zkoušena derivatizační reakce převzatá z literatury [141], v rámci které bylo smícháno 100 μ l standardního roztoku EC ($c = 303$ mmol/l) nebo močoviny ($c = 308$ mmol/l) s 500 μ l derivatizačního činidla *p*-DMAB ($c = 183$ mmol/l), které bylo připraveno rozpuštěním 300 mg *p*-DMAB činidla v 10 ml ethanolu a 1 ml 35% HCl. Současně s deriváty byl připraven slepý pokus, kdy byly standardní roztoky nahrazeny vodou. Po protřepání směsi a vhodném naředění v ethanolu byly proměřeny UV/VIS spektra, na kterých byly oproti předešlému postupu jasně viditelné pásy derivátů v rozmezí vlnových délek 400 – 450 nm (Obrázek 31).

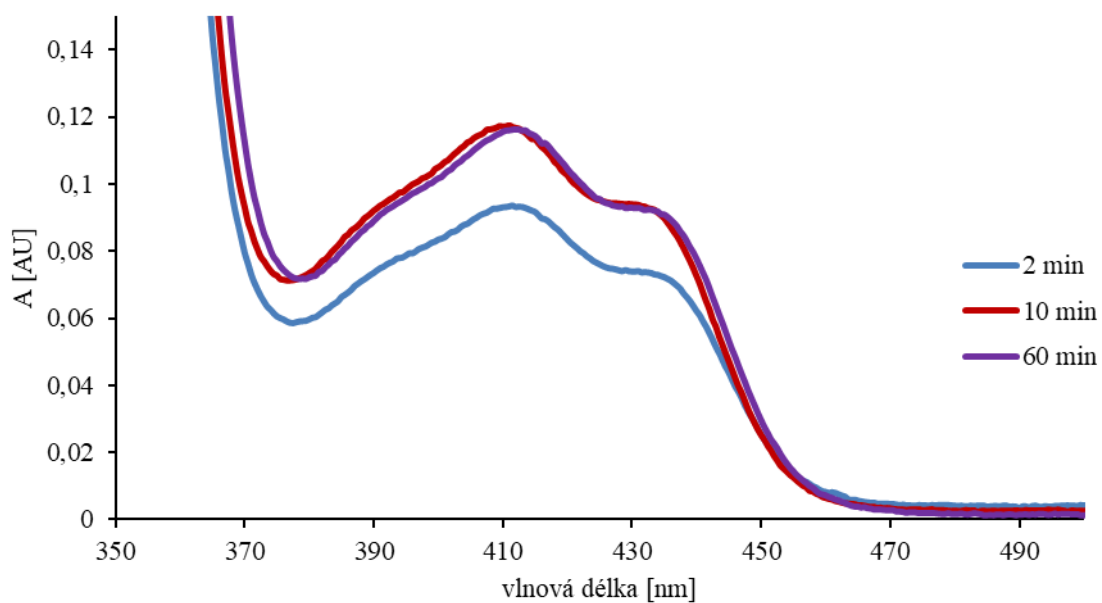


Obrázek 34: UV/VIS spektra močoviny, EC, a slepého pokusu po reakci s *p*-DMAB dle literatury [141].

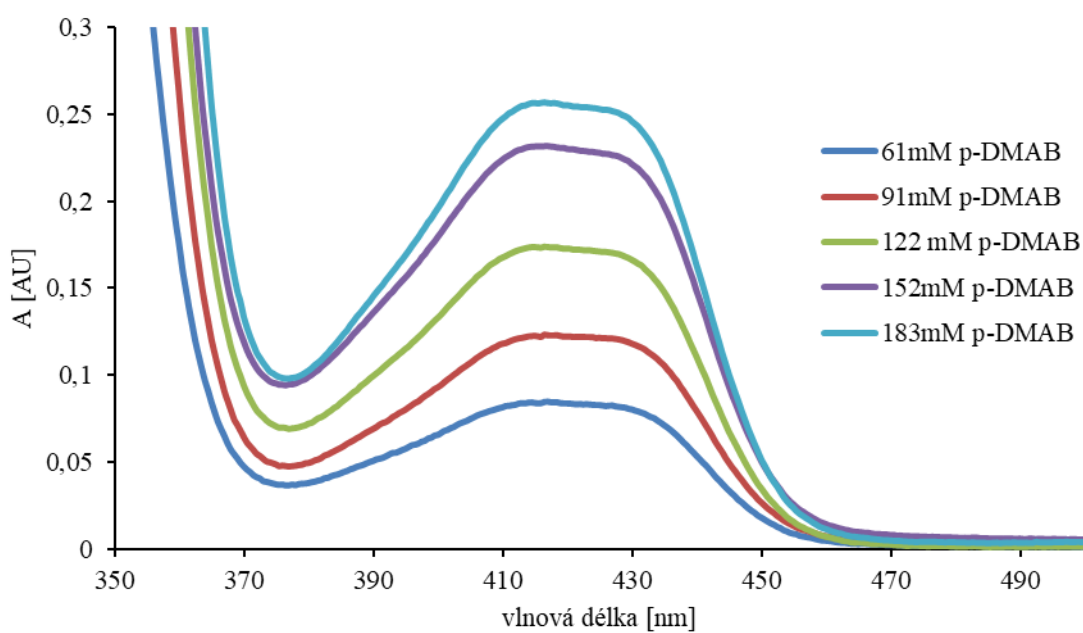
Spektrofotometricky byla následně studována také kinetika derivatizační reakce a bylo optimalizováno množství a molární poměr jednotlivých reaktantů. Byla připravená série různě koncentrovaných zásobních roztoků derivatizačního činidla ($c = 61 \text{ mmol/l}$, 91 mmol/l , 122 mmol/l , 152 mmol/l a 183 mmol/l), které byly smíseny se standardními roztoky EC ($c = 303 \text{ mmol/l}$) a močoviny ($c = 308 \text{ mmol/l}$) ve stejném objemovém poměru jako při předchozí reakci. Takto připravené roztoky byly následně proměřeny spektrofotometricky po 2, 10 a 60 minutách od přípravy. Ze záznamů (Obrázek 32) lze vidět, že reakce močoviny probíhá kvantitativně v podstatě již po 2 minutách, jelikož je intenzita pásu derivátu močoviny v průběhu hodiny téměř neměnná. Naopak u EC lze pozorovat nárůst intenzity o 0,2 % mezi druhou a desátou minutou (Obrázek 33). Z tohoto důvodu byly deriváty měřeny chromatograficky vždy po 10 minutách od přípravy. Zároveň nejlepší výsledky poskytovala reakce EC i močoviny s činidlem o nejvyšší koncentraci p -DMAB ($c_{p\text{-DMAB}} = 183 \text{ mmol/l}$) (Obrázky 34 a 35). Pro zjištění, zda by mohla podpořit derivatizační reakci zvýšená teplota, byla také proměřena spektra derivátu, který byl po přípravě zahříván 30 min ve vodní lázni vyhřáté na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Jak lze vidět na Obrázku P2, tento krok naopak způsobil snížení intenzity pásu derivátu, což naznačuje, že reakce je termolabilní.



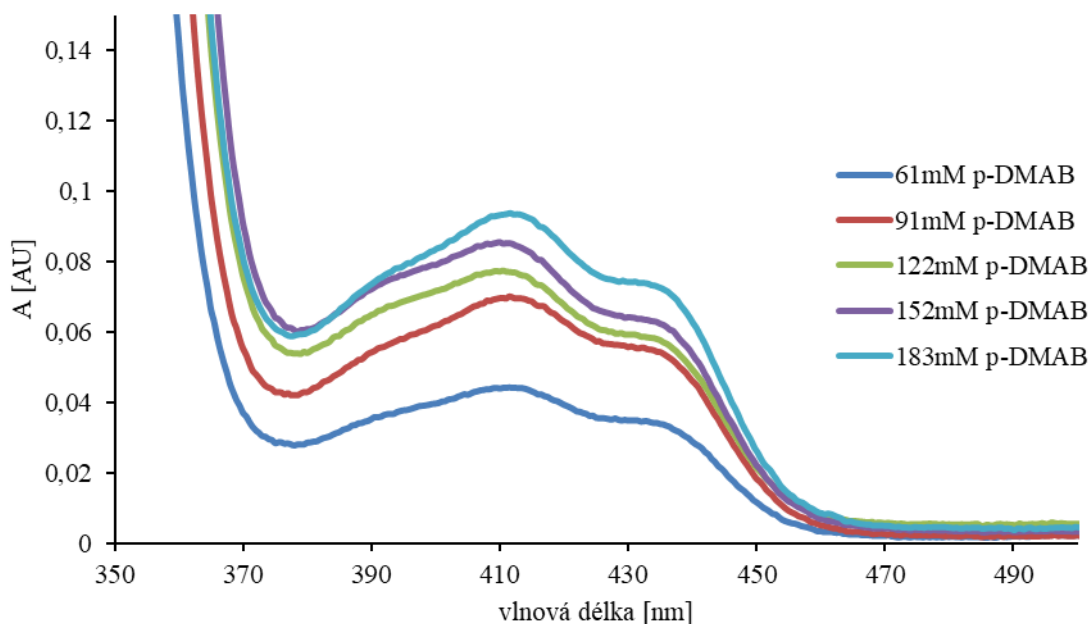
Obrázek 35: Derivát močoviny po reakci s 183mM p -DMAB měřený po 2, 10 a 60 minutách.



Obrázek 36: Derivát EC po reakci s 183mM p-DMAB měřený po 2, 10 a 60 minutách.



Obrázek 37: Derivát močoviny po reakci s různě koncentrovanými roztoky činidla p-DMAB.



Obrázek 38: Derivát EC po reakci s různě koncentrovanými roztoky činidla *p*-DMAB.

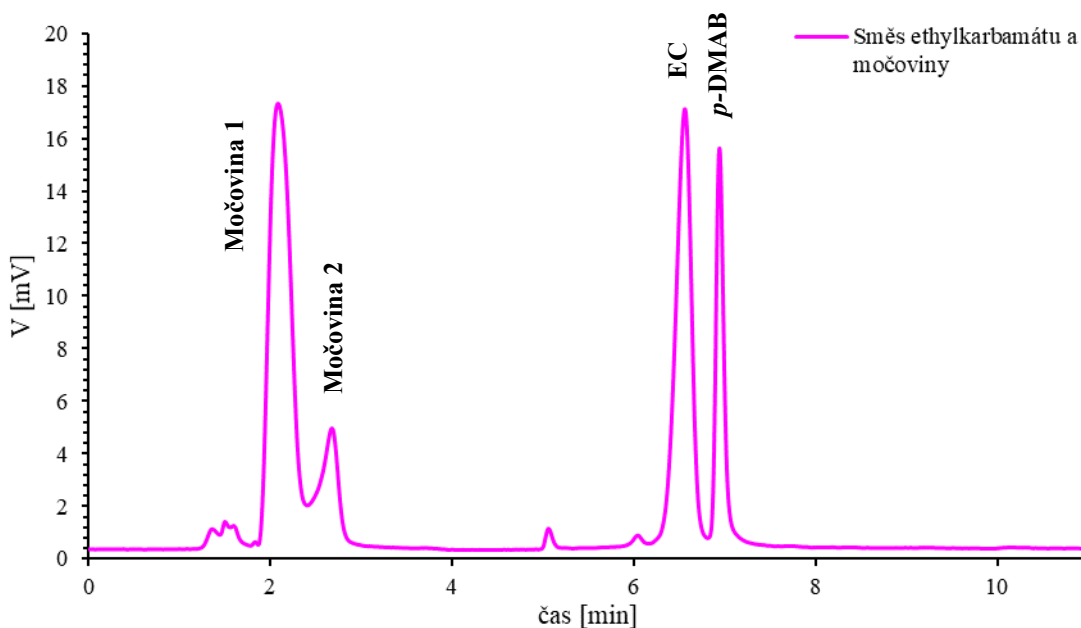
Pro chromatografickou analýzu byly deriváty měřeny jako směs EC a močoviny. Do derivatizační směsi bylo tedy přidáno po 50 μ l každého roztoku standardu.

