

Stanovení ftalátů a karbamátů ve vybraných ovocných destilátech

Bc. Daniel Kulig

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniel KULIG**
Osobní číslo: **T08806**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení ftalátů a karbamátů ve vybraných
ovocných destilátech**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

1. Obecná charakteristika ftalátů a karbamátů
2. Proces výroby ovocných destilátů (stručný popis)
3. Vliv ftalátů a karbamátů na lidský organizmus
4. Izolace a příprava vzorků ke stanovení
5. Metody stanovení
6. Cíl práce

Praktická část:

1. Metodika (použité přístroje, metody stanovení, vzorky,...)
2. Analýza jednotlivých vzorků
3. Výsledky a komentáře
4. Závěr (shrnutí)

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Jan Velíšek, *Chemie potravin II*, Osis 2002.238s.

[2] RNDr. Jan Jelínek, RNDr. Vladimír Ticháček, *Biologie*, Olomouc 2002.452s.

[3] Josef Dyr, Jan E. Dyr, *Výroba slivovice a jiných pálenek*, Maxdorf 1997. 302s.

[4] ing. Karel Hanzlík, *Posuzování kvality destilátů*, Lípa 1994.175s.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

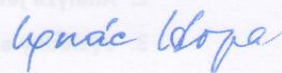
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo charakterizovat vlastnosti ftalátů a karbamátů, zjistit jejich výskyt u vybraných druhů ovocných destilátů použitím analytických metod HPLC a GC-FID. V práci je popsána základní výroba destilátů, zahrnující přípravu surovin, technologické vybavení a postupy během destilace. Součástí teoretické části je i popis vlivů těchto látek na lidské zdraví a okolí. V praxi se na stanovení těchto látek často používá metoda GC-MS, přičemž cílem této práce bylo také prověření i méně často používaných metod, jakými jsou GC-FID a HPLC s kombinovanou UV/ VIS a MS detekcí.

Klíčová slova: ftaláty, ethylkarbamát, destilační zařízení, plynová chromatografie , HPLC.

ABSTRACT

The goal of the work is to define the properties of phthalates and carbamates, to analyse their abundance in the select kinds of fruit distillate while applying the HPLC and GC-FID methods. The work describes the basic distillate production, involving raw materials preparation, technological equipment and the procedures during distillation. The influence of the substances on the human health and the environment forms part of the theory. It is necessary to add that the way of the analysis was to a certain extend pioneering since the GC-MS method is being applied at present, but the goal of this work was using less commonly methods as GC-FID and HPLC with UV/VIS and MS detection.

Keywords: phthalates, ethyl carbamate, distillation equipment, gas chromatography, High performance liquid chromatography.

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. za pomoc a vedení při této práci. Rád bych poděkoval také Mgr. Robertu Víchovi, PhD. za obětavost a vstřícnost při stanovení plynovou chromatografií.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Motto: *Vždy bojuj až do konce*

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

OBSAH

ÚVOD	7
I TEORETICKÁ ČÁST	8
1 CHARAKTERISTIKA FTALÁTŮ A KARBAMÁTŮ	9
1.1 FTALÁTY	9
1.1.1 Vlastnosti ftalátů	10
1.1.2 Výskyt ftalátů	11
1.1.3 Legislativní aspekty týkající se ftalátů	12
1.2 ETHYLKARBAMÁT	14
1.2.1 Hlavní zdroje ethylkarbamátu	16
1.2.2 Legislativní rámec týkající se ethylkarbamátu	18
2 PROCES VÝROBY OVOCNÝCH DESTILÁTŮ	19
2.1 PŘÍPRAVA SUROVIN	19
2.2 JEDNOTLIVÉ FÁZE VÝROBY	19
2.3 KVASNÉ KÁDĚ	19
2.3.1 Čištění a desinfekce nádob	20
2.3.2 Plnění nádob	20
2.4 KVAŠENÍ ZÁPARY	20
2.5 FERMENTACE SUROVIN	21
2.6 VEDLEJŠÍ PRODUKTY ETANOLOVÉHO KVAŠENÍ	22
2.7 DESTILACE	23
2.7.1 Destilační kotle	25
2.7.2 Klobouk	25
2.7.3 Přestupní trubka	26
2.7.4 Chladicí zařízení	26
2.7.5 Destilace	26
2.7.6 Rektifikace	27
2.7.7 Ředění destilátu	28
3 VLIV FTALÁTŮ A KARBAMÁTŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ	29
3.1 ZPŮSOBY A MECHANIZMY VSTŘEBÁVÁNÍ FTALÁTŮ	29
3.2 KARBAMÁTY	31
3.3 TOXICITA PRO ČLOVĚKA	32
3.4 INSEKTICIDNÍ KARBAMÁTY POUŽÍVANÉ V ČR	33
4 IZOLACE A PŘÍPRAVA VZORKŮ KE STANOVENÍ	34
5 METODY STANOVENÍ	35
5.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	35
5.1.1 Plynový chromatograf	35
5.1.2 Mobilní fáze	38

5.2	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	38
5.3	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	39
6	CÍL PRÁCE.....	43
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	44
7	METODIKA.....	45
7.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	45
7.2	POUŽITÉ VZORKY	47
8	ANALÝZA JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ	49
8.1	PŘÍPRAVA JEDNOTLIVÝCH STANDARDŮ A VZORKŮ	49
8.1.1	Příprava standardů ftalátů a ethylkarbamátu	49
8.1.2	Příprava vzorků pro HPLC	49
8.1.3	Příprava vzorků pro GC-FID	49
8.2	OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO METODU HPLC.....	49
8.2.1	Experimentální analýzy pro volbu optimálního nastavení (pro ftaláty)	50
8.2.2	Experimentální analýzy pro volbu optimálního nastavení (pro urethan)	50
9	VÝSLEDKY A KOMENTÁŘE.....	51
10	ZÁVĚR (SHRNUTÍ)	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK	68
	SEZNAM PŘÍLOH	69

ÚVOD

Ethylkarbamát je přirozenou toxickou složkou výrobků, kde se uplatňují fermentační procesy. V ovocných destilátech, zejména vyrobených z peckového ovoce, se nachází ve vyšších koncentracích, jelikož jeho hlavními prekurzory jsou kyanogenní glykosidy. Opak tvoří ftaláty, které jsou považovány za reprodukčně a vývojově toxickou látku. Tyto látky se v alkoholických nápojích vyskytují jako kontaminanty a vlivem neodborné manipulace během výrobního procesu.

Cílem této diplomové práce bylo zanalyzovat výskyt ftalátů a ethylkarbamátu ve vybraných ovocných destilátech. Vlastní stanovení probíhalo na HPLC-MS a GC-FID, což mělo do určité míry vyzkoušet nestandardní postup stanovení. Běžně v praxi se totiž používá metoda GC-MS s vhodně zvolenou kolonou.

Je zde obsažena také charakteristika těchto látek, jejich vliv na lidský organismus a okolí. V kapitole pojednávající o výrobě destilátu jsou popsány základní technologické operace, nutné k dosažení požadované kvality produktu. Nechybí zde popis metod používaných ke stanovení ftalátů a karbamátu v destilátech.

Praktická část popisuje jednotlivé dílčí etapy, průběh a materiálové vybavení použité u jednotlivých analýz.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA FTALÁTŮ A KARBAMÁTŮ

1.1 Ftaláty

Označení ftaláty je odvozeno od názvu pro kyselinu ftalovou, která patří mezi významné kontaminanty životního prostředí. Jejich značné rozšíření do mnoha složek životního prostředí má příčinu v tom, že mají určité vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, což umožňuje jejich uplatnění jako změkčovadla v oblasti výroby plastických hmot. Příkladem může být přeměna PVC z tuhého plastu do jeho měkčené formy [1].

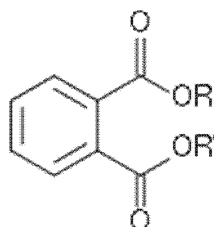
PVC je dialkyl- nebo alkylarylestery 1,2-benzendikarboxylové kyseliny. Konečný produkt může obsahovat až 40% změkčovadla, jež není chemicky vázáno a je zde nebezpečí uvolňování do materiálu, se kterým je plast v kontaktu [2].

Sortiment výrobků obsahujících ftaláty je velmi pestrý – jde například o potřeby pro domácnost, gumové rukavice, dětské hračky, potravinářské obaly, až po specializované výrobky pro zdravotnictví jako jsou vaky pro uchování krve a krevní plazmy, injekční stříkačky apod. [3].

Americký Úřad pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency), zahrnul šest esterů kyseliny ftalové – dimethylftalát, diethylftalát, dibuthylftalát, benzylbutylftalát, bis(2-ethylhexyl)ftalát, dioktylftalát jako podstatné kontaminanty životního prostředí. K nejvíce rozšířeným z tohoto seznamu patří dibuthylftalát a bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) [4].

Obecná chemická struktura ftalátů:

R a R' = C_nH_{2n+1}; n = 4-15



Obrázek 1: Obecná chemická struktura ftalátů [5]

1.1.1 Vlastnosti ftalátů

Ftaláty jsou estry 1,2-benzendikarboxylové (ftalové) kyseliny. Molekulu tvoří rigidní planární aromatický kruh se dvěma flexibilními, většinou nelineárními alifatickými, často shodnými řetězci. Jiné obsahují ve své molekule dvě různé alkylové skupiny. Ftaláty bývají většinou čiré, olejovité, nehořlavé kapaliny, bez jakéhokoliv zápachu, s nízkou tenzí par a s vysokým bodem varu. Jsou značně lipofilní, hlavně ty s delším postranním řetězcem. Snadno se rozpouští v nepolárních rozpouštědlech jako je benzen, toluen nebo ether [6].

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných ftalátů [7]

Ftalát	M_r	Bod varu (°C)	Bod tání (°C)	Rozp. ve vodě v mg.dm ⁻³	Tenze par v mPa (25°C)	pK_{ow}
dimethylftalát	194,2	284	2	4000	220	1,53
diethylftalát	222,2	294	-41	1080	220	2,35
dibuthylftalát	278,4	340	-35	11,2	1,87	4,57
benzylbutylftalát	312,4	370	-35	2,69	1,15	4,91
bis(2-ethylhexyl)ftalát	390,6	384	-50	0,3	0,86	5,11
dioktylftalát	390,6	220	-25	0	-	-

Z tabulky je zřejmé, že s rostoucí relativní molekulovou hmotností (M_r), stoupá hodnota rozdělovacího koeficientu oktanol-voda (pK_{ow}), jež je mírou lipofily sloučenin. Následně se ze vzrůstající molekulovou hmotností projevuje klesající tenze par. Vyšší ftaláty jsou při pokojové teplotě minimálně těkavé, pouze u nižších esterů bylo pozorováno významnější odpařování. Hlavním faktorem, který určuje chemické vlastnosti ftalátů je esterifikovaná karboxylová skupina.

1.1.2 Výskyt ftalátů

Ftaláty se do životního prostředí dostávají činností člověka, hlavně při výrobě materiálů, které je z určité části obsahují, následně jejich používáním a likvidací. Kontaminovány mohou být půda, atmosféra, voda i potraviny [3].

Alkoholické nápoje

Větší množství ftalátů se objevuje u destilátů dovážených ze zahraničí a u produktů, kde dochází k nesprávným technologickým postupům, jako použití nevhodného materiálu ke skladování kvasu nebo nesprávně provedená destilace. Z kontrol ČZPI plyne, že někteří zahraniční výrobci používají při výrobě lihovin nevhodné materiály a zařízení, pokryté některými druhy nátěrů nebo vyrobené z určitých druhů plastů, z nichž se mohou estery kyseliny ftalové uvolnit do vyráběného produktu [8].

Voda

Rozpustnost ftalátů ve vodě je relativně nízká a klesá s rostoucí relativní molekulovou hmotností. Koncentrace ve vodě může však snadno překročit limity, hlavně v případě bis(2-ethylhexyl)ftalátu a to díky schopnosti sorbovat se na organické částice a interagovat s rozpuštěným organickým materiálem jako jsou huminové kyseliny a fulvokyseliny v půdě. Ftaláty se proto ve vodě navazují především na sediment [6].

Kontaminace povrchových a spodních vod je způsobena přímo, zde se jedná hlavně o pevné odpady nebo odpadní vody, tak i nepřímou cestou a to hlavně srážkami z atmosféry. Hladiny kontaminace se liší podle lokality – v blízkosti průmyslových center jsou vyšší a jejich rozmezí se pohybuje od desetin až k tisícům mikrogramů na decimetr krychlový [6].

Ovzduší

Koncentrace v ovzduší je díky nízké tenzi par zanedbatelná. Zvýšené hladiny dosahuje pouze v okolí průmyslových závodů, kde se zpracovávají samotné ftaláty nebo plasty, ale také v uzavřených prostorech, kde se vyskytují výrobky obsahující tyto změkčovadla. V průmyslových centrech a uzavřených prostorech se hladina ftalátů pohybuje kolem desítek miligramů na metr krychlový. V samotné atmosféře existují ve formě aerosolu, vázané na prachové částice nebo jako páry, zde se jedná o estery s nižší relativní molekulovou hmotností [9].

Půda

Většina ftalátů se do půdy dostává při aplikaci zemědělských přípravků, průmyslovými odpady nebo emisemi. V půdě se sorbují na organickou hmotu a dochází k akumulaci. Absorpce v půdě se zvyšuje s rostoucí relativní hmotností a s klesající rozpustností ve vodě.

U vyšších esterů nastává v půdě tak silná sorpce, že nedochází k jejich následnému pohybu. Dojde-li k pravidelným přísunům, např. na skládkách, může po uplynutí určité doby nastat nasycení vrchních vrstev půdy a následné migraci, což může mít za následek kontaminaci spodních vod.

U dimethylftalátu dochází k vyluhování do spodních vod a stejně jako diethylftalát může následně z vysušených půd částečně vytékat. Jiné ftaláty tento jev nevykazují.

I když jsou značně perzistentní, činností mikroorganismů podléhají částečné biodegradaci [6].

Potraviny

Ke kontaminaci potravin může docházet ve všech fázích výroby od surovin, přes následné zpracování až po konečné balení. Prostup ftalátů z obalového materiálu do potravin je ovlivněn především: druhem obalového materiálu, samotnou potravinou, teplotou, atd. Potraviny s vyšším obsahem tuku jsou k výluhu náchylnější než tukuprosté. Hladina kontaminace se pohybuje od setin miligramů na kilogram až po desítky miligramů na kilogram u tučných potravin [10].

1.1.3 Legislativní aspekty týkající se ftalátů

Ftaláty, zejména bis(2-ethylhexyl)ftalát vykazují možnou karcinogenní a estrogenní aktivitu. Proto byl vznesen požadavek omezovat jejich množství a minimalizovat s nimi kontakt. Tímto směrem se ubírají i legislativní úpravy v různých zemích na celém světě. Snaží se stanovit maximální množství těchto reziduí nebo způsoby použití.

Evropská legislativa přijala maximální denní množství bis(2-ethylhexyl)ftalátu na 0,025 mg/1kg tělesné hmotnosti na den; pro dibutylftalát je toto množství rovno 0,05 mg/1kg tělesné hmotnosti na den. V České republice byly přijaty úpravy používání ftalátů při výrobě PVC, jež přichází do styku s potravinami [11].

Tabulka 2: Maximální množství esterů kyseliny ftalové v potravinářských výrobcích [10]

Potravina	Přípustné množství (mg/kg)
Lihoviny	1,0
Mléko, maso, pivo, víno, pečivo, mouka	2,0
Ryby, máslo, tuky, ovoce, pochutiny	4,0

Maximální množství přidávaných ftalátů u neměkčeného PVC je do 5%, u neměkčeného je tato mez posunuta na 35%. Podmínkou je zde obsah tuku do 5% v potravíně nebo obsah etanolu do 10%. Toto omezení se nevztahuje na uzávěry pro víno a likéry. Na výrobu těsnicího materiálu pro hotová jídla, limonádové sirupy, ovocné mošty a pivo do 14% celkového extraktu, smí být používán PVC s celkovým obsahem až 35% změkčovadel [12].

SZPI sleduje systematicky obsah ftalátů v minerálních vodách od roku 1999. Výsledky analýz potvrdily přítomnost těchto látek v minerálních vodách, přesto nebyly nadlimitní nálezy dosud zaznamenány. V roce 2002 bylo odebráno celkem 44 vzorků minerálních vod, u 4 vzorků byl zaznamenán pozitivní nález [13].

Tabulka 3: Zjištěný obsah ftalátů v minerálních vodách (hodnoty v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [13]

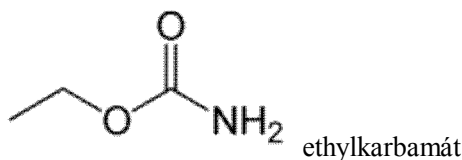
Analyt	n	n pozit.	% n pozit.	n+	% n+	průměr	medián	kvantil 90%	kvantil 10%	min, max
Bis(2-etylhexyl)ftalát	23	3	13,04	0	0	0,1696	n.d.	0,2	n.d.	n.d., 3,5
di-n-butylftalát	23	4	17,39	0	0	0,0783	n.d.	0,46	n.d.	n.d., 0,7
Ftaláty (suma)	44	4	9,09	0	0	0,125	n.d.	0,2	n.d.	n.d., 3,9

Tabulka 4: Množství ftalátů v kontrolovaných lihovinách (dle SZPI) [8]

Produkt, výrobce	Množství ftalátů [mg/kg]
Bernardýn tuzemský rum 40%, Seliko Olomouc	1,7
Slivovice, Bala Praha	1,76
T.H.C. bylinný likér 55%, L'or Prádlo u Nepomuku	2,1
Rum tuzemský 40%, Tritex Svitavy	3,0
Vodka Lvovska 50%, Bros-Handel, Německo	4,05
J & W whisky 43%, Henning&Grimbeek, JAR (nákup na tržnici)	23,3

1.2 Ethylkarbamát

Ethylkarbamát (uretan) je ethylester karbamové kyseliny a je přirozenou toxickou složkou, která se nachází ve výrobcích, jež jsou výsledkem fermentačního procesu. Nízké hladiny je možno detekovat v jogurtech, chlebu, aj. Nejvyšší koncentrace se vyskytují v některých ovocných destilátech [14].



Obrázek 2: Chemická struktura ethylkarbamátu [15]

Tabulka 5: Fyzikálně-chemické vlastnosti ethylkarbamátu [7]

Molekulární vzorec	$C_3H_7NO_2$
Molární hmotnost	89.09 g mol^{-1}
Hustota	1.056 g / cm^3
Bod tání	$49^\circ \text{ C}, 322 \text{ K}, 120^\circ \text{ F}$
Bod varu	$185^\circ \text{ C}, 458 \text{ K}, 365^\circ \text{ F}$

Tabulka 6: Koncentrace ethylkarbamátu v potravinách [11]

Potravina	Průměrný obsah v $\mu\text{g}/\text{kg}$
Chléb	1-12
Sýry	0-3
citrusové džusy	0,1-1,9
sojová omáčka	7-18
Ocet	1-10

Tabulka 7: Koncentrace ethylkarbamátu ve vybraných alkoholických nápojích

(z evropských expertíz trhu) [16]

Alkoholický nápoj	Průměrný obsah v $\mu\text{g}/\text{kg}$
stolní víno	10-12
Pivo	1
Likéry	14-118
Vodka	0-1
Whisky	32-51
Bourbon	180
Rum	13-27
Brandy ovocné	21-1116
Brandy vinné	39-47
Saké	214
Sherry	62-82

1.2.1 Hlavní zdroje ethylkarbamátu

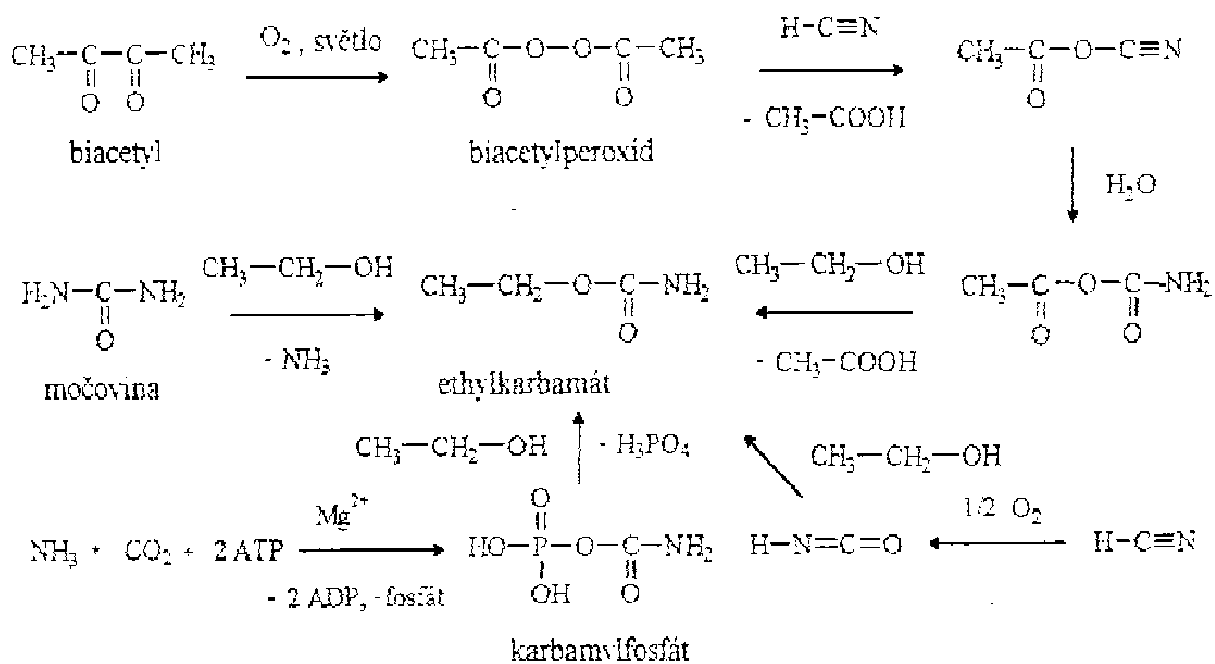
Předpokládá se, že prekursorem ethylkarbamátu je diethylkarbonát, kdysi hojně používaný konzervační prostředek v nápojovém průmyslu.

Ve fermentovaných výrobcích jsou prekursory ethylkarbamátu karbamylfosfát a L-karbamylasparagová kyselina, jedná se o meziprodukty katabolismu a biosyntézy pyrimidinových nukleosidů a purinových bází. Vzniká rovněž reakcí močoviny s etanolem. Tento proces se uplatňuje v metabolismu nukleových kyselin a některých aminokyselin, např. v ornitinovém cyklu s argininem, a tedy je přítomná jako metabolit ve fermentačních médiích. Tato reakce má za následek vznik ethylkarbamátu v alkoholických nápojích [17].

