

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



RYCHLÉ SEPARACE PŘI ODHALOVÁNÍ PANČOVÁNÍ POTRAVIN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Martina Uhrová
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí diplomové práce:	prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.
Konzultant:	M.Sc. Volodymyr Pauk, Ph.D.
Forma studia:	Prezenční
Termín odevzdání práce:	20. 4. 2018

Olomouc 2018

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Martina Uhrová
Název práce:	Rychlé separace při odhalování pančování potravin
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018

Abstrakt: Předložená diplomová práce se zaměřuje na vývoj rychlé chromatografické separace syntetických barviv a jejich analýzu v potravinových vzorcích při odhalování pančování potravin. Barviva mohou být nepovoleně použita pro vylepšování vzhledu potravin. Přidávána mohou být bez uvedení na obalu nebo ve vyšším než povoleném množství Úvodní kapitoly jsou zaměřeny na možné způsoby pančování potravin jak v minulosti, tak v současnosti. Dále práce poskytuje přehled možných způsobů analytické kontroly pravosti potravin, pozornost je věnována analýze syntetických barviv chromatografickými metodami. Experimentální část přibližuje analýzu syntetických barviv. Chromatografické dělení pomocí superkritické fluidní chromatografie probíhalo na ultraúčinných kolonách s částicemi náplně menšími než 2 μm a k selektivní a citlivé detekci byl použit hmotnostní spektrometr. Kvalita separace byla posuzována pro různé experimentální podmínky, konkrétně pro různé stacionární fáze, aditiva, gradienty a průtoky mobilní fáze a teploty kolony. Z výsledků měření vyplývá, že nejlepší volbou je 2-Ethylpyridinová stacionární fáze, strmý gradient modifikátoru (methanol/voda s hydroxidem amonným jako aditivem) v oxidu uhličitém, průtok 0,7 ml/min a teplota kolony 40 °C. Doba samotné separace je velmi příznivá a nepřesahuje čas devíti minut. Finální metoda byla částečně validována v parametrech opakovatelnosti, preciznosti, linearity, meze detekce a kvantifikace, zároveň byla aplikována na reálné vzorky iontového nápoje a žvýkacích bonbónů.

Klíčová slova:	Syntetické barvivo, potravina, superkritická fluidní chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran:	68
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Martina Uhrová
Title: Fast separation in detection of food adulteration
Type of thesis: Master theses
Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic
Supervisor: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.
The year of presentation: 2018

Abstract: The presented diploma thesis focuses on the development of fast chromatographic separation of synthetic dyes and their analysis in food samples to control food adulteration. Synthetic dyes can be added illegally to food to improve the appearance. They can be added without any note on food packaging or their content can be higher than accepted limit. The introductory chapters are focused on food adulteration both in the past and nowadays. Further, the work provides an overview of analytical control of food authenticity and the attention is paid to the determination of synthetic dyes by chromatographic methods. The experimental part describes the analysis of synthetic dyes. Chromatographic separation by supercritical fluid chromatography was performed on ultra-efficient columns with stationary phase particles with diameter less than 2 μm . A mass spectrometer was used for selective and sensitive detection. The separation was assessed for various experimental conditions, namely for different stationary phases, additives, gradients and flow-rates of mobile phase and column temperatures. Results show that the best choice is a 2-Ethylpyridine stationary phase, a steep gradient of modifier (methanol/water with ammonium hydroxide as an additive) in carbon dioxide, a flow rate of 0.7 ml/min and column temperature of 40 °C. Separation time is very favorable and does not exceed nine minutes. The final method was partially validated in repeatability, precision, linearity, limits of detection and limits of quantification, and was applied to real samples of ionic beverage and chewy candies.

Keywords: Synthetic dye, foodstuff, supercritical fluid chromatography, mass spectrometry
Number of pages: 68
Language: Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci sepsala samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Karla Lemra, Ph.D., za použití pramenů uvedených v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, aby byla moje práce zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Martina Uhrová

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Karlovi Lemrovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a kritické připomínky při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala M.Sc. Volodymyru Paukovi, Ph.D. za předané zkušenosti a kladný přístup při zpracování experimentální části diplomové práce. V neposlední řadě patří velké poděkování celé katedře analytické chemie za poskytnutí prostoru, přístrojů a chemikálií pro zpracování mé diplomové práce a podpoře v rámci projektů Univerzity Palackého v Olomouci (IGA PrF 2017 020, IGA PrF 2018 027).

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Falšování potravin.....	10
2.2	Způsoby pančování.....	13
2.3	Analytické metody kontroly pravosti potravin.....	17
2.3.1	Analýza stabilních izotopů.....	18
2.3.2	Metody založené na analýze DNA.....	20
2.3.3	Proteomické metody.....	21
2.3.4	Spektrální metody.....	22
2.3.5	Elektroanalytické metody.....	25
2.4	Separční metody.....	26
2.4.1	Rychlé separace.....	27
2.4.2	Stanovení syntetických barviv v potravinách chromatografickými metodami.....	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1	Přístroje.....	36
3.2	Chemikálie.....	36
3.3	Pracovní postup.....	39
3.3.1	Příprava pracovních roztoků.....	39
3.3.2	Příprava modifikátoru mobilní fáze.....	40
3.3.3	Příprava vzorků.....	40
3.3.4	Nastavení hmotnostního spektrometru Xevo TQS.....	41
3.3.5	Nastavení chromatografu.....	41
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
4.1	Hmotnostně-spektrická detekce.....	43
4.2	Vliv aditiva a stacionární fáze na chromatografickou separaci.....	44
4.3	Gradient složení mobilní fáze.....	47
4.4	Průtok mobilní fáze a teplota kolony.....	49
4.5	Částečná validace metody a zpracování výsledků.....	51
4.5.1	Opakovatelnost retenčních časů a preciznost ploch píků.....	51
4.5.2	Linearita.....	52
4.5.3	Mez detekce a stanovitelnosti.....	53

4.6	Analýza iontového nápoje a žvýkacích bonbónů.....	53
4.6.1	Stanovení syntetického barviva ve vzorku	56
4.7	Srovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.....	57
5	ZÁVĚR.....	59
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	62

1 ÚVOD

Barviva patří mezi aditivní látky, které jsou společně s lešticími látkami a bělidly řazeny do skupiny látek upravujících vzhled potravin. Barvení potravin má své opodstatnění především z hlediska estetického, nicméně důvodů pro přidávání barviv je mnohem víc, například k obnovení původního vzhledu potraviny, který se během výrobního procesu změnil, k zajištění uniformity výrobku ve všech šaržích nebo k zvýšení spotřebitelské atraktivity. K barvení potravin se využívá široká škála jak přírodních tak syntetických barviv. Většina barviv získaných z přírodních zdrojů je však nestabilní a při zpracování potravin snadno degraduje. Proto se v potravinářství objevují barviva syntetická a to nejen pro svou vysokou stabilitu ale i nízké výrobní náklady. [1]

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA- European Food Safety Authority) v roce 2008 zahájil nové prověřování zdravotní nezávadnosti všech přídatných látek, přičemž mezi první patřila potravinářská barviva. V posledních letech se totiž objevil názor, že některá syntetická barviva mají vliv na chování dětí. [2-5] Odborné stanovisko EFSA k syntetickým potravinářským barvivům bylo zpracováno do nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. 12. 2008 o potravinářských přídatných látkách. [2] Druhy a počty povolených barviv se v jednotlivých zemích liší. Ve většině zemí je povoleno okolo deseti druhů syntetických barviv jako potravinářských aditiv. Některé země barvení potravin neregulují vůbec, jiné zakazují veškeré používání syntetických barviv. [1]

Syntetická barviva použitá v této práci jsou v České republice povolena pouze při výrobě definovaných potravin nebo jejich skupin a to jednotlivě nebo v kombinaci, maximálně však do výše daných limitů. [6] Nejvyšší povolená množství se odvíjí od druhu potraviny. Například v cukrovinkách se maximální limit syntetického barviva pohybuje v rozmezí 200-300 mg/kg, výjimku tvoří ponceau 4R nebo žluť SY, kde se nejvyšší povolené množství pohybuje od 10 mg/kg do 50 mg/kg podle druhu cukrovinek. Výrobky s obsahem barviv žluť SY, chinolinová žluť SY, azorubin, červeň allura, tartrazin nebo ponceau 4R musí být na obalu za uvedením názvu barviva opatřeny doplňující informací, že dané barvivo může nepříznivě ovlivnit činnost a pozornost dětí. [7]

Dlouhodobý vliv syntetických barviv na zdraví člověka není ještě zcela prozkoumán. Dostatečné výzkumy pak mnohdy odhalují chronické poškození zdraví

nebo riziko vzniku rakoviny. Skryté nebezpečí používání potravinářských aditiv by se tedy nemělo podceňovat a nadále je vhodná jejich kontrola státními orgány. [1]

V současnosti se k separaci syntetických barviv používá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/VIS nebo MS detekcí. V budoucnu by se k těmto metodám mohla zařadit i superkritická fluidní chromatografie, u které vhodná volba modifikátoru nebo aditiva do mobilní fáze rozšiřuje její aplikovatelnost i na analýzu polárnějších látek. Předkládaná diplomová práce se zabývá analýzou polárních syntetických barviv superkritickou fluidní chromatografií s využitím strmého gradientu vedoucího k 100 % modifikátoru. Teoretická část je věnována analytickým metodám využívaným k odhalování pančovaných potravin se zaměřením na separační techniky v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Obsahem praktické části je vyvinutí a zhodnocení analýzy polárních syntetických barviv za použití vysoce účinných kolon s částicemi náplně menšími než 2 μm , ionizace elektrosprejem v záporném módu a kvadrupólového hmotnostního analyzátoru. Posuzován byl vliv stacionární fáze, aditiva, gradientu složení mobilní fáze, průtoku mobilní fáze a teploty kolony.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Falšování potravin

Pančované, šizené či jinak znehodnocené potraviny nejsou výsadou současnosti, s případy falšování se můžeme setkat od doby, kdy byly vyráběny za účelem prodeje. V řadě historických textů se nacházejí první zmínky nejen o falšování potravin, ale i trestech, které byly ukládány nepoctivým výrobcům a obchodníkům. [8] Například pražští pekaři ve středověku byli za nepoctivost zavíráni do koše a mácháni ve Vltavě, kdežto nepoctivým sládkům hrozil až trest smrti. Ve 14. století se smrtí trestaly nejen znehodnocené tekutiny, ale i šizení šafránu nekvalitními rostlinnými barvivy. Běžně docházelo k nastavování másla moukou, sádlem nebo strouhaným tuřínem. Z Francie je znám trest, kdy byli nepoctiví výrobci připoutáni na pranýř a pomazáni právě nepoctivou potravinou. Pančování potravin se rozmáhalo především v těžkém období války nebo neúrody. Potravní kodex československý, platný od roku 1937 do roku 1948, definoval a zakazoval pančování potravin, ale také přesně popisoval použití surovin, možné technologické postupy, nutriční hodnotu, zdravotní nezávadnost a mnoho dalších. Například bylo nepřipustné přidávat mouku a jakékoliv další cizorodé látky do masných výrobků s výjimkou soli, koření, vody v povoleném množství, vitamínů či minerálních látek. [9]

S postupy falšování se současně vyvíjely i metody odhalování znehodnocených potravin. Německý chemik Fridrich Accum je považován za zakladatele analytických postupů detekce pančovaných potravin. V Londýně roku 1793 působil jako analytický chemik, konzultant a učitel chemie. Roku 1820 publikoval pojednání o falšování potravin a kulinářských jedech. Kniha na obálce s lidskou lebkou a citátem z Bible „V hrnci je smrt“ vyvolala velký zájem po celé Evropě. Právě v dobách vzniku díla se na britském trhu objevilo velké množství pančovaných potravin. Za zmínku stojí použité čajové lístky, které byly „ošetřeny“ varem v zelené skalici a výluhu z ovčího trusu, poté barveny pruskou modří, octanem mědnatým, mořidlem z kampeškového dřeva, taninem nebo sazemi a opět prodávány jako pravý černý čaj. Obdobným způsobem byla falšována kávová sedlina, obohacena o fazole, písek nebo štěrk, čekanku a sušený kořen divoké endivie neboli štěrbáku. Pro dosažení tmavě hnědé barvy se používal spálený cukr jinak označován „black jack“. [8,10]

O deset let později navázal na práci Fridricha Accumy lékař Arthur Hill Hassall, který v roce 1854 sesbíral a analyzoval 2500 vzorků po celém Londýně. Vzorky byly nejprve analyzovány pod mikroskopem a následně, podle potřeby, ověřovány chemickými testy. Mikroskop umožnil odhalit cizí rostlinný materiál, žijící i mrtvý hmyz nebo krystalky cizí organické látky. Chemické analýzy byly použity k identifikaci kamence v bochníku chleba, železa, olova a sloučenin rtuti v pepři, solí mědi v nakládaném ovoci a zelenině nebo oxidu železitého v omáčkách. Testování alkaloidu v pivu bylo mnohem obtížnější, než testování minerálních solí, ale přesto úspěšné. Test byl založen na barevných změnách vyvolaných různými činidly, jako je kyselina sírová, chroman draselný nebo železitý a soli cínu nebo rtuti. Výsledky podrobné analýzy každého vzorku byly zveřejněny v časopise The Lancet. Po dobu prvních tří měsíců byli nepoctiví prodejci pouze varováni, pokud však nesjednali nápravu, jejich jména byla zveřejněna. Ukázalo se, že falšování potravin bylo spíše pravidlem než výjimkou. [10,11]

Šízení čaje nebo kávy nebylo činností pouze nelegální, ale zároveň se jednalo o výrobky, které ohrožovaly zdraví a život konzumenta podobně jako některé látky přidávané do piva nebo cukrovinek. Cukr byl v 19. století poměrně drahou surovinou, proto se určité množství nahrazovalo drceným vápnem, sádrou nebo síranem vápenatým. Tato levná náhražka se v roce 1858 stala osudnou pro dvacet lidí, kdy byla zaměněna s velmi silným jedem oxidem arsenitým, známým pod názvem arsenik. Nešťastná událost se stala v chudé čtvrti města Bradford, kde se během sobotní noci prodalo pět liber mentolových pastilek. Za smrt 20 lidí a přiotrávení se více než 200 lidí nebyl nikdo obviněn, neboť neexistoval zákoník, který by tento druh přestupku definoval. [8,12]

Dnes je pančování většinou šízením zákazníka, kdy si spotřebitel za své peníze nekoupí produkt odpovídající kvality a očekávaných vlastností, v 19. století falšování ohrožovalo mnohem častěji zdraví spotřebitelů. Případem z nedávné minulosti ohrožujícím zdraví je pančování mléka. V roce 2008 bylo velkou kauzou ředění mléka a maskování nižšího obsahu bílkovin přídavkem průmyslové látky melaminu (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin) pro zvýšení obsahu dusíku. Dávka melaminu v mléce vyvolávala poškození až selhávání ledvin dětí. Podle údajů bylo postiženo téměř 300 tisíc dětí, z nichž šest zemřelo. [13]

Čerstvým příkladem pančování v ČR je přídavek methanolu do lihovin nebo záměna ethanolu methanolem. První případy otravy se objevily v září roku 2012 na severní Moravě a během několika týdnů si vyžádaly několik obětí. Mezi naopak starší příklady patří kauza z roku 1985, kdy se do rakouských vín přidával toxický

diethylenglykol ((2-hydroxyethoxy)ethan-2-ol) pro zvýraznění chut'ového profilu. Nasládlá látka dodávala laciným a kyselým vínům lepší chuť. Podvodníci toho zneužívali a vína uváděli na trh po celém světě jako vína přívlastková. [14]

Falšování je motivováno ekonomickým profitem, proto se nejčastěji napodobují drahé a málo dostupné potraviny jako jsou lihoviny, víno nebo koření, nebo právě naopak potraviny široce dostupné jako jsou oleje, mléčné nebo masné výrobky. Trendy ve falšování potravin lze vyhodnocovat dle počtu záznamů (publikací) věnovaných konkrétnímu problému ve vědeckých databázích. Kromě vědeckých článků jsou vyhodnocovány také zprávy mediální, ale jejich odezva na konkrétní případ falšování se liší podle významu z hlediska dopadu (regionální versus mezinárodní) a podle aktuální situace v dané zemi, například významně stoupl počet článků věnující se pančování mléka po aféře s melanimem v kojenecké výživě. [8]

2.2 Způsoby pančování

Slovo pančovat pochází z rakouského nářečí patschen a znamená kazit či ředit vodou. V českém jazyce může být slovo pančování neboli také falšování chápáno jako padělek nebo napodobenina. V principu se dnešní postupy pančování s postupy popsány v historických pramenech zásadně nemění. Nové případy se objevují se změnou legislativy či dostupností a cenou surovin na trhu. Tabulka I shrnuje hlavní kategorie falšování. [8]

Tabulka 1: Hlavní kategorie falšování potravin [8]

Kategorie	Příklady
Záměna potravin za jinou levnější	vydávání levnější odrůdy za dražší (např. brambory) vydávání mořského pstruha za lososa vydávání jiných rostlinných olejů za olivový
Nastavování potravin levnější složkou	nedeklarované nebo přílišné křehčení masa nedodržení požadavků na obsah tzv. glazury u zmražených mas částečná nebo úplná náhrada rýže Basmati levnějšími druhy přidávky kravského mléka do buvolího při výrobě pravé mozzareilly přidávky mouky z obvyčejné pšenice seté (<i>Triticum aestivum</i>) do těstovin vydávaných za těstoviny vyrobené ze semoliny (vyrobené z mouky pšenice <i>Triticum durum</i>) přidávky pražených slupek do mleté kávy nebo kakaa náhrada dražších druhů ovoce levnějším (jablečné pyré namísto jahod, jablečná šťáva namísto dražších šťáv atd.) ředění olivového oleje jinými rostlinnými oleji přidávky škrobových hydrolyzátů nebo cukerných sirupů do medu přidávky vody, cukru, kyselin a barviv do ovocných šťáv, nektarů, nápojů náhrada části rajčatové sušiny v kečupech cukrem a škrobem snížení obsahu kakaového másla v čokoládě přidávkem jiných olejů ředění mléka vodou

	<p>nedeklarované přídavky rostlinných olejů do mléka a sýrů</p> <p>ředění vína a burčáku vodou</p> <p>nedeklarované přídavky sójových, cereálních, hrachových a jiných rostlinných bílkovin do masných výrobků</p> <p>přídavky vlákniny do masných výrobků</p> <p>použití krevních bílkovin namísto svaloviny v masných výrobcích</p>
Přítomnost nedeklarovaných složek	<p>nepovolené nebo nedeklarované použití strojně odděleného masa v masných výrobcích</p> <p>nedeklarované použití vnitřností v masných výrobcích nebo nedodržení deklarovaného podílu, např. jater v paštikách</p> <p>nedeklarované použití jiných druhů masa v masných výrobcích (drůbežího, koňského), masa, na které by spotřebitel nemusel reagovat pozitivně (nutrií, hlodavců atd.)</p>
Nastavení nebo falšování potravin ke zlepšení jejich vlastností	<p>přídavek glycerolu do vína ke zlepšení chuti</p> <p>nedovolená aromatizace vín (přídavek aromových kompozic)</p> <p>nedeklarované nebo nepovolené přibarvování (barvení výrobků z červeného ovoce, přibarvování těstovin a knedlíků žlutými pigmenty, přibarvování masných výrobků a polotovarů atd.)</p>
Nedodržení deklarovaného technologického postupu	<p>vydávání rozmrazeného masa a ryb za čerstvé</p> <p>deklarování rozpékaného pečiva jako čerstvého</p> <p>nedeklarované použití gama záření při výrobě</p> <p>vydávání rekonstituované šťávy z koncentrátu za šťávu čerstvě lisovanou</p> <p>vydávání syntetické kyseliny octové za kvasný ocet</p> <p>použití syntetického lihu k výrobě lihovin</p> <p>nedodržení technologie výroby burčáku, vína, piva, medoviny (použité suroviny – surogát namísto sladu u piva, výluhy matolin a umělé kompozice u vína, přídavky lihu atd.)</p> <p>vydávání obyčejného oleje za olej lisovaný za studena (panenský olivový olej)</p> <p>označování řezaných destilátů jako pravé destiláty, nesprávně uvedení stáří destilátu</p>
Uvádění vyššího než skutečného obsahu složky	<p>uvádění vyššího počtu vajec v těstovinách</p>

	<p>deklarace podílu svalových bílkovin v masných výrobcích zkrácená přidavkem krevních bílkovin a dalších složek</p> <p>používání etiket a označování uvádějících spotřebitele v omyl (obrázky, názvy, grafické symboly neodpovídající složení potraviny)</p>
Nesprávné uvádění geografického původu nebo způsobu produkce	<p>vydávání ryb produkovaných na farmách za divoké označování obvyklé produkce za bio (organic)</p> <p>vydávání dovozových vín za moravská</p>
Zneužití známé značky	<p>falešný prodej výrobku pod dražší obchodní značkou (např. lihoviny vyrobené pokoutně ze syntetického lihu plněné do obalů známých značek)</p> <p>používání obalů, etiket, názvů připomínajících známou značku atd.</p>

Samotná klasifikace je někdy obtížná, neboť jednotlivé kategorie nejsou přesně vymezeny a navzájem se překrývají. Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č.110/1997 Sb. ani základní evropský předpis potravinového práva – nařízení č. 178/2002 ES pojem „falšovaná“ potravina či „falšování“ přímo nedefinuje. Podle §10 tohoto zákona je zakázáno uvádět do oběhu potraviny klamavě označené nebo nabízené ke spotřebě klamavým způsobem. Podle článku 16 nařízení č. 178/2002 ES pak spotřebitel nesmí být uváděn v omyl nejen z hlediska označování potraviny, ale ani z pohledu propagace a její obchodní úpravy, jejího tvaru, vzhledu nebo balení, použitých obalových materiálů, způsobu její úpravy a místa vystavení, jakož i z hlediska informací poskytovaných o ní jakýmkoli médiem. Specifickým případem falšování potravin a klamání spotřebitele je nedodržování požadavků vycházejících ze směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13 ES týkající se zásady uvádět údaje o množství složek nebo skupin složek používaných při výrobě nebo přípravě všech balených potravin označovaných jako tzv. QUID pravidla (z anglického quantitative ingredient declaration), zavedena v české legislativě prostřednictvím vyhlášky č. 113/2005 Sb. o způsobu označování potravin a tabákových výrobků. Vyhláška stanovuje, že se množství složky v hmotnostních nebo objemových procentech, popřípadě v g/100 g potraviny nebo v ml/100 ml uvede na obalu v blízkosti názvu nebo u příslušné složky. Výjimkou jsou lihoviny a to v případech kdy se složky nebo skupiny složek použijí v názvu potraviny, pod nímž se potravina uvádí do oběhu nebo ji spotřebitel s tímto názvem obvykle spojuje. Složka nebo skupina složek je v označení zdůrazněna slovně, obrazově nebo graficky a je

základní pro charakteristiku potraviny a pro její odlišení od výrobků, se kterými by mohla být zaměnitelná pro svůj název nebo vzhled. V praxi to znamená povinnost množství zdůrazněné složky uvést ve složení. [15]

Další požadavky na složení jednotlivých druhů potravin jsou upřesněny ve vyhláškách k zákonu o potravinách, například Vyhláška č. 326/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich a vyhláška č. 157/2003 Sb. pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování. [8]

Kontrola kvality potravin je prováděná prostřednictvím orgánu státního dozoru (Státní zemědělská a potravinářská inspekce SZPI a Státní veterinární správa SVS) s ohledem na požadavky uvedené ve vyhláškách a dalších předpisech. Problémem je, že výrobci jsou tlačeni k co nejnižším cenám, pokud spotřebitelé kvalitní a nefalšované potraviny nenakupují v dostatečném množství oproti levným potravinám, u kterých se jejich výrobci pohybují až na hranici požadavků legislativy. [8,15]

2.3 Analytické metody kontroly pravosti potravin

Postupy pro hodnocení pravosti potravin lze dělit do dvou skupin. Do první skupiny se řadí kontrolní postupy, které spočívají v kontrole záznamů a dokumentů u výrobců, zpracovatelů a distributorů. Tyto postupy zvyšují nároky na evidenci jednotlivých subjektů a rovněž na samotné kontrolní orgány, které mají ve své kompetenci provádět kontroly a přezkoumávat veškerou dokumentaci. Z dokladů je tak možné odhalit například pančování medu, pokud výrobce vedle medu nakupuje ve velkém množství i cukerný sirup. [16]

Druhá skupina postupů je založena na kontrole kvalitativních znaků u jednotlivých výrobců. Pro sledování těchto znaků existuje celá řada metod, které se vážou ke složení, původu a způsobu zpracování potraviny. Při praktickém ověřování však velká část z nich naráží na faktory, které s pravostí či pančováním potravin nesouvisí. Tyto problémy jsou dány širokou variabilitou použitých surovin, které souvisí se způsobem pěstování nebo chovu, odrůdami rostlin nebo plemeny zvířat, s ročním obdobím a řadou dalších. Tyto faktory je třeba zohlednit při ověřování autenticity. Jedním z přístupů je analýza markerů související s konkrétním druhem pančování. Příkladem může být průkaz nedeklarovaného přídavku mechanicky separovaného masa na základě přítomnosti úlomků kostí a obsahu vápníku v produktu nebo průkaz flavonoidu floridzinu v jahodovém džemu, který je typický pro jablka a v jiných druzích ovoce je přítomen ve významně menším množství. Druhý přístup zahrnuje cílenou nebo necílenou analýzu jedné či více složek, jejichž výsledky jsou zpracovány statistickými metodami a porovnávány s vlastními nebo komerčně dostupnými databázemi. Odlehlé vzorky, které se liší svým složením, jsou podezřelé. S ohledem na problémy dané přirozenou variabilitou, je interpretace pančovaného vzorku založena na více než jednom markeru. Pro posouzení pravosti je nutné expertní posouzení celého stavu potraviny. Příkladem může být draslík, který je významným markerem ovoce a zeleniny a selhává v případě konzervace produktů sorbanem nebo benzoanem draselným, v případě, že je v receptuře nahrazen běžný ocet kyselinou citronovou způsobí náhrada nadhodnocení tohoto parametru při výpočtu. [16]

Ke zjišťování a průkazu falšovaných potravin slouží široká škála metod od nejjednodušších senzorických metod (posouzení barvy, vzhledu, chutě, vůně nebo konzistence výrobků), přes klasické metody založené na fyzikálně chemických vlastnostech postihující základní složky resp. vlastnosti potraviny (stanovení hmotnosti,

sušiny/ vlhkosti, dusíku/ bílkovin, tuku, kyselosti, pH, vlákniny apod.) až po složité instrumentální metody vyžadující nejmodernější přístroje a kvalifikovanou obsluhu (izotopové metody, biochemické, molekulárně-biologické a imunochemické metody, separační a spektrální metody.). [17]

K prokázání falšované potraviny je zpravidla potřeba několika stanovení a měření. Nezbytnou součástí velkého počtu analýz je vysoce účinný selektivní separační krok a dále použití kombinace dvou či více vzájemně propojených měřících technik. Příkladem může být kombinace chromatografické nebo elektromigrační separace se dvěma či více detekčními technikami jako je HPLC-UV/VIS-ED (vysokoúčinná kapalinová chromatografie následovaná spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí) nebo CE-MS/MS (kapilární elektroforéza s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí). Rozsah potřebné analýzy nelze předem jednoduše odhadnout, neboť nevíme, do jaké míry bylo falšování provedeno, případně zamaskováno. [16]

2.3.1 Analýza stabilních izotopů

Mezi hlavní komponenty organické hmoty patří vodík, uhlík, kyslík a dusík. Tyto základní prvky se v živém materiálu nacházejí ve dvou hlavních stabilních izotopech, jejichž charakteristický poměr ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) je významný při posuzování autenticity potravin. [8] Zastoupení je závislé na environmentálních podmínkách, například poměr stabilních izotopů uhlíku je závislý na způsobu využívání vzdušného oxidu uhličitého rostlinami. Pro fixaci oxidu uhličitého v rostlinách jsou známy tři mechanismy, a to Calvinův cyklus (C_3 rostliny), CAM cyklus (crassulacean acid metabolism neboli metabolismus kyselin u tučnolistých) a Hatch-Slackův cyklus (C_4 rostliny). Skutečnost, že C_3 rostliny (pšenice, luštěniny, brambory) použijí fotosyntézou méně ^{13}C izotopu než C_4 rostliny (kukuřice, cukrová třtina), je dáno odlišnými mechanismy a karboxylačními enzymy. [8, 17]

