

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Analýza syntetických antioxidantů
v krmivech spojením vysokoúčinné
kapalinové chromatografie s hmotnostní
spektrometrií**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Marie Turková
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí diplomové práce:	prof. RNDr. Karel Lemr, PhD.
Konzultant:	Mgr. Lucie Hartmanová

Olomouc 2012

SOUHRN

Teoretická část diplomové práce pojednává o analýze syntetických antioxidantů v krmivech pomocí instrumentálních metod.

Syntetické antioxidanty se přidávají do krmiv a potravin za účelem prevence proti oxidaci lipidů. V nízkých dávkách působí na organismus člověka i zvířete pozitivně, avšak ve větších dávkách mají negativní dopad na zdraví. Mohou mít karcinogenní, teratogenní, mutagenní účinky. Jedná se o aditivní látky, jejichž užívání se řídí legislativou. Obsah aditivních látek je jedním z aspektů kvality potravin a krmiv. Kvalita společně s bezpečností je základním požadavkem na potraviny a krmiva. Bezpečnost je regulována legislativou, která ale dostatečně neřeší kvalitu produktu. Této absenci v zákoně využívají výrobci a za účelem vidiny vyššího zisku často klamou spotřebitele tím, že chybně uvádějí obsah deklarovaných složek nebo nahrazují dražší komponenty za levnější. Nástrojem pro určení kvality výrobků je chemická a senzorická analýza.

Praktická část této práce se věnuje nalezení vhodných separačních podmínek pro analýzu šesti syntetických antioxidantů, povolených při výrobě krmiv, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí, resp. ve spojení s hmotnostní spektrometrií. UV detekce byla využita pro kvantifikaci a MS detekce pro identifikaci. Zvolené chromatografické podmínky dovolují separovat všech šest antioxidantů na základní linii. Metoda na reálném vzorku ukázala možnost identifikace látek (prokázána přítomnost čtyř ze šesti antioxidantů) a kvantifikace BHA.

SUMMARY

The theoretical part of the thesis deals with the analysis of synthetic antioxidants in animal feed using instrumental methods.

Synthetic antioxidants are added to the animal feed and food in order to prevent lipids oxidation. Low doses of synthetic antioxidants have a positive impact on human and animal organisms. However, larger doses may have a negative impact on health. There might be carcinogenic, teratogenic or mutagenic effects. Use of such additives is governed by legislation. The substance of additives is the quality indicators of food and animal feed. Quality and health safety are basic requirements for food and animal feed. Safety is regulated by legislation, but that does not sufficiently address the quality of the product (the use of

synthetic and natural antioxidants). Unfortunately this absence in the legislation is misused by manufacturers in order to increase their profits. The consumers might often be misled by wrongly declared list of substances. Manufactures might also replace more expensive ingredients for cheaper components in order to generate more revenues. The tool for determining product's quality is the chemical and sensory analysis.

The content part of this thesis is devoted to find suitable separation conditions for analysis of six synthetic antioxidants which are permitted in animal feed, using high performance liquid chromatography with UV detection in conjunction with mass spectrometry. UV detection was used for quantification whereas mass spectrometric detection was used for identification. The selected chromatographic conditions allow separation of all six antioxidants on baseline. The real sample analysis has confirmed the possibility of substances identification (the presence of four out of the six antioxidants has been demonstrated) and quantification of BHA.

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracovala samostatně. Veškerá použitá literatura je uvedena v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezentačně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Vlastnoruční podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Karlu Lemrovi, PhD. za cenné rady, připomínky a trpělivost. Velký dík patří také Mgr. Lucii Hartmanové za ochotu a čas, který mi věnovala při experimentech a konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům a studentům Katedry analytické chemie za ochotu a vstřícnost.

