

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav technologie potravin**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



**Možnosti stanovení ethylkarbamátu v produktech  
kvasných výrob**  
Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Tomáš Gregor, Ph.D.

*Vypracoval:*  
David Hlaváč

---

Brno 2015

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: **Možnosti stanovení ethylkarbamátu v produktech kvasných výrob** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Gregorovi, Ph.D. za mnoho cenných rad, trpělivost, zájem a čas, který mi při psaní diplomové práce věnoval. Dále bych rád poděkoval RNDr. Aleně Ansorgové, Ph.D. za proškolení a několik cenných poznatků ohledně práce v laboratoři.

## **ABSTRAKT**

Ethylkarbamát, známý také jako urethan, je karcinogenní látka vyskytující se ve fermentovaných potravinách jako chléb, sýry, jogurty a zejména pak alkoholické nápoje. Nejvíce se pak vyskytuje v destilátech z peckového ovoce. V této práci se analyzovalo celkem 15 vzorků (2 vzorky chleba, 2 vzorky sýrů, 2 vzorky jogurtů a 9 vzorků alkoholických nápojů) pomocí plynové chromatografie, z nichž 5 bylo pozitivních. Ethylkarbamát byl detekován ve všech 3 vzorcích testovaných slivovic, a sice v koncentracích  $(9,94 \pm 0,25)$  mg/l,  $(5,34 \pm 0,41)$  mg/l a  $(4,03 \pm 0,36)$  mg/l a ve 2 vzorcích vodky v koncentracích  $(2,38 \pm 0,25)$  mg/l a  $(0,26 \pm 0,01)$  mg/l. Ve vzorcích chlebo, sýru, jogurtů, Ginu, Staré myslivecké, Meruňce a Gieroy vodce nebyl ethylkarbamát detekován. Podmínky skladování však nebyly u žádného ze vzorků známy.

**klíčová slova: ethylkarbamát, urethan, karcinogen, fermentované potraviny, alkoholické nápoje**

## **ABSTRACT**

Ethyl carbamate, also known as urethane, is a carcinogen occurring in fermented foods such as bread, cheese, yoghurt and most in alcoholic beverages, especially in stone fruit brandies. 15 samples of fermented foods were analyzed in this work (2 samples of bread, cheese and yoghurt and 9 samples of alcoholic beverages) using gas chromatography. 5 samples were positive. Ethyl carbamate was detected in all of 3 samples of plum brandy in concentrations  $(9,94 \pm 0,25)$  mg/l,  $(5,34 \pm 0,41)$  mg/l and  $(4,03 \pm 0,36)$  mg/l and in 2 vodka samples in concentrations  $(2,38 \pm 0,25)$  mg/l and  $(0,26 \pm 0,01)$  mg/l. Ethyl carbamate was not detected in bread, cheese and yoghurt samples as well as in Gin, Stará myslivecká, Apricot brandy and Gieroy vodka. However, the storage conditions of all samples were unknown.

**key words: ethyl carbamate, urethane, carcinogen, fermented foods, alcoholic beverages**

## **OBSAH**

1 ÚVOD.....	7
2 CÍL PRÁCE.....	8
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	9
3.1 Ethylkarbamát.....	9
3.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti.....	9
3.1.2 Výroba a použití.....	9
3.1.3 Ethylkarbamát v potravinách.....	10
3.1.3.1 Výskyt ethylkarbamátu v potravinách.....	10
3.1.3.2 Mechanismus vzniku ethylkarbamátu v potravinách.....	11
3.1.3.3 Prevence vzniku ethylkarbamátu v potravinách.....	15
3.1.3.4 Dopad preventivních zásahů na životní prostředí.....	17
3.1.4 Toxikologie.....	17
3.1.4.1 Toxicita ethylkarbamátu.....	17
3.1.4.2 Obecný princip karcinogeneze.....	18
3.1.4.2 Metabolismus a mechanismus toxického působení ethylkarbamátu.....	19
3.1.4.3 Toxikologické studie na zvířecích modelech.....	20
3.1.5 Metody stanovení ethylkarbamátu v potravinách.....	32
3.1.5.1 Stanovení ethylkarbamátu plynovou chromatografií.....	32
3.5.1.2 Stanovení ethylkarbamátu kapalinovou chromatografií.....	35
3.5.1.3 Srovnání plynové a kapalinové chromatografie při stanovení ethylkarbamátu.....	37
4 MATERIÁL A METODIKA.....	38
4.1 Seznam chemikálií, laboratorních pomůcek a přístrojů.....	38
4.1.1 Chemikálie.....	38
4.2.2 Laboratorní pomůcky a přístroje.....	38
4.2 Příprava standardů a dalších látek potřebných k analýze.....	39
4.2.1 Příprava standardu ethylkarbamátu.....	39
4.2.2 Příprava standardu ethylkarbamátu pro měření výtěžnosti pevných vzorků potravin.....	39
4.2.3 Příprava standardu ethylkarbamátu pro měření výtěžnosti kapalných vzorků.....	40
4.2.4 Příprava sorbentu.....	40

4.2.5 Příprava 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové .....	40
4.3 Vzorčky pro analýzu.....	40
4.3.1 Seznam vzorků.....	40
4.3.2 Prekoncentrace, izolace a analýza vzorků .....	41
4.3.3 Podmínky analýzy.....	42
4.3.4 Zpracování a vyhodnocení naměřených dat .....	42
5 VÝSLEDKY PRÁCE .....	44
5.1 Výsledky naměřených hodnot .....	44
5.2 Statistické srovnání vybraných skupin .....	49
5.2.1 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v alkoholických nápojích a v ostatních potravinách.....	49
5.2.2 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce a v ostatních alkoholických nápojích.....	50
5.2.3 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v domácích a komerčně dostupných alkoholických nápojích .....	51
5.2.4 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi vzorky vodky a slivovice.....	52
6 DISKUSE.....	54
7 ZÁVĚR .....	56
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	57
9 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	63
10 SEZNAM TABULEK .....	64

# 1 ÚVOD

Způsob výroby některých potravin za přispění fermentačních procesů je znám po několik tisíciletí. Mikrobiální konverze sacharidů na jiné charakteristické produkty (lišící se dle typu fermentace) umožňuje vznik nových potravin, které se staly běžnou součástí jídelníčku většiny lidí.

Fermentace tedy dává procesu výroby potravin nový rozměr. Vzniká při ní velké množství nových chemických látek, které jsou charakteristické pro daný typ potraviny. Většinou se jedná o látky aromatické, dávající potravíně svůj typický charakter a konzumentem jsou chápány pozitivně. Například u vína je aroma, které je podmíněné těkavými složkami, ukazatelem kvality (BALÍK a kol., 2002). Fermentačními procesy mohou ovšem vznikat i látky nežádoucí, některé jsou dokonce i karcinogenní.

Nejznámějším takovým karcinogenem je ethylkarbamát (i když karbamáty jsou známy spíše jako pesticidy, VLČEK, POHANKA, 2011), který se vyskytuje především v ovocných destilátech, sýrech, jogurtech, pivu, sojové omáčce a dokonce i chlebě. Při rozumné konzumaci těchto fermentovaných potravin člověku obvykle žádné velké nebezpečí nehrozí, ovšem při jejich častějším příjmu nabývá toxicita ethylkarbamátu na významu a jeho tolerovatelná denní dávka bývá často překročena, a to zejména u konzumentů vyššího množství alkoholu (STRATIL, KUBÁŇ, 2004).

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši k problematice vzniku a detekce ethylkarbamátu v produktech kvasných výrob a také se zaměřit na jeho toxikologické účinky. Poté navrhnout metody jeho prekoncentrace, izolace a analýzy a v chemické laboratoři se jej z běžně dostupných potravin pokusit zachytit, prekoncentrovat a stanovit pomocí plynové chromatografie. Takto získaná data v závěru statisticky zpracovat a vyhodnotit.



## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Ethylkarbamát

#### 3.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Ethylkarbamát ( $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ ), známý také pod názvy urethan, ethylurethan či ethylester kyseliny karbamové (IARC monographs, 2010) je bezbarvá krystalická látka rozpustná ve vodě, benzenu, ethanolu, chloroformu, etheru, glycerolu a olivovém oleji (SCHRENK, 2012). Vodný roztok vykazuje neutrální pH. Mezi další fyzikálně-chemické vlastnosti patří:

- bod varu: 182–184 °C;
- bod tání: 48–50 °C;
- těkavost: snadno sublimuje při 103 °C při 54 mm Hg, těkavý při pokojové teplotě;
- relativní molekulová hmotnost: 89,1 (IARC monographs, 2010).

#### 3.1.2 Výroba a použití

Ethylkarbamát lze vyrobit reakcí ethanolu a močoviny nebo zahřátím nitrátu močoviny s ethanolem a dusitanem sodným. Další možností výroby je přidání ethanolu do isokyanátu trichloracetylu.

Výroba ethylkarbamátu byla převážně zaznamenána v 1. pol. 20. stol., kdy se komerčně vyráběl v USA. Sloužil převážně pro výrobu meprobamátu, dále se používal jako rozpouštědlo, v textilním průmyslu, jako přídavek do vlasových kondicionérů, k přípravě kyseliny sulfamové, jako extrační činidlo uhlovodíků z ropy a v potravinářském průmyslu jako látka zvyšující chuť a vůni. Na konci 19. stol. se používal také jako hypnotikum, než byl nahrazen barbituráty. V roce 2003 byl poprvé použit ve veterinární medicíně jako anestetikum pro laboratorní zvířata (IARC monographs, 2010).

### 3.1.3 Ethylkarbamát v potravinách

#### 3.1.3.1 Výskyt ethylkarbamátu v potravinách

Ethylkarbamát vzniká ve fermentovaných potravinách, pečených potravinách a alkoholických nápojích z různých prekurzorů jako kyselina kyanovodíková, močovina a N-karbamylové sloučeniny reakcí s ethanolem (WEBER, SHARYPOV, 2009). Nejvíce se vyskytuje v ovocných destilátech, v nichž vzniká navíc z kyanogenních glykosidů (podrobný mechanismus vzniku urethanu v potravinách bude vysvětlen níže), dále se také vyskytuje v chlebě, jogurtech, sýrech, sojové omáčce apod. (STRATIL, KUBÁŇ, 2004). Množství ethylkarbamátu v potravinách podrobněji znázorňuje tabulka 1.

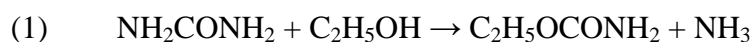
**Tabulka 1** Množství ethylkarbamátu ve vybraných potravinách (WEBER, SHARYPOV, 2009)

<b>potravina</b>	<b>koncentrace</b>
kapalné (mg/l)	
<i>lihoviny</i>	0,01–6,2
<i>whisky</i>	<0,01
<i>pivo</i>	<0,01
<i>víno</i>	0,01–0,025
<i>saké</i>	0,08–0,17
<i>ocet</i>	0,03
<i>destiláty z peckového ovoce</i>	0,01–22
pevné (mg/kg)	
<i>dort</i>	<0,01
<i>chléb</i>	<0,01
<i>kysané zelí</i>	0,03
<i>kvasnicový extrakt</i>	0,04
<i>sýry</i>	<0,01
omáčky a jogurty (mg/kg)	
<i>sojová omáčka</i>	0,01–0,084
<i>jogurty</i>	<0,01
<i>anglický vánoční pudink</i>	0,02
<i>fermentovaná sojová omáčka</i>	0,01–0,1

### 3.1.3.2 Mechanismus vzniku ethylkarbamátu v potravinách

#### 1) Vznik ethylkarbamátu přirozenou cestou

Existuje mnoho způsobů vzniku urethanu v potravinách závislých na charakteru dané potraviny, výrobním procesu a přítomných prekurzorech. Jedním z nejznámějších způsobů vzniku ethylkarbamátu v kyselém prostředí je reakce močoviny s ethanolem, kterou znázorňuje rovnice 1.



Močovina se nachází v mnoha fermentovaných potravinách jako jogurty, sýry, chléb a pečené potraviny obecně, alkoholické a nealkoholické nápoje. V syrových potravinách se nachází především v mléce v množství stovek mg/l. Tvorba urethanu z močoviny a ethanolu má mírný průběh při pokojové teplotě, nicméně se vzrůstající teplotou rapidně roste (pečením, vařením a grilováním). Proto jsou např. pro konzervaci vín vhodné teploty do 24 °C, čímž se množství vzniklého ethylkarbamátu výrazně sníží.

Z močoviny může ovšem ethylkarbamát vznikat i jinými mechanismy. V rozmezí teplot 60–100 °C se ve vodném roztoku ethanolu močovina rozkládá na kyanát a isokyanát. Reakcí ethanolu, isokyanátu a kyanátu vzniká v kyselém prostředí ethanol (rovnice 2a). Další možností je termický rozklad močoviny (např. pečením) na amoniak a kyselinu kyanatou (rovnice 2b), přičemž výsledný urethan následně vzniká reakcí kyseliny kyanaté s ethanolem.



Při kvašení (zejména jablečno-mléčném) vznikají působením kvasinek z proteinů i další urethanové prekurzory jako citrulin a v menší míře také karbamyl fosfát. Reakce těchto látek s ethanolem vede ke vzniku vysokého množství nežádoucího ethylkarbamátu (rovnice 3).



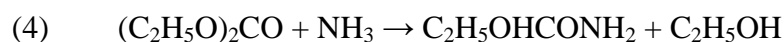
Další přirozený způsob vzniku ethylkarbamátu je skrze kyanidový aniont. Na světě existuje přes 2000 druhů rostlin produkujících kyanogenní glykosidy a s nimi související hydrolytické enzymy. Z kyanogenních glykosidů může vznikat cukr a kyanohydrin, který se rychle rozkládá na kyselinu kyanovodíkovou. Jako příklad lze uvést maniok jedlý, třetí nejdůležitější zdroj potravy v tropických oblastech, který obsahuje vysoké množství kyanogenních glykosidů a může způsobit až otravu kyanidem. Většina případů vzniku urethanu z kyanidu či kyanátu vzniká v důsledku vysokého zahřátí při výrobě potravin (destilací, pečením). Vzhledem k tomu, že

kyselina kyanovodíková je prekurzorem vzniku ethylkarbamátu, sledoval se vztah mezi ní (a kyanidem) a koncentracemi urethanu v alkoholických nápojích. Sledovalo se 260 vzorků různých alkoholických nápojů s koncentrací HCN v rozmezí hodnot 1–40 mg/l, přičemž pouze u 17,5 % vzorků závisela změna koncentrace ethylkarbamátu na změně koncentrace kyseliny kyanovodíkové. Nicméně bylo zjištěno, že čím vyšší množství kyseliny kyanovodíkové se nacházelo ve vzorku, tím více ethylkarbamátu zde bylo přítomno. Dobrým příkladem je fakt, že u 89,4 % vzorků, které obsahovaly více než 20 mg/l kyanidů, se koncentrace urethanu pohybovala nad 0,4 mg/l. Naproti tomu u 63 % vzorků s koncentrací kyanidů nižší než 5 mg/l byla koncentrace urethanu nižší než 0,4 mg/l. Důležitou roli zde navíc hrají i další aspekty jako teplota, světlo a přítomnost katalyzátorů.

U přirozené tvorby ethylkarbamátu jsou důležité i fotochemické mechanismy. V tomto případě se jedná o autooxidaci nenasycených sloučenin kyslíkem vedoucí ke vzniku hydroperoxidů a hydroxylových radikálů s následným vznikem ethylkarbamátu skrze kyanátové a isokyanátové intermedie oxidací kyanidových aniontů nebo kyseliny kyanovodíkové. Nedávno navíc byla prokázána snadná tvorba karbamátů a karbamových kyselin reakcí oxidu uhličitého s aminy. I když tento mechanismus vzniku není ještě plně znám, předpokládá se, že i toto je jeden ze způsobů vzniku ethylkarbamátu v potravinách a nápojích, kde je přítomen oxid uhličitý (z fermentace) a aminy (ze syrové potraviny) (WEBER, SHARYPOV, 2009).

## 2) Ethylkarbamát z aditiv

Ethylkarbamát může vznikat z několika potravinářských aditiv. Jedním z nich je diethylkarbonát, který se používá pro kontrolu mikrobiální aktivity a v průmyslu také např. jako rozpouštědlo. Jeho reakcí a s amoniakem vzniká ethylkarbamát, což znázorňuje rovnice 4.



Dalším příkladem aditivní látky, ze které může urethan vznikat, je azodikarbonamid používaný jako nadouvadlo. Je prokázáno, že použití této látky vede v alkoholickém prostředí ke vzniku ethylkarbamátu, nicméně urethanový prekurzor v tomto případě není znám. Azodikarbonamid se rozkládá na plyny, primárně na oxid dusný a uhelnatý společně s menším množstvím oxidu uhličitého a amoniaku. Z azodikarbonamidu vznikají i netěkavé složky, které se za normálních podmínek vyskytují pouze v omezeném množství (biurea okolo 2 %). Za určitých podmínek se však zbytková

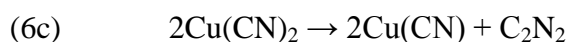
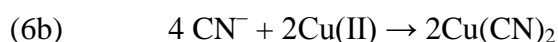
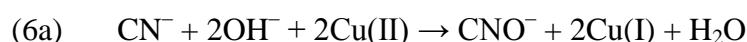
biurea může vyskytovat i v množství 34 %. Mezi další netěkavé produkty patří urazol a kyselina kyanurová, což jsou ethylkarbamátové prekurzory. Suchý rozklad azodikarbonamidu při teplotě 190 °C vede ke vzniku již výše zmíněné kyseliny kyanurové, možného urethanového prekurzoru (WEBER, SHARYPOV, 2009).

### 3) Vznik ethylkarbamátu během zpracování potravin

Obecně platí, že vysoké koncentrace urethanu se nacházejí v ovocných destilátech. Za jeho vznik jsou zodpovědné různé mechanismy, přičemž nejvýznamnější roli hraje vznik z kyanidu (a jiných těkavých dusíkatých prekurzorů). Předpokládá se, že kyanidový aniont, který vzniká enzymatickým a tepelným odštěpením z kyanogenních glykosidů, je nejvýznamnější urethanový prekurzor v různých druzích ovoce a zeleniny. Mezi faktory ovlivňující vznik ethylkarbamátu z kyanidu patří pH, světlo, obsah ethanolu, teplota a obsah některých kovů (plní funkci katalyzátorů). Kyanát a jeho isomer isokyanát jsou hlavní urethanové prekurzory (rovnice 2a). Reakce 2a je katalyzována kovovými ionty Cu (II) nebo Fe (III). Nekatalytická tvorba kyanátu ( $\text{CNO}^-$ ) nebo isokyanátu ( $\text{NCO}^-$ ) z kyanidu není dosud jasná, neboť k oxidaci kyanidu na kyanát je zapotřebí peroxid vodíku nebo chlornanový aniont a probíhá v zásaditém prostředí (WEBER, SHARYPOV, 2009).

### 4) Tvorba ethylkarbamátu ve vodných a alkoholických roztocích

Přímá konverze kyanidu na kyanát (rovnice 5) ve vodných a ethanolových roztocích může probíhat bez katalýzy, ale probíhá pomalu v kyselém pH, proto se uplatňují především katalytické cesty, běžné pro fermentované nápoje (rovnice 6a–6d).