3.4.1 Optimalizace podmínek separace *p*-DMAB derivátů EC a močoviny pomocí RP-HPLC

Za účelem dosažení co nejlepší citlivosti analýzy a separace byly optimalizovány jednotlivé chromatografické parametry, jako jsou složení a pH mobilní fáze, dále typ kolony a eluční podmínky. Cílem bylo dosáhnout co nejlepšího rozlišení v co nejkratším čase.

Jelikož byla pro analýzu *p*-DMAB derivátu močoviny v literatuře [142] používána MF složená z fosfátového pufru o pH 4,4 – 4,5 (A) a methanolu (B) a separace probíhala na oktadecylsilikagelové koloně, byly nejprve zvoleny tyto podmínky. Fosfátový pufr byl připraven z 0,1M NaH_2PO_4 a byl upraven na pH 4,5 pomocí 5 % H_3PO_4 . Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m) temperované na teplotu 30 $^\circ\text{C}$, na kterou byly dávkovány 2 μ l. Průtok mobilní fáze odpovídal 0,4 ml/min a detekce probíhala při 420 nm. Pro separaci byla zvolena gradientové eluce s následujícím průběhem: 0 min – 30 % B, 2 min – 50 % B; 6 min – 70 % B; 7 min – 100 % B. Močovina po této analýze poskytovala dva píky v retenčních časech $t_R = 3,7$ min a $t_R = 4$ min, které však stejně jako pík EC ($t_R = 6,7$ min), měly pouze malou intenzitu (Obrázek P3). Pro zjištění, zda jsou fosforečné ionty k separaci potřebné byla následně testována MF složená z 0,1% vodného roztoku TEA upraveného pomocí HCOOH na pH 4,5 (A) a 100% methanolu (B). Za stejných podmínek jako u předchozí separace

byla provedena analýza s gradientovou elucí: 0 min – 30 % B, 7 min – 100 % B. Jak lze vidět na přiloženém záznamu (Obrázek P4), takto připravená MF ke zlepšení kvality píků nepomohla, a proto byla dále testována jiná kolona, a to Ascentis Express RP-Amide (150 x 3,0 mm; 2,7 µm). Separace derivátů na ní proběhla s využitím fosfátového pufru o pH 4,5 či 0,1 % vodného roztoku TEA o pH 4,5 (A) a methanolu (B). Ostatní podmínky analýzy zůstaly nezměněné, včetně průběhu gradientové eluce. Ukázalo se, že tato kolona není vhodná pro separaci těchto derivátů, jelikož kvalita separace se oproti oktadecylsilylagelové koloně zhoršila u obou typů MF (Obrázek P5, P6). Z tohoto důvodu byla další měření realizována na původní koloně, tedy Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 µm), avšak s použitím MF o nižším pH. Pro dosažení optimální separace bylo zkoušeno velké množství různých gradientových programů, které se lišily počáteční koncentrací organické složky MF (20–30 % B), strmostí i množstvím jednotlivých kroků. Nejlepší separace pak na výše zmíněné koloně proběhla pomocí MF sestávající z vodného roztoku HCOOH o pH 3 (A) a methanolu (B), s následujícím průběhem gradientové eluce: 0 min – 20 % B, 2 min – 25 % B; 5 min – 61 % B, 10 min – 62 % B, 11 min – 100 % B (Obrázek 36). Pro zjištění, zda by postačil v rozmezí 5 – 10 min izokratický krok, byla také provedena analýza s gradientovou elucí: 0 min – 20 %, 2 min – 25 %, 5 min – 60 %, 10 min – 60 %, 11 min – 100 %, avšak kvalita píků se za těchto podmínek zhoršila (Obrázek P7), a tak byla pro účely kalibrace a následné validace zvolena předchozí varianta. Jak lze vidět na přiložených záznamech (Obrázky 35 a P3-P7) močovina po separaci poskytovala dva píky, což je pravděpodobně způsobeno tím, že činidlo reagovalo buď na jedné nebo obou aminoskupinách vyskytujících se v chemické struktuře močoviny.



Obrázek 39: HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s *p*-DMAB.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; MF A: vodný roztok HCOOH o pH 3; MF B: 100% MetOH; gradient: 0 min – 20 %, 2 min – 25 %, 5 min – 61 %, 10 min – 62 %, 11 min – 100 %; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 420 nm.

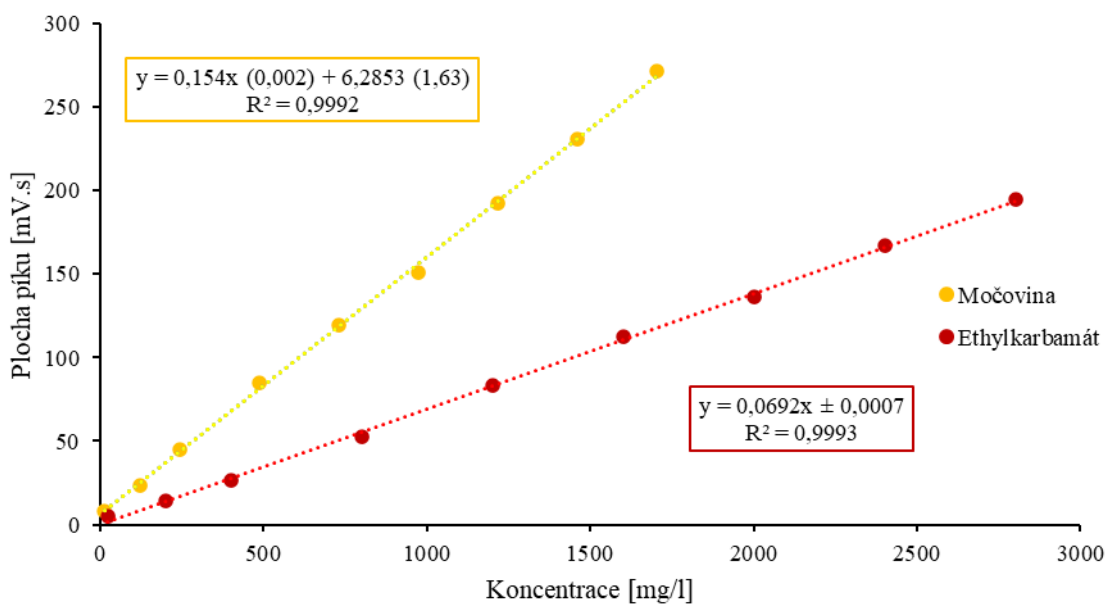
3.4.2 Validace analytické metody

Abychom charakterizovali tuto nově vyvinutou analytickou metodu, včetně ověření její platnosti a kvality, byla provedena validace, a to v základních parametrech, jako je linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti, správnost (návratnost) a přesnost (intradenní a mezidenní opakovatelnost).

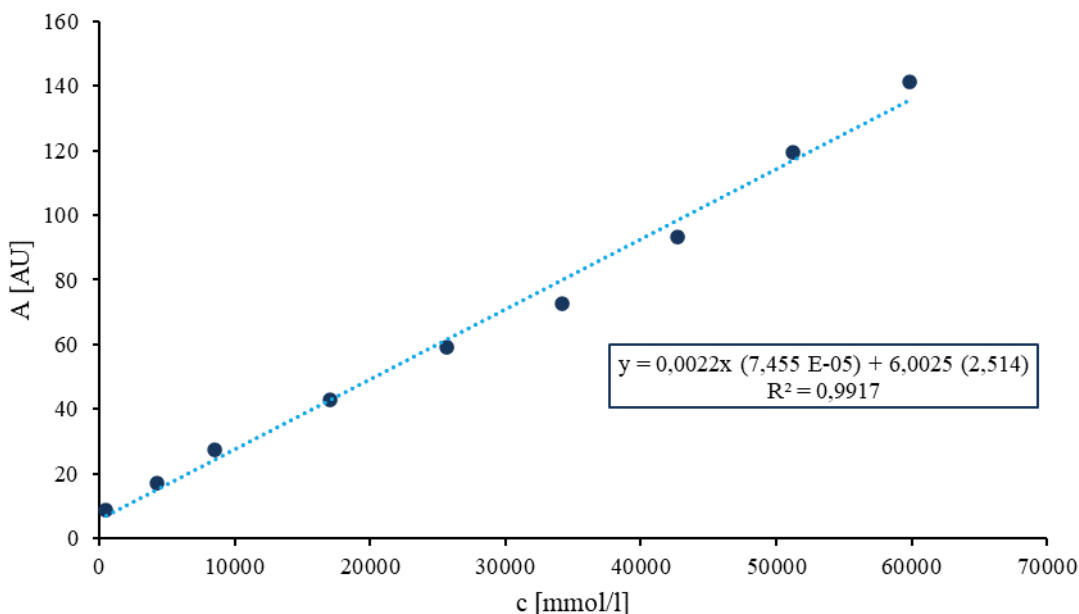
3.4.2.1 Příprava kalibrační křivky

Pro kvantitativní stanovení EC a močoviny byla použita metoda vnějšího standardu, konkrétně metoda kalibrační křivky. Pro sestrojení kalibrační závislosti bylo připraveno devět roztoků v koncentračním rozsahu 23 – 2800 mg/l (0,258 – 31 mmol/l) pro EC a 14 – 1704,3 mg/l (0,233 – 28 mmol/l) pro močovinu, které byly zderivatizovány a následně analyzovány již optimalizovaným postupem. Každý kalibrační bod byl připraven třikrát a následně jednou analyzován. Z odečtených ploch pík derivátů byly následně sestrojeny kalibrační závislosti plochy píku derivátu na jeho koncentraci, přičemž u močoviny byla odečítána suma ploch obou pík derivátů. Byla studována statistická významnost úseků získaných rovnic regrese a pro úsek i směrnici byly počítány také směrodatné odchylky. U kalibrační závislosti EC bylo zjištěno, že je úsek nevýznamný. Kalibrační křivky byly v celém koncentračním rozsahu lineární a jsou

spolu s rovnicí regrese a koeficientem determinace uvedeny na Obrázku 37. Konkrétní plochy píku spolu s průměrnými hodnotami, které byly použité pro sestavení kalibračních závislostí jsou pro jednotlivé koncentrace uvedeny v Tabulkách P1 a P2. Jelikož se *p*-DMAB v souvislosti s močovinou doposud používal především pro spektrofotometrické stanovení, byly zderivatizované kalibrační roztoky EC a močoviny proměřeny také tímto způsobem a byla opět sestavena kalibrační závislost z naměřených hodnot absorbancí (odečtených při 420 nm) na koncentraci (Obrázek 38). Tímto způsobem však nelze deriváty EC a močoviny separovat, a tak se jedná o hodnoty odpovídající jejich směsi (Tabulka P3). Pro určení celkové koncentrace EC a močoviny, ze které je vytvořena kalibrační závislost bylo nutné přepočítat hodnoty koncentrací kalibračních roztoků EC a močoviny na počet molů jednotlivých analytů v dané směsi. Tyto moly byly následně sečteny a přepočteny na mmol/l. Dle korelačních koeficientů lze posoudit, že linearita, které bylo dosaženo při kalibraci pomocí spektrofotometru je horší než u kalibrační závislosti sestavené na základě chromatografických dat.



Obrázek 40: Kalibrační závislosti sumy ploch obou píků derivátů močoviny a plochy derivátu EC na jejich koncentraci.



Obrázek 41: Kalibrační závislost Absorbance na celkové koncentraci EC a močoviny.