OBSAH

OBSAH	
1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 ANALÝZA POTRAVIN A KRMIV	2
2.1.1 FALŠOVÁNÍ POTRAVIN A METODY ODHALENÍ.....	3
2.2 ANTIOXIDANTY.....	7
2.2.1 AUTOOXIDACE LIPIDŮ.....	8
2.2.2 MECHANIZMUS ÚČINKU ANTIOXIDANTŮ	9
2.2.3 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ.....	11
2.2.4 SYNTETICKÉ ANTIOXIDANTY	11
2.2.5 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH ANTIOXIDANTŮ	13
2.2.6 STANOVENÍ VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH ANTIOXIDANTŮ	16
2.2.7 STANOVENÍ VYBRANÝCH ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE VE SPOJENÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ.....	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky.....	26
3.2 Pracovní postup	27
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5. ZÁVĚR.....	43
6. LITERATURA	44
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48

1. ÚVOD

Syntetické antioxidanty jsou do krmiv přidávány k prevenci proti oxidaci tuků, která znehodnocuje kvalitu krmiva. Jejich užívání je ovšem omezeno legislativou, která upravuje jejich maximální přípustné limity. Je proto nutné provádět monitoring těchto antioxidantů v krmivech. Jejich nadbytečné množství má negativní účinky na zdraví. Prokázány jsou karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky a také toxicita pro reprodukční systém. O jejich přítomnosti a obsahu by měli být spotřebitelé informováni, avšak v současné době nejsou výrobci povinni uvádět detailní informace pro tyto látky na etiketách krmiv. Legislativa jim ukládá povinnost uvádět pouze deklarované složky, mezi které patří dusíkaté látky, tuky, vláknina, popel a u krmiv pro hospodářská zvířata lysin a methionin a u krmiv pro ryby fosfor.

Legislativa povoluje šest syntetických antioxidantů, tři estery kyseliny galové, butylhydroxyanizol, butylhydroxytoluen a ethoxychin, který se od ostatních liší svými chemickými vlastnostmi. Proto bývá analyzován zvlášť. Publikované metody pro stanovení jednotlivých antioxidantů existují, avšak nebyla popsána metoda pro jejich současnou analýzu v krmivech.

Cílem této diplomové práce je vyvinout metodu s účinnou separací syntetických antioxidantů vyskytujících se v krmivech pro psy. Mezi požadavky kladené na novou metodu patřila separace všech šesti látek na základní linii a krátká doba analýzy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ANALÝZA POTRAVIN A KRMIV

Primárním požadavkem na potraviny a krmiva je jejich bezpečnost a zdravotní nezávadnost, ty jsou upravovány legislativou, která definuje fyzikální (ionizující záření a kontaminace potravin radionuklidy), chemická (přítomnost mykotoxinů, těžkých kovů, reziduí pesticidů, atd.) a biologická (viry a bakterie) rizika. Také reguluje přidávání pomocných látek (antioxidantů, konzervantů, stabilizátorů, emulgátorů, barviv, pojiv, vitamínů a dalších) a stanovuje jejich maximální přípustné limity. Řídí také přidávání antibiotik do krmiv a používání geneticky modifikovaných organismů.¹

V současné době je kladen důraz i na kvalitu, se kterou je úzce spjato falšování potravin a krmiv. Zákon č.110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích ani zákon č. 91/1996 Sb, o krmivech, pojem falšování nezahrnuje.² Těto absence v zákoně využívají výrobci a za účelem vidiny vyššího zisku často klamou spotřebitele tím, že chybně uvádějí obsah deklarovaných složek nebo nahrazují dražší komponenty za levnější.³ Ne vždy se výrobci dopouštějí podvodu. Často uvádějí pravé složení výrobku a dávají tak spotřebiteli možnost volby. To je demonstrováno na obrázku 1, na kterém je ukázka etikety šunky obsahující 90 % masa a šunky, ve které je maso zastoupeno pouhými 56 %, zbytek je tvořen nutričně chudými komponentami, vodou a škrobem.

Určit kvalitu potravin a krmiv lze na základě kontroly složek deklarovaných výrobcem, určení množství použitých aditiv a původu surovin, ze kterých jsou vyrobeny, a na základě podrobení produktu senzoričké analýze.