V roztoku dochází ke tvorbě komplexu kyanát-měď (II). Atom uhlíku zde nabírá kladný náboj a je atakován ethanollem, což vede ke vzniku urethanu (rovnice 7–8).

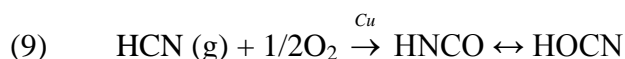


Jako nejlepší katalyzátor se z měďnatých solí pro tvorbu ethylkarbamátu z kyanátu považuje octan měďnatý (WEBER, SHARYPOV, 2009).

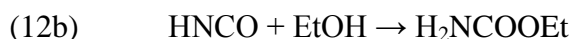
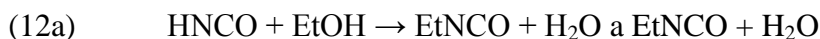
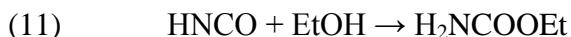
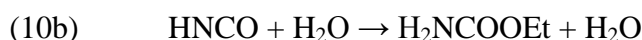
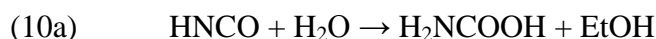
## 5) Produkce ethylkarbamátu v plynné fázi

Relativně vysoké koncentrace ethylkarbamátu se nacházejí v destilátech a obecně v alkoholických nápojích, které jsou tedy jeho hlavním zdrojem. Urethanové prekurzory a mechanismus vzniku v kapalně fázi (např. ovocné šťávy) jsou popsány výše. V destilátech jsou ještě navíc další mechanismy, které navyšují tvorbu ethylkarbamátu různými reakcemi v plynné fázi při destilačním procesu. Předpokládá se, že pouze menšina urethanu v kapalně fázi se odpaří a nachází se v destilátech kvůli vysokému bodu varu blízkému 184 °C. Urethan může být do alembiku transportován ve formě aerosolu nebo mlhy. Dále se odhaduje, že téměř 80 % ethylkarbamátu nacházejícího se v lihovinách vytvoří během destilačního procesu a během prvních 48 h po destilaci.

I v této fázi tvorby urethanu hrají důležitou roli jeho prekurzory jako kyselina kyanovodíková a fulminová (nebo kyanatá), přítomné nebo vzniklé během destilačního procesu v alkoholovém médiu. Kvůli jejich velmi nízkému bodu varu (<30 °C) se tyto kyseliny odpaří a mohou produkovat urethan v plynné fázi nebo heterogenními (pevné/plynné) reakcemi, a to zejména pokud je zařízení pro destilaci vyrobeno z mědi (alembik), která slouží jako katalyzátor oxidační přeměny kyseliny kyanovodíkové na kyanatou a fulminovou (rovnice 9).



Kyselina kyanatá (nebo fulminová) může zreagovat s ethanolem nebo jeho výpary za vzniku různých meziproduktů (rovnice 10–12) jako kyselina karbamová (rovnice 10) nebo ethylkyanat (rovnice 12), které oba vedou ke vzniku ethylkarbamátu (WEBER, SHARYPOV, 2009).



## 6) Post-destilační a fotochemická produkce ethylkarbamátu

V destilátech vzniká většina urethanu (cca 80 %) během destilace a do 48 h po destilaci, jak je již zmíněno výše. Bylo zjištěno, že prvořadě jsou zde dva faktory, a sice přítomnost kovových solí (Cu (II) a Fe (III)) a světla (především UV záření). Významný je i synergistický efekt mezi působením kovů a ozářením. Ethylkarbamát zde vzniká

dvěma způsoby. Prvním z nich je katalyzovaná reakce ethanolu s urethanovými prekurzory vzniklými v plynné fázi během destilačního procesu a druhým fotochemické reakce vedoucí ke vzniku hydroxylového radikálu autooxidací nenasycených složek způsobující oxidaci kyanidu na kyanát (rovnice 2a). Oba typy reakcí jsou katalyzovány kovovými solemi, jak bylo podrobně popsáno výše. Závěrem nutno dodat, že fotochemické mechanismy nejsou omezeny pouze na post-destilační reakce, ale mohou se uplatňovat i u tvorby ethylkarbamátu přirozenou cestou (WEBER, SHARYPOV, 2009).

### **3.1.3.3 Prevence vzniku ethylkarbamátu v potravinách**

Vzhledem k velkému množství urethanových prekurzorů a složitým mechanismům neexistuje žádná obecná metoda, která by zamezila vzniku ethylkarbamátu v potravinách. Existuje však několik způsobů, kterými lze množství výsledného urethanu v potravinách výrazně snížit. V poslední době klesl obsah ethylkarbamátu u velkého množství potravin pod detekovatelnou mez. Největší pokles byl zaznamenán u sojové omáčky, kde se obsah urethanu v roce 1993 pohyboval okolo 70 µg/kg, ale v roce 2004 byl z několika testovaných vzorků pouze 1 pozitivní s obsahem 10 µg/kg.

Prvním logickým krokem, který vede ke snížení množství nežádoucího urethanu, je snížení hladiny jeho prekurzorů (močovina, citrulín, arginin atd.). Toho se v dnešní době dosahuje použitím vybraných druhů kvasinek s nízkou exkrecí močoviny během fermentace. Další možností je použití enzymů ureáz, což vede ke snížení množství močoviny. Většina známých ureáz je však v kyselém prostředí inaktivována. Tento problém našťastí řeší purifikovaná kyselá ureáza z bakterie *Lactobacillus fermentum*, která je dnes běžně dostupná a používaná při výrobě vín a fermentovaných nápojů. Např. použití kyselé ureázy vedlo při výrobě japonského saké ke snížení obsahu močoviny z 35 mg/l na nedetekovatelnou hodnotu. Další úspěšný způsob je použití mutantních kvasinek *Sacharomyces cerevisiae*, jejichž použití opět vedlo ke snížení množství výsledné močoviny pod detekovatelnou mez. Problém s využitím ureáz při výrobě vín nastává ovšem u ceny, což je hlavní limitující faktor použití tohoto enzymu a zaznamenáno je jen málo případů výroby vína tímto způsobem.

Zvláštní pozornost je nutno věnovat destilátům kvůli několika aspektům. Obsahují nejvyšší koncentrace ethylkarbamátu, prekurzorem zde není močovina ani proteiny, ale kyselina kyanovodíková a také proto, že výsledný urethan zde vzniká především během

destilačního procesu a nejvíce pak v období krátce po něm. Další problém je měděný alembik u tradičního způsobu výroby, kde měď slouží jako katalyzátor oxidační přeměny kyseliny kyanovodíkové na urethanové prekurzory. Základ v omezení tvorby ethylkarbamátu tedy tvoří eliminace kyanidů před destilací a eliminace Cu (II), čímž se zabrání katalytické tvorbě nežádoucího urethanu.

Chemické eliminace kyanidů ve zkvašené ovocné šťávě před vlastní destilací může být dosaženo tvorbou nerozpustných kyanidových solí. Komerčně dostupné produkty především Cu (I) solí jako cyanurex<sup>®</sup> jsou schopny rapidně snížit množství kyanidů (až o 90 %) v alkoholickém médiu, přičemž jeho použití se na sensorických vlastnostech výsledného produktu neprojeví (WEBER, SHARYPOV, 2009). Samozřejmě je vhodné používat pouze vypeckované ovoce, snížit teplotu a pH během fermentačního procesu. Všechny tyto faktory snižují vznikající množství nežádoucího urethanu (JIAO a kol., 2014).

Hlavními prekurzory ethylkarbamátu jsou během destilace těkavé kyanidy, kyanáty a isokyanáty. V tomto kroku je nutno eliminovat kyanidy a měď. Měděný kondenzátor může být nahrazen materiálem z nerezové oceli. Plynné prekurzory lze eliminovat jejich navázáním na měď ještě před kolonou (nebo hlavou alembiku), čímž se zabrání vzniku ethylkarbamátu a jeho prekurzorů a jejich odpaření do kolony nebo kondenzátoru. V tomto případě je důležité, aby byl měděný povrch co největší.

Důležité jsou i post-destilační opatření vedoucí k zamezení vzniku nežádoucího urethanu. I zde je nutné eliminovat Cu (II) a urethanové prekurzory, přičemž se nabízí několik způsobů. Prvním je použití nerozpustných chelatačních činidel nebo iontoměničových pryskyřic. Odstraněním měďnatých iontů, které je založeno na vzniku nerozpustných chelatačních činidel nebo na použití chelatačních pryskyřic, se však zabývalo poměrně málo studií. Tyto metody jsou poměrně složité a závisí na mnoha faktorech jako pH, době kontaktu s pryskyřicí, teplotě a velikosti pryskyřicových částic. Zkoušelo se i odstranění nežádoucích prekurzorů pomocí iontoměničových pryskyřic, a to v laboratorních i provozních podmínkách. Výsledkem byl značný pokles kyanidových aniontů (<0,1 mg/l) a Cu (II) iontů (<0,1 mg/l) u slivovice a třešňové pálenky. Kationty mědi byly rozptýleny jako aniontové komplexy. Tyto výsledky vedly i k žádoucímu poklesu koncentrace ethylkarbamátu (<140 µg/l). Tyto způsoby eliminace mědi a kyanidů však doprovázelo poměrně značné zhoršení sensorických vlastností. Později však byla objevena novější metoda vedoucí k odstranění měďnatých iontů (u destilátů z cukrové třtiny), která nevykazovala viditelné změny sensorických



vlastností. Její princip je založen na přidavku uhličitanu vápenatého nebo hořečnatého, které způsobí výměnu kationtů. Zde byla hladina Cu (II) iontů ve sledovaných vzorcích nižší než 0,01 mg/l při použití obou uhličitanů. Pozorovatelný byl i vzestup pH způsobený neutralizací organických kyselin. Tento způsob je však méně efektivní pro alkoholické nápoje zrající v dřevěných nádobách. Navíc musí být přizpůsoben průmyslovému způsobu výroby destilátů. Smísení pevných uhličitanů s destiláty může oxidací změnit jejich výsledné chemické složení, což může vést i ke změně senzorických vlastností (WEBER, SHARYPOV, 2009). Samozřejmostí je pak zamezení přístupu světla během skladování a dodržování správné výrobní praxe během destilačního procesu, jak je uvedeno v doporučení Evropské komise 133 z roku 2010.

#### ***3.1.3.4 Dopad preventivních zásahů na životní prostředí***

Nežádoucí měď, která se během výroby destilátů vytěsňuje, se ovšem dostává do odpadních vod, což s sebou přináší i ekologický problém. V lihovarnickém průmyslu však existuje mnoho způsobů vedoucích k odstranění solí mědi z odpadních vod. Patří sem metalurgické reakce mezi železem a mědí, adsorpce na hydroxid hořečnatý, iontoměniče, elektrochemický rozklad a vysrážení jako hydroxid, uhličitan nebo sulfid. Tyto techniky sníží množství mědi až o 90 %. V poslední době se začínají používat i biosorbenty, jako např. použití ječných výpalků, které vznikají jako vedlejší produkt při výrobě whisky (WEBER, SHARYPOV, 2009).

### **3.1.4 Toxikologie**

#### ***3.1.4.1 Toxicita ethylkarbamátu***

Ethylkarbamát je genotoxický a karcinogenní pro mnoho živočišných druhů jako krysy, myši, křečci a opice, což naznačuje potenciální karcinogenní riziko pro člověka (WEBER, SHARYPOV, 2009). Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) je klasifikován jako karcinogen 2A skupiny, tj. látka pravděpodobně karcinogenní pro člověka (IARC monographs, 2010). Původně byl zařazen do skupiny 2B (možný lidský karcinogen), nicméně v březnu roku 2007 byl překlasifikován do skupiny 2A (WEBER, SHARYPOV, 2009).

Akutní orální toxicita ethylkarbamátu je poměrně nízká, LD<sub>50</sub> dosahuje u hlodavců přibližně 2000 mg/kg těl. hm. Dávky okolo 1000 mg/kg těl. hm. způsobují anestezii

(WHO, 2006). Vysoké dávky vykazují u zvířecích modelů toxický efekt na centrální nervovou soustavu, gastrointestinální trakt, slezinu a brzlík (IARC monographs, 2010).

Tolerovatelná denní dávka (TDI) je 20 ng/kg živé hmotnosti a den, což pro osobu s hmotností 70 kg činí 520 µg za rok, a tedy 1,4 µg na den (VELÍŠEK, 1999). Odhadnutý denní příjem ethylkarbamátu je 80 ng/kg živé hmotnosti, pokud se vezmou v úvahu i alkoholické nápoje. Bez nich se denní příjem odhaduje na 15 ng/kg živé hmotnosti. Protože jsou alkoholické nápoje hlavním zdrojem urethanu, zavedla kanadská legislativa v roce 1985 limit pro jeho koncentrace v alkoholických nápojích, a sice 30 µg/l pro stolní vína, 100 µg/l pro fortifikovaná vína, 150 µg/l pro destiláty kromě těch ovocných, 200 µg/l pro saké a 400 µg/l pro ovocné destiláty (LEÇA a kol., 2014). Česká republika se touto kanadskou legislativou řídila až do roku 2010 (limity byly dány vyhláškou 305/2004). Tato vyhláška pak ale byla zrušena a směrodatné je nyní doporučení komise ze dne 2. března 2010 o prevenci a snížení kontaminace lihovin z peckovin a výlisků peckovin ethylkarbamátem a o monitorování obsahu ethylkarbamátu v těchto nápojích (2010/133/EU), které doporučuje zajistit přijetí všech příslušných opatření, aby bylo dosaženo co nejnižšího obsahu ethylkarbamátu v lihovinách z peckovin a lihovinách z výlisků peckovin, přičemž cílovou hodnotou je 1 mg/l. Dále upozorňuje na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 ze dne 15. ledna 2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89 (2). Toto nařízení stanoví, že maximální obsah kyseliny kyanovodíkové v lihovinách z peckovin a lihovinách z výlisků peckovin je 7 gramů na hektolitr alkoholu o 100 % objemových (70 mg/l).

#### ***3.1.4.2 Obecný princip karcinogeneze***

Na světě existuje více než 100 různých druhů rakovin (zhoubných nádorů). Ačkoli se jednotlivé typy od sebe liší, všechny mají společný jeden základ, a to nekontrolovatelný růst buněk, které se vymkly kontrolním mechanismům pacientova organismu. Takto překotně a bez kontroly rostoucí buňky tvoří nádor. Nádory rostou zpočátku pomaleji a na jednom místě, poté však mohou začít agresivně pronikat do okolí a uvolňovat buňky, které se šíří do vzdálených míst, a to buď mizní cestou do lymfatických uzlin, anebo krevní cestou do různých orgánů, přičemž zde tvoří nová nádorová ložiska, tzv. metastázy (ABRAHÁMOVÁ, 2009).

Vznik rakoviny může ovlivnit řada faktorů, zejména kouření, strava, alkohol, infekce, hormonální faktory a radiace, genetické faktory a jiné málo známé nebo neznámé příčiny. S rostoucím věkem také roste riziko vzniku nádorů, jak se postupně v průběhu života kumulují v buňkách genové poruchy. Zatímco v rozvojových zemích se na vzniku nádorových onemocnění podílejí zejména různé typy infekcí, tak v hospodářsky vyspělých zemích patří mezi nejdůležitější faktory strava. Potrava zde hraje poměrně významnou roli, a to nejen svou skladbou, ale i celkovým množstvím (STRATIL, KUBÁŇ, 2004). Aby se normální buňky staly rakovinnými, musí projít jistým počtem genetických poruch. Strava bohatá na ochranné složky může rakovinu zpomalit, a dokonce i zastavit (GILLIE, 2001).

Při indukci mutací DNA, které mohou vést až ke vzniku nádoru, se uplatňuje kumulační efekt, tzn. že se množství jednotlivých karcinogenů sčítá (i podprahových), poruchy DNA se hromadí a je jedno, jaká látka je způsobila (STRATIL, KUBÁŇ, 2004).

#### **3.1.4.2 *Metabolismus a mechanismus toxického působení ethylkarbamátu***

Ethylkarbamát se vstřebává poměrně rychle a téměř kompletně z gastrointestinálního traktu a kůže. Jeho následný metabolismus zahrnuje 3 hlavní dráhy:

- hydrolyza
- *N*-hydroxylace nebo *C*-hydroxylace
- oxidace postranního řetězce

Hlavní metabolickou dráhu tvoří hydrolyza urethanu jaterními mikrozomálními esterázami na ethanol, amoniak a oxid uhličitý. Přibližně 5 % ethylkarbamátu se z těla vyloučí nezměněno a více než 90 % je hydrolyzováno. Ethylkarbamát je také přeměněn cytochromem P-450 na *N*-hydroxykarbamát (přibližně 0,1 %),  $\alpha$ -hydroxyethylkarbamát a vinylkarbamát (přibližně 0,5 %). Vinylkarbamát je následně epoxidací konvertován na epoxid vinylkarbamátu (WEBER, SHARYPOV, 2009), který se může kovalentně vázat na DNA za vzniku etheno-DNA aduktů, RNA a proteiny. Hepatokarcinogenní účinky vinylkarbamátu jsou silnější než u samotného ethylkarbamátu. Epoxid vinylkarbamátu působí navíc ještě silněji než samotný vinylkarbamát (IARC monographs, 2010). Dalším problémem je *N*-hydroxyurethan vzniklý metabolismem urethanu. Metabolickou konverzi urethanu na *N*-hydroxyurethan katalyzuje cytochrom P-450 vyskytující se v plicích, lymfě, játrech a kůži, kde se navíc ještě vyskytuje i enzym esteráza. *N*-hydroxyurethan může být esterázou metabolizován na hydroxylamin, který

působí karcinogenně tvorbou kyslíku a oxidu dusnatého, což vede k oxidaci a depurinaci DNA (WEBER, SHARYPOV, 2009).

#### **3.1.4.3 Toxikologické studie na zvířecích modelech**

S toxikologickým výzkumem ethylkarbamátu se začalo již v roce 1974. Biologické testy se prováděly na myších, potkanech a křečcích. Urethan se uvedeným druhům aplikoval perorální, dermální, subkutánní a intraperitoneální cestou.

Perorální podání ethylkarbamátu vedlo u myši ke zvýšené incidenci plicních adenomů, karcinomů, dlaždicových karcinomů, lymfomů (hlavně lymfosarkomů), adenokarcinomů a karcinomů mléčné žlázy, leukémie a adenomů a angiomů Harderovy žlázy. Přídavek promotoru 12-*O*-tetradekanoylforbol-13 acetátu (TPA) ještě zvýšil incidenci kožních papilomů a dlaždicových karcinomů. U potkanů byla zvýšená incidence karcinomů Zymbalovy žlázy a mléčné žlázy a u křečků nádorů kůže, papilomů předžaludku, adenokarcinomů mléčné žlázy, hepatomů, hemangiomů sleziny a jater a karcinomů štítné žlázy, vaječnicků a vaginy.

Dermální aplikace ethylkarbamátu vedla u myši k významnému zvýšení incidence plicních adenomů a karcinomů mléčné žlázy.

Subkutánní podání ethylkarbamátu vedlo ke zvýšení incidence plicních adenomů u dospělých myši a hepatomů u novorozených mláďat. Lokální přídavek krotonového oleje navíc rapidně zvýšil incidenci kožních papilomů.