3.4.2.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Na základě postupu a početních vztahů uvedených v kapitole 2.3.5.1. byly vypočteny hodnoty LOD a LOQ. K určení meze detekce a stanovitelnosti byl použit roztok směsi analytů obsahující 1542 mg/l močoviny ($c_{\text{močovina}}=25,67$ mmol/l) a 2250 mg/l EC ($c_{\text{EC}}= 25,26$ mmol/l), který byl následně zderivatizován a proměřen chromatograficky již optimalizovaným postupem. Na základě uvedených rovnic 1 a 2 byly vypočteny příslušné hodnoty LOD, které činily 6,8 mg/l ($c_{\text{EC}} = 0,08$ mmol/l) pro EC, 4,0 mg/l ($c_{\text{močovina1}} = 0,06$ mmol/l) pro pík močoviny s vyšší intenzitou a 13,5 mg/l ($c_{\text{močovina2}} = 0,22$ mmol/l) pro pík močoviny s nižší intenzitou. Vypočtené koncentrace LOQ činily 22,8 mg/l ($c_{\text{EC}} = 0,25$ mmol/l) pro EC, 13,5 mg/l ($c_{\text{močovina1}} = 0,20$ mmol/l) pro pík močoviny s vyšší intenzitou a 44,2 mg/l ($c_{\text{močovina2}} = 0,73$ mmol/l) pro pík močoviny s nižší intenzitou.

3.4.2.3 Návratnost metody

Dalším sledovaným parametrem byla návratnost metody, kterou byly ověřeny odchylky mezi reálnou a experimentálně zjištěnou koncentrací EC a močoviny (na základě výpočtu s využitím kalibračních závislostí dle vztahů a postupů uvedených v kapitole 2.3.5.2). Návratnost byla sledována vždy na dvou koncentračních hladinách pro každý analyt (50 mg/l a 2600 mg/l pro EC a 30,4 mg/l a 1582 mg/l pro močovinu). Naměřené hodnoty ploch píků jsou v případě močoviny opět uváděny jako suma obou píků. Z výsledků uvedených v Tabulkách 3 a 4 lze konstatovat, že průměrné hodnoty návratnosti splňují téměř ve všech případech požadavky

z validačních protokolů [143], které pro koncentrace v řádech desítek mg/l povolují rozmezí 90–107 % a v řádech tisíců mg/l rozmezí 95–105 %. Do tohoto rozmezí nespadá jeden měřený vzorek EC ($c = 50$ mg/l). Důvodem vzniku odchylek mohl být nedokonalý průběh derivatizace u méně koncentrovaných roztoků.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty ploch píků, vypočtené koncentrace, návratnosti a relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrační hladiny EC.

EC	Plocha píku [mV.s]	Stanovená koncentrace [mg/l]	Návratnost [%]	SD [%]
c = 50 mg/l	4,3	61,8	123,6	5,1
	4,8	69,2	138,3	
	4,1	59,5	119,0	
Průměr	4,4	63,5	127,0	
c = 2600 mg/l	179,6	2596	99,8	11,5
	178,8	2584	99,4	
	178,0	2573	99,0	
Průměr	178,8	2584	99,4	

Tabulka 4: Naměřené hodnoty sumy ploch píků obou derivátů močoviny, vypočtené koncentrace, návratnosti a relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrační hladiny.

MOČOVINA	Suma ploch píků [mV.s]	Stanovená koncentrace [mg/l]	Návratnost [%]	SD [%]
c = 30,4 mg/l	11,3	32,6	107,0	1,4
	10,9	30,0	98,5	
	11,2	31,9	104,9	
Průměr	11,1	31,5	103,5	
c = 1582 mg/l	254,6	1612	101,9	28,3
	254,8	1613	102,0	
	262,3	1662	105,0	
Průměr	257,2	1629	103,0	

3.4.2.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla ověřena na základě postupů popsanych v kapitole 2.3.5.3. Pro zjištění intradenní opakovatelnosti bylo v jeden den připraveno a analyzováno pět stejných derivátů o zvolené koncentraci ($c_{EC} = 400 \text{ mg/l}$ a $c_{\text{močovina}} = 243,5 \text{ mg/l}$). Pro výpočty močoviny byla odečítána suma ploch obou píků. Z naměřených hodnot (Tabulky 6, 7 a 8) bylo vypočteno RSD pro koncentraci derivátu, které odpovídalo 4,3 % pro močovinu a 2,3 % pro EC. Kromě plochy píků, potažmo tedy koncentraci, byl jako další retenční parametr sledován retenční čas derivátů během jednotlivých měření. RSD pro retenční časy pak odpovídalo 0,3 % pro první pík močoviny, 0,2 % pro druhý pík močoviny a 0,07 % pro EC. Dle validačních protokolů [143] by RSD takto připravených roztoků nemělo překročit hodnotu 5,3 %, což je ve všech případech splněno.

Mezidenní opakovatelnost byla vyhodnocena opět po přípravě a proměření pěti derivátů (o stejné koncentraci), avšak tentokrát v různé dny. Jelikož koncentrace EC a močoviny pro derivatizaci byly v tomto případě zvoleny vyšší, konkrétně $c_{EC} = 2700 \text{ mg/l}$ a $c_{\text{močovina}} = 1850 \text{ mg/l}$, validační protokoly udávají také přísnější kritéria pro výsledné RSD ($\leq 3,7 \%$). Koncentrace močoviny byly opět počítány ze sumy ploch obou píků derivátů. Vypočtené hodnoty RSD z koncentrace močoviny odpovídalo 3,7 % a u EC také 3,7 %. Lze tedy konstatovat, že v obou případech byla tato podmínka splněna. Stejně tak vypočtené hodnoty RSD pro retenční časy derivátů toto kritérium splňují ve všech případech, jelikož odpovídají 1,3 % pro první pík močoviny, 1,5 % pro druhý pík močoviny a 0,87 % pro EC.

Tabulka 5: Intradenní a mezidenní opakovatelnost koncentrací, ploch píků a retenčních časů pro EC.

Počet měření	Intradenní opakovatelnost EC			Mezidenní opakovatelnost EC		
	Retenční čas [min]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [mg/l]	Retenční čas [min]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [mg/l]
1	6,55	26,1	377,1	6,69	183,4	2650,33
2	6,54	26,0	376,3	6,62	180,4	2606,49
3	6,55	26,6	384,7	6,56	198,0	2861,27
4	6,55	27,5	396,8	6,57	184,5	2666,50
5	6,55	26,1	376,6	6,63	189,9	2744,06
Průměr	6,55	26,5	382,3	6,63	187,2	2705,73
SD	0,004	0,6	8,8	0,06	6,2	100,15
RSD [%]	0,07	2,3	2,3	0,9	3,3	3,7

Tabulka 6: Intradenní opakovatelnost koncentrací, sumy ploch píků a retenčních časů pro močovinu.

Počet měření	Intradenní opakovatelnost močoviny			
	Retenční čas močoviny 1 [min]	Retenční čas močoviny 2 [min]	Suma ploch píků [mV.s]	Koncentrace [mg/l]
1	2,01	2,68	44,9	250,8
2	2,01	2,68	47,2	265,7
3	2,0	2,67	43,8	243,6
4	2,0	2,67	47,9	270,3
5	2,0	2,67	45,3	253,4
Průměr	2,004	2,67	45,8	256,8
SD	0,005	0,005	1,7	11,0
RSD	0,3	0,2	3,7	4,3

Tabulka 7: Mezdenní opakovatelnost koncentrací, sumy ploch píků a retenčních časů pro močovinu.

Počet měření	Mezdenní opakovatelnost močoviny			
	Retenční čas močoviny 1 [min]	Retenční čas močoviny 2 [min]	Suma ploch píků [mV.s]	Koncentrace [mg/l]
1	2,14	2,73	289,8	1840
2	2,18	2,68	295,9	1880
3	2,15	2,68	295,3	1876
4	2,22	2,74	298,9	1899
5	2,16	2,77	318,1	2024
Průměr	2,17	2,72	299,6	1904
SD	0,03	0,04	10,9	70,6
RSD	1,3	1,5	3,6	3,7

3.4.3 Analýza vzorků

Pro zjištění, zda matrice alkoholických nápojů může negativně ovlivnit průběh derivatizace, byly vybrány dva druhy pálenek z peckovic, ve kterých byla provedena derivatizace. Jelikož se EC a močovina v alkoholických nápojích nevyskytuje běžně v koncentracích, které odpovídají limitům detekce této metody, byly do vzorků přidány standardní roztoky EC a močoviny. Byl smísen 1 ml pálenky a 100 μ l standardního roztoku EC i močoviny, oba o koncentraci 6000 mg/l. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 100 μ l a smíšeno s 500 μ l derivatizačního roztoku p-DMAB. Koncentrace EC a močoviny v takto připravené derivatizační směsi odpovídala 83,33 mg/l. Od každého druhu pálenky byly připraveny tři derivatizační směsi, které byly následně po zfiltrování přes PTFE jednou proměřeny již optimalizovaným postupem. Naměřené plochy píků a vypočtené koncentrace EC a močoviny v obou vzorcích lze vidět v Tabulkách 8 a 9. U močoviny byla opět odečítána suma obou píků derivátů. V prvním vzorku se naměřené hodnoty EC i močoviny zásadně neliší od těch teoretických, avšak u druhého vzorku jsou vypočtené koncentrace nižší než reálné. Závěrem lze tedy konstatovat, že matrice může mít vliv na kvantitativní průběh derivatizace, avšak pouze nepatrný.

Tabulka 3: Množství močoviny stanovené v ovocných pálenkách.

Číslo vzorku	Suma ploch píků [mV.s]	Koncentrace [mg/l]	Průměrná koncentrace \pm interval spolehlivosti
1	18,9	81,6	82,2 \pm 4
	19,1	83,2	
	18,9	81,9	
Průměr	19,0	82,2	
2	18,5	79,4	80,6 \pm 5
	18,9	81,7	
	18,7	80,8	
Průměr	18,7	80,6	

Tabulka 4: Množství EC stanovené v ovocných pálenkách.

Číslo vzorku	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [mg/l]	Průměrná koncentrace ± interval spolehlivosti
1	5,8	83,4	82,2 ± 10
	5,8	83,6	
	5,5	79,5	
Průměr	5,7	82,2	
2	5,4	78,3	80,0 ± 8
	5,7	81,9	
	5,5	79,9	
Průměr	5,5	80,0	

ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce bylo zhodnotit možnosti derivatizace ethylkarbamátu i močoviny pro následnou analýzu pomocí kapalinové chromatografie. Pro tento účel bylo vybráno šest derivatizačních činidel, a to konkrétně fenylišothiokyanát, dansylchlorid, *p*-toluidin, *p*-nitrofenylhydrazin, 2,4-dinitrofenylhydrazin a *p*-dimethylbenzaldehyd. Jediným činidlem, kterým bylo možné tyto analyty zderivatizovat byl však *p*-DMAB. Byla optimalizována jak derivatizační reakce, tak podmínky následné analýzy. V rámci optimalizace derivatizace byl zkoumán ideální poměr činidla s analytem, pro co nejlepší průběh reakce. Bylo zjištěno, že nejlepší výsledky poskytuje reakce, při které poměr činidla a analytu odpovídá 6:1. Studium kinetiky této reakce ukázalo, že kvantitativně reakce proběhne v případě močoviny za dvě minuty a u ethylkarbamátu proběhne reakce kvantitativně do deseti minut. Takto připravené deriváty pak byly stabilní po dobu nejméně 5 dnů. Pro optimalizaci chromatografických podmínek bylo testováno složení i pH mobilní fáze, typ stacionární fáze a v neposlední řadě gradientový profil. Mobilní fázi u optimalizované metody tvořila směs methanolu a vodného roztoku kyseliny mravenčí o pH 3 a analyzované látky byly separovány na koloně Ascentis Express C18 pomocí gradientové eluce. Detekce probíhala spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm.

Tato nově vyvinutá metoda byla také validována z hlediska linearity, přesnosti, návratnosti a opakovatelnosti (intradenní a mezidenní). Linearita byla ověřena v rozmezí koncentrací odpovídající 23 – 2800 mg/l pro ethylkarbamát a 14 – 1704,3 mg/l pro močovinu. Vyjma jednoho vzorku ethylkarbamátu při studiu návratnosti metody, byly splněny všechny kritéria, které udávají validační protokoly. Takto validovaná metoda byla použita pro analýzu ethylkarbamátu a močoviny ve dvou vzorcích pálenky, pro ověření vlivu matrice vzorku na derivatizaci, přičemž při zvolených podmínkách derivatizace přítomností interferentů matrice ovlivněna nebyla.