Obr. 1 Etikety šunek různé kvality

2.1.1 FALŠOVÁNÍ POTRAVIN A METODY ODHALENÍ

Významnou cestou k odhalení pravosti produktů je sledování obsahu a původu proteinové složky. V krmivech pro psy jsou živočišné zdroje bílkovin nahrazovány alternativními, levnějšími surovinami, např. sójou, kostní moučkou nebo kukuřičným lepem, které jsou pro psy nestravitelné a nutričně bezvýznamné.⁴ U masných produktů dochází k případům, kdy jsou zaměňovány druhy masa, ze kterých jsou vyrobeny. V mléčných výrobcích, např. ovčích sýrech nebo mozzarella, vyráběné z buvolího mléka, jsou dražší mléka nahrazována levnějším kravským mlékem.² Bílkoviny a peptidy jsou často pro posouzení kvalitativních vlastností potravin a krmiv klíčovými.

K odhalení falšování proteinové složky jsou využívány metody založené na analýze DNA, jako polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo polymorfismus délek restričních fragmentů (RFPL). Uplatnění také nachází imunoanalytické metody, např. ELISA (z anglického *enzyme-linked immuno sorbent assay*), hybridizační a elektroforetické metody.⁵

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s kationovou výměnou lze na základě detekce dipeptidů karnosinu a anserinu, které jsou specifickými markery živočišných bílkovin, získat informaci o původu (živočišném druhu) bílkovin.⁶

Významným nástrojem k identifikaci proteinů je hmotnostní spektrometrie. K tomuto účelu jsou využívány ionizační techniky elektrosprej (ESI) a desorpční ionizace laserem za asistence matrice (MALDI). Z hmotnostních analyzátorů jsou využívány levnější techniky jako kvadrupól, iontová past, průletový analyzátor (TOF) ale i dražší iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR).⁷ Spojením kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s nanoelektrosprejem a iontovou pastí (nanoLC-MS/MS) byly monitorovány sójové proteiny v masných výrobcích.⁸ Charakteristickým markerem pro sójové proteiny je glycinin A. Příkladem aplikace ESI – MS je identifikace ovčí bílkoviny na základě analýzy kaseinů.⁹ Metodou MALDI-TOF byla sledována např. přítomnost α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu poukazujících na přítomnost kravského mléka v nezpracovaném ovčím a buvolím mléce.¹⁰ Technika MALDI-TOF-MS byla také použita k odhalení melaminu v potravinách a krmivech.¹¹ Obsah bílkovin bývá odvozen z výsledků stanovení dusíku Kjeldahlizací. Látkami obsahujícími vysoký podíl dusíku je možné zkreslit (zvýšit) obsah bílkovin a zamaskovat tak jejich nedostatek. Takovou látkou je i životu nebezpečný melamin. Nebezpečí používání této látky spočívá v jeho schopnosti tvořit komplexy s kyselinou močovou a kyselinou kyanurovou. Tyto komplexy krystalizují a mají na svědomí selhání ledvin. V roce 2004 a 2007 bylo evidováno hromadné umírání psů a koček na selhání ledvin v důsledku přidání melaminu do krmiv pro domácí zvířata. V roce 2008 došlo v Číně k otravě tisíců kojenců díky kontaminaci kojenecké výživy touto látkou.^{11,12}

Předmětem falšování jsou také sacharidové složky. Směsici sacharidů je například med. V České republice je zakázána jakákoliv úprava této suroviny. Na trhu jsou ale dostupné medy z dovozu, jejichž kvalita je znehodnocena ředěním cukernými sirupy, přídavkem umělých sladidel nebo cukrů, které nejsou přirozenou součástí medu. Nejčastěji jsou přidávány kukuřičný sirup, obsahující vysoký podíl fruktosy, škrobový sirup, třtinový, řepný nebo glukózový cukr.² Informaci o biologickém původu medu lze získat stanovením kyseliny abscisové, flavonoidů a fenolových látek pomocí HPLC. Tyto látky tvoří charakteristický profil medu z daného druhu rostlin.¹³