V alkoholických nápojích vyrobených z peckového ovoce – meruňky, švestky jsou hlavními prekursory ethylkarbamátu kyanogenní glykosidy, především amygdalin a aprunasin. V primární fázi dochází k oxidaci uvolněného kyanidu na kyanát, jež reaguje z etanolem za vzniku ethylkarbamátu. Mechanismus vzniku produktů reakce kyanidů s peroxidy vicinálních α -dikarboxylových sloučenin (methylglyoxal, biacetyl nebo 2,3-pentadion) a následnou ethanolýzou má za následek vznik ethylkarbamátu [17].

Tabulka 8: Zjištěný obsah ethylkarbamátu v lihovinách (hodnoty v mg.l^{-1}) [18]

Analyt	N	n pozit.	% n pozit.	n+	% n+	průměr	medián	kvantil 90%	kvantil 10%	min, max
uretan	70	44	62:86	1	1,43	0,1191	0,07	0,307	n.d.	n.d., 1,2



Obrázek 3: Mechanismus vzniku ethylkarbamátu v alkoholických nápojích [10]

Podstatný vliv na vznik ethylkarbamátu u alkoholických nápojů má světlo. U ovocných destilátů z peckového ovoce je vznik této sloučeniny podmíněn fotochemickými reakcemi přítomných prekurzorů. Nejvyšší koncentrace uretanu se objevuje u čirých láhví během dvou dnů. Působení světelného záření se v praxi často nedá odstranit, proto se zavádí speciální měděné katalyzátory přidávané do zářivky nebo zařazené před deflegmátor.

Při kvašení nelze jako zdroj dusíku používat močovinu. Také se doporučuje zpracovávat vypeckované ovoce, čehož efektem je snížený obsah kyanogenních glykosidů. Teplota kvašení má být v rozmezí 18-25 °C nebo by se měla snížit hodnota pH [19].

Úřad pro chemické a veterinární vyšetřování Baden Württemberg prezentoval snadná a poměrně účinná opatření, vedoucí k odstranění ethylkarbamátu v palírnách. Obsah této škodliviny lze snížit vhodným destilačním zařízením a následně výrobním postupem. Destilační aparatura s automatickým promýváním je účinnější než manuální regulace. Je nutno věnovat zvýšenou pozornost odstraňování dokapu, v němž se málo těkavý ethylkarbamát ve větší míře hromadí [20].

1.2.2 Legislativní rámec týkající se ethylkarbamátu

Ethylkarbamát je klasifikován jako potenciální karcinogen, maximální přípustná dávka (TDI) je 20ng/kg hmotnosti na den, což odpovídá příjmu 520 μg ročně u 70 kg člověka. Tuto hodnotu by některé skupiny lidí snadno překročily (častí konzumenti alkoholických nápojů), proto je nutné obsah do jisté míry redukovat. V České republice je povolen maximální obsah ethylkarbamátu od 0,03 mg/dm^3 pro víno do 0,04 mg/dm^3 pro ovocné destiláty [21].

2 PROCES VÝROBY OVOCNÝCH DESTILÁTŮ

2.1 Příprava surovin

Správně připravená surovina má značný vliv na celkovou kvalitu destilátu. Proto je nutno věnovat jí náležitou péči. Kvalitní destilát získáme pouze ze stejně kvalitní suroviny. Ovoce má být čisté, optimálně vyzrálé, nenahnilé. Výsledkem je destilát optimální chuti po surovinách, bez cizích příchutí a zápachů [22].

2.2 Jednotlivé fáze výroby

Mělnění, drcení ovoce

Na větší množství ovoce se používají účinné mlýnky. Konkrétní zvolený typ se odvíjí od druhu suroviny a rovněž destilačního kotle, v němž bude následně destilace probíhat. Proto se u přímo vyhřívaného kotle aplikuje jemnější kvas, jež se snáz destiluje.

Nejčastěji používané druhy mlýnků:

Struhadlový mlýnek - vzhledem k značnému výkonu, je vhodný pro větší objem zpracované suroviny. Každý druh ovoce má své specifické vložky, jejichž výsledkem je homogenní kvas

Strouhák- je dřevěný válec s kovovými lištami, které oškrabují ovoce

Válcové mlýnky - skládají se z rýhovaných, proti sobě se otáčejících válců. Válce jsou nastavitelné, takže je možno zpracovávat různé druhy ovoce.

Talířový drtič - používá se k přípravě velmi jemné směsi z jádrového nebo bobulového ovoce. Nebezpečí představuje kyanovodík z rozmělněných pecek [23].

2.3 Kvasné kádě

Ke kvašení surovin se dá použít několik typů nádob, musí však splňovat základní požadavky. Důležitá je hlavně snadná údržba, velký plnicí otvor, který pak následně usnadňuje čištění. Nejdůležitějším faktorem nadále zůstává odolnost vůči kvasu, tzn. nesmí se projevovat reakcemi, které by měly za následek změnu chuti a vůně. Tyto požadavky jsou splněny u nádob vyrobených z nerezové oceli a umělých hmot.

Zcela nevhodné jsou nádoby železné, jelikož snadno rezivějí, nedají se dobře čistit a dochází v nich k reakci organických kyselin ovoce z kovy, jež následně narušují kvalitu destilátu.

Nejčastěji se jako kvasné nádoby používají sudy z polyethylenu a polyesterových pryskyřic, jež se vystružují sklenými vlákny. Objem sudů bývá od 30 do 275 litrů. K výhodám patří odolnost, malá hmotnost a snadné plnění díky velkým uzávěrům.

Někdy se používají i nádoby zhotovené z chromniklové nebo chromvanadiové oceli. Mají poměrně vysokou životnost, lehce se čistí, nepropouští vzduch, ale jejich hmotnost je značná. Tyto nádoby, díky nereaktivnímu materiálu, je možné také používat k uchování destilátů [24].

2.3.1 Čištění a desinfekce nádob

Všechny nádoby se musí před plněním pečlivě vyčistit, popřípadě i vydesinfikovat. Nádoby se umývají vodou a roztoky, které ničí mikroorganismy. Důležité je vymytí studenou vodou spojené s kartáčováním, kdy se odstraní hrubší nečistoty. Po 1-2 hodinách se nádoba musí vypláchnout studenou vodou, aby se odstranily zbytky dezinfekčního prostředku. Nádoby, které lze neprodyšně uzavřít se vysířují sirnými pásky. Toto řešení se používá hlavně u dřevěných sudů určených k skladování kvasu [25].

2.3.2 Plnění nádob

Kvasné nádoby se plní jen asi do 4/5 objemu nádoby, jelikož během kvasných procesů se obsah v kádích zvedá a může docházet k přetékání břečky. Kvasné nádoby je vhodné plnit jednorázově, doplňování nelze doporučit, vhodnější je zejména u malého množství ovoce po uplynutí hlavního kvašení obsahu spojit. Po naplnění se nádoby důkladně očistí od zbytků břečky a rychle se uzavřou. Kvůli úniku oxidu uhličitého a zabránění přístupu kyslíku se víka opatří kvasným uzávěrem. Konkrétní typ kvasné zátky se volí podle použité nádoby [25].

2.4 Kvašení zápary

Probíhající etanolové kvašení (fermentace) je biologický proces, při němž se sacharidy vlivem mikroflóry, především kvasinek, rozpadají a vzniká etanol a oxid uhličitý. Hlavním cílem etanolového kvašení u ovocných destilátů není maximální produkce etanolu, nýbrž

tvorba sensoricky významných látek, které tvoří konečný charakter produktu. U pěstitelského pálení se nepoužívá čisté kvasné kultury, nýbrž přirozené mikroflóry, která se nachází na povrchu suroviny. Zastoupení mikroorganismů je značně široké od kvasinek přes plísně až po bakterie. S rostoucím množstvím etanolu a oxidu uhličitého vytvořeného kvasinkami dochází k zastavení růstu mnoha mikroorganismů, proto je rychlý začátek kvašení velmi důležitý. Od koncentrace 14-15% etanolu se zastaví i růst kulturních kvasinek.

Na kvasný proces má vliv i teplota. Optimální je rozmezí od 17- 21 °C. Teplota nad 40 °C již působí inhibičně a nad 60 °C kvasinky hynou. Zvýšené teploty působí negativně na celé spektrum aromatických látek, typických pro jednotlivé druhy destilátů.

Následně při skladování je nutno zohlednit druh ovoce. Platí pravidlo, že kvasy z měkkého ovoce se destilují později než kvasy připravené z jádrového ovoce. Dlouhodobým skladováním se tvoří látky, které negativně působí na jakost kvasu. Při dlouhodobějším skladování se doporučuje uskladnění v chladu, případně úprava pH [26].

2.5 Fermentace surovin

Alkoholové kvašení je biochemický proces typický pro kvasinky a některé druhy bakterií, při kterém jsou rostlinné polysacharidy přeměňovány na etanol a oxid uhličitý za vzniku tepla a energie.

Glukosa není vhodným donorem vodíkových atomů, proto se aktivuje dvojnásobnou fosforylací, při níž se spotřebují dvě molekuly ATP.

Celý proces startuje přenosem fosfátové skupiny z ATP na glukosu. Z D-glukosy vzniká glukosa-6-fosfát. Tato reakce je katalyzovaná hexokinasou. Následně dochází k isomerii, kde glukosa-6-fosfát konverguje na fruktosa-6-fosfát (tzv. Neubergův ester). Při druhé fosforylaci, která je zároveň nejpomalejší reakcí, se fruktosa-6-fosfát transformuje na fruktosa-1,6-bisfosfát za katalýzy fosfofruktokinasy. Další fází je štěpení fruktosa-1,6-bisfosfátu za vzniku glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu, přičemž tyto dva metabolity jsou udržovány ve vzájemné rovnováze. Dehydrogenací glyceraldehyd-3-fosfátu vznikne 1,3-bisfosfoglycerát, z něhož se následně uvolní fosfát za vzniku ATP a 3-fosfoglycerátu. V další reakci glykolýzy se 3-fosfoglycerát izomeruje na 2-fosfoglycerát, který následně podléhá enolizaci na fosfoenolpyruvát za odštěpení vody a katalýzy enzymu enolázy. Fosfoenolpyruvát pak odštěpí molekuly fosfátu, důsledkem toho je vznik pyruvátu. Vlivem anaer-

robních podmínek dojde k přeměně pyruvátu na acetaldehyd a CO_2 , který je dále redukován pomocí NADH. Finálním produktem je etanol [27].

Tabulka 9: Fyzikálně chemické vlastnosti etanolu [7]

Molekulová hmotnost	46,06 g/mol
Měrná hmotnost	789,4 kg/m ³ (20 °C)
Bod varu	78,3 °C
Teplota tání	-114,4 °C
Výparné teplo	915,6 kJ/kg
Viskozita	1,200 mPa·s (20.0 °C)
Bod vzplanutí	12 °C
Dolní výhřevnost	26,63 MJ/kg
Dolní mez zápalnosti par se vzduchem	3,95%
Horní mez zápalnosti par se vzduchem	13,65%
Kontrakce	50 obj. dílů etanolu+50 obj. dílů vody= 96,4 obj. dílů směsi o lihovitosti 51,87% obj.

2.6 Vedlejší produkty etanolového kvašení

Mezi nejvýznamnější vedlejší produkty patří následující látky:

Glycerol

Vzniká během kvašení glukosy z 1,3-dihydroxyacetonu, resp. 1,3-dihydroxyacetonfosfátu. Glycerol je slabě jedovatá kapalina (LD_{50} = 12,6 g/kg), která v menších dávkách způsobuje žaludeční potíže, bolesti hlavy a někdy zvracení. Ve vyšších koncentracích poškozuje játra. Do destilátu se však nedostane, jelikož má vysoký bod varu.

Ethanal (acetaldehyd)

Acetaldehyd je bezbarvá těkavá hořlavá kapalina štiplavého zápachu. V přírodě se vyskytuje ve zralém ovoci, kávě apod. Vyskytuje se jako součást zralého ovoce a např. i v kávě, kde je produkován metabolismem procesu zrání. V lidském organismu se tvoří při metabolismu etanolu. Odděluje se jako součást lutru.

Metanol

Zdrojem metanolu jsou pektinové látky, kde je vázán jako methylester. Je to bezbarvá, alkoholicky páchnoucí kapalina, neomezeně mísitelná s vodou. Je těkavý, hořlavý a silně jedovatý (orálně u potkana LD₅₀: 5628 mg/kg).

Přiboudlina

Tento termín označuje skupinu vyšších alkoholů s bodem varu v rozmezí 80-160 °C, jež se při vhodném oddestilování dokapu oddělí. Je charakteristická nepříjemným zápachem a chutí. Po požití se rychle vstřebává žaludeční sliznicí a dostává se do krve.

Vonné a aromatické látky

Tyto látky dotváří výsledné sensorické vlastnostech destilátu. Jejich obsah se odvíjí především od mikroflóry kvasu.

Kyanovodík a benzaldehyd

Tyto látky jsou součástí kvasu připraveného z peckového ovoce, vznikající enzymatickým štěpením amygdalinu, který je obsažen v jádrech. Jejich množství se odvíjí od počtu rozdrčených pecek. V pálenice tvoří charakteristické aroma po hořkých mandlích.

Kyselina octová

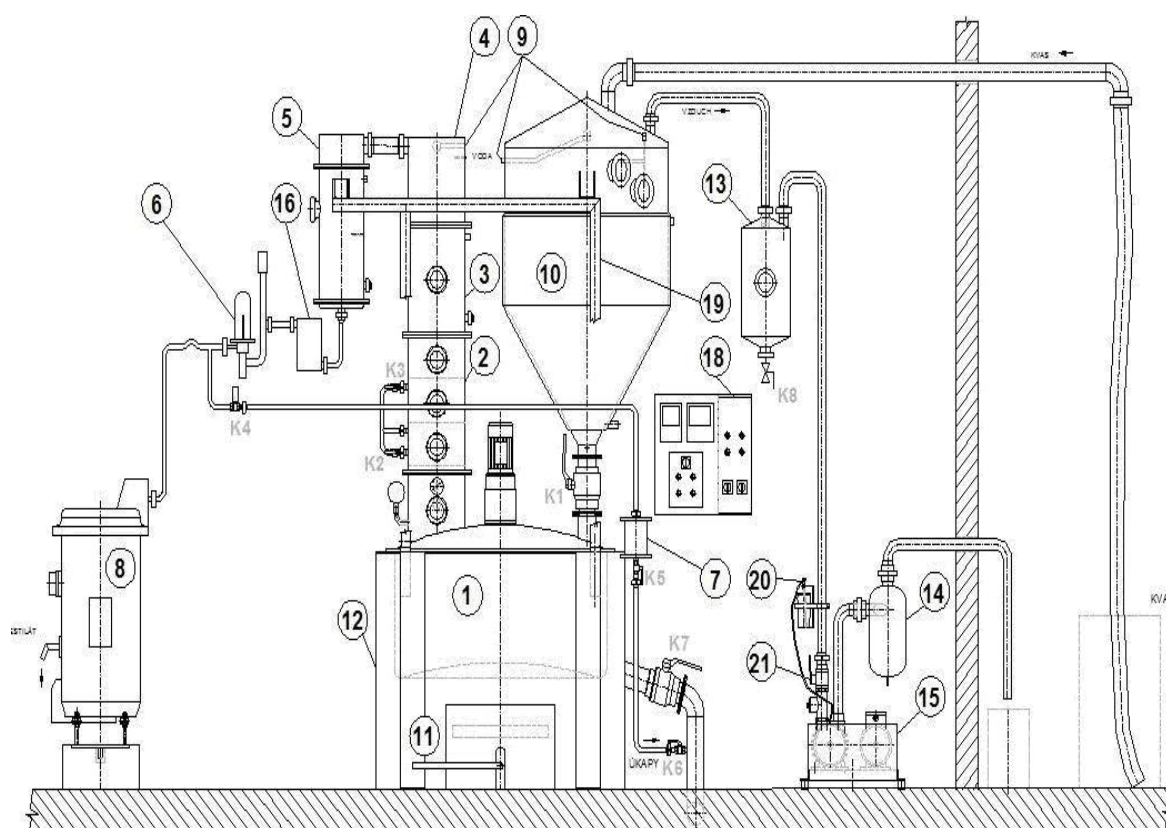
Tato látka negativně ovlivňuje kvalitu produktu. Její obsah roste při nevhodně provedeném kvašení [19].

2.7 Destilace

Destilace jako proces oddělení alkoholického podílu od zbytku kvasu se realizuje v destilačních zařízeních různé konstrukce.

Podstatnými částmi jednoduchých destilačních přístrojů jsou: destilační kotel (vařák), klobouk, přestupník a chladič. U těchto jednoduchých přístrojů je však nutná dvojitá destilace, jejichž produktem je surový a následně jemný destilát.

Nejvhodnějším konstrukčním materiálem pro výrobu destilačních zařízení je měď a nerez. Tyto materiály neovlivňují kvalitu kvasu ani následný destilát a jsou odolné vůči kyselinám a ostatním látkám, které jsou obsaženy v kvasu. Doporučená kombinace je vařák a klobouk z mědi a přestupník a chladič z nerezavějící oceli. Měď se doporučuje zejména pro schopnost navázat na sebe sirné sloučeniny (hlavně sirovodík). Chladič z nerezavějící oceli vyloučí tvorbu měďenky, která zhoršuje přestup tepla a také ovlivňuje kvalitu destilátu.



- | | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| 1 VAŘÁK | 7 PŘEPOUŠTĚCÍ ARMATURA ÚKAPŮ | 13 BEZPEČOSTNÍ A ODLUČOVACÍ NÁDOBA | 20 MAZACÍ PŘÍSTROJ |
| 2 REKTIFIKAČNÍ ČÁST KOLONY | 8 KONTROLNÍ OBJEMOVÉ LIHOVÉ MĚRIDLO | 14 ODLUČOVAČ OLEJE | 21 UZAVÍRACÍ PRVEK |
| 3 DEFLEGMÁTOR | 9 PROPLACHOVACÍ ZAŘÍZENÍ | 15 VÝVĚVA | |
| 4 KATALYZÁTOR | 10 NÁDRŽ NA KVAS | 16 DOCHLAZOVAC DEZILÁTŮ | |
| 5 KONDENZÁTOR | 11 PLYNOVÝ POLOAUTOMATICKÝ HOŘÁK | 18 OVLÁDACÍ PANEL | |
| 6 EPRUVETA S LIHOMĚREM | 12 NEREZOVÁ KOTLINA S VNITŘNÍ IZOLACÍ | 19 NOSNÁ KONSTRUKCE | |

PLOŠNÝ NÁKRES TECHNOLOGIE DESTILA KPD

Obrázek 4: Destilační zařízení firmy Destila [28]

2.7.1 Destilační kotle

Slouží k ohřátí záparů, aby došlo k odpaření těkavých látek z kvasu. Nevhodnějším materiálem pro výrobu destilačních kotlů je měď a nerezová ocel, jelikož mají příznivé vlastnosti týkající se vedení tepla, což výrazně snižuje náklady na vytápění.

Jednoplášťový kotel s přímým ohřevem byl používán hlavně v minulosti. Byl vytápěn dřevem nebo uhlím. Jeho značnou nevýhodou bylo připalování kvasu na stěnu nádoby. Snadno pak docházelo k průniku těchto látek do destilátu, což mělo za následek zhoršení kvality výsledného produktu. Částečně se tomuto jevu dalo zabránit pomalým ohřevem a stálým mícháním kvasu.

V současné době se používají dvouplášťové kotle, které eliminují tyto nedostatky. Prostor mezi pláštěmi bývá vyplněn vodní lázní nebo olejem. V první fázi se ohřívá médium, jež následně předává teplo kvasu. Vhodným médiem je voda, jelikož má relativně nízký bod varu a proto nedochází i při špatné regulaci k destilaci vyšších alkoholů a také kvas se na stěny prakticky nenapěká. Navíc dochází k pohybu kapaliny, tím i k rovnoměrnému prohřátí [29].

2.7.2 Klobouk

Destilační kotel je ukončen kloboukem. Vzhledem k poměrně velkému povrchu klobouku a dostatečné tepelné vodivosti materiálu se páry již částečně ochlazují, dochází k částečné kondenzaci výše vroucích frakcí (voda, dokapy). Ty následně stékají zpět do kotle a páry se obohacují o těkavější látky (etanol). Tímto způsobem dochází k zvyšování koncentrace etanolu v destilátu [30].



Obrázek 5: Destilační kotel

2.7.3 Přestupní trubka

Přestupník spojuje klobouk destilačního kotle s chladičem. Zde také probíhá částečné ochlazení. Voda a přiboudliny kondenzují a stékají zpět do vařáku.

2.7.4 Chladicí zařízení

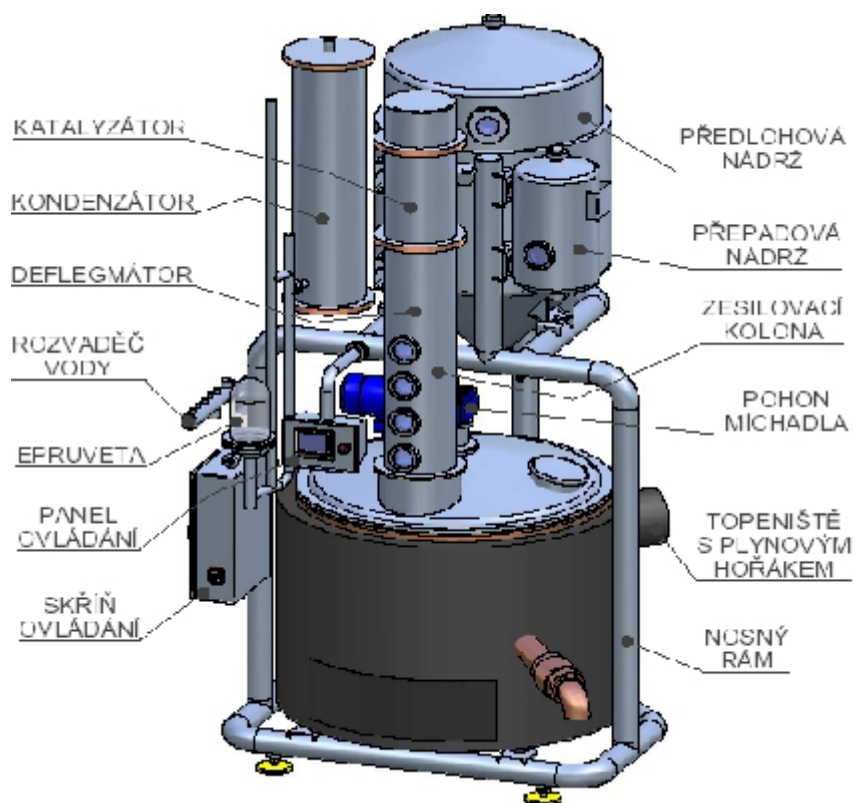
Slouží ke kondenzování páry vycházející z kotle přes klobouk a přestupník. Důležité je, aby chladič byl dostatečně výkonný. Nejjednodušším typem jsou spirálové chladiče, mají však nedostatečný výkon a problematické čištění. Nejpoužívanější a rovněž nejvýkonnější jsou chladiče trubkové, které se chladí protiproudně. V konečné fázi prochází destilát měřidlem [29].