Koncentrace ethylkarbamátu či močoviny, které je možné touto metodou stanovit, se běžně v potravinách či alkoholických nápojích nevyskytují. Metoda je však využitelná pro výrobce destilátů i jiných alkoholických nápojů či fermentovaných potravin, jelikož při monitorování vzniku ethylkarbamátu či močoviny v průběhu destilace či fermentace se tyto sloučeniny vyskytují v koncentracích odpovídajících až stovkám mg/l. Pro screeningové testy zaměřené na odhalení vysokých koncentrací v průběhu výroby nebo i po ní je lépe využitelná spektrofotometrická analýza, která umožňuje za velmi krátký čas zjistit, kolik ethylkarbamátu i močoviny je v analyzovaném vzorku přítomno. Pro podrobnější analýzu, včetně možnosti

separace obou analytů lze využít optimalizovanou metodu pro kapalinovou chromatografii. V tomto případě je však nutné brát na vědomí, že močovina eluuje ve formě dvou píků, což u nižších koncentrací znesnadňuje následné vyhodnocení.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ABT, E.; V. INCORVATI; L. POSNICK; R. a B. W. REDAN. 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 [cit. 2022-10-16]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.4315/JFP-21-219>.
- [2] ESSELEN, M. a D. SCHRENK. Toxicants in foods generated by non-thermal processes. *Chemical Contaminants and Residues in Food*, Elsevier [online]. 2012, 250-285 [cit. 2022-10-24]. ISBN 9780857090584. Dostupné z: doi:[10.1533/9780857095794.2.250](https://doi.org/10.1533/9780857095794.2.250).
- [3] ZIMMERLI, B. a J. SCHLATTER. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology* [online]. 1991, 259 (3-4), 325-350 [cit. 2022-10-16]. ISSN 01651218. Dostupné z: doi:[10.1016/0165-1218\(91\)90126-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90126-7).
- [4] FIELD, K. J. a C. M. LANG. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. *Laboratory Animals* [online]. 1988, 22(3), 255-262 [cit. 2022-12-28]. ISSN 0023-6772. Dostupné z: doi:[10.1258/002367788780746331](https://doi.org/10.1258/002367788780746331).
- [5] LACHENMEIER, D. W.; M. CP LIMA; I. NÓBREGA; J. PEREIRA; F. KERR-CORRÊA; F. KANTERES a J. REHM. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. *BMC Cancer* [online]. 2010, 10(1) [cit. 2022-12-28]. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:[10.1186/1471-2407-10-266](https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-266).
- [6] JIAO, Z.; Y. DONG a Q. CHEN. Ethyl Carbamate in Fermented Beverages: Presence, Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Proposals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, 13(4), 611-626 [cit. 2022-12-28]. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:[10.1111/1541-4337.12084](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12084).
- [7] WEBER, J. V. a V. I. SHARYPOV. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2009, 7(3), 233-247 [cit. 2022-10-17]. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:[10.1007/s10311-008-0168-8](https://doi.org/10.1007/s10311-008-0168-8).
- [8] Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants. *EFSA Journal* [online]. 2007, 5(10) [cit. 2022-10-23]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:[10.2903/j.efsa.2007.551](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.551).

- [9] ARESTA, M.; M. BOSCOLO a D. W. FRANCO. 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 [cit. 2022-12-28]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf001346w.
- [10] YE, J.; X.-H. WANG; Y.-X. SANG a Q. LIU. Assessment of the Determination of Azodicarbonamide and Its Decomposition Product Semicarbazide: Investigation of Variation in Flour and Flour Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, 59(17), 9313-9318 [cit. 2022-10-24]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf201819x.
- [11] ZHONGXIN L.; J. GAO; P. YU; D. YANG. History, mechanism of action, and toxicity: a review of commonly used dough rheology improvers. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*. 2021, 69 [cit. 2022-11-30]. Dostupné z doi:10.1080/10408398.2021.1956427.
- [12] MA, Y.; S. GUO; J. ZHANG; Y. XU a D. WANG. Kinetic modeling of ethyl carbamate formation from urea in Huangjiu during storage. *Food Control* [online]. 2021, 129 [cit. 2022-11-30]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2021.108249.
- [13] ZACARONI, L. M.; M. G. CARDOSO; W. D. SANTIAGO; M. DE SOUZA GOMES; F. C, DUARTE a D. L. NELSON. 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 [cit. 2023-03-19]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.214.
- [14] TEGMO L.; I. MAI a T. D. SPITTLER. Temperature and Light Effects on Ethyl Carbamate Formation in Wine During Storage. *Journal of Food Science* [online]. 1990, 55(4), 1166-1167 [cit. 2023-02-15]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01624.x.
- [15] MA, Y.; S. GUO; J. ZHANG; Y. XU a D. WANG. Kinetic modeling of ethyl carbamate formation from urea in Huangjiu during storage. *Food Control* [online]. 2021, 129 [cit. 2022-11-30]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2021.108249.
- [16] LACHENMEIER, D. W.; B. SCHEHL; T. KUBALLA; W. FRANK a T. SENN. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2005, 22(5), 397-405 [cit. 2023-03-19]. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030500073360.

- [17] NÓBREGA, I. C.C.; J. A.P. PEREIRA; J. E. PAIVA a D. W. LACHENMEIER. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions. *Food Chemistry* [online]. 2009, 117(4), 693-697 [cit. 2023-02-15]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.067.
- [18] XIA, Q.; C. YANG; Ch. WU; R. ZHOU a Y. LI. Quantitative strategies for detecting different levels of ethyl carbamate (EC) in various fermented food matrices: An overview. *Food Control* [online]. 2018, 84, 499-512 [cit. 2022-10-28]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2017.09.008.
- [19] Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.
- [20] DOPORUČENÍ KOMISE ze dne 2. března 2010 o prevenci a snížení kontaminace lihovin z peckovin a lihovin z výlisků peckovin ethylkarbamátem a o monitorování 58 obsahu ethylkarbamátu v těchto nápojích: (2010/133/EU).
- [21] Cairns, T., E. G. Siegmund, M.A. Luke, G. M. Doose. Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas chromatography and mass spectrometry/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1987, (59); 2055-2059.
- [22] JUNG, S.; S. KIM; I. KIM; M.-S. CHUNG; B. MOON; S. SHIN aj. LEE. Risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages in Korea using the margin of exposure approach and cancer risk assessment. *Food Control* [online]. 2021, 124 [cit. 2022-11-16]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2021.107867.
- [23] FU, Z.; L. YANG; L. MA; X. LIU a J. LI. Occurrence of ethylcarbamate in three types of Chinese wines and its possible reasons. *Food Science and Biotechnology*. 2016, (25) 949–953.
- [24] HERNANDES, K. C.; É. A. SOUZA-SILVA; C. F. ASSUMPCAO; C. A. ZINI a J. E. WELKE. Carbonyl compounds and furan derivatives with toxic potential evaluated in the brewing stages of craft beer. *Food Additives and Contaminants*. 2020, (37), 61–68.
- [25] JUNG, S.; S. KIM; I. KIM; M.-S. CHUNG; B. MOON; S. SHIN a J. LEE. Risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages in Korea using the margin of exposure approach and cancer risk assessment. *Food Control*. 2021, 124; Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodcont.2021.107867
- [26] LI, G.; Q. ZHONG; D. WANG a H. GAO. A survey of ethylcarbamate in beer from Chinese market. *Food Control*. 2017, (79), 254–257.

- [27] UTHURRY, C.; F. VARELA; B. COLOMO; J. S. LEPE; J. D. LOMBARDELO a J. G. DEL HIERRO. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*. 2004, (88), 329–336.
- [28] WU, P.; X. PAN, L. WANG; X. SHEN a D. YANG. A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China. *Food Control* . 2012, (23), 286–288.
- [29] HASNIP, S.; C. CREWS; N. POTTER; 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 [cit. 2022-11-16]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf063121c.
- [30] 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*, 1987, 93(5): 382-386.
- [31] LACHENMEIER, D. W.; et al. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from Mexico (tequila, mezcal, bacanora, sotol) and Guatemala (cuxa): Market survey and risk assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6 (1): 349-360.
- [32] RYU, Dayeon, et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and fermented foods sold in Korea. *Toxicological research*, 2015, 31: 289-297.
- [33] HADDON, WILLIAM F., et al. Occurrence of ethyl carbamate (urethane) in US and Canadian breads: measurements by gas chromatography-mass spectrometry. *Cereal chemistry* (USA), 1994.
- [34] TANG, A. S. P., et al. Ethyl carbamate in fermented foods and beverages: dietary exposure of the Hong Kong population in 2007–2008. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2011, 4 (3): 195-204.
- [35] VAHL, M. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Additives & Contaminants*, 1993, 10 (5): 585-592.
- [36] RYU, D.; B. CHOI; E. KIM; et al. Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Fermented Foods Sold in Korea. *Toxicological Research [online]*. 2015, 31(3), 289-297 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1976-8257. Dostupné z: doi:10.5487/TR.2015.31.3.289.

- [37] TANG, A.S.P.; S.W.C. CHUNG; K. KWONG; Y. XIAO; M.Y.Y. CHEN; Y.Y. HO a S.W.Y. MA. Ethyl carbamate in fermented foods and beverages: dietary exposure of the Hong Kong population in 2007–2008. *Food Additives and Contaminants: Part B* [online]. 2011, 4(3), 195-204 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1939-3210. Dostupné z: doi:10.1080/19393210.2011.605524.
- [38] VAHL, M. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Additives and Contaminants* [online]. 1993, 10(5), 585-592 [cit. 2023-03-19]. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652039309374182.
- [39] FAUHL, C.; R. CATSBURG a R. WITTKOWSKI. Determination of ethyl carbamate in soy sauces. *Food Chemistry* [online]. 1993, 48(3), 313-316 [cit. 2023-03-19]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/0308-8146(93)90147-8.
- [40] RYU, D.; B. CHOI; E. KIM, et al. Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Fermented Foods Sold in Korea. *Toxicological Research* [online]. 2015, 31(3), 289-297 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1976-8257. Dostupné z: doi:10.5487/TR.2015.31.3.289.
- [41] 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 [cit. 2022-11-30]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-013-1953-6.
- [42] CHEN, Y.; W. ZENG; F. FANG, S. YU a J. ZHOU. Elimination of ethyl carbamate in fermented foods. *Food Bioscience* [online]. 2022, 47 [cit. 2022-12-01]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.101725.
- [43] ZHAO, X.; G. DU; H. ZOU; J. FU; J. ZHOU a J. CHEN. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2013, 32(2), 97-107 [cit. 2022-12-28]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2013.05.009.
- [44] BUTZKE, Ch. E. a L. F. BISSON. Ethyl Carbamate Preventative Action Manual [online]. California, 1997 [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/food/process-contaminants-food/ethyl-carbamate-preventative-action-manual>.
- [45] CERRETI, M.; M. FIDALEO; I. BENUCCI; K. LIBURDI; P. TAMBORRA a M. MORESI. Assessing the Potential Content of Ethyl Carbamate in White, Red, and Rosé Wines as a Key Factor for Pursuing Urea Degradation by Purified Acid Urease. *Journal of Food Science* [online]. 2016, 81(7), C1603-C1612 [cit. 2023-03-21]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.13344.