Sledován je také obsah 5-hydroxymethylfurfuralu. Jeho vysoká koncentrace v medu poukazuje na tepelné zpracování nebo dlouhodobé skladování.¹⁴ Rychlou metodou ke stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu v medu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC) s UV nebo fluorescenční detekcí nebo ve spojení s hmotnostním

spektrometrem.¹⁵ Použit lze také HPLC v systému reverzních fází¹⁶ nebo spektrofotometrii v ultrafialové oblasti spektra.¹⁷ Dalším nástrojem k odhalení pančování medu je posouzení izotopového poměru uhlíku ^{12}C a ^{13}C , který je pro danou rostlinu charakteristický. Pro medonosné rostliny je hodnota poměru ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) $\delta^{13} = -22$ až -33 ‰. Med s hodnotou vyšší než $-23,5$ ‰ je považován za pančovaný. Vztah mezi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) a δ^{13} vystihuje rovnice (I).²

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [\text{R}_{\text{vzorku}}/\text{R}_{\text{standardu}} - 1] \cdot 10^3, \quad \text{kde } \text{R} = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \quad (\text{I})$$

Nástrojem ke zjištění izotopového poměru uhlíku může být IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry), tj. hmotnostní spektrometrie na speciálním přístroji, který dovoluje měřit s potřebnou přesností poměry intenzit izotopů.¹⁸

V medu je také nežádoucí obsah exotických pylů, které mohou být spouštěčem alergických reakcí.³ K ověření geografického původu medu lze využít např. nukleární magnetickou resonanci (NMR).¹⁹

2.1.3 SENZORICKÁ ANALÝZA

Senzorická analýza je disciplína zabývající se posuzováním organoleptických, tj. na lidské receptory působících, vlastností potravin a krmiv pomocí lidských smyslů.^{20,21}

Chuťovými smysly je vnímána chuť sladká podávající informaci o zdroji sacharidů, slaná poukazující na přítomnost anorganických solí, dále chuť hořká, kyselá, alkalická, kovová, trpká, svíravá a chuť umami, která je vyvolávána bílkovinnými zdroji. Pomocí chuťových buněk je také vnímána palčivost, která je známa např. u alkoholu, a štiplavost vyvolávanou např. křenem nebo ředkvičkami.^{20,21}

Čichovými smysly jsou vnímány vůně, pachy a aroma, které jsou zpravidla způsobeny lipofilními těkavými látkami s relativní molekulovou hmotností do 300. Jedná se o karbonylové sloučeniny, alkoholy, ethery, kyseliny, estery a další. V souvislosti s čichem se můžeme setkat s termínem „buket“ vystihující charakteristické aroma, např. vína. Stejně jako chutí, je čichem rozeznávána palčivost a štiplavost.^{20,21}

Zrakem jsou posuzovány vnější vlastnosti, především barva, barevný tón, nasycení, tj. čistota barvy, průhlednost, průsvitnost, opacita, lesk a textura. Pod pojmem textura se

skrývají mechanické, geometrické a povrchové vlastnosti. K mechanickým vlastnostem patří tvrdost, soudržnost, přilnavost, elasticita, viskozita a konzistence. Geometrickými vlastnostmi se rozumí velikost, tvar, granulace a prostorové uspořádání částic. K fyzikálním vlastnostem se řadí vlhkost a tučnost, které jsou vnímány ústy. Sluch má v potravinářství význam zejména u hodnocení fyzikálních vlastností a textury křehkých a křupavých potravin. K senzorické analýze se využívají také smysly taktilní, neboli dotykové, zprostředkované mechanoreceptory, termoreceptory a nocisenzory, tj. receptory pro bolest lokalizované v kůži. Tyto smysly společně se smysly kinestetickými, tedy pohybovými, podávají informace zejména o textuře.^{20,21} Senzorickou analýzu mohou vykonávat pouze odborně vyškolené osoby. Význam této disciplíny díky vzrůstajícímu zájmu spotřebitele o kvalitu v posledních letech výrazně vrostl a stále se vyvíjí. Současným trendem je zavádění instrumentálních metod do senzorické analýzy. V praxi jsou běžně využívány spektrofotometry a kolorimetry k hodnocení barvy. Využívány jsou také elektronické rukavice vyhodnocující tlak, pružnost a jiné texturní znaky.²⁰ Elektronický nos fungující na principu několika elektrochemických senzorů nebo biosenzorů, je schopný na základě tzv. otisku vůně posoudit trvanlivost potraviny nebo identifikovat původ, což může nacházet uplatnění při odhalování falšování potravin.²⁰ Byl aplikován např. k posouzení mikrobiální kontaminace potravin,²² k monitoringu jakosti olejů v průběhu tepelného zpracování potravin,¹⁹ hodnocení kvality krmiv²³ a vína²⁴. Elektronický jazyk nachází uplatnění v kontrole kvality kapalných vzorků, aplikován byl například na rychlé posouzení chuti a vůně piva,²⁵ bílého vína,²⁶ džusů²⁷ nebo monitoringu znečištění vod.¹⁹ Kromě potravinářského průmyslu nachází senzorická analýza uplatnění např. v kosmetice, v textilním průmyslu a kontrole kvality ovzduší, v rámci Evropské unie je povinnou součástí kontroly pitné vody.¹⁹