U izotopů $^2\text{H}/^1\text{H}$ a $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ je míra rovnovážné frakcionace při výparu a kondenzaci závislá na teplotě, tedy čím bude teplota vzduchu vyšší, tím se relativně více těžších molekul vody vypaří. [18] Proto výpar a tím i déšť bude v rovníkových oblastech izotopově těžší než nad studenými póly Země. Obecně platí, že ve vyšších zeměpisných šířkách, nadmořských výškách a ve vnitrozemí jsou srážky ochuzené o těžší kyslíkové a vodíkové izotopy. Také podzemní voda obsahuje minimální množství těžkých izotopů, zatímco povrchová voda je izotopově bohatší. Stromy například přijímají hlubší půdní nebo podzemní vodu, která rostlinou protéká bez frakcionace a transpirovaná vodní pára

má stejné izotopové složení jako voda v půdě. [19] Naopak voda v listech bývá izotopově obohacena proti zdrojové vodě, protože lehké izotopy ve formě vody se vypařují dřív, než těžší izotopy, které se hromadí uvnitř listu. Tento fakt má velké důsledky na izotopové zastoupení u kyslíku a vodíku v organických látkách syntetizovaných v rostlinách. Izotop kyslíku ^{18}O je v buňkách vyměňován s molekulou CO_2 a při fotosyntetické karboxylaci je zabudováván do organických látek, jako je tomu v případě celulózy. [20]

K analýze stabilních izotopů jsou zejména využívány SNIF-NMR (z angl. Site-specific Natural Isotope Fractionation) (^2H -NMR stanovení poměru stabilních izotopů vodíku $^2\text{H}/^1\text{H}$ nukleární magnetickou rezonancí) a různé varianty IRMS (z angl. Isotope Ratio Mass Spektrometry) (např. EA-IRMS; elementární analýza-hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů; stanovení poměrů $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). [8] Zmíněné izotopové techniky byly využity k určení botanického původu octa a k rozlišení přírodní a syntetické kyseliny octové. U kvasného lihového octa se poměry $^2\text{H}/^1\text{H}$ pohybují v rozmezí od 90 ppm do 110 ppm v závislosti na botanickém původu, u C_3 rostlin je poměr 90-100 ppm, u C_4 rostlin je poměr okolo 110 ppm, zatímco poměry $^2\text{H}/^1\text{H}$ u syntetické kyseliny octové se pohybují v rozmezí od 120 ppm do 140 ppm. Isotopový poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$ je proto dostatečný marker pro průkaz rozdílu mezi kvasným lihovým octem a syntetickou kyselinou octovou. Směsi kvasného octa a syntetické kyseliny octové není možné posuzovat pouze na základě analýzy poměru $^2\text{H}/^1\text{H}$, jelikož přídavek syntetické kyseliny octové ke kyselině octové z C_3 rostlin nelze rozpoznat od kvasných octů z C_4 rostlin, proto je nutné stanovit i isotopový poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Kromě izotopových poměrů $^2\text{H}/^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ může být stanoven také isotopový poměr $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, který potvrzuje geografický původ vody, ze které byl ocet vyroben. [21]

Uplatnění nachází analýza stabilních izotopů i při posuzování pravosti ovocných šťáv. Pomocí metod IRMS a SNIF-NMR je možno získat informace o původu suroviny, identifikovat přídavek cukru, naředění šťávy vodou, přídavek organických kyselin, informace o technologických podmínkách výroby či geoklimatickém prostředí. [22] Za zmínku stojí taktéž posuzování autenticity medu celkovým poměrem izotopů uhlíku $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pomocí IRMS, kde měření odhaluje přídavek tzv. C_4 cukrů. Cukrová třtina spolu s kukuřicí a dalšími rostlinami patří mezi C_4 rostliny, jejich cukry vznikají ze čtyř uhlíkatých prekurzorů. Tyto rostliny neprodukují nektar, a proto se jejich cukry mohou do medu dostat jedině falšováním. Zásadní rozdíl mezi cukry C_3 a C_4 je v rozdílném poměru izotopů uhlíku, který vzniká rozdílným metabolismem C_3 a C_4 rostlin. Na rozdíl od přídavků cukrové třtiny, či hydrolyzátů kukuřičného škrobu, nelze touto metodou

prokázat přídavek jak řepného cukru tak sacharidových a škrobových hydrolyzátů pocházejících z brambor nebo obilovin. [23]

Stabilní izotopy se staly nenahraditelným pomocníkem v řadě důležitých oborů od základního výzkumu až po průmysl. Rozvoj instrumentálních technik umožnil řadu aplikací, zejména určení botanického původu a ověření pravosti výrobků. Mezi příklady patří již zmíněná identifikace přírodní a syntetické kyseliny octové, autentizace ovocných šťáv, medu, vína, lihovin, olivových olejů, kávy a mnoho dalších. [8, 21]

2.3.2 Metody založené na analýze DNA

Základem pro mnohé molekulárně biologické metody je polymerázová řetězová reakce (PCR). Za podmínek *in vitro* lze velice rychle a selektivně namnožit konkrétní nukleotidovou sekvenci obsaženou v DNA. Principem PCR je cyklicky se opakující syntéza templátové molekuly DNA katalyzovaná DNA- polymerázou. Samotná syntéza DNA je pak řízena dvěma krátkými oligonukleotidy, takzvanými primery, které se komplementárně párují s denaturovanou templátovou DNA na počátku a na konci vybraného úseku. Od primeru se na obou matricových řetězcích původní dvouřetězové molekuly DNA utváří nová vlákna. [24]

Polymerázová řetězová reakce je velice užívaná metoda, má však jistá omezení, mezi něž patří vysoká citlivost, která u kontaminovaných vzorků může poskytnout falešné pozitivní reakce. [25] Výhodou je amplifikace (kopírování) DNA, kterou lze provádět z velmi starého a degradovaného vzorku biologického původu a je často možná i pro ne zcela známou sekvenci primerů. [24, 26]

Kromě PCR existuje celá řada modifikací, které jsou upraveny podle účelu analýzy. Známa je mnohonásobná PCR (multiplex PCR), polymorfismus délky restrikčních fragmentů produktů PCR (RFLP), PCR v reálném čase (qPCR) a mnoho dalších. [27, 28]

Metody molekulární genetiky, zejména PCR a PCR-RFLP našly uplatnění v určování druhového původu masa a masných výrobků. Pro průkaz falšování masa jatečných zvířat a zvěřiny je metoda enzymatického zmnožení nukleových kyselin jednou ze specifických metod. Metoda je nejen schopna rozlišit různé druhy masa, ale je schopna detegovat nízké procento přídavku masa druhově odlišného. Identifikace se týká jak tepelně upraveného masa tak masa pocházející z tepelně ošetřených nebo fermentovaných masných výrobků. Druhovou identifikaci masa molekulárními metodami využívají kontrolní orgány, provádějící dozor nad potravinami, celní orgány

k ověření importovaného a exportovaného zboží, dovozci i odběratelé při pochybnostech o složení masa a masných výrobků. [29]

Dalším příkladem využití PCR spočívá v odhalení lepkových bílkovin v potravinách, které jsou potenciálně toxické pro osoby trpící geneticky podmíněným onemocněním jako je glutensenzitivní enteropatie, Gee-Hartenův syndrom, alergie na lepek apod. Metoda je schopna detegovat kontaminaci vzorku nepoškozenými nukleovými kyselinami DNA alergenních obilovin v potravinách. I když je hlavní volbou pro stanovení alergenních proteinů ELISA (z angl. Enzyme linked immunosorbent assay), PCR je vhodnou alternativou k této metodě vykazující vyšší citlivost. Poměrně dobrá shoda výsledků obou metod nabízí možnost jejich vzájemné kontroly. [30]

Na základě genetické informace umožňují molekulárně-genetické metody určit i patogenní mikroorganismy v potravinách. Pro samotnou PCR analýzu je potřeba bakterie ze zkoumaného vzorku izolovat, neboť matrice může snižovat citlivost stanovení, rozmnožit v tekutém médiu a provést lýzu. Takto lze určit například *Listeria monocytogenes*, patogenní mikroorganismus kontaminující mlékárenské a masné výrobky. [31]

Kromě výše zmíněných příkladů se metody PCR využívají k detekci alergenů, identifikaci použitého masa, detekci exotických druhů masa, rozlišení pstruha mořského a lososa, identifikaci lososa nebo tuňáka v konzervách, identifikaci druhů ovoce, Basmati rýže, detekci pšenice seté v těstovinách, k detekci geneticky modifikovaných rostlin nebo různých patogenních mikroorganismů a virů. [8, 32 a 33]

2.3.3 Proteomické metody

Vývoj molekulární biologie, genomiky, bioinformatiky, spektrálních a separačních metod přispívá k rychlému vzestupu proteomické analýzy, která umožňuje provádět necílenou i cílenou analýzu proteomu. [34] Dynamický rozvoj proteomických metod byl umožněn především díky pokrokům hmotnostní spektrometrie a to zejména ionizačních technik jako je ESI (Electrospray Ionization) nebo MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization, ionizace laserem za přítomnosti matrice). Hlavním cílem proteomiky je nejen identifikace bílkovin (včetně stanovení molekulové hmotnosti, určení sekvence aminokyselin, pozice vazeb S-S a posttranslačních modifikací), ale i popis funkce bílkovin v procesech probíhajících v organismech. Existuje několik hmotnostně spektrometrických způsobů identifikace proteinů, kam se řadí PMF (peptide

mass fingerprinting) neboli peptidové mapování a PFS (peptide fragment sequencing) neboli fragmentační analýza peptidů. [35, 36]

Proteomická analýza se stala vhodnou metodou pro jednoznačnou identifikaci glutenových bílkovin v potravinách toxických pro pacienty s celiakií. Výchozím materiál pro studium glutenových bílkovin byla pšeničná mouka, která je složkou mnoha potravin. Pro enzymatické štěpení byl využit chymotripsin, který štěpí peptidové vazby na C-konci tyrosinu, fenylalaninu, tryptofanu, leucinu, methioninu a alaninu a poskytuje tak peptidy o molekulových hmotnostech vhodných pro analýzu hmotnostní spektrometrií MALDI TOF (z anglického time of flight, detektor doby letu). Nejpoužívanějším enzymem v proteomických analýzách je trypsin, který však z důvodů nízkého obsahu argininu a lysinu ve struktuře glutenových bílkovin nebylo vhodné použít. [37]

Proteomické aplikace v detekci falšování potravin jsou teprve na počátku vývoje. Dnes se uplatňují při kontrolách kvality a bezpečnosti potravin nebo k zavádění nových výrobních procesů. Například se do databází dostávají specifické peptidové markery k identifikaci a průkazu přítomnosti uvedeného druhu masa v masných výrobcích, je tak možné detegovat například vnitřnosti v masných výrobcích. Proteomická analýza dokáže rovněž odhalit falšování masa sójovými proteiny, přídavek vepřových nebo hovězích želírovacích činidel nebo kontaminaci masa mikroorganismy a viry. Dále se zjišťuje přítomnost čířidel ve víně či přítomnost patogenů. Kromě toho přispěla kompletní anotace hovězího a lidského proteomu mléka k vytvoření umělé mléčné výživy pro děti. [8]

2.3.4 Spektrální metody

K analýze a detekci pančovaných potravin se rovněž využívají techniky vibrační spektroskopie. Ze tří oblastí IR záření je nejpoužívanější zejména střední infračervená oblast MIR ($4000-200\text{ cm}^{-1}$) a blízká infračervená oblast NIR ($12800-4000\text{ cm}^{-1}$). [38] MIR spektra poskytují informace o chemických vazbách v molekule, naopak z NIR spekter vychází kompletní obraz organického složení analyzovaného vzorku. Metody infračervené spektroskopie se uplatňují jak v kvalitativní tak kvantitativní analýze, nejdůležitější je však použití v oblasti identifikace a strukturní analýze organických i anorganických látek. [39]

Spektroskopie v NIR oblasti je velice používaná v analýze zemědělských produktů a potravinářských surovin již od 60. let. Mezi první aplikace NIR patří stanovení obsahu vody v potravinách jako je mléko, maso, brambory nebo ovoce, kde se obsah vody pohybuje v rozmezí od 70 do 90%. Kromě vody stanovuje NIR spektroskopie sacharidy,

kteře se v potravinách vyskytují velice často a především v různých kombinacích. Obsah sacharózy je možné stanovovat ve víně, čokoládě či pečivu, v mléce je často analyzován obsah laktózy. Kromě hlavních složek může technika stanovovat i jiné složky obsažené v potravinách, může se jednat o mastné kyseliny v mléce, olivovém oleji či králičím mase, o rozpustnou a nerozpustnou vlákninu, o škrob a β -glukan v cereáliích, o hořké kyseliny chmele v pivu a destilátech nebo o polyfenoly ve víně. U mléka a mléčných výrobků lze pomocí FT-NIR (spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou transformací) sledovat proces srážení a určení okamžiku zahájení krájení sýřeniny. Do sýrové vany, kde probíhá enzymová hydrolýza κ -kaseinu, se umístí sonda vláknové optiky a měří se závislost absorpance na čase pro určení optimální doby začátku zpracování. Kromě κ -kaseinu se sleduje titrační kyselost, kolagenní částice, pH či obsah somatických buněk. Zvýšený výskyt somatických buněk je známkou zánětu mléčné žlázy a u nehomogenizovaného syrového mléka se tak dá rozeznat mléko od dojnice zdravé a dojnice se zánětem vemene. NIR spektroskopii lze sledovat i látky nebezpečné lidskému zdraví, kam řadíme například pesticidy v rostlinných produktech, toxiny nebo antibiotika v živočišných produktech. Hodnotí se i obsah alkaloidů v čaji a kávě, kde kromě kofeinu jsou často stanovované teobromin a teofylin. Technika NIR spektroskopie je vhodná k odhalování původu sýrů, medů či jiných potravin. Důležitou možností je detekce náhrady dražší složky složkou levnější, příkladem je přídavek kravského mléka do kozího, nahrazení cibulového prášku kukuřičným škrobem, nahrazení mletého hovězího masa masem krůtím nebo náhrada mléčného tuku tukem rostlinným. Pomocí FT-NIR techniky byl spolehlivě zachycen i přídavek melaminu v diskutované kauze sušeného mléka. Velkou roli hraje NIR spektroskopie také u sledování mikrobiologických procesů například při identifikaci volných aminokyselin během zrání sýrů, sledování tvorby ethanolu a obsahu cukrů při kontrole správné fermentace piva nebo ke sledování napadení jablek *Gloeosporio*ovou hnilobou. [40]

Mezi techniky vibrační spektroskopie se kromě infračervené spektroskopie řadí i Ramanova spektroskopie, která je založena na nepružném rozptylu monochromatického světla. Ramanova analýza se snadno provádí ve vodných médiích i přes skleněné obaly, neboť signál vody i skla ve spektru je velice slabý a nepřekrývá se se signály proteinů, lipidů a sacharidů, které jsou naopak citlivé a specifické. [41] Vhodnost použití této techniky v potravinářství ukazuje i studie povrchového hodnocení bezpečnosti a kvality potravin, která je založena na relativně nové technice RCI (Raman Chemical Imaging) pro povrchovou kontrolu. Technika kombinuje výhody Ramanovy spektroskopie

a digitálního zobrazování k analýze struktury a složení potravin a současně poskytuje lepší detaily o vibracích kovalentních vazeb a vizualizuje přítomnost a distribuci kontaminantů v potravinách. [42] Ve studii Qina a kol. byla technika RCI použita pro detekci a vizualizaci vnitřní distribuce lykopenu během dozrávání rajčat. Po rozkrojení vzorků rajčat v různých stádiích zralosti byly v rozmezí vlnových délek 200-2500 cm^{-1} naměřeny hyperspektrální snímky s prostorovým rozlišením 1 mm. Obsah lykopenu postupně rostl se zralostí rajčat od zelených přes světle červené po tmavě červené. [43] Obdobným způsobem byly získány hyperspektrální snímky mléčné směsi pro detekci čtyř adulterantů síranu amonného, dikyandiamidu, melaminu a močoviny na koncentračních úrovních (w/w) 0,1-5,0 % v rozsahu vlnových délek 102-2538 cm^{-1} . [44] Kromě RCI techniky byla k detekci melaminu využita i povrchem zesílená Ramanova spektroskopie SERS (Spectral Enhanced Raman Scattering). Výhody SERS spočívají v zesílení Ramanova rozptylu s využitím nanostruktury vzácného kovu, a to až tisícinásobně. [45]

Široké spektrum aplikací související s potravinami má i nukleární magnetická rezonance (NMR). Uplatňuje se v potravinářství, včetně mikrobiologie potravin, chemie potravin, potravinářského inženýrství nebo balení potravin. Možnosti NMR spektroskopie v ověřování pravosti potravin jsou velké a uplatnily se například k posuzování mléka a sýrů, lanýžů, vanilky, pistácií nebo šafránu. Kromě toho byla popsána NMR analýza panenského olivového oleje, který je pro svou vysokou cenu a kvalitu terčem podvodných činů, jako je chybné označení původu či jejich autenticita. Obdobně na tom jsou alkoholické nápoje, pivo nebo výroba ovocných šťáv. Svůj potenciál prokázala ^1H -NMR spektroskopie také v pančování zeleného čaje, kde je schopna detegovat z jednoho extraktu současně katechiny, aminosloučeniny, fenolové sloučeniny a mastné kyseliny související s kvalitou čaje. ^1H -NMR spektroskopie se uplatňuje i v identifikaci a kvantifikaci nežádoucích příměsí v pražené a mleté kávě, mezi které patří ječmen, kukuřice, sója nebo kávové slupky. [46]

UV-VIS spektroskopie se rovněž využívá k analýze potravin, avšak ve srovnání s ostatními technikami není pro autentizaci potravin tak významná. Naopak značný význam má hmotnostní spektrometrie (MS). Kromě již zmíněné techniky IRMS, použití MS jako součást proteomických metod, se významně uplatňuje jako detekční technika ve spojení se separačními metodami (plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kapilární elektroforéza (CE)). Pro autentizaci potravin jsou perspektivní metody hmotnostní spektrometrie v otevřeném prostoru s různými způsoby ionizace (ambientní ionizační technika) ve spojení

s vysokorozlišovací schopností hmotnostního spektrometru. [8] Uplatňuje se např. ionizace pro přímou analýzu v reálném čase DART (Direct Analysis in Real Time), kdy metoda prakticky nevyžaduje žádnou nebo pouze minimální úpravu vzorku a ve velmi krátkém čase je možné získat hmotnostní spektrum vzorku. [47] Metoda patří mezi poměrně nové techniky a byla použita například k rozlišení trapistických piv [48] nebo k průkazu falšování olivového oleje lískovým. [49] Zástupcem těchto technik je také desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku - DAPCI (Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization), která byla například použita k autentizaci mořské okurky [50] nebo k rychlému prokázání kontaminace produktů na bázi čaje. [51]

2.3.5 Elektroanalytické metody

Elektroanalytické metody se v analýze potravin dostávají v posledních letech do popředí a to hlavně pro svou rychlost a ekonomickou nenáročnost. Využití našly například v hodnocení antioxidační aktivity (schopnost zachytit radikál) v potravinách a nápojích. Obecně se identifikace a kvantifikace antioxidantů v potravinách provádí kapalinovou nebo plynovou chromatografií, micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií, kapilární elektroforézou, UV-VIS spektrofotometrií a dalšími. Vzhledem k některým nevýhodám zmíněných technik (v některých případech drahá činidla a vybavení nebo náročnější předúprava vzorku) představují elektroanalytické techniky rychlou, jednoduchou a nenákladnou alternativu. Navíc tyto techniky dovolují měření v přítomnosti rušivých sloučenin jako je kyselina askorbová nebo měření v barevných vzorcích ovocných šťáv a vín. Mezi nejběžnější a nejčastěji používané elektroanalytické techniky k hodnocení antioxidační aktivity patří cyklická voltametrie, square wave voltametrie, diferenčně pulzní voltametrie a chronoamperometrie. [52]

Ne méně důležité jsou aplikace elektroanalytických biosenzorů, které se v oblasti analýzy a bezpečnosti potravin stávají stále významnější. V posledních letech se rozšiřují biosenzory obsahující nanomateriály, které svými jedinečnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi výrazně ovlivňují schopnosti biosenzorů. Díky vysoké selektivitě, citlivosti, rychlé odezvě a použitelnosti v terénu mohou analyzovat vzorky potravin on-line nebo v reálném čase. Miniaturizace elektrochemického snímače umožňuje široké využití v oblasti zpracování, skladování a distribuce potravin. K analýze potravin se především využívají elektrochemické biosenzory s nanomateriály založenými na uhlíku, nanočástice kovů a oxidů kovů a magnetické nanočástice. [53]

2.4 Separační metody

Chromatografické metody patří mezi standardně používané metody k hodnocení autenticity potravin. Především pro analýzu konkrétních markerů při průkazech předpokládaného způsobu falšování se mnohdy aplikují metody plynové a kapalinové chromatografie. Zejména GC metody našly využití v analýze profilů těkavých látek, mastných kyselin, sterolů a triacylglycerolů (TAGs) naopak LC metody se používají k analýze sacharidů, TAGs a kyselin. [8]

Mezi příklady plynové a kapalinové chromatografie můžeme zařadit stanovení akrylamidu ve vodách, biologických tekutinách a tepelně neupravených potravinách jako je kukuřice, brambory, cukrová řepa apod. Pro analýzu potravin upravovaných za vysokých teplot je vzhledem k větším interferencím daleko výhodnější spojení těchto technik se selektivními detektory, především s hmotnostním spektrometrem. Akrylamid je toxický, karcinogenní, genotoxický a neurotoxický pro centrální nervový systém a je zařazen Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny do skupiny látek s označením 2A, tedy jako potenciální lidský karcinogen. V roce 2002 vyvolal rozruch objev švédských vědců, kteří prokázali v některých potravinách zvýšený obsah akrylamidu. Vysoké koncentrace akrylamidu vznikají v potravinách rostlinného původu, které jsou bohaté na škrob a které jsou tepelně upravované při teplotě více než 120 °C ať už smažením, pečením, pražením, grilováním atd. Jedná se především o smažené bramborové lupínky a hranolky, kávu, pečivo, sušenky, sníadaňové cereálie a mnoho dalších. Přítomnost akrylamidu v potravinách lze z větší části vysvětlit jako důsledek Maillardovy reakce, kdy dochází k reakci mezi aminokyselinami a redukcujícími cukry. Metoda GC je využíváné k analýze akrylamidu ve vodách, matričně složitějších potravinových vzorcích i ke stanovení akrylamidu v plynných produktech uvolňovaných např. při spalování a pyrolýze některých typů potravinových vzorků. [54]

Stanovením akrylamidu plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí se zabývá i práce Papouška a kol. Jelikož bývá obsah akrylamidu ve vzorcích velmi nízký a navíc složité matrice mohou obsahovat rušící látky, ovlivňující stanovení, je nutné provést derivatizaci analytu pro dosažení vyšší selektivity a nižších detekčních limitů. Pro danou metodu byla využita bromace a akrylamid byl mimo jiné stanoven ve smažených bramborových lupíncích, perníku, mleté červené paprice nebo mleté kávě. [54]

V případě kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií je metoda nejpoužívanější technikou v oblasti kvantifikace a strukturní charakterizace nízkomolekulárních polyfenolů. Počet publikací zabývajících se analýzou polyfenolů je obrovský a některé přehledové články a kapitoly věnované této problematice jsou uvedeny v přehledu literatury. [55-58]

K dalším příkladům chromatografické separace se řadí určení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. Z prohlubujících se poznatků o jejich biologickém působení na člověka se zvýšil zájem o identifikaci a stanovení koncentrací jednotlivých biogenních aminů v potravinách. Biogenní aminy jsou sice pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky vasoaktivní a psychoaktivní. Zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypo- nebo hyper-tenze a migrény jsou možné symptomy při konzumaci vysokých dávek biogenních aminů. Pro stanovení biogenních aminů bylo vyvinuto několik technik zahrnující plynovou (GC) a kapalinovou chromatografii (LC) nebo kapilární elektroforézu (CE). V praxi se pro stanovení nejčastěji používají citlivé metody kapalinové chromatografie na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí po dansylaci, benzoylaci nebo derivatizaci s 9-fluoromethyl chloroformátem, N-hydroxysuccinimidyl-6-chinolyl karbamátem nebo *o*-ftaldialdehydem. V posledních letech se jeví jako velice spolehlivá a vysoce citlivá elektrochemická nebo hmotnostně spektrometrická detekce (LC/MS). K separaci podle Smělé a kol. byla použita reverzní fáze C8 a lineární gradientová eluce po derivatizaci biogenních aminů ftalanhydridem a dansychloridem. K detekci byl použit fluorescenční detektor. [59]

Kromě chromatografických metod se k analýze potravin používají i alternativnější metody jako je kapilární elektroforéza CE, kapilární elektrochromatografie CEC, nano-kapalinová chromatografie nano-LC či kapilární kapalinová chromatografie CLC. Počet aplikací zmíněných metod je ve srovnání s konvenčními LC nebo GC metodami stále malý, jejich uplatnění v oblasti analýzy potravin je však věnována pozornost. Například CEC metoda byla využita v analýze lipidů, mastných kyselin a jejich esterů, nukleosidů, aminokyselin a antioxidantů v široké škále potravinových matic. [60]

2.4.1 Rychlé separace

Mezi příklady rychlých separací patří stanovení formaldehydu v mléce skotu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí (HPLC-UV). Formaldehyd se do mléka přidává podobně jako peroxid vodíku, kyselina salicylová, chlornan sodný nebo

dichroman draselný k prodloužení trvanlivosti produktu, neboť má antiseptické a konzervační vlastnosti. Formaldehyd je reaktivní vůči řadě endogenních molekul včetně glutathionu, bílkovin, nukleových kyselin a kyseliny listové, je tedy toxický pro člověka a Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) jej klasifikovala jako karcinogenní. [61]

Spojení HPLC-UV bylo použito na přímé stanovení formaldehydu ve vzorcích mléka bez nutnosti destilace nebo jiné předběžné úpravy vzorku (prováděna byla deprivatizace 2,4-dinitrofenylhydrazinem). Separace byla provedena na koloně Supelcosil C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) gradientovou elucí mobilní fáze acetonitrilu a vody. Teplota kolony byla 30 °C a retenční čas příslušného hydrazonu byl 4,6 minut. Navzdory složitosti matrice byla metoda jednoduchá, precizní a za daných podmínek nebyla pozorována žádná interference. Nízká hodnota LOQ (10 μg/l - 20 μg/l) této metody vede k možnosti detekce stopových hladin formaldehydu. [61]

Dalším příkladem rychlé separace je RP-HPLC s detekcí DAD, která stanovuje histamin v rybách a rybích produktech. Kontrola přesné koncentrace histaminu je důležitá pro lidské zdraví a kvalitu potravin. Detekce histaminu v rybích produktech se provádí širokou škálou analytických metod, jako jsou imunoenzymatické, kolorimetrické a chromatografické metody. Nařízení EU 2073/2005 vyžaduje stanovení histaminu ve třech různých koncentracích 100, 200 a 400 mg/kg. Pro tyto koncentrace jsou imunoenzymatické metody nedostačující naopak HPLC metody se stávají hlavní technikou, která je navíc schopna kvantifikovat i další biogenní aminy přítomné v rybách. K separaci podle Altieri a kol. byla použita kolona Zorbax C18 (4,6 mm × 150 mm, 5 μm) a gradientová eluce po derivatizaci histaminu dansychloridem. Mobilní fáze byla složena z 0,1 mmol/l octanu amonného (pH 7,9) a acetonitrilu. Histamin byl detegován při vlnové délce 254 nm. Metoda byla validovaná a vhodná pro testování úředního kontrolního vzorku podle požadavků EU (nařízení CE 882/04) a pro splnění kritéria bezpečnosti potravin (nařízení CE 2073/05). [62]

Relativně novou separační technikou v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie je ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra performance liquid chromatography UHPLC). Použití krátké chromatografické kolony (100 mm) a sorbentu o malém průměru částic (1,7 μm) poskytuje krátké doby separace při vysoké účinnosti. Separací proces probíhá za velmi vysokých tlaků kolem 1000 barů (alternativou je použití povrchově pórovitých náplní s malým průměrem nebo monolitických sorbentů). UHPLC je technika vhodná pro zpracování velkého množství

vzorků. Velké uplatnění našla ve farmaceutických oborech, v analýze mykotoxinů nebo antioxidantů v obilovinách a dalších potravinových matricích. Ve spojení s citlivými hmotnostními spektrometry je využívána k analýze stopového množství kontaminantů vyskytujících se v potravinách nebo životním prostředí. [63]

Pro identifikaci a kvantifikaci čtyř mykotoxinů (ochratoxin A, zearalenol, aflatoxin B1 a aflatoxin M1) ve vzorcích kapalného mléka a mléčných prášků byla vyvinuta metoda SPE-UPLC-MS/MS. Metoda je schopna eliminovat interferenci matrice a stanovit nízkou hladinu mykotoxinů. Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované toxigenními houbami, které způsobují vážná onemocnění až smrt lidí i zvířat. V africké Keni si kontaminovaná kukuřice v roce 2004 vyžádala 125 obětí. Provedená studie kontaminovaného krmiva s poměrně vysokou hladinou mykotoxinu prokázala, že se mykotoxiny společně s metabolity mohou přenášet do mléka. Proto identifikace a kvantifikace mykotoxinů v kapalném mléce a mléčném prášku je nezbytná k ochraně lidského zdraví. V Evropě podle nařízení komise (ES) č. 1881/2006 nesmí aflatoxin M1 překročit koncentraci 0,05 µg/kg. [64] Mykotoxiny z kontaminovaného krmiva se však nepřenáší pouze do mléka, ale i do jedlých tkání a orgánů hospodářských zvířat. Vzhledem k možné karcinogenní aktivitě ochratoxinu A (OTA) přijalo italské ministerstvo zdravotnictví preventivní opatření a zavedlo orientační hodnotu 1 µg/kg OTA pro vepřové maso a masné výrobky. Právě pro sledování orientační hodnoty a splnění požadavků úředních kontrol byla navržena zmíněná validovaná metoda UPLC-MS. [65]