- [46] PACE, V.; W. HOLZER a B. OLOFSSON. Increasing the Reactivity of Amides towards Organometallic Reagents: An Overview. *Advanced Synthesis & Catalysis* [online]. 2014, 356(18), 3697-3736 [cit. 2022-11-23]. ISSN 16154150. Dostupné z: doi:10.1002/adsc.201400630.
- [47] DAVIDSON, D. a H. SKOVRONEK. The Acylation of Amides [online]. 1957, 376-379 [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1021/ja01535a032.
- [48] KNOCHEL, P. a G. A. MOLANDER, ed. *Comprehensive organic synthesis*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, c2014. ISBN 9780080977423.
- [49] LibreTexts CHEMISTRY: CHE 202: Organic Chemistry II 3.7: Amides- Structures and Names [online]. 2021 [cit. 2022-11-23]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Courses/Brevard_College/CHE_202%3A_Organic_Chemistry_II/03%3A_Amines_and_Amides/3.07%3A_Amides-_Structures_and_Names.
- [50] KAISER, D.; A. BAUER; M. LEMMERER a N. MAULIDE. Amide activation: an emerging tool for chemoselective synthesis. *Chemical Society Reviews* [online]. 2018, 47(21), 7899-7925 [cit. 2022-11-25]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C8CS00335A.
- [51] LI, G.; S. MA a M. SZOSTAK. Amide Bond Activation: The Power of Resonance. *Trends in Chemistry* [online]. 2020, 2(10), 914-928 [cit. 2022-12-27]. ISSN 25895974. Dostupné z: doi:10.1016/j.trechm.2020.08.001.
- [52] Svoboda, J. *Organická chemie I; Vysoká škola chemicko-technologická*, 2005.
- [53] GREENBERG, Arthur, Curt M. BRENEMAN a Joel F. LIEBMAN. *The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science*. 2000. ISBN 978-0-471-35893-0.
- [54] JURŠIĆ, Branko S. a Zoran ZDRAVKOVSKI. A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture. *Synthetic Communications* [online]. 1993, 23(19), 2761-2770 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0039-7911. Dostupné z: doi:10.1080/00397919308013807.
- [55] Močovina. In: *Chemie - informace od A do Z* [online]. 29.5.2015 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <http://chemie.g6.cz/?p=146>.
- [56] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2022, 31. srpna). močovina . Encyklopedie Britannica . <https://www.britannica.com/science/urea>.

- [57] VOLZ, N. a J. CLAYDEN. The Urea Renaissance. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2011, 50(51), 12148-12155 [cit. 2022-12-28]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201104037.
- [58] CABRERA, M.L.; D.E. KISSEL a B.R. BOCK. Urea hydrolysis in soil: Effects of urea concentration and soil pH. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 1991, 23(12), 1121-1124 [cit. 2023-03-22]. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(91)90023-D.
- [59] KAMINSKAIA, N. V. a N. M. KOSTIĆ. Kinetics and Mechanism of Urea Hydrolysis Catalyzed by Palladium(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* [online]. 1997, 36(25), 5917-5926 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic961500p.
- [60] CHIN, W. a W. KROONTJE. Urea Hydrolysis and Subsequent Loss of Ammonia. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 1963, 27(3) [cit. 2023-03-22]. ISSN 0361-5995. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1963.03615995002700030030x.
- [61] ADAMS, E.; "BARBITURATES." *Scientific American*, vol. 198, no. 1, 1958, pp. 60–67. JSTOR, Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/24942035>. Accessed 23 Mar. 2023.
- [62] UMBERGER, C. J.; G. ADAMS. Identification of malonyl urea derivatives. *Analytical Chemistry*, 1952, 24.8: 1309-1322.
- [63] CURRAN, D. P. a L. H. KUO. Acceleration of a dipolar Claisen rearrangement by Hydrogen bonding to a soluble diaryl urea. *Tetrahedron Letters* [online]. 1995, 36(37), 6647-6650 [cit. 2022-12-28]. ISSN 00404039. Dostupné z: doi:10.1016/00404-0399(50)1394-W.
- [64] PALECKIENE, R.; A. SVIKLAS a R. SLINKSIENE. Reaction of Urea with Citric Acid. *Russian Journal of Applied Chemistry* [online]. 2005, 78(10), 1651-1655 [cit. 2022-12-28]. ISSN 1070-4272. Dostupné z: doi:10.1007/s11167-005-0579-2.
- [65] WANG, H.; M. WANG; W. ZHAO; W. WEI a Y. SUN. Reaction of zinc oxide with urea and its role in urea methanolysis. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* [online]. [cit. 2022-12-28]. ISSN 1878-5190. Dostupné z: doi:10.1007/s11144-009-0134-x.
- [66] MINDL, J. a A. ČEGAN. The chemistry of carbamates. *Scientific papers of the University of Pardubice: Faculty of chemical technology* [online]. 1999, (5), 130-157 [cit. 2022-12-27]. Dostupné z :https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/32623/S_129-164_Mindl%20%28Vol.%205%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [67] ADAMS, P. a F. A. BARON. Esters of Carbamic Acid. *Chemical Reviews* [online]. 1965, 65(5), 567-602 [cit. 2022-12-27]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr60237a002.

- [68] Mindl, J. Structure and Reactivity of Carbamates. *Chemické Listy*. 2000, 94(3). Dostupné z :<http://www-.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2527>.
- [69] WERNER, E. A.; LII.—The constitution of carbamides. Part VI. The mechanism of the synthesis of urea from urethane. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 1918, 113: 622-627.
- [70] MICHMAN, M.; S. PATAI a Y. WIESEL. Organic reactions in melts and solids. Part 10. Reactions of carboxylic acids and anhydrides with carbamates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* [online]. 1977, (15) [cit. 2022-12-27]. ISSN 0300-922X. Dostupné z: [doi:10.1039/p19770001705](https://doi.org/10.1039/p19770001705).
- [71] KIRSANOV, A. V. Mechanism of reaction of phosphorus pentachloride with carboxylic acid amides. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* [online]. 1954, 3(4), 551-558 [cit. 2022-12-28]. ISSN 0568-5230. Dostupné z: [doi:10.1007/BF01172698](https://doi.org/10.1007/BF01172698).
- [72] XIA, Q.; C. YANG; Ch, WU; R. ZHOU a Y. LI. Quantitative strategies for detecting different levels of ethyl carbamate (EC) in various fermented food matrices: An overview. *Food Control* [online]. 2018, 84, 499-512 [cit. 2021-11-29]. ISSN 09567135. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodcont.2017.09.008](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.008).
- [73] GOWD, V.; H. SU; P. KARLOVSKY a W. CHEN. Ethyl carbamate: - An emerging food and environmental toxicant. *Food Chemistry* [online]. 2018, 248, 312-321 [cit. 2021-11-27]. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.072](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.072).
- [74] VALENTE, I. M.; R. M. RAMOS; L. M. GONÇALVES a J. A. RODRIGUES. Determination of ethyl carbamate in spirits using salting-out assisted liquid–liquid extraction and high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Analytical Methods* [online]. 2014, 6(22), 9136-9141 [cit. 2022-12-29]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: [doi:10.1039/C4AY02075H](https://doi.org/10.1039/C4AY02075H).
- [75] WANG, Ch.; M. WANG a M. ZHANG. Ethyl carbamate in Chinese liquor (Baijiu): presence, analysis, formation, and control. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2021, 105(11), 4383-4395 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: [doi:10.1007/s00253-021-11348-1](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11348-1).

- [76] Péres, VF.; Saffi, J.; Melecchi, MIS.; Abad, FC.; Jacques, RA.; Martinez, MM.; Oliveira, EC.; Caramão, EB. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Journal of Chromatography A* [online] 2006, (1105), 115-118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.113>.
- [77] UBEDA, C.; C. BALSERA; A.M. TRONCOSO; R.M. CALLEJÓN a M.L. MORALES. Validation of an analytical method for the determination of ethyl carbamate in vinegars. *Talanta* [online]. 2012, 89, 178-182 [cit. 2023-02-27]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2011.12.012.
- [78] LACHENMEIER, D. W.; U. NERLICH a T. KUBALLA. 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 [cit. 2022-12-26]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.12.086.
- [79] KRULL, I.S. a R.S. STRONG. CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Derivatization. In: *Encyclopedia of Separation Science* [online]. Elsevier, 2000, 583-591 [cit. 2022-12-16]. ISBN 9780122267703. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-226770-2/00351-3.
- [80] PINO, V.; J. L. ANDERSON; A. BERTHOD a A. M. STALCUP, ed. *Analytical Separation Science* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2015 [cit. 2022-12-16]. ISBN 9783527678129.
- [81] PICKERING, Michael. An overview of post column derivatization methods from a pharmaceutical applications perspective. 2007, [cit. 2022-12-17]. Dostupné z: www.pickeringlabs.com.
- [82] DAVID, V.; S. C. MOLDOVEANU a T. GALAON. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomedical Chromatography* [online]. 2021, 35(1) [cit. 2022-12-17]. ISSN 0269-3879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.5008.
- [83] DOUŠA, Michal. Derivatizační techniky v HPLC. HPLC.CZ [online]. 1999-2020 [cit. 2022-12-20]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Tip/derivatizace.htm>.
- [84] ROCHA, F. R. P. a E. A. G. ZAGATTO. Chemical Derivatization in Flow Analysis. *Molecules* [online]. 2022, 27(5) [cit. 2022-12-20]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27051563.

- [85] CARDINAEL, P.; et al. Sample derivatization in separation science. *Analytical separation science*, 2015, 1725-1756.
- [86] DAVID, V.; S. C. MOLDOVEANU a T. GALAON. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomedical Chromatography [online]*. 2021, 35(1) [cit. 2023-02-28]. ISSN 0269-3879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.5008.
- [87] MACIEL, L. S.; A. MARENGO; P. RUBIOLO; I. LEITO a K. HERODES. Derivatization-targeted analysis of amino compounds in plant extracts in neutral loss acquisition mode by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A [online]*. 2021, 1656 [cit. 2023-02-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2021.462555.
- [88] Xanthidrol. Sigma aldrich [online]. [cit. 2022-12-20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/252573>.
- [89] CHO, Y.-H. a H.-S. SHIN. Determination of trace levels of acetamide, propanamide, and butyramide in surface and drinking water using gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with 9-xanthidrol. *Analytica Chimica Acta [online]*. 2013, 787, 111-117 [cit. 2022-12-20]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.06.013.
- [90] ZHOU, J.; C. LIU; Y. CHEN; X. LUO a D. DENG. Determination of Urea in Swimming Pool Water Using High-Performance Liquid Chromatography with Online Postcolumn Derivatization by Xanthidrol. *Journal of Chromatographic Science [online]*. 2022 [cit. 2022-12-20]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmac025.
- [91] SHIN, H.-S. a E.-Y. YANG. Simultaneous determination of methylcarbamate and ethylcarbamate in fermented foods and beverages by derivatization and GC-MS analysis. *Chemistry Central Journal [online]*. 2012, 6(1) [cit. 2022-12-20]. ISSN 1752-153X. Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-6-157.
- [92] AGUILERA O.; D. A. WROBEL; A. R. CORRALES ESCOBOSA; L. F. MEJIA DIAZ a K. WROBEL. Automated pre-column derivatization with 9-xanthidrol for the determination of ethyl carbamate in food matrices by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Food Measurement and Characterization [online]*. 2019, 13(4), 2722-2728 [cit. 2022-12-21]. ISSN 2193-4126. Dostupné z: doi:10.1007/s11694-019-00193-6.

- [93] AJTONY, Z.; N. SZOBOSZLAI; L. BENCS; E. VISZKET a V. G. MIHUCZ. Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry [online]*. 2013, 141(2), 1301-1305 [cit. 2022-12-21]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.011.
- [94] PICKERING, Michael. An overview of post column derivatization methods from a pharmaceutical applications perspective. 2007. Dostupné z: www.pickeringlabs.com (accessed 12/2012), 2007.
- [95] CHAVEZ, G. Determination of aliphatic alcohols after on-line microwave-assisted derivatization by liquid chromatography-photodiode array detection. *Talanta [online]*. 2004, 64(5), 1323-1328 [cit. 2022-12-22]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2004.05.055.
- [96] LI, H.; J. R. LEE; D. Q. A. NGUYEN; et al. Quantitative analysis of valioline through pre-column derivatization with phenylisocyanate using high-performance liquid chromatography with UV detection: Selection of reagent, identification of derivative and optimization of derivatization conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]*. 2009, 49(4), 957-963 [cit. 2022-12-22]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2009.02.020.
- [97] BJÖRKQVIST, B. Separation and determination of phenyl isocyanate-derivatized carbohydrates and sugar alcohols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A [online]*. 1981, 218, 65-71 [cit. 2022-12-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)82047-6.
- [98] HERMANSON, G. T. The Reactions of Bioconjugation. In: *Bioconjugate Techniques [online]*. Elsevier, 2013, 229-258 [cit. 2022-12-22]. ISBN 9780123822390. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382239-0.00003-0.
- [99] KLIKAROVÁ, J.; L. ČESLOVÁ a J. FISCHER. Rapid analysis of phenyl isothiocyanate derivatives of amino acids present in Czech meads. *Journal of Chromatography A [online]*. 2021, 1644 [cit. 2022-12-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2021.462134.