2.2 ANTIOXIDANTY

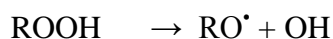
V širším slova smyslu se jako antioxidanty označují látky, které mají schopnost potlačovat tvorbu a účinky volných radikálů majících negativní vliv na zdraví jedince. Volné radikály mohou mít endogenní či exogenní původ. V těle organismu vznikají během některých enzymatických reakcí nebo mohou být produkty buněčného dýchání. Takto vzniklé volné radikály je tělo schopné eliminovat vlastním antioxidačním systémem. Organismy jsou ovšem nadměrně vystavovány vlivům volných radikálů i z exogenních zdrojů, kterými jsou např. výfukové plyny, toxiny z životního prostředí, ionizující záření mající průmyslový nebo kosmický původ a UV záření. Vysoké hladiny volných radikálů nejsou organismy schopny eliminovat. To má za následek poškození tkání a tedy negativní dopad na jejich zdraví. Proto je nutné přijímat antioxidanty formou potravy.^{28,29} Hlavními zdroji antioxidantů jsou byliny, obiloviny, olejniny a luštěniny. Obsaženy jsou také v zelenině a ovoci.³⁰ V průmyslově zpracovávaných potravinách (krmivech) se ovšem nacházejí i antioxidanty, které nejsou jejich přirozenou součástí. Některé se do potravin (krmiv) přidávají cíleně za účelem zamezení či oddálení znehodnocení potravin autooxidačními procesy lipidů. Z velké části se jedná o průmyslově vyráběné syntetické antioxidanty. Z přírodních antioxidantů je povoleno užívání tokoferolů jako potravinářských aditiv, ale i ty jsou ve většině případů přidávány v syntetické formě.³¹ Používání antioxidantů jako potravinářských aditiv je upraveno legislativou.

2.2.1 AUTOOXIDACE LIPIDŮ

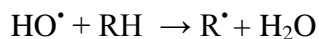
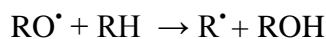
K autooxidaci lipidů dochází vlivem působení vzdušného kyslíku na mastné kyseliny, které jsou nejvýznamnější složkou všech lipidů. Podle stupně nasycenosti se mastné kyseliny rozdělují na nasycené a nenasycené. Nasycené neobsahují žádnou dvojnou vazbu, nenasycené obsahují jednu (monoenuové mastné kyseliny) nebo více (polyenuové mastné kyseliny) dvojných vazeb. K oxidaci nenasycených mastných kyselin dochází již při laboratorní teplotě, zatímco nasycené mastné kyseliny oxidují pouze při vyšších teplotách.³²