2.7.5 Destilace

Vlastní destilace může probíhat jednostupňově a nebo dvoustupňově (destilace kvasu a následná rektifikace).

Jednostupňová

Tato zařízení jsou méně nákladná z hlediska spotřeby energie, zastavěného prostoru a také snižují nároky na obsluhu. Jednotlivé části jsou umístěny na společném rámu a kotel je vytápěn zpravidla plynem. Tento způsob doznal rozšíření hlavně v Německu a Rakousku [31].



Obrázek 6: Schéma jednostupňového destilačního zařízení firmy Pacovské strojírny a.s.[32]

Dvoustupňová destilace

Při dvoustupňové destilaci se kotel plní do $\frac{2}{3}$ objemu obsahu (musí se ponechat místo pro pěnu) a začne se topit. Destilace probíhá pomalu, jelikož je tento krok rozhodujícím prvkem kvality destilátu. Obsah kotle se pravidelně míchá, aby se zabránilo připalování. První destilát se jímá až do poklesu alkoholu pod 2% obj. Průměrná lihovitost je kolem 15-30% obj. Tento první surový destilát- lutr se jímá do společné nádoby. Jelikož lutr má nízký obsah alkoholu, je nutné provést další destilaci zvanou rektifikace [30].

2.7.6 Rektifikace

Během rektifikace se nepoužívá míchadlo a proces probíhá velmi pomalu. Platí, že čím má být destilát jemnější, tím pomaleji má rektifikace probíhat. Nejčastěji se dělí na tři frakce: úkap, prokap (jádro), dokap. Všechny frakce přecházejí přes lihové měřidlo.

Takto získáme tři základní frakce:

- úkap, který obsahuje látky těkavější než etanol (metanol , aromata)
- jádro s obsahem etanolu kolem 50-70%
- dokap tvoří organické kyseliny a přiboudliny, které mají negativní vliv na produkt [33]

2.7.7 Ředění destilátu

Destilát z rektifikace není vhodný k přímé konzumaci. Jeho buket je neharmonický, proto je nutné delší uskladnění, které plně rozvine celou škálu chuťových látek. Na pitnou stupňovitost se destilát ředí měkkou vodou, nejlepší je destilovaná, jelikož zde nedochází k zákalu vyloučených solí.

3 VLIV FTALÁTŮ A KARBAMÁTŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ

Velkému rozšíření ftalátů do okolního prostředí došlo hlavně díky širokému spektru využití plastických hmot, kde sehrávají úlohu změkčovadel. Riziko vyplývající z přítomnosti ftalátů je aktuální již řadu let, k významnějšímu sledování těchto látek se přistoupilo teprve při podezření na možný karcinogenní účinek bis(2-ethylhexyl)ftalátu. Dalším mezníkem se stala 90. léta, kdy byly prokázány slabé estrogenní aktivity u dibutylftalátu a benzylbutylftalátu. Ftaláty se proto řadí do skupiny látek jako jsou PCB, DDT, hexachlorbenzen, aj., jež vykazují podobnou aktivitu [34].

3.1 Způsoby a mechanismy vstřebávání ftalátů

Potrava

Do potravin se ftaláty dostávají jednak přímo z obalů – např. obalové vaničky na mléčné výrobky (Termix), tuky apod., ale také určité riziko vzniká při použití hadic z PVC k zavlažování zeleniny nebo ovoce.

Ke kontaminaci může docházet také při znečištění vstupních surovin, během zpracování. Při sledování průniku bis(2-ethylhexyl)ftalátu do oleje z obalu, bylo zjištěno, že rychlost kontaminace značně ovlivňuje vzrůst teploty a protřepávání obalu během přepravy.

Podstatný je rovněž vliv média – čím více tuku se v potravíně nachází, tím se riziko výluhu zvětšuje.

Ke kontaminaci mléka může docházet při hnojení pastvin odpadními kaly z čističek odpadních vod. Zvířata takto znečištěnou potravu konzumují, přičemž jejich organismus není schopen zvýšené množství ftalátů metabolizovat a proto dochází k jejich ukládání. Při laktaci, kdy dochází k mobilizaci tuků, se také může značné množství těchto škodlivin uvolňovat do mléka [10, 34].

Dýchací cesty

Obsah ftalátů v PVC je poměrně vysoký – cca 30-51 % a jelikož zde nejsou pevně vázány, snadnost uvolňují do prostředí a následně dochází k vdechování a přenosu do krve [35].

Sliznice

Přímým stykem s sliznicí dochází k přenosu do krve, což je vážným problémem u určité skupiny zdravotnických a lékařských pomůcek – měkčené hadičky využívané při hemodialýze nebo peritoneální dialýze, intravenózní a transfuzní sety apod. Pacienti bývají při těchto zákrocích vystavováni vysokým dávkám ftalátů

Ftaláty patří do skupiny endokrinních disruptorů (EDCs), což znamená, že fungují podobně jako hormony. Proto může v endokrinním systému snadno dojít k narušení jejich fyziologické funkce. Již relativně nízká dávka během těhotenství nebo v dětství působí na plod, respektive na dítě způsobem, který se nemusí projevit okamžitě, ale může mít dopad na další generace např. snížením reprodukce, modifikovaným vývojem orgánů apod.

Ftaláty ohrožují děti i dospělé tím, že narušují funkci jater a ledvin, zvyšují možnost vzniku alergií, či astmatu. Právě DEHF, je považován z reprodukčně-vývojového hlediska za jednu z nejnebezpečnějších látek.

Tyto látky do jisté míry ovlivňují mužský reprodukční systém, indikující hypospadias, kryptorchismus, sníženou produkci testosteronu a snížení počtu spermií. Studie také poukazují na vztah mezi expozicí ftalátům a kvalitou lidského spermatu nebo ostatními ukazateli reprodukčního poškození (Swan a kol., 2005). Většina z těchto zjištění je v souladu s pozorováním u zvířat [36].

Většina ftalátů v potravinách pochází z materiálů, jež přichází bezprostředně do styku s potravinou, proto je snaha regulovat jejich množství právě u obalů.

Problém při stanovení ftalátů v potravinách představuje skutečnost, že stopy těchto látek se nachází rovněž v chemikáliích, rozpouštědlech a laboratorních pomůckách, jež jsou nezbytné pro rozbor vzorků. Rozlišit pak analytický signál ftalátů obsažených ve vzorku od ftalátů pocházejících z používaného vybavení je značně obtížné a reálná nejistota může vést k dezinterpretacím.

Nyní v ČR platí Vyhláška č.38/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy, jakožto prováděcí vyhláška Zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví. Součástí vyhlášky je tzv. limit celkové migrace, kdy plasty a výrobky z plastů určené pro styk s potravinami nesmí uvolňovat do potravin své vlastní

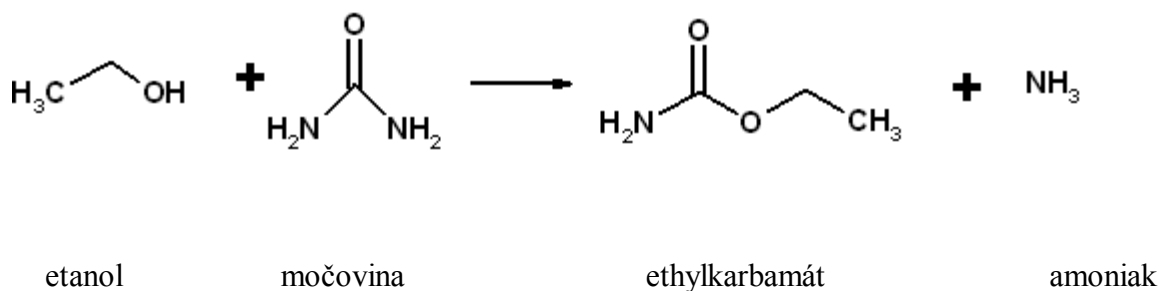
složky v množství přesahujícím 10 mg/dm^2 povrchové plochy výrobku nebo 60 mg/kg potravin pro nádoby, víčka, těsnicí vložky, zátky a jim podobné části obalů.

Tato vyhláška obsahuje kromě seznamu povolených monomerů také Specifické migrační limity (SML) pro jednotlivé látky, nebo prohlášení, že daná látka nesmí být vůbec detekována (ND), přičemž její výskyt je limitován mezi detekce, jež je ověřována analytickou metodou (LOD). Jsou zde upraveny hodnoty pro kyselinu isoftalovou (SML= 5 mg/kg), diallyl ftalát (ND, LOD = $0,01 \text{ mg/kg}$), ftalovou a tereftalovou kyselinu (SML= $0,05 \text{ mg/kg}$). Seznam také obsahuje přísady, které je možno použít při výrobě plastů. Jedná se o 50% n-decyl-n-oktyl ftalát, 25% dioktyl ftalát. Tyto látky se nacházejí v oddílu A prováděcí vyhlášky, kdy smí být používány pro plastové výrobky, které přicházejí do styku s potravinami, s dětskou stravou až po obalový materiál [37, 38].

3.2 Karbamáty

Ethylkarbamát je charakterizován širokou biologickou působností. Ve 40. letech minulého století byl dokonce používán jako anestetikum vhodné hlavně pro děti – působí totiž na CNS jako sedativum s účinky blízkými barbiturátům. Později se u laboratorních zvířat začaly projevovat karcinogenní účinky tohoto anestetika. Nové studie prokázaly karcinogenní a genotoxické účinky u vinylkarbamátu a ethyl-N-hydroxykarbamátu, jež jsou intermediáty metabolismu ethylkarbamátu. Od roku 1975 je ethylkarbamát Mezinárodním centrem pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikován jako potenciální lidský karcinogen [39].

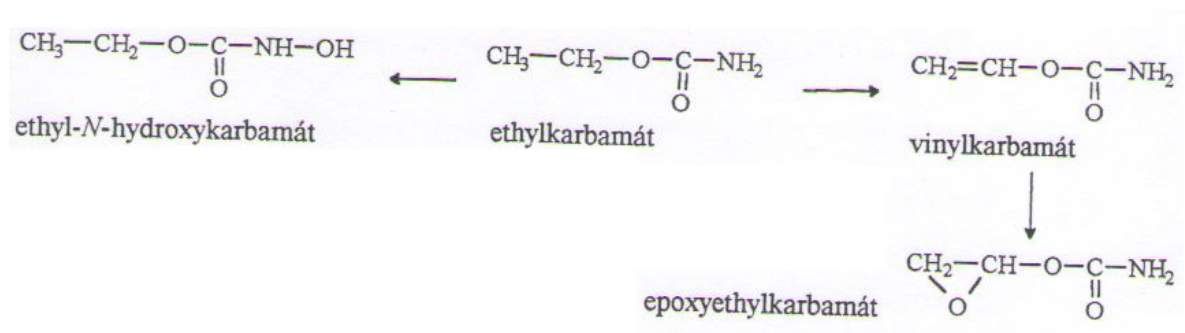
Reakce vzniku ethylkarbamátu (nukleofilní alifatická substituce) [10]



Tato reakce probíhá při vyšších teplotách, proto např. whisky, brandy nebo ovocné destiláty obsahují víc ethylkarbamátu, jelikož vznikají destilací při zvýšených teplotách. Ve víně také dochází k obdobné reakci, s tím rozdílem, že močovina vzniká jako metabolit argininu nebo citrulinu činností kvasinek, případně jiných mikroorganismů.

Současně také dochází k rozkladu ethylkarbamátu na etanol, oxid uhličitý, vodu a amoniak během 24 hodin. Většina se však vylučuje v nezměněné formě [40].

Karbamáty se mohou navazovat na bílkoviny. U carbarylů bylo prokázáno navázání mikrosomálních frakcí na bílkoviny v krysích játrech. Významná je rovněž jejich mutagenita, která se nemusí projevovat ihned, ale až po převedení na určité deriváty. Po přidavku N-methylkarbamátových insekticidů do krmiva, došlo k dvěma projevům mutagenity. Byl pozorován jednak pokles tvorby NAD a také inhibice karboxylestráz subcelulárních membrán [40].



Obrázek 7: Schéma aktivace ethylkarbamátu [10]

3.3 Toxicita pro člověka

Karbamáty – obecně organické látky odvozené od kyseliny karbaminové, se svými vlastnostmi podobají organofosfátům. Do organismu pronikají požitím, vdechováním i pokožkou. Místně dráždí sliznice i kůži. Celkové účinky zejména insekticidních karbamátů se shodují s organofosfáty, ale intoxikace probíhá i odeznívá podstatně rychleji.

Při manipulaci s těmito látkami je potřeba omezit nadměrné vypařování, tzn. Nepracovat při vysokých teplotách, zabránit vdechování výparů a aerosolů. Při práci je obsluha povinná používat ochranné oděvy a pracovní pomůcky a po skončení práce je důkladně odmořit.

Nebezpečí je zde značně vysoké, jelikož tyto přípravky pronikají i gumovými rukavicemi. K odmořování a při likvidacích havárií se používá 3-5% roztok hydroxidu sodného nebo soda, přičemž se právě využívá hydrolytického účinku těchto chemikálií [41].

3.4 Insekticidní karbamáty používané v ČR

Oxamyl LD₅₀ 5 mg/kg

Pirimicarb LD₅₀ 150 mg/kg

Tento karbamát účinkuje hloubkově i translaminárně. Používá se k hubení mšic jako dotykový a dýchací jed po dobu 3-7 dní. Mšice řešetláková a chmelová jsou k tomuto přípravku přirozeně odolné. Výhodou je, že nedochází k negativním účinkům na přirozené nepřátele mšic, jako jsou slunéčka, pestřenky, atd. [42].

Carbofuran LD₅₀ 8 mg/kg

Jedná se o insekticid karbamátové řady, který byl poprvé registrovaný v roce 1969 v USA.

Tento přípravek je v zemědělství používán k tlumení škůdců na rostlinách v ranných vývojových stádiích růstu. Aplikace karbofuranu je velmi rozsáhlá- od kukuřice, cukrovou řepu, až po brambory a slunečnici. Granulované přípravky se vpravují do půdy, takuté slouží k postřiku nebo zálivce. Usmrcuje žravý a savý hmyz jako dotykový, požerový a dýchací nervový jed. Půdním háďátkům brání vniknutí do kořenů rostlin. V půdě účinkuje asi 50 dní. Pro včely, ryby, ptáky a zvěř nebezpečný [43].

Methiocarb LD₅₀ 20 mg/kg Mesuroi

Tyto průmyslově vyráběné karbamáty hubí žravý a savý hmyz, roztoče a měkkýše jako dotykový a požerový nervový jed. Odpuzují ptáky i drobné hlodavce, ale pro včely, ryby a zvěř jsou nebezpečné [42].

4 IZOLACE A PŘÍPRAVA VZORKŮ KE STANOVENÍ

Při analýze destilátů se vzorky většinou aplikují přímo, bez jakékoliv předchozí úpravy. Někdy se používá zahušťování v proudu plynu (dusík) nebo ve vakuové odparce.

Při stanovení ftalátů ve vodě se používají skleněné vzorkovnice se skleněnými zátkami, případně vzorkovnice nerezové, které se plní až po hrdlo. Pro eliminaci kontaminace se nepoužívá plastové vybavení (hadičky, nádobky,...). Nelze-li se vyhnout plastovým částem odběrového zařízení, provádí se proplach minimálně pětinásobkem objemu vzorku. Tento krok je nutno uvést do protokolu o zkoušce. Vzorek se analyzuje co nejdříve po odběru. Je-li nutná konzervace, vzorky se uloží do tmy při teplotě do 4 °C po dobu maximálně 4 dnů. Vzorky se stejně jako u destilátů analyzují bez předběžné úpravy, pouze se homogenizují [44].

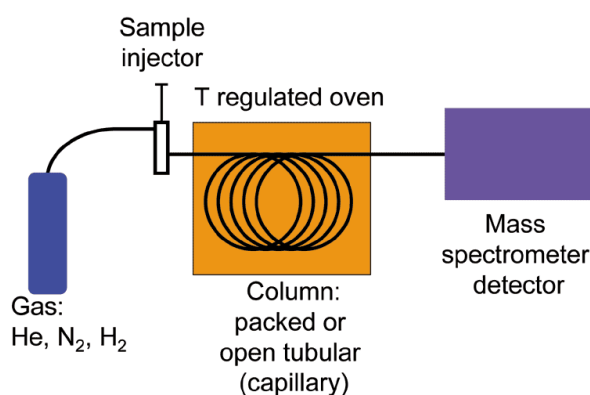
5 METODY STANOVENÍ

5.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrií kombinuje vysoce účinnou separační schopnost plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií pro identifikaci širokého spektra látek v rámci stanovovaného vzorku. Oblast použití je velice široká od analýzy drog, výbušnin, až po stanovení neznámých vzorků. Vlastní analýza probíhá ve třech po sobě navazujících etapách. Prvním krokem se převede analyzovaná látka do plynného skupenství, dále dojde k rozdělení směsi v koloně na jednotlivé složky a následně dochází k ionizaci plynné fáze a rozdělení podle hmotnosti iontů [45].

Instrumentace

GC-MS se skládá ze dvou hlavních částí: plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru.



Obrázek 8: Schéma GC-MS [46]

5.1.1 Plynový chromatograf

Slouží k dělení směsi látek o rozdílném bodu varu a rozdělovacím koeficientu.

Vzorek je dávkován přímo do nosného plynu, kde je následně transportován separační kolonou. Mobilní fází je zde plyn. Z důvodu snadného přenosu, musí být i vzorek převeden do plynné fáze. Dále prochází kolonou, v níž dochází k separaci jednotlivých složek. Slož-

ky, které opouští kolonu jsou detekovány pomocí detektoru, jež určuje kvalitativní a po kalibraci i kvantitativní zastoupení jednotlivých složek [45].

Plynový chromatograf se skládá z těchto komponent: zásobník s nosným plynem, čistící zařízení, dávkovací ventil, kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení.

Zásobník s nosným plynem

Jedná se o tlakovou nádobu obsahující helium, vodík, dusík, případně argon, jehož funkce spočívá v přenosu vzorku kolonou. Tento plyn musí být inertní vůči složkám. Volba nosného plynu závisí na zvolené koloně a druhu detektoru.

Čistící zařízení

Slouží k čištění nosného plynu a k zachycení nadměrné vlhkosti. Zbavuje také plyn reaktivního kyslíku, který poškozuje stacionární fázi v koloně [47].

Dávkovací ventil

Slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Nástřík se nejčastěji provádí pomocí speciální injekční stříkačky přes septum. Injektor obsahuje skleněnou vložku, která slouží k rychlému odpaření vzorku a následně k promíchání par s nosným plynem. Dále je možno použít dynamický head – space dávkovací systémy pro adsorpci a desorpci obsahující „proublávací“ zařízení, pomocí něhož jsou těkavé látky uvolňovány z roztoku a vyplavovány do adsorpční kolony. Zadržené látky se pak desorbují do mobilní fáze rychlým zahříváním adsorpční kolony.

Statické head – space dávkovací systémy, které obsahují termostatovou komůrku. Pro dosažení předem stanovené rovnováhy mezi plynnou a kapalnou fází, je určené množství plynné fáze nutno dávkovat do plynového chromatografu.

Kolona

Kolony se používají dvojího typu - náplňové a kapilární.

Náplňové jsou trubice o průměru 2 až 5 mm a délce 1 až 3 m obsahující sorbent nebo nosič pokrytý kapalnou fází. Zhotovují se z nerezové oceli nebo skla a mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Absorbentovou náplň tvoří silikagel, grafitizované saze, případně oxid hlinitý [48].

Kapilární kolony se zhotovují z křemenného skla a bývají potaženy polyamidem. Jejich vnější průměr je do 5 mm a délka 20 až 60 m. Stacionární fáze je zde rozprostřená na vnějších stěnách kapiláry. Účinnost je kolem 1000 až 3000 teoretických pater na 1 m.

Detektor

Z kolony je plyn veden do detektoru, který následně reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, který je zaznamenáván. Podmínkou efektivní funkce detektoru je dostatečná citlivost s možností dosahovat dostatečně nízké detekční limity pro určité analyty. Důležitá je rovněž vysoká selektivita pro stanovované analyty. Nejčastěji používané jsou tepelně-vodivostní detektory, plamenionizační a detektory elektronového záchytu [47].

Plamenově – ionizační detektor (FID)

Tento detektor má široké uplatnění od potravinářského průmyslu až po průmysl pohonných hmot.. FID je velmi vhodný pro analýzu uhlovodíků jako je např. methan, ethan, acetylen, ale také pro organické látky obsahující uhlovodíkové řetězce a pro těkavé organické sloučeniny.

Analyt je zde spalován ve vodíku, dochází ke vzniku volných elektronů a iontů. Nabité částice vytváří v nosném plynu měřitelný elektrický proud mezi elektrodami detektoru. Rozdíl signálu mezi čistým plynem a plynem se složkami analyzovaného vzorku podává informace o složení analyzované látky.

Plamenově – ionizační detektory jsou velmi citlivé, ale nevýhodou je destrukce vzorku. Podstatnou roli zde hraje výběr nosného plynu, který musí splňovat určité požadavky: musí být inertní a nesmí se adsorbovat na kolonu. Obvykle se používá helium, dusík nebo vodík [49].

Detektory elektronového záchytu

EDC – Electron Capture Detektor – zdrojem ionizující energie je zde radioaktivní zářič ^3H . Proud elektronů β^- má značně vysokou energii a není zachycováno elektronegativními atomy složky. Srážkami molekul dusíku jako nosného plynu se zářením β^- dojde k ionizaci a dochází k uvolňování pomalých elektronů. Tyto elektrony mají schopnost zachytit elektronegativní atomy složky a následně dochází ke snížení ionizačního proudu.

Tepelně vodivostní detektor

TDC – Thermal Conductivity Detektor – tento detektor je do jisté míry univerzální. Nosný plyn zde prochází přes vlákno, které je žhaveno stálým elektrickým proudem. Přítomnost detekované složky znění tepelnou vodivost prostředí, což se projeví zněnou teploty a elektrického odporu vlákna. Ke stanovení se obvykle používají dvě vlákna – přes jedno proudí nosný plyn a přes druhé plyn z kolony. Následně dochází v Wheatstonově můstku k porovnání jejich elektrických odporů. Přítomnost složky se projeví jejich rozladěním [47].