Intraperitoneální podání ethylkarbamátu výrazně zvýšilo u dospělých myši incidenci plicních adenomů, hepatomů a kožních papilomů. U mláďat indukovalo vznik lymfomů, plicních adenomů, hepatomů, nádorů Harderovy žlázy a stromálních a epiteliálních nádorů vaječnicku (IARC monographs, 2010).

Níže jsou uvedeny příklady toxikologických studií.

Skupinám 50 samčím B6C3F<sub>1</sub> myším ve věku 6 týdnů se podával ethylkarbamát o koncentracích 0; 0,6; 3; 6; 60 a 600 ppm v pitné vodě po dobu 70 týdnů. Následně byly myši usmrceny a provedla se histologická vyšetření. Výsledkem této urethanové expozice bylo na dávce závislé zvýšení incidence alveolárních/bronchiálních adenomů a karcinomů, jaterních hemangiomů a angiosarkomů a srdečních hemangiomů. Incidence plicních alveolárních/bronchiálních adenomů byla 18 %, 8 %, 15 %, 16 %, 68 % a 95 % odpovídající koncentracím urethanu o hodnotách 0; 0,6; 3; 6; 60 a 600 ppm. Statisticky významný je značný nárůst patologie u koncentrací 60 a 600 ppm. Plicní

alveolární/bronchiální karcinom se vyskytl pouze u skupiny, které byl podáván urethan v koncentraci 600 ppm, a sice ve 14% incidenci. Jaterní hemangiom se vyskytl pouze u skupin s urethanovou koncentrací 60 (4 %) a 600 (45 %) ppm. Jaterní angiosarkom vznikl u skupin, kterým byl podáván ethylkarbamát o koncentracích 6, 60 a 600 ppm, s incidencí 4 %, 4 % a 25 %. Srdeční hemangiom se vyskytl pouze u skupiny s koncentrací urethanu 600 ppm, přičemž incidence zde byla 9 % (IARC monographs, 2010).

V další studii se podával ethylkarbamát v pitné vodě skupinám 48 samčím a 48 samičím B6C3F<sub>1</sub> myším ve věku 4 týdnů v koncentracích 0, 10, 30 a 90 ppm po dobu 104 týdnů. S rostoucími koncentracemi urethanu se zvyšoval počet nádorů i úmrtí, což bylo pozorovatelné především při koncentracích 30 a 90 ppm. Incidence tumorů u samčích myší byla pro koncentrace 0, 10, 30 a 90 ppm následující:

- plicní alveolární a bronchiální adenomy a karcinomy: 10 %, 37 %, 62 %, 77 %
- hepatocelulární adenomy a karcinomy: 26 %, 38 %, 52 %, 52 %
- jaterní hemangiosarkomy: 2 %, 4 %, 11 %, 29 %
- adenomy a karcinomy Harderovy žlázy: 6 %, 25 %, 64 %, 81 %
- dlaždicové nádory kůže: 0 %, 2 %, 6 %, 12 %
- dlaždicové nádory předžaludku: 0 %, 14 %, 7 %, 11 %
- srdeční hemangiosarkomy: 0 %, 0 %, 2 %, 10 %

Incidence tumorů u samčích myší byla pro koncentrace 0, 10, 30 a 90 ppm následující:

- plicní alveolární a bronchiální adenomy a karcinomy: 12 %, 17 %, 53 %, 83 %
- hepatocelulární adenomy a karcinomy: 10 %, 23 %, 43 %, 40 %
- jaterní hemangiosarkomy: 0 %, 0 %, 2 %, 15 %
- adenokarcinomy mléčné žlázy: 8 %, 6 %, 6 %, 23 %
- adenoakantomy mléčné žlázy: 0 %, 2 %, 2 %, 23 %
- adenomy a karcinomy Harderovy žlázy: 6 %, 23 %, 40 %, 62 %
- folikulární nádory vaječníků: 0 %, 0 %, 4 %, 13 % (IARC monographs, 2010; BELAND a kol., 2005)

Ghanayem a kol. se ve své studii zabývali rozdílností výskytu nádorů indukovaných urethanem u *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> a *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myší, protože primární enzym zodpovědný za oxidaci urethanu není esteráza, ale enzym CYP2E1. Pro výzkum byly použity skupiny 28–30 samčích *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> a *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myší ve věku 5–6 týdnů, kterým se podával ethylkarbamát zavedením sondy do žaludku v dávkách 0, 1, 10, 100 mg/kg/den 5 dní

v týdnu po dobu 6 týdnů. Poté se přestal urethan na 7 měsíců podávat. Následně byly myši usmrceny a hodnotila se karcinogenita ethylkarbamátu. Jaterní tumory (hemangiomy a hemangiosarkomy) se objevily u *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši, kterým se podával urethan v množství 100 mg/kg živé hmotnosti, s incidencí 33 % a 53 % ve srovnání s kontrolními *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši, kde byly incidence 0 % a 0 %. Jaterní hemangiom byl zjištěn pouze u jedné *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> myši (7% incidence) ze skupiny myši exponovaných dávkou urethanu 100 mg/kg živé hmotnosti. Mezi *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> a *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> myši exponovanými dávkami ethylkarbamátu 100 mg/kg živé hmotnosti byly nalezeny průkazné rozdíly v incidenci jaterních hemangiosarkomů (53 % u *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši vs. 0 % u *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši). V případě jaterních hemangiomů byl rozdíl menší (33 % vs. 7 %). Incidence bronchioloalveolárního adenomu u *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši exponovaných dávkami 0, 1, 10, 100 mg/kg živé hmotnosti byla 0 %, 21 %, 100 % a 93 %, přičemž nárůst incidence u dávek 10 a 100 mg/kg živé hmotnosti byl statisticky významný. U *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> myši byla incidence bronchioloalveolárního adenomu 0 %, 0 %, 29 % a 60 %, přičemž i zde byl patrný značný nárůst incidence u dávek 10 a 100 mg/kg. Rozdíl mezi *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> a *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši byl i v tomto případě dobře pozorovatelný. Zaznamenán byl i jeden případ bronchioloalveolárního karcinomu u *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši při použité dávce 100 mg/kg živé hmotnosti. Incidence adenomu Harderovy žlázy u *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši exponovaných dávkami 0, 1, 10, 100 mg/kg živé hmotnosti byla 7 %, 29 %, 100 % a 87 %, přičemž nárůst incidence u dávek 10 a 100 mg/kg byl znatelný. U *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> myši byla incidence adenomu Harderovy žlázy 0 %, 7 %, 14 % a 80 %, přičemž zde byl patrný nárůst incidence až u dávky 100 mg/kg živé hmotnosti. Zde byl rozdíl mezi *Cyp2e1*<sup>-/-</sup> a *Cyp2e1*<sup>+/+</sup> myši znatelný pouze u dávky 10 mg/kg. Tato studie prokázala, že CYP2E1 hraje důležitou roli při vzniku rakoviny indukované ethylkarbamátem (IARC monographs, 2010; GHANAYEM a kol., 2007).

Iversen ve své studii zkoumal účinek ethylkarbamátu jako látky schopné zesílit působení 7,12-dimethylbenzo[*a*]antracenu (DMBA) indukujícího nádory kůže. Skupině 16 samčím a 16 samičím myším zbavených srsti (věk nespecifikován) se dermálně podávalo 51,2 µg DMBA ve 100 µl acetonu jednou týdně po dobu 60 týdnů. Další skupině o stejném počtu myši se podával DMBA stejným způsobem, avšak po 2 týdnech od doby ukončení aplikace DMBA se začalo dvakrát týdně dermálně podávat 100 µl 10% roztoku ethylkarbamátu v acetonu po dobu 50 týdnů. Třetí skupině se nepodával DMBA, ale pouze urethan po dobu 60 týdnů. Výsledky ukázaly, že u 11 myši exponovaných pouze DMBA bylo zaznamenáno 21 kožních tumorů (především

papilomy, ale také karcinomy a atypické keratoakantomy a žádné plicní adenomy), u 5 myší exponovaných pouze urethanem bylo zjištěno 8 kožních tumorů a u 22 myší exponovaných pouze urethanem 79 plicních adenomů a u 16 myší exponovaných DMBA i urethanem bylo nalezeno 60 kožních tumorů a u 23 myší exponovaných DMBA i urethanem 121 plicních adenomů. Ethylkarbamát sám o sobě tedy nevykazoval vysokou kožní karcinogenitu, nicméně působil synergicky v kombinaci s DMBA (IARC monographs, 2010; IVERSEN, 1991).

Další studie se zabývala inhalační expozicí urethanem. Skupiny samičích JCL:ICR myší (počet ve skupině nespecifikován) ve věku 28 dní byly vystaveny působení vzduchu obsahujícího ethylkarbamát v koncentraci 0,25 µg/ml po dobu 1, 3, 5 nebo 10 dní nebo vzduchu s urethanovou koncentrací 1,29 µg/ml po dobu 0,25; 1; 2; 4 nebo 5 dní. Skupiny samčích JCL:ICR myší ve věku 28 dní byly vystaveny vzduchu s urethanovou koncentrací 0,25 µg/ml po dobu 10 dní (50 myší) a vzduchu s urethanovou koncentrací 1,29 µg/ml po dobu 4 dní (47 myší). Samicí myši byly usmrceny 5 měsíců a samčí 12 měsíců po skončení expozice. U samicích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 0,25 µg/ml byla incidence plicních nádorů (typ nespecifikován) 53 % a nádorová multiplicita  $1,08 \pm 0,39$  (hlavní  $\pm$  95% interval spolehlivosti) po 1denní expozici, 86 % a  $5,29 \pm 1,28$  po 3denní expozici, 87 % a  $7,56 \pm 2,05$  po 5denní expozici a 82 % a  $17,8 \pm 4,6$  po 10denní expozici. U samicích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 1,29 µg/ml byla incidence plicních nádorů (typ nespecifikován) 48 % a nádorová multiplicita  $0,67 \pm 0,20$  po 0,25denní expozici, 92 % a  $10,7 \pm 2,9$  po 1denní expozici, 94 % a  $18,6 \pm 3,8$  po 2denní expozici, 94 % a  $10,6 \pm 2,6$  po 4denní expozici a 100 % a  $12,2 \pm 3,9$  po 5denní expozici. U samčích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 0,25 µg/ml po dobu 10 dní byla incidence plicních adenokarcinomů 80 %, přičemž 22 % vykazovalo známky invaze nebo metastazování. U samčích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 1,29 µg/ml po dobu 4 dní byla incidence plicních adenokarcinomů 35 %. Incidence leukémie u samicích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 0,25 µg/ml byla 6 % po 1denní expozici, 4 % po 3denní expozici, 9 % po 5denní expozici a 0 % po 10denní expozici. Incidence leukémie u samicích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 1,29 µg/ml byla 2 % po 0,25denní expozici, 2 % po 1denní expozici, 17 % po 2denní expozici, 21 % po 4denní expozici a 17 % po 5denní expozici. Incidence leukémie u samčích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 0,25 µg/ml po dobu 10 dní byla 10 % a v koncentraci 1,29 µg/ml po dobu

4 dní 20 %. Incidence děložních hemangiomů u myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 1,29 µg/ml byla 0 % po 0,25denní expozici, 2 % po 1denní expozici, 3 % po 2denní expozici, 9 % po 4denní expozici a 0 % po 5denní expozici. 1 děložní hemangiom (incidence 2 %) byl také nalezen ve skupině samicích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 0,25 µg/ml po dobu 3 dnů. Incidence hepatomů u samicích myší exponovaných ethylkarbamátem v koncentraci 0,25 µg/ml po dobu 10 dní byla 12 %, v koncentraci 1,29 µg/ml po dobu 4 dní 7 (IARC monographs, 2010, NOMURA a kol., 1990).

Vědci zkoumali i účinky působení ethylkarbamátu u potomků exponovaných rodičů. Samčím Cr:NIH(S) myším ve věku 6 týdnů (počet myší nespécifikován) se podala intraperitoneální injekce destilované vody nebo injekce destilované vody obsahující navíc 1,5 g/kg těl. hm. ethylkarbamátu. Po dvou týdnech se tyto samčí myši přemístily k samicím ve věku 8 týdnů za účelem páření. Po 3 týdnech byly samicí myši odděleny za účelem porodu mláďat. Potomstvo bylo odstaveno ve 4 týdnech věku. Všichni jedinci se nechali přirozeně uhynout a provedla se histologická vyšetření. Paternální expozice ethylkarbamátem vyústila u mláďat (samců i samic) ke vzniku nádorů nadledvinek a žaludku. Incidence nádorů nadledvinek byla 5 %, přičemž 83 % z nich tvořily feochromocytohy a 17 % kortikální adenomy. U kontrolních myší se nádory nevyskytovaly. Incidence nádorů žaludku byla 18 %, přičemž 6 % tvořily adenomy, 5 % karcinomy a 7 % atypické hyperplazie. U kontrolních myší byla incidence nádorů žaludku 4 % (IARC monographs, 2010; YU a kol., 1999).

Skupině 25 Swiss Webster samicích myší ve věku 10 týdnů a ve 14. dni těhotenství se podal jednorázově intravenózně ethylkarbamát (3,3 mmol/kg těl. hm. ve 250 µl fosfátového fyziologického roztoku. Kontrolní skupině 22 těhotným myším samicím stejného věku se aplikovala injekce fosfátového pufru (250 µl). Třetí skupině 30 panenským myším samicím se podaly intravenózně 3,3 mmol/kg těl. hm. ethylkarbamátu ve fyziologickém roztoku a poslední skupině 29 panenským myším samicím samotný fosfátový pufr. Po všech injekcích ještě následovala u všech skupin 1 injekce 100 µl fosfátového fyziologického roztoku. 6 měsíců po porodu byly všechny myši usmrceny (těhotné matky, jejich potomci a panenské samice) a zkoumala se incidence plicních nádorů. 1 kontrolní samice zemřela ještě před naplánovaným usmrcením. Míra přežití potomků nebyla uvedena. Incidence plicních adenomů u 21 kontrolních samic byla 28,6 % s nádorovou multiplicitou 0,33 nádoru na myš. V případě jejich potomků (96 samců a 72 samic) se jednalo o hodnoty 10,4 % a 0,12



nádoru na myš a 16,6 % a 0,19 nádoru na myš. Incidence plicních adenomů u 20 samic vystavených účinku ethylkarbamátu byla 95,0 % s nádorovou multiplicitou 10,5 nádorů na myš. V případě jejich potomků (90 samců a 70 samic) se jednalo o hodnoty 45,0 % a 0,96 nádoru na myš a 57,1 % a 1,3 nádoru na myš. Incidence plicních adenomů u 29 kontrolních panenských myší byla 44,8 % s nádorovou multiplicitou 0,75 nádoru na myš. V případě 30 panenských urethanem exponovaných myší byla incidence 100 % a nádorová multiplicita 6,2 nádorů na myš (IARC monographs, 2010; NEEPER-BRADLEY a kol., 1992).

Následné studie zkoumají účinky urethanových metabolitů. Skupinám 20 nebo 25 samčích a 20 nebo 25 samičích Swiss myší ve věku 2–3 měsíců se podala perorálně jednotná dávka 25 mg ethylkarbamátu nebo 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu v destilované vodě (objem nespecifikován). Dalších 46 myší sloužilo jako kontrolní skupina. 4 dny po perorálním podání se všem skupinám dvakrát denně dermálně aplikoval 5% krotonový olej v tekutém parafinu (objem nespecifikován). Incidence a multiplicita kožních nádorů se hodnotila po 20 a 40 týdnech od poslední aplikace krotonového oleje a v případě plicních nádorů pouze po 40 týdnech. Míra přežití byla  $\geq 90$  % po 20 týdnech a  $\geq 80$  % po 40 týdnech od poslední aplikace krotonového oleje. Incidence a multiplicita ( $\pm$  směrodatná odchylka) kožních nádorů po 20 týdnech byla u myší exponovaných ethylkarbamátem 89 % a  $1,5 \pm 0,2$  a 48 % a  $0,7 \pm 0,2$  u myší exponovaných *N*-hydroxyethylkarbamátem. V případě myší vystavených pouze působení krotonového oleje byly hodnoty 7 % a  $0,07 \pm 0,05$ . Rozdíl v incidenci a multiplicitě mezi exponovanými a kontrolními jedinci byl statisticky významný. Patrný byl i rozdíl mezi účinky ethylkarbamátu a *N*-hydroxyethylkarbamátu, kde se karcinogenní účinek ethylkarbamátu jevil silnější. Incidence a multiplicita ( $\pm$  směrodatná odchylka) kožních nádorů po 40 týdnech byla u myší exponovaných ethylkarbamátem 89 % a  $1,6 \pm 0,3$  a 95 % a  $1,5 \pm 0,3$  u myší exponovaných *N*-hydroxyethylkarbamátem. V případě myší vystavených pouze působení krotonového oleje byly hodnoty 25 % a  $0,4 \pm 0,1$ . Rozdíl v incidenci a multiplicitě mezi exponovanými a kontrolními jedinci byl statisticky významný. Incidence a multiplicita ( $\pm$  směrodatná odchylka) plicních nádorů po 40 týdnech byla u myší exponovaných ethylkarbamátem 67 % a  $3,4 \pm 1,3$  a 45 % a  $0,75 \pm 0,3$  u myší exponovaných *N*-hydroxyethylkarbamátem. V případě myší vystavených pouze působení krotonového oleje byly hodnoty 5 % a  $0,05 \pm 0,03$ . Rozdíl v incidenci a multiplicitě mezi exponovanými a kontrolními jedinci byl statisticky významný. Pozorovatelný byl i

rozdíl v nádorové multiplicitě mezi jedinci exponovanými ethylkarbamátem a *N*-hydroxyethylkarbamátem (IARC monographs, 2010; BERENBLUM a kol., 1959).

Skupinám 40 samičím CD-1 myším ve věku 6–8 týdnů se na oholená záda dermálně aplikovalo 1,2 mg krotonového oleje ve 200 µl destilovaného acetonu. Po 18–24 h se dermálně aplikovalo 5 nebo 60 mg ethylkarbamátu nebo 5 mg vinylkarbamátu ve 200 µl acetonu nebo aceton samotný. Po týdnu se aplikace karbamátů nebo rozpouštědla zopakovala. Týden po druhé aplikaci se všem myším podávalo dvakrát v týdnu 900 µg krotonového oleje ve 150 µl acetonu. Experiment trval 32 týdnů a přežilo jej  $\geq 88$  % myší. Poté se po usmrcení provedla histologická vyšetření. Incidence a nádorová multiplicita kožních papilomů byla 2 % a 0 u myší exponovaných samotným rozpouštědlem, 25 % a 0,3 u myší exponovaných celkem 10 mg urethanu, 47 % a 3,4 u myší exponovaných celkem 120 mg urethanu a 66 % a 4,5 u myší exponovaných celkem 10 mg vinylkarbamátu. Incidence kožních papilomů se mezi kontrolními a karbamáty exponovanými jedinci statisticky významně lišila. Významně se incidence lišila i mezi jedinci exponovanými ethylkarbamátem a vinylkarbamátem, kde vinylkarbamát vykazoval silnější karcinogenní účinek. Incidence a nádorová multiplicita plicních adenomů byla 17 % a 0,4 u myší exponovaných samotným rozpouštědlem, 42 % a 1,0 u myší exponovaných celkem 10 mg urethanu, 82 % a 8,8 u myší exponovaných celkem 120 mg urethanu a 97 % a 18,9 u myší exponovaných celkem 10 mg vinylkarbamátu. Incidence plicních adenomů se mezi kontrolními a karbamáty exponovanými jedinci statisticky významně lišila. Významně se lišila i mezi jedinci exponovanými ethylkarbamátem a vinylkarbamátem, kde vinylkarbamát opět vykazoval silnější karcinogenní účinek (IARC monographs, 2010; DAHL a kol., 1978).