- [100] FIERABRACCI, V.; P. MASIELLO; M. NOVELLI a E. BERGAMINI. Application of amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate derivatization to the rapid determination of free amino acids in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [online]*. 1991, 570(2), 285-291 [cit. 2022-12-25]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(91)80531-G.
- [101] DOUŠA, Michal. ZAJÍMAVÉ DERIVATIZAČNÍ REAKCE POUŽÍVANÉ V HPLC. HPLC.CZ [online]. 1999-2020 [cit. 2020-26-12]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Der/der_spec.htm.
- [102] Adegoke, A.O. Analytical, Biochemical and Synthetic Applications of Para-Dimethylaminobenzaldehyde. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2011, 11, 17-29.
- [103] Smallidge RL, Albert K. Determination of Sulfamethazine in Swine and Cattle Feed by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization: Collaborative Study, *Journal of AOAC International*; 83 (2), 2000, 260-268.
- [104] RIND F. M. A., Khuhawar MY, Rajper AD, HPLC determination of phenylpropanolamine in pharmaceutical preparations using 4-dimethylaminobenzaldehyde as a derivatizing reagent, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26, 2001, 331-336.
- [105] KNORST, M. T.; R. NEUBERT a W. WOHLRAB. Analytical methods for measuring urea in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]*. 1997, 15(11), 1627-1632 [cit. 2022-12-26]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(96)01978-4.
- [106] RIND, F.M.A., M.Y. KHUHAWAR a A.D. RAJPER. HPLC determination of phenylpropanolamine in pharmaceutical preparations using 4-dimethylaminobenzaldehyde as a derivatizing reagent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]*. 2001, 26(2), 331-336 [cit. 2022-12-26]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(01)00371-5.
- [107] CZAUDERNA M.; KOWALCZIK J. Simple, selective, and sensitive measurement of urea in body fluids of mammals by reversed-phase ultra-fast liquid chromatography. *Czech Journal of Animal Science*; 2012, 57: 19-27. [cit. 2022-12-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/5480-CJAS>.

- [108] AERTS, M.M.L.; W.M.J. BEEK a U.A.Th. BRINKMAN. Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A [online]*. 1988, 435, 97-112 [cit. 2022-12-26]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)82166-X.
- [109] LEAREY, J. J.; S. CRAWFORD-CLARK; B. J. BOWEN; C. J. BARROW a J. L. ADCOCK. Detection of biogenic amines in pet food ingredients by RP-HPLC with automated dansyl chloride derivatization. *Journal of Separation Science [online]*. 2018, 41(24), 4430-4436 [cit. 2022-12-26]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201800455.
- [110] TAKEUCHI, T. HPLC of Amino Acids as Dansyl and Dabsyl Derivatives. In: Quantitation of amino acids and amines by chromatography - methods and protocols [online]. *Journal of Chromatography Library*. 2005, s. 229-241 [cit. 2022-12-26]. ISBN 9780444520500. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-4770(05)80010-7.
- [111] TANG, Z. a F. P. GUENGERICH. Dansylation of Unactivated Alcohols for Improved Mass Spectral Sensitivity and Application to Analysis of Cytochrome P450 Oxidation Products in Tissue Extracts. *Analytical Chemistry [online]*. 2010, 82(18), 7706-7712 [cit. 2022-12-26]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac1015497.
- [112] BAGHDADY, Y. Z. a K. A. SCHUG. Review of in situ derivatization techniques for enhanced bioanalysis using liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science [online]*. 2016, 39(1), 102-114 [cit. 2022-12-26]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201501003.
- [113] ORATA, F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *Advanced gas chromatography-Progress in agricultural, biomedical and industrial applications*, 2012, 91.
- [114] DROZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1975, 113(3), 303-356.
- [115] XU, X.; Y. GAO; X. CAO; X. WANG; G. SONG; J. ZHAO a Y. HU. 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 [cit. 2023-03-27]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201100526.

- [116] DEÁK, E.; A. GYEPES; É. STEFANOVITS-BÁNYAI a M. DERNOVICS. 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 [cit. 2023-03-27]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2010.09.014.
- [117] LI, G.; Q. ZHONG; D. WANG; X. ZHANG; H. GAO a S. SHEN. Determination and formation of Ethyl Carbamate in Chinese spirits. *Food Control [online]*. 2015, 56, 169-176 [cit. 2023-03-27]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.029.
- [118] LACHENMEIER, D. W.; W. F. a T. KUBALLA. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits. *Rapid Communications in Mass Spectrometry [online]*. 2005, 19(2), 108-112 [cit. 2022-12-06]. ISSN 0951-4198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.1755.
- [119] SHIN, H.-S. a E.-Y. YANG. Simultaneous determination of methylcarbamate and ethylcarbamate in fermented foods and beverages by derivatization and GC-MS analysis. *Chemistry Central Journal [online]*. 2012, 6(1) [cit. 2023-02-27]. ISSN 1752-153X. Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-6-157.
- [120] HE, B.; et al. Determination of ethyl carbamate in fermented foods using gas chromatography-mass spectrometry. *China Tropical Medicine*, 2009, 9.11: 2107-2119.
- [121] LACHENMEIER, D. W.; W. FRANK a T. KUBALLA. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits. *Rapid Communications in Mass Spectrometry [online]*. 2005, 19(2), 108-112 [cit. 2022-12-06]. ISSN 0951-4198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.1755.
- [122] AJTONY, Z.; N. SZOBOSZLAI; L. BENCS; E. VISZKET a V. G. MIHUCZ. Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry [online]*. 2013, 141(2), 1301-1305 [cit. 2022-12-07]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.011.
- [123] HERBERT, P.; L. SANTOS; M. BASTOS; P. BARROS a A. ALVES. New HPLC Method to Determine Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages Using Fluorescence Detection. *Journal of Food Science [online]*. 2002, 67(5), 1616-1620 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08693.x.

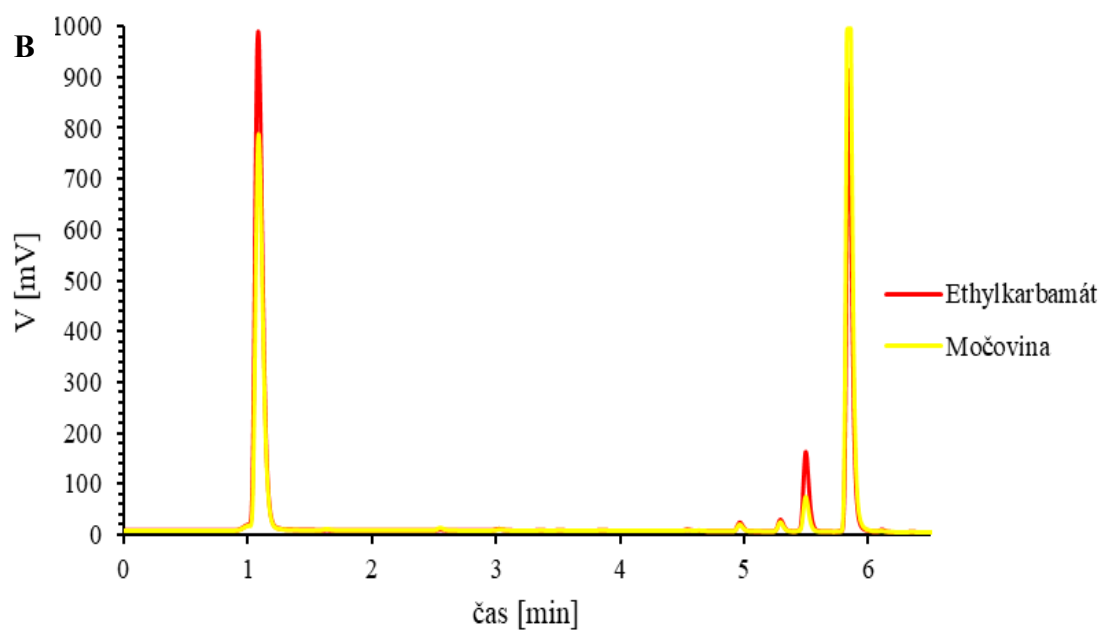
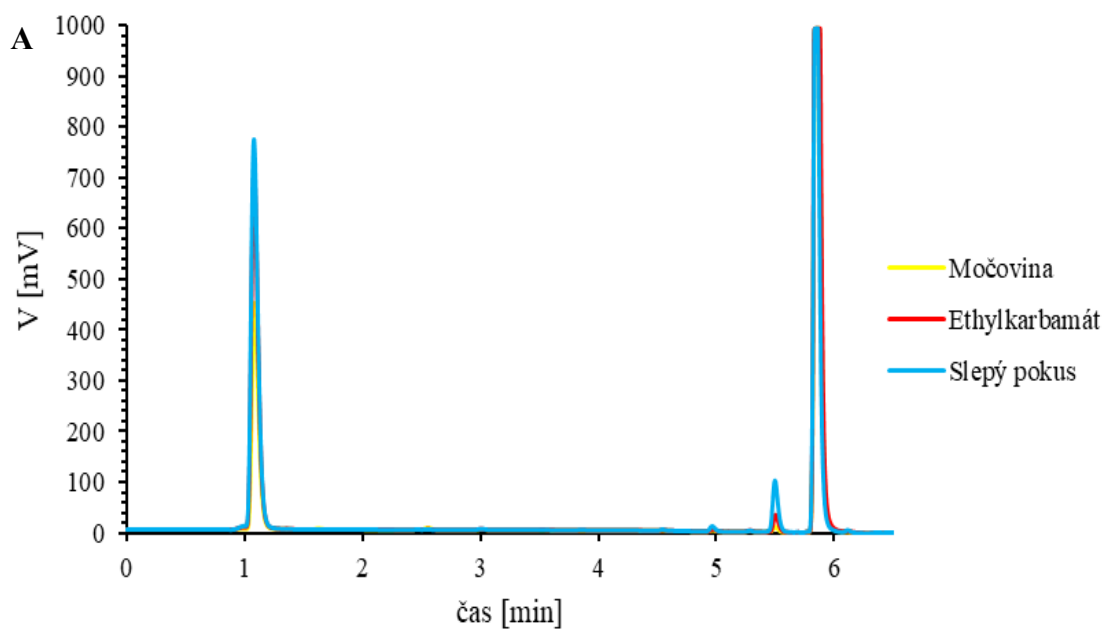
- [124] ZHOU, Kai, et al. An improved HPLC-FLD for fast and simple detection of ethyl carbamate in soy sauce and prediction of precursors. *Food Analytical Methods*, 2017, 10.12: 3856-3865. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0948-5>.
- [125] LI, G.; Q. ZHONG; D. WANG; X. ZHANG; H. GAO a S. SHEN. Determination and formation of Ethyl Carbamate in Chinese spirits. *Food Control [online]*. 2015, 56, 169-176 [cit. 2023-02-27]. ISSN 09567135. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.029](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.029).
- [126] MADRERA, R. R. a B. S. VALLES. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. *Food Control [online]*. 2009, 20(2), 139-143 [cit. 2023-02-27]. ISSN 09567135. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodcont.2008.03.004](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.004).
- [127] FU, M.-L.; J. LIU; Q.-H. CHEN; X.-J. LIU; G.-Q. HE a J.-Ch. CHEN. Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *International Journal of Food Science & Technology [online]*. 2010, 45(6), 1297-1302 [cit. 2023-02-27]. ISSN 09505423. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02279.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02279.x).
- [128] ALBERTS, P.; M. A. STANDER a A. DE VILLIERS. 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. *Food Additives & Contaminants: Part A [online]*. 2011, 28(7), 826-839 [cit. 2022-12-07]. ISSN 1944-0049. Dostupné z: [doi:10.1080/19440049.2011.568010](https://doi.org/10.1080/19440049.2011.568010).
- [129] RIBEIRO, M. A.; A. P. P. TONIN; C. B. POLISELI; C. C. OLIVEIRA; J. V. VISENTAINER; V. M. SILVA a E. C. MEURER. Determination of Ethyl Carbamate in Sugar Cane Spirit by Direct Injection Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Using 18-Crown-6/Trifluoroacetic Acid Spiking Additives. *Food Analytical Methods [online]*. 2019, 12(1), 69-75 [cit. 2022-12-07]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: [doi:10.1007/s12161-018-1339-2](https://doi.org/10.1007/s12161-018-1339-2).
- [130] LU, X.; N. ZHOU a Y. TIAN. Spectrophotometric determination of ethyl carbamate through bi-enzymatic cascade reactions. *Analytical Methods [online]*. 2015, 7(4), 1261-1264 [cit. 2022-12-29]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: [doi:10.1039/C4AY02693D](https://doi.org/10.1039/C4AY02693D).