Ionizační detektor

Podstatou těchto zařízení je vedení elektřiny v plynech. Základ tvoří izolovaná nádoba, kterou proudí plyn přes dvě elektrody, mezi nimiž je elektrické pole.

5.1.2 Mobilní fáze

Účinnost kolony a retenční čas dané složky je závislý na průtokové rychlosti nosného plynu. Platí zde závislost, že retenční čas je přímo úměrný délce kolony a rozlišení je úměrné druhé odmocnině délky kolony. Průtoková rychlost u náplňových kolon se vyjadřuje v milimetrech za minutu při pokojové teplotě a atmosférickém tlaku. Pro názornost - průtoková rychlost 60 ml/min u kolony s průměrem 4 mm je rovná průtokové rychlosti u kolony o průměru 2 mm a rychlosti 15 ml/min.

Míra účinnosti separačních kolon se stanovuje veličinou zvanou počet teoretických pater n .

n je vyjadřováno z retenčního času dané látky a šířky píku v její určité výšce. Nečastěji se tato hodnota analyzuje uprostřed píku. Počet teoretických pater n je přibližně úměrný délce kolony L . Nejčastěji používanými nosnými plyny pro náplňové kolony jsou helium nebo dusík, zatímco pro kapilární kolony dusík, helium a vodík [50].

5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (zkratka *MS* z anglického *Mass spectrometry*) patří do skupiny analytických metod založených na dělení na základě poměru mezi hmotností a nábojem fragmentu. Celý proces je rozdělen do pěti po sobě navazujících kroků – odpařování vzor-

ku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů na hmotnostním filtru, detekce iontů.

Prvním krokem je převedení analyzované látky na ionty, následně dochází k jejich akceleraci, dále se separují v analyzátoru, konečnou fází je detekce v detektoru. Tyto procesy probíhají v izolovaném prostoru, kde je trvale udržováno vakuum.

Informace získané touto cestou slouží k stanovení molekulové hmotnosti, případně vypovídají o struktuře z fragmentových iontů – kvalitativní hledisko nebo ke stanovení kvantitativnímu při aplikaci vnějších nebo vnitřních standardů na vybraný fragment nebo molekulový iont. Detekční limity se pohybují na hranici mezi řády pikomolů až femtomolů [51].

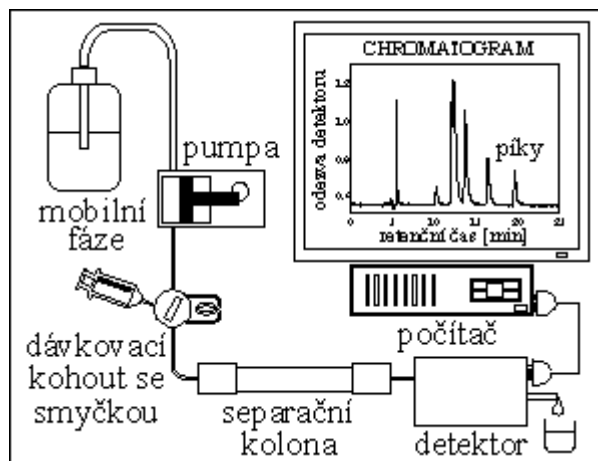
5.3 Kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je jedna z nejčastěji používaných separačních metod. Tato, vysoce účinná, robustní metoda má velmi dobrou opakovatelnost. Společným znakem všech technik HPLC je použití kapalně mobilní fáze, účinných kolon a vysokotlakých čerpadel. Na základě toho dochází k separaci analytů vlivem distribuce mezi mobilní a stacionární fází.

Metody HPLC můžeme dělit na:

- systém kapalina- kapalina (kapalná stacionární fáze, která je zakotvená na inertním nosiči)

- systém kapalina- tuhá látka (zde patří například iontoměnič, reversní fáze, gelová permeační chromatografie, adsorpční chromatografie) [52]



Obrázek 9: Schéma kapalinového chromatografu [48]

Vysoké rychlosti a účinnosti je dosahováno požitím kolon s náplněmi o velmi jemné zrnitosti (3-15 μ m) a také použití čerpadel, jež pracují s vysokými tlaky.

Kapalinový chromatograf je složen ze:

- zásobníků mobilní fáze
- směšovacího zařízení
- vysokotlakého čerpadla
- dávkovácího ventilu
- předkolony
- kolony
- detektoru
- vyhodnocovacího zařízení (PC)

Mobilní fáze

Mobilní fázi tvoří ve většině případů kapalně organické látky a jejich směsi nebo ve spojení s vodnými roztoky pufrů. Složení mobilní fáze má vliv na: účinnost kolony; kapacitní poměr; retenční poměr; rozlišení; dobu analýzy a citlivost.

Vysokotlaké čerpadlo

Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly při tlaku zpravidla vyšším než 35 MPa. K výrobě se používá nerezová ocel nebo plast, přičemž podmínkou je, že materiál nesmí žádným způsobem ovlivňovat analýzu. Čerpadla bývají obvykle dvojčinná, aby se zamezilo vzniku nežádoucích tlakových rázů (pulzů). Zřídka se používá čerpadlo založeno na principu injekční stříkačky, nevýhodou tohoto typu je nízký objem a z toho plynoucí časté doplňování [47].

Dávkovací ventil

Dávkovací ventily představují dávkovací smyčku spojenou s injekční stříkačkou. Pomocí ní je dávka o objemu desítek mikrolitrů aplikována přímo do kolony.

Kolony

Jejich účinnost se odvíjí od aplikované stacionární fáze, délky, materiálu a počtu spojovacích částí. Nejčastěji se používají kolony skleněné, případně z nerezové oceli. Délka kolon se pohybuje od 10 do 25 cm, vnitřní průměr 3 až 4,6 mm. Volba kolony závisí od použité techniky a požadavků na analýzu.

Předkolona

Hlavní funkcí předklony je chránit vlastní kolonu před mechanickými nečistotami a nerozpustnými látkami [52].

Detektor

Detektor slouží k detekci a stanovení jednotlivých složek.

Požadavky kladené na detektory jsou: selektivita, nízká citlivost k mobilní fázi a vysoká citlivost k analytům.

Nejčastěji používanými detektory jsou:

Refraktometrický detektor – je založen měření indexu lomu analytu a rozpouštědla. Tento typ detektoru je velmi univerzální, má však nízkou citlivost a nutnost udržovat konstantní teplotu během stanovení.

Spektrometrický – **pracuje** na principu snímání absorpčního spektra v závislosti na čase, výsledkem je dvoj – nebo trojrozměrný záznam. Používá se zejména k posouzení čistoty zaznamenaného píku analyzované látky.

Fluorescenční – **založen** na principu fluorescence, jedná se o velice citlivý selektivní detektor [53].

Konduktometrický - tento typ je neselektivní, poměrně jednoduchý, uplatňuje se při analýzách vody.

6 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo charakterizovat vlastnosti ftalátů a karbamátů z hlediska obecných a fyzikálně-chemických vlastností, výskytu a rozšíření. Zjistit jejich výskyt u vybraných druhů ovocných destilátů použitím analytických metod HPLC a GC-FID. Zohlednit způsob skladování kvasu a použití vhodných destilačních postupů pro základní výrobu destilátů. Tyto postupy zahrnují přípravu surovin, technologické vybavení a operace během destilace. Součástí teoretické části je i popis vlivu těchto látek na lidské zdraví a okolí. V praxi se na stanovení těchto látek často používá metoda GC-MS, přičemž cílem této práce bylo také prověření i méně často používaných metod, jakými jsou GC-FID a HPLC s kombinovanou UV/ VIS a MS detekcí.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 METODIKA

7.1 Použité přístroje a pomůcky

- Standardní laboratorní vybavení

Analytické váhy Adam, AFA 210 LC, Schoeller instruments

Chladnička Whirpool

Digestoř Merci s.r.o

Hliníková fólie

Vialky 1,8 ml (tmavá) pro HPLC

Vialky 1,8 ml (světlá) pro GC- FID

Mikropipety Biohit proline (objem 0,5-10 μ l , 100 μ l , 100-1000 μ l)

- Speciální zařízení

Modulový přístroj pro HPLC (Dionex) zahrnující:

Pumpa Ultimate 3000 RS Pump

Dávkovací ventil Ultimate 3000 RS Autosampler

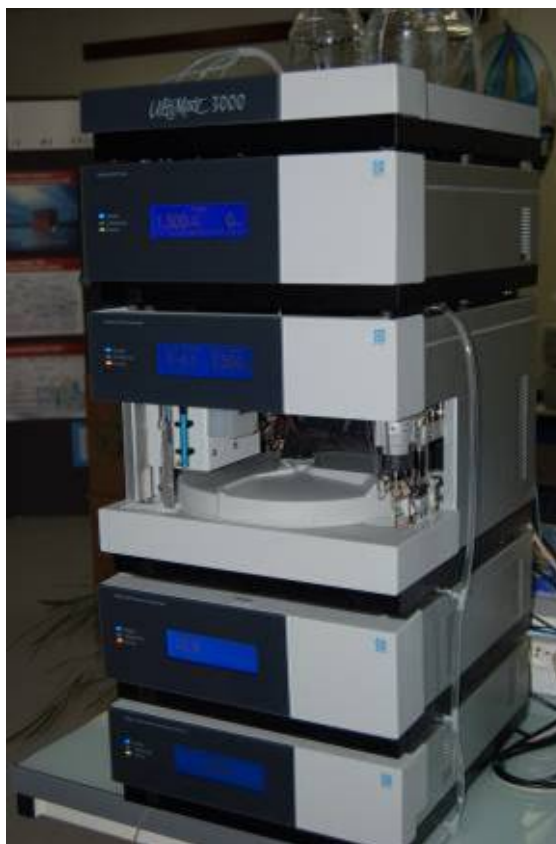
Kolona C8, 5 μ m , 2,1x 150 mm, Waters, Ireland

Kolona C8, 5 μ m , 4,6x 150mm, Waters, Ireland

Detektor Ultimate 3000 RS Diode array Detektor

Hmotnostní spektrometr amaZon X, Bruker

PC s vyhodnocovacími programy Chromeleon a Hy Star3.2



Obrázek 10: HPLC přístroj Dionex 3000

Přístroj pro GC- FID

Plynový chromatograf Gas chromatograf GC- 2010A series, Shimadzu, Japan

Kolona SPB- PUFA SUPELCO, 0,2 μm , 0,25mm x 30m

Nosný plyn- dusík

Teplotní program - 40°C/0,75min; 60°C/1min; 150°C/5min; 220°C

PC

- **Chemikálie a standardy**

Nitril kyseliny octové (99,9 %), Lach- Ner s.r.o, Neratovice, ČR

Metanol (99,9%), Fisher Scientific, UK

Dichlormethan (99%), Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR
n- hexan (99%), Penta Chrudim, ČR
síran sodný – bezvodý (99,8%), Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR
Dibutylftalát (99,8%), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bis-(2-ethylhexyl)- ftalát (99,7), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Benzyl butyl ftalát (98%), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Uretan (99%), Sigma Aldrich, St. Louis, USA

7.2 Použité vzorky

Analyzované vzorky jsou původem ze severovýchodní Moravy (nadmořská výška pěstovaného ovoce 352 – 618 m.n.m) byly vypáleny v pěstitelské pálenici Ing.Jiřího Pospíšila ve Vendryni. Výjimku tvoří vzorek číslo 7, zde se jedná o archivní druh slivovice (pěstitel Jan Spratek , hliníkový vařák, měděný chladič, dřevěná kvasná nádoba, doba kvašení cca 4 měsíce).

Vzorky:

- Vzorek číslo 1, slivovice ročník 2009, pěstitel Jan Kantor, doba kvašení 143 dnů, kvasná nádoba o objemu 50 litrů (pro potravinářské účely)
- Vzorek číslo 2, jablkovice ročník 2008 , pěstitel Vladislav Ciešlar, doba kvašení 119 dnů, kvasná nádoba o objemu 150 litrů (pro potravinářské účely)
- Vzorek číslo 3, slivovice ročník 2009, pěstitel Jan Spratek, doba kvašení 121 dnů, kvasná nádoba o objemu 50 litrů
- Vzorek číslo 4, slivovice ročník 2009, pěstitel Gustav Štefěk, doba kvašení cca130 dnů, kvasná nádoba o objemu 120 litrů
- Vzorek číslo 5, hruškovice 2009, pěstitel Josef Kulig, doba kvašení 85 dnů, kvasná nádoba o objemu 50 litrů (pro potravinářské účely)

- Vzorek číslo 6, hruškovice 2008, pěstitel Josef Kulig, doba kvašení 94 dnů, kvasná nádoba o objemu 50 litrů (pro potravinářské účely)
- Vzorek číslo 8, slivovice 2009, pěstitel Jan Kantor, doba kvašení cca 113 dnů, kvasná nádoba o objemu 60 litrů (nerezová)

Všechny vzorky byly přepravovány v skleněných nádobách o objemu 250 ml, pod víčko byla použita hliníková fólie, která měla zamezit možné kontaminaci z plastového těsnění na víčku. Vzorky byly přechovávány v chladničce (Whirpool) při teplotě do 7 °C, s cílem zamezení nadměrného těkání.

8 ANALÝZA JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ

8.1 Příprava jednotlivých standardů a vzorků

8.1.1 Příprava standardů ftalátů a ethylkarbamátu

Standardy byly naváženy na analytických vahách s přesností 0,0001 g. Navážka standardů byla 0,002 g na 2 ml rozpouštědla. Pro HPLC jako rozpouštědlo byl použit n-hexan, pro GC-FID byl jako rozpouštědlo použit dichlormethan. Následně bylo odebráno 0,01 ml roztoku příslušného rozpuštěného standardu a převedeno do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno po rysku příslušným rozpouštědlem. Tímto bylo dosaženo 1000 násobného zředění. Výsledná koncentrace ftalátů činila 1 μg /ml.

8.1.2 Příprava vzorků pro HPLC

Vzorky pro metodu HPLC byly pipetovány v objemu 1,5 ml do hnědých vialek o objemu 1,8 ml. Nebyla zde provedena žádná úprava vzorků ani ředění. Nástřik byl proveden přímo.

8.1.3 Příprava vzorků pro GC-FID

Vzorky pro metodu GC-FID byly pipetovány v množství 25 ml do dělicí nálevky z teflonovým kohoutem, následně bylo přidáno 12,5 ml dichlormethanu. Obsah byl důkladně protřepán. Spodní fáze byla odpuštěná do kádinky o objemu 50 ml a přidán bezvodý síran sodný. Obsah byl důkladně promíchán skleněnou tyčinkou. Vzorek o objemu 9 ml byl přelit do zkumavky a zahušťován v proudu dusíku na výsledný objem 1,5 ml. Následně byl vzorek převeden do čiré vialky o objemu 1,8 ml a analyzován.

8.2 Optimalizace podmínek pro metodu HPLC

Primární fází, během optimalizace metody pro analýzu jednotlivých ftalátů a ethylkarbamátu, bylo určení vhodných podmínek pro analýzu. Analýza probíhala na koloně C8, i když v literatuře byla jako vhodnější uváděna kolona C5. Proto bylo nutné experimentálně ověřit různé podmínky analýzy a z nich vybrat nejvhodnější.

8.2.1 Experimentální analýzy pro volbu optimálního nastavení (pro ftaláty)

Typ kolony: C8, 5 μm , 4,6x150mm, Waters, Ireland

Tabulka 10: Analýza pro volbu optimální metody při stanovení ftalátů

Složení mobilních fází (rozmezí)	Průtoky [ml/min] (rozmezí)	UV [nm]	Nástřiky [μl] (rozmezí)	Délky jednotlivých analýz [min] (rozmezí)
od 90% ACN k 10% metanolu s 2% vody po 50% ACN k 50% metanolu s 2% vody	od 0,2 do 0,6	210, 230, 265, 285	od 10 do 15	od 3 do 15

8.2.2 Experimentální analýzy pro volbu optimálního nastavení (pro urethan)

Kolona C8, 5 μm , 2,1x 150mm, Waters, Ireland

Tabulka 11: Analýza pro volbu optimální metody při stanovení urethanu

Složení mobilních fází (rozmezí)	Průtoky [ml/min] (rozmezí)	UV [nm]	Nástřiky [μl] (rozmezí)	Délky jednotlivých analýz [min] (rozmezí)
od 90% ACN k 10% metanolu s 2% vody po 40% ACN k 60% metanolu s 2% vody	od 0,2 do 0,3	210, 230, 265, 280	od 10 do 15	od 7 do 15

9 VÝSLEDKY A KOMENTÁŘE

Zhodnocení a výběr vhodných podmínek pro analýzu

Při výběru podmínek pro vlastní stanovení bylo nutno zohlednit optimální složení mobilní fáze, průtok, nástřik a délku analýzy. Detekce v UV oblasti byla ponechána na konstantních hodnotách vlnových délek 210, 230, 265 a 280 nm pro všechny analýzy.

Tabulka 12: Podmínky pro stanovení ftalátů

Mobilní fáze (složení)	Průtok [ml/min]	UV [nm]	Nástřik [μ l]	Délka analýzy [min]
50% ACN 50% metanol s 2% vody	0,2	210, 230, 265, 280	10	15

Tabulka 13: Podmínky pro stanovení ethylkarbamátu

Mobilní fáze (složení)	Průtok [ml/min]	UV [nm]	Nástřik [μ l]	Retenční čas [min]
50% ACN 50% metanol s 2% vody	0,2	210, 230, 265, 280	10	7

Analýza HPLC-MS

Molární hmotnosti jednotlivých sloučenin:

Butyl benzyl ftalát 312,37 g/mol

Dibutyl ftalát 278,34 g/mol

Bis(2-ethylhexyl) ftalát 390,56 g/mol

Etylkarbamát 89,09 g/mol

Podmínky analýzy HPLC-MS:

Software pro HPLC

Chromeleon 6.8

Chromeleon 6.8 se řadí mezi nejdokonalejší chromatografické software současnosti. Umožňuje využívat dynamické databázové uspořádání chromatografických dat, klient/server zapojení přístrojů do sítě, upravovat ovládací panely pro řízené přístroje, řídit pomocí jednoho software více než 250 typů chromatografických přístrojů od různých výrobců, tisknout uživatelsky upravitelné reporty nebo je přímo ukládat při zachování vzhledu jako xls soubory.

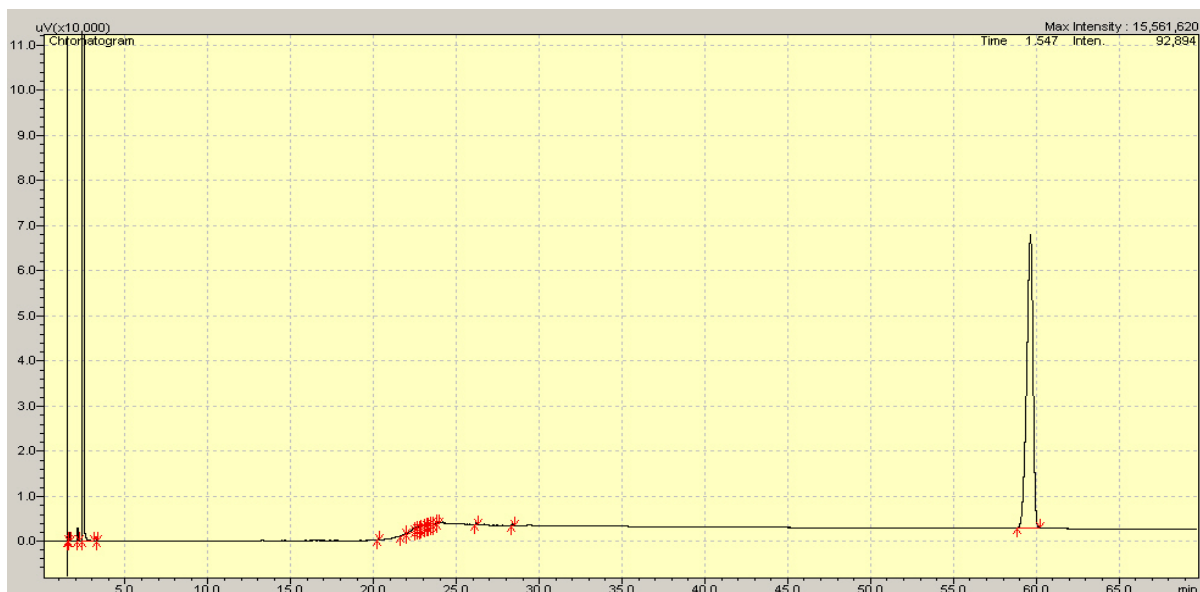
HyStar 3.2

HyStar 3.2 je program navržený pro úpravu a řízení HPLC analýz a jiných spektrometrických metod jako hmotnostní spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance.

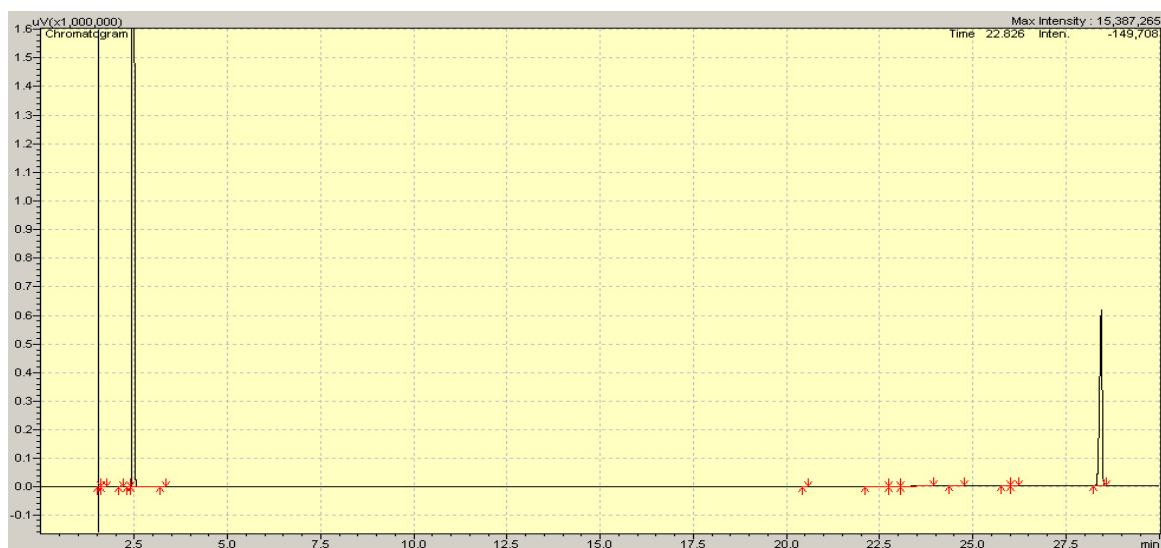
Nutno uvést, že se ftaláty v analyzovaných vzorcích vyskytovaly v asociované formě se sodíkem, tudíž výsledná hmotnost je o cca 23 g/mol vyšší oproti standardní molární hmotnosti. Jednotlivé chromatogramy jsou uvedeny v přílohách.