Ve svém druhém experimentu použili Dahl a kol. skupiny 30–33 samičích CD-1 myší starých 6–8 týdnů, kterým se na oholená záda aplikovalo 1,2 mg krotonového oleje ve 200 µl destilovaného acetonu. Po 18–24 h se dermálně aplikovalo 2,5; 5 nebo 60 mg ethylkarbamátu nebo 2,5 nebo 5 mg vinylkarbamátu ve 200 µl acetonu nebo aceton samotný. Po týdnu se aplikace karbamátů nebo rozpouštědla zopakovala. Týden po druhé aplikaci se všem myším podávalo dvakrát v týdnu 900 µg krotonového oleje ve 150 µl acetonu. Experiment trval 35 týdnů a přežilo jej  $\geq 90$  % myší. Poté se provedla histologická vyšetření. Incidence a nádorová multiplicita kožních papilomů byla 0 % a 0 u myší exponovaných samotným rozpouštědlem, 10 % a 0,1 u myší exponovaných celkem 5 mg urethanu, 13 % a 0,2 u myší exponovaných celkem 10 mg

urethanu, 38 % a 1,8 u myši exponovaných celkem 120 mg urethanu, 38 % a 1,8 u myši exponovaných celkem 5 mg vinylkarbamátu a 37 % a 2,0 u myši exponovaných celkem 10 mg vinylkarbamátu. Incidence kožních papilomů se mezi kontrolními a karbamáty exponovanými jedinci (kromě 5 a 10 mg urethanu) statisticky významně lišila. Významně se i lišila mezi jedinci exponovanými ethylkarbamáty a vinylkarbamáty, kde vinylkarbamáty vždy vykazovaly silnější karcinogenní účinek. Incidence a nádorová multiplicita plicních adenomů byla 55 % a 0,9 u myši exponovaných samotným rozpouštědlem, 46 % a 0,9 u myši exponovaných celkem 5 mg urethanu, 53 % a 1,0 u myši exponovaných celkem 10 mg urethanu, 83 % a 7,3 u myši exponovaných celkem 120 mg urethanu, 90 % a 4,5 u myši exponovaných celkem 5 mg vinylkarbamátu a 100 % a 12,0 u myši exponovaných celkem 10 mg vinylkarbamátu. Incidence plicních adenomů se mezi kontrolními a karbamáty exponovanými jedinci (kromě 5 a 10 mg urethanu) statisticky významně lišila. Významně se lišila i mezi jedinci exponovanými ethylkarbamátem a vinylkarbamátem, kde vinylkarbamát opět vykazoval silnější karcinogenní účinek (IARC monographs, 2010; DAHL a kol., 1978).

Park a kol. se ve svých experimentech zabývali karcinogenními účinky vinylkarbamátu a epoxidu vinylkarbamátu. Skupinám 30 samičích CD-1 myši ve věku 6–8 týdnů se dermálně aplikovalo 2,5  $\mu\text{g}$  TPA ve 100  $\mu\text{l}$  acetonu. Po 18–24 h se aplikovalo 5,8 nebo 11,5  $\mu\text{mol}$  vinylkarbamátu nebo 5,8 nebo 11,5  $\mu\text{mol}$  epoxidu vinylkarbamátu ve 200  $\mu\text{l}$  acetonu obsahujícího navíc 15% dimethylsulfoxid (DMSO). Aplikace vinylkarbamátu a epoxidu vinylkarbamátu se opakovala v týdenních intervalech až do celkového počtu 5 aplikací. Poté se dvakrát v týdnu aplikovalo 2,5  $\mu\text{g}$  TPA ve 100  $\mu\text{l}$  acetonu. Kontrolním myším se aplikoval pouze TPA a rozpouštědlo. Experiment byl ukončen 22 týdnů po první aplikaci vinylkarbamátu a epoxidu vinylkarbamátu a přežilo jej  $\geq 95$  % myši. Nádorová multiplicita ( $\pm$  směrodatná odchylka) byla  $6,5 \pm 5,2$  pro myši exponované 5,8  $\mu\text{mol}$  vinylkarbamátu,  $10,5 \pm 8,4$  pro myši exponované 11,5  $\mu\text{mol}$  vinylkarbamátu,  $13,3 \pm 9,2$  pro myši exponované 5,8  $\mu\text{mol}$  epoxidu vinylkarbamátu,  $13,8 \pm 9,0$  pro myši exponované 11,5  $\mu\text{mol}$  epoxidu vinylkarbamátu a  $0,1 \pm 0,3$  pro myši kontrolní. Průměrný počet papilomů se mezi myšmi exponovanými a kontrolními statisticky významně lišil ve všech skupinách. Statisticky významný byl i rozdíl mezi vinylkarbamátem a epoxidem vinylkarbamátu exponovanými myšmi u množství karcinogenu 5,8  $\mu\text{mol}$  (IARC monographs, 2010; PARK a kol., 1993).

Ve druhém experimentu se skupinám 30 samičích CD-1 myší ve věku 6–8 týdnů dermálně aplikovalo 2,5 µg TPA ve 100 µl acetonu. Po 18–24 h se aplikovalo 1,15 nebo 11,5 µmol vinylkarbamátu nebo 1,15 nebo 11,5 µmol epoxidu vinylkarbamátu ve 200 µl acetonu obsahujícího navíc 15% dimethylsulfoxid (DMSO). Po uplynutí doby 1 týdne se dvakrát v týdnu aplikovalo 2,5 µg TPA ve 100 µl acetonu. Kontrolním myším se aplikoval pouze TPA a rozpouštědlo. Experiment byl ukončen 22 týdnů po první aplikaci vinylkarbamátu a epoxidu vinylkarbamátu a přežilo jej  $\geq 97$  % myší. Poté se provedla histologická vyšetření. Incidence papilomů a průměrný počet papilomů na myš ( $\pm$  směrodatná odchylka) byla 56 % a  $0,9 \pm 1,1$  pro myši exponované 1,15 µmol vinylkarbamátu, 98 % a  $7,8 \pm 5,1$  pro myši exponované 11,5 µmol vinylkarbamátu, 93 % a  $5,2 \pm 3,5$  pro myši exponované 1,15 µmol epoxidu vinylkarbamátu, 100 % a  $9,8 \pm 4,7$  pro myši exponované 11,5 µmol epoxidu vinylkarbamátu a 7 % a  $0,07 \pm 0,2$  pro myši kontrolní. Rozdíl v incidenci papilomů mezi myšmi exponovanými a kontrolními byl u všech testovaných skupin statisticky významný. Statisticky významný byl i rozdíl v incidenci mezi myšmi exponovanými 1,15 µmol vinylkarbamátu a 1,15 µmol epoxidu vinylkarbamátu. Průměrný počet papilomů na myš se mezi exponovanými a kontrolními jedinci statisticky významně lišil kromě skupin exponovaných 1,15 µmol vinylkarbamátu (IARC monographs, 2010; PARK a kol., 1993).

Ve třetím experimentu se skupinám 30 samičích CD-1 myší nespecifikovaného věku podával dermálně jedenkrát týdně vinylkarbamát nebo epoxid vinylkarbamátu ve 200 µl acetonu obsahujícího navíc 15% DMSO v dávkách 11,5 µmol (1. a 2. týden), 5,7 µmol (3. a 4. týden) a 3,8 µmol (5.–32. týden). Kontrolním myším se podávalo pouze rozpouštědlo. Míra přežití nebyla uvedena. Po 32 týdnech od první expozice byla provedena histologická vyšetření. Incidence a průměrný počet papilomů na myš byly 4 % a  $0,03 \pm 0,2$  pro myši exponované vinylkarbamátem, 96 % a  $4,6 \pm 2,6$  pro myši exponované epoxidem vinylkarbamátu a 0 % a  $0,0 \pm 0,0$  pro myši kontrolní. Incidence a průměrný počet papilomů na myš byly výrazně vyšší u myši exponovaných epoxidem vinylkarbamátu než u myši exponovaných vinylkarbamátem i myši kontrolních. U 12 myši exponovaných epoxidem vinylkarbamátu byly objeveny epidermoidní karcinomy (u myši exponovaných vinylkarbamátem a myši kontrolních nebyly objeveny vůbec). 42 týdnů po první aplikaci vinylkarbamátu a epoxidu vinylkarbamátu byly u obou exponovaných skupin myši nalezeny maligní nádory (2 adenokarcinomy mléčné žlázy, 1 lymfoblastický lymfom, 1 hemangiom a 1 epidermoidní karcinom u myši exponovaných vinylkarbamátem a 18 epidermoidních karcinomů,

4 keratoakantomy, 3 fibrosarkomy a 1 thymom u myší exponovaných epoxidem vinylkarbamátu). Maligní nádor nebyl objeven u žádné z kontrolních myší (IARC monographs, 2010; PARK a kol., 1993).

Berenblum a kol. se kromě perorální expozice urethanem a jeho metabolity zabývali i expozicí intraperitoneální. Skupinám 18–30 samčím i samičím Swiss myším ve věku 2–3 měsíců se aplikovala injekce (intraperitoneálně) 10 mg ethylkarbamátu (0,11 mmol) nebo 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu (0,11 mmol) ve fyziologickém roztoku (objem nespécifikován), nebo 5 nebo 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu v destilované vodě (objem nespécifikován). 46 myší sloužilo jako kontrolní skupina. 4 dny po perorálním podání se všem skupinám dvakrát denně dermálně aplikoval 5% krotonový olej v tekutém parafínu (objem nespécifikován). Incidence a multiplicita kožních nádorů se hodnotila po 20 a 40 týdnech od poslední aplikace krotonového oleje a v případě plicních nádorů pouze po 40 týdnech. Míra přežití byla  $\geq 97\%$  po 20 týdnech a  $\geq 80\%$  po 40 týdnech od poslední aplikace krotonového oleje. Incidence a multiplicita ( $\pm$  směrodatná odchylka) kožních nádorů po 20 týdnech byla 47 % a  $0,6 \pm 0,1$  u myší exponovaných 10 mg ethylkarbamátu, 10 % a  $0,1 \pm 0,05$  u myší exponovaných 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu, 70 % a  $1,0 \pm 0,2$  u myší exponovaných 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu a 7 % a  $0,07 \pm 0,05$  u myší kontrolních. Statisticky významný nárůst incidence oproti kontrolním myším byl pozorován u myší exponovaných 10 mg ethylkarbamátu a 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu. V případě nádorové multiplicity byl statisticky významný nárůst u všech exponovaných skupin kromě skupin exponovaných 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu. Incidence a multiplicita kožních nádorů byla u myší exponovaných 10 mg ethylkarbamátu o poznání vyšší než u myší exponovaných 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu. Incidence a multiplicita ( $\pm$  směrodatná odchylka) kožních nádorů po 40 týdnech byla 60 % a  $0,9 \pm 0,2$  u myší exponovaných 10 mg ethylkarbamátu, 21 % a  $0,2 \pm 0,1$  u myší exponovaných 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu, 95 % a  $1,9 \pm 0,2$  pro myši exponované 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu, 44 % a  $0,25 \pm 0,05$  pro myši exponované 5 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu a 25 % a  $0,4 \pm 0,1$  pro myši kontrolní. Incidence a multiplicita kožních nádorů byly významně vyšší u myší exponovaných 10 mg ethylkarbamátu a 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu než u myší kontrolních a u skupin exponovaných 10 mg ethylkarbamátu významně vyšší než u skupin s 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu. Po 40 dnech od poslední aplikace krotonového oleje byla incidence a multiplicita plicních nádorů 88 % a  $2,8 \pm 0,5$  pro myši exponované 10 mg

ethylkarbamátu, 19 % a  $0,3 \pm 0,1$  pro myši exponované 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu, 6 % a  $0,8 \pm 0,2$  pro myši exponované 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu, 28 % a  $0,4 \pm 0,1$  pro myši exponované 5 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu a  $5 \% \pm 0,03$  pro myši kontrolní. Statisticky významný nárůst incidence oproti kontrolním myším byl pozorován u skupin exponovaných 10 mg ethylkarbamátu a 25 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu. V případě nádorové multiplicity se jednalo o všechny exponované skupiny. Incidence a multiplicita plicních nádorů byla u myši exponovaných 10 mg ethylkarbamátu o poznání vyšší než u myši exponovaných 11,8 mg *N*-hydroxyethylkarbamátu (IARC monographs, 2010; BERENBLUM a kol. 1959).

Dahl a kol. se kromě dermální expozice urethanem a jeho metabolity zabývali i expozicí intraperitoneální. Skupinám 40–42 samičím CD-1 myším ve věku 6–8 týdnů se na oholená záda dermálně aplikovalo 1,2 mg krotonového oleje ve 200  $\mu$ l destilovaného acetonu. Po 18–24 h se myším aplikovala intraperitoneální injekce 65  $\mu$ g/g těl. hm. ethylkarbamátu nebo vinylkarbamátu v 5  $\mu$ l/g těl. hm. 0,87% fyziologického roztoku nebo samotného rozpouštědla. Další skupině se aplikovaly 2 intraperitoneální injekce 1,0 mg/g těl. hm. ethylkarbamátu v 5  $\mu$ l/g těl. hm. 0,9% fyziologického roztoku v týdenním intervalu. Týden po poslední aplikaci se všem myším aplikovalo dermálně dvakrát v týdnu 900  $\mu$ g krotonového oleje ve 150  $\mu$ l acetonu. Experiment trval 28 týdnů a přežilo jej  $\geq 63$  % myši. Poté se provedla histologická vyšetření. Incidence a průměrný počet kožních papilomů na myš byly 12 % a 0,2 u myši exponovaných 65  $\mu$ g/g těl. hm. ethylkarbamátu, 65 % a 5,4 u myši exponovaných celkovým množstvím 2 mg/g těl. hm. ethylkarbamátu, 58 % a 3,9 u myši exponovaných 65  $\mu$ g/g těl. hm. vinylkarbamátu a 2 % a 0 u myši kontrolních. Incidence kožních papilomů u myši exponovaných 2 mg/g těl. hm. ethylkarbamátu a 65  $\mu$ g/g těl. hm. vinylkarbamátu byla statisticky o poznání vyšší než u myši kontrolních a o poznání vyšší u myši exponovaných 65  $\mu$ g/g těl. hm. vinylkarbamátu než u myši exponovaných ekvimolárním množstvím ethylkarbamátu. Incidence a průměrný počet plicních adenomů na myš byly 36 % a 0,6 u myši exponovaných 65  $\mu$ g/g těl. hm. ethylkarbamátu, 94 % a 28,3 u myši exponovaných celkovým množstvím 2 mg/g těl. hm. ethylkarbamátu, 93 % a 19,2 u myši exponovaných 65  $\mu$ g/g těl. hm. vinylkarbamátu a 10 % a 0,2 u myši kontrolních. Incidence plicních adenomů byla v každé z exponovaných skupin statisticky o poznání vyšší než u skupin kontrolních a o poznání vyšší u myši exponovaných 65  $\mu$ g/g těl. hm. vinylkarbamátu než u myši exponovaných

ekvimolárním množstvím ethylkarbamátu (IARC monographs, 2010; DAHL a kol., 1978).

Ve druhém experimentu použili Dahl a kol. skupiny 20 a 33 samičích A/Jax myší ve věku 6–8 týdnů, kterým aplikovali intraperitoneální injekci 32 nebo 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. ethylkarbamátu nebo vinylkarbamátu v 5  $\mu\text{l/g}$  těl. hm. 0,9% fyziologického roztoku nebo 500  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. ethylkarbamátu v 5  $\mu\text{l}$  0,9% fyziologického roztoku nebo rozpouštědlo samotné. Experiment trval 22 týdnů a přežilo jej  $\geq 95$  % myší s výjimkou skupiny exponované 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu, kde byla míra přežití 65 %. Následně se provedla histologická vyšetření. Incidence a průměrný počet plicních adenomů na myš byly 75 % a 0,8 u myší exponovaných 32  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. ethylkarbamátu, 85 % a 1,7 u myší exponovaných 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. ethylkarbamátu, 100 % a 42,3 u myší exponovaných 32  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu, 100 % a 19,1 u myší exponovaných 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu a 15 % a 0,2 u myší kontrolních. Incidence plicních adenomů byla v každé z exponovaných skupin statisticky o poznání vyšší než u skupin kontrolních a o poznání vyšší u myší exponovaných 32  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu než u myší exponovaných ekvimolárním množstvím ethylkarbamátu (IARC monographs, 2010; DAHL a kol., 1978).

Ve třetím experimentu se skupinám 20 nebo 30 samičích A/Jax myší ve věku 6–8 týdnů aplikovala intraperitoneální injekce 16, 32 nebo 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu v 5  $\mu\text{l/g}$  těl. hm. 0,9% fyziologického roztoku nebo rozpouštědlo samotné. Experiment trval 28 týdnů a přežilo jej  $\geq 85$  % myší s výjimkou skupiny exponované 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu, kde byla míra přežití 27 %. Následně se provedla histologická vyšetření. Incidence a průměrný počet plicních adenomů na myš byly 100 % a 20,0 u myší exponovaných 16  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu, 100 % a 35,2 u myší exponovaných 32  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu a 100 % a 21,4 u myší exponovaných 65  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu a 29 % a 0,4 u myší kontrolních. Incidence plicních adenomů byla v každé z exponovaných skupin statisticky o poznání vyšší než u skupin kontrolních (IARC monographs, 2010; DAHL a kol., 1978).

Ve čtvrtém experimentu se skupinám 9–30 samičích A/Jax myší ve věku 6–8 týdnů aplikovalo 5 intraperitoneálních injekcí 10  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. ethylkarbamátu, 1 intraperitoneální injekce 500  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. ethylkarbamátu, 10 intraperitoneálních injekcí 5  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu, 5 intraperitoneálních injekcí 10  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu anebo 1 intraperitoneální injekce 16  $\mu\text{g/g}$  těl. hm. vinylkarbamátu. Multiplicitní injekce se podávaly v týdenních intervalech. Jako rozpouštědlo se pro

všechny složky použilo 5 µl/g těl. hm. 0,9% fyziologického roztoku. Kontrolní skupině se aplikovalo 10 injekcí v týdenních intervalech samotného rozpouštědla. Experiment trval 20 týdnů a přežily jej všechny myši. Incidence a průměrný počet plicních adenomů na myš byly 75 % a 1,2 u myši exponovaných 5 injekcemi 10 µg/g těl. hm. ethylkarbamátu, 100 % a 19,3 u myši exponovaných 1 injekcí 500 µg/g těl. hm. ethylkarbamátu, 100 % a 25,2 u myši exponovaných 10 injekcemi 5 µg/g těl. hm. vinylkarbamátu, 100 % a 53,2 u myši exponovaných 5 injekcemi 10 µg/g těl. hm. vinylkarbamátu, 100 % a 25,2 u myši exponovaných 1 injekcí 16 µg/g těl. hm. vinylkarbamátu. Incidence plicních adenomů byla v každé z exponovaných skupin statisticky o poznání vyšší než u skupin kontrolních a o poznání vyšší u myši exponovaných 5 injekcemi 10 µg/g těl. hm. vinylkarbamátu než u myši exponovaných ekvimolárním množstvím ethylkarbamátu (IARC monographs, 2010; DAHL a kol., 1978).