- [131] ZHIWEI, Z.; X. LU; Y. TIAN a N. ZHOU. High-sensitive Electrochemical Determination of Ethyl Carbamate Using Urethanase and Glutamate Dehydrogenase Modified Electrode. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices [online]*. 2017, 29(2), 481-488 [cit. 2022-12-29]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/elan.201600421>.
- [132] LUO, L.; H.-T. LEI; J.-Y. YANG; 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 [cit. 2022-12-08]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:[10.1016/j.aca.2016.11.008](https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.008).
- [133] FU, H.-J.; Z.-J. CHEN; H. WAN; L. LUO; Y. WANG; R.-M. HUANG; Z.-L. XU a B. HAMMOCK. Development of a sensitive non-competitive immunoassay via immunocomplex binding peptide for the determination of ethyl carbamate in wine samples. *Journal of Hazardous Materials [online]*. 2021, 406 [cit. 2022-12-08]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jhazmat.2020.124288](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124288).
- [134] JIANG, X.; Y. XIE; D. WAN; F. ZHENG a J. WANG. Simultaneously detecting ethyl carbamate and its precursors in rice wine based on a pH-responsive electrochemical impedance sensor. *Analytica Chimica Acta [online]*. 2020, 1126, 124-132 [cit. 2022-12-09]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:[10.1016/j.aca.2020.05.068](https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.068).
- [135] WATT, G. W.; J. CHRISP. Spectrophotometric method for determination of urea. *Analytical chemistry*, 1954, 26.3: 452-453.
- [136] HARIHARAN, M.; S. NAGA a T. VANNOORD. Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection with precolumn derivatization using phenyl isothiocyanate. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [online]*. 1993, 621(1), 15-22 [cit. 2020-05-01]. doi: [10.1016/0378-4347\(93\)80071-B](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80071-B). ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479380071B>.
- [137] PALEGO, L.; G. GIANNACCINI; G. SACCOMANNI et al. Modified RP-LC of Phenylthiocarbamyl Amino Acid Adducts in Plasma Acetonitrile Extracts Using Multiple Internal Standards and Photo-Diode UV Detection. *Chromatographia [online]*. 2010, 71(3-4), 291-297 [cit. 2020-05-02]. doi: [10.1365/s10337-009-1423-2](https://doi.org/10.1365/s10337-009-1423-2). ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1365/s10337-009-1423-2>.

- [138] KLIKAROVÁ, J.; L. ČESLOVÁ a J. FISCHER. Rapid analysis of phenyl isothiocyanate derivatives of amino acids present in Czech meads. *Journal of Chromatography A [online]*. 2021, 1644 [cit. 2023-04-17]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2021.462134.
- [139] KLIKAROVÁ, J.; J. ŠEBKOVÁ; J. FISCHER a L. ČESLOVÁ. Determination of proline in meads by high performance liquid chromatography. *Scientific papers of the University of Pardubice [online]*. 2019, 25, 15-26 [cit. 2023-04-08]. ISSN 1211-5541. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/74269/02%20%20Klikarov%C3%A1%20et%20a1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [140] GIRALDO, J. D. a BERNABÉ L. R. Determination of urea using p-N,N-dimethylaminobenzaldehyde: solvent effect and interference of chitosan. *Journal of the Chilean Chemical Society [online]*. 2017, 62(2), 3538-3542 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0717-9707. Dostupné z: doi:10.4067/S0717-97072017000200023.
- [141] WATT, W.; CHRISP, J. D. Spectrophotometric method for determination of urea. *Analytical chemistry*, 1954, 26 (3), 452-453.
- [142] KOWALCZYK C. M. Simple, selective, and sensitive measurement of urea in body fluids of mammals by reversed-phase ultra-fast liquid chromatography. *Czech Journal of Animal Science*. 2012; 57(1): 19-27. doi: 10.17221/5480-CJAS.
- [143] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Journal of AOAC International [online]*. 2016, (1), 1-16.

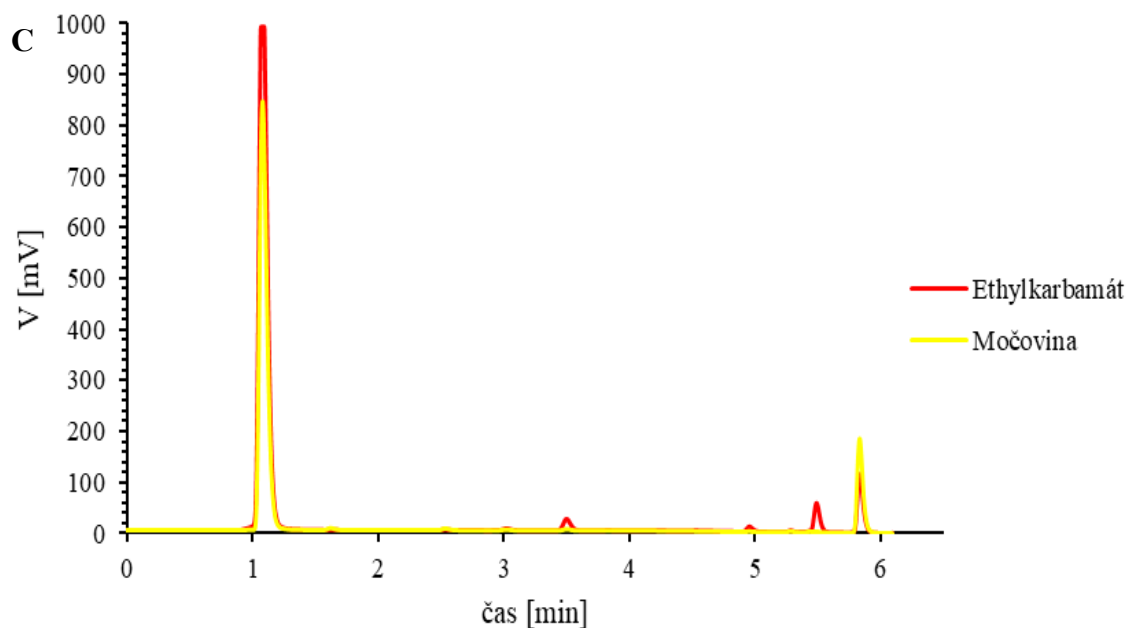
PŘÍLOHA

OBRÁZKY



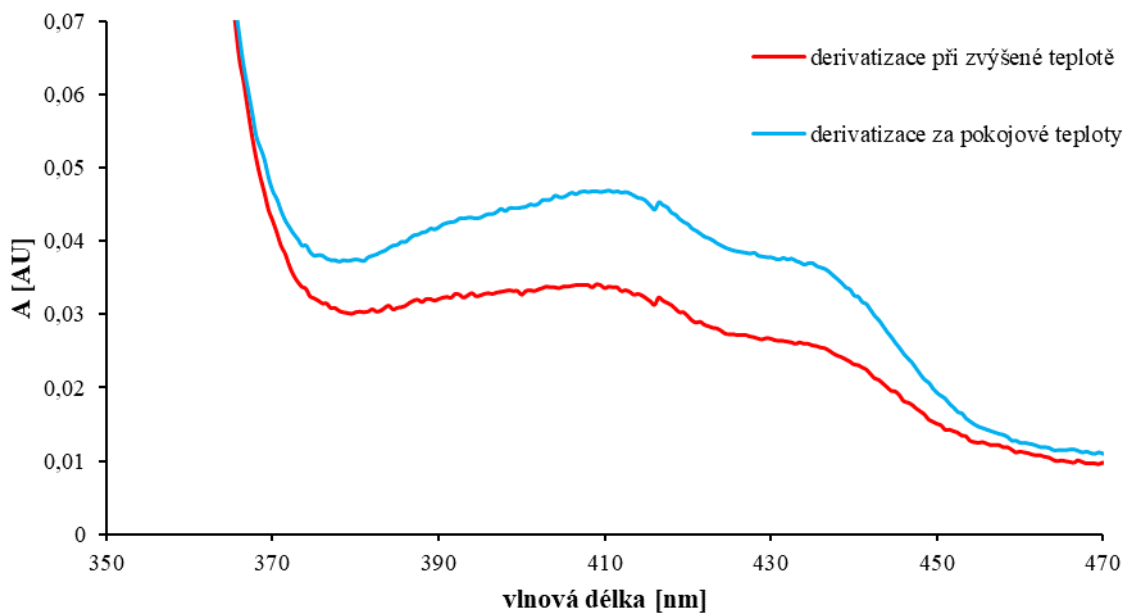
Obrázek P1: HPLC separace EC, močoviny a slepého pokusu po dansylaci probíhající při 60 °C po dobu 60 minut (A) a 120 minut (B).

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 °C; MF A: 0,1% vodný roztok TEA o pH 3 (pomocí HCOOH); MF B: 100% ACN; gradient: 0 min – 40 % B, 3 min – 50 % B, 5 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 270 nm.

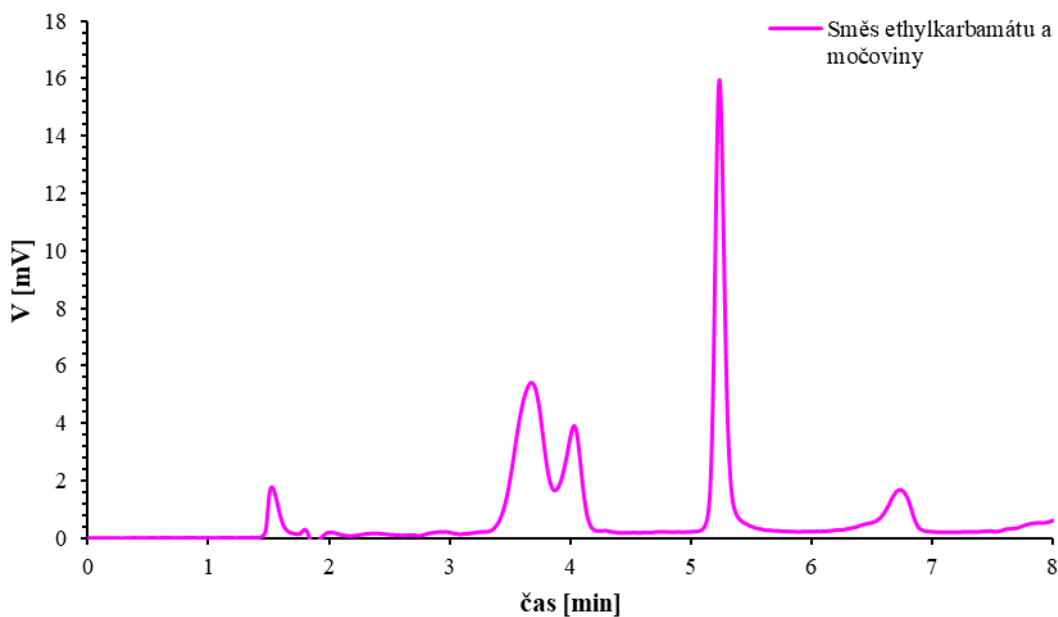


Obrázek P1: HPLC separace EC, močoviny a slepého pokusu po dansylaci probíhající při 80 °C po dobu 30 minut (C).