Tabulka 14: Retenční časy jednotlivých standardů (GC-FID)

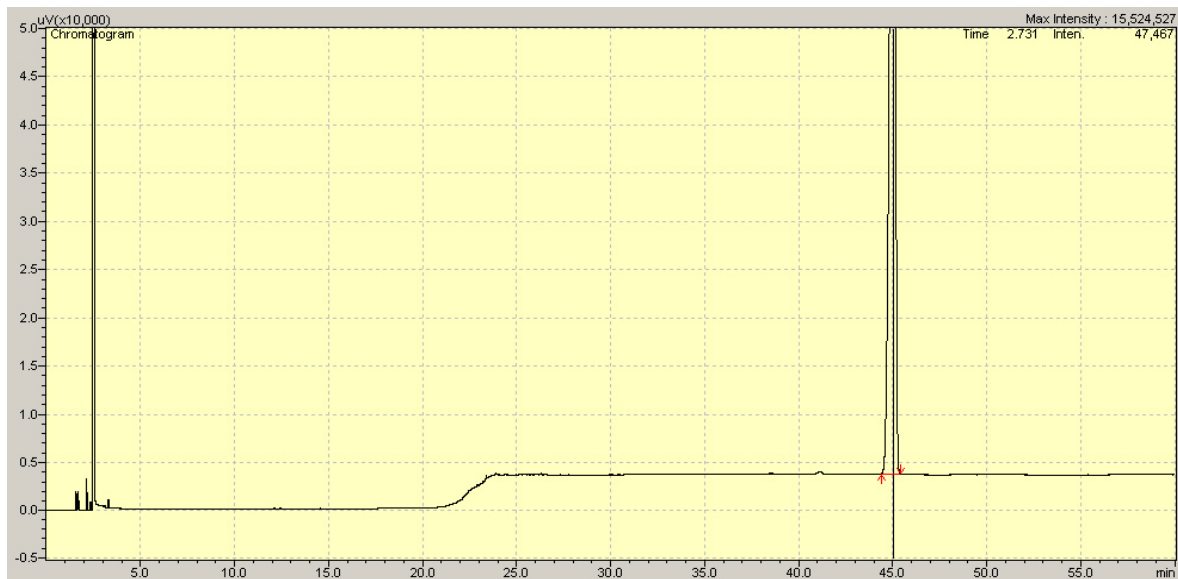
Standardy	Butyl benzyl ftalát	Dibutyl ftalát	Bis(2-ethylhexyl)	Etylkarbamát
Retenční čas [min]	59,647	28,45	45,049	17,76



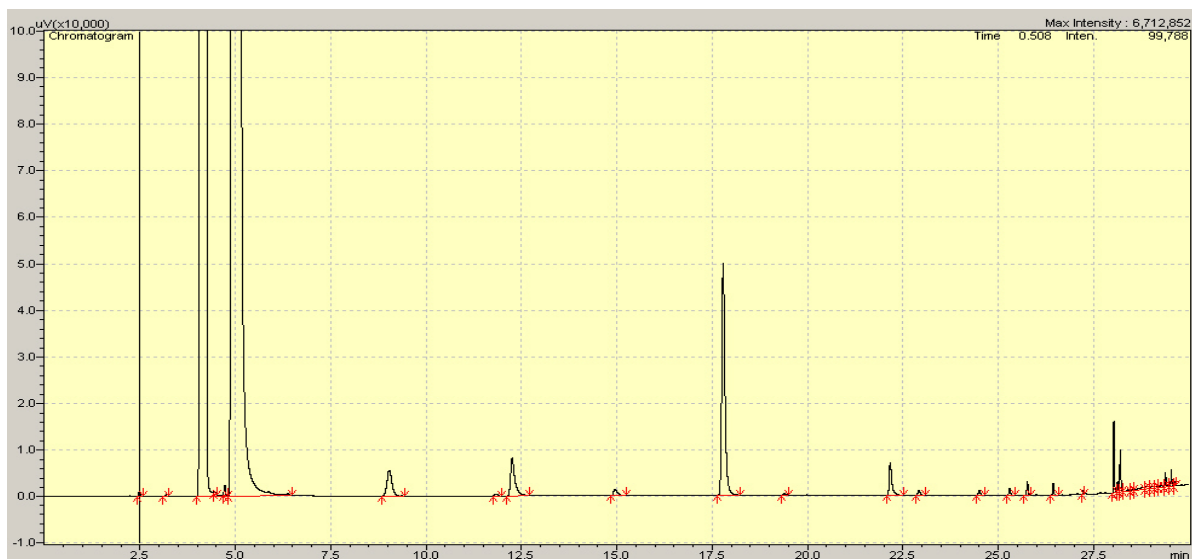
Obrázek 11: Chromatogram BBF



Obrázek 12: Chromatogram DBF



Obrázek 13: Chromatogram DEHF

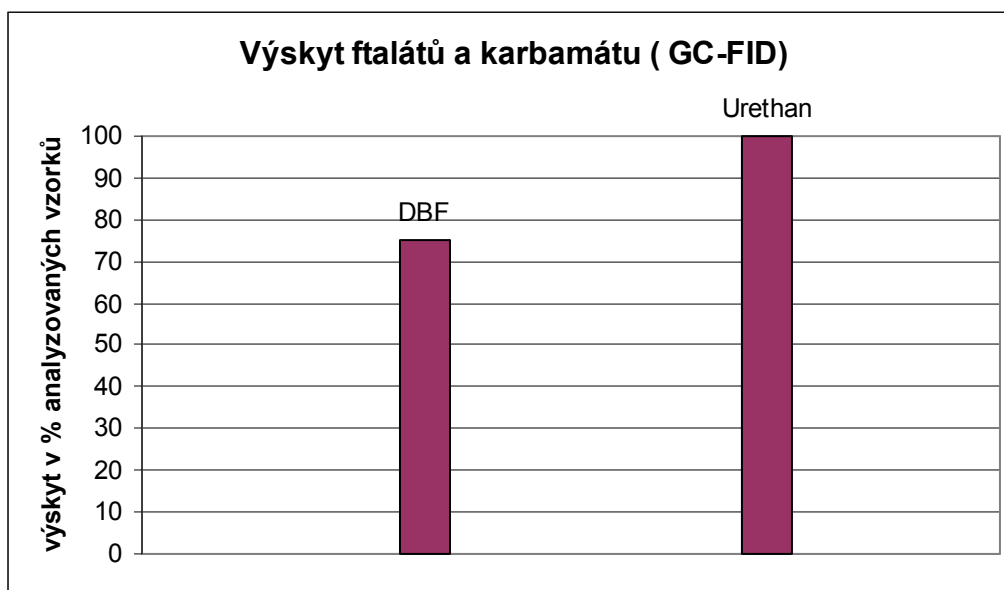


Obrázek 14: Chromatogram ethylkarbamátu

Tabulka 15: Analyzované vzorky (metoda GC-FID)

Vzorek	BBF	DBF	DEHF	Etylkarbamát
1.	Nedetekován	Nedetekován	Nedetekován	Detekován
2.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
3.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
4.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
5.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
6.	Nedetekován	Nedetekován	Nedetekován	Detekován
7.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
8.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován

Graf 1: Celkové zastoupení ftalátů a etylkarbamátu u analyzovaných vzorků (GC-FID)



Tabulka 16: Analýza vzorků (GC-FID)

Analyt	n	n pozitivní	% n pozitivní
BBF	8	0	0
DBF	8	6	75
DEHF	8	0	0
Urethan	8	8	100

Analýzou GC-FID bylo prokázáno, že zastoupení jednotlivých ftalátů a ethylkarbamátu je na velmi nízkých úrovních, BBF a DEHF nebyly prakticky detekovány, což nasvědčuje, že byl správně zvolen technologický postup, počínaje výběrem kvasných nádob až po provedení vlastní destilace. U vzorků 1 a 7 nebyl prokázán ani DBF. Nutno dodat, že vzorek č. 7 kvasil v dřevěné nádobě a byl destilován v roce 1988. Tyto faktory se mohly podílet na celkové eliminaci DBF v destilátech.

Analýza HPLC

Tabulka 17: Retenční časy jednotlivých standardů

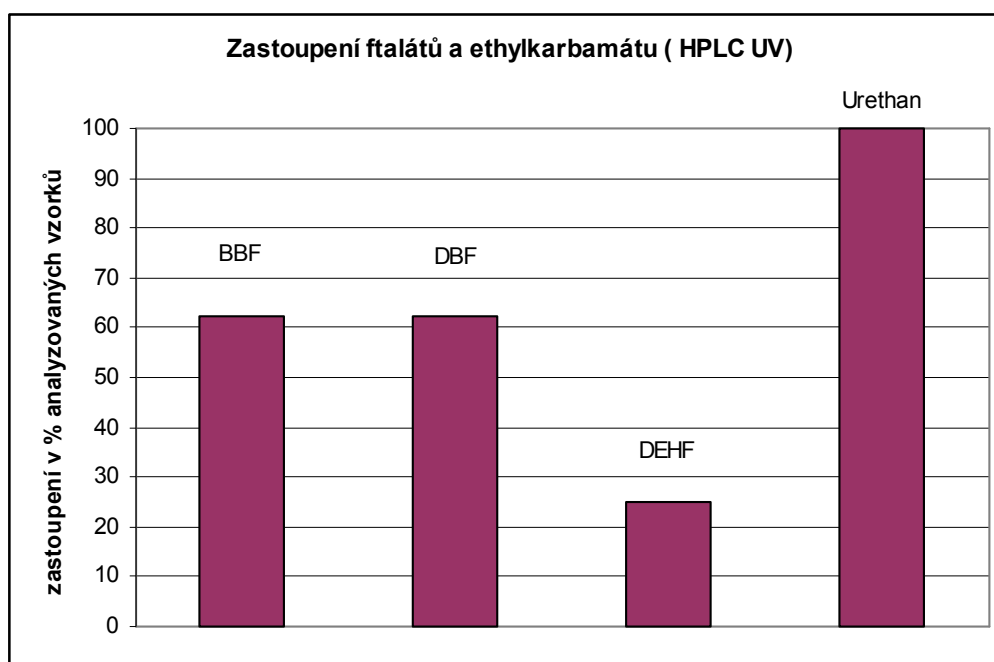
Standard	BBF	DBF	DEHF	ethylkarbamát
Retenční čas [min]	3:32	4:31	3:52	3:21

Tabulka 18: Výsledky analýzy HPLC-UV

Vzorek	BBF	DBF	DEHF	Etylkarbamát
1.	Nedetekován	Nedetekován	Detekován	Detekován
2.	Nedetekován	Detekován	Detekován	Detekován
3.	Detekován	Nedetekován	Nedetekován	Detekován
4.	Detekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
5.	Nedetekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
6.	Detekován	Detekován	Nedetekován	Detekován
7.	Detekován	Nedetekován	Nedetekován	Detekován
8.	Detekován	Detekován	Nedetekován	Detekován

Graf 2: Celkové zastoupení ftalátů a etylkarbamátu u analyzovaných vzorků

(HPLC_UV)



Tabulka 19: Analýza vzorků (HPLC UV)

Analyt	n	n pozitivní	% n pozitivní
BBF	8	5	62,5
DBF	8	5	62,5
DEHF	8	2	25
Urethan	8	8	100

10 ZÁVĚR (SHRNUTÍ)

Cílem práce bylo zjistit výskyt ftalátů a ethylkarbamátu u ovocných destilátů. Pro stanovení byly použity přístroje GC-FID a HPLC UV/MS. Tyto přístroje se pro stanovení těchto látek v destilátech používají v menší míře z důvodu citlivosti (GC-FID) a nedostupnosti knihoven MS spekter pro HPLC-MS. Využívá se hlavně metoda GC-MS, přičemž tuto metodu používá i SZPI.

Dosažené výsledky je možné shrnout následovně:

Byl vyvinut a ověřen postup stanovení ftalátů a ethylkarbamátu metodou GC-FID, přičemž tato metoda se jevila méně citlivá v porovnání s HPLC-UV/MS.

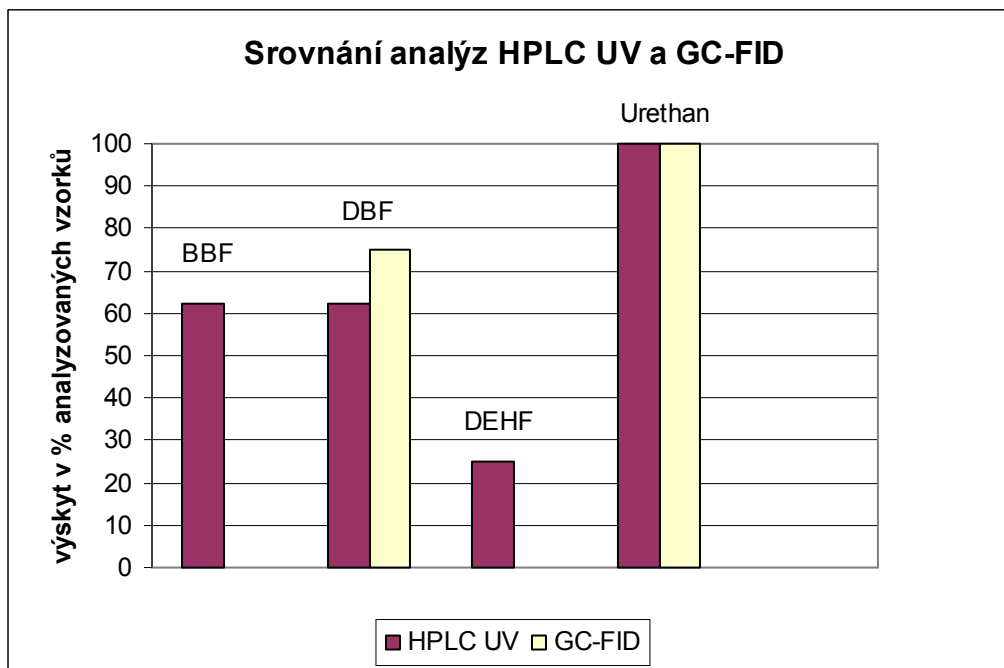
Metodou HPLC-UV/MS bylo detekováno celkově větší množství ftalátů (v porovnání z GC-FID)

Analýzami bylo prokázáno, že koncentrace ftalátů a ethylkarbamátu ve zkoumaných vzorcích jsou na velmi nízkých úrovních – řádově tisícin procent (viz příloha č.XXII). Tyto nízké hodnoty potvrzují dodržení správného technologického postupu, zahrnující použití vhodných kvasných nádob (pro potravinářské účely nebo dřevěný sud) a rovněž odborně provedenou destilaci v pěstitelské pálenici. U všech vzorků byl prokázán ethylkarbamát, což souvisí s tím, že kvas procházel procesem kvašení, a proto ho nelze zcela vyloučit. Důležité je, aby bylo jeho množství na co nejnižší úrovni. Proto je doporučeno u kvasů z peckového ovoce, odstranění minimálně poloviny pecek, čímž se výrazně hladina ethylkarbamátu sníží.

Na základě provedených analýz je proto možné všeobecně doporučit zaměřit se na dodržování správného technologického postupu od výběru suroviny, přes volbu kvasných nádob, až po odborně provedenou destilaci. Dále po prostudování tuzemských a také zahraničních článků zabývajících se touto problematikou se nedoporučuje konzumace destilátů z podezřelých zdrojů, jakými jsou tržnice a neověření soukromí dodavatelé, jelikož právě zde většinou bývají až několikanásobně překračovány limity ftalátů (viz tabulka 4).

Při porovnání metod GC-FID a HPLC UV se jeví jako vhodnější metoda HPLC, neboť s ní, jako citlivější, bylo detekováno více kontaminujících látek na nižších koncentračních úrovních.

Graf 3: Srovnání metod HPLC UV a GC-FID



SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor, 1999. Vydání první.
ISBN 80-247-0373-4
- [2] WILKES, Charles E, SUMMERS, James W., DANIELS, Charles A., BERRARD, Mark T. *PVC Handbook*. Hanser Verlag, 2005. 414 s. ISBN 9781569903797
- [3] VERNER, Michal. *Ftaláty jako hrozba*. Právo, 22.dubna 2010, roč. 20, č. 94. ISSN 1211-2119
- [4] *Drinking water* [online]. [cit. 2010-01-13]. Dostupný z WWW:
<<http://www.epa.gov/safewater/phthalates/index.html>>
- [5] WIKIPEDIA. *Phthalate*. [online]. [cit. 2010-03-17]. Dostupný z WWW:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Phthalates>>
- [6] STAPLES, C.A., PETERSON, D.R., PARKARTON T.F., ADAMS, W.J. *The environmental fate of phthalate esters*. 1997. Vol. 35, 667-749
- [7] SÝKORA, Václav. *Chemicko-analytické tabulky*. Praha STNL 1996
- [8] DOLEŽAL, JAN. *Jedovaté destiláty z trhu nemizí*. [online]. [cit. 2009-12-18].
Dostupný z WWW:
<[http://ekonomika.idnes.cz/jedovate-destilaty-z-trhu-nemizi-dqf-
/test.asp?c=2000M299T05A](http://ekonomika.idnes.cz/jedovate-destilaty-z-trhu-nemizi-dqf-/test.asp?c=2000M299T05A)>
- [9] RUDEL, R.A., CARMAN, D.E., SPENGLER J.D., KORN, L.R. *Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust*. 2003. Isme 20, 4543-4553
- [10] VELÍŠEK, JAN. *Chemie potravin II*. Ossis 2002. 238 s.
- [11] Úřední věstník Evropské unie. *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2005/84/ES Ze dne 14.12.2005. O omezení a uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek*

- [12] Sbírka zákonů České republiky. *Zákon č.110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, vč. příslušných vyhlášek*
- [13] OKLC - Odbor kontroly laboratoří a certifikace SZPI. *Výsledky plánované kontroly cizorodých látek v roce 2002*. [online]. [cit. 2009-12-19]. Dostupný z WWW:
< <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1003456&docType=ART&nid=11386&chnum=5>>
- [14] DEAN, J.A. *Lnage's Handbook of Chemistry*. 1985. 586 s.
- [15] WIKIPEDIA. *Ethyl carbamate*. [online]. [cit. 2010-02-13]. Dostupný z WWW:
< http://en.wikipedia.org/wiki/Ethyl_carbamate>
- [16] DENNÍK, PRÁVO. *Na tržnicích se objevil nebezpečný alkohol*. roč. 20, č.110
- [17] SCHIDT, F. *Biochemistry I*. IDG Books Worldwide 2000. Inc. USA
- [18] OKLC - Odbor kontroly laboratoří a certifikace SZPI. *Výsledky plánované kontroly cizorodých látek v roce 2002*. [online]. [cit. 2009-12-19]. Dostupný z WWW.
<<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1003456&docType=ART&nid=11386&chnum=12>>
- [19] HANZLÍK, Karel. *Posuzování kvality destilátů*. Lípa 1994. 206 s. ISBN 80-815-27-4
- [20] WELTRING, A. RUPP, M. ARZBERGER, U. ROTHENBÜCHER, L. KOCH, H. SOROLL, C. LACHENMEIER, D.W. *Ethylcarbamate: Auswertung von Fragebogen zur Erhebung von Steinobstbränden bei Kleinbrennerien*. [online]. [cit. 2010-01-30]. Dostupný z WWW:
< <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17572159>>
- [21] KOMÍNKOVÁ, D. *Ekotoxikologie*. I vyd. Praha 2008. 156 s. ISBN 978-80-01-04058-4
- [22] ŠLOSAR, Petr. *Dotazy a rady k úpravě destilátů*. [online]. [cit. 2010-03-15]. Dostupný z WWW:

< <http://www.ovocne-destilaty.cz/index.php?stranka=dotazy> >

- [23] UHROVÁ, H. *Děláme si sami slivovici, meruňkovici, hruškovici, jablkovci a jiné ovocné destiláty, vína a šťávy a sirupy*. Víkend 1995. 156 s. ISBN 80-7222-180-9
- [24] JÍLEK, J. ZENTRYCH, J.A. *Příprava ovocných kvasů na výrobu slivovice*. Olomouc 1998. 167 s. ISBN 80-86179-28-1.
- [25] VONDRÁČEK, O. *Výroba ušlechtilých pálenek z ovoce*. [online]. [cit. 2010-04-01] Dostupné z WWW:
< <http://www.tech-info.cz/palenka-kvas.html> >
- [26] ROP, O. HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. I vyd. UTB Zlín, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [27] HOZA, I. KRAMÁŘOVÁ, D. BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie III*. I vyd. UTB Zlín, 2006. 123 s. ISBN 80-7318-396-x
- [28] *Pěstitelské pálenice Destila*. [online]. [cit.2010-01-12]. Dostupný z WWW:
<<http://www.destila.cz/produkty/pestitelske-palence/se-surovinovym-kotlem-a-rektifikacni-kolonou-typ-kpd.html#>>
- [29] EXNAR, P. MELZOCH, K. RYCHTERA, M. *Praktická lihovarnická příručka*. Praha 1988. 178s.
- [30] PISCHL, J. *Vyrábíme ušlechtilé destiláty*. Praha 1997. 187. s. ISBN 80-237-3441-5
- [31] *Popis činnosti jednostupňové destilace*. [online]. [cit. 2010-03-19]. Dostupný z WWW:
< http://www.liho-bojanov.cz/palence_technologie.htm >
- [32] *Jednostupé pěstitelské pálenice*. [online]. [cit.2009-12-19]. Dostupný z WWW:
< http://www.pstrading.cz/foto_lihovary/2-4-3.jpg>
- [33] ŠKOPEK, J. *Výroba destilátů z vlastního ovoce*. Dona 1996. 125 s. ISBN 80-7234-570-2