K dalším aplikacím ultra vysoko-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem rozptylu světla po odpaření mobilní fáze (evaporative light scattering detektor UPLC-ELSD) patří stanovení polysacharidu inulinu izolovaného z topinamburu, který se přidává do potravin pro diabetiky jako náhražka cukru. [66] UHPLC je také vhodnou metodou pro kvantifikaci cholesterolu v potravinových matricích. I když lze cholesterol v potravinách stanovit různými analytickými metodami, jako je gravimetrie, kolorimetrie, fluorimetrie a chromatografie, je UHPLC z hlediska spotřeby rozpouštědel a časové náročnosti nejefektivnější. [67]

Mezi rychlé separační techniky se dnes řadí i superkritická fluidní chromatografie (SFC). Jedná se o metodu, kde stacionární fáze jsou analogické těm používaným v UHPLC. Mobilní fází je CO₂, který za superkritických podmínek má vlastnosti mezi kapalinou a plynem. Díky těmto unikátním vlastnostem umožňuje SFC velmi rychlou analýzu vzorků dnes řádově v několika minutách. SFC je vhodná především pro analýzu

nepolárních látek, tedy lipidů. Propojením tohoto typu chromatografické separace s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem představuje velice rychlý a účinný nástroj pro vyšetření vzorků, například k analýze lipidomu mléka a jeho využití pro detekci falšování a ověřování autenticity. [68]

Mléčný tuk je na trhu jeden z nejdražších, proto se jej výrobci snaží nadstavit nedeklarovaným přídavkem levnější suroviny za účelem zvýšení zisku. Mezi levnější přísady se řadí sója respektive sójové mléko. Použití nedeklarovaného přídavku sójového mléka znamená nejen klamání zákazníka, ale pro jistou část populace představuje závažné zdravotní riziko, neboť patří mezi alergenní přísady a jeho použití musí být uvedeno na etiketě výrobku. Kromě falšování kravského mléka může docházet k falšování sójového mléka mlékem kravským. Zde je zdravotní riziko skryto v přítomnosti laktózy v kravském mléce, zejména u lidí s laktosovou intolerancí. Tento přídavek je rovněž v rozporu s veganskou a vegetariánskou stravou, která vylučuje požití potravin živočišného původu. [68]

V dnešní době se mobilní fáze v SFC často modifikují organickým rozpouštědlem nebo aditivem, kterým se zvýší její eluční síla pro polární sloučeniny. Oxid uhličitý však obvykle zůstává hlavní složkou mobilní fáze. Mezi polární sloučeniny, které se separují modifikovanou mobilní fází, patří fosfolipidy. Metoda vyvinutá Lafossem a kol. separovala fosfatidylcholin, fosfatidovou kyselinu, fosfatidylinositol a fosfatidyl ethanolamin ze sójového lecitinu. Použitá mobilní fáze byla modifikována 21,6 % směsí methanol : voda : triethylamin (95 : 4,95 : 0,05). Čas separace byl 22 minut na silikagelové koloně za izokratických podmínek. Eckard a kol., testovali separaci fosfolipidů s různou povahou a polaritou na čtyřech různých kolonách (Valuepak Amino, Deltabond Cyano, Hypersil Silica a Luna Octyl). Nejrychlejší separace bylo dosaženo na koloně Luna oktyl za méně než 20 minut. V tomto případě byl použit gradient modifikátoru methanol : ethanol (50 : 50) obsahující 0,1 % kyseliny trifluoroctové. [69]

Superkritická fluidní chromatografie byla také aplikována v oblasti adulterantů potravin. Separace čtyř barviv (sudan I-IV) bylo dosaženo za 7 minut použitím kolony Princeton Benzamid (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) při průtoku 4 ml/min, tlaku 200 bar, teplotě 40 °C a gradientu methanolu (2% - 5%). Barviva byla detegována UV/VIS detektorem s fotodiodovým polem a hmotnostní spektrometrií. [70] Další zajímavou aplikací SFC je oddělení produktů degradace 4- hydroxybenzylglukozinolátu (sinalbin) katalyzovanou myrosinase. Sinalbin se vyskytuje jako hlavní glykosinolat v semenech *Sinapis alba* (hořčice setá). Separace produktů degradace sinalbinu byla provedena na

koloně HP Hypersil (200 mm x 4,6 mm, 5 um) při průtoku 2 ml/min, tlaku 20 MPa, teplotě 40°C a gradientu methanolu s 1% kyseliny trifluoroctové. Za těchto podmínek byl během 16 minut separován 4- hydroxybenzylisothiokyanát, kyselina sinapová, 3 - hydroxybenzylalkohol, 4- hydroxybenzylalkohol a 4- hydroxybenzylaskorbigen v hořčících a hořčičných práscích. [71]

2.4.2 Stanovení syntetických barviv v potravinách chromatografickými metodami

Barva potravin je velice důležitá vlastnost neboť vytváří jeden z prvních dojmů spotřebitele. Do potravin jsou barviva přidávána z důvodů výrobního procesu, který mění nebo ničí přirozenou barvu potravin během zpracování nebo skladování. Pro zachování či obnovení vzhledu potravinového výrobku se používají jak přírodní tak syntetická barviva. [72]

První syntetické barvivo vyrobil v roce 1856 z uhelného prachu William Henry Perkin, jednalo se o anilinové barvivo zvané purpur. [73] Dnes jsou barviva průmyslově vyráběna z velkého množství výchozích látek, založených na produktech zpracování ropy a dehtu. Povolené použití aditiv musí být pro spotřebitele bezpečné, proto je zapotřebí vypracovat celou řadu zdravotních zkoušek každé aditivní látky. Mezi ty nejdůležitější se řadí testy akutní toxicity, subchronické a chronické toxicity, kancerogenity, mutagenity, teratogenity, kumulace v organismu, bioenergetické účinky a některé další. [72]

Kromě požadavků na zdravotní nezávadnost nesmí syntetická barviva nepříznivě ovlivňovat organoleptické vlastnosti přibarvené potravin a to především vůni a chuť, musí být dobře rozpustné ve vodě, dostatečně chemicky inertní, musí být stále vůči světlu, vlhkosti, teplu a změnám pH. [72]

Syntetická barviva se podle chemické povahy řadí do několika skupin, jsou to azobarviva mono- i polyfunkční, di- a trifenylmethanová barviva, nitrobarviva, pyrazonová, antrachinonová, xanthenová, chinolinová a indigoidní barviva. Některá obsahují ve své chemické struktuře jednu nebo více sulfoskupin a jsou vyráběna ve formě sodných solí, aby se lépe rozpouštěla ve vodě. Seznam barviv, která smějí být používaná k výrobě potravin jednotlivě či v kombinaci až do nejvyššího povoleného množství jsou uvedena v následující tabulce. Pro své aromatické, chuťové nebo výživové vlastnosti se do potravinové výroby přidávají aromatické nebo chuťové látky a jejich složky, které zároveň mají sekundární barvicí účinek. Jsou to například mletá paprika, kurkuma, šafrán

a barviva, která obarvují nejedlé části potravin, ve smyslu povlaků sýrů, salámových střev a další. Takové to látky se za barviva nepovažují. [1]

Tabulka 2: Barviva povolená k barvení potravin [1]

Číslo označení	Název
E100	kurkumin
E102	tartrazin
E104	chinolinová žluť
E110	žluť SY
E120	košenila, kyselina karmínová, karmíny
E122	azorubin
E124	ponceau 4R
E129	červeň allura AC
E131	patentní modř V
E132	indigokarmín
E133	brilantní modř FCF
E142	zeleň S
E151	čern BN
E155	hněd HT
E160 b	lutein
E160 d	lykopen
E160 e	beta-apo-8'-karotenal
E160 f	ethylester kyseliny beta-apo-8'-karotenové

V poslední době neustále roste zájem o potravinářská syntetická barviva, jelikož u řady z nich byly vystopovány pravděpodobné kancerogenní účinky. Proto došlo ve většině států k zákazu používání některých lipofilních syntetických barviv pro potravinové účely. Na celém území USA a Velké Británie jsou zakázány ponceau 4R (E124), amarant (E 123) a erythrosin (E 127). V České republice je používání těchto

barviv řízeno zákonem č. 110/1997 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích, který zmíněná barviva povoluje používat i přes podezření na pravděpodobné kancerogenní účinky. [1]

Syntetická barviva označována jako sudanová barviva (sudan I-IV, sudanová červeň B, sudanová červeň 7B, sudanová červeň G, sudanová oranž G, sudanová černá a další) patří do skupiny azobarviv, které jsou především používány pro různé průmyslové a vědecké aplikace, vzhledem k jejich nízké ceně a široké dostupnosti jsou atraktivní i jako potravinová barviva. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovala sudanová barviva jako karcinogenní látky, proto jsou ve většině zemí včetně EU v potravinách zakázány. Nicméně se tato barviva objevila v potravinářských produktech dovážených evropskými a několika dalšími zeměmi. Nejčastěji se tato barviva přidávají do potravinových produktů, jako jsou chilli omáčky nebo chilli prášky. Výroční zpráva RASFF (systém rychlého varování pro potraviny a krmiva) z roku 2006 zmiňuje koření dovezené z Indie a Pákistánu kontaminované sudanem I, sudanem IV nebo kombinací obou. I tato přítomnost zakázaných barviv v potravinových výrobcích vedla k rostoucí poptávce po metodách vhodných pro ověřování přítomnosti a pro stanovení těchto barviv. EU stanovila limit sudanových barviv na 0,5-1 mg/ kg, všechny potraviny s vyšším obsahem než je stanovený limit musí být z trhu staženy. [70, 74]

Vliv syntetických barviv v potravinách na lidské zdraví je neustále testován, s čímž souvisí i rozvoj metod zabývajících se měřením hodnot koncentrací syntetických barviv v potravinářských výrobcích. [1]

K analýze jednotlivých barviv se v minulosti používala především papírová, tenkovrstvá a kolonová chromatografie. V současnosti se nejvíce využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza, iontově párová chromatografie, iontově výměnná chromatografie a micelární elektrokinetická chromatografie. Některé příklady jsou uvedeny níže. [1]

K separaci a kvantifikaci 10 potravinových syntetických barviv v jogurtu byla vyvinuta metoda HPLC-DAD. Na separaci byla použita kolona NUCLEODUR C18 (150 mm × 4,6 mm, 3 μm) a gradientovou elucí mobilní fázi 1% octanu amonného ve směsi metanol : acetonitril (80 : 20). Barviva byla v eluátu detegována spektrofotometricky s detekčním limitem v rozmezí 0,18 – 4,58 μg/ml. [75]

Pro rozdělení a stanovení čtyř běžně používaných sulfonových azobarviv (tartrazin, amarant, žluť SY, brilantní modř FCF) ve vzorcích nealkoholických nápojů na koloně

SUPELCOSIL LC-18 HPLC (15 cm × 4,6 mm, 5 μm) byla použita směs metanolu a vody s přídavkem octanu amonného pro lepší dělení barviv. Jeho přidáním se výrazně zvýšil retenční čas sloučenin obsahující kyselá skupiny, bez jeho přídavku byla eluce barviv příliš rychlá, téměř v mrtvém čase. Detekce byla provedena spektrofotometricky. [76]

Pro separaci a stanovení 20 barviv v konzervovaných sirupech a chilli prášcích byla vyvinuta metoda LC-MS/MS na koloně Acclaim Polar Advantage C16 (150 mm × 4,6 mm, 3 μm). K extrakci barviv z potravinové matrice byl zvolen acetonitril, který měl pro extrakci několik výhod jako je vysoká výtěžnost, vysrážení sacharidů a bílkovin a malá rozpustnost tuku. Příprava vzorku tak byla rychlá a jednoduchá, samotná separace však trvala 20 minut. Tandemová hmotnostní spektrometrie poskytující MRM přechody byla schopna detegovat všechny cílové sloučeniny v jediném nástřiku s hodnotou LOQ mezi 0,001 až 1 mg/kg. [77]

V práci Prado a kol. byla vyvinuta analýza syntetických barviv pomocí kapilární elektroforézy v alkoholických nápojích. Analýza byla provedena křemennou kapilárou délky 73 cm při 35 °C, se základním elektrolytem 10 mmol/l fosfátového pufru s 10 mmol/l dodecylsulfátu sodného o pH 11 a separačním napětí 25 kV. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu 11 syntetických barviv byly použity tři vlnové délky ve viditelné oblasti. Detekční limity se pohybovaly od 0,4 do 2,5 μg/ml. [78]

Kapilární zónová elektroforéza byla použita i v případě vzorků zmrzliny. K separaci byla použita separační kapilára 50 cm × 70 μm a detektor s fotodiodovým polem. Jako základní elektrolyt byla použita směs 25 mmol/l fosforečnanu sodného a 25 mmol/l boritanu sodného (1 : 1) o pH 8. [79]

Stanovení potravinářských aditiv micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií MECK s křemennou kapilárou o vnitřním průměru 50 μm a celkové délce 65 cm popisuje práce Thompsona a kol. K detekci byl použit UV detektor při 214 nm. Základní elektrolyt byl tvořen z 15 % acetonitrilem a z 85 % 0,05 mol/l deoxycholátem sodným (deoxycholát sodný byl rozpuštěný ve 100 ml směsi boritanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného v poměru 1 : 1). Separace probíhala při 25°C a 30 kV. Během 20 minut bylo separováno 9 syntetických barviv v cukrovinkách. [80]

Kapilární elektroforéza poskytuje velmi dobré výsledky i postačující citlivost stanovení. Malá spotřeba vzorku i základního elektrolytu je její hlavní výhodou. Na rozdíl od HPLC je nutné oddělit látky ze vzorku, aby nedocházelo k ucpání separační kapiláry. Metody kapilární elektroforézy dávají velmi dobré výsledky nejen v oblasti syntetických barviv v potravinách ale i dalších barviv obsahujících alespoň jednu karboxy-, hydroxy-

nebo sulfoskupinu. Taková to barviva existují v zásaditém nebo neutrálním prostředí ve formě aniontů, což umožňuje jejich rychlé a jednoduché stanovení. Tyto skupiny se naopak nevyskytují u přírodních barviv, což spolu s jejich velikostí komplikuje stanovení kapilární elektroforézou. [1]

Metoda HPLC, která na rozdíl od kapilární elektroforézy dovoluje separaci iontových i neiontových barviv, je dnes stále preferovanou volbou pro rutinní kontrolu syntetických barviv v potravinách. Dovoluje jednoduchou kvantifikaci i snadnou identifikaci barviv na základě jejich retenčního času a spektrální charakteristiky. V neposlední řadě často odpadá složitá úprava vzorků před vlastní separací a kromě toho je u mnoha vzorků citlivost stanovení o více než jeden řád lepší. [1]

K HPLC může být zajímavou alternativou superkritická fluidní chromatografie. Praktická část diplomové práce se zabývá separací řady syntetických barviv. Cílem bylo sledovat jejich chromatografické chování v systému superkritické fluidní chromatografie, zvolit vhodný postup hmotnostně spektrometrické detekce, provést částečnou validaci nové metody a demonstrovat její aplikovatelnost na reálném vzorku.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje

K měření vzorků syntetických barviv byl použit superkritický fluidní chromatografický systém ACQUITY UPC² (Waters, Manchester, UK), jehož součástí je čerpadlo, automatický dávkovač a kolonový termostat. Pomocná kapalina byla čerpána izokratickým čerpadlem. K přípravě vzorků syntetických potravinářských barviv byly použity váhy Mettler Toledo (Praha, Česká republika). Separace byly testovány na čtyřech chromatografických kolonách řady ACQUITY (Waters, Manchester, UK): CSH (Charged Surface Hybrid) Fluoro-Phenyl (3 × 100 mm; 1,7 μm), HSS (High Strength Silica) C18 SB (3 × 100 mm; 1,8 μm), BEH (Bridged Ethylene Hybrid) silikagel (3 × 100 mm; 1,7 μm) a BEH 2-Ethylpyridine (3 × 100 mm; 1,7 μm). Hmotnostní spektra byla získána po ionizaci elektrosprejem na trojitém kvadrupólu Xevo TQS (Waters, Manchester, UK). Ovládání přístroje a vyhodnocení výsledků bylo zajištěno softwarem MassLynx 4.1, SCN 851 (Waters, Manchester, UK).

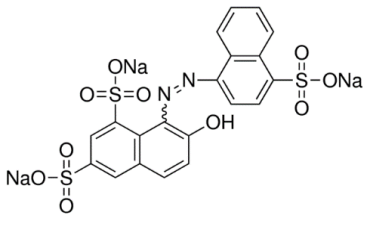
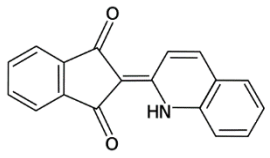
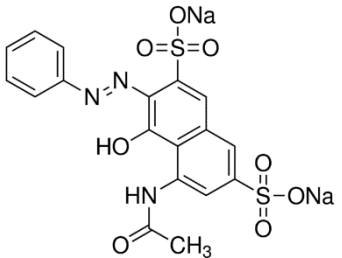
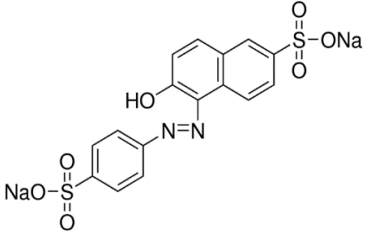
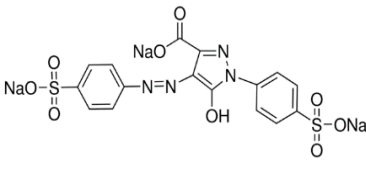
3.2 Chemikálie

Standardy analyzovaných syntetických potravinářských barviv (Tab. 3) (červeň allura AC, amarant, azorubin, brilantní modř blue FCF, brilantní čern BN, kyselina karmínová, erythrosin B, zeleň S, indigokarmín, patentní modř V, ponceau 4R, chinolinová žlut' SS, červeň 2G, žlut' SY a tartrazin) pocházely od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, Česká republika). Voda byla upravována na přístroji Direct-Q 3 UV (Millipore, Mollsheim, Francie). Oxid uhličitý (kat. 4.8, 99.998 %) byl zakoupen u společnosti SIAD Czech spol. s. r. o. (Praha, Česká republika). Dodavatelem trifluoroctové kyseliny (>99,0 %) a hydroxidu amonného (>28 %) byla společnost Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Mravenčan amonný (>99,0 %) byl zakoupen od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko) a methanol (gradient grade for HPLC) od firmy VWR International (Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika).

Tabulka 3: Syntetická potravinářská barviva [81]

Číslo	Označení	Název (Synonymum)	Systematický název	Struktura
1	E129	Červeň Allura AC (Food Red 17)	6-hydroxy-5-((2-methoxy-5-methyl-4-sulfofenyl)azo)-2-naftalenesulfonát disodný	
2	E123	Amarant (Food Red 9)	(4E)-3-oxo-4-[(4-sulfonato-1-naftyl)hydrazono]naftalen-2,7-disulfonát trisodný	
3	E 122	Azorubin (Food Red 3)	4-hydroxy-2-[(E)-(4-sulfonato-1-naftyl)diazenyl]naftalen-1-sulfonát disodný	
4	E 133	Brilantní modř FCF (Food Red 2)	2-[[4-[ethyl-[(3-sulfonatofenyl)methyl]amino]fenyl]-[4-ethyl-[(3-sulfonatofenyl)methyl]azaniumyliden]cyklohexa-2,5-dien-1-yliden]methyl]benzensulfonát disodný	
5	E 151	Brilantní čern BN (Food Black 1)	(6Z)-4-acetamido-5-oxo-6-[[7-sulfonato-4-(4-sulfonatofenyl)azo-1-naftyl]hydrazono]naftalen-1,7-disulfonát tetrasodný	

6	E 120	Kyselina karmínová (Natural Red 4)	7- α -D-glukopyranosyl-9,10-dihydro-3,5,6,8-tetrahydroxy-1-methyl-9,10-dioxoanthracen karboxylová kyselina	
7	E 127	Erythrosin B (Food Red 14)	2,4,5,7-tetraiodofluorescein disodný	
8	E 142	Zeleň S (Acid Green 50)	4-[(4-dimethylaminofenyl)-(4-dimethyl azaniumyliden-1-cyklohexa-2,5-dienylid)methyl]-3-hydroxynaftalen-2,7-disulfonát sodný	
9	E 132	Indigokarmín (Acid Blue 74)	(2E)-3-oxo-2-(3-oxo-5-sulfonato-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonát disodný	
10	E 131	Patentní modř V (Food Blue 5)	4-[[4-(diethylamino)fenyl]-(4-diethyl azaniumyliden cyklohexa-2,5-dien-1-ylid)methyl]-6-hydroxybenzen-1,3-disulfonát vápenatý	

11	E 124	Ponceau 4R (Food Red 7)	(8Z)-7-oxo-8-[(4-sulfonatonaftalen-1-yl)hydrazinylden]naphthalen-1,3-disulfonát trisodný	
12	E 104	Chinolinová žlut' SS (Food Yellow 13)	2-(2-chinolyl)indan-1,3-dionu	
13	E 128	Červeň 2G (Acid Red 1)	8-acetamido-1-hydroxy-2-fenylazonaftalen-3,6-disulfonát disodný	
14	E 110	Žlut' SY (Food Yellow 3)	6-hydroxy-5-[(4-sulfonatofenyl)azo]-2-naftalensulfonát disodný	
15	E 102	Tartrazin (Food Yellow 4)	(4E)-5-oxo-1-(4-sulfonatofenyl)-4-[(4-sulfonatofenyl)hydrazono]-3-pyrazolkarboxylát trisodný	

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Příprava pracovních roztoků

Zásobní roztoky standardů syntetických barviv o koncentraci 0,1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním 1,0 mg standardu v 10 ml směsi methanolu a vody v poměru 1 : 1

(v/v). Chinolinová žluť SS byla ve směsi methanolu a vody v poměru 1 : 1 (v/v) nerozpustná, proto byla připravena rozpuštěním v čistém methanolu.

Pro přímé zavádění roztoků do hmotnostního spektrometru byly zásobní roztoky standardů naředěny methanolem k přípravě pracovních roztoků o koncentraci 1 µg/ml. Pracovní roztoky byly zfiltrány přes 13 mm PTFE mikrofiltr s velikostí pórů 0,22 µm (Labicom, Olomouc, Česká republika).

Pracovní směsný standard byl připraven naředěním zásobních roztoků syntetických barviv methanolem na výslednou koncentraci 1 µg/ml pro všechny látky a zfiltrován přes PTFE mikrofiltr s velikostí pórů 0,22 µm.

Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním směsi standardů syntetických potravinářských barviv na výsledné koncentrace: 2,00; 1,5; 1,25; 1,00; 0,50; 0,25; 0,10; 0,01 µg/ml.

3.3.2 Příprava modifikátoru mobilní fáze

Mobilní fáze CO₂ byla upravena přidávkem modifikátoru s aditivem. Jako modifikátor byla zvolena směs methanolu a vody v poměru 95 : 5 a aditivum tvořil hydroxid amonný v koncentracích 1, 5 a 10 mmol/l, nebo 5 mmol/l trifluoroctová kyselina, nebo 5 mmol/l mravenčan amonný.

3.3.3 Příprava vzorků

Pro analýzu byly použity vzorky iontového nápoje Gatorade Cool Blue a žvýkácí bonbóny Skittles s příchutí tropického ovoce, které byly zakoupeny v běžném obchodě. K analýze iontového nápoje bylo odebráno 50 ml vzorku, který byl 10 minut ponechán v ultrazvukové lázni pro odplynění. Poté byly 2 ml odplyněného iontového nápoje přefiltrovány přes 13 mm nylonový mikrofiltr s velikostí pórů 0,22 µm (Labicom, Olomouc, Česká republika). Nylonový mikrofiltr zde sloužil k zachycení veškerého modrého barviva, což potvrzovala čírost filtrátu. Veškeré modré barvivo bylo z mikrofiltru eluováno 2 ml 10 mmol/l NH₄OH v methanolu.

Příprava vzorků žvýkácích bonbónů byla rovněž jednoduchá. Analyzován byl modrý a fialový žvýkácí bonbón. Každý bonbón byl ponechán ve 2 ml 10 mmol/l NH₄OH v methanolu po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni. Tato doba byla dostačující k tomu, aby se ze žvýkácích bonbónů smyla veškerá barva do roztoku. Po 30 minutách byl

odebrán vřechen barevný roztok a pŕefiltrován pŕes nylonový mikrofiltr. Tentokrát veřkeré modré a fialové barvivo pŕeřlo pŕes filtr bez zachycení, což potvrzoval čistý filtr.

Upravený vzorek iontového nápoje Gatorade Cool Blue byl bez ředění nastříknut do SFC, vzorky řvýchacích bonbónů Skittles byly pŕed nástřikem 10 krát řředěny roztokem 10 mmol/l NH₄OH v methanolu, jelikoř koncentrace barviva v roztoku byla pŕiřiř vysoká.

3.3.4 Nastavení hmotnostního spektrometru Xevo TQS

Parametry hmotnostního spektrometru Xevo TQS byly nastaveny během manuálního ladění. Pracovalo se v záporném módu. Napětí na sprejovací kapiláŕe pro iontový zdroj ESI bylo nastaveno na -2,20 kV, napětí na kónusu bylo 20 V, teplota zdroje byla 150 °C a teplota suřícího plynu byla 500 °C. Průtok suřícího plynu byl nastaven na 600 l/h a průtok plynu v kónusu na 150 l/h. Pro SFC-MS měření byla pouřžita pomocná kapalina (methanol) o průtoku 0,1 ml/min. Pomocí pŕímé infúze byly nalezeny prekurzorové iony. Pro nalezení těchto iontů byl průtok nastaven na 15 µl/min. Tyto ionty byly následně fragmentovány. Vhodné kolizní energie byly zvoleny pro čtyři až řest vybraných fragmentovaných iontů. Vřechny tyto ionty byly otestovány během chromatografické analýzy a dva nejintenzivnější SRM (Selected Reaction Monitoring) pŕechody byly zahrnuty do finální metody (Tab. 4).

3.3.5 Nastavení chromatografu

Vřdy pŕi změně kolony nebo změně mobilní fáze bylo provedeno promytí chromatografického systému mobilní fází s vysokým obsahem modifikátoru (50-100 %) pŕi průtoku 0,5 ml/min po dobu alespoň 10 minut. Následně byl systém ekvilibrován pŕi počátečních podmínkách chromatografické metody tak, aby se pŕi požadovaného složení mobilní fáze ustálil pracovní tlak. Pŕed každým měřením standardů ři vzorků byl proveden nástřik slepého vzorku (methanol). Pro testování modifikátoru, aditiv a stacionárních fází bylo pouřžito následující nastavení. Objem nastřikovaného vzorku na kolonu byl 4 µl, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a zpětný tlak byl udržován na 1500 psi. Separace probíhaly pŕi teplotě 40 °C, pŕi různých gradientech složení mobilní fáze. Ve finální metodě byla pouřžita kolona BEH 2-Ethylpyridine, průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min a gradient začínající na 5 % modifikátoru: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 14,5 min – 5 %, 16 min – 5 %.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem této práce bylo vypracovat vhodnou metodu pro separaci a stanovení syntetických potravinářských barviv pomocí superkritické fluidní chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Navržená SFC metoda je vhodná pro velmi polární iontové látky, přičemž nevyžaduje ion-párovací činidlo, které by mohlo komplikovat detekci hmotnostní spektrometrií. Je plně kompatibilní s MS detekcí, velice citlivá, stabilní a rychlá. Z barviv povolená k barvení potravin (tab. 2) bylo vybráno 16 potravinářských barviv. Beta-apo-8'-karotenal byl z počátku zahrnut do analýzy ale po té, co se neionizoval elektrosprejem v záporném módu, byl z dalších postupů vyřazen. Barviva jako je kurkumin, lutein, lykopen nebo kyselina karmínová se získávají z přírodních zdrojů, proto nebyly zařazeny do analýz s výjimkou kyseliny karmínové, jejíž standard byl k dispozici

Samotné měření směsi 15 standardů syntetických barviv bylo provedeno po pečlivém ladění experimentálních podmínek (nastavení iontového zdroje a kolizní energie, nastavení chromatografických podmínek, složení mobilní fáze a gradientu atd.). Kvalita separace byla podmíněna použitou stacionární fází, aditivem do mobilní fáze, jejím průtokem a teplotou kolony. Ze čtyř kolon (BEH silikagel, BEH 2-Ethylpyridine (2-EP), CSH Fluoro-Phenyl (FPh) a HSS C18 SB (C18)) byla pro měření reálných vzorků vybrána kolona 2-EP. Každá stacionární fáze byla otestována se všemi modifikátory. Vždy se jednalo o roztok methanolu s vodou v poměru 95 : 5 (v/v) a přídatkem polárnějšího aditiva (NH₄OH, trifluoroctová kyselina a mravenčan amonný). Průtok mobilní fáze byl vždy zvolen tak, aby nebyl nepřekročen tlak 6000 psi. Na separaci navazovala vhodná detekce.