### **3.1.5 Metody stanovení ethylkarbamátu v potravinách**

#### ***3.1.5.1 Stanovení ethylkarbamátu plynovou chromatografií***

Plynová chromatografie (dále v textu jen GC) je nejpřesnější a nejčastěji volená metoda sloužící ke stanovení ethylkarbamátu (a dalších těkavých složek) v potravinách (IARC monographs, 2010). Metoda slouží k separaci směsi látek v plynném skupenství na základě různé afinity k nepohyblivé (stacionární) fázi v chromatografické koloně. Důležité je, aby separované látky nebyly termolabilní a aby se nacházely alespoň částečně v plynné fázi při pracovní teplotě chromatografické kolony (LEHOTAY, 2009). Jako mobilní fáze slouží inertní plyn a jako stacionární fáze se používá viskózní inertní kapalina (TEKEL, MIKUŠ, 2005). Přístrojová technika v GC zahrnuje tlakovou nádobu, regulátor tlaku (např. jehlový ventil), dávkovací zařízení, chromatografickou kolonu, detektor a vyhodnocovací zařízení (zapisovač, integrátor, počítač). Z důvodu separace směsi látek ve vysokých teplotách musí být chromatografická kolona společně s dávkovacím zařízením a detektorem uloženy v termostatu. Mobilní plynná fáze prochází z tlakové nádoby čisticím zařízením do regulátoru tlaku, vzorek se dávkuje injekční jehlou nebo dávkovacím ventilem do proudu pohyblivé fáze a vstupuje do chromatografické kolony a odtud do detektoru (LEHOTAY, 2009).

Dávkování vzorku na kolonu je jednou z kritických operací, která významně ovlivňuje výsledek stanovení. Ideální dávkovač musí zajistit dokonalé zplynění vzorku,



jeho promísení s nosným plynem a nemá snižovat účinnost separace. Rozlišuje se několik typů dávkování, a sice s děličem toku, bez děliče toku, přímé dávkování do kolony a dávkování s programovaným odpařováním vzorku (TEKEL, MIKUŠ, 2005).

Kolony se v plynové chromatografii používají buď náplňové, nebo kapilární. Náplňové kolony tvoří kovová nebo skleněná do spirály stočená trubice o vnitřním průměru 2–4 mm a délce 2–6 m, která je naplněná částicemi stacionární fáze o průměru 30–350  $\mu\text{m}$ . Kapilární kolony bývají vyrobeny z křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50–350  $\mu\text{m}$ , které jsou navíc kvůli zvýšení odolnosti potažené vrstvou polymeru. Na vnitřní straně je nanese na netěkavá kapalina, která slouží jako vlastní stacionární fáze. Kapilární kolony jsou oproti náplňovým účinnější, nicméně jsou zatížitelné pouze malým množstvím dávkovaného vzorku (OPEKAR, 2002).

Detektory jsou citlivé snímače zaznamenávající v mobilní fázi přítomnost složky, která opouští chromatografickou kolonu (TEKEL, MIKUŠ, 2005). Pro stanovení ethylkarbamátu se běžně používá hmotnostní či tandemová hmotnostní detekce, plamenový ionizační detektor, detektor elektronového záchytu a termoionizační selektivní detektor. Pro kvantifikační účely lze použít široké spektrum interních standardů. K tomuto účelů slouží kromě samotného ethylkarbamátu také:

- ethylkarbamát- $\text{d}_5$
- [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-ethylkarbamát
- methylkarbamát
- propylkarbamát a isopropylkarbamát
- *tert*-butylkarbamát a *n*-butylkarbamát
- pyrazol
- *n*-oktanol (IARC monographs, 2010).

Použití hmotnostní detekce patří vůbec k nejrozšířenějším a nejcitlivějším metodám. Ionty s  $m/z$  89, 74 a 62 se používají k potvrzení totožnosti ethylkarbamátu. Iont s  $m/z$  62 je nejintenzivnější iont v hmotnostním spektru ethylkarbamátu, propylkarbamátu a butylkarbamátu, a je tedy pro karbamáty charakteristický. Poměr ethylkarbamát/propylkarbamát (nebo ethylkarbamát/butylkarbamát) je následně použit ke kvantifikaci. Pro hmotnostní detekci se ale preferuje použití izotopem značeného ( $^{13}\text{C}$  nebo  $^{15}\text{C}$ ) ethylkarbamátu kvůli vyšší přesnosti a citlivosti (WEBER, SHARYPOV, 2009).

Stanovení ethylkarbamátu pomocí GC často komplikují matricové efekty, kdy množství sledovaného analytu nezávisí pouze na jeho koncentraci, ale také na

přítomnosti dalších koextrahovaných látek (YE a kol., 2012). I když žádné oficiální limitní hodnoty matricového efektu neexistují, obecně se považuje za přijatelné, když míra zvýšení či snížení koncentrace sledovaného analytu nepřesahuje 15 % (LEÇA a kol., 2014). Tento problém se však netýká pouze karbamátů, ale i dalších látek, zejména pak organofosfátů, hydroxysloučenin, aminosloučenin, imidazolů a benzimidazolů a derivátů močoviny (HÚŠKOVÁ a kol., 2007).

Před vlastní analýzou je ovšem nutné vyextrahovat požadovaný ethylkarbamát. Nejčastěji se používá extrakce kapaliny kapalinou a extrakce pevnou fází. Jako rozpouštědlo se nejčastěji volí dichlormethan. Potraviny jako chléb se homogenizují s vodou, centrifugují a vodná vrstva se oddělí, přičemž následuje extrakce kapalinou nebo pevnou fází (STADLER, LINEBACK, 2009). Zajímavý příklad použití techniky extrakce pevnou fází publikovali ve svých studiích Lim a Lee. Vzorok se smíchaly s nasyceným roztokem chloridu sodného a následně se sorbentem (oxid křemičitý, obchodní název Celite 545). Ethylkarbamát se ze směsi vyextrahoval dichlormethanem, zahustil se ve vakuové odparce a poté v proudu dusíku na 1 ml a následně analyzoval plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LIM, LEE, 2011; LEE, 2013).

Mikroextrakce pevnou fází se běžně používá jako jedna z extrakčních metod při stanovení obsahu různých látek v alkoholických nápojích, např. vínech (MIKULÍKOVÁ a kol., 2008), avšak pro stanovení ethylkarbamátu se používá minimálně. Tuto metodu použili např. Leça a kol., a sice u fortifikovaných vín. Autoři vyzdvihují výhody této metody ve srovnání s extrakcí pevnou fází, protože při použití menšího množství vzorku a rozpouštědla se minimalizuje negativní dopad analýzy na životní prostředí a roste citlivost analýzy samotné. Mikroextrakce navíc umožňuje přímé vstřikování vzorku do samotného chromatografu. Nejprve byl sorbent promyt a kondicionován methanolem, dichlormethanem a čistou vodou a poté se nechal sorbentem protékat vzorek. Následovalo sušení, po kterém byl ethylkarbamát eluován dichlormethanem a poté injekčně vpraven do portu plynového chromatografu s hmotnostní detekcí. Výsledky ukázaly vysokou přesnost a citlivost navíc spojenou s poměrně nízkou časovou náročností (LEÇA a kol., 2014). Techniku mikroextrakce tuhou fází použili i Liu a Xu při stanovení ethylkarbamátu v saké. I zde autoři vyzdvihují vysokou přesnost, citlivost a zejména nízkou časovou náročnost, kdy celková doba analýzy jednoho vzorku zabrala ve srovnání s konvenční extrakcí pevnou fází polovinu času (LIU, XU, 2012). Vzhledem k přesvědčivým výsledkům se počítá

s využitím této metody do budoucna při stanovení ethylkarbamátu v potravinách (LEÇA a kol., 2014).

Jednodušší je situace u lihovin, kde stačí provést extrakci vzorku dichlormethanem s následným stanovením pomocí GC (IARC monographs, 2010). Pro stanovení ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce, kde se navíc vyskytují vysoké koncentrace ethylkarbamátu ( $> 200 \mu\text{g/l}$ ), může být použita jednodušší metoda bez složitých extrakčních a koncentračních kroků. Vzorky se upraví na výsledný obsah alkoholu 40 % naředěním čistou vodou nebo přidávkem čistého ethanolu, který nesmí obsahovat žádné, byť stopové, množství ethylkarbamátu. Jako interní standard slouží *n*-propylkarbamát a vlastní analýza se provede pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Tuto metodu použilo již několik autorů a ve Švýcarsku byla přijata jako oficiální metoda stanovení ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce (HESFORD, SCHNEIDER, 2001; BRUNO a kol., 2007, WEBER, SHARYPOV, 2009).

### ***3.5.1.2 Stanovení ethylkarbamátu kapalinovou chromatografií***

Kapalinová chromatografie je separační metoda, která používá kapalinu jako mobilní fázi a stacionární fázi tvoří zpravidla modifikované silikagelové sorbenty. Existují 3 varianty kapalinové chromatografie, a sice nízkotlaká kolonová chromatografie, planární chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (dále v textu jen HPLC), která má v analytické chemii dominantní postavení (OPEKAR, 2002) a která se jako jediná používá ke stanovení ethylkarbamátu v potravinách (IARC monographs, 2010).

V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon, které jsou naplněny stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Kolony se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a díky tomu i vysokým hydrodynamickým odporem. Přetlak (v řádu jednotek až několik desítek MPa) zajistí dostatečný průtok mobilní fáze.

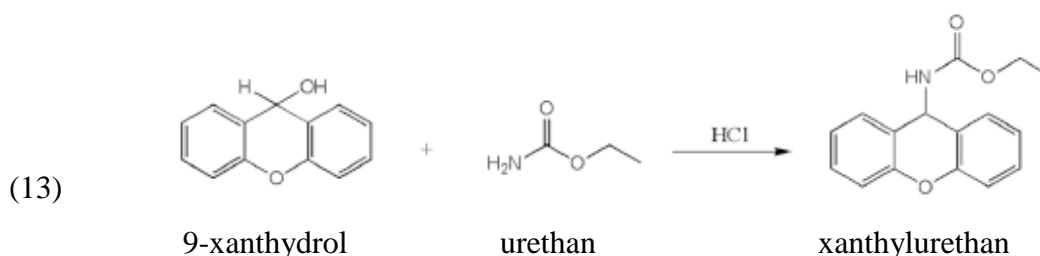
Tok mobilní fáze zajišťuje vysokotlaké čerpadlo, přičemž v HPLC se používají 2 typy čerpadel. První typ, tzv. lineární čerpadlo, umožňuje bezpulsní provoz, nicméně neumožňuje změnu složení mobilní fáze během analýzy. Tento nedostatek může eliminovat reciproční uspořádání čerpadla.

Dávkování vzorku je zvláštním problémem v HPLC. Do proudu mobilní fáze, která je protlačována kolonou pod vysokým tlakem, musí být nastříknut vzorek o přesně definovaném objemu a nesmí dojít k výraznějším fluktuacím průtokové rychlosti mobilní fáze. Jako dávkovací zařízení se v HPLC používá šesticečný ventil s dávkovací smyčkou.

U kolon používaných v HPLC je důležité, aby vydržely působení vysokého tlaku mobilní fáze. Většinou bývají vyrobeny z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru 2–5 mm a délce 30–300 mm. Kolony jsou zevnitř naplněny stacionární fází, kterou bývá oxid křemičitý o vhodné zrnitosti, který je navíc chemicky modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin, které určují výslednou polaritu stacionární fáze.

V kapalinové chromatografii se používají jiné typy detektorů než v chromatografii plynné. Nejrozšířenější je fotometrický detektor, který umožňuje sledovat absorpenci látek vystupujících z chromatografické kolony. Dále je možno použít detektor s diodovým polem umožňující okamžitý záznam celého spektra ve zvolené oblasti vlnových délek. Pro látky, které vykazují fluorescenci, je žádoucí použití fluorimetrického detektoru. Čím dál častěji se používá i hmotnostní detektor umožňující přímou identifikaci separovaných látek na základě získaných hmotnostních spekter. Možné je i použití detektorů elektrochemických (OPEKAR, 2002).

Herbert a kol. byli první, kdo poprvé použili HPLC v kombinaci s fluorimetrickým detektorem (HPLC-FLD) pro detekci ethylkarbamátu v potravinách, a to až v roce 2002 u vín, fortifikovaných vín a vinných brandy. Metoda je založena na derivatizační reakci ethylkarbamátu s 9-xanthidolem v kyselém prostředí za vzniku fluorescentního xanthylurethanu detekovatelného fluorimetrickým detektorem. Reakci znázorňuje rovnice 13.



V praxi se provedla derivatizační reakce smícháním 500  $\mu\text{l}$  zředěného vzorku se 100  $\mu\text{l}$  roztoku 9-xanthidolu. Poté se přidalo 50  $\mu\text{l}$  1,5 mol HCl. Reakce poté proběhla během 5 min. ve tmě a hned na to se nastříklo 15  $\mu\text{l}$  výsledného produktu do

chromatografického systému. Všechny vzorky se před začátkem experimentu upravily (naředěním vodou nebo přidávkem roztoku ethanolu) na výsledný obsah alkoholu 20 %. U této metody není nutné provádět extrakční a koncentrační kroky (HERBERT a kol., 2002).

### ***3.5.1.3 Srovnání plynové a kapalinové chromatografie při stanovení ethylkarbamátu***

Oficiální metoda stanovení ethylkarbamátu v alkoholických nápojích a sojové omáče podle Evropské komise a Asociace analytických chemiků spočívá v použití metody extrakce pevnou fází, zkoncentrováním v rotační odparce a následnou kvantifikací pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) (LIU a kol., 2012).

Výhodou použití HPLC při stanovení urethanu je především její nižší časová náročnost. Abreu a kol. se ve své studii zabývali srovnáním plynové a kapalinové chromatografie u stolních vín, fortifikovaných vín, destilátů a vinných brandy a uvádějí, že zatímco analýza jednoho vzorku GC-MS (včetně extrakčních a prekoncentračních kroků) trvá přibližně 3 h, použití HPLC zkrátí čas přibližně na 40 min. na vzorek, a to vzhledem k absenci nutnosti extrakce a prekoncentrace. Použití kapalinové chromatografie se tedy jeví jako zajímavá možnost pro laboratoře, kde se musí zanalyzovat velké množství vzorků v co nejkratším čase. Další výhodou použití HPLC oproti GC-MS je i nižší cena.

Stanovení kapalinovou chromatografií není tak maximálně přesné jako při použití plynové chromatografie (výsledky vykazovaly vyšší interlaboratorní variabilitu). Ta se vzhledem k náročným extrakčním a prekoncentračním krokům očekávala vyšší u plynové chromatografie, vědci ale vyšší rozdíly u kapalinové chromatografie připisují derivatizační reakci. Nicméně rozdíly v přesnosti jsou poměrně malé a dají se považovat za srovnatelné. Kromě vyšší přesnosti je další výhodou plynové chromatografie širší spektrum použití. Plynová chromatografie se používá pro stanovení ethylkarbamátu ve všech rizikových druzích potravin, kapalinová pouze u alkoholických nápojů (ABREU a kol., 2005).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Seznam chemikálií, laboratorních pomůcek a přístrojů

#### 4.1.1 Chemikálie

- destilovaná voda
- urethan, dodavatel Sigma-Aldrich, čistota  $\geq 99\%$
- kyselina chlorovodíková 35%, dodavatel Lach-Ner, s.r.o
- ethanol, dodavatel Sigma-Aldrich, čistota  $\geq 99,8\%$
- dichlormethan, p.a., dodavatel mikroCHEM
- vodní sklo (vodní roztok křemičitanu sodného, koncentrace  $< 40\%$ ), výrobce Kittfort Praha s.r.o

#### 4.2.2 Laboratorní pomůcky a přístroje

- plynový chromatograf Fisons 8000 series s plamenovým ionizačním detektorem a autosamplermem, který je znázorněn na obr. 1



Obrázek 1 Plynový chromatograf Fisons 8000 series

- analytické váhy KERN ABJ, výrobce KERN & Sohn GmbH, Germany, citlivost 0,0001 g
- homogenizér Heidolph DiAx 900
- zařízení pro extrakci na pevné fázi od firmy Labicom s.r.o.

- centrifuga Universal 32 R, výrobce Hettich GmbH & Co.KG
- rotační vakuová odparka IKA, výrobce IKA® WERKE GmbH & Co. KG, Germany
- sušárna Memmert, výrobce Memmert GmbH & Co. KG
- vialky o objemu 1,8 ml
- mikropipeta 100–1000 ml
- běžné laboratorní sklo a další pomůcky jako kádinky o objemu 50–500 ml, dělicí nálevka 100 ml s plastovou zátkou a teflonovým kohoutem, odsávací baňka, nálevka, odměrné baňky o objemech 25, 100 a 250 ml, skleněná tyčinka, odměrné válce a objemech 10 a 100 ml, lodičky na vážení, filtrační papír, stojan, filtrační kruh

## **4.2 Příprava standardů a dalších látek potřebných k analýze**

### **4.2.1 Příprava standardu ethylkarbamátu**

Do odměrné baňky o objemu 25 ml se navážilo 0,0244 g pevného ethylkarbamátu a obsah baňky se doplnil dichlormethanem po rysku. Tím bylo dosaženo koncentrace urethanu 0,976 mg/ml. Poté se 1 ml roztoku standardu ethylkarbamátu napipetoval do vialky o objemu 1,8 ml a vložil se do plynového chromatografu k analýze. Následně se vzorek standardu pro kontrolu dvakrát naředil a opět analyzoval pomocí GC-FID.

### **4.2.2 Příprava standardu ethylkarbamátu pro měření výtěžnosti pevných vzorků potravin**

Do odměrné baňky o objemu 25 ml se navážilo 0,0257 g pevného ethylkarbamátu a obsah baňky se doplnil destilovanou vodou po rysku. Tím bylo dosaženo koncentrace urethanu 1,028 mg/ml. Poté se 1 ml roztoku standardu pipetoval do kolonky s 2 g sorbentu (oxid křemičitý) připojené na zařízení pro extrakci na pevné fázi, která se ještě před začátkem filtrace aktivovala propláchnutím 4 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové a 2 ml destilované vody. Poté proběhla filtrace za sníženého tlaku s následným propláchnutím kolonky 3 ml destilované vody. Výsledný filtrát jímaný v kádince se zlikvidoval. Následně se kolonka propláchnula 5 ml dichlormethanu. Výsledný filtrát se jímal v kádince, zahustil se na vakuové odparce na 1 ml a analyzoval pomocí GC-FID. Celý proces se provedl dvakrát.