- [34] NTP-CERHR. *Monogram on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Phthalates*. (1996)
- [35] WIKIPEDIE. *Ftaláty*. [online]. [cit. 2010-04-02]. Dostupný z WWW:
< <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ftal%C3%A1ty> >
- [36] RŮŽIČKOVÁ, K. COBBING, M. ROSSI, M. BELAZZI, T. *preventiv Harm from Phthalates, Avoiding PVC in Hospitals, Health Care Without Harm*. Praha 2006
- [37] VYHLÁŠKA Č. 38/2001 Sb., NOVELA 186/2003 Sb. *O hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami*
- [38] ZÁKON Č. 258/2000 Sb. *O ochraně veřejného zdraví*
- [39] JELÍNEK, R. *Základy vývojové toxikologie a teratologie*. VŠB-TU 2006. 69 s. ISBN 80-7078-364-8
- [40] BUTZKE, CH. E. BISSON, L. F. *Ethyl carbamate preventative action manual*. [online]. [cit.2010-04-20]. Dostupný z WWW:
< <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/EthylCarbamateUrethane/ucm078546.htm> >
- [41] VOREL, F. *Toxikologie*. Jihočeská univerzita, 1996, 106 s. ISBN 80-7040-172-9
- [42] *Karbamáty*. [online]. [cit. 2009-12-11]. Dostupný z WWW:
< http://etext.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul_key=56&idkapitola=55 >
- [41] *Jak zabíjí karbofuran*. [online]. [cit. 2009-12-11]. Dostupný z WWW:
< <http://www.karbofuran.cz/fakta.php?2> >
- [43] ČSN EN ISO 18856 (757587) *Jakost vod - Stanovení vybraných ftalátů plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií*
- [44] ADLARD, E.R. HANDLEZ, A.J. *Gas chromatographic techniques and applications*. London 2001. 436 s. ISBN 0-8493-0521-7
- [45] DOUGLAS, F. *GC-MS analysis*. [online]. [cit.2010-02-05]. Dostupný z WWW:

- < <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> >
- [46] WIKIPEDIA. *Gas chromatography-mass spectrometry*. [online]. [cit. 2010-01-28].
Dostupný z WWW:
< http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry>
- [47] KLUODA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [48] MOTYKA, K. HLAVÁČ J. *Stručný přehled separačních metod*. Univerzita Palackého 2009. 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3
- [49] LINDE GAS A.S. *Plamenoionizační detektor*. [online]. [cit.2010-030-06].
Dostupný z WWW:
< [http://www.linde-gas.cz/international/web/lg/cz/like35lgcz.nsf/repositorybyalias/pdf_plamenoionizacni_detektor/\\$file/Plamenoionizacni_detektor.pdf](http://www.linde-gas.cz/international/web/lg/cz/like35lgcz.nsf/repositorybyalias/pdf_plamenoionizacni_detektor/$file/Plamenoionizacni_detektor.pdf) >
- [50] KOLEKTIV AUTORŮ. *Instrumentální analýza*. STNL Praha 1986. 124 s.
- [51] MCMASTER, M.C. *GC-MS A practical user's guide*. 2. vyd. Canada 2008. 180 s.
- [52] DOUŠA, M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno 2002. 129 s.
ISBN 80-86548-09-0
- [53] *HPLC detektory*. [online]. [cit.2010-04-23]. Dostupný z WWW:
< <http://www.hplc.cz/> >

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PVC	polyvinylchlorid
pK_{ow}	hodnota rozdělovacího koeficientu oktanol - voda
ČZPI	Česká zemědělská a potravinářská inspekce
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
ATP	adenosintrifosfát
TDI	maximální přípustná dávka
% obj.	objemová procenta
SML	specifický migrační limit
CNS	centrální nervová soustava
PCB	polychlorované bifenyly
DDT	dichlordifenyltrichlormethylmethan
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
GC	plynová chromatografie
HPLC	kapalinová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
ACN	acetonitril
BBF	benzyl butyl ftalát
DBF	dibutyl ftalát
DEHF	di(2-ethylhexyl) ftalát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecná chemická struktura ftalátů.....	str.12
Obrázek 2: Chemická struktura ethylkarbamátu.....	str.17
Obrázek 3: Mechanismus vzniku ethylkarbamátu v alkoholických nápojích.....	str.20
Obrázek 4: Destilační zařízení firmy Destila.....	str.27
Obrázek 5: Destilační kotel.....	str.28
Obrázek 6: Schéma jednostupňového destilačního zařízení Pacovské strojírnny a.s.	str.30
Obrázek 7: Schéma aktivace ethylkarbamátu.....	str.35
Obrázek 8: Schéma GC-MS.....	str.38
Obrázek 9: Schéma kapalinového chromatografu.....	str.43
Obrázek 10: HPLC aparatura Dionex 3000.....	str.49
Obrázek 11: Chromatogram BBF.....	str.55
Obrázek 12: Chromatogram DBF.....	str.56
Obrázek 13: Chromatogram DEHF.....	str.56
Obrázek 14: Chromatogram ethylkarbamátu.....	str.57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných ftalátů.....	str.13
Tabulka 2: Maximální množství esterů kyseliny ftalové v potravinářských výrobcích...	str.16
Tabulka 3: Zjištěný obsah ftalátů v minerálních vodách (hodnoty v mg.kg-1).....	str.16
Tabulka 4 : Množství ftalátů v kontrolovaných lihovinách.....	str.17
Tabulka 5: Fyzikálně-chemické vlastnosti ethylkarbamátu.....	str. 17
Tabulka 6: Koncentrace ethylkarbamátu v potravinách.....	str.18
Tabulka 7: Koncentrace ethylkarbamátu ve vybraných alkoholických nápojích (z evropských expertíz trhu)	str.18
Tabulka 8: Zjištěný obsah ethylkarbamátu v lihovinách (hodnoty v mg.l-1).....	str.19
Tabulka 9: Fyzikálně chemické vlastnosti etanolu	str.25
Tabulka 10: Analýza pro volbu optimální metody při stanovení ftalátů	str.53
Tabulka 11: Analýza pro volbu optimální metody při stanovení urethanu	str.53
Tabulka 12: Podmínky pro stanovení ftalátů	str.54
Tabulka 13: Podmínky pro stanovení ethylkarbamátu	str.54
Tabulka 14: Retenční časy jednotlivých standardů (GC-FID).....	str.55
Tabulka 15: Analyzované vzorky (metoda GC-FID).....	str.57
Tabulka 16: Analýza vzorků (GC-FID).....	str.58
Tabulka 17: Retenční časy jednotlivých standardů	str.59
Tabulka 18: Výsledky analýzy HPLC-UV	str.59
Tabulka 19: Analýza vzorků (HPLC UV)	str.60