4.1 Hmotnostně-spektrometrická detekce

Hmotnostní analyzátor byl nejprve použit pro nalezení prekurzorových iontů a zhodnocení jejich fragmentace pro jednotlivá syntetická barviva. Pomocí přímého zavádění roztoků do hmotnostního spektrometru byly proměřeny vzorky standardů o koncentraci 1 µg/ml v methanolu za ionizace elektrosprejem v záporném módu. U indigokarmínu byla použita koncentrace 2 µg/ml, protože v případě nižší koncentrace nebyl nalezen prekurzorový ion. Jelikož většina standardů syntetických barviv obsahuje několik sulfokupin (látky byly dostupné ve formě sodných solí), byla u většiny látek pozorována tvorba vícenásobně nabitých iontů. Fragmentační spektra pro jednotlivé standardy syntetických barviv jsou uvedena v příloze č. I. Nejintenzivnější SRM (Selected Reaction Monitoring- sledování vybrané reakce) přechody (Tab. 4) byly použity při chromatografické analýze směsi standardů, vzorků iontového nápoje a žvýkacích bonbónů.

Tabulka 4: Podmínky na stavení hmotnostního spektrometru pro jednotlivé standardy syntetických barviv

Číslo	Název	Sumární vzorec	Relativní molekulová hmotnost	Prekurzor	Produktové ionty	Napětí na kónusu (V)	Kolizní energie (eV)
1	Červeň Allura AC	$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$	496,4	224,6	185,7 213,8	20	16 20
2	Amarant	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604,5	267,7	157,5 205,7	20	14 12
3	Azorubin	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	502,4	227,7	169,9 220,9	20	18 15
4	Brilantní modř FCF	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	792,9	373,0	169,9 333,1	20	20 18
5	Brilantní čern BN	$C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$	867,7	387,9	226,6 290,9	20	20 20
6	Kyselina karmínová	$C_{22}H_{20}O_{13}$	492,4	491,0	357,0 446,9	20	23 20
7	Erythrosin B	$C_{20}H_6I_4Na_2O_5$	879,86	834,1	536,4 662,2	20	30 30
8	Zeleň S	$C_{27}H_{25}N_2NaO_7S_2$	576,6	552,6	495,6 510,7	20	28 36
9	Indigo karmín	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$	466,36	225,8	169,7 197,8	20	25 18

10	Patentní modř V	$C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Ca_{1/2}$	579,71	558,7	434,7 478,9	20	45 30
11	Ponceau 4R	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604,46	267,5	205,9 301,7	20	20 20
12	Chinolinová žluť SS	$C_{18}H_{11}NO_2$	273,29	271,8	215,9 243,9	20	32 30
13	Červeň 2G	$C_{18}H_{13}N_3Na_2O_8S_2$	509,4	231,4	157,9 171,4	20	18 15
14	Žluť SY	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	452,4	202,7	170,8 206,8	20	12 12
15	Tartrazin	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	534,3	233,8	197,8 210,9	20	15 7

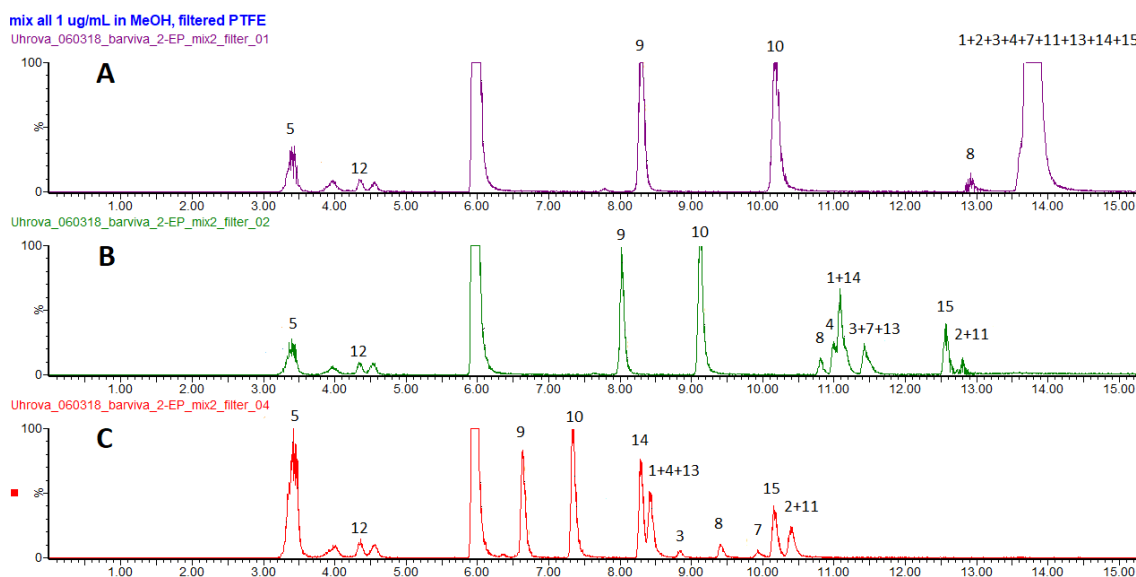
Fragmentové ionty většiny standardů syntetických barviv se shodují s nalezenými SRM přechody v literatuře. [82-84] Fragmentační spektra vychází z měření na přístroji s nižší rozlišovací schopností. Návrhy fragmentačních cest by mohly být detailněji studovány například pomocí experimentů na hmotnostním spektrometru s vyšší rozlišovací schopností dávající přesné hodnoty m/z. V této práci však bylo cílem nalézt vhodné fragmentační cesty použitelné při stanovení a potvrzení identity studovaných analytů, nikoli detailně studovat fragmentaci.

4.2 Vliv aditiva a stacionární fáze na chromatografickou separaci

Typ použitého aditiva měl výrazný vliv na počet eluovaných látek z chromatografické kolony, na tvar a šířku píků. Mezi studována aditiva patřil hydroxid amonný, mravenčan amonný a trifluoroctová kyselina. V prvotních experimentech byla studována koncentrace aditiva 5 mmol/l na všech testovaných kolonách (BEH, 2-EP, C18 a FPh). V případě trifluoroctové kyseliny a mravenčanu amonného docházelo na kolonách BEH a 2-EP při zvoleném gradientu (0 min – 10 %, 5 min – 100 % modifikátoru) k zadržení dvou látek brilantní modři FCF a tartrazinu. Na stacionárních fázích FPh a C18 se za stejných podmínek zadržely všechny látky. Ani zvýšení koncentrace na 10 mmol/l trifluoroctové kyseliny resp. mravenčanu amonného nepomohlo k eluci látek z kolon.

Nejefektivnějším aditivem byl hydroxid amonný, který umožnil eluci téměř všech látek z testovaných stacionárních fází (s výjimkou kyseliny karmínové). Následně byl pro toto aditivum studován vliv koncentrace na separaci látek. Jelikož kolona 2-EP poskytovala nejlepší separaci v přítomnosti 5 mmol/l hydroxidu amonného, byla na téže

koloně sledována i separace pro koncentrace tohoto aditiva 1 mmol/l a 10 mmol/l. Vyšší koncentrace aditiva urychlila analýzu látek a zároveň zvýšila počet úspěšně separovaných látek (Obr. 1).



Obrázek 1: Vliv koncentrace NH_4OH v modifikátoru na separaci látek: **A)** 1 mmol/l NH_4OH , **B)** 5 mmol/l NH_4OH a **C)** 10 mmol/l NH_4OH (kolona: 2-EP; teplota kolony: 40 °C; gradient mobilní fáze: 0 min – 5 % modifikátoru, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

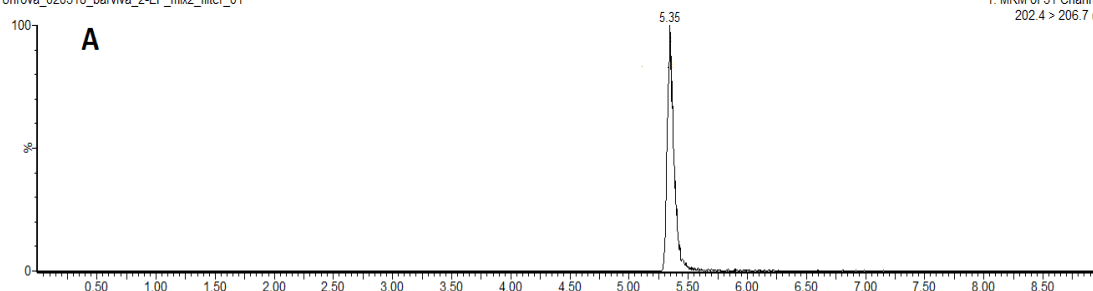
Společně s aditivy byla hodnocena i vhodná stacionární fáze pro separaci syntetických barviv. Důležitým předpokladem pro výběr stacionární fáze bylo vymytí všech sledovaných syntetických barviv z kolony. Za izokratické eluce 100% modifikátorem tvořeným směsí methanolu a vody v poměru 95 : 5 (v/v) s 5 mmol/l NH_4OH splňovaly tuto podmínku všechny použité kolony. V případě gradientové eluce (0 min – 10 %, 5 min – 100 %, 7 min – 100 % modifikátoru) byl počet vymytých standardů různý. Standard kyseliny karmínové nebyl eluován během analýzy z žádné kolony. Kolony FPh a C18 silně zadržovaly kromě standardu kyseliny karmínové i amarant, ponceau 4R a chinolinovou žluť SS (Tab. 5).

Výběr mezi kolonami 2-EP a BEH závisel na ploše píků jednotlivých standardů barviv. Plocha píků pro žluť SY a azorubin byla větší na koloně 2-EP (Obr. 2A a 2C) než na koloně BEH (Obr. 2B a 2D), obdobný rozdíl byl pozorován i u barviv zeleň S a indigokarmín. Z hlediska separace a odezvy látek byla pro analýzu reálných vzorků iontového nápoje a žvýkacích bonbónů vybrána stacionární fáze 2-EP.

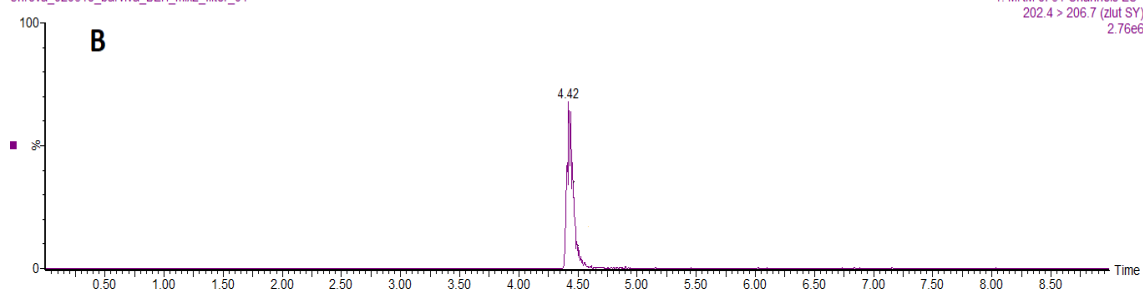
Tabulka 5: Srovnání kolon z hlediska eluce standardů (teplota kolony: 40 °C; gradient modifikátoru 5 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 10 %, 5 min – 100 %, 7 min – 100 %, 9 min – 10 %; průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

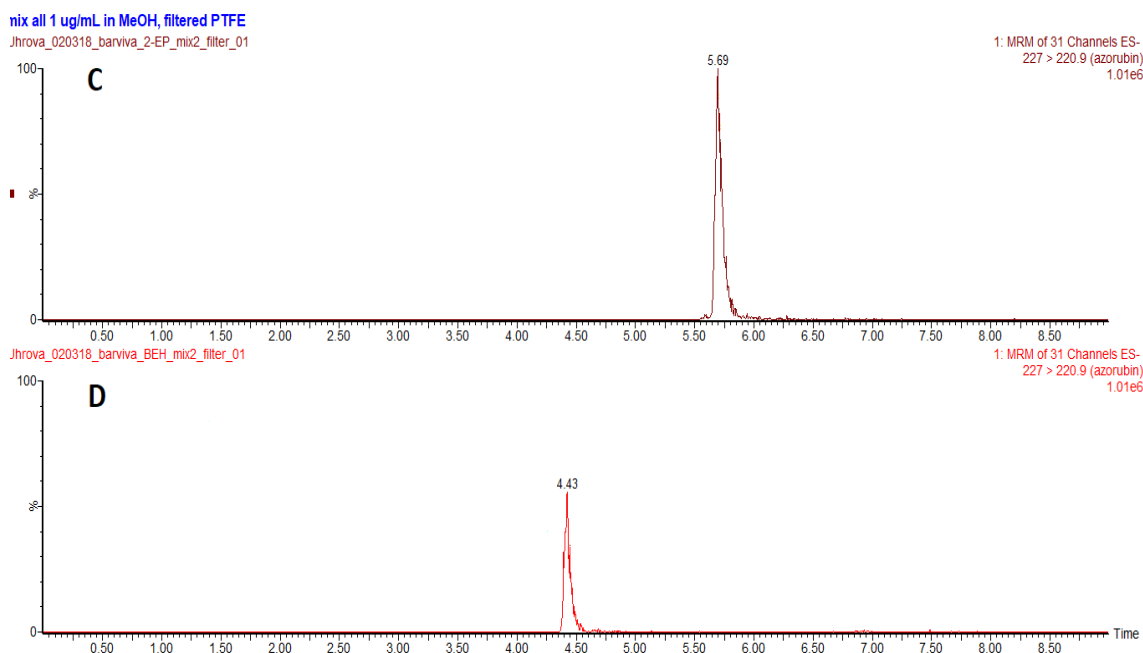
Barvivo	Stacionární fáze a retenční časy (min)			
	2-EP	BEH	FPh	C18
Červeň Allura AC	5,42	4,45	3,81	3,81
Amarant	6,45	4,64	Ne	4,05
Azorubin	5,69	4,43	3,81	3,85
Brilantní modř FCF	5,30	4,78	3,11	4,13
Brilantní čern BN	3,02	3,02	2,83	3,33
Kyselina karmínová	Ne	Ne	Ne	Ne
Erythrosin B	6,14	4,34	4,39	3,96
Zeleň S	5,76	4,98	3,95	4,33
Indigokarmín	4,35	4,17	3,42	3,50
Patentní modř V	4,70	4,58	3,81	4,23
Ponceau 4R	6,49	4,66	Ne	4,02
Chinolinová žluť SS	3,48	3,23	3,52	Ne
Červeň 2G	5,56	4,45	3,76	3,81
Žluť SY	5,35	4,43	3,75	3,79
Tartrazin	6,31	4,69	3,86	4,00

mix all 1 ug/mL in MeOH, filtered P I H
 Uhrova_020318_barviva_2-EP_mix2_filter_01



Uhrova_020318_barviva_BEH_mix2_filter_01





Obrázek 2: Vliv stacionární fáze na plochu píků: **A)** separace standardu žluť SY na koloně 2-EP, **B)** separace standardu žluť SY na koloně BEH, **C)** separace standardu azorubin na koloně 2-EP a **D)** separace standardu azorubin na koloně BEH (teplota kolony: 40 °C; gradient modifikátoru 5 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 10 %, 7 min – 100 %, 10 min – 100 %, 12 min – 10 %; průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

4.3 Gradient složení mobilní fáze

Vzhledem k vysoké polaritě a elektrickému náboji testovaných látek, které vedou k příliš silným interakcím se stacionární fází a vysoké retenci, byl použit strmý gradient modifikátoru až po 100 %. Samozřejmě za těchto podmínek nelze hovořit o superkritickém stavu mobilní fáze, ale jde o stav subkritický. Vlastnosti mobilní fáze se však mění kontinuálně, proto přechod mezi těmito stavy je plynulý a opakovatelný.

Prvotní gradient byl testován na všech vybraných kolonách. Obsah modifikátoru začínal na 10 %, během tří minut při průtoku 0,5 ml/min vystoupal na 100 %, na této hodnotě setrval dalších 10 sekund, během dvou minut se pak vrátil zpět na výchozí stav. Celkový čas analýzy byl 5 minut (Tab. 6). Na kolonách C18 a FPh byly všechny látky s výjimkou kyseliny karmínové vymyty během 3,5 minuty, na koloně BEH byly látky vymyty do 4 minut a na koloně 2-EP byly látky vymyty během 4,5 minuty. Ani jedna z kolon neseparovala všechny látky.

V dalším kroku byla navržena úprava gradientu tak, aby bylo dosaženo nižší retence látek a tím i rychlejší analýzy. Experimenty byly realizovány jen na koloně C18 (nejnižší

retence), kdy byla počáteční koncentrace modifikátoru postupně zvyšována na 20 %, 30 % a 40 % se zachovaným časovým rámcem. Retence látek byla snížena o více než minutu a půl. Zároveň však došlo ke snížení účinnosti separace, kdy byly pozorovány široké píky. Z tohoto důvodu byla počáteční koncentrace modifikátoru naopak snížena na 5 %.

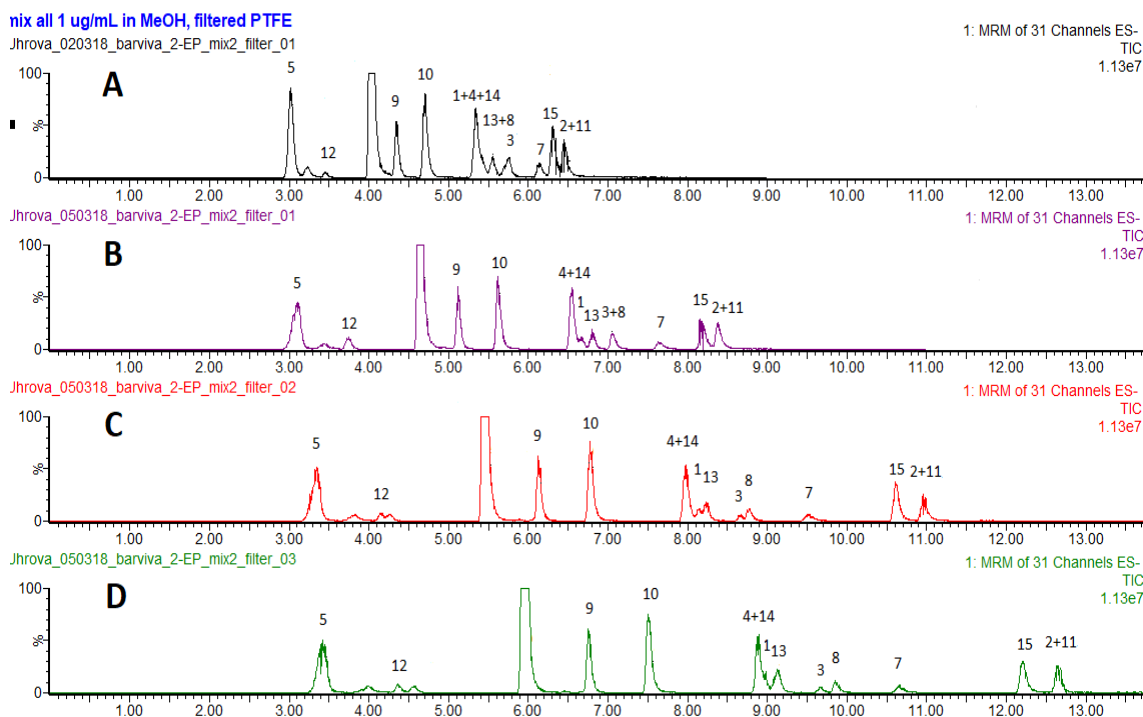
Použití tohoto gradientu vedlo k vymytí většiny látek ve stejném retenčním čase, proto byla nutná další úprava. K tomu, aby byly všechny látky separovány tj. eluovány v různých časech, bylo nutné prodloužit čas gradientu. Čas byl postupně zvyšován z 3 minut na 5, 7, 10 a 12 minut (Obr. 3). Experimenty při všech časových změnách byly prováděny jen na koloně 2-EP, která umožnila v původním čase separovat nejvíce látek. Ze všech navržených časových změn poskytla kolona 2-EP nejvíce separovaných látek (11 látek) v případě nejdelšího gradientu. Všechny látky byly z kolony vymyty během 13 minut s výjimkou kyseliny karmínové, která byla na koloně zadržena při všech časových změnách gradientu (Tab. 6). Celkový čas analýzy byl 16 minut.

U látek amarant a ponceau 4R, které jsou izomerní, bylo dosaženo pouze částečné separace. K jejich odlišení je možné využít fragmentační spektra, kdy poskytují stejné fragmenty ale o rozdílných relativních intenzitách. V případě přítomnosti obou látek ve vzorku však může docházet k vzájemnému ovlivňování výsledku při jejich stanovení.

Tabulka 6: Průběh prvotního a výsledného gradientu mobilní fáze

Čas (min)	Průtok (ml/min)	CO ₂ (%)	Modifikátor (%)
0	0,5	90	10
3	0,5	0	100
3,1	0,5	0	100
5	0,5	90	10

Čas (min)	Průtok (ml/min)	CO ₂ (%)	Modifikátor (%)
0	0,5	95	5
12	0,5	0	100
14	0,5	0	100
14,5	0,5	95	5
16	0,5	95	5



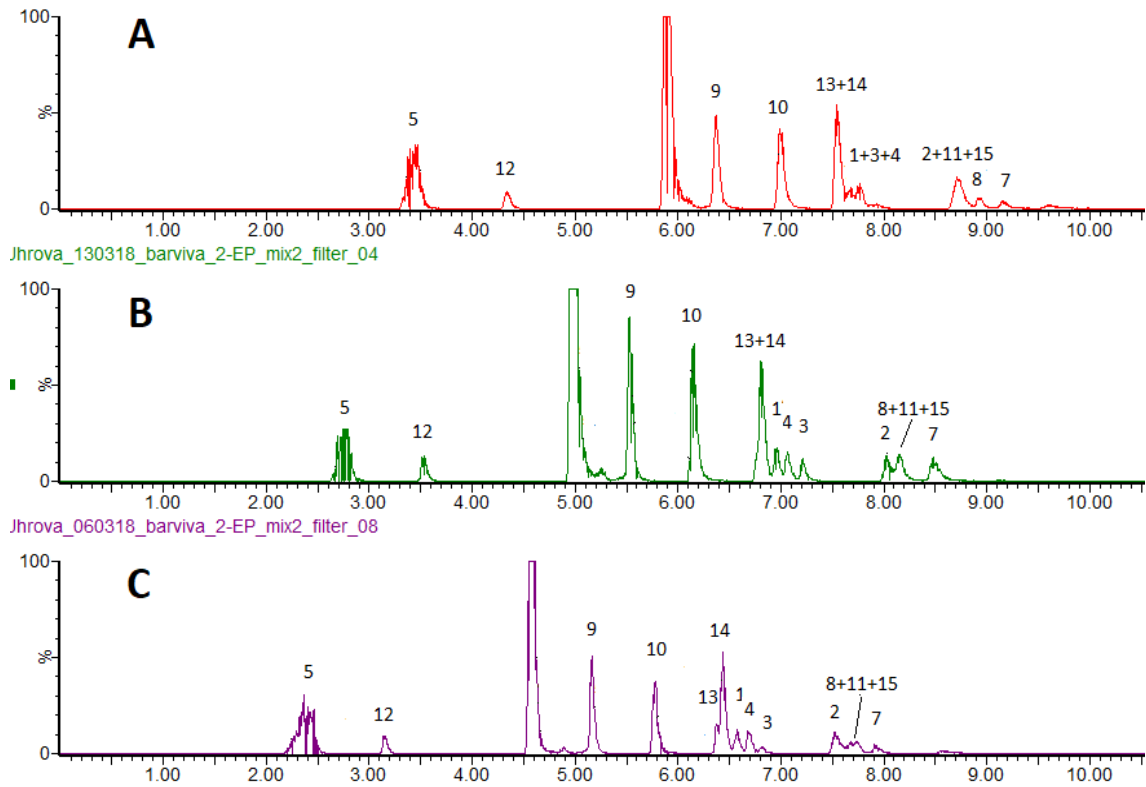
Obrázek 3: Vliv gradientu na separaci látek, zvýšení obsahu modifikátoru z 5 % na 100 % za: **A)** 5 minut, **B)** 7 minut, **C)** 10 minut a **D)** 12 minut; (kolona: 2-EP; teplota kolony: 40 °C; průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

4.4 Průtok mobilní fáze a teplota kolony

V dalším kroku byla navržena úprava průtoku mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo rychlejší analýzy. Z původního průtoku 0,5 ml/min byl průtok zvýšen na 0,8 ml/min (Obr. 4C). Došlo sice ke zkrácení retenčních časů téměř o minutu, ale tlak v systému vzrostl na kritickou hodnotu 5910 psi, proto byl pro další analýzy průtok snížen na 0,7 ml/min (Obr. 4B), pro který tlak nepřekročil 5310 psi.

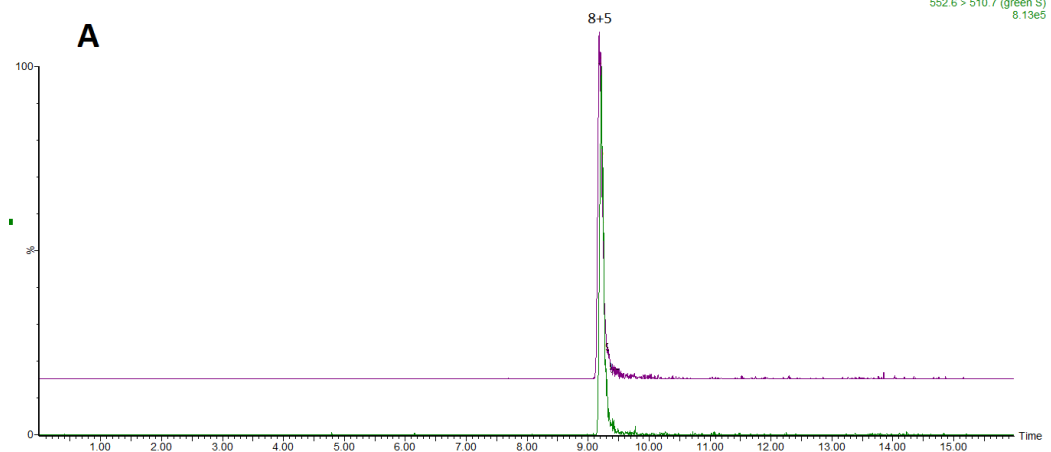
Posledním sledovaným parametrem byla teplota kolony, která však neměla výrazný vliv na průběh separace. Separace syntetických barviv byla studována při teplotách 30 °C, 40 °C a 50 °C na koloně 2-EP. Mezi teplotami kolony 40 °C a 50 °C nebyl žádný výraznější rozdíl. Pouze u nejnižší teploty 30 °C byla pozorována horší separace tartrazinu a zeleně S, jak dokládá srovnání jejich separace při teplotách kolony 30 °C a 40 °C (Obr. 5). Rozdíl v separaci při různých teplotách byl pozorován i u párů amarant a zeleň S nebo ponceau 4R a tartrazin (Příloha II.).

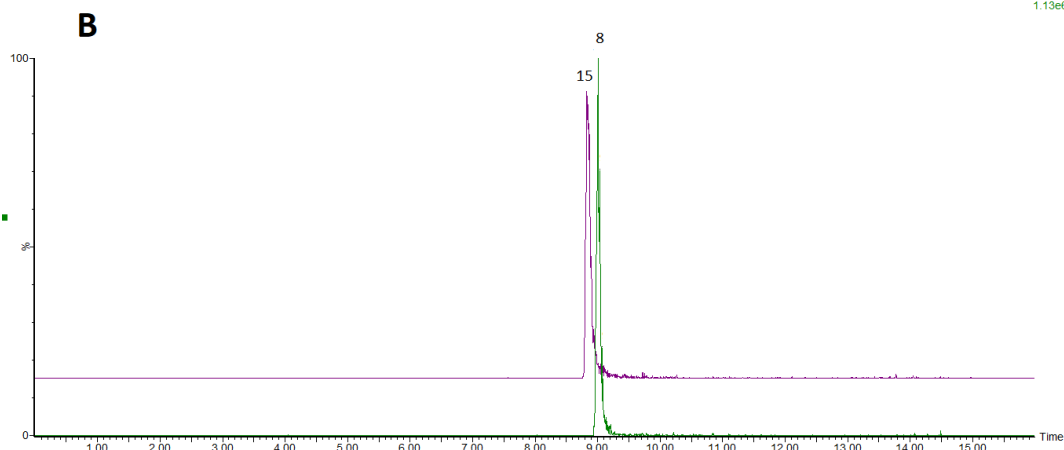
nix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Jhrova_060318_barviva_2-EP_mix2_filter_07



Obrázek 4: Vliv průtoku mobilní fáze na rychlost separace: **A)** 0,5 ml/min, **B)** 0,7 ml/min, **C)** 0,8 ml/min; (kolona: 2-EP; teplota kolony: 40 °C; gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; detekce: hmotnostní spektrometr)

nix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Jhrova_060318_barviva_2-EP_mix2_filter_06





Obrázek 5: Separace tartrazinu a zeleň S při teplotě kolony: **A)** 30 °C, **B)** 40 °C (kolona: 2-EP; gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

4.5 Částečná validace metody a zpracování výsledků

Vyvinutá metoda byla částečně validována v parametrech opakovatelnosti, přesnosti, linearity, meze detekce a stanovitelnosti.