### **4.2.3 Příprava standardu ethylkarbamátu pro měření výtěžnosti kapalných vzorků**

Do odměrné baňky o objemu 100 ml se navážilo 0,1078 g pevného ethylkarbamátu a obsah baňky se doplnil přibližně 50% roztokem ethanolu (připraveným smícháním 60 ml 100% ethanolu a 60 ml destilované vody) po rysku. Tím bylo dosaženo koncentrace urethanu 1,078 mg/ml. Poté se do dělicí nálevky pipetovalo 20 ml roztoku standardu a přidalo se 10 ml dichlormethanu. Obsah dělicí nálevky se důkladně protřepal a následně nechal v klidu odstát, až došlo k vytvoření 2 vrstev. Poté se spodní vrstva se vypustila do kádinky. Následně se do dělicí nálevky přidalo opět 10 ml dichlormethanu a extrakce se zopakovala. Obsah kádinky se následně zahustil na vakuové odparce na 1 ml a analyzoval pomocí GC-FID. Celý proces se provedl dvakrát.

### **4.2.4 Příprava sorbentu**

V kádince se smíchalo vodní sklo s destilovanou vodou (1:1). Totéž se provedlo s 35% kyselinou chlorovodíkovou. Oba roztoky se poté smíchaly za vzniku hustého gelu. Vzniklý gel se poté zfiltraval za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce a následně vysušil v sušárně při 105 °C po dobu 12 h. Vzniklé krystalky se následně podrtily v třecí misce na jemný prášek, který se přesypal do skleněné láhve a uchoval k analýze.

### **4.2.5 Příprava 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové**

Do odměrné baňky o objemu 250 ml se nalilo 2,2 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a obsah baňky se doplnil destilovanou vodou po rysku.

## **4.3 Vzorky pro analýzu**

### **4.3.1 Seznam vzorků**

K analýze bylo celkem použito 15 vzorků (2 vzorky chlebů, 2 vzorky sýrů, 2 vzorky jogurtů a 9 vzorků alkoholických nápojů). Přehled vzorků znázorňuje následující seznam:

- celozrnný žitný chléb Rivercote, krájený;
- pšenično-žitný chléb konzumní s kmínem Penam, krájený;
- Eidam od firmy Bluedino, 30 % tuku v sušině, bloček;
- Gouda od firmy Bluedino, 45 % tuku v sušině, bloček;
- Pilos jogurt bílý, 3,7%;
- Florian meruňka, 8%;



- Hanácká vodka, obsah alkoholu 37,5 % obj., výrobce Granette&Starorežná Distilleries, a.s., přibližné stáří 2 roky;
- Boris vodka, obsah alkoholu 37,5 % obj., výrobce Granette, a.s., přibližné stáří 4 roky;
- Gin, obsah alkoholu 37,5 % obj., výrobce Dynybl s.r.o., přibližné stáří 1,5 roku;
- Slivovice domácí výroby 1, obsah alkoholu neuveden, přibližné stáří 4 roky;
- Stará myslivecká, výrobce Granette&Starorežná Distilleries, a.s., obsah alkoholu 38 %, přibližné stáří 1 rok;
- Meruňka (meruňkový destilát), výrobce KB Likér, obsah alkoholu 35 %, přibližné stáří 1 rok;
- Gieroy vodka, obsah alkoholu 37,5 %, výrobce neuveden, přibližné stáří 1 rok;
- Slivovice domácí výroby 2, obsah alkoholu neuveden, přibližné stáří 3,5 roku;
- Slivovice domácí výroby 3, obsah alkoholu neuveden, přibližné stáří 3 roky.

#### **4.3.2 Prekoncentrace, izolace a analýza vzorků**

2 g vzorků chlebů se homogenizovaly s 9 ml destilované vody a centrifugovaly při 4000/min. otáčkách po dobu 10 min. Po skončení centrifugace se supernatant slil do kádinky a následně se pomalu přelával do kolonky s 2 g sorbentu (oxid křemičitý) připojené na zařízení pro extrakci na pevné fázi, která se ještě před začátkem filtrace aktivovala propláchnutím 4 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové a 2 ml destilované vody. Poté proběhla filtrace za sníženého tlaku s následným propláchnutím kolonky 3 ml destilované vody. Výsledný filtrát jímáný v kádince se zlikvidoval. Následně se kolonka propláchl 5 ml dichlormethanu. Výsledný filtrát se jímá v kádince, zahustil se na vakuové odparce na 1 ml a analyzoval pomocí GC-FID. Celý proces se provedl dvakrát.

2 g vzorků sýrů se homogenizovaly s 9 ml destilované vody a centrifugovaly při 4000 otáčkách/min. po dobu 10 min. Po skončení centrifugace se supernatant slil do kádinky a následně se pomalu přelával do kolonky s 2 g sorbentu (oxid křemičitý) připojené na zařízení pro extrakci na pevné fázi, která se ještě před začátkem filtrace aktivovala propláchnutím 4 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové a 2 ml destilované vody. Poté proběhla filtrace za sníženého tlaku s následným propláchnutím kolonky 3 ml destilované vody. Výsledný filtrát jímáný v kádince se zlikvidoval. Následně se kolonka propláchl 5 ml dichlormethanu. Výsledný filtrát se jímá v kádince, zahustil se na vakuové odparce na 1 ml a analyzoval pomocí GC-FID. Celý proces se provedl dvakrát.

2 g vzorků jogurtů se homogenizovaly s 6 ml destilované vody a centrifugovaly při 4000 otáčkách/min. po dobu 10 min. Vzorky jogurtu Florian bylo nutné po skončení centrifugace ještě přefiltrovat přes skládaný filtrační papír do kádinky. Poté se supernatant slil do kádinky a následně se pomalu přelával do kolonky s 2 g sorbentu (oxid křemičitý) připojené na zařízení pro extrakci na pevné fázi, která se ještě před začátkem filtrace aktivovala propláchnutím 4 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové a 2 ml destilované vody. Poté proběhla filtrace za sníženého tlaku s následným propláchnutím kolonky 3 ml destilované vody. Výsledný filtrát jímáný v kádince se zlikvidoval. Následně se kolonka propláchla 5 ml dichlormethanu. Výsledný filtrát se jímá v kádince, zahustil se na vakuové odparce na 1 ml a analyzoval pomocí GC-FID. Celý proces se provedl dvakrát.

20 ml vzorků destilátů se pipetovalo do dělicí nálevky a přidalo se 10 ml dichlormethanu. Obsah dělicí nálevky se důkladně protřepal a následně nechal v klidu odstát, až došlo k vytvoření 2 vrstev. Poté se spodní vrstva se vypustila do kádinky. Následně se do dělicí nálevky přidalo opět 10 ml dichlormethanu a extrakce se zopakovala. Obsah kádinky se následně zahustil na vakuové odparce na 1 ml a analyzoval pomocí GC-FID. Celý proces se provedl dvakrát.

#### **4.3.3 Podmínky analýzy**

Pro vlastní analýzu byla použita kapilární kolona DB-23 o délce 60 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce 0,25  $\mu\text{m}$ . Jako nosný plyn byl použit dusík o konstantním průtoku kolnou 1,23 ml/min. Jako pomocné plyny stlačený vzduch a vodík. Teplotní program byl následovný. Kolona se nechala vytemperovat na 75 °C po dobu 1 min. Poté následoval teplotní gradient 30 °C/min do 120 °C a následně byla kolona vyhřívána rychlostí 10 °C/min do teploty 240 °C, při které se kolona ponechala 2 min. Nástřik vzorku byl proveden s děličem toku. K nástřiku o objemu 1  $\mu\text{l}$  byl použit injektor vyhříváný na teplotu 250 °C. Teplota detektoru byla 260 °C. Vstupní tlak na kolonu byl 200 kPa. Vzorek byl v rámci 1 vialky analyzován dvakrát a vypočtený aritmetický průměr z každé dvojice byl zahrnut do výsledků k následnému statistickému zpracování.

#### **4.3.4 Zpracování a vyhodnocení naměřených dat**

Všechna naměřená data byla zpracována a vyhodnocena pomocí softwaru Microsoft Office Excel 2007 a Statistica 12 od firmy StatSoft CR s.r.o. Analýza každého vzorku

byla provedena dvakrát a z této dvojice výsledků se poté vypočetl aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Pro porovnání koncentrací ethylkarbamátu mezi jednotlivými vzorky navzájem byla použita jednofaktorová ANOVA s následným Tukeyovým testem. Pro testování normality byl použit Shapiro-Wilkův test a pro porovnání 2 skupin hodnot Mann-Whitneyův U test. Všechny statistické testy byly provedeny na hladině významnosti 5 %. U vzorků, kde nebyl ethylkarbamát detekován, byly pro statistickou analýzu použity hodnoty 0 mg/l, popř. 0 mg/kg.

## 5 VÝSLEDKY PRÁCE

### 5.1 Výsledky naměřených hodnot

Výsledky účinností obou extrakčních metod jsou znázorněny v tabulkách 2 a 3. Pomocí těchto hodnot byly přepočteny naměřené hodnoty jednotlivých vzorků na 100% obsah v konkrétním analyzovaném vzorku. Účinnost extrakce kapalinou byla vyšší o 3,65 % ve srovnání s účinností extrakce pevnou fází.

**Tabulka 2** *Výtěžnost extrakce pevnou fází*

	<b>původní množství (mg)</b>	<b>výtěžek (mg)</b>	<b>výtěžnost (%)</b>	<b>průměr (%)</b>	<b>sm. odch. (%)</b>
<b>standard 1</b>	1,03	0,76	73,93	<b>71,50</b>	<b>2,43</b>
<b>standard 2</b>	1,03	0,71	69,07		

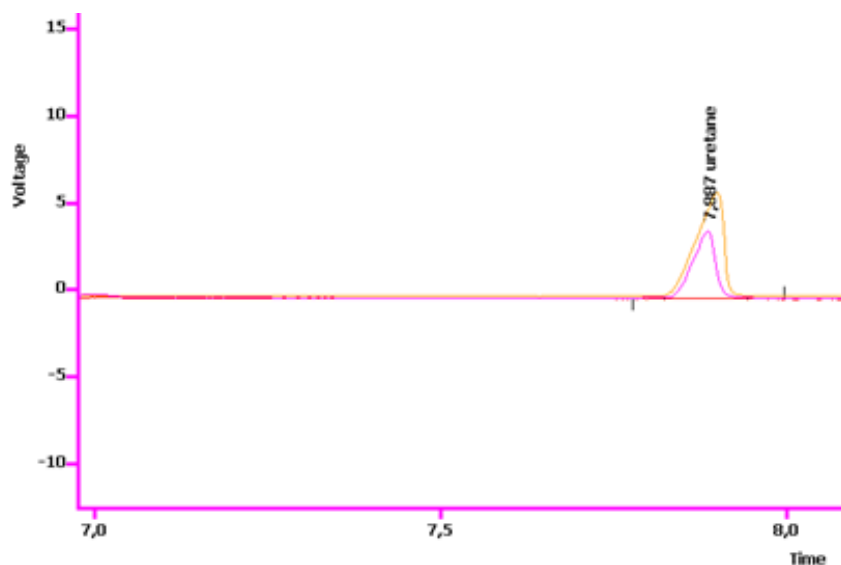
sm. odch. = směrodatná odchylka

**Tabulka 3** *Výtěžnost extrakce kapalinou*

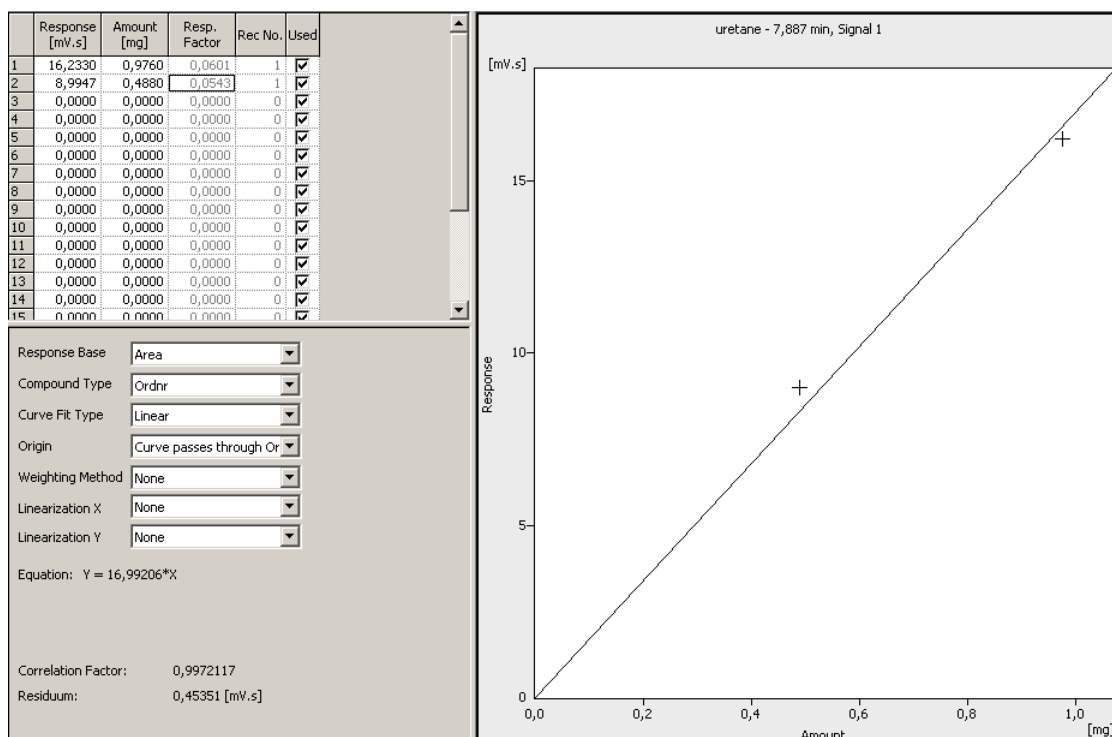
	<b>původní množství (mg)</b>	<b>výtěžek (mg)</b>	<b>výtěžnost (%)</b>	<b>průměr (%)</b>	<b>sm. odch. (%)</b>
<b>standard 1</b>	21,56	15,61	72,10	<b>75,15</b>	<b>3,05</b>
<b>standard 2</b>	21,56	16,86	78,20		

sm. odch. = směrodatná odchylka

Na obrázku 2 je uveden chromatogram standardu ethylkarbamátu v retenčním čase 7,887 min. a na obrázku 3 kalibrační křivka použitá pro vyhodnocení vzorků (kvantifikaci).



**Obrázek 2** Chromatogram standardu ethylkarbamátu



**Obrázek 3** Kalibrační křivka standardu ethylkarbamátu

Rovnice regrese má tvar  $y = 16,99206x$  a koeficient determinace byl stanoven na hodnotu 0,9972117.

Samotné výsledky jsou pak znázorněny číselně v tabulce 4 a graficky na obrázku 4 (všechny vzorky) a obrázku 5 (pozitivní vzorky). U vzorků alkoholických nápojů je výsledek uveden v mg/l, u vzorků chlebů, jogurtů a sýru v mg/kg dané potraviny.

Rozdíl mezi koncentracemi ethylkarbamátu všech pozitivních vzorků byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ; jednofaktorová ANOVA s následným Tukeyovým testem).

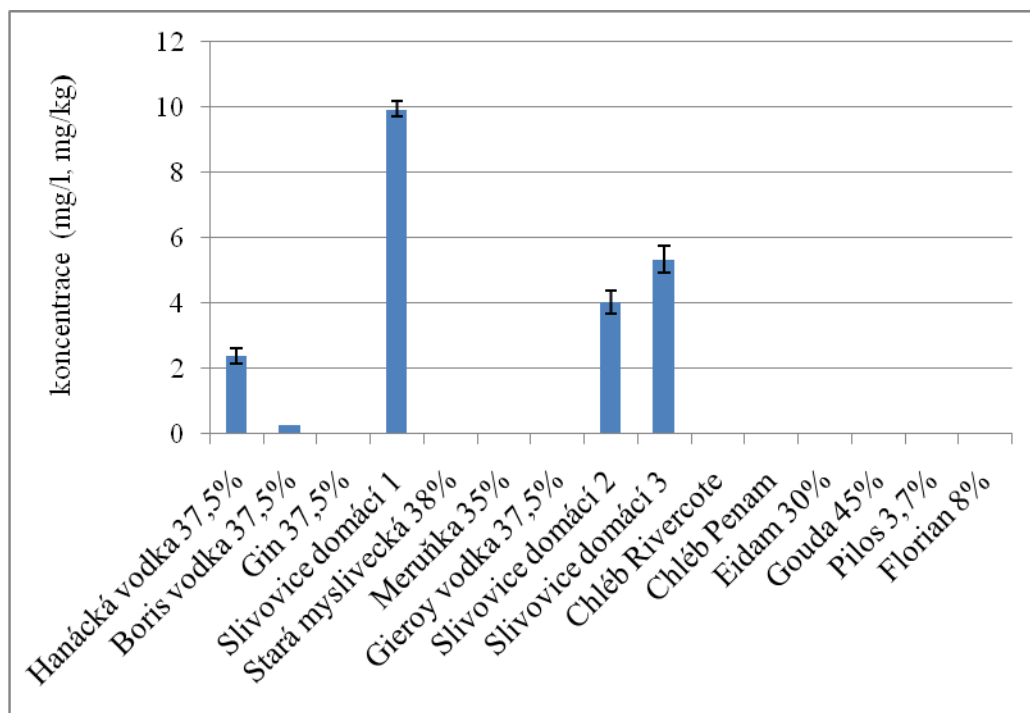
**Tabulka 4** Koncentrace ethylkarbamátu ve sledovaných vzorcích potravin

vzorek	koncentrace (mg/l, mg/kg)			sm. odch.
	1. měření	2. měření	průměr	
Hanácká vodka 37,5%	2,63	2,14	<b>2,38</b>	<b>0,25</b>
Boris vodka 37,5%	0,25	0,27	<b>0,26</b>	<b>0,01</b>
Gin 37,5%	N	N	N	N
Slivovice domácí 1	9,69	10,19	<b>9,94</b>	<b>0,25</b>
Stará myslivecká 38%	N	N	N	N
Meruňka 35%	N	N	N	N
Gieroy vodka 37,5%	N	N	N	N
Slivovice domácí 2	3,67	4,38	<b>4,03</b>	<b>0,36</b>
Slivovice domácí 3	4,93	5,75	<b>5,34</b>	<b>0,41</b>
Chléb Rivercote	N	N	N	N
Chléb Penam	N	N	N	N
Eidam 30%	N	N	N	N
Gouda 45%	N	N	N	N
Pilos 3,7%	N	N	N	N
Florian 8%	N	N	N	N

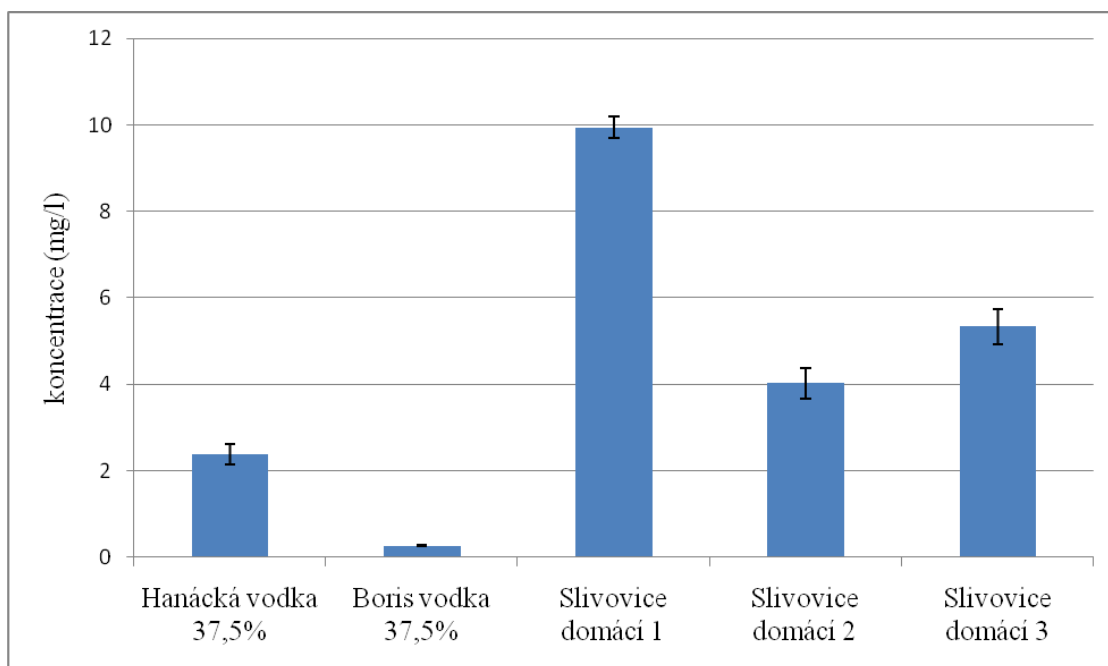
sm. odch. = směrodatná odchylka

N = nedetekován

Grafické znázornění rozdílů mezi jednotlivými vzorky potravin včetně chybových úseček znázorňují obrázky 4 a 5.