SEZNAM PŘÍLOH

P I: MS spektrum vzorku 1

P II: MS spektrum vzorku 2

P III: MS spektrum vzorku 3

P IV: MS spektrum vzorku 4

P V: MS spektrum vzorku 5

P VI: MS spektrum vzorku 6

P VII: MS spektrum vzorku 7

P VIII: MS spektrum vzorku 8

P IX: Vzorek číslo 1 GC- FID

P X: Vzorek číslo 2 GC- FID

P XI: Vzorek číslo 3 GC- FID

P XII: Vzorek číslo 4 GC- FID

P XIII: Vzorek číslo 5 GC- FID

P XIV: Vzorek číslo 6 GC- FID

P XV: Vzorek číslo 7 GC- FID

P XVI: Vzorek číslo 8 GC- FID

P XVII: Chromatogram standardu BBF

P XVIII: Chromatogram standardu DBF

P XIX: Chromatogram standardu DEHP

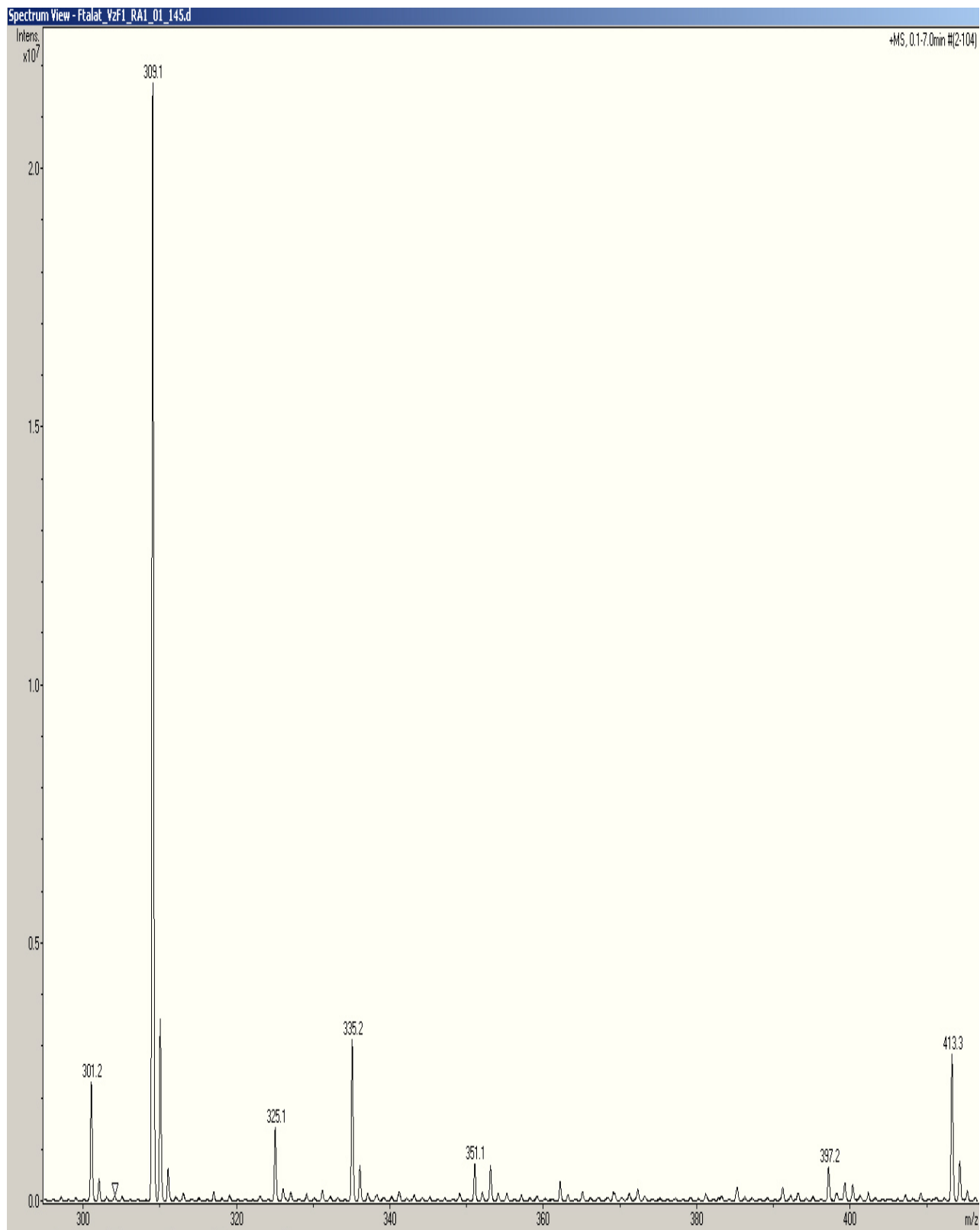
P XX: Chromatogram standardu uretanu

P XXI: Přístrojové parametry pro stanovení HPLC UV/MS

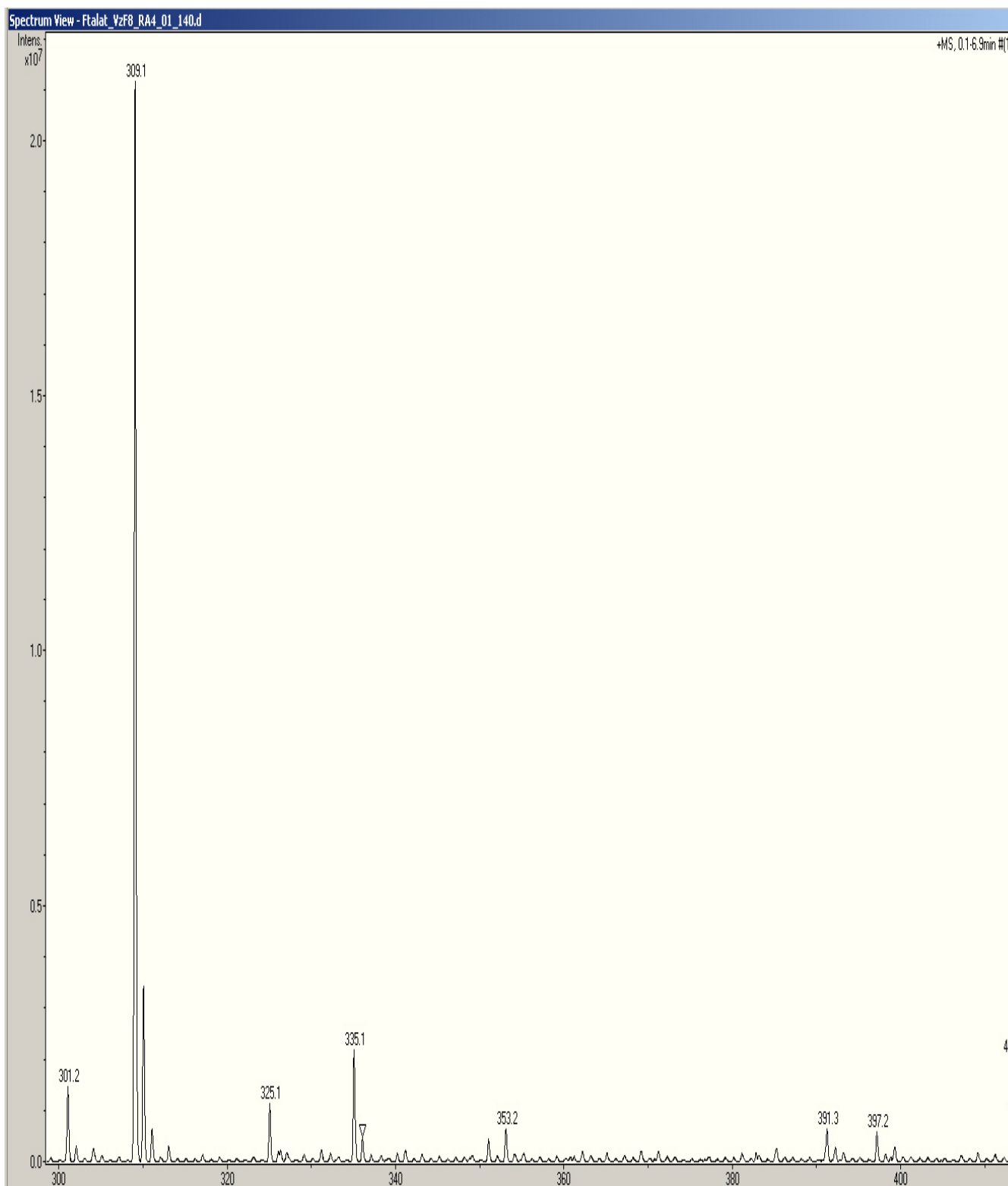
P XXII: Analýza GC-FID

Chromatogramy vzorků z HPLC-MS

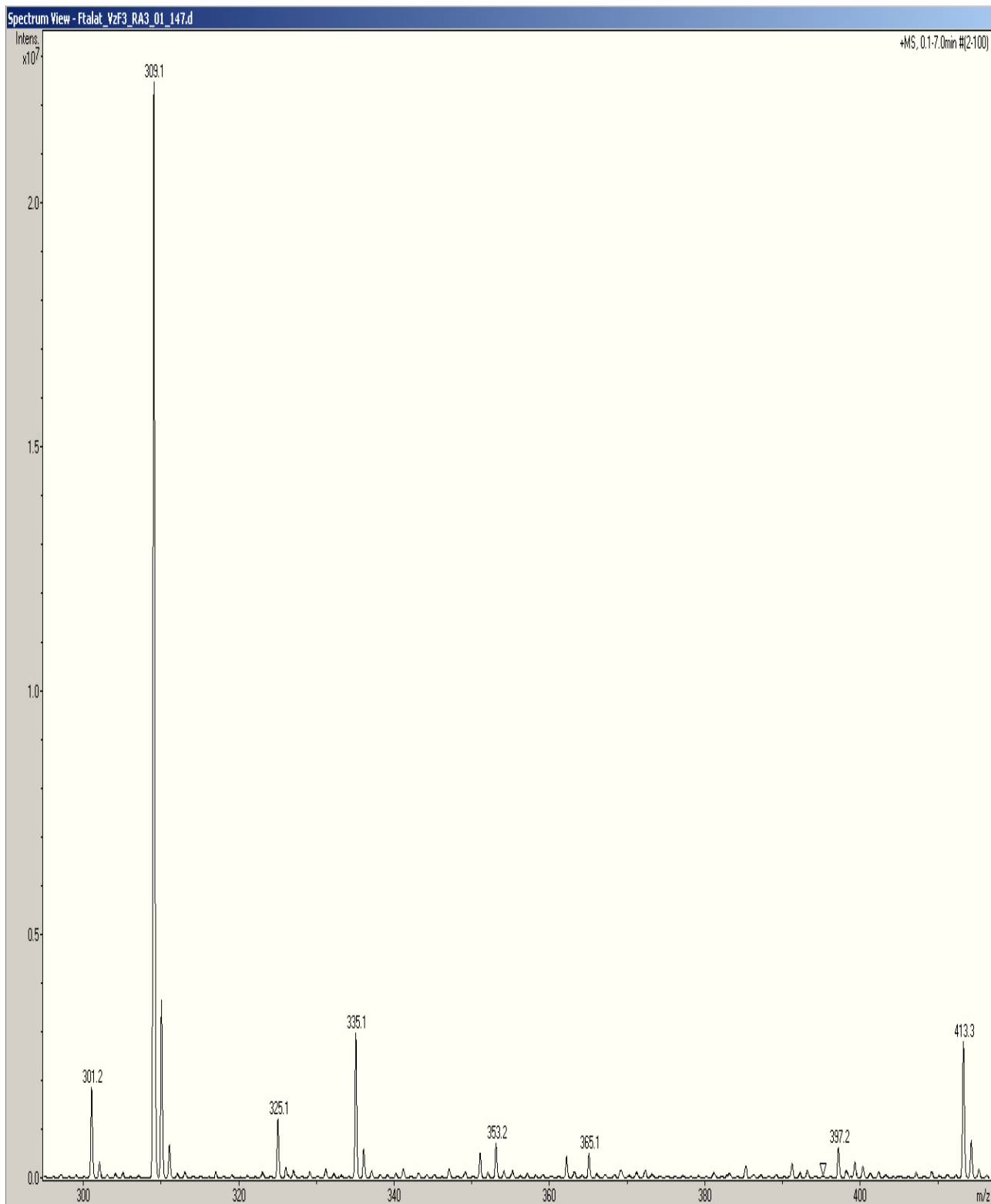
P I: MS spektrum vzorku 1



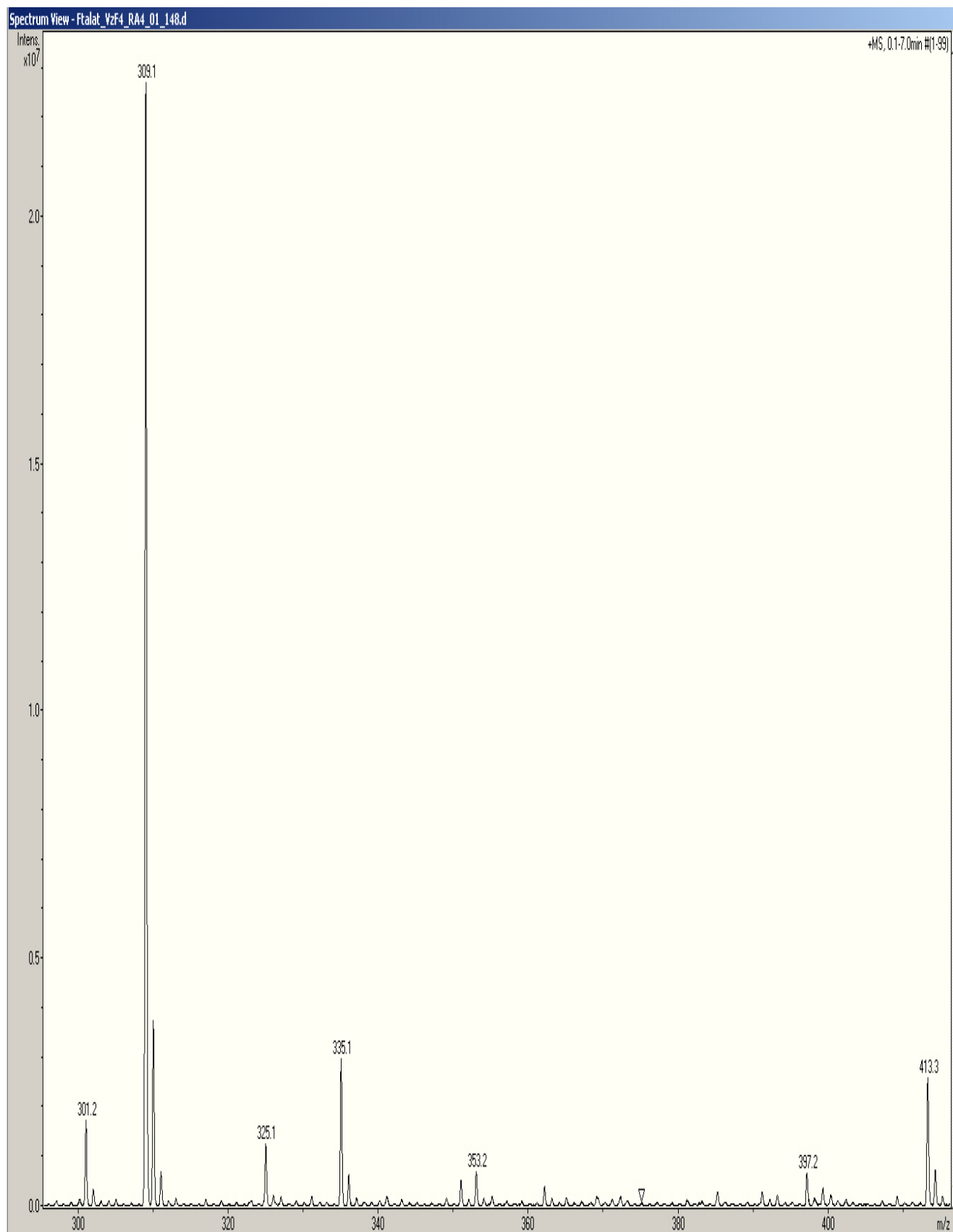
P II: MS spektrum vzorku 2



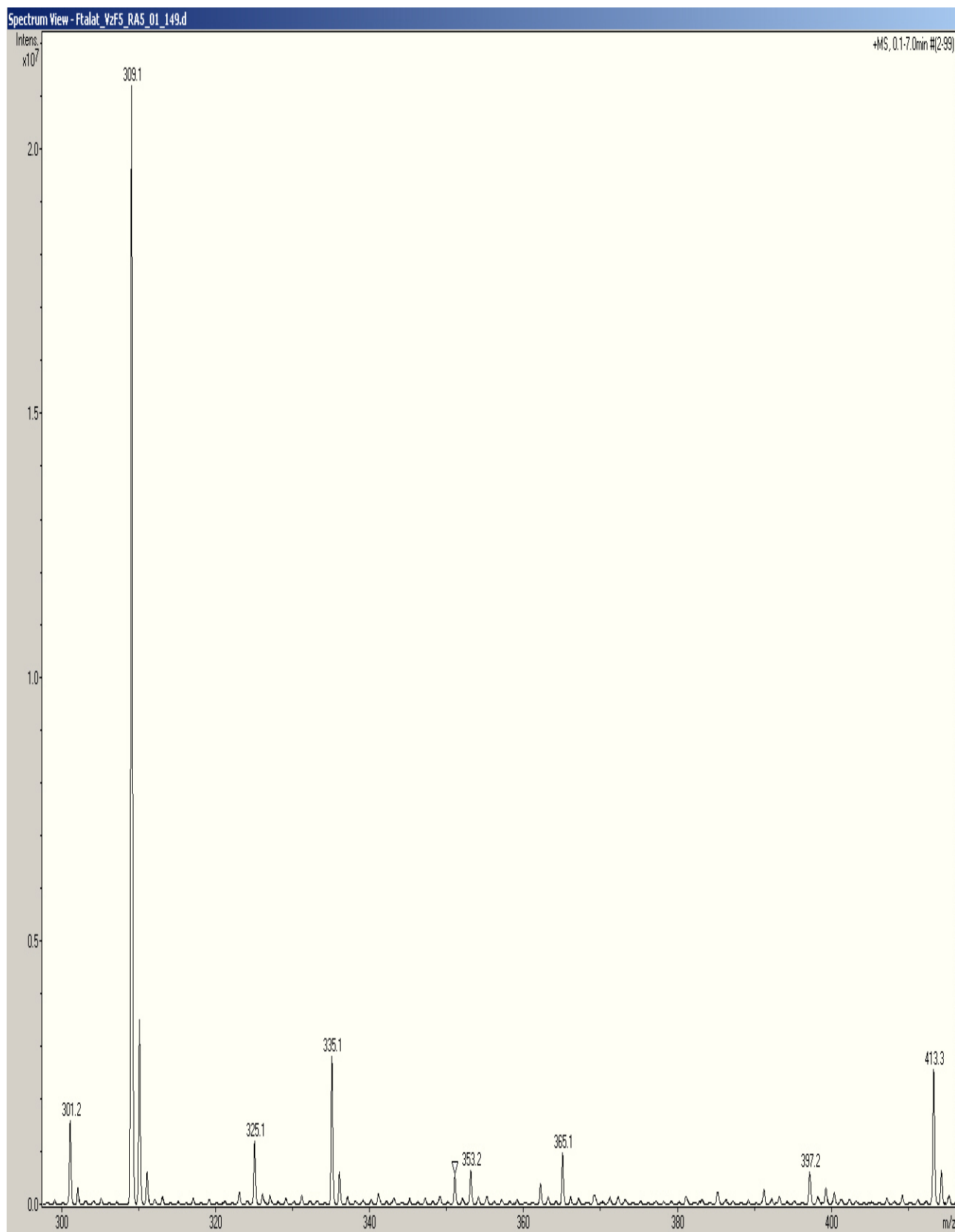
P III: MS spektrum vzorku 3



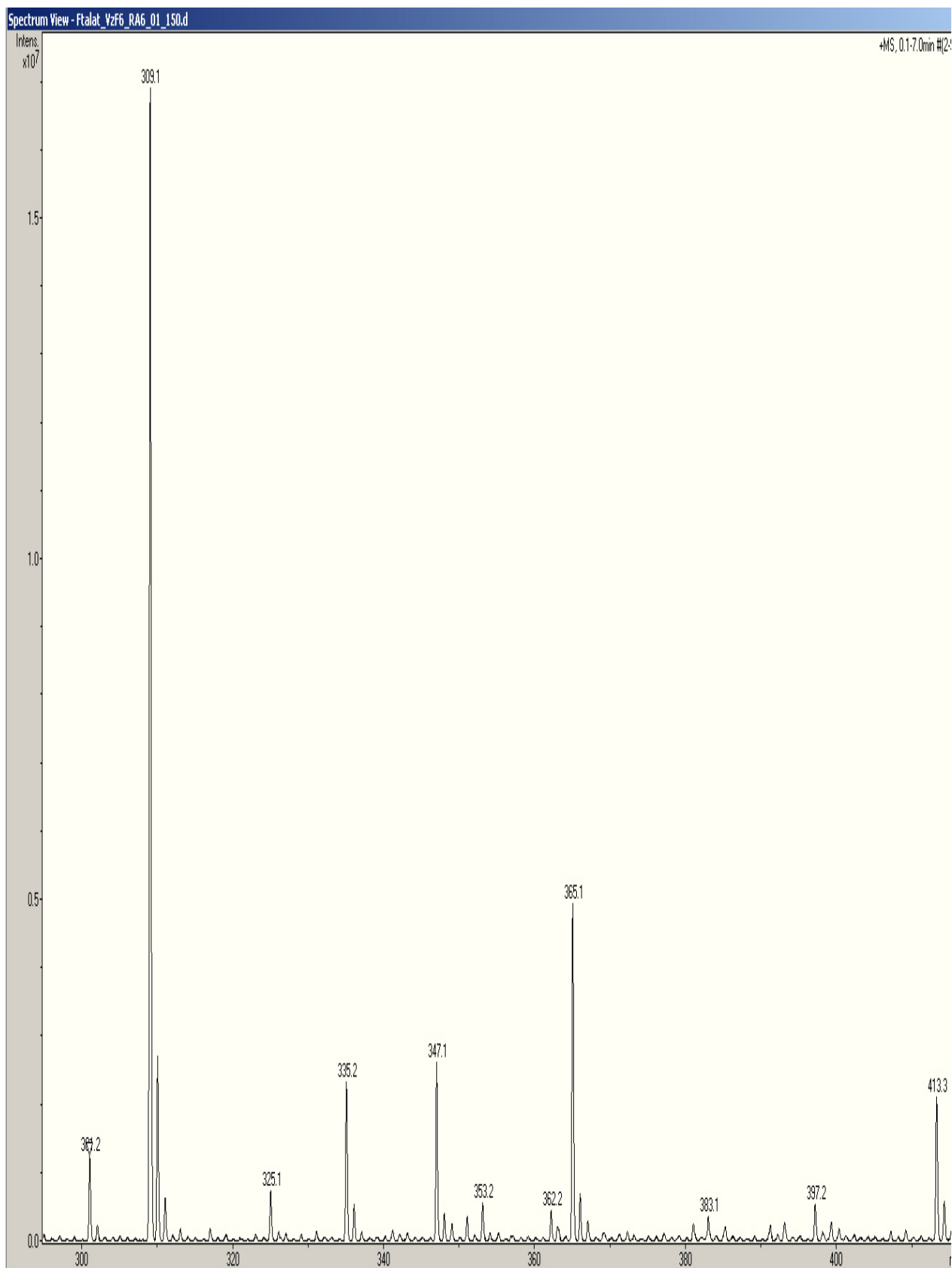
P IV: MS spektrum vzorku 4



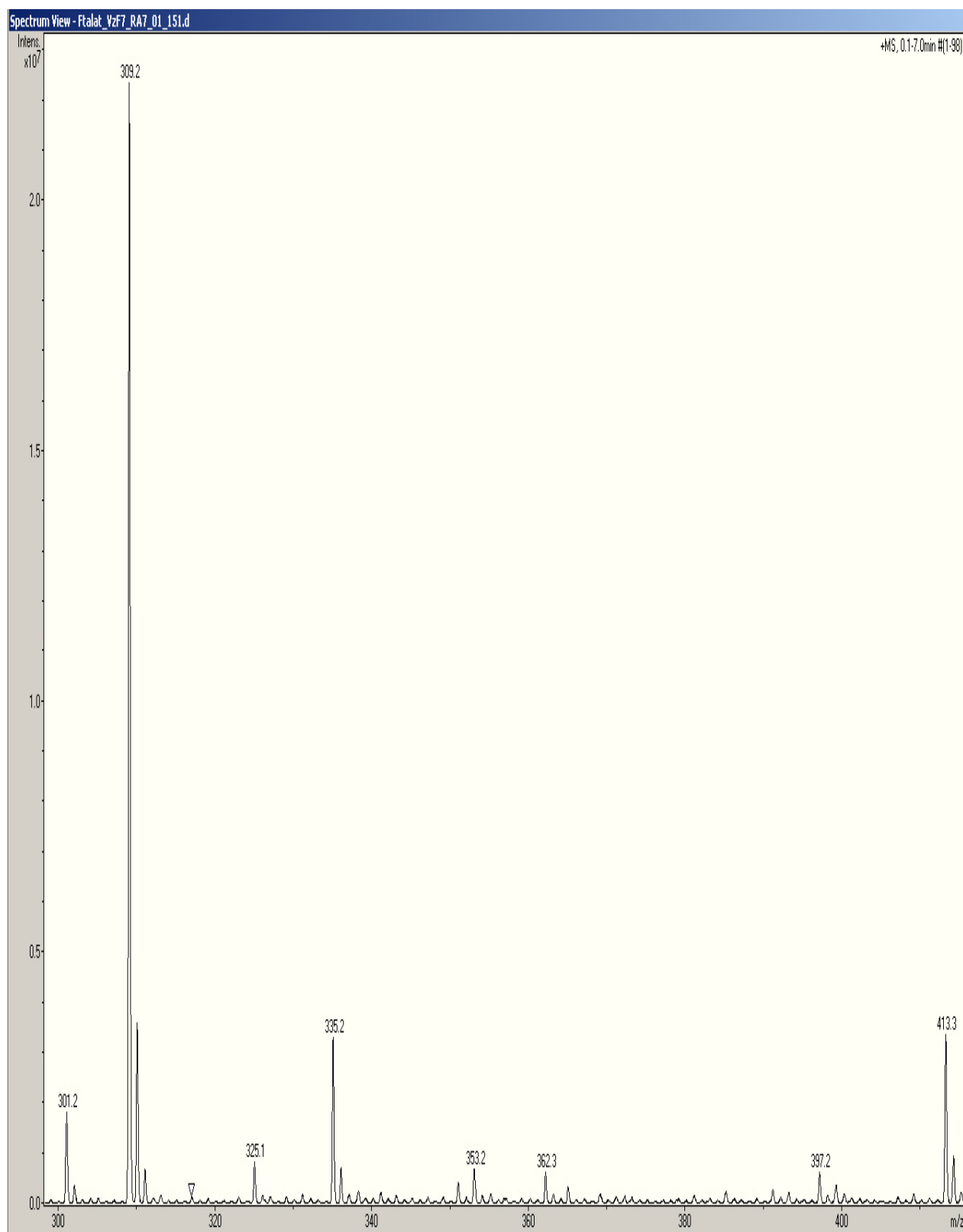
P V: MS spektrum vzorku 5



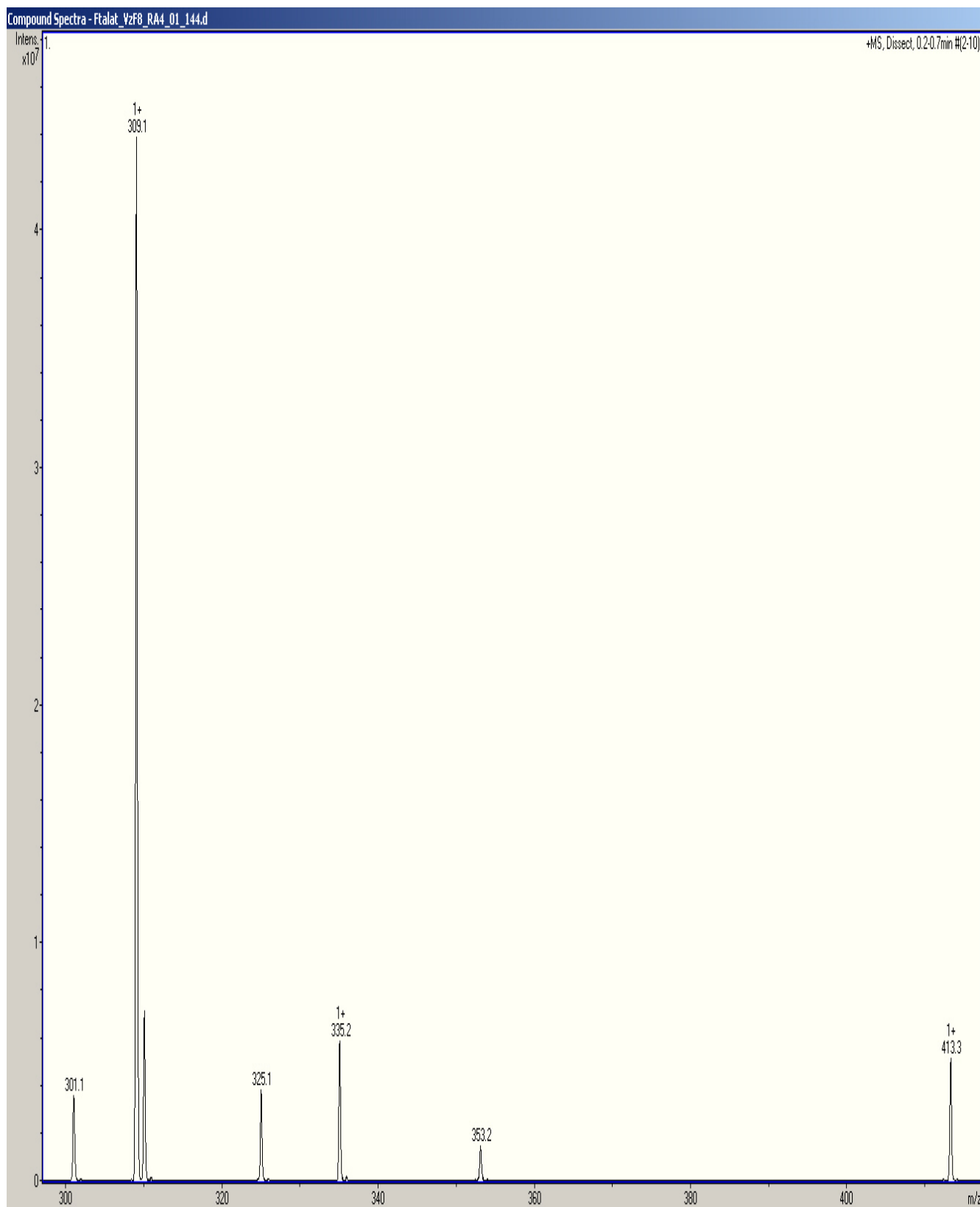
P VI: MS spektrum vzorku 6



P VII: MS spektrum vzorku 7

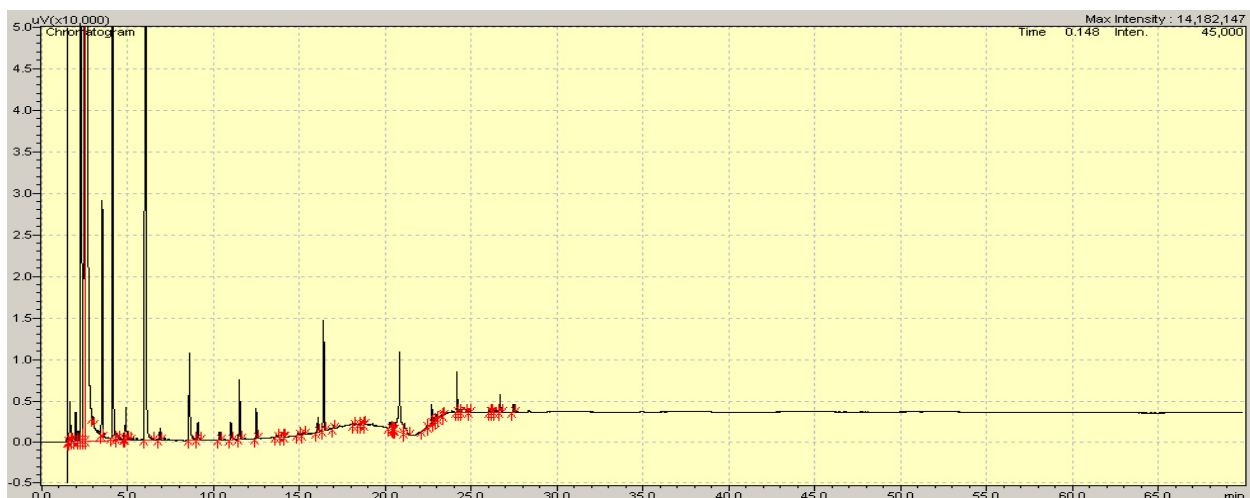


P VIII: MS spektrum vzorku 8



Chromatogramy vzorků z plynového chromatografu (GC-FID)