4.5.1 Opakovatelnost retenčních časů a preciznost ploch píků

Na kolonu byl šestkrát po sobě nadávkován stejný objem (4 μ l) směsi standardů o koncentraci 1 μ g/ml. Z naměřených retenčních časů jednotlivých standardů byly vypočítány relativní směrodatné odchylky (RSD), které se jako ukazatel opakovatelnosti pohybovaly v rozmezí od 0,05 % do 0,60 %. Preciznost byla hodnocena pomocí relativní směrodatné odchylky ploch píků šesti po sobě jdoucích měření téhož vzorku a pohybovala se v rozmezí od 1,57 % do 8,95 %. Pro kvantitativní stanovení látek pomocí LC-ESI-MS je často za nejvyšší přípustnou hodnotu RSD ploch považována hranice 15 % (Tab. 7). [85] Příloha IV. zahrnuje tabulky s naměřenými retenčními časy a plochami píků pro jednotlivá barviva.

Tabulka 7: Relativní směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků jednotlivých standardů syntetických barviv (vypočteno ze šesti měření)

Barvivo	Průměrný retenční čas (min)	RSD % (retenční čas)	Průměrná plocha	RSD % (plocha)
Červeň Allura AC	6,91	0,14	175005,6	4,2
Amarant	8,03	0,12	38295,27	2,8
Azorubin	7,15	0,17	127687,1	1,8
Brilantní černě BN	8,96	0,33	42818,50	2,7
Brilantní modř FCF	7,04	0,13	145894,1	6,4
Erythrosin B	8,38	0,15	287730,8	1,9
Zeleň S	8,14	0,05	64985,65	3,6
Indigokarmín	5,50	0,14	677801,7	3,2
Patentní modř V	6,14	0,13	717169,6	1,6
Ponceau 4R	7,94	0,60	250027,1	2,8
Chinolinová žlutě SS	3,53	0,16	94419,10	9,0
Červeň 2G	6,73	0,11	143405,9	3,3
Žlutě SY	6,77	0,12	433070,4	5,2
Tartrazin	8,05	0,11	218013,1	3,3

4.5.2 Linearita

Linearita byla vyhodnocena z kalibračních přímek všech standardů syntetických barviv s výjimkou kyseliny karmínové na základě analýzy na osmi koncentračních úrovních (10 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 1250 ng/ml, 1500 ng/ml a 2000 ng/ml). Brilantní černě BN byla hodnocena v koncentračním rozsahu 250-2000 ng/ml a amarant 100-2000 ng/ml, neboť na nižších koncentračních úrovních nedosahovaly trojnásobek poměru signál/šum. K dosažení výsledné koncentrace byly zásobní roztoky standardů ředěny methanolem. Každá z koncentrací byla měřena dvakrát. Výsledné plochy píků jednotlivých standardů byly zjištěny pomocí programu TargetLynx a následně použity k sestavení grafu kalibrační závislosti. Pro integraci píků byla nastavena prahová plocha píku na 1000 a pro kalibraci bylo využito funkce vážené lineární regrese ($1/x^2$). V příloze V. jsou uvedeny výsledné grafy reziduí a grafy kalibračních závislostí společně s rovnicemi přímek a korelačními koeficienty. Z kalibračních křivek je patrné, že u většiny standardů syntetických barviv je koeficient determinace R^2 větší než 0,990, což znamená linearitu v celém testovaném rozsahu koncentrací. Pouze chinolinová žlutě SS má R^2 menší než 0,990, vykazuje linearitu

v rozsahu koncentrací 250-2000 ng/ml. Linearitu potvrzují i přiložené grafy reziduí, jejichž hodnoty jsou pod 15 % opět s výjimkou chinolinové žluti SS, pro kterou byla zjištěna hodnota nad 20 %.

4.5.3 Mez detekce a stanovitelnosti

U jednotlivých standardů syntetických barviv byla za pomoci programu OriginPro vypočítána mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) s využitím kalibrační přímky (Tab. 8).

K výpočtu byl použit vzorec: $mez = (k \times \sigma_B) / A$, kde σ_B je směrodatná odchylka úseku (stanovena na základě kalibrace), A je směrnice kalibrační závislosti a k je konstanta (3,3 pro LOD, 10 pro LOQ).

Tabulka 8: Meze detekce a stanovitelnosti

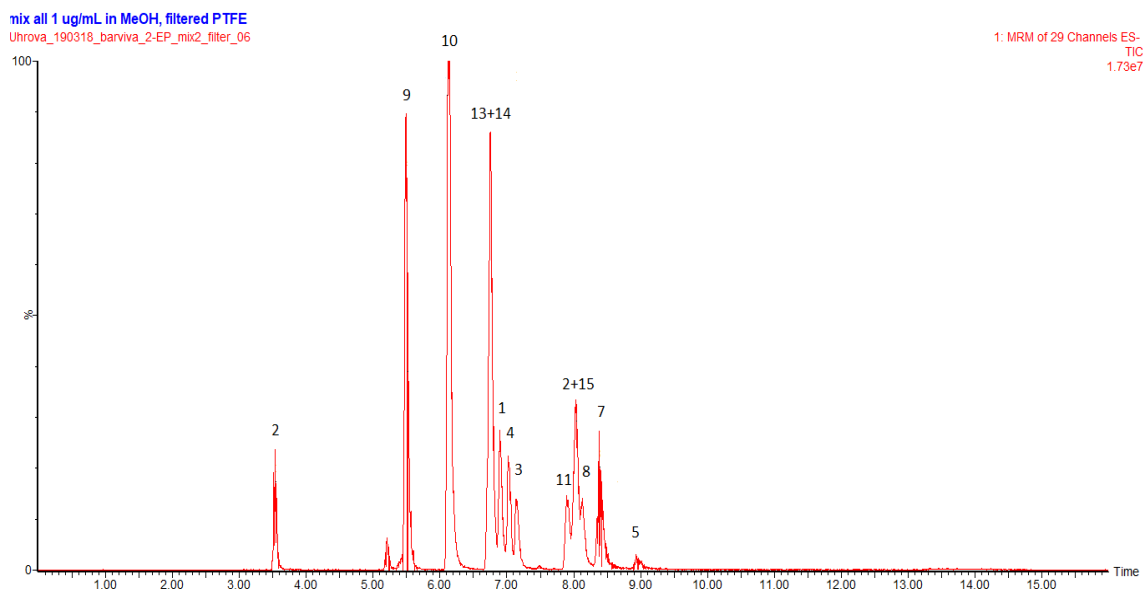
Barvivo	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Červeň Allura AC	1,73	5,24
Amarant	1,18	35,6
Azorubin	1,39	4,23
Brilantní čern BN	84,3	255
Brilantní modř FCF	1,83	5,54
Erythrosin B	1,64	4,96
Zeleň S	1,64	4,97
Indigokarmín	1,34	4,05
Patentní modř V	1,27	3,85
Ponceau 4R	1,17	3,55
Chinolinová žlut' SS	3,48	10,5
Čereveň 2G	1,08	3,28
Žlut' SY	2,43	7,36
Tartrazin	1,42	4,29

Mez detekce se u jednotlivých syntetických barviv pohybovala v rozmezí od 1,08 ng/ml do 84,3 ng/ml a mez stanovitelnosti od 3,28 ng/ml do 255 ng/ml.

4.6 Analýza iontového nápoje a žvýkacích bonbónů

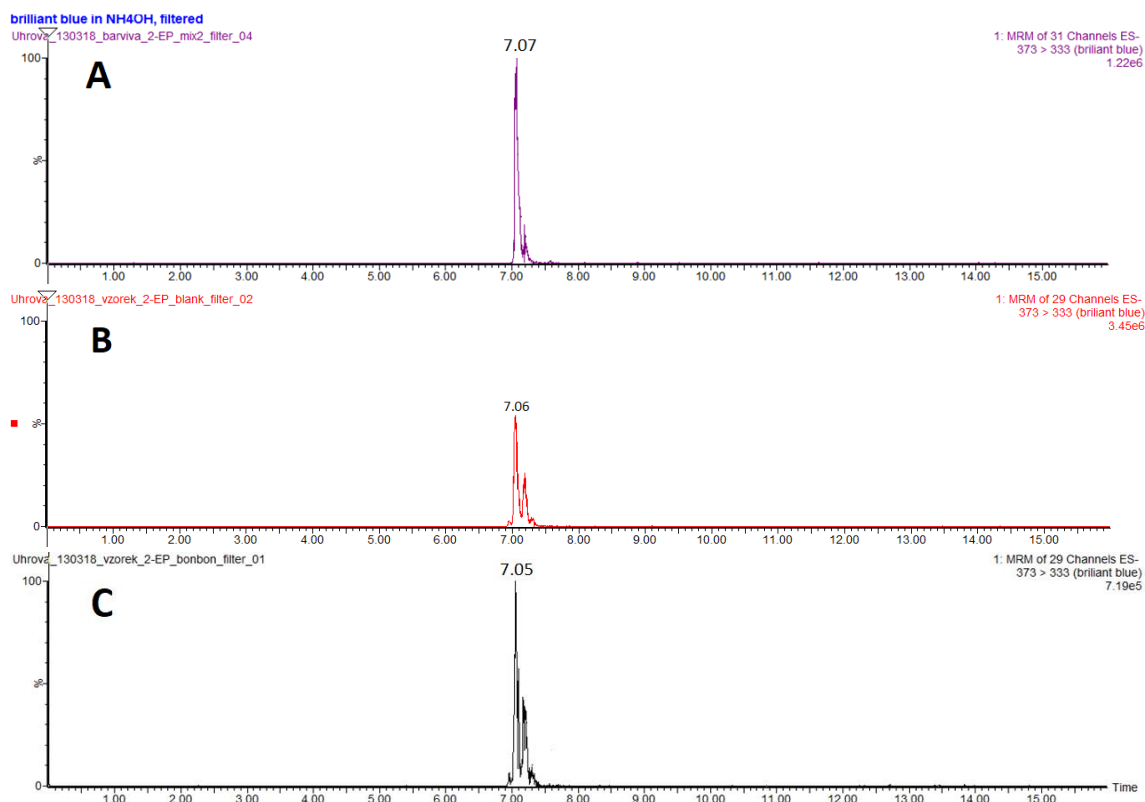
Vyvinutá metoda SFC/MS pro syntetická potravinářská barviva (Obr. 6 a příloha III.) byla použita k analýze reálných vzorků iontového nápoje Gatorade Cool Blue a žvýkacích bonbónů Skittles s příchutí tropického ovoce. Po úpravě a ředění vzorků

(kap. 3.3.3) proběhla analýza na stacionární fázi 2-EP s gradientem od 5 % modifikátoru (směs methanolu a vody v poměru 95 : 5 (v/v) s 10 mmol/l NH₄OH) do 100 % za 12 minut. Chromatografická analýza vzorků trvala 16 minut na koloně vyhřáté na 40 °C při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min.

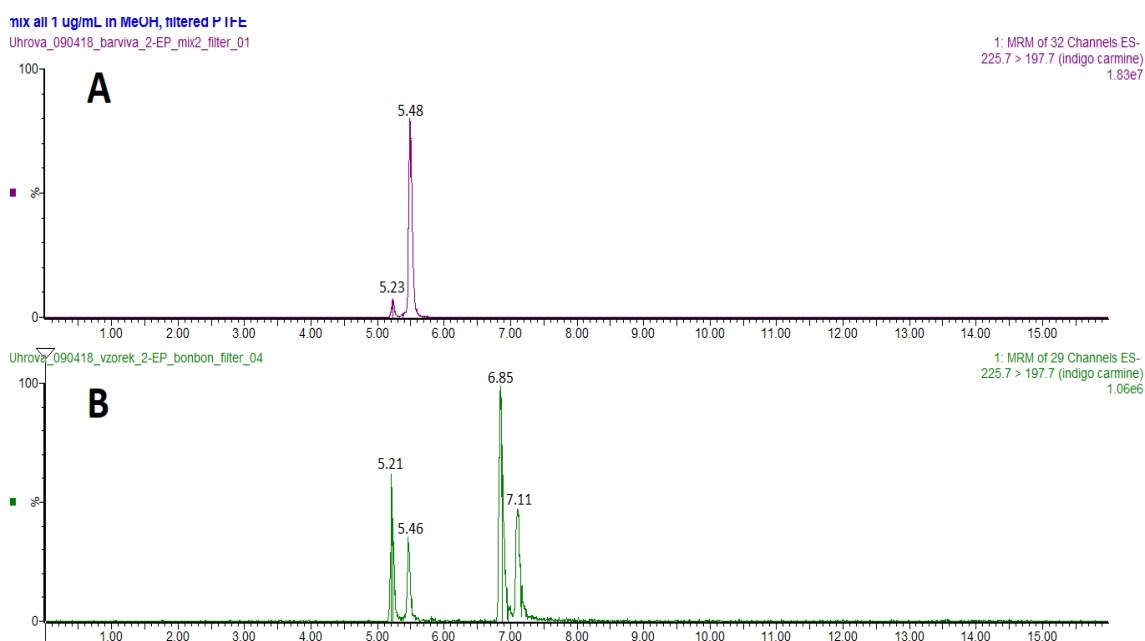


Obrázek 6: Výsledná separace standardů syntetických barviv (kolona: 2-EP, teplota kolony: 40 °C, gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 % modifikátoru, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %, průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometrie

Ve vzorku iontového nápoje i v modrých žvýkacích bonbónech bylo nalezeno syntetické barvivo brilantní modř FCF. Kromě modrého žvýkacího bonbónu byl analyzován i fialový žvýkací bonbón, ve kterém se potvrdila přítomnost syntetického barviva indigokarmínu. Přítomnost nalezených barviv byla potvrzena na základě retenčních časů a charakteristických iontů jejich SRM přechodů (Obr. 7 a 8). Chromatogram vzorku fialového žvýkacího bonbónu obsahuje čtyři píky, které náleží pouze SRM přechodu indigokarmínu. Pro kvantifikaci tohoto barviva byly použity plochy pro dva píky, které jsou shodné s SRM přechodem standardu, i pro čtyři píky. Vysvětlením většího počtu píků by mohla být přítomnost izomerů barviva.



Obrázek 7: Analýza syntetického barviva brilantní modř FCF: **A)** standard, **B)** iontový nápoj, **C)** modrý žvýkácí bonbón (kolona: 2-EP; teplota kolony: 40 °C; gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)



Obrázek 8: Analýza syntetického barviva indigokarmínu: **A)** standard, **B)** fialový žvýkácí bonbón ((kolona: 2-EP; teplota kolony: 40 °C; gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

4.6.1 Stanovení syntetického barviva ve vzorku

Tři vzorky totožného iontového nápoje, tři modré a tři fialové žvýkácí bonbóny byly upraveny podle kap. 3.3.3 a změřeny. Z retenčních časů jednotlivých syntetických barviv byly vypočítány relativní směrodatné odchylky (RSD), které se jako ukazatel opakovatelnosti pohybovaly v rozmezí od 0,17 % do 0,19 %. Preciznost byla hodnocena pomocí relativní směrodatné odchylky ploch píků a nepřekračovala nejvyšší přípustnou hodnotu RSD pro kvantitativní stanovení látek 15 % (Tab. 9).

Tabulka 9: Relativní směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků jednotlivých vzorků

Vzorek	Průměrný retenční čas (min)	RSD % (retenční čas)	Průměrná plocha	RSD % (plocha)
Iontový nápoj	6,83	0,19	225733,8	8,0
Modrý žvýkácí bonbón	6,87	0,19	66657,73	1,6
Fialový žvýkácí bonbón (2 píky)	5,22	0,17	44569,14	1,3
Fialový žvýkácí bonbón (4 píky)	5,22	0,17	167705,53	2,4

Obsahy detegovaných syntetických barviv brilantní modři FCF a indigokarmínu v reálných vzorcích byly vypočteny pomocí sestrojených kalibračních přímek pro standardy syntetických barviv. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10: Obsahy barviv v reálných vzorcích

Vzorek	Měření	Obsahy (iontový nápoj v $\mu\text{g/ml}$ a žvýkáč bombón v $\mu\text{g/g}$)	Hmotnost bombónu (mg)
Iontový nápoj	1.	2,0	-
	2.	2,0	-
	3.	1,7	-
Modrý žvýkáč bombón	1.	5,29	1064
	2.	5,05	1093
	3.	5,41	1061
Fialový žvýkáč bombón (2 píky)	1.	0,82	1048
	2.	0,79	1051
	3.	0,80	1068
Fialový žvýkáč bombón (4 píky)	1.	2,89	1048
	2.	3,06	1051
	3.	2,95	1068

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. 12. 2008 o potravinách přídatných látek je pro syntetická barviva brilantní modř FCF a indigokarmín v cukrovinkách stanoven kombinovaný maximální limit 200 mg/kg neboli 200 $\mu\text{g/g}$ a v ochucených nápojích 100 mg/l neboli 100 $\mu\text{g/ml}$. [7] Vzorky žvýkáčích bombónů ani iontový nápoj nepřekračují nejvyšší povolené množství.

4.7 Srovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Největší počet metod používaných dnes pro identifikaci potravinářských barviv spadá do oblasti kapalinové chromatografie. V minulosti se používaly především papírová, tenkovrstvá a kolonová chromatografie, dnes se nejvíce využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/VIS nebo MS detekcí. I když je detekce na principu molekulové absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti záření jednoduchá a spolehlivá a při analýze barviv může poskytnout vyšší míru selektivity danou absorpcí ve viditelné oblasti spektra (oproti absorpci v UV oblasti), hmotnostní spektrometrie a především tandemová hmotnostní spektrometrie je cennou technikou, která je v současné době obecně upřednostňována před UV/VIS detektory pro svou vysokou citlivost a selektivitu. Kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií představuje přístup poskytující potřebné informace pro identifikaci potravinářských barviv, což může

mít význam např. pro identifikaci nelegálně přidaných barviv do potravin s cílem vylepšit barvu. Proto zmíněná detekční technika byla využita i v této práci. Následující tabulka (Tab. 11) srovnává vyvinutou metodu SFC/MS s vybranými publikovanými postupy, kde jsou syntetická barviva detegována jak UV/VIS tak MS detektory. Postupy založené na UV/VIS detekci ve srovnání s SFC/MS metodou mají delší čas analýzy a zároveň detekují menší počet analytů. Postupy založené na MS detekci ve srovnání s SFC/MS metodou vykazují v některých případech kratší časy analýz a detekují téměř shodný počet analytů. Z hlediska aplikované chromatografické metody články, které by se zabývaly separací povolených potravinářských barviv superkritickou fluidní chromatografií, se doposud v literatuře neobjevily.

Tabulka 11: Srovnání vyvinuté SFC/MS metody, HPLC-UV/VIS a HPLC/MS metod

Článek	Počet shodných analytů (celkový)	Celkový čas separace (min)	Kolona	Detektor	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Vyvinutá SFC/MS metoda	14	16	Acquity BEH 2-Ethylpyridine	Hmotnostní spektrometr Xevo TQS	1,08-84,25	3,28-255,30
Cit. [75]	6 (10)	50	NUCLEODUR C18	UV/VIS Lambda 25	0,18-4,58	0,54-13,9
Cit. [76]	4	20	SUPELCOSIL LC-18	UV/VIS SPD-M10AVP	3-40	12-90
Cit. [86]	7	26	Symmetry C18	UV/VIS SPD-M20A	-	0,02
Cit. [77]	7 (20)	20	Acclaim Polar Advantage C16	Hmotnostní spektrometr API 3200	-	1-1000
Cit. [87]	14 (19)	11	Acquity BEH C18	Hmotnostní spektrometr Q-trap 4000	1-20	10-401
Cit. [88]	10 (19)	10	Phenomenex Kinetex C18	Hmotnostní spektrometr TSQ Quantum	17,3-952	1-50

5 ZÁVĚR

Diplomová práce je zaměřena na analýzu syntetických potravinářských barviv, které jsou díky své nízké ceně a vysoké stabilitě velmi často přítomny v potravinách a mohou mít nežádoucí vliv na lidské zdraví. Jejich nepovolený přídavek může být motivován snahou vylepšit vzhled potravin a je jednou z možností pančování potravin.

Separace studovaných syntetických barviv byla provedena pomocí superkritické fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickým detektorem. V prvním kroku bylo ověřeno vhodné nastavení parametrů hmotnostního spektrometru pro ionizaci a fragmentaci sledovaných barviv pomocí zavádění roztoků jejich standardů. Analyty byly ionizovány v záporném módu a jejich kvantifikace byla prováděna v módu sledování vybrané reakce (selected reaction monitoring). Následně byla studována chromatografická separace na čtyřech vybraných kolonách 2-EP, BEH, C18 a FPh.

Hodnocen byl vliv aditiva, stacionární fáze, teploty kolony, gradientu složení mobilní fáze a průtoku mobilní fáze z hlediska celkové doby a kvality separace látek. Nejlepší separace bylo dosaženo na chromatografické koloně 2-EP při teplotě 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. K oxidu uhličitému byl přimíchán modifikátor s aditivem (10 mmol/l NH₄OH ve směsi methanol : voda 95 : 5). Byl zvolen následující gradient modifikátoru: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 14,5 min – 5 %, 16 min – 100 %. Na chromatogramu bylo možné rozeznat 12 píků pro 14 analytů (vzájemně neseparované látky bylo možné odlišit hmotnostně spektrometrickou detekcí). Na žádné z kolon se při uvedeném složení a gradientu mobilní fáze nepodařilo vymýt kyselinu karmínovou. To bylo možné při použití aditiva mravenčanu amonného nebo trifluoroctové kyseliny, které však nebyly vhodné pro ostatní analyzovaná syntetická barviva. Celkový čas chromatografické analýzy byl 16 minut ale poslední analyt se eluoval již v 9 minutě.

Metoda byla částečně validována s ohledem na opakovatelnost, preciznost, linearitu, mez detekce a stanovitelnosti. Opakovatelnost retenčních časů byla vyjádřena z šesti po sobě jdoucích měření směšného standardu o koncentraci 1 µg/ml pomocí RSD (hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,05 % do 0,60 %). Preciznost byla vyhodnocena jako RSD ploch píků šesti po sobě jdoucích měření téhož vzorku a pohybovala se v rozmezí od 1,57 % do 8,95 %. Linearita byla prokázána v koncentračním rozsahu 10 – 2000 ng/ml u všech analyzovaných syntetických barviv s výjimkou brilantní černí

BN, amarantu a chinolinové žluti SS. Mez detekce se pohybovala v rozsahu od 1,08 ng/ml do 84,3 ng/ml a mez stanovitelnosti od 3,28 ng/ml do 255 ng/ml.

Vyvinutá metoda byla aplikována na analýzu reálných vzorků (iontový nápoj Gatorade Cool Blue a žvýkáci bonbóny Skittles). Vzorky byly nejdříve upraveny a následně analyzovány. Z retenčních časů a výsledných ploch píků byla vypočítána opakovatelnost a preciznost jako RSD. Opakovatelnost retenčních časů se pohybovala od 0,17 % do 0,19 % a preciznost ploch píků byla lepší než nejvyšší přípustná hodnota RSD pro stanovení látek tj. 15 %. Pomocí kalibračních závislostí pro brilantní modř FCF a indigokarmín byla nalezená barviva kvantifikována. Ve třech vzorcích totožného iontového nápoje, byla průměrná koncentrace brilantní modři FCF 1,9 µg/ml. Ve vzorcích třech modrých žvýkácích bonbónů bylo též barvivo přítomné v množství 5,05-5,41 µg/g. Ve vzorcích třech fialových žvýkácích bonbónů se obsah indigokarmínu pro dva píky které byly shodné s SRM přechodem standardu pohyboval v rozmezí 0,79-0,82 µg/g a pro čtyři píky se stejným SRM pozorované při analýze v rozmezí 2,89-3,06 µg/g. Uvedené hodnoty nepřekračují nejvyšší povolená množství pro uvedená barviva, která jsou v ochucených nápojích 100 µg/g a v cukrovinkách tohoto typu (bonbónech) 200 µg/g. Větší počet píků zjištěný při analýze indigokarmínu by mohl být způsoben přítomností izomerů, pak by bylo důležité je zahrnout do výpočtu, nebo jiných látek se shodným SRM přechodem. V takovém případě by při hodnocení potravin bylo nutné pokračovat jejich identifikací např. s využitím hmotnostního spektrometru s vyšší rozlišovací schopností.

Superkritická fluidní chromatografie se ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí osvědčila pro úspěšnou a rychlou analýzu syntetických potravinářských barviv. Jelikož studovaná syntetická barviva patří mezi velmi polární látky a dochází k silné retenci látek v koloně, byl pro analýzu použit strmý gradient modifikátoru až po 100 %. Za těchto podmínek nelze hovořit o stavu superkritickém ale subkritickém. Avšak vlastnosti mobilní fáze se mění kontinuálně, proto přechod mezi těmito stavy je plynulý a opakovatelný. Výsledná SFC metoda je vhodná pro všechny studované velmi polární iontové látky s výjimkou kyseliny karmínové. Protože metoda nevyžaduje ion-párovací činidla, je dobře kompatibilní s MS detekcí, je velice citlivá, poskytuje stabilní retenční časy analytů a rychlou ekvilibraci kolony. Ve srovnání s kapalinovou chromatografií obstála pro dané analyty stejně dobře a má podobné nároky na instrumentaci. Ve srovnání s HPLC/UV-VIS má i nižší nároky na celkový čas separace. Celkově tak superkritická

fluidní chromatografie má dobré předpoklady stát se jedním z nových možných přístupů v analýze nejen syntetických barviv ale i jiných velmi polárních iontových látek.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. Šlampová A., Smělá D., Vondráčková A., Jančářová I., Kubáň V., Stanovení syntetických barviv v potravinách separačními metodami, Chem. listy 95 (2001) 163-168.
2. <http://www.bezpecnostpotravin.cz/potravinarska-barviva-prirodnimistosyntetickych.aspx>, staženo 28. března 2018
3. http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova_2/COT_Southampton_hyperaktivita.pdf, staženo 8. 4. 2018
4. <http://www.actiononadditives.com/>, staženo 8. 4. 2018
5. <http://www.bezpecnostpotravin.cz/prijem-barviv-z-potravin-v-australii.aspx>, staženo 8. 4. 2018
6. Vyhláška č. 4/2008Sb. kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Sbírka zákonů č.4/2008, leden 2008.
7. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách, prosinec 2008.
8. Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J. a Voldřich M., Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování, Chem. Listy 106 (2012) 903-910.
9. <http://acto.cz/podpora-obchodu/historie-ceskeho-obchodu/>, staženo 11. února. 2016.
10. <http://www.rsc.org/education/eic/issues/2005mar/thefightagainstfoodadulteration.asp>, staženo 11. února 2016.
11. Charnley B., Arguing over adulteration: the success of the Analytical Sanitary Commission, Endeavour 32 (2008) 129-133.
12. <https://www.foodwatch.org/en/what-we-do/topics/imitation-foods-and-blatant-trickery/more-information/history-of-food-fraud/>, staženo 11. února 2016.
13. Skinner C. G., Thomas J. D., Osterloh J. D., Melamine toxicity, J. Med. Toxicol. 6 (2010) 50-55.
14. Schier J. G., Rubin C., Miller D., Barr D., McGeehin M., Medication-associated diethylene glycol mass poisoning: a review and discussion on the origin of contamination, J. Public Health Policy 30 (2009) 127-143.
15. Cuhra P., Metody a kriteria pro ověřování authenticity potravin a potravinářských surovin, Key Publishing, Ostrava 2011.

16. https://www.potravinainfo.cz/33/metody-hodnoceni-autenticity-a-detekce-falsovani-potravin-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EIJc_cGyFPGgc%20RFraJ4GxDzVRYFLS2WAvA/, staženo 11. února 2016
17. Kubásek J., Šetlík J., Dwyer S., Šantrůček J., Light and growth temperature alter carbon isotope discrimination and estimated bundle sheath leakiness in C4 grasses and dicots, *Photosynt. Res.* 91 (2007) 47-58.
18. Dawson T. E., Siegwolf R. T. W., *Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change*, Academic Press an imprint of Elsevier, Amsterdam 2007, 285-300.
19. Dawson T. E., Ehleringer J. R., Streamside trees that do not use stream water, *Nature* 350 (1991) 335-337.
20. Deniro M. J., Epstein S., Relationship between the oxygen isotope ratios of terrestrial plant cellulose, carbon dioxide, and water, *Science* 204 (1979) 51-53.
21. Grégrová A., Mazáč J., Čížková H., Hodnocení robustnosti markerů autenticity potravin: kritický přehled se zaměřením na isotopový poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$ kyseliny octové, *Chem. Listy* 110 (2016) 263-268.
22. Gonzalez J., Jamin E., Remaund G, Martin Y. L., Martin G. G., Martin M. L., Authentication of lemon juices and concentrates by a combined multi-isotope approach using SNIF-NMR and IRMS, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2200-2205.
23. Čížková H., Voldřich M., Rajchl A., Horsáková I., Kvalita a autenticita medu, *Výživa a potravin* 1 (2010) 21.
24. Bursová Š., Dušková M., Necidová L., Karpíšková R., Myšková P., *Mikrobiologické laboratorní meody*, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2004, 36-40.
25. Španová, A., Rittich B., *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*, Vysoké učení technické v Brně, Brno 2010, 86.
26. Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J., *Metody molekulární biologie*, Masarykova univerzita, Brno 2005, 194.
27. Dudová S., Hájek R., *Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu*, Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, Brno 2008, 220-222.
28. Demnerová K., *Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu*, *Chem. Listy* 106 (2012) 920-925.
29. Obrovská I., Steinhäuserová I., Nebola M., Krkoška L., Identifikace druhů masa v masných výrobcích, *Veterinářství* 52 (2002) 421-423.