Autooxidace je radikálová řetězová reakce probíhající ve třech fázích.^{31,32,33} V iniciační fázi (II) reagují molekuly mastných kyselin se vzdušným kyslíkem za vzniku hydroperoxidů, které se díky své nízké stabilitě rozkládají na alkoxylové (RO^\bullet) a hydroperoxidové (ROO^\bullet) radikály. Ty v průběhu propagace (III) odštěpují vodík z molekul mastných kyselin a mění je na radikálovou formu. Během terminace (IV) je radikálová řetězová reakce ukončena vznikem neradikálových produktů, zejména aldehydů, které jsou příčinou žluknutí tuků. To se může projevit vznikem nepříjemného zápachu, zhoršením chuti a tedy snížením kvality dané potraviny (krmiva), která se může stát pro konzumenta zdraví škodlivou, protože produkty autooxidace lipidů mohou mít toxické vlastnosti. Na autooxidaci lipidů působí katalyticky přítomnost kovů, volných radikálů, působení světla, tepla, enzymů a činnost mikroorganismů.^{31,33,34}

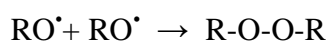
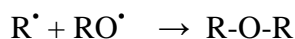
Iniciace:



Propagace: (III)



Terminace: (IV)



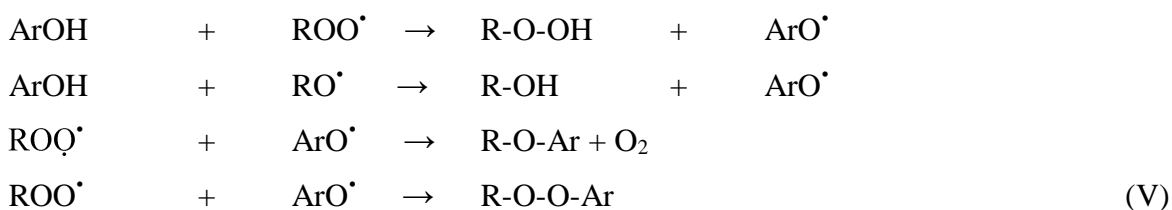
Autooxidaci lipidů lze předcházet použitím antioxidantů. Funkce antioxidantů je založena na různých mechanismech.

2.2.2 MECHANIZMUS ÚČINKU ANTIOXIDANTŮ

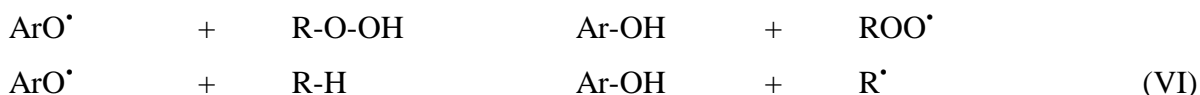
Podle mechanismu účinku antioxidantů se antioxidanty dělí na primární a sekundární, mezi nimiž neexistuje ostrá hranice, protože řada antioxidantů může působit více než jedním mechanismem. V praxi se často přistupuje ke kombinování antioxidantů, vykazujících synergismus, tj. mající stejný nebo podobný účinek, za účelem zvýšení antioxidační aktivity. U všech antioxidantů dochází během procesu oxidace tuků a olejů k degradaci, při které se vytváří řada produktů, které si ponechávají část antioxidačních účinků.^{31,33}

Primární antioxidanty

Primární antioxidanty přeměňují volné radikály na stabilní molekuly podle schématu (V). Mezi molekulami antioxidantů a lipidy dochází ke kompetitivní reakci s hydroperoxidovými ROO[•] nebo alkoxylovými RO[•] radikály. Antioxidanty vykazují k volným radikálům vyšší afinitu než lipidy. Proto volné radikály reagují přednostně s antioxidanty, které jim předávají vodíkový radikál za vzniku radikálu antioxidantu. Ten je díky delokalizaci nepárového elektronu v systému aromatického jádra stabilní, a tudíž nepokračuje v řetězové reakci. Ukončuje ji vytvořením neradikálových produktů interakcí s volnými radikály.^{31,33}



Při vysokých koncentracích antioxidantů fenoxylové radikály ArO[•] mohou přispívat ke štěpení dalších molekul a působit jako prooxidant (schéma VI):



Typickými zástupci primárních antioxidantů jsou butylhydroxyanizol, butylhydroxytoluen, tokoferoly aj.^{31,33}