P IX: Vzorek číslo 1 GC- FID



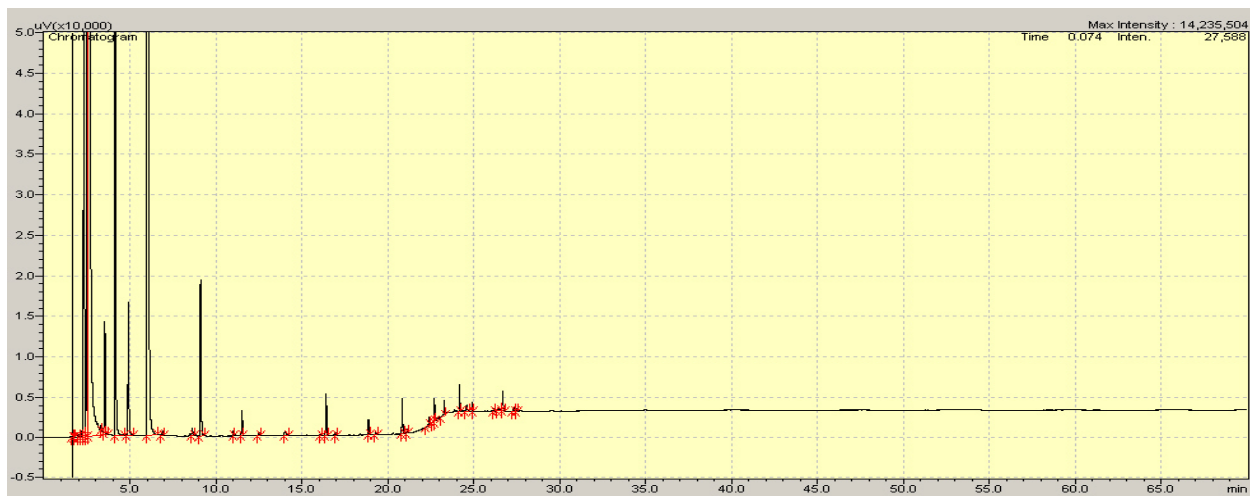
P X: Vzorek číslo 2 GC- FID



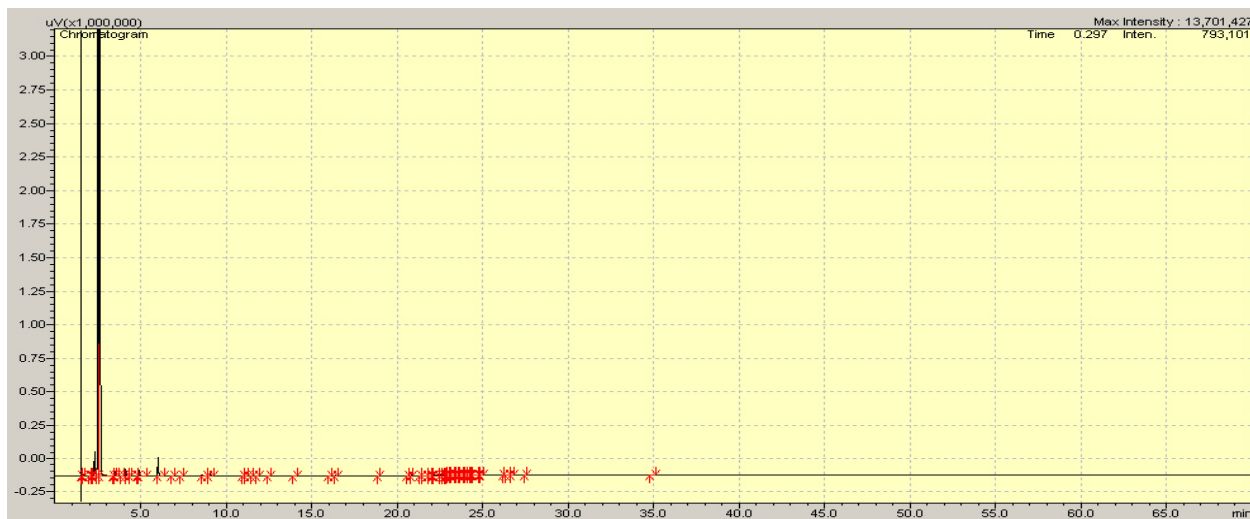
P XI: Vzorek číslo 3 GC- FID



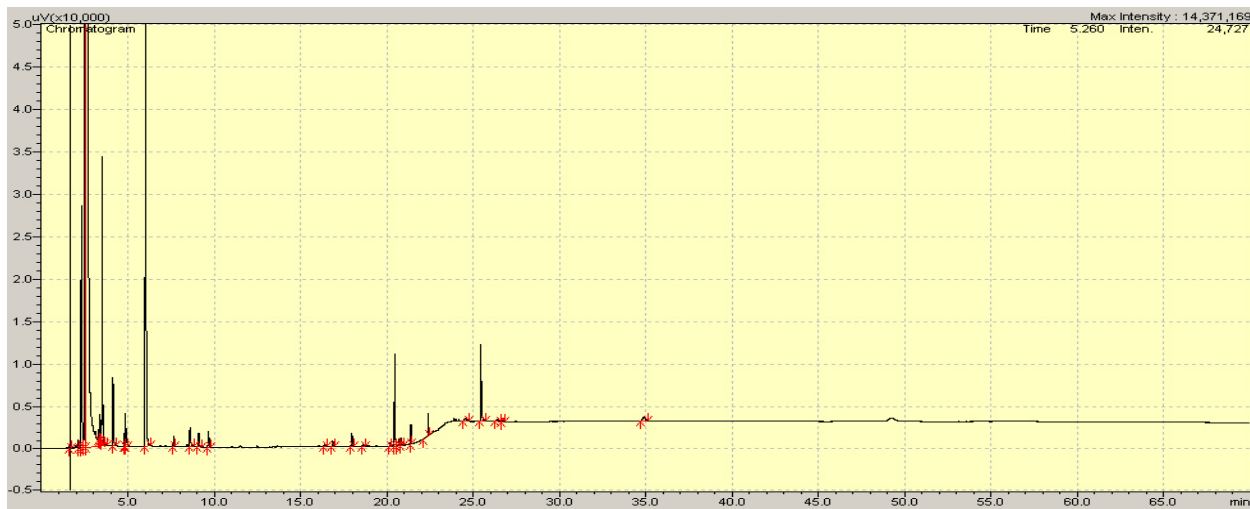
P XII: Vzorek číslo 4 GC- FID



P XIII: Vzorek číslo 5 GC- FID



P XIV: Vzorek číslo 6 GC- FID



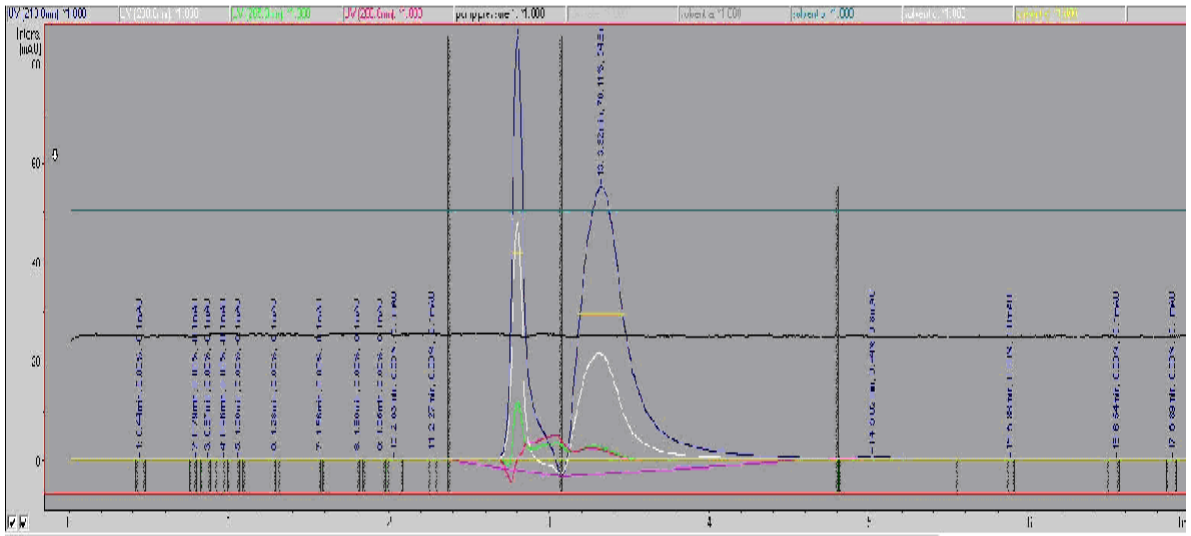
P XV: Vzorek číslo 7 GC- FID



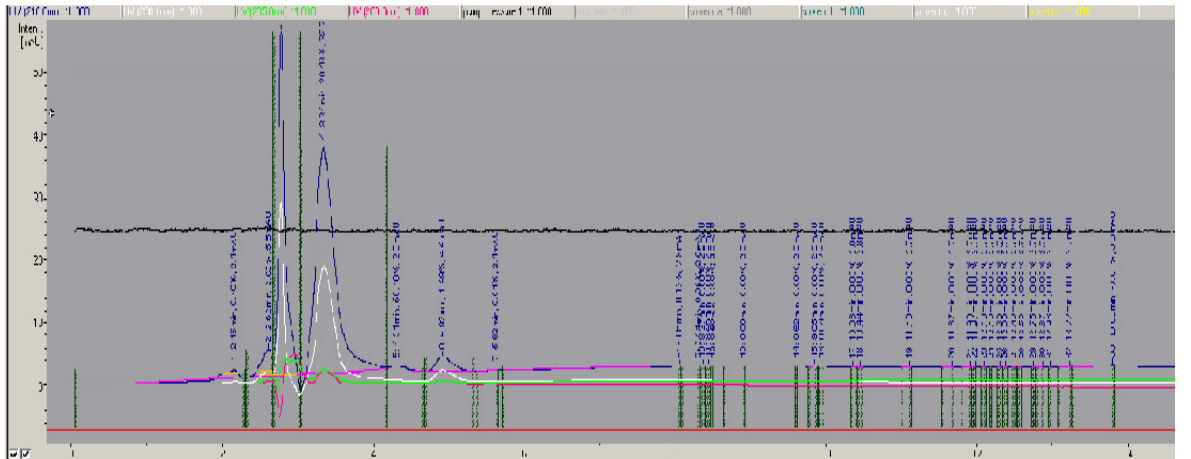
P XVI: Vzorek číslo 8 GC- FID



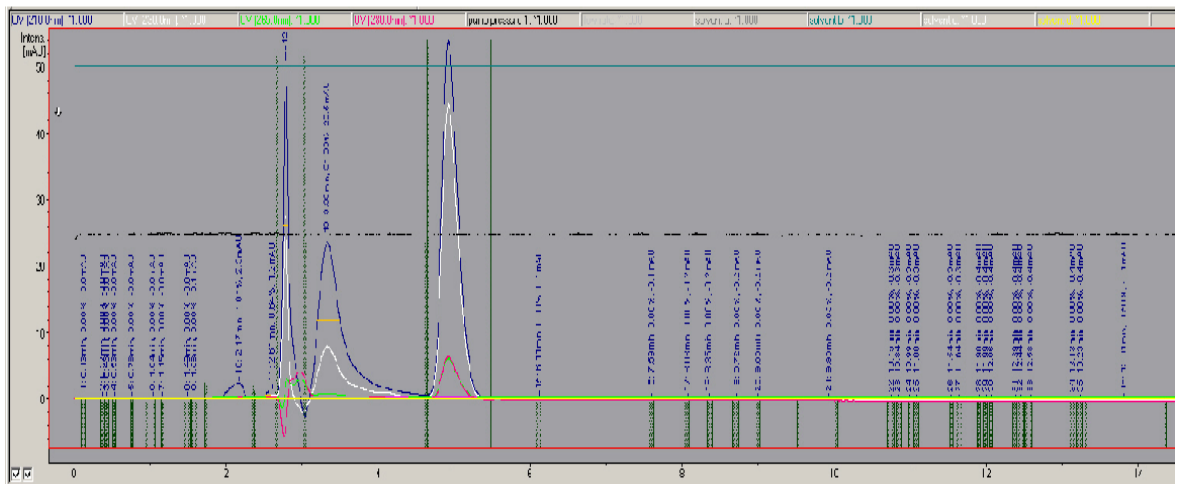
P XVII: Chromatogram standardu BBF



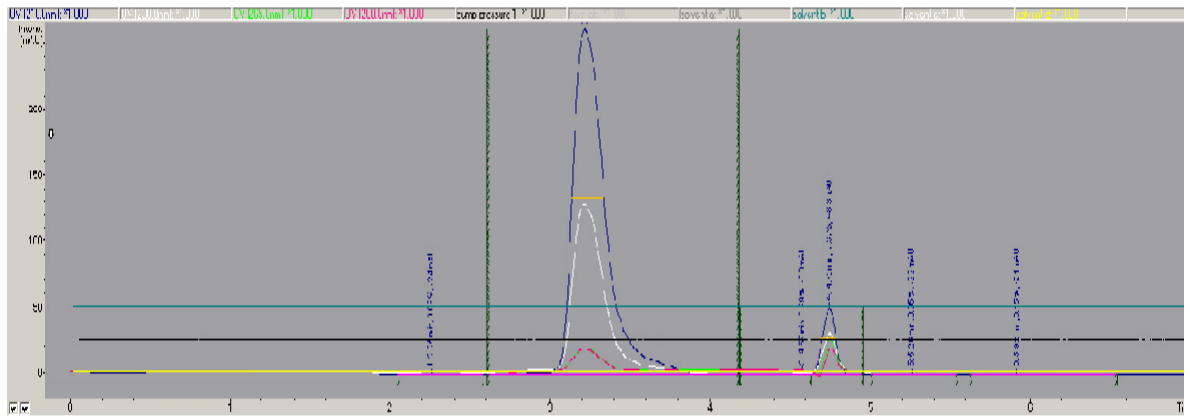
P XVIII: Chromatogram standardu DBF



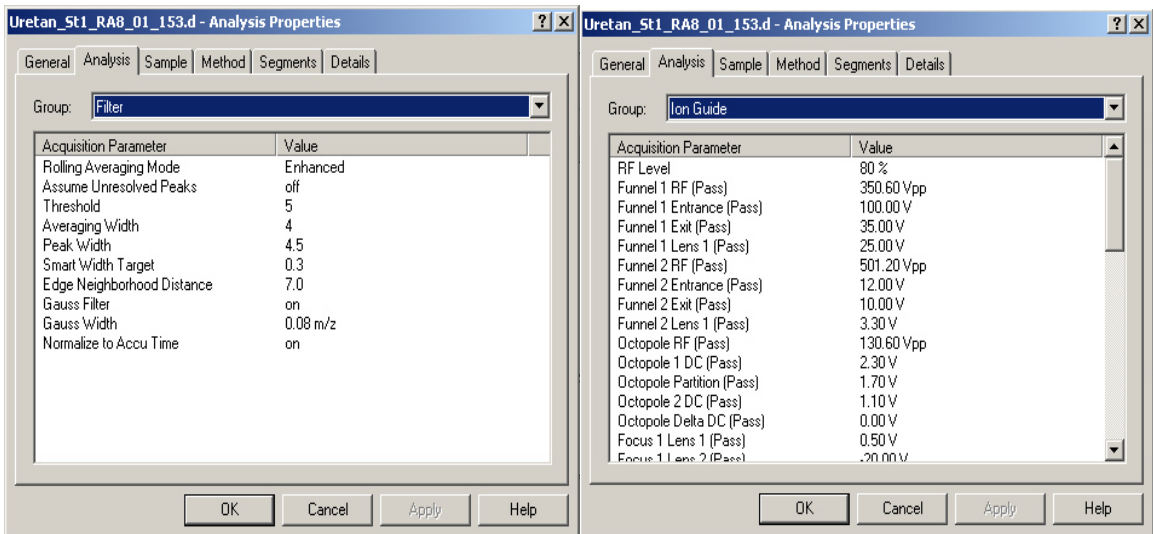
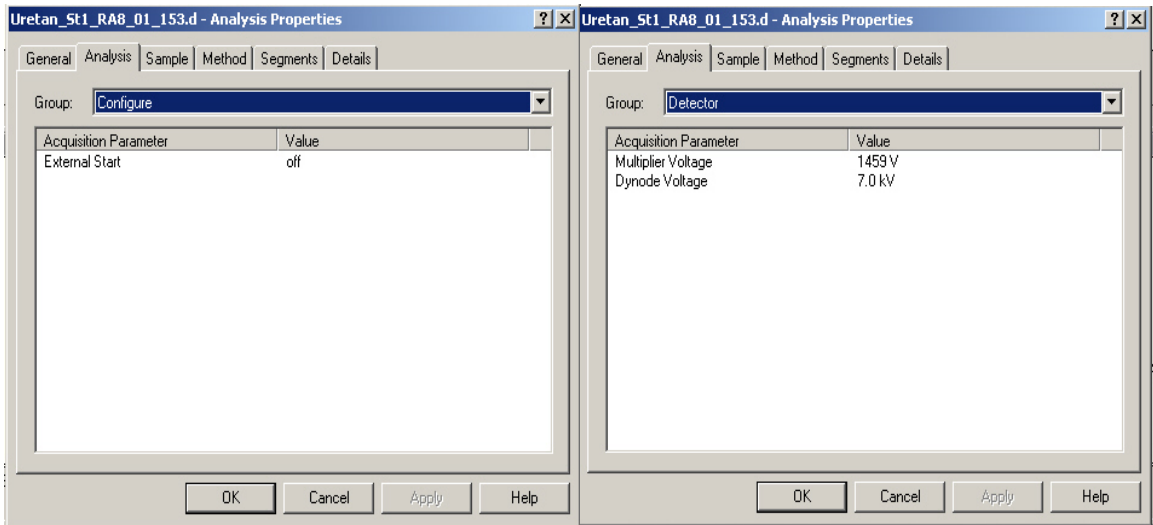
P XIX: Chromatogram standardu DEHP



P XX: Chromatogram standardu uretanu



P XXI: Přístrojové parametry pro stanovení HPLC UV/MS



Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Ion Guide

Acquisition Parameter	Value
Octopole Delta DC (Pass)	0.00 V
Focus 1 Lens 1 (Pass)	0.50 V
Focus 1 Lens 2 (Pass)	-20.00 V
Focus 1 Lens 3 (Pass)	-6.00 V
Multipole Lens 1 (Pass)	-6.00 V
Multipole RF (Pass)	40.90 Vpp
Multipole DC (Pass)	-4.00 V
Focus 4 Lens 1 (Pass)	-4.00 V
Focus 4 Lens 2 (Pass)	-5.00 V
Focus 4 Lens 3 (Pass)	-75.00 V
Funnel 1 RF (Block)	350.60 Vpp
Funnel 1 Entrance (Block)	100.00 V
Funnel 1 Exit (Block)	35.00 V
Funnel 1 Lens 1 (Block)	25.00 V
Funnel 2 RF (Block)	501.20 V
Funnel 2 Entrance (Block)	12.00 V

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Ion Guide

Acquisition Parameter	Value
Funnel 2 Lens 1 (Block)	3.30 V
Octopole RF (Block)	130.60 Vpp
Octopole 1 DC (Block)	2.30 V
Octopole Partition (Block)	1.70 V
Octopole 2 DC (Block)	1.10 V
Octopole Delta DC (Block)	0.00 V
Focus 1 Lens 1 (Block)	0.50 V
Focus 1 Lens 2 Delta (Block)	100.00 V
Focus 1 Lens 3 (Block)	-6.00 V
Multipole Lens 1 (Block)	-6.00 V
Multipole RF (Block)	40.90 Vpp
Multipole DC (Block)	-4.00 V
Focus 4 Lens 1 (Block)	-4.00 V
Focus 4 Lens 2 (Block)	-5.00 V
Focus 4 Lens 3 Delta (Block)	100.00 V

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Mode

Acquisition Parameter	Value
Mass Range Mode	Enhanced Resolution
Ion Polarity	Positive
Ion Source Type	ESI
Alternating Ion Polarity	off
Current Alternating Ion Pol	Positive
Divert Valve	to Source

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: MS/MS Automatic

Acquisition Parameter	Value
Auto MS/MS	off

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: MS/MS Parameter

Acquisition Parameter	Value
Manual MS(n)	off
MRM	off

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Noise Evaluation

Acquisition Parameter	Value
Multiplier Gain Target	250.00
Arithmetic Noise Correl Fact	8.32
Geometric Noise Correl Fact	8.34
Averages Made	15 Spectra
Accumulation Time Averaged	8047 µs
FindScanMax	on
IDC Shape Value	2.1788

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Other

Acquisition Parameter	Value
Instrument Program Version	10329305
Manufacturer	Bruker
Spectrum ID	0x620001
Active Segment	1
Internal Job ID	0x6A8
APG interface available	no
Calib Scan	Current
High ICC MS-Scans, MovAv	0.0000 %
High ICC MaxRes-Scans, MovAv	0.0000 %
High ICC MS(n)-Scans, MovAv	54.4116 %
Low ICC MS-Scans, MovAv	2.4538 %
Low ICC MaxRes-Scans, MovAv	0.0000 %
Low ICC MS(n)-Scans, MovAv	11.2168 %
High ICC Scans	-12599
Calib Isol/Frag	Current
Instrument Temp (Measured)	43.0 °C

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Other

Acquisition Parameter	Value
Low ICC MaxRes-Scans, MovAv	0.0000 %
Low ICC MS(n)-Scans, MovAv	11.2168 %
High ICC Scans	-12599
Calib Isol/Frag	Current
Instrument Temp (Measured)	43.0 °C
Single RF Generator Status	0
General RF Generator Status	3330
Fractional RF Generator Status	1.7622e-003
Moving Average RF Generator Status	109.09
Reset Date RF Generator Status	20091103
Max MovAv RF Generator Status	556.19
Number of scan counter overflows	0
Scan counter	1889732
Digital Resolution	32
Auxiliary Reduction	3

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Trap

Acquisition Parameter	Value
Accumulation Time	8047 µs
Scan Begin	50 m/z
Scan End	200 m/z
Averages	15 Spectra
RF Capacitor Temp (Measured)	54.64 °C
Max. Accu Time	200000 µs
(Smart) ICC Target	200000
ICC Actual	101682
ICC	on
ACQ Test	off

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Tune

Acquisition Parameter	Value
Capillary Current Control	off
Trap Drive	59.1
Helium Pressure (Set)	67.16 %
Helium Pressure (Measured)	67.16 %
Helium Differential Pressure	1.50e-006 mbar
Capillary Exit	140.0 V
Dry Temp (Set)	300 °C
Dry Temp (Measured)	300 °C
Nebulizer (Set)	8.00 psi
Nebulizer (Measured)	8.00 psi
Dry Gas (Set)	6.00 l/min
Dry Gas (Measured)	6.00 l/min
HV Capillary	-4200 V
Current Capillary	2499.106 nA
Current End Plate	59.855 nA
HV End Plate Offset	-500 V

OK Cancel Apply Help

Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Tune

Acquisition Parameter	Value
Trap Drive	59.1
Helium Pressure (Set)	67.16 %
Helium Pressure (Measured)	67.16 %
Helium Differential Pressure	1.50e-006 mbar
Capillary Exit	140.0 V
Dry Temp (Set)	300 °C
Dry Temp (Measured)	300 °C
Nebulizer (Set)	8.00 psi
Nebulizer (Measured)	8.00 psi
Dry Gas (Set)	6.00 l/min
Dry Gas (Measured)	6.00 l/min
HV Capillary	-4200 V
Current Capillary	2499.106 nA
Current End Plate	59.855 nA
HV End Plate Offset	-500 V

OK Cancel Apply Help

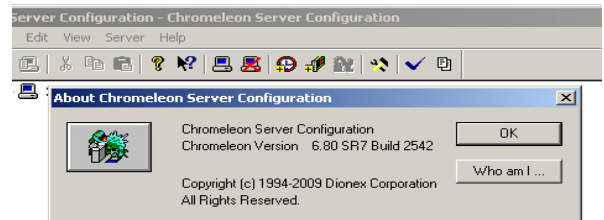
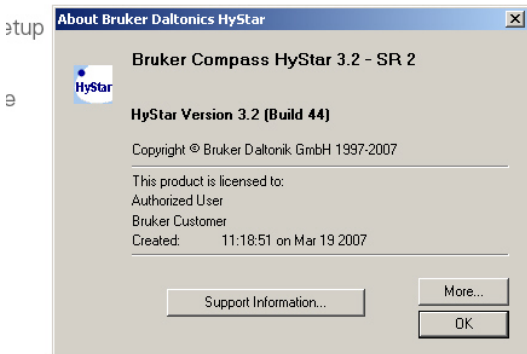
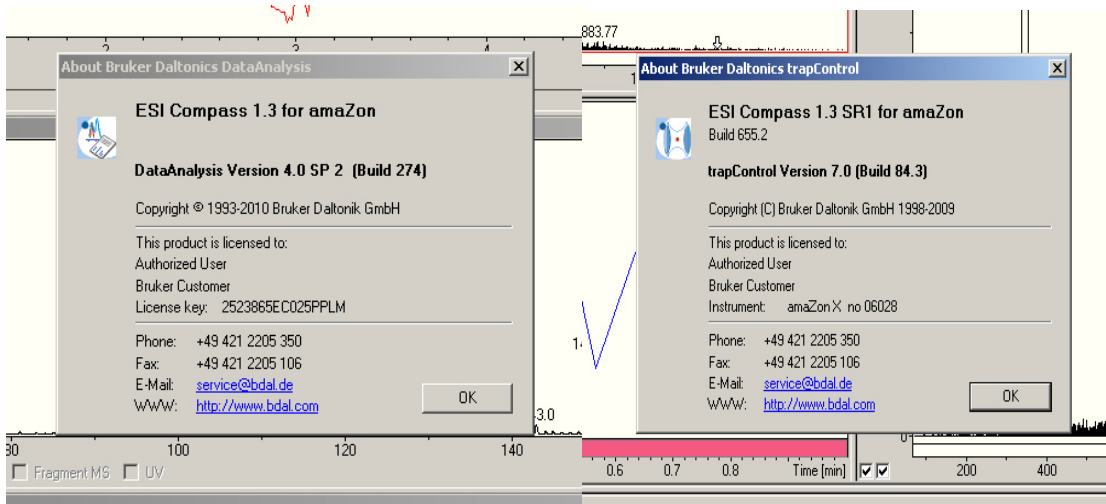
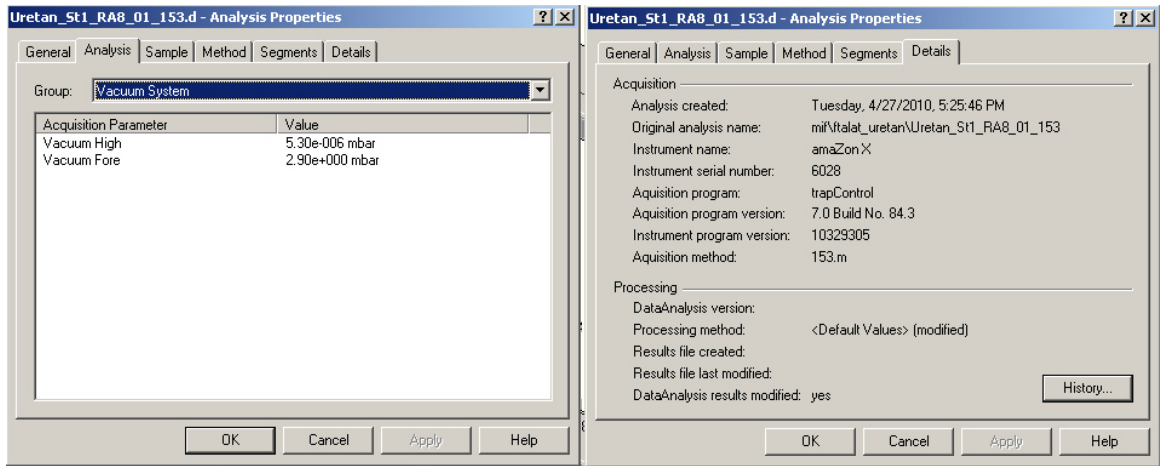
Uretan_St1_RA8_01_153.d - Analysis Properties

General Analysis Sample Method Segments Details

Group: Tune SPS

Acquisition Parameter	Value
Target Mass	640 m/z
Compound Stability	100 %
Trap Drive Level	100 %
Optimize	Normal
Smart Parameter Setting	active

OK Cancel Apply Help



P XXII: Analýza GC-FID

Analýza GC-FID

Vzorek	BBF [%]	DBF [%]	DEHF [%]	Etylkarbamát [%]
1.	Nedetekován	Nedetekován	Nedetekován	0,0018
2.	Nedetekován	0,0025	Nedetekován	0,0161
3.	Nedetekován	0,0015	Nedetekován	0,009
4.	Nedetekován	0,0014	Nedetekován	0,0016
5.	Nedetekován	0,0019	Nedetekován	0,0027
6.	Nedetekován	Nedetekován	Nedetekován	0,0066
7.	Nedetekován	0,0017	Nedetekován	0,0009