30. Hulín P., Dostálek P., Hochel I., Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách, Chem. Listy 102 (2008) 327-337.
31. Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P., *Listeria monocytogenes* – Nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách, Chem. Listy 99 (2005) 467-473.
32. Logan J., Edwards K., Saunders N., Real-time PCR: Current Technology and Applications, Norfolk: Horizon Scientific Press, Great Britain 2009, 284.
33. Hernandez-Rodriquez P., Ramirez Gomez A. P., Polymerase Chain Reaction, InTech Open Access Publisher 2012, 173-194.
34. Han, X., Aslanian A., Yates, J. R., Mass spektrometry for proteomics, Chem. Biol. 12 (2008) 483-490.
35. Zdráhal Z., Plocek J., Konečný P., Chmelík J., Characterization of biomacromolecules using mass spektrometry, Chem. Listy 91 (1997) 811.
36. Chmelík J., Proteomický průvodce, Chem. Listy 99 (2005) 883-885.
37. Šalplachta J., Allmaier G., Chmelík J., Proteomická identifikace glutenových bílkovin, Chem. Listy 99 (2005) 967-971.
38. Matějka P., Techniky měření a interpretace IR a Ramanových spekter., VŠCHT, Praha 2012.
39. Horák M., Papoušek D., Infračervená spektra a struktura molekul, Academia, Praha 1976.
40. Dvořák L., Šustová K., Mlček J., Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin, Chem. Listy 110 (2016) 868-873.
41. Mandrile L., Zeppa G., Giovannozzi A. M., Rossi A. M., Controlling protected designation of origin of wine by Raman spectroscopy, Food Chem. 211 (2016) 260-267.
42. Yaseen T., Sun D. W., Cheng J. H., Raman imaging for food quality and safety evaluation: Fundamentals and applications, Trends Food Sci. Technol. 62 (2016) 316-326.
43. Qin J., Chao K., Kim M. S., Investigation of Raman chemical imaging for detection of lycopene changes in tomatoes during postharvest ripening, J. Food Eng. 107 (2011) 277-288.
44. Qin J., Chao K., Kim M. S., Simultaneous detection of multiple adulterants in dry milk using macro-scale Raman chemical imaging, Food Chem. 138 (2013) 998-1007.

45. Giovannozzi A. M., Rolle F., Segal M., Abete M. C., Marchis D., Rossi A. M., Rapid and sensitive detection of melamine in milk with gold nanoparticles by Surface Enhanced Raman Scattering, *Food Chem.* 84 (2014) 240-256.
46. Ribeiro M. V. M., Boralle N., Pezza H. R., Pezza L., Toci A. T., Authenticity of roasted coffee using ^1H NMR spectroscopy, *J. Food Comp. Anal.* 57 (2017) 24-30 .
47. Hajšlová J., Čajka T., Václavík L., Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 204-218.
48. Čajka T., Riddelová K., Tomaniová M., Hajšlová J.: *Metabolomics* 7 (2011) 500.
49. Václavík L., Čajka T., Hrbek V., Hajšlová J., Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 56-63.
50. Wu Z., Chen H., Wang W., Jia B., Yang T., Zhang Z., Ding J., Xiao X., Differentiation of dried sea cucumber products from different geographical areas by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 9356.
51. Chen H., Liang H., Ding J., Lai J., Huan Y., Qiao X., Rapid differentiation of tea products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10093.
52. Hoyos-Arbeláez J., Vázquez M., Contreras-Calderón J., Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review, *Food Chem.* 221 (2007) 1371-1381.
53. Zeng Y., Zhu Z., Du D., Lin Y., Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety, *J. Electroanal. Chem.* 781 (2006) 147-154.
54. Papoušek R., Nováková P., Marková E., Barták P., Analýza akrylamidu metodou GC-MS, *Chem. listy* 107 (2013) 255-260.
55. Lucci P., Saurina J., Núñez O., Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 88 (2017) 1-24.
56. Motilva M. J., Serra A., Marcia A, Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 66-82.
57. Flamini R., Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols, *ISRN Spectroscopy* 2013 (2013) 45.

58. Núñez O., Gallart-Ayala H., Claudia M., Paolo L., *Fast Liquid Chromatography-mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*, London: Imperial College Press 2015.
59. Smělá D., Pechová P., Komprda T., Klejdus B., Kubáň V., *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*, *Chem. listy* 98 (2004) 432-437.
60. D'Orazio G., Asensio-Ramos M., Fanali Ch., Hernández-Borges J., Fanali S., *Capillary electrochromatography in food analysis*, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 250-267.
61. Rezende F., Borges F., Cheibub S. S., Maria A., Netto P., Duarte A., Marques, Carvalho F. F., *Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method*, *Microchem. J.*, 134 (2017) 383-389.
62. Altieri I., Semeraro A., Scalise F., Calderari I., Stacchini P., *European official control of food: Determination of histamine in fish products by a HPLC-UV-DAD method*, *Food Chem.* 211 (2016) 694-699.
63. Benešová K., Pluháčková H., Běláková S., Vaculová K., Mikulíková R., Ehrenbergerová J., Březinová Belcredi N., *Využití moderní separační techniky UPLC ke stanovení vitamínu E v znu ječmene*, *Chem. listy* 106 (2012) 672-676.
64. Wang X., Li P., *Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC-MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run*, *Food Chem.* 173 (2015) 897-904.
65. Brera C., Pannunzi E., Guariano Ch., Debegnach F., Gregori E., De Santis B., *Ochratoxin A determination in cured ham by high performance liquid chromatography fluorescence detection and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: a comparative study*, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 37 (2013) 2036-2045.
66. Krmela A., Krtková V., Schulzová V., *Vývoj UPLC-ELSD metody pro stanovení polysacharidu inulinu*, *Chem. listy* 107 (2013) 243-246.
67. Albuquerque T. G., Oliveira M. B., Sanches-Silva A., Costa H. S., *Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography*, *Food Chem.* 193 (2016) 18-25.
68. Hrbek V., Ovesná J., Demnerová K., Hajšlová J., *Využití superkritické fluidní chromatografie pro lipidomické profilování sójového mléka a kravského mléka: autenticita a detekce falšování*, *Chem. listy* 109 (2015) 518-526.
69. Bernal J. L., Martin M., Torbio L., *Supercritical fluid chromatography in food analysis*, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 24-36.

70. Ávila M., Zougagh M., Escarpa A., Rios Á., Determination of sudan dyes in food samples using supercritical fluid extraction–capillary liquid chromatography, *J. Supercrit. Fluids* 55 (2011) 977-982.
71. Buskov S., Hasselstrom J., Olsen C. E., Sorensen H., Sorensen J. C., Sorensen S., Supercritical fluid chromatography as a method of analysis for the determination of 4-hydroxybenzylglucosinolate degradation products, *J. Biochem. Bioph. Methods* 43(2000) 157-174.
72. doc. Ing. Luboš Babička Csc., *Přídavné látky v potravinách*, Praha: Potravinářská komora České republiky 2012.
73. <https://www.britannica.com/biography/William-Henry-Perkin>, staženo 8. 4. 2018
74. Rebane R., Leito I., Yurchenko S., Herodes K., A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrixes, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2747-2757.
75. Bento W. A. S., Lima B. P., Paim A. P. S., Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC, *Food Chem.* 183 (2015) 154-160.
76. Andrade F. I., Guedes M. I. F., Vieira Í. G. P., Mendes F. N. P., Rodrigues P. A. S., Maia C. S. C., Áviua M. M. M., Ribeiro L. M., Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC, *Food Chem.* 157 (2014) 193-198.
77. Tsai Ch., Kuo Ch.-H., Shih D. Y.-Ch., Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.* 23 (2015) 453-462.
78. Prado M. A., Boas L. F. V., Bronze M. R., Godoy H. T., Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1136 (2016) 231-236.
79. Del Giovine L., Piccioli Bocca A., Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis, *Food Control* 14 (2003) 131-135.
80. Thomson C. O., Trenerry V. C., Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 195-201.
81. Damant A. P., *Food Colourants, Handbook of Textile and Industrial Dyeing* 2 (2011) 252-305.
82. Li X. Q., Zhang Q. H., Ma K., Li H. M., Guo Z., Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array detection-ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 182 (2015) 316-326.

83. Feng F., Zhao Y., Yong W., Sun L., Jiang G., Chu X., Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 1813-1818
84. Chen X.-H., Zhao Y.-G., Shen H.-Y., Zhou L.-X., Pan S.-D., Jin M.-C., Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 13 (2014) 123-128.
85. Kovaříková P., Analytické hodnocení nových potenciálních léčiv s využitím HPLC, disertační práce, Lékařská fakulta UK HK, Hradec Králové 2006.
86. Karanikolopoulos G., Gerakis A., Papadopoulou K., Mastrantoni I., Determination of synthetic food colorants in fish products by an HPLC-DAD method, *Food Chem.*, 177 (2015) 197-203.
87. Martin F., Oberson J.-M., Meschiari M., Munari C., Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS selected matrices, *Food Chem.*, 197 (2016) 1249-1255.
88. Guerra E., Llompart M., Garcia-Jares C., Miniaturized matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of synthetic dyes in cosmetics and foodstuffs used or consumed by children, *J. Chromatogr. A*, 1529 (2017) 29-38.

PŘÍLOHY

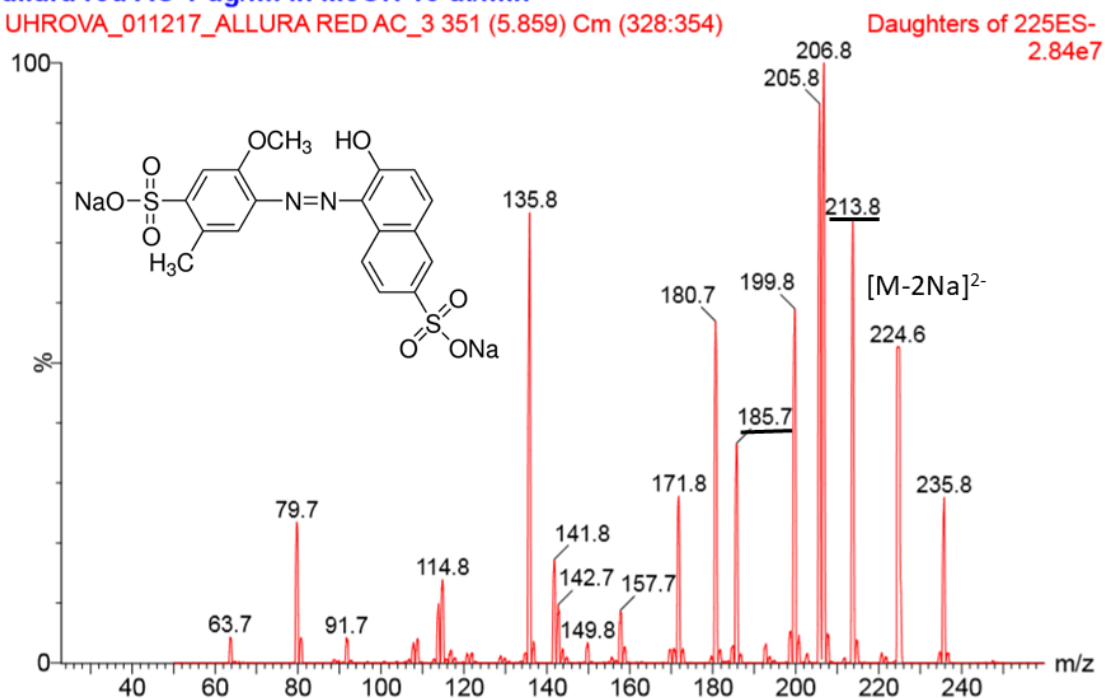
Seznam příloh:

- I. Fragmentační spektra standardů s vybranými SRM přechody
- II. Koelující látky 30 °C a 40 °C
- III. Výsledná separace látek
- IV. Opakovatelnost retenčních časů, preciznost pro plochy píků
- V. Kalibrační závislost

I. Fragmentační spektra standardů s vybranými SRM přechody

allura red AC 1 ug/ml in MeOH 15 ul/min

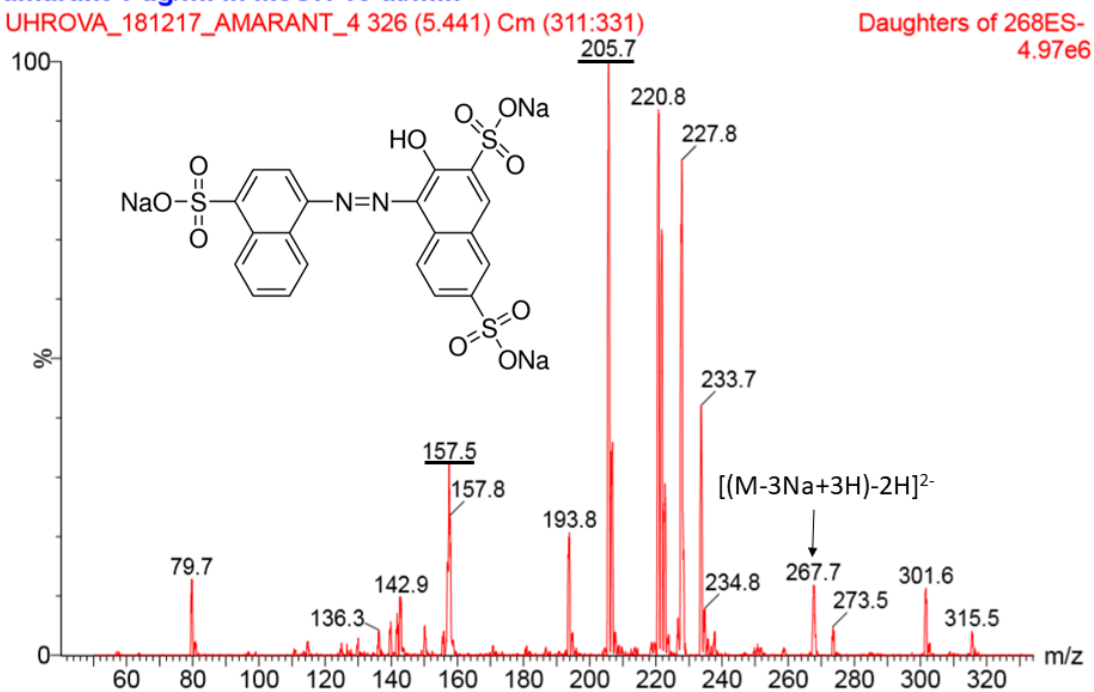
UHROVA_011217_ALLURA RED AC_3 351 (5.859) Cm (328:354)



Obrázek 9: Fragmentační spektrum standardu červeň allura AC m/z 225

amarant 1 ug/ml in MeOH 15 ul/min

UHROVA_181217_AMARANT_4 326 (5.441) Cm (311:331)

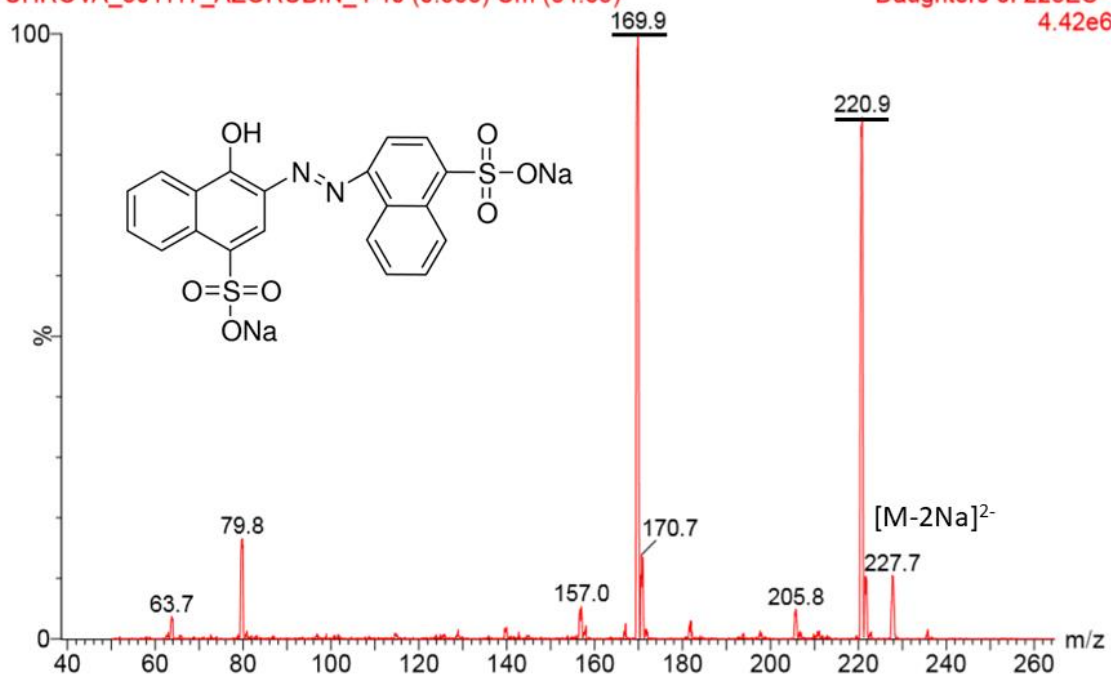


Obrázek 10: Fragmentační spektrum standardu amarant m/z 268

azorubin 1ug/ml in MeOH 15 ul/min

UHROVA_301117_AZORUBIN_4 40 (0.668) Cm (34:65)

Daughters of 228ES-
4.42e6

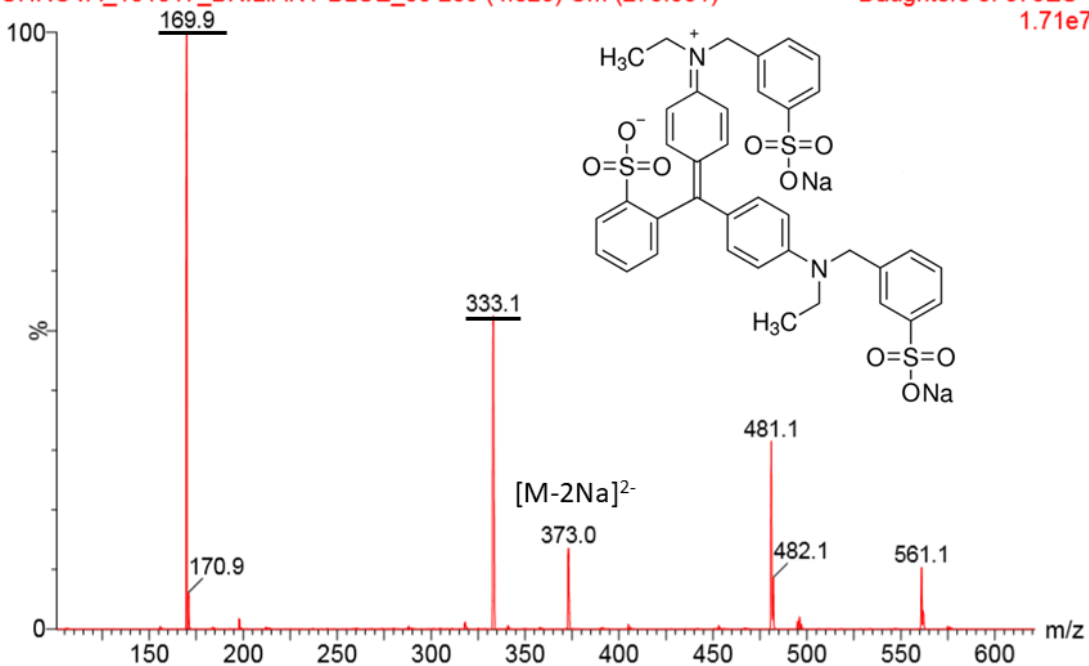


Obrázek 11: Fragmentační spektrum standardu azorubin m/z 228

Brilliant blue 1 ug/ml in MeOH:H2O 1:1

UHROVA_101017_BRILIANT BLUE_05 289 (4.823) Cm (273:331)

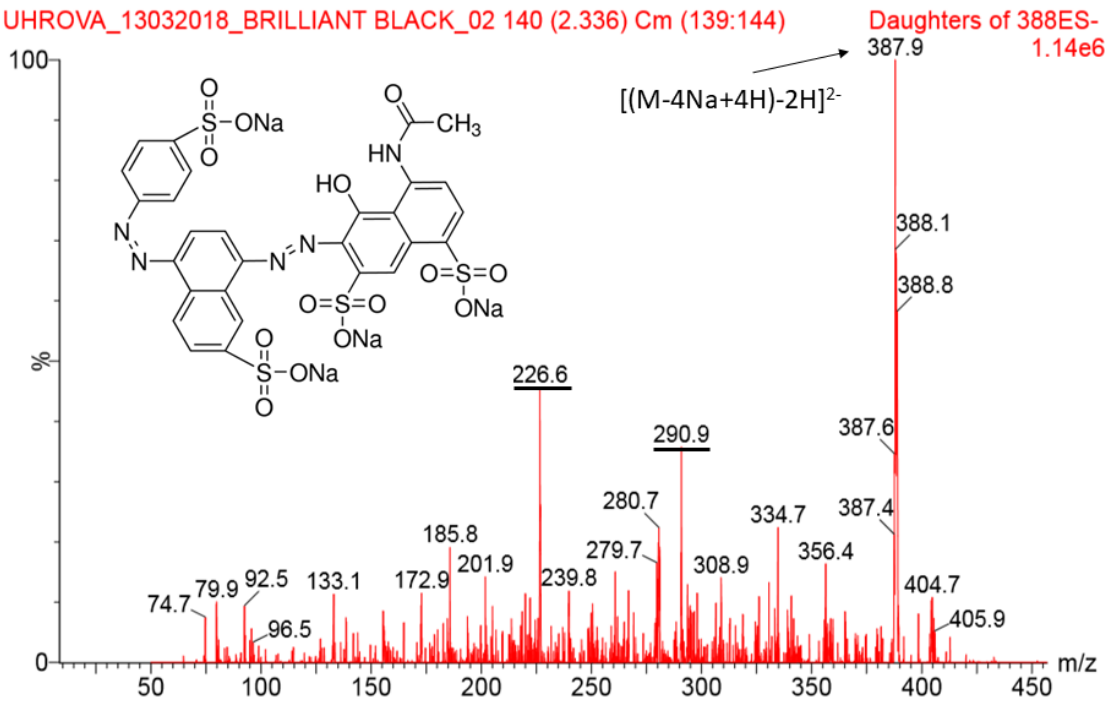
Daughters of 373ES-
1.71e7



Obrázek 12: Fragmentační spektrum standardu brilantní modř FCF m/z 373

Brilliant black BN in 5 mM NH₄OH

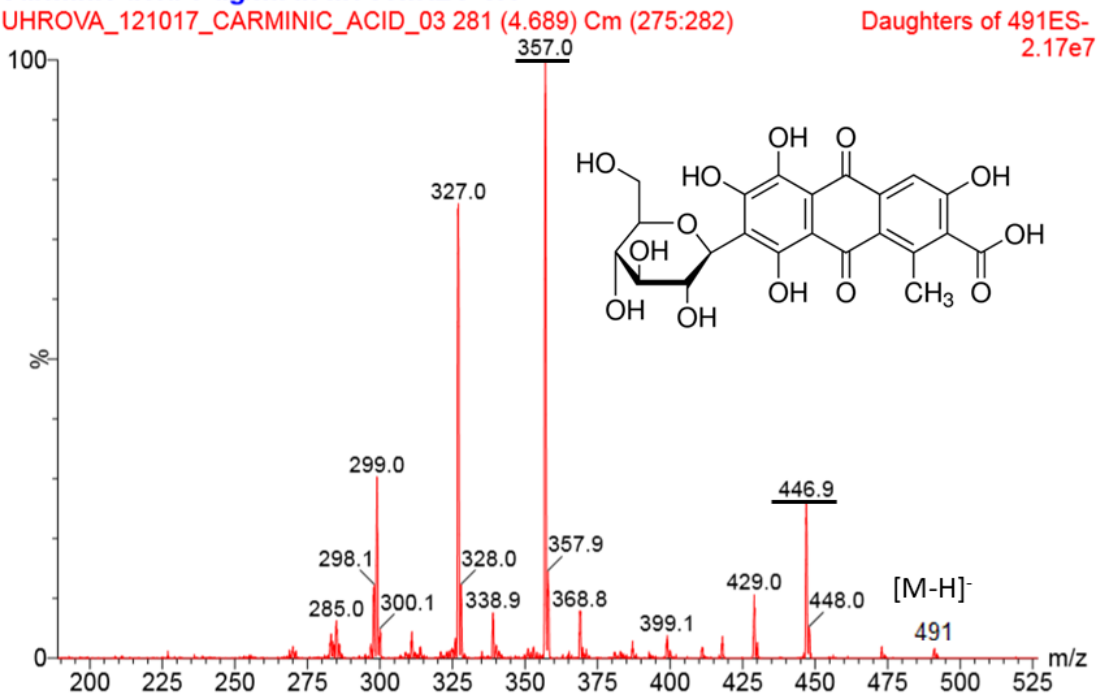
UHROVA_13032018_BRILLIANT_BLACK_02 140 (2.336) Cm (139:144)



Obrázek 13: Fragmentační spektrum standardu brilantní černě BN m/z 388

Carminic acid 5 ug/ml in MeOH:H₂O 1:1

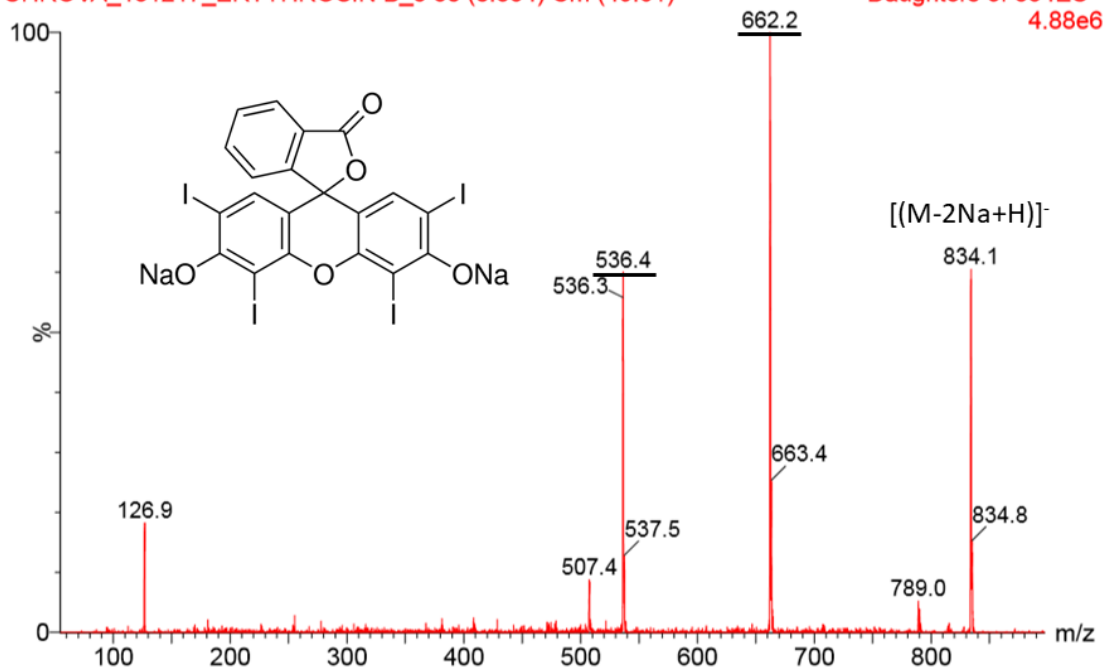
UHROVA_121017_CARMINIC_ACID_03 281 (4.689) Cm (275:282)