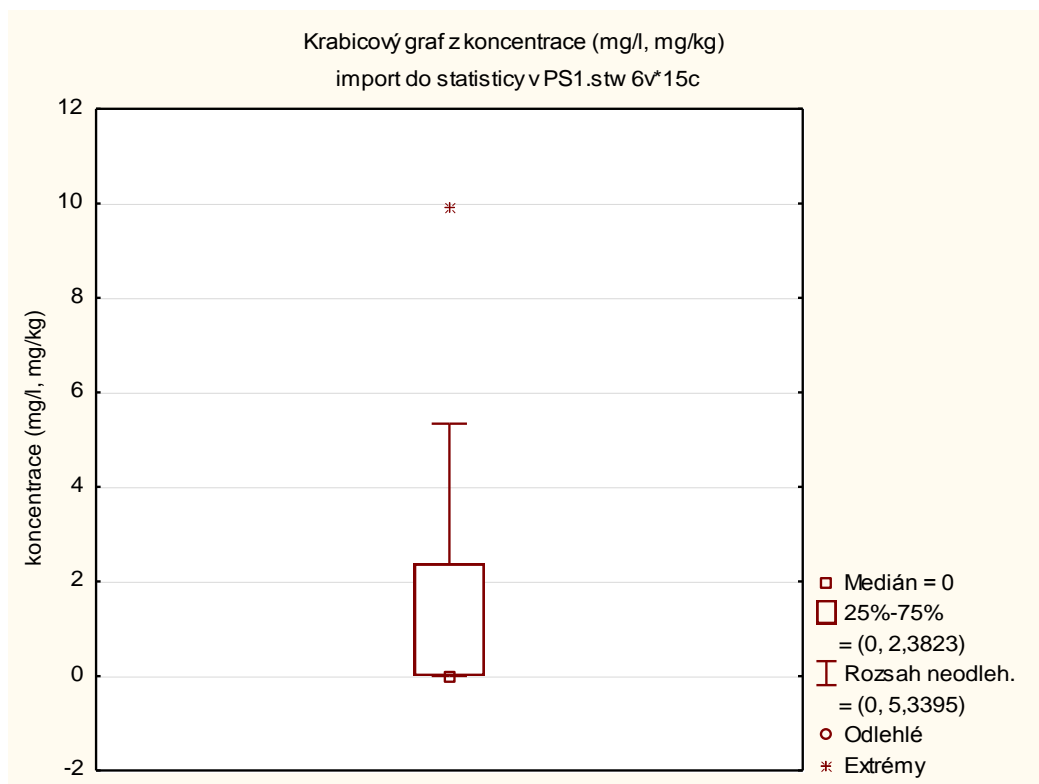


**Obrázek 4** Grafické srovnání koncentrace ethylkarbamátu u všech vzorků



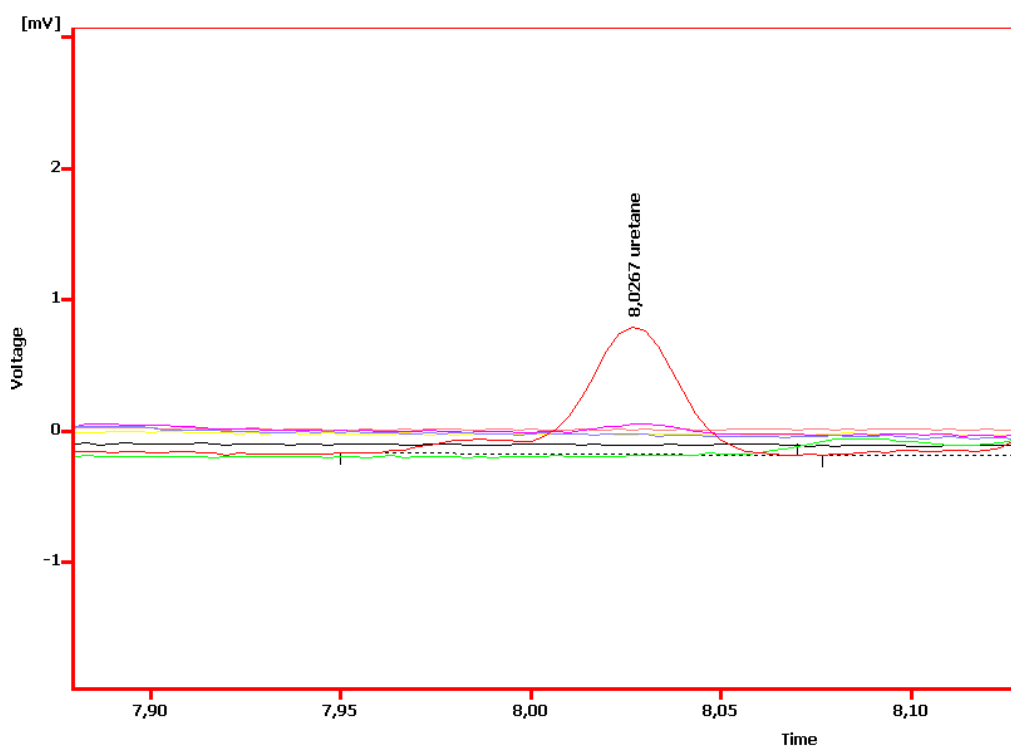
**Obrázek 5** Grafické srovnání koncentrace ethylkarbamátu u pozitivních vzorků

Obrázek 6 znázorňuje rozmezí koncentrací ethylkarbamátu od nedetekovaných vzorků až po vzorek slivovice domácí 1 s nejvyšší urethanovou koncentrací o hodnotě  $(9,94 \pm 0,25)$  mg/l.



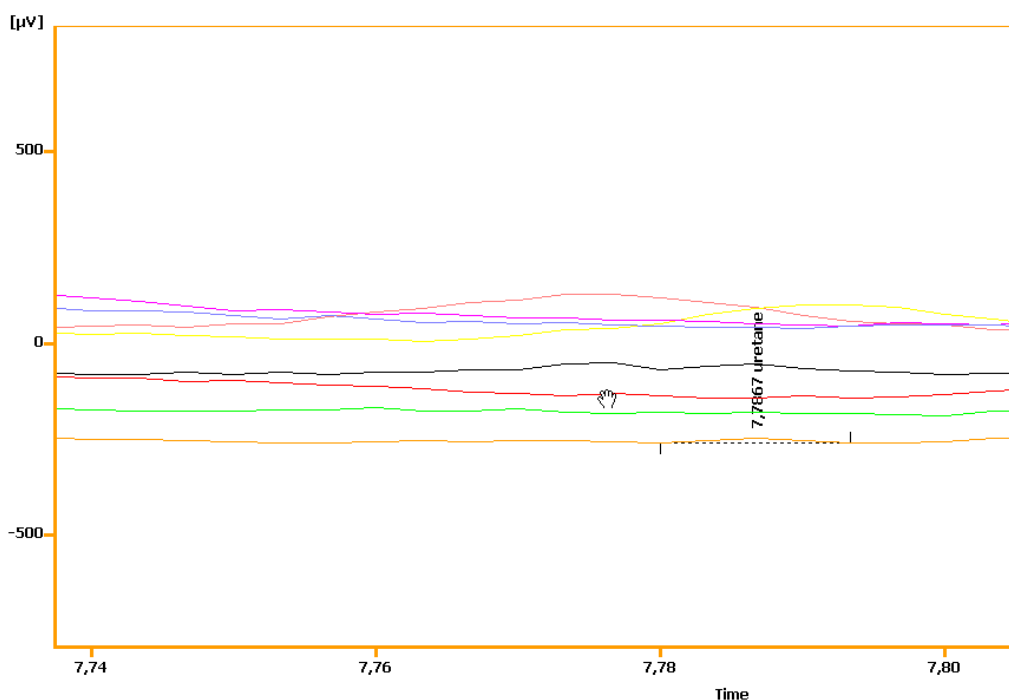
**Obrázek 6** Rozmezí hodnot koncentrace ethylkarbamátu

Následné obrázky 7 a 8 znázorňují chromatogramy s píkem detekované látky a látky nedetekované.



**Obrázek 7** Příklad chromatogramu ethylkarbamátu u pozitivního vzorku





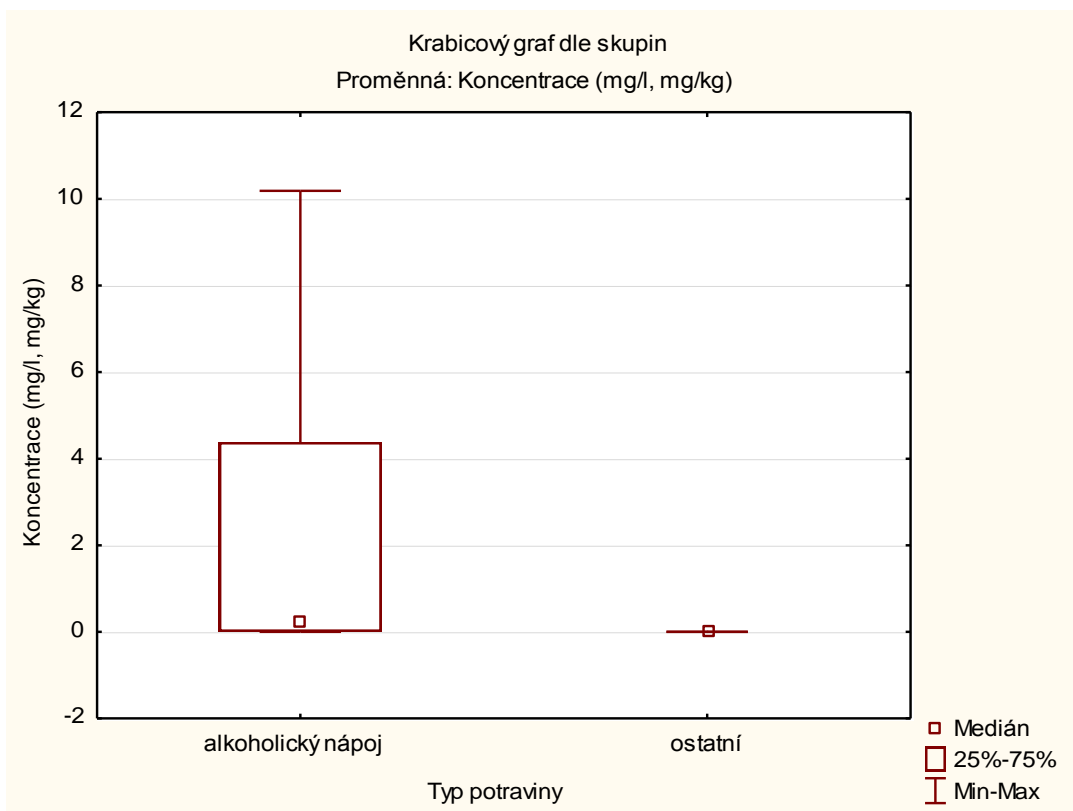
**Obrázek 8** Příklad chromatogramu ethylkarbamátu u negativního vzorku

Obrázek 7 znázorňuje jasný pík zobrazující hledaný ethylkarbamát (konkrétně se jedná o vzorek slivovice domácí 3). Na obrázku 8 je pouze určitý náznak píku, který je na úrovni šumu, a hledaný analyt tedy nebylo možné detekovat (zde vzorek celozrnného chleba Rivercote).

## 5.2 Statistické srovnání vybraných skupin

### 5.2.1 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v alkoholických nápojích a v ostatních potravinách

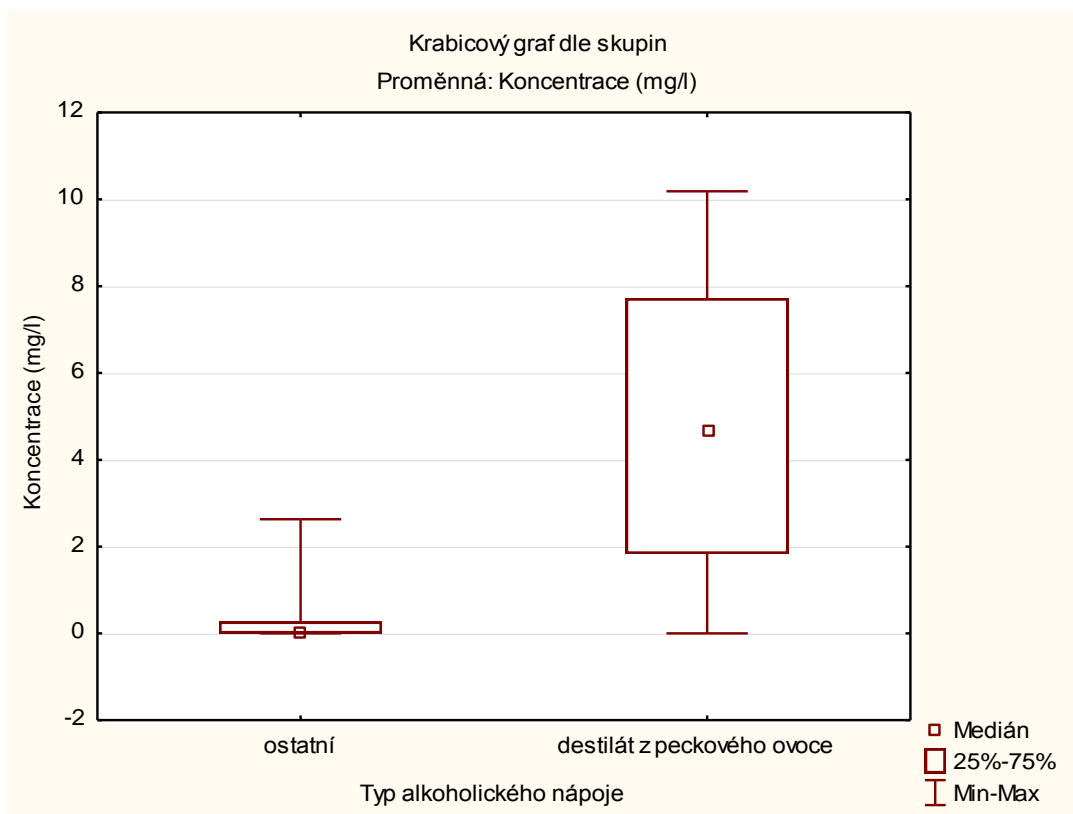
Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi alkoholickými nápoji a ostatními potravinami zahrnující chleby, jogurty a sýry znázorňuje obrázek 9. Rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitneyův U test).



**Obrázek 9** Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v alkoholických nápojích a ostatních potravinách

### 5.2.2 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce a v ostatních alkoholických nápojích

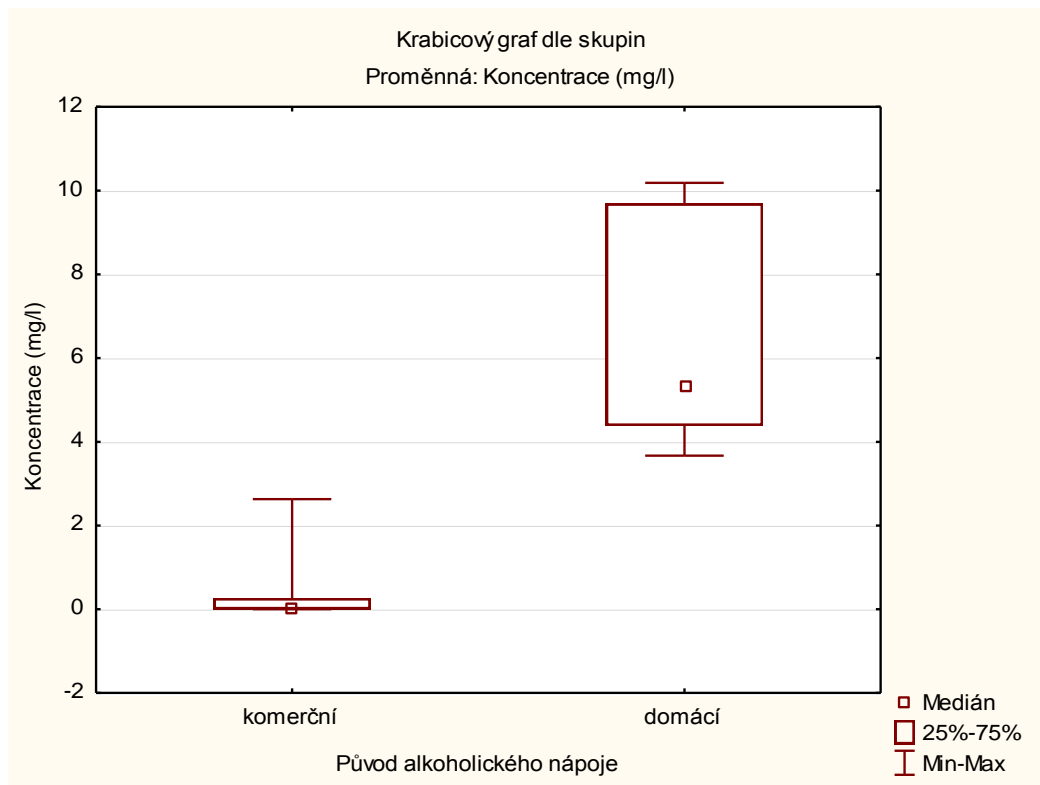
Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi destiláty z peckového ovoce a ostatními alkoholickými nápoji znázorňuje obrázek 10. Rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitneyův U test).



**Obrázek 10** Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce a ostatních alkoholických nápojích

### 5.2.3 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v domácích a komerčně dostupných alkoholických nápojích

Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi alkoholickými nápoji domácí výroby a komerčně dostupnými alkoholickými nápoji znázorňuje obrázek 11. Rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitneyův U test).



**Obrázek 11** Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v domácích a komerčně dostupných alkoholických nápojích

#### 5.2.4 Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi vzorky vodky a slivovice

Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi vzorky vodky a slivovice znázorňuje obrázek 12. Rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitneyův U test).