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm); teplota 30 °C; MF A: 0,1% vodný roztok TEA o pH 3 (pomocí HCOOH); MF B: 100% ACN; gradient: 0 min – 40 % B, 3 min – 50 % B, 5 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; dávkování: 2 μl ; detekce při 270 nm.

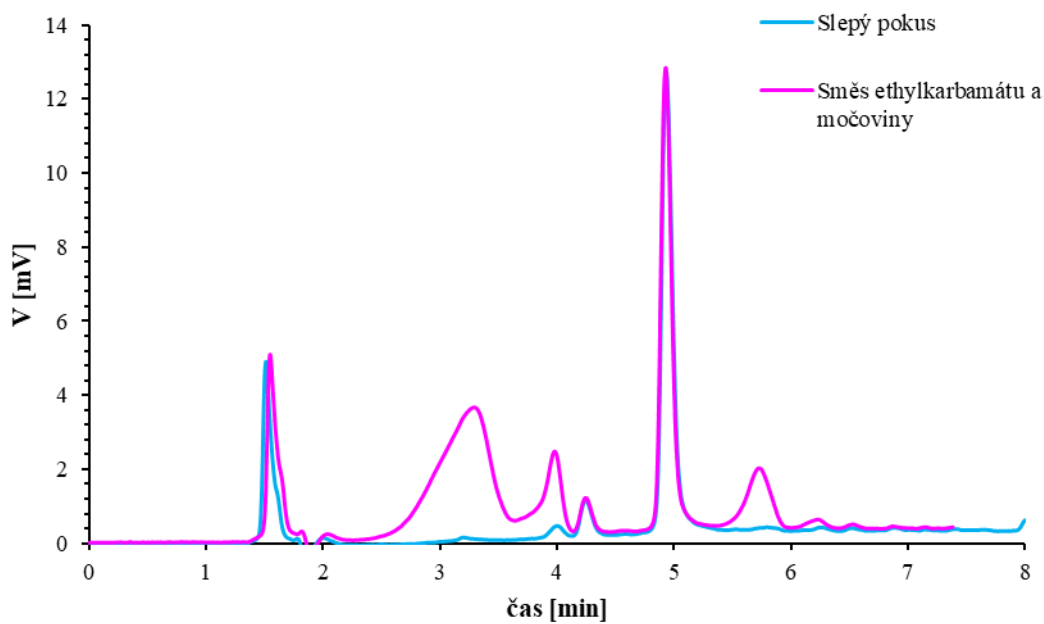


Obrázek P2: UV/VIS spektrum EC po třicetiminutové reakci s p-DMAB za zvýšené (červená) a pokojové (modrá) teploty.



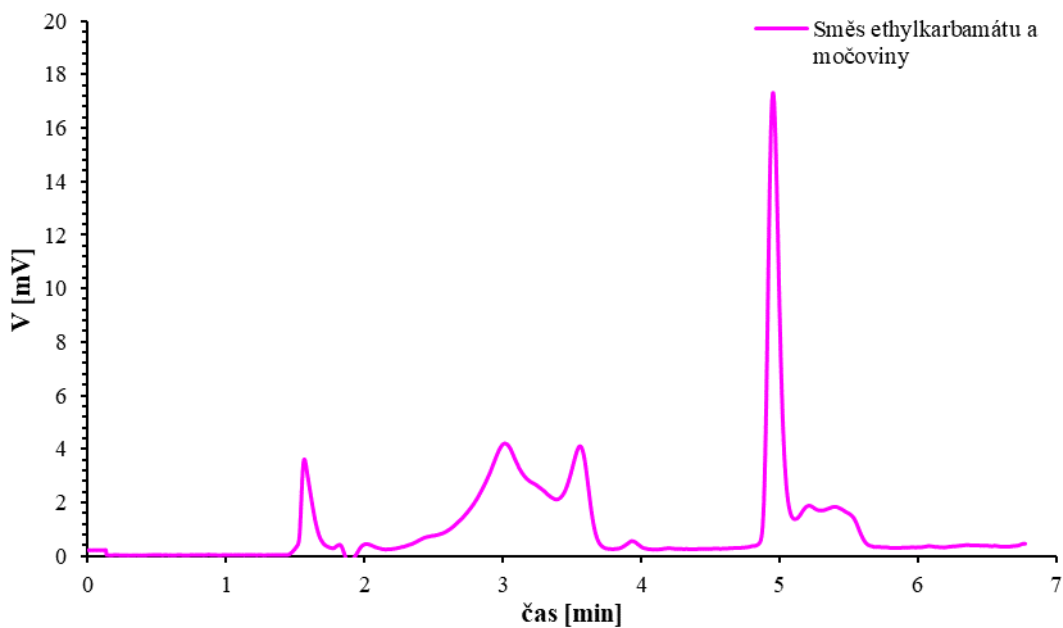
Obrázek P3: HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s *p*-DMAB.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 °C; MF A: fosfátový pufr o pH 4,4; MF B: 100% MetOH; gradient: 0 min – 30 % B, 2 min – 50 % B; 6 min – 70 % B; 7 min – 100 %; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 420 nm.



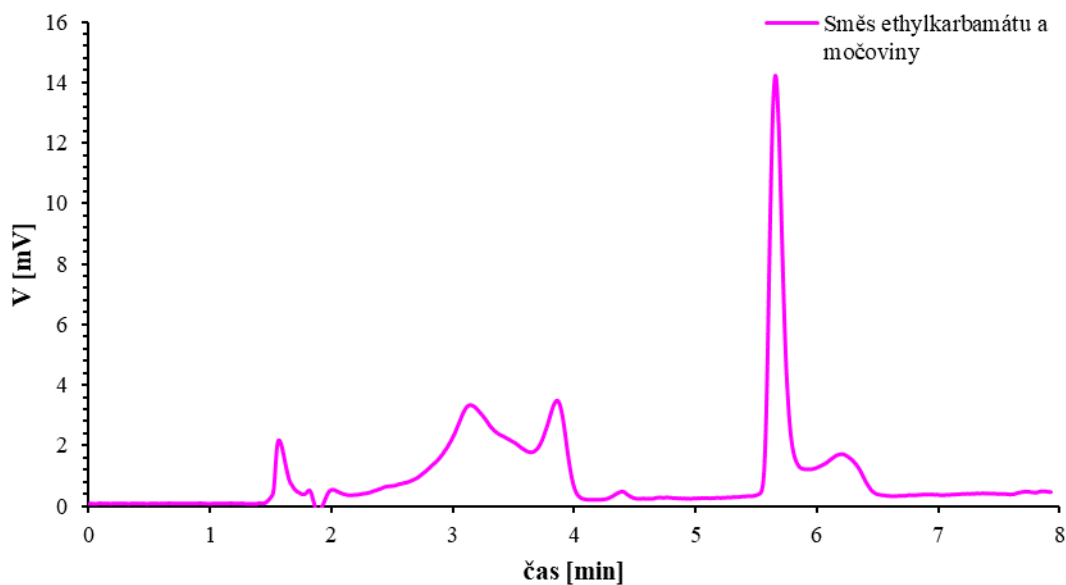
Obrázek P4: HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s *p*-DMAB.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 °C; MF A: 0,1% vodný roztok TEA o pH 4,5 (pomocí HCOOH); MF B: 100% MetOH; gradient: 0 min – 30 % B, 7 min – 100 % B; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 420 nm.



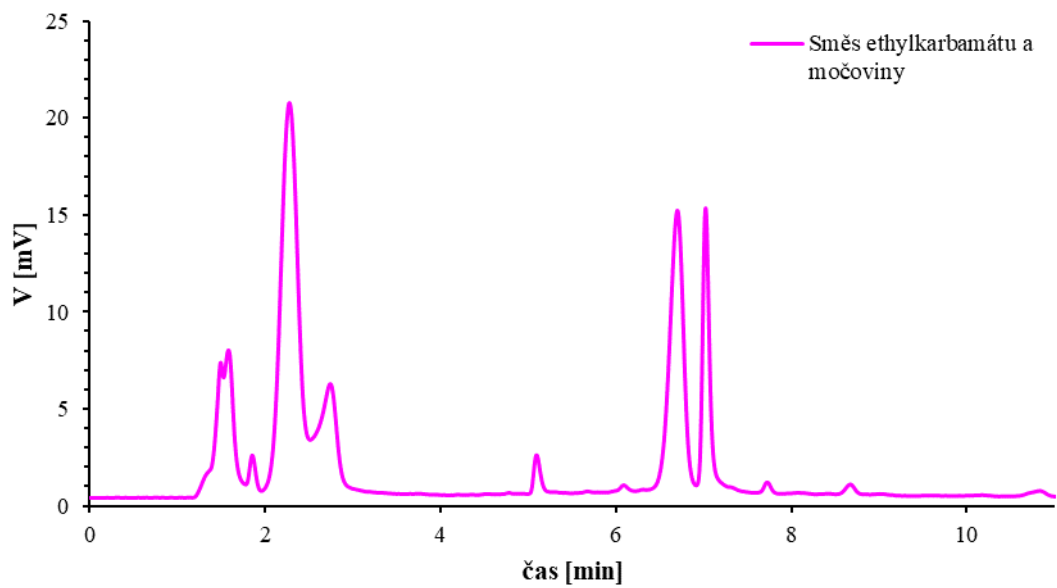
Obrázek P5: HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s *p*-DMAB.

Podmínky analýzy: Ascentis Express RP-Amide (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m částice, Supelco); teplota 30 °C; MF A: fosfátový pufr o pH 4,4; MF B: 100% MetOH; gradient: 0 min – 30 % B, 3 min – 50 % B; 4 min – 70 % B; 5 min – 100 %; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 420 nm.



Obrázek P6: HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s *p*-DMAB.

Podmínky analýzy: Ascentis Express RP-Amide (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m částice, Supelco); teplota 30 °C; MF A: 0,1 % vodný roztok TEA o pH 4,5 (pomocí HCOOH); MF B: 100% MetOH; gradient: 0 min – 30 % B, 6 min – 70 % B; 8 min – 100 % B; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 420 nm.



Obrázek P7: HPLC separace slepého pokusu a směsi EC a močoviny po reakci s *p*-DMAB.

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; MF A: vodný roztok HCOOH o pH 3; MF B: 100% MetOH; gradient: 0 min – 20 %, 2 min – 25 %; 5 min – 60 %, 10 min – 60 %, 11 min – 100 %; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; detekce při 420 nm.

TABULKY

Tabulka P1: Plochy píku derivátu EC a jejich průměrné hodnoty pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady.

Koncentrace EC [mg/l]	Plocha píku 1 [mV.s]	Plocha píku 2 [mV.s]	Plocha píku 3 [mV.s]	Průměrná hodnota plochy píku [mV.s]
23	5,2	4,4	4,3	4,6
200	14,1	13,6	14,8	14,2
400	26,1	26,0	26,6	26,3
800	52,7	51,6	54,3	52,9
1200	83,1	82,1	84,1	83,1
1600	117,8	110,2	109,3	112,4
2000	140,2	134,0	133,9	136,0
2400	163,5	165,3	172,1	166,9
2800	201,1	191,4	192,6	195,0

Tabulka P2: Plochy sumy obou píkù derivátù močoviny a jejich průměrné hodnoty pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady.

Koncentrace močoviny [mg/l]	Plochy píkù 1 [mV.s]	Plochy píkù 2 [mV.s]	Plochy píkù 3 [mV.s]	Průměrná hodnota ploch píkù [mV.s]
14	8,3	8,3	8,3	8,4
121,7	39,7	40,9	42,6	23,6
243,5	48,0	44,2	43,8	45,3
486,9	85,8	84,3	84,8	84,9
730,4	112,2	115,0	130,5	119,2
973,9	152,7	148,2	126,2	150,6
1217,3	193,3	191,0	193,3	192,6
1460,9	227,3	238,7	227,3	231,1
1704,3	278,3	261,2	275,2	271,6

Tabulka P3: Naměřené hodnoty Absorbance pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady.

Koncentrace EC a močoviny [mmol/l]	Průměrná hodnota Absorbance [mAU]
491,3	8,6
4271	17
8544	27,4
17087	42,7
25631	59,1
34174	72,8
42717	93,1
51263	119,6
59806	141,3