Obrázek 14: Fragmentační spektrum standardu karmínová kyselina m/z 491

erythrosin B 1 ug/ml MeOH 15 ul/min

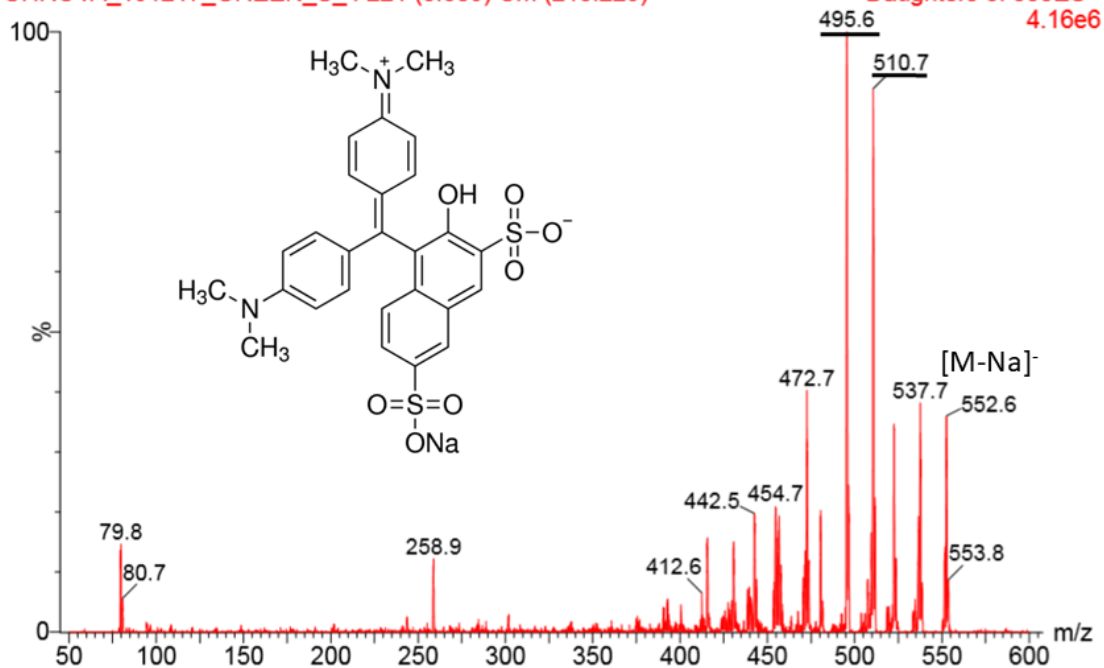
UHROVA_181217_ERYTHROSIN B_5 50 (0.834) Cm (49:61)



Obrázek 15: Fragmentační spektrum standardu erythrosin B m/z 834

green S 1 ug/ml in MeOH 15 ul/min

UHROVA_191217_GREEN_S_4 221 (3.689) Cm (215:229)

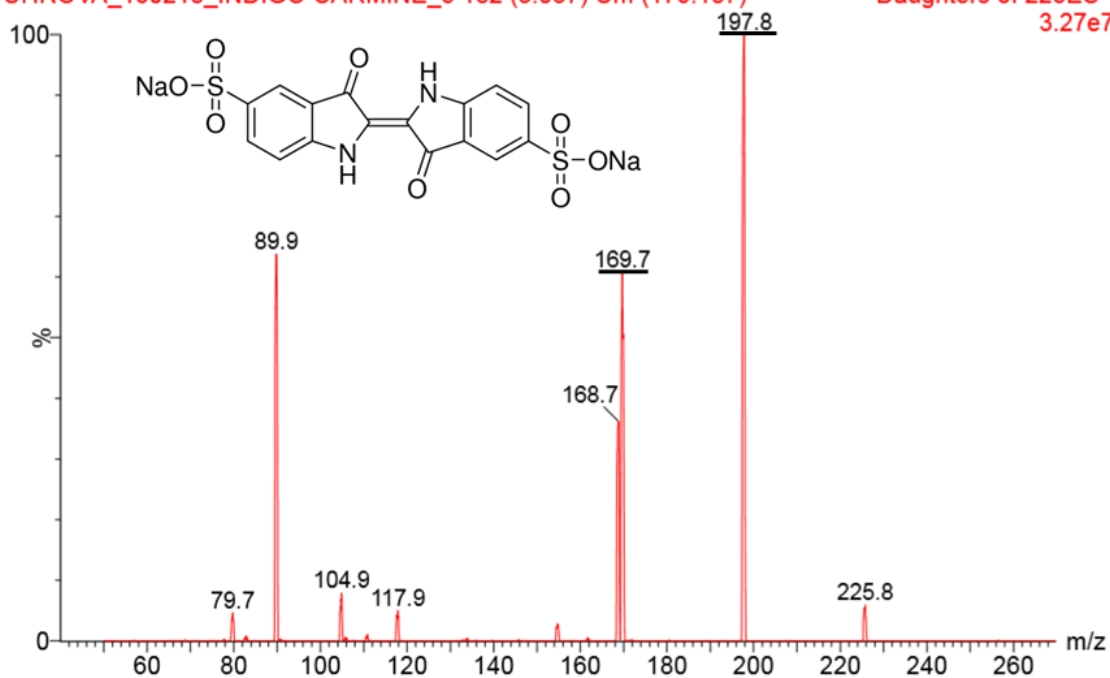


Obrázek 16: Fragmentační spektrum standardu zeleň S m/z 553

indigo carmine in 5mM AH 15 ul/min

UHROVA_160218_INDIGO CARMINE_5 182 (3.037) Cm (176:187)

Daughters of 226ES-
3.27e7

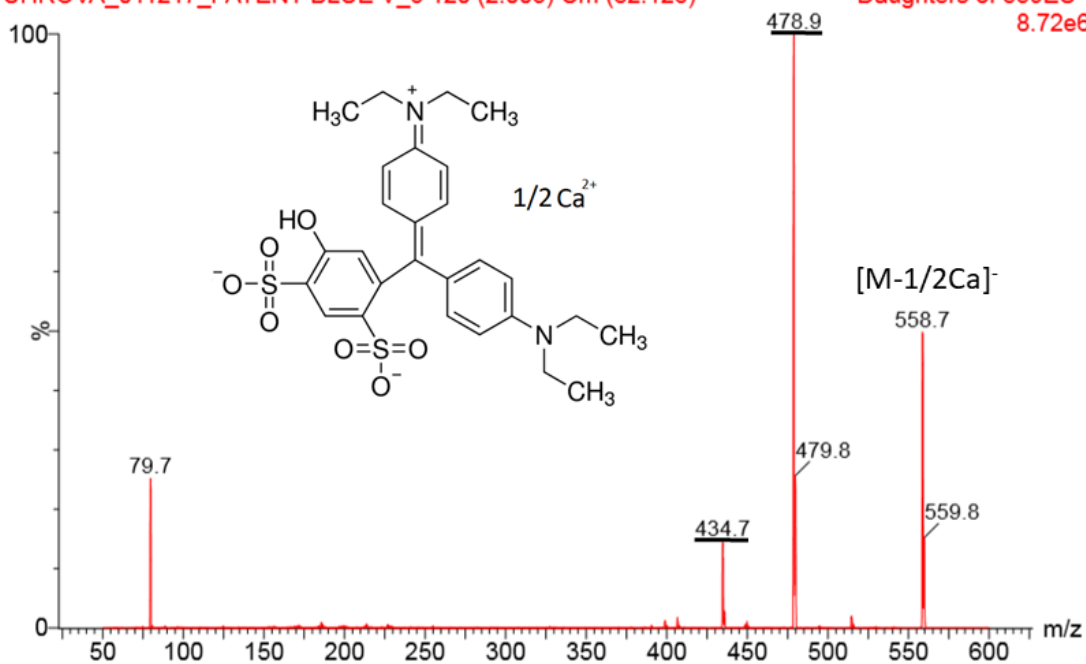


Obrázek 17: Fragmentační spektrum standardu indigokarmín m/z 226

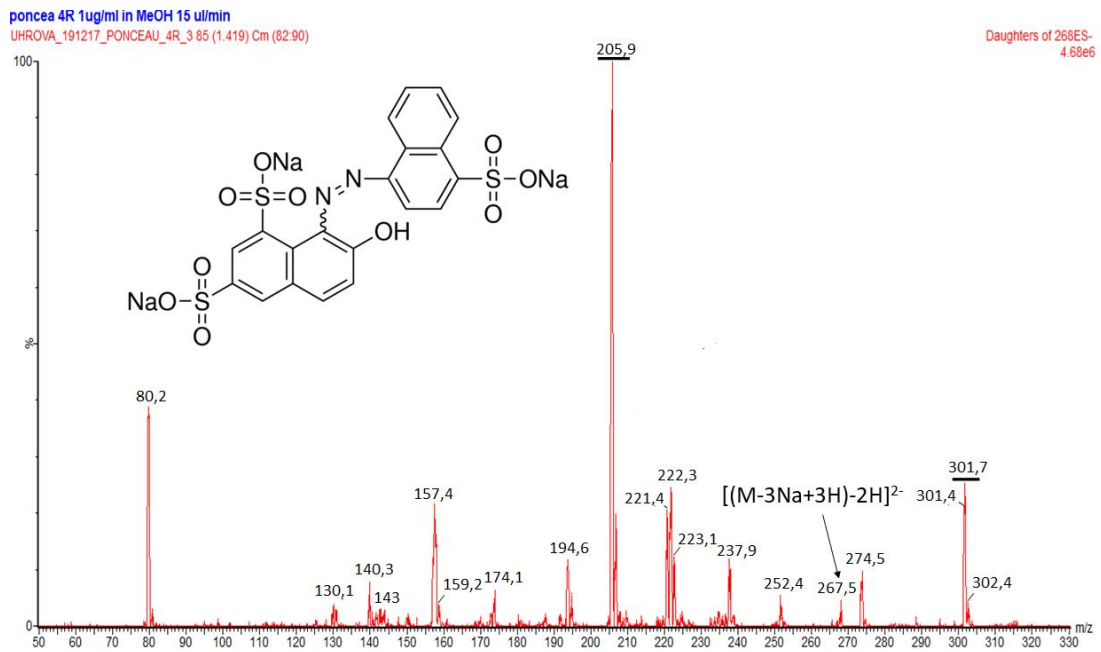
patent blue V 1 ug/ml in MeOH 15 ul/min

UHROVA_011217_PATENT BLUE V_3 120 (2.003) Cm (82:126)

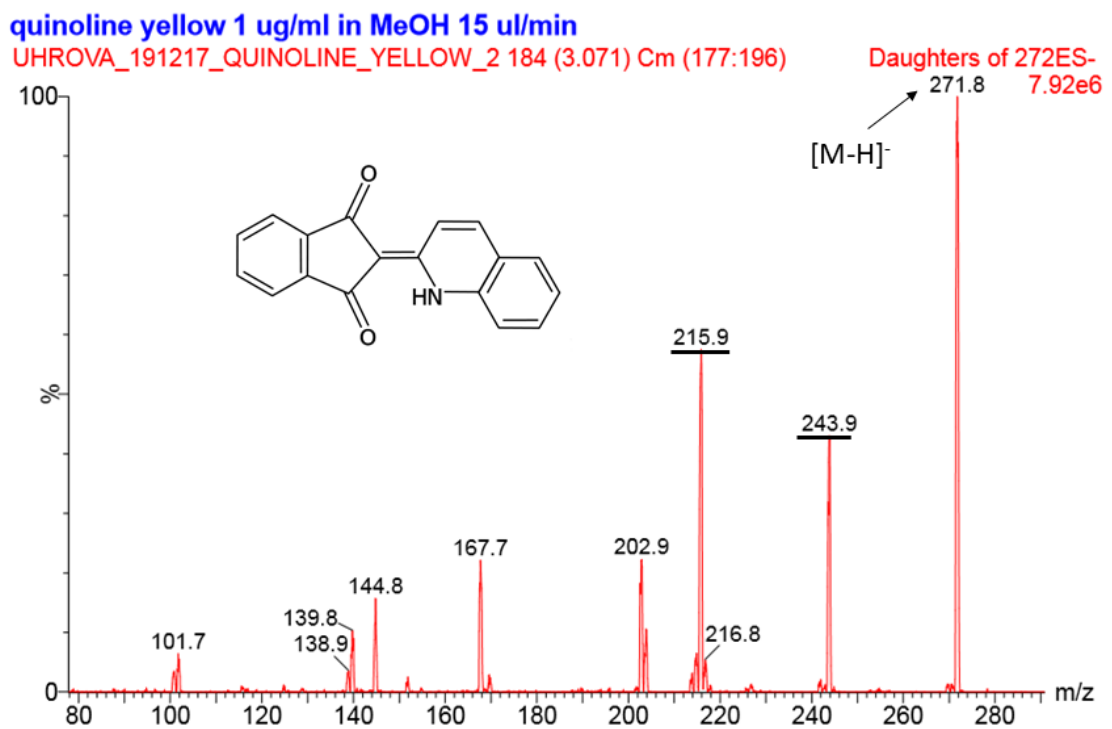
Daughters of 559ES-
8.72e6



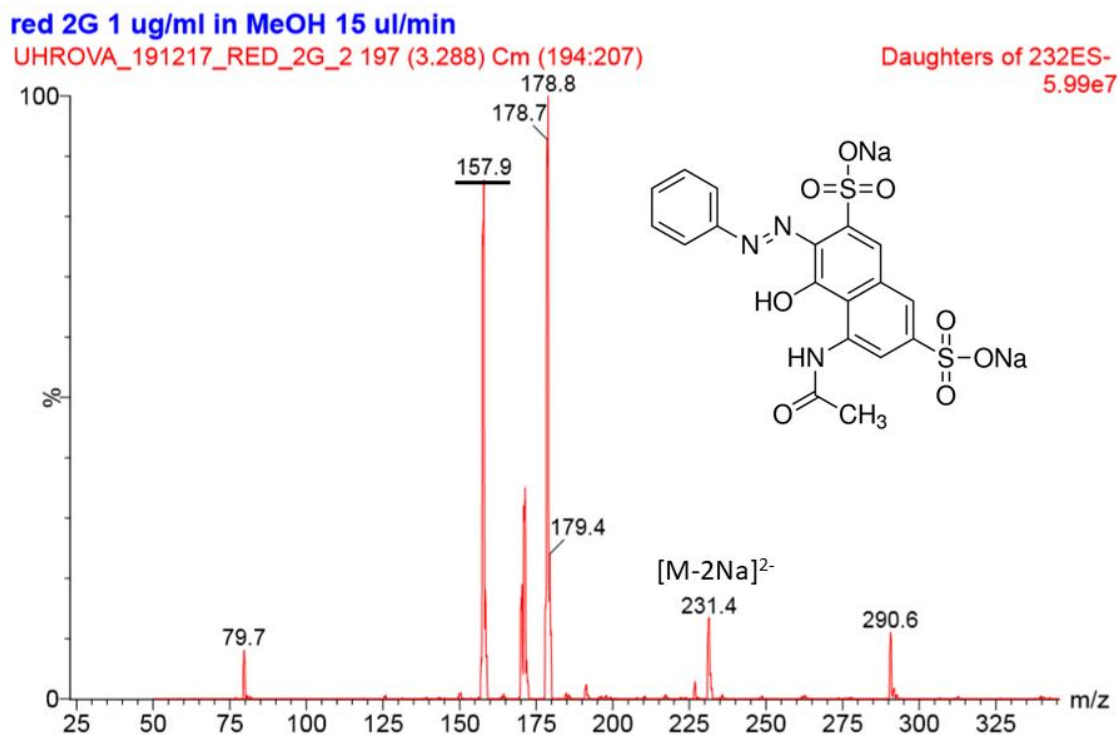
Obrázek 18: Fragmentační spektrum standardu patentní modř V m/z 559



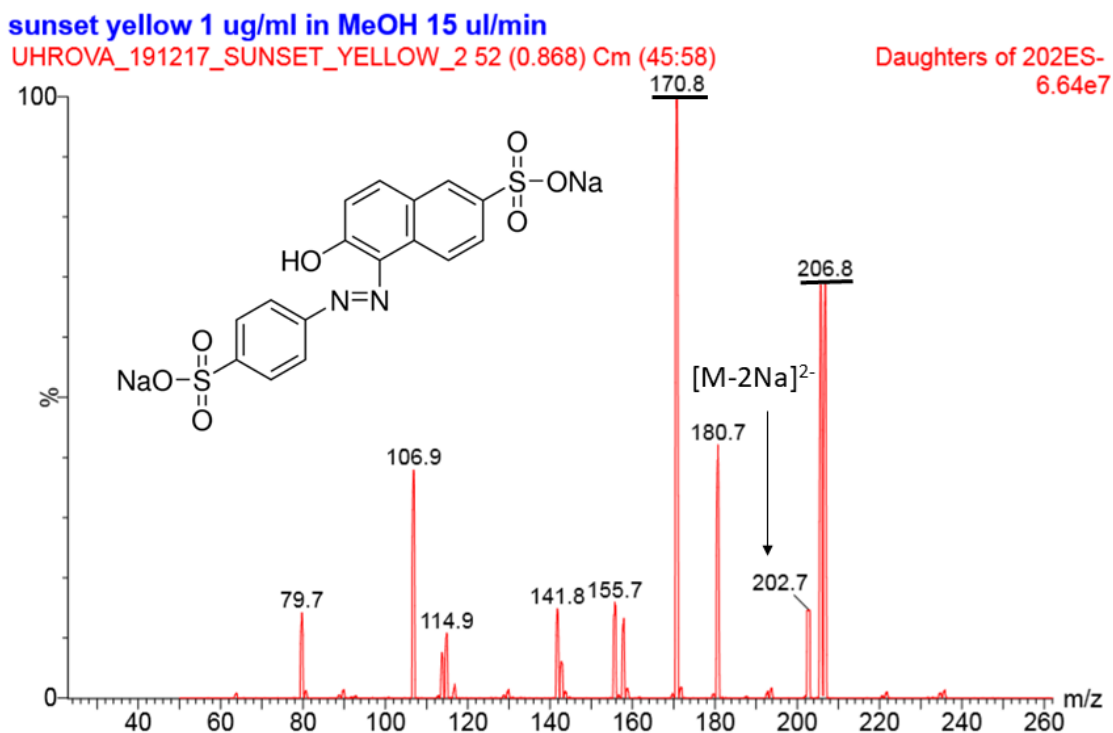
Obrázek 19: Fragmentační spektrum standardu ponceau 4R m/z 268



Obrázek 20: Fragmentační spektrum standardu chinolinová žluť SS m/z 272



Obrázek 21: Fragmentační spektrum standardu červeně 2G m/z 232

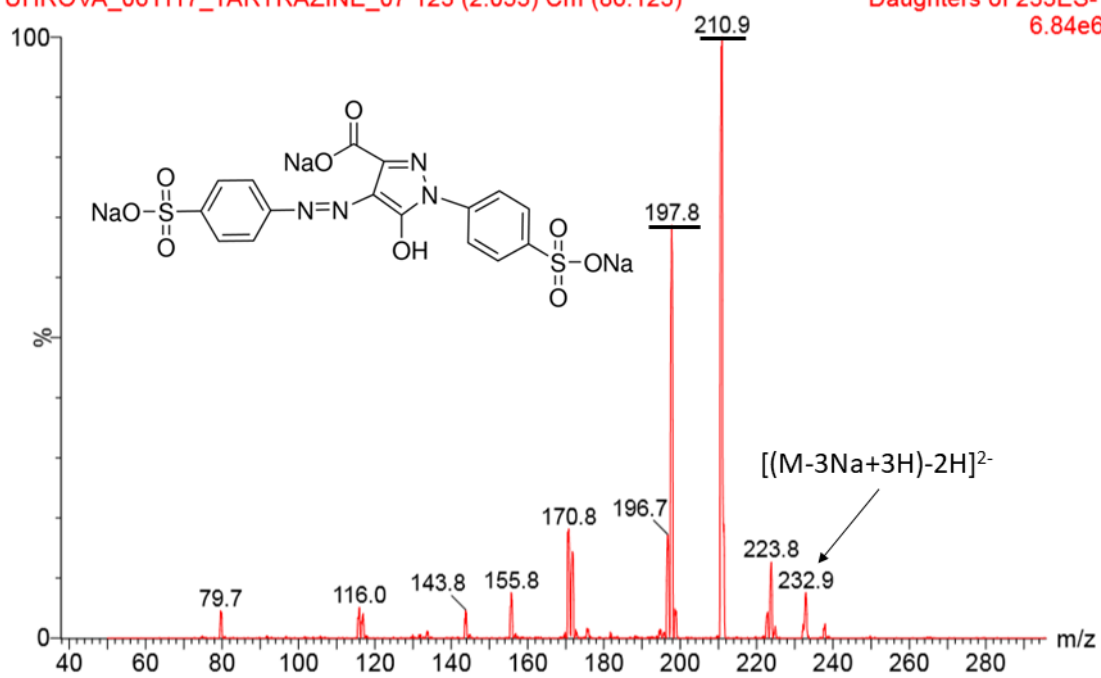


Obrázek 22: Fragmentační spektrum standardu žlutě SY m/z 202

tartrazine 1 ug/ml in MeOH 20 ul/min

UHROVA_061117_TARTRAZINE_07 123 (2.053) Cm (86:123)

Daughters of 233ES-
6.84e6

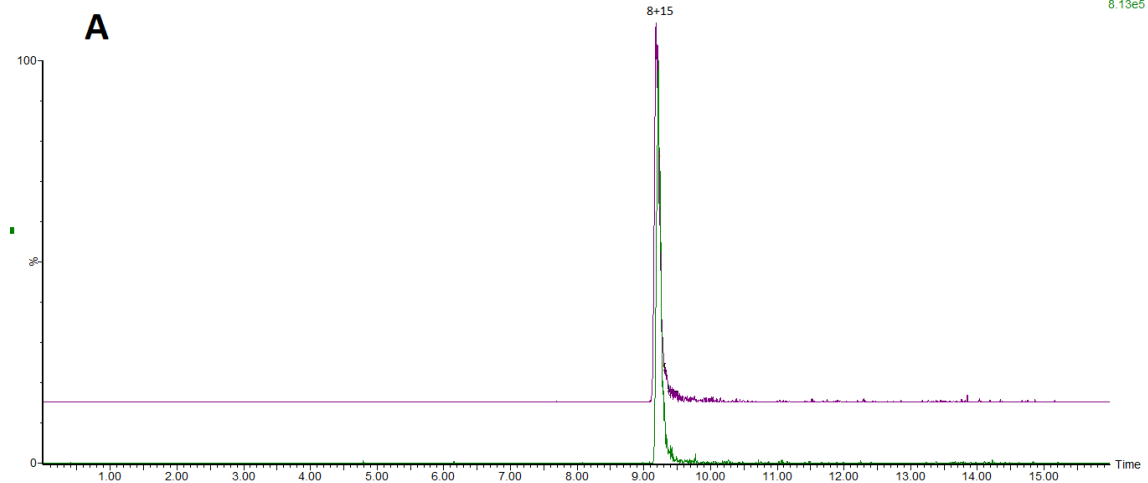


Obrázek 23: Fragmentační spektrum standardu tartrazin m/z 233

II. Koelující látky při teplotách 30 °C a 40 °C

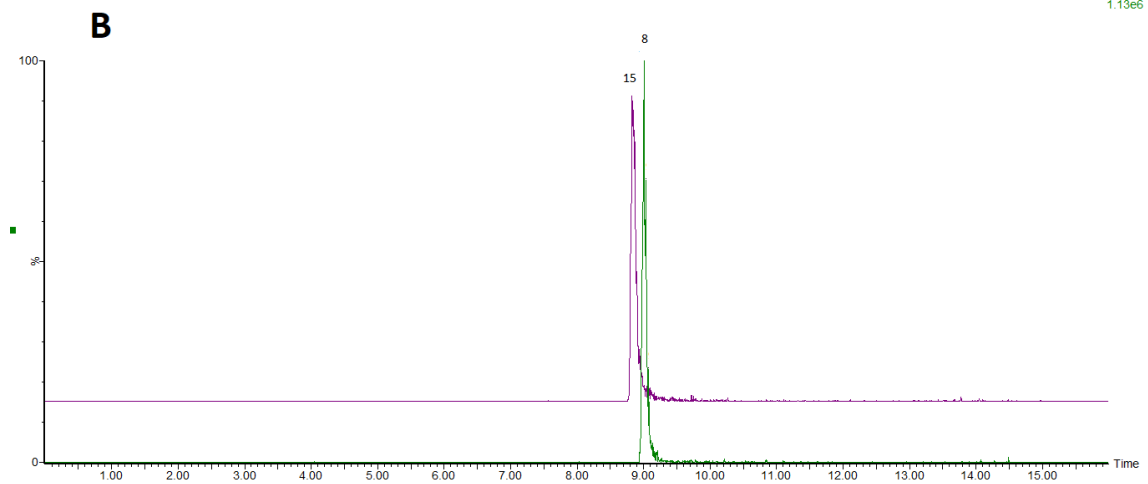
mix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Jhrova_060318_barviva_2-EP_mix2_filter_06

1: MRM of 31 Channels ES-
552.6 > 510.7 (green S)
8.13e5



mix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Uhrova_060318_barviva_2-EP_mix2_filter_05

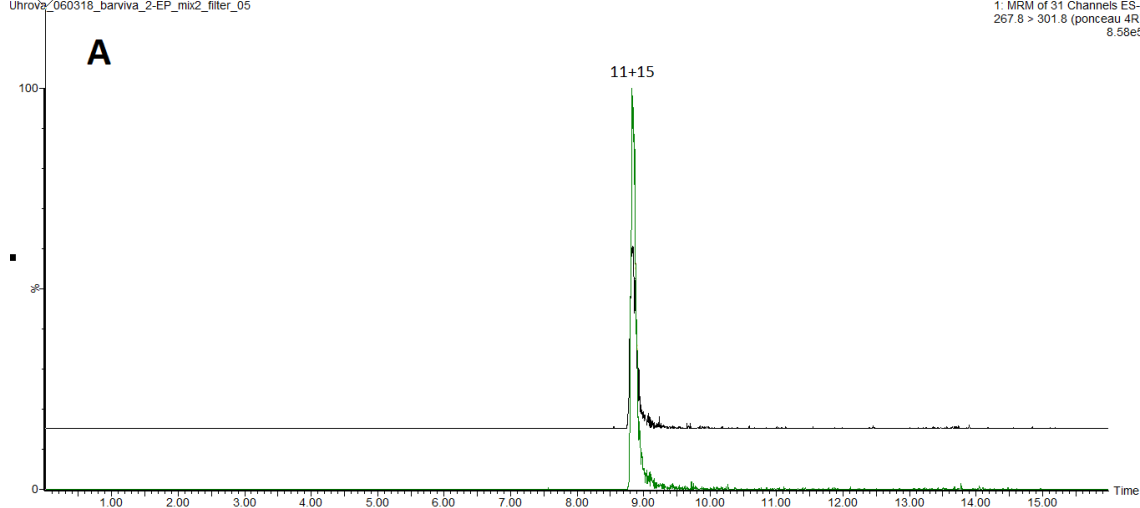
1: MRM of 31 Channels ES-
552.6 > 510.7 (green S)
1.13e6



Obrázek 24: Separace amarantu a zeleně S při teplotě kolony: **A)** 30 °C, **B)** 40 °C (kolona: 2-EP; gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

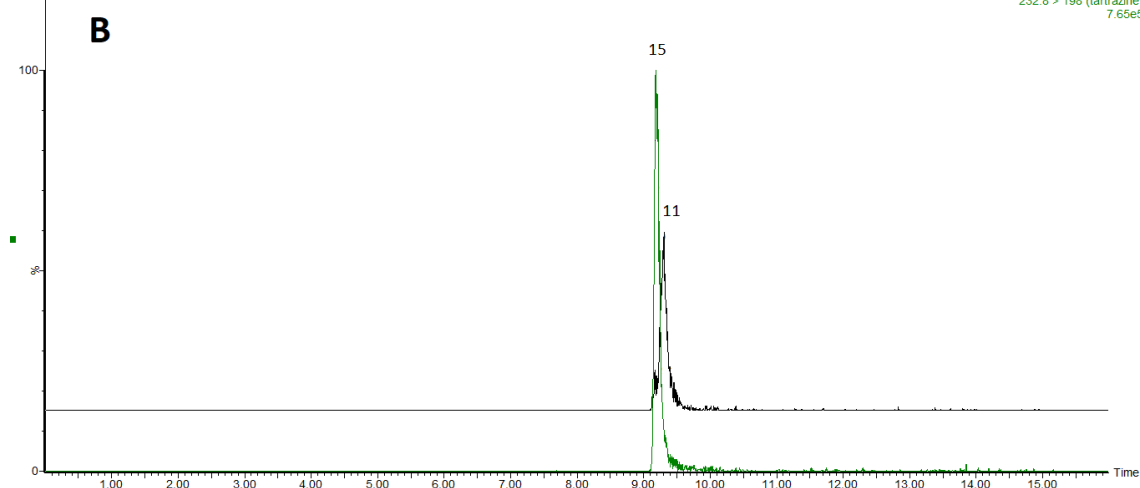
mix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Uhr0vz_060318_barviva_2-EP_mlx2_filter_05

1: MRM of 31 Channels ES-
267.8 > 301.8 (ponceau 4R)
8.58e5



mix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Uhr0vz_060318_barviva_2-EP_mlx2_filter_06