**Obrázek 12** Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi vzorky vodky a slivovice

## 6 DISKUSE

Koncentrace ethylkarbamátu se stanovovala celkem u 15 vzorků potravin, z nichž 9 vzorků tvořilo alkoholické nápoje. Pozitivní vzorky pocházely pouze ze skupiny alkoholických nápojů. V jogurtech, sýrech a chlebu ethylkarbamát detekován nebyl. Rozdíl koncentrací mezi alkoholickými nápoji a ostatními potravinami byl statisticky významný ( $p < 0,05$ ), jak je znázorněno na obrázku 9. Zde se potvrdily výsledky mnoha studií, které ukázaly, že u potravin vyrobených fermentací pomocí kvasinek se vyskytují podstatně vyšší koncentrace urethanu než u potravin fermentovaných bakteriemi mléčného kvašení. Nekvasinkové fermentované produkty obvykle obsahují nedetekovatelné koncentrace ethylkarbamátu (CHUNG a kol., 2010). Monografie od Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny shrnuje výsledky mnoha studií zabývajících se detekcí ethylkarbamátu u fermentovaných potravin a nápojů. U sýrů zjištěné hodnoty nepřesahovaly 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a u jogurtů 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . U chlebů se nejvyšší hodnoty blížily 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , jednalo se však o chleby opečené. U klasicky tepelně neopracovaného chleba hodnoty většinou nepřesahují 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (IARC monographs, 2010). Lee se ve své studii poměrně rozsáhle zabýval koncentrací ethylkarbamátu u jogurtů, sýrů, chlebů a dalších (zejména korejských národních) fermentovaných potravin. Ethylkarbamát nebyl detekován v žádném z 18 vzorků jogurtů a 12 vzorků sýrů. Ze 32 vzorků bílých chlebů byly pouze 2 pozitivní, přičemž nejvyšší koncentrace dosáhla hodnoty 3,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (LEE, 2013).

Hlavním zdrojem ethylkarbamátu jsou ovšem alkoholické nápoje, nejvíce pak destiláty z peckového ovoce, u kterých už byly detekované i koncentrace 22 mg/l (podrobněji uvedeno v tabulce 1). V této práci bylo na ethylkarbamát pozitivně testováno 5 vzorků alkoholických nápojů, a sice všechny 3 vzorky slivovice a 2 ze 3 vzorků vodky. Výsledné stanovené koncentrace ethylkarbamátu u všech 3 vzorků testovaných slivovic byly velmi vysoké a několikanásobně převyšovaly nejvyšší doporučené množství 1 mg/l. Dá se zde předpokládat, že kromě nedodržení správného technologického postupu zde hrál významnou roli i nesprávný způsob skladování na světle. Lachenmeier a kol. se detekcí ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce zabýval v několika ze svých studií. V případě slivovice se naměřené hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,01–8,8 mg/l u originálních vzorků a 0,01–16,5 mg/l u stejných vzorků po 4 h působení UV záření (LACHENMAIER a kol., 2005). Hodnota ( $2,38 \pm 0,25$ ) mg/l u Hanácké vodky je také velmi vysoká. I zde se dá předpokládat nesprávný

způsob skladování na světle. Ve vodce (uvedeno netradičně v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) obvykle koncentrace ethylkarbamátu nepřekračují  $846 \mu\text{g}/\text{kg}$ , nicméně se mohou vyskytnout i koncentrace převyšující  $2 \text{ mg}/\text{kg}$  (EFSA, 2007). V Ginu, Staré myslivecké, Gieroy vodce a Meruňce nebyl nežádoucí urethan detekován. V ginu koncentrace ethylkarbamátu zpravidla nepřekračují  $11 \mu\text{g}/\text{kg}$  (JIAO a kol., 2014). Výsledné stanovené hodnoty koncentrací ethylkarbamátu v této práci také mohly do jisté míry zkreslovat matricové efekty.

Na rozdíl od ostatních alkoholických nápojů vzniká u destilátů z peckového ovoce nežádoucí ethylkarbamát také z kyanogenních glykosidů obsažených v peckách. Proto je velice vhodné použité ovoce nejdříve vypeckovat, popř. zabránit rozdrčení pecek v kvasu. Tento správný technologický postup bývá často zanedbáván u menších domácích pálitelů. Na obrázku 10 jsou znázorněny koncentrace stanovovaného ethylkarbamátu u destilátů z peckového ovoce a ostatních alkoholických nápojů. Rozdíl v koncentracích mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ). V případě peckových destilátů nebyl urethan detekován pouze v Meruňce 35%, která ale jako jediná nebyla domácí výroby. Rozdíl v koncentracích ethylkarbamátu mezi domácími a komerčně dostupnými destiláty znázorňuje obrázek 11. Rozdíl v koncentracích mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ).

Slivovice je českou populací obecně považována za nejzdravější z tvrdých alkoholických nápojů, nicméně z hlediska výskytu karcinogenního ethylkarbamátu na tom bývá podstatně hůře než vodka, která se nevyrábí z peckového ovoce. Rozdíly v koncentracích urethanu mezi vzorky slivovice a vodky znázorňuje obrázek 12. Rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ).

Statistické porovnání vybraných skupin znázorněné na obrázcích 9–12 sice potvrzuje výše uvedené teoretické poznatky, nicméně samo o sobě nemůže být považováno za příliš relevantní (a ani nebylo hlavním cílem práce), a to především z důvodu, že nebyly známy podmínky skladování. V případě srovnání koncentrací ethylkarbamátu mezi destiláty z peckového ovoce a ostatními alkoholickými nápoji by pak bylo vhodnější, aby byl poměr mezi domácími a komerčními destiláty vyrovnanější. Totéž platí pro srovnání vzorků vodky a slivovice. Naopak u srovnání komerčních a domácích alkoholických nápojů bylo žádané vyšší zastoupení peckových destilátů ve skupině komerčních alkoholických nápojů. Srovnání koncentrací ethylkarbamátu mezi alkoholickými nápoji a ostatními potravinami naopak za relevantní považovat lze.

## 7 ZÁVĚR

Ethylkarbamát je karcinogenní látka 2A skupiny vyskytující se ve fermentovaných potravinách a nápojích, přičemž jeho nejvyšší koncentrace se vyskytují v destilátech z peckového ovoce. Za jeho karcinogenní účinky jsou zodpovědné jeho toxické metabolity, především pak epoxid vinylkarbamátu.

Hlavním cílem práce bylo pokusit se zachytit, prekoncentrovat a stanovit pomocí plynové chromatografie. Celkem se analyzovalo 15 vzorků. Chleby, sýry a jogurty byly zastoupeny po 2 vzorcích a zbylých 9 tvořily alkoholické nápoje. Vzorky byly vyhodnoceny metodou srovnání se standardem. Pro extrakci analytu ze vzorků chlebů, jogurtů a sýrů byla použita metoda extrakce pevnou fází, jejíž výtěžnost byla ( $71,50 \pm 2,43$ ) % a pro extrakci analytu z alkoholických nápojů metoda extrakce kapalinou (dichlormethanem) s výtěžností ( $75,15 \pm 3,05$ ) %.

Z celkově 15 analyzovaných vzorků bylo 5 pozitivních, a to pouze ze skupiny alkoholických nápojů. Nejvyšší koncentrace byly detekovány ve vzorcích domácích slivovic, a sice ( $9,94 \pm 0,25$ ) mg/l, ( $5,34 \pm 0,41$ ) mg/l a ( $4,03 \pm 0,36$ ) mg/l. Dále byla přítomnost ethylkarbamátu zjištěna ve 2 ze 3 analyzovaných voděk, a sice v Hanácké vodce v koncentraci ( $2,38 \pm 0,25$ ) mg/l a v Boris vodce v koncentraci ( $0,26 \pm 0,01$ ) mg/l. Ve vzorcích Gieroy vodky, Ginu, Meruňky, Staré myslivecké a nealkoholických fermentovaných potravinách nebyl ethylkarbamát detekován.

Rozdíl v koncentracích ethylkarbamátu mezi alkoholickými nápoji a ostatními sledovanými potravinami, mezi destiláty z peckového ovoce a ostatními alkoholickými nápoji, mezi alkoholickými nápoji domácí výroby a komerčně dostupnými alkoholickými nápoji a mezi vzorky vodky a slivovice byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ). Podmínky skladování, které se na výsledné koncentraci podílí významným způsobem, však nebyly známy a do jisté míry mohou být výsledky zkresleny matricovými efekty.



## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABRAHÁMOVÁ, Jitka. *Co byste měli vědět o rakovině prsu*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 143 s. Doktor radí. ISBN 978-802-4730-639.

ABREU DE MELO, Susana, Arminda ALVES, Beatriz OLIVEIRA a Paulo HERBERT. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, vol. 382, issue 2, s. 498-503. DOI: 10.1007/s00216-005-3061-3.

*Alcohol consumption and ethyl carbamate*. Geneva: Distributed by WHO Press, 2010, ix, 1424 s. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 96. ISBN 92-832-1296-7.

BALÍK, Josef, Jan GOLIÁŠ, Jaromír VEVERKA, Marie KYSELÁKOVÁ, Anna NĚMCOVÁ, Ludmila ŠUDERLOVÁ a Jiří VEJROSTA. Wine volatiles composition in the sensory evaluation of bouquet and flavour of two vine cultivars. *Horticultural Science*. 2002, vol. 29, issue 1, s. 4-11. ISSN 0862-867X.

BELAND, Frederick A., R. Wayne BENSON, Paul W. MELLICK, Robert M. KOVATCH, Dean W. ROBERTS, Jia-Long FANG a Daniel R. DOERGE. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2005, vol. 43, issue 1, s. 1-19. DOI: 10.1016/j.fct.2004.07.018.

BERENBLUM, I., D. BEN-ISHAI, N. HARAN-GHERA, A. LAPIDOT, E. SIMON, N. TRAININ, Daniel R. DOERGE. Skin initiating action and lung carcinogenesis by derivatives of urethane (ethyl carbamate) and related compounds: Relationships among non-pregnant murine females, gravid dams, and transplacentally exposed offspring. *Biochemical Pharmacology*. 1959, vol. 2, issue 3, s. 168-176. DOI: 10.1016/0006-2952(59)90065-6.

BRUNO, S, D VAITSMAN, C KUNIGAMI a M BRASIL. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane

spirits. *Food Chemistry*. 2007, vol. 104, issue 4, s. 1345-1352. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.048.

CHUNG, Stephen Wai-Cheung, Ka Ping KWONG a Benedict Ling-Sze CHEN. Determination of Ethyl Carbamate in Fermented Foods by GC-HRMS. *Chromatographia*. 2010, vol. 72, 5-6, s. 571-575. DOI: 10.1365/s10337-010-1694-7.

DAHL, A. Gary, James A. MILLER a Elizabeth C. MILLER. Vinyl Carbamate as a Promutagen and a More Carcinogenic Analog of Ethyl Carbamate. *Cancer Res.* 1978, vol. 38, issue 11, s. 3793-3804.

Doporučení komise (2010/133/EU) ze dne 2. března 2010 o prevenci a snížení kontaminace lihovin z peckovin a výlisků peckovin ethylkarbamátem a o monitorování obsahu ethylkarbamátu v těchto nápojích (2010/133/EU).

*Evaluation of certain food contaminants: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO, 2006. ISBN 92-412-0930-5.

*Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants*. The EFSA Journal (2007) 551, s. 1-44

GHANAYEM, B. I., R. Wayne BENSON, Paul W. MELLICK, Robert M. KOVATCH, Dean W. ROBERTS, Jia-Long FANG a Daniel R. DOERGE. Inhibition of Urethane-Induced Carcinogenicity in Cyp2e1<sup>-/-</sup> in Comparison to Cyp2e1<sup>+/+</sup> Mice. *Toxicological Science*. 2006-11-08, vol. 95, issue 2, s. 331-339. DOI: 10.1093/toxsci/kfl158.

GILLIE, Oliver. *Zdravou výživou proti rakovině: kniha založená na průkopnických zjištěních Nadace pro světový výzkum rakoviny*. Hodkovičky [Praha]: Pragma, 2001, 204 s. ISBN 80-720-5742-1.

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*. 2002, vol. 67, issue 5, s. 1616-1620. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08693.x.

HESFORD, Frank a Katharina SCHNEIDER. Validation of a simple method for the determination of ethyl carbamate in stone fruit brandies by GC–MS. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 2001, vol. 92, issue 3, s. 250-259. ISSN 1424-1307.

HÚŠKOVÁ, Renáta, Michal KIRCHNER a Eva MATISOVÁ. Matricové efekty a ich eliminácia pri analýze rezíduí pesticídov v potravinách plynovou chromatografiou. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, roč. 2007, s. 1020-1027, ISSN 0009-2770.

IVERSEN, OH. Urethan (ethyl carbamate) is an effective promoter of 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin 2-stage experimentes. *Carcinogenesis*. 1991, vol. 12, issue 5, s. 901-903. DOI: 10.1093/carcin/12.5.901.

JIAO, Zhihua, Yachen DONG a Qihe CHEN. Ethyl Carbamate in Fermented Beverages: Presence, Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Proposals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, vol. 13, issue 4, s. 611-626. DOI: 10.1111/1541-4337.12084.

LACHENMEIER, Dirk W, Beatus SCHEHL, Thomas KUBALLA, Willi FRANK a Thomas SENN. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Additives and Contaminants*. 2005, vol. 22, issue 5, s. 397-405. DOI: 10.1080/02652030500073360.

LEÇA, João M., Vanda PEREIRA, Ana C. PEREIRA a José C. MARQUES. Rapid and sensitive methodology for determination of ethyl carbamate in fortified wines using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 2014, vol. 811, s. 29-35. DOI: 10.1016/j.aca.2013.12.018.

LEE, Kwang-Geun. Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented foods. *European Food Research and Technology*. 2013, vol. 236, issue 5, s. 891-898. DOI: 10.1007/s00217-013-1953-6.

LEHOTAY, Jozef. *Separáčné metódy v analytickej chémii*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2009, 233 s. ISBN 978-80-227-3036-5.

LIM, Hyo-Shin a Kwang-Geun LEE. Development and validation of analytical methods for ethyl carbamate in various fermented foods. *Food Chemistry*. 2011, vol. 126, issue 3, s. 1373-1379. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.110.

LIU, Jun, Yan XU a Guang-ao ZHAO. Rapid determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012, vol. 118, issue 2, s. 217-222. DOI: 10.1002/jib.33.

MIKULÍKOVÁ, Renata, Jan GOLIÁŠ a Vladimíra MRÁZOVÁ. SPME-GC-MS analysis of volatile compounds in Czech white from five grape varieties. *Mitteilungen Klosterneuburg*. 2009, vol. 59, issue 3, s. 159-165. ISSN: 0007-5922.

NEEPER-BRADLEY, T. L., Mary K. CONNER, Paul W. MELLICK, Robert M. KOVATCH, Dean W. ROBERTS, Jia-Long FANG, Daniel R. DOERGE. Tumor formation and sister chromatid exchange induction by ethyl carbamate: Relationships among non-pregnant murine females, gravid dams, and transplacentally exposed offspring. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1992, vol. 12, issue 4, s. 167-177. DOI: 10.1002/tcm.1770120403.

NOMURA, Taisei, Terumasa HAIASHI, Toshiya MASUYAMA, Satonori TANAKA, Hiroo NAKAJIMA, Nobuo KUROKAWA, Yukio ISA. Carcinogenicity of sublimed urethane in mice through the respiratory tract. *Jpn J Cancer Res*. 1990, vol. 81, issue 8, s. 742-746. PMID: 2118889.

OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.

PARK, Kwang-Kyun, Amy LIEM, Bradley C. STEWART a James A. MILLER. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis*. 1993, vol. 14, issue 3, s. 441-450. DOI: 10.1093/carcin/14.3.441.

SCHRENK, Dieter. *Chemical contaminants and residues in food*. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2012, xxvi, 577 s. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 235. ISBN 9780857095794.

STADLER, Richard H. a David R. LINEBACK. *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*. Wiley: Hoboken, N.J., c2009, xv, 723 p. ISBN 978-047-0074-756.

STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ. Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, roč. 2004, s. 379-387, ISSN 0009-2770.

TEKEL, Jozef a Peter MIKUŠ. *Vybrané kapitoly z analytickej chémie – analýza látok v biologických systémoch*. 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislavě, 2005, 194 s. ISBN 80-223-1988-0.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.

VLČEK Vítězslav a Miroslav POHANKA. Environmentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chemické listy*. 2011. vol. 2011, issue 105, s. 908-912. ISSN 0009-2770.

WEBER, J. V. a V. I. SHARYPOV. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2009, vol. 7, issue 3, s. 233-247. DOI: 10.1007/s10311-008-0168-8.

YE, Chang-Wen, Xue-Na ZHANG, Yuan-Li GAO, Yu-long WANG, Si-Yi PAN a Xiu-Juan LI. Multiple headspace solid-phase microextraction after matrix modification for avoiding matrix effect in the determination of ethyl carbamate in bread. *Analytica Chimica Acta*. 2012, vol. 710, s. 75-80. DOI: 10.1016/j.aca.2011.10.030.

YU, Wei, Mark. A. SIPOWICZ, Diana C. HAINES, Lisa BIRELY, Bhalchandra A. DIWAN, Charles W. RIGGS, Kazimierz S. KASPRZAK, Lucy M. ANDERSON. Preconception Urethane or Chromium(III) Treatment of Male Mice: Multiple Neoplastic and Non-neoplastic Changes in Offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1999, vol. 158, issue 2, s. 161-176. DOI: 10.1006/taap.1999.8692.

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Plynový chromatograf Fisons 8000 series</i> .....	38
Obrázek 2 <i>Chromatogram standardu ethylkarbamátu</i> .....	45
Obrázek 3 <i>Kalibrační křivka standardu ethylkarbamátu</i> .....	45
Obrázek 4 <i>Grafické srovnání koncentrace ethylkarbamátu u všech vzorků</i> .....	47
Obrázek 5 <i>Grafické srovnání koncentrace ethylkarbamátu u pozitivních vzorků</i> .....	47
Obrázek 6 <i>Rozmezí hodnot koncentrace ethylkarbamátu</i> .....	48
Obrázek 7 <i>Příklad chromatogramu ethylkarbamátu u pozitivního vzorku</i> .....	48
Obrázek 8 <i>Příklad chromatogramu ethylkarbamátu u negativního vzorku</i> .....	49
Obrázek 9 <i>Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v alkoholických nápojích a ostatních potravinách</i> .....	50
Obrázek 10 <i>Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v destilátech z peckového ovoce a ostatních alkoholických nápojích</i> .....	51
Obrázek 11 <i>Srovnání koncentrace ethylkarbamátu v domácích a komerčně dostupných alkoholických nápojích</i> .....	52
Obrázek 12 <i>Srovnání koncentrace ethylkarbamátu mezi vzorky vodky a slivovice</i> .....	53

## 10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 <i>Množství ethylkarbamátu ve vybraných potravinách (WEBER, SHARYPOV, 2009)</i> .....	10
Tabulka 2 <i>Výtěžnost extrakce pevnou fází</i> .....	44
Tabulka 3 <i>Výtěžnost extrakce kapalinou</i> .....	44
Tabulka 4 <i>Koncentrace ethylkarbamátu ve sledovaných vzorcích potravin</i> .....	46