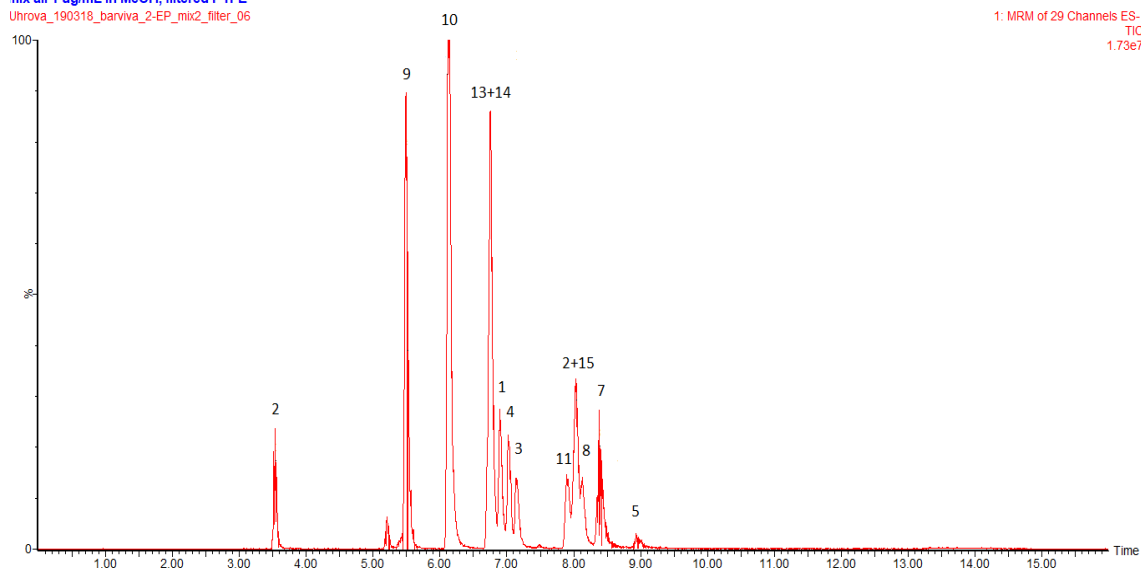
1: MRM of 31 Channels ES-
232.8 > 198 (tartrazine)
7.65e5



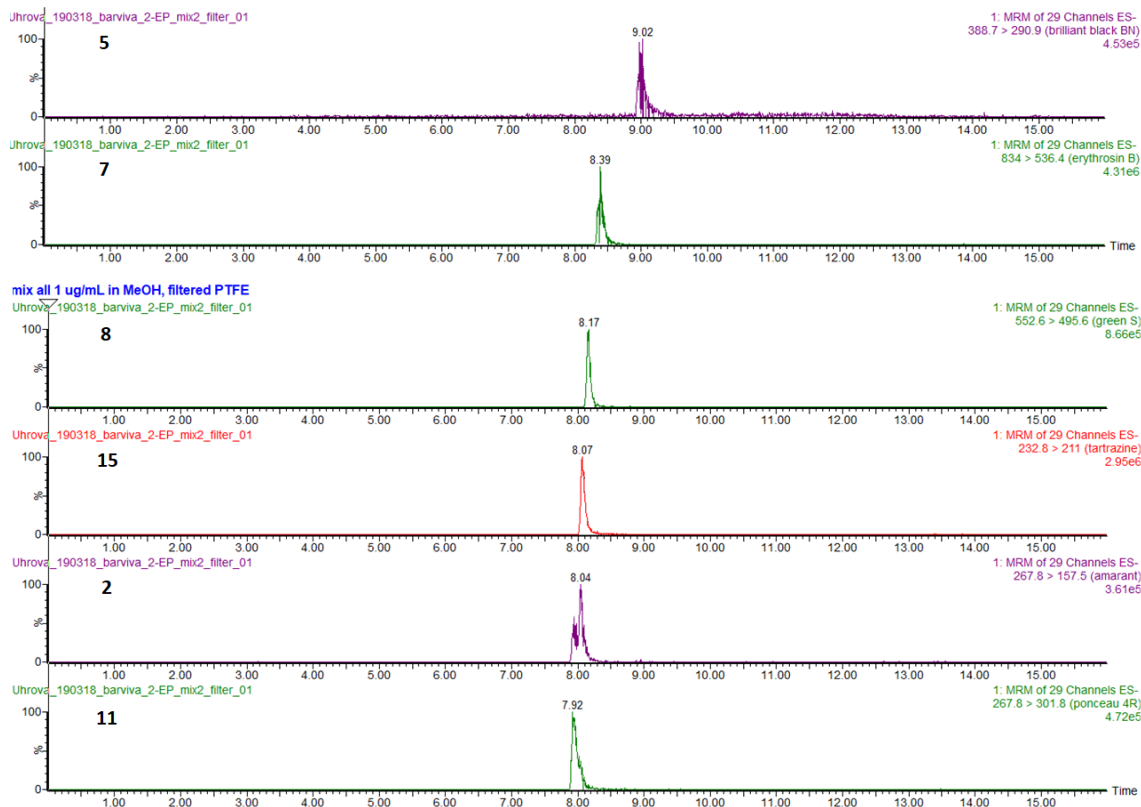
Obrázek 25: Separace ponceau 4R a tartrazinu při teplotě kolony: **A)** 30 °C, **B)** 40 °C (kolona: 2-EP; gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 % modifikátoru, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %; průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometr)

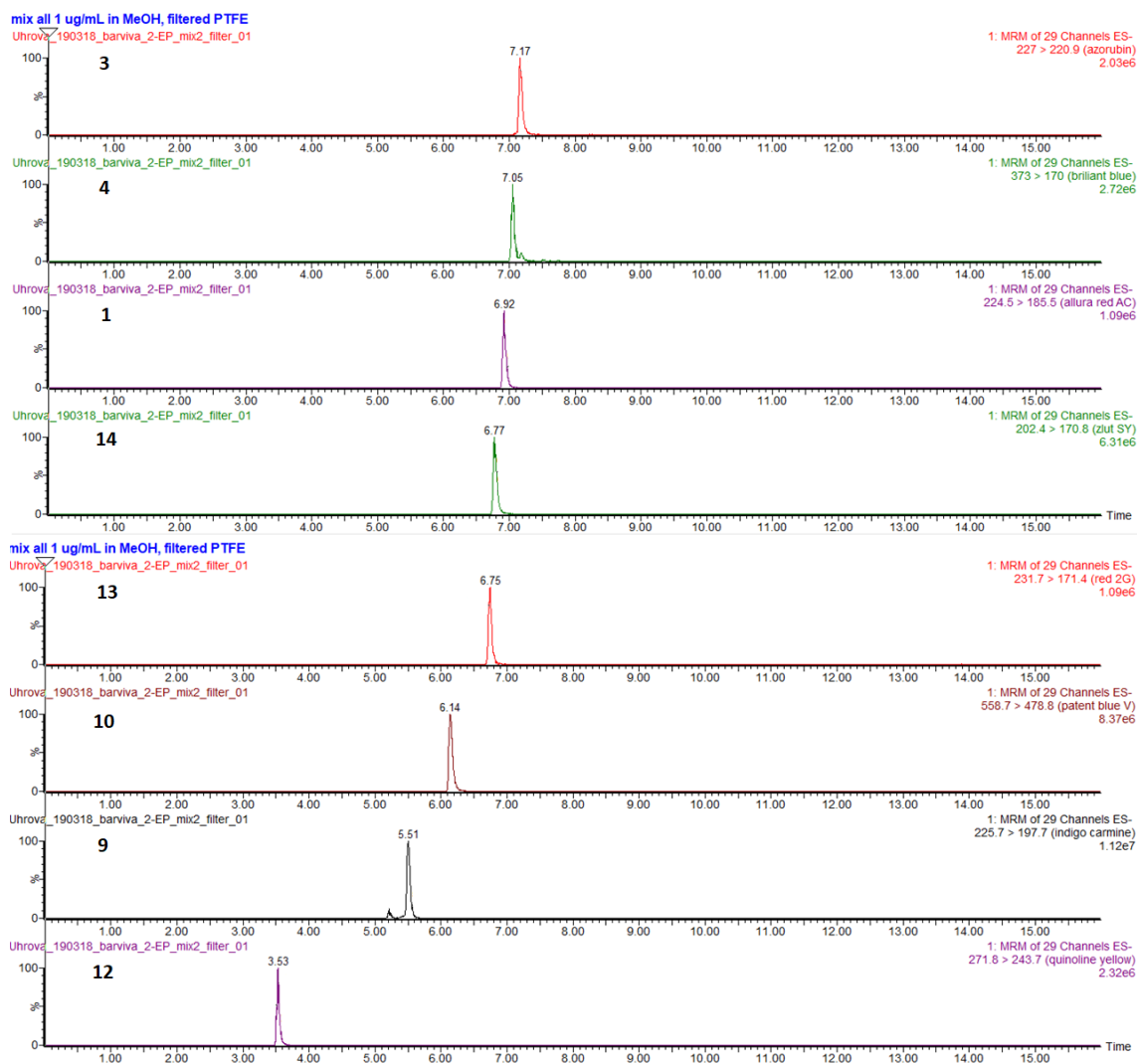
III. Výsledná separace látek

mix all 1 ug/mL in MeOH, filtered PTFE
Uhrova_190318_barviva_2-EP_mix2_filter_06



Obrázek 26: Výsledná separace standardů syntetických barviv (kolona: 2-EP, teplota kolony: 40 °C, gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 % modifikátoru, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %, průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometrie)





Obrázek 27: Chromatogramy jednotlivých standardů syntetických barviv pro zvolené SRM přechody (kolona: 2-EP, teplota kolony: 40 °C, gradient modifikátoru 10 mmol/l NH₄OH v methanolu: 0 min – 5 %, 12 min – 100 %, 14 min – 100 %, 16 min – 5 %, průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min; detekce: hmotnostní spektrometrie)

IV. Opakovatelnost retenčních časů, preciznost pro plochy píků

Tabulka 12: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy červeň allura AC a amarant

Červeň Allura AC		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	6,97	170880,1
2	6,91	162969,4
3	6,92	177054,3
4	6,90	178513,1
5	6,92	173781,3
6	6,89	186835,5
Průměr	6,91	175005,6
SD	0,01	7301,085
RSD (%)	0,14	4,17

Amarant		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	8,03	36852,0
2	8,04	37963,3
3	8,02	37144,9
4	8,03	39317,3
5	8,02	38755,6
6	8,01	39738,5
Průměr	8,03	38295,3
SD	0,01	1068,952
RSD (%)	0,12	2,79

Tabulka 13: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy azorubin a brilantní čern BN

Azorubin		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	7,17	123736,6
2	7,16	127731,7
3	7,14	129896,0
4	7,15	129564,6
5	7,15	129342,0
6	7,13	125851,5
Průměr	7,15	127687,1
SD	0,01	2240,566
RSD (%)	0,17	1,76

Brilantní čern BN		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	9,02	40920,9
2	8,96	43789,1
3	8,95	42068,6
4	8,97	43198,4
5	8,94	44494,0
6	8,93	42440,0
Průměr	8,96	42818,5
SD	0,03	1169,06
RSD (%)	0,33	2,73

Tabulka 14: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy brilantní modř FCF a erythrosin B

Brilantní modř FCF		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	7,05	145179,6
2	7,05	131449,7
3	7,04	141071,7
4	7,05	146910,9
5	7,03	162604,8
6	7,03	148147,6
Průměr	7,04	145894,1
SD	0,01	9289,478
RSD (%)	0,13	6,37

Erythrosin B		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	8,39	279287,8
2	8,38	286655,3
3	8,40	296337,5
4	8,36	291309,2
5	8,38	284262,5
6	8,38	288532,7
Průměr	8,38	287730,8
SD	0,01	5354,022
RSD (%)	0,15	1,86

Tabulka 15: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy zeleň S a indigokarmín

Zeleň S		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	8,14	60495,7
2	8,15	68115,5
3	8,14	65191,5
4	8,13	65444,0
5	8,14	66187,7
6	8,14	64479,5
Průměr	8,14	64985,7
SD	0,004	2306,12
RSD (%)	0,05	3,55

Indigokarmín		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	5,51	693346,7
2	5,50	658471,2
3	5,49	656336,3
4	5,50	659277,2
5	5,50	712922,3
6	5,49	686456,3
Průměr	5,50	677801,7
SD	0,01	21321,33
RSD (%)	0,14	3,15

Tabulka 16: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy patentní modř V a ponceau 4R

Patentní modř V			Ponceau 4R		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku	Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	6,14	692471,5	1	8,04	242439,6
2	6,15	723034,7	2	7,94	245742,3
3	6,14	724449,9	3	7,91	243415,7
4	6,15	718004,6	4	7,93	250567,0
5	6,13	720658,5	5	7,91	261366,4
6	6,15	724398,2	6	7,89	256631,4
Průměr	6,14	717169,6	Průměr	7,94	250027,1
SD	0,01	11273,28	SD	0,05	6977,682
RSD (%)	0,13	1,57	RSD (%)	0,60	2,79

Tabulka 17: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy chinolinová žlut' SS a červeň 2G

Chinolinová žlut' SS			Červeň 2G		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku	Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	3,53	100619,9	1	6,74	138513,3
2	3,52	89117,01	2	6,73	144260,3
3	3,54	82651,62	3	6,72	139198,6
4	3,53	103542,2	4	6,73	147368,6
5	3,53	103615,5	5	6,73	139884,1
6	3,54	86968,40	6	6,73	151210,3
Průměr	3,53	94419,11	Průměr	6,73	143405,9
SD	0,01	8449,397	SD	0,01	4679,452
RSD (%)	0,16	8,95	RSD (%)	0,11	3,26

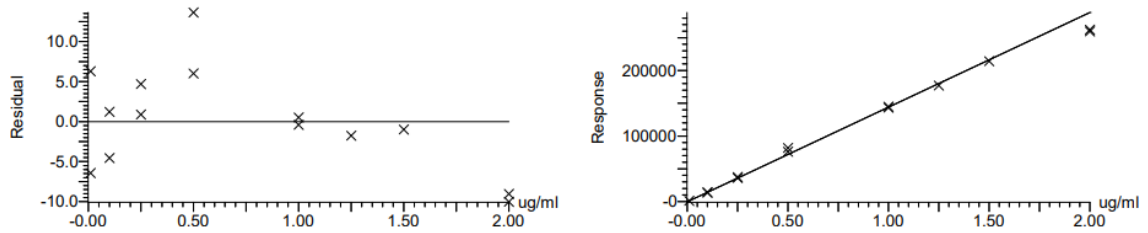
Tabulka 18: Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků pro standardy tartrazin a žluť SY

Tartrazin		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	8,07	207048,7
2	8,05	214289,7
3	8,05	213135,5
4	8,05	220152,7
5	8,04	227154,7
6	8,04	226297,1
Průměr	8,05	218013,1
SD	0,01	7241,595
RSD (%)	0,11	3,32

Žluť SY		
Číslo měření	Retenční čas	Plocha píku
1	6,77	394611,0
2	6,78	411141,6
3	6,77	439655,5
4	6,78	449290,8
5	6,77	449600,5
6	6,76	454122,7
Průměr	6,77	433070,4
SD	0,01	22296,884
RSD (%)	0,12	5,15

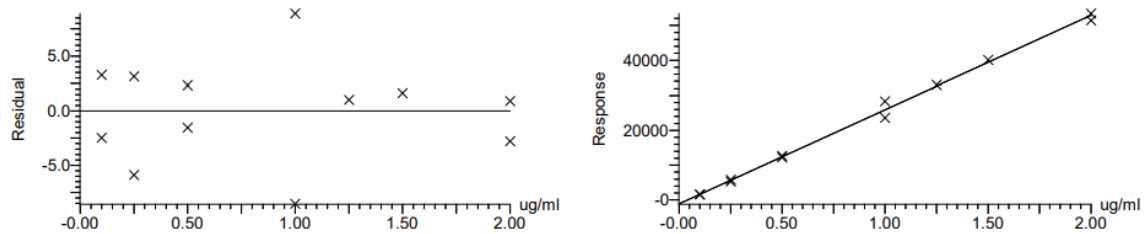
V. Kalibrační závislost

Compound name: Allura red AC
Correlation coefficient: $r = 0.997630$, $r^2 = 0.995266$
Calibration curve: $144460 * x + -370.627$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



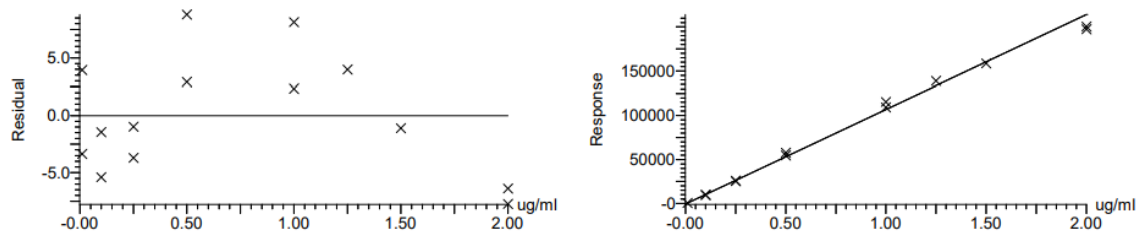
Obrázek 28: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu červeň allura AC

Compound name: Amaranth
Correlation coefficient: $r = 0.998218$, $r^2 = 0.996439$
Calibration curve: $27024.6 * x + -1112.99$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



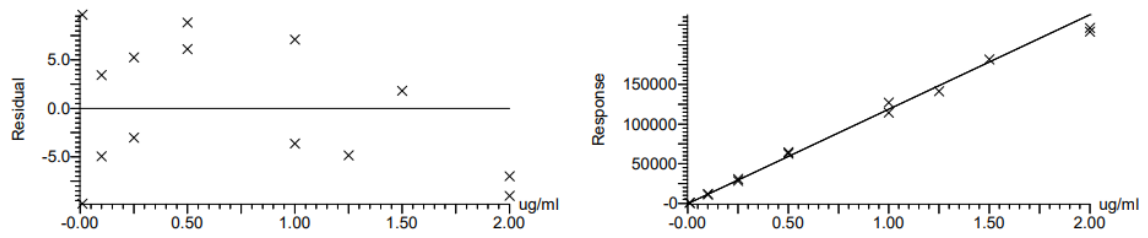
Obrázek 29: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu amarant

Compound name: Azorubine
Correlation coefficient: $r = 0.998454$, $r^2 = 0.996911$
Calibration curve: $107300 * x + -529.302$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



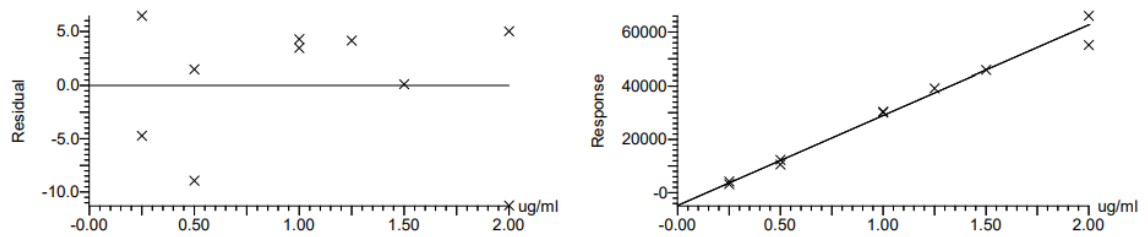
Obrázek 30: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu azorubin

Compound name: Brilliant blue FCF
 Correlation coefficient: $r = 0.997344$, $r^2 = 0.994695$
 Calibration curve: $119213 * x + -447.682$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



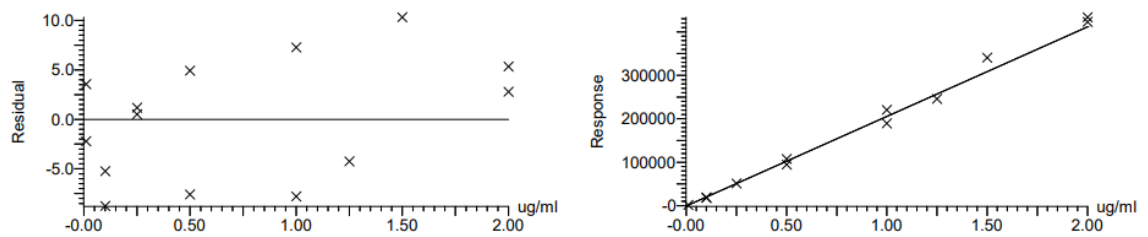
Obrázek 31: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu brilantní modř FCF

Compound name: Brillinat black BN
 Correlation coefficient: $r = 0.995461$, $r^2 = 0.990943$
 Calibration curve: $33738.1 * x + -4774.07$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



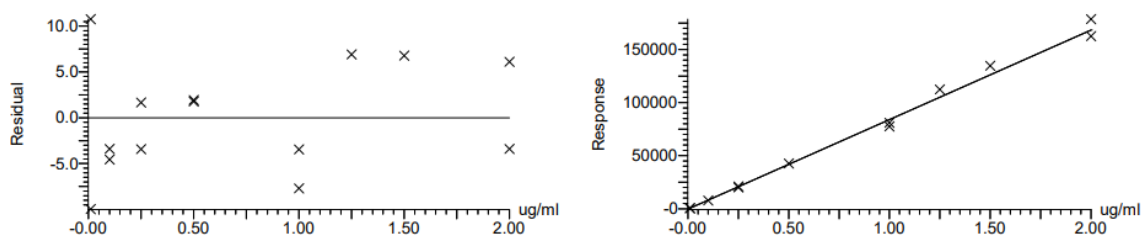
Obrázek 32: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu brilantní čern BN

Compound name: Erythrosine
 Correlation coefficient: $r = 0.997874$, $r^2 = 0.995753$
 Calibration curve: $206062 * x + -553.931$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



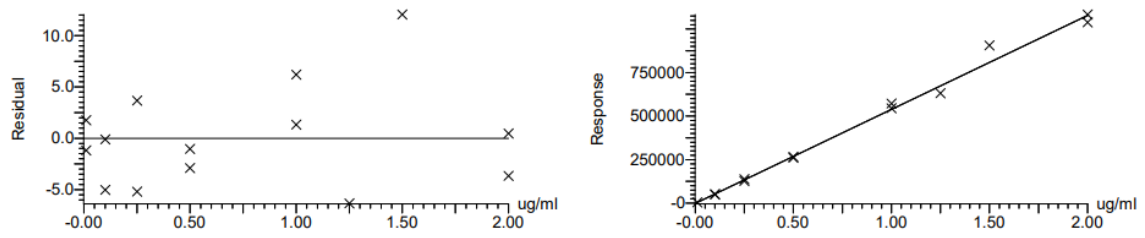
Obrázek 33: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu erythrosin B

Compound name: Green S
 Correlation coefficient: $r = 0.997862$, $r^2 = 0.995728$
 Calibration curve: $84349.3 * x + -347.165$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



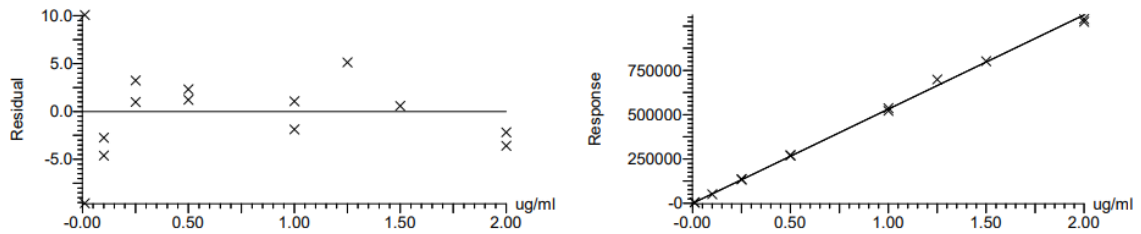
Obrázek 34: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu zeleň S

Compound name: Indigo carmine
 Correlation coefficient: $r = 0.998583$, $r^2 = 0.997169$
 Calibration curve: $539786 * x + -1244.4$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



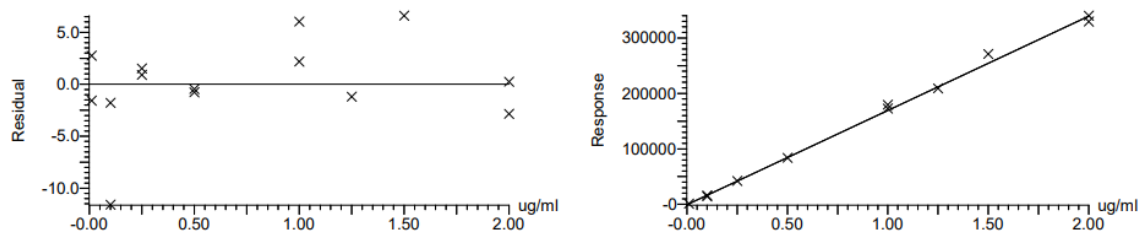
Obrázek 35: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu indigokarmín

Compound name: Patent blue V
 Correlation coefficient: $r = 0.998715$, $r^2 = 0.997431$
 Calibration curve: $531738 * x + -507.458$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



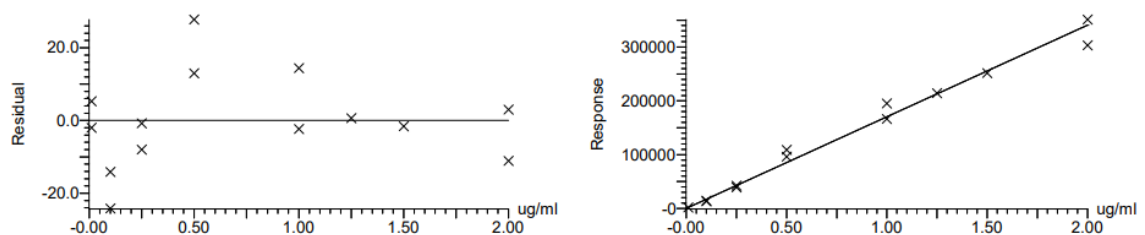
Obrázek 36: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu patentní modř V

Compound name: Ponceau 4R
 Correlation coefficient: $r = 0.998908$, $r^2 = 0.997817$
 Calibration curve: $169964 * x + -675.151$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



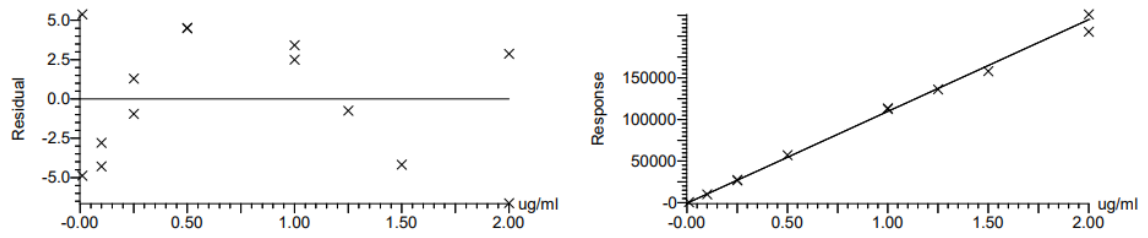
Obrázek 37: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu ponceau 4R

Compound name: Quiniline yellow
 Correlation coefficient: $r = 0.990496$, $r^2 = 0.981081$
 Calibration curve: $170357 * x + 152.814$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



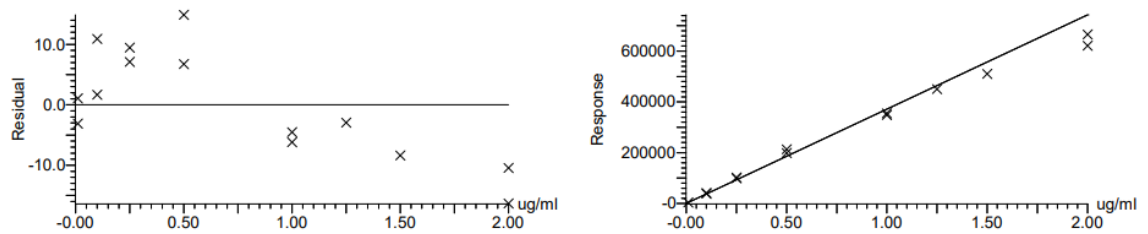
Obrázek 38: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu chinolinová žluť SS

Compound name: Red 2G
 Correlation coefficient: $r = 0.999066$, $r^2 = 0.998133$
 Calibration curve: $110257 * x + -522.208$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



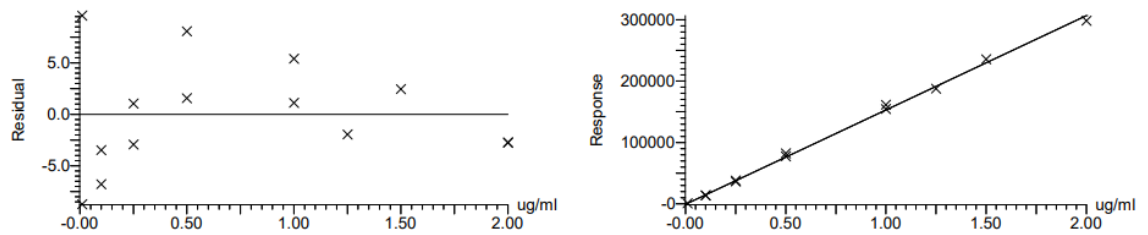
Obrázek 39: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu červeně 2G

Compound name: Sunset yellow SY
 Correlation coefficient: $r = 0.995339$, $r^2 = 0.990701$
 Calibration curve: $371233 * x + 363.936$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



Obrázek 40: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu žlutě SY

Compound name: Tartrazine
 Correlation coefficient: $r = 0.998405$, $r^2 = 0.996812$
 Calibration curve: $153662 * x + -674.336$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



Obrázek 41: Graf reziduí a kalibrační závislost standardu tartrazin