Sekundární antioxidanty

Sekundární antioxidanty brání oxidaci lipidů tvorbou komplexů s katalyticky působícími kovy,³⁵ eliminací vlivu vzdušného kyslíku, redukcí různých typů radikálů nebo absorpcí UV záření.^{31,33}

V tucích jsou přítomna stopová množství vícemocných kationtů kovů, např. Cu, Co, Fe nebo Mn, které pocházejí z přírodních zdrojů nebo inkluují během procesů zpracování. Ty působí jako katalyzátory při rozkladu hydroperoxidu podle následujícího schématu (VII):³⁵

1) Rozklad hydroperoxidu za vzniku peroxy a alkoxy radikálu:



2) Tvorba alkyl radikálu reakcí s molekulou tuku:



3) Interakce s molekulárním kyslíkem za vzniku singletového kyslíku:



Antioxidanty deaktivují tyto kovy tvorbou chelátů, čímž dochází ke sterické zábraně interakce mezi kovy a lipidy nebo oxidačními meziprodukty, např. peroxidy. To má za následek snížení katalytické aktivity kovu. Vhodné jsou látky, které tvoří s ionty kovu σ -vazbu, např. kyselina citronová, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a deriváty kyseliny fosforečné, které se běžně používají k prodlužování trvanlivosti potravin obsahujících tuky. Látky tvořící π -komplexy, např. komponenty s heterocyklickým základem, urychlují oxidaci lipidů a působí jako prooxidanty. Účinnost chelatačního činidla je závislá na pH a přítomnosti jiných iontů, například Ca^{2+} .^{33,35}

Oxidace lipidů je iniciována nejen molekulovým kyslíkem, ale i jeho jinými formami. Superoxidový anion O_2^- a peroxidy nereagují přímo s lipidy. Primárně reagují s kovy nebo kyslíkem. O_2^- vzniká přijetím elektronu molekulou O_2 . Podílí se na oxidačních reakcích tím, že podporuje uvolňování kovů navázaných na proteiny. Takto funguje např. enzym glukosoxidasa, která se v kombinaci s katalázou komerčně používá k odstranění O_2 z potravin, nebo glutathionperoxidasa, nacházející se v mnoha biologických tkáních. Tyto

enzymy pomáhají redukovat různé typy radikálů, které mohou vznikat v tucích obsažených v biologických systémech.³³

2.2.3 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ

Antioxidanty se člení dle původu na přírodní a syntetické. Přírodní antioxidanty jsou součástí tuků a olejů. Obsaženy jsou také v řadě rostlin, zvláště v bylinách a koření, např. rozmarýnu, šalvěji, oregánu a dalších, které se již po staletí užívají k prodloužení trvanlivosti potravin. Přírodní antioxidanty se dále dělí podle struktury na jednoduché fenoly, fenolové kyseliny, kurkuminoidy, diterpeny a chinoidy, triterpeny a steroly, flavonoidy a další.^{30,32,33}

Syntetické antioxidanty jsou zpravidla fenolové látky, které jsou substituovány v para-poloze alkylovými skupinami, čímž dochází ke zlepšení jejich rozpustnosti v tucích, zvýšení antioxidační aktivity a snížení toxicity.

Existuje mnoho publikací, které vyzdvihují blahodárné účinky přírodních antioxidantů, z čehož vyplývá předpoklad, že výrobci budou upřednostňovat jejich používání před syntetickými. Ty jsou však v prevenci proti oxidaci tuků efektivnější a cenově výhodnější.³⁶ Proto jsou preferovány.

2.2.4 SYNTETICKÉ ANTIOXIDANTY

Používání syntetických antioxidantů je v řadě zemí regulováno právními předpisy, které stanovují, jaké antioxidanty a v jakém množství mohou být do potravin a krmiv přidávány.

Pro potraviny platí v rámci Evropské unie Nařízení 1333/2008/ES,³⁷ v České republice Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.³⁸

Oblast výroby krmiv se řídí podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003, o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat³⁹ a Vyhláška č. 356/2008 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech.⁴⁰

Pro výrobu krmiv jsou v České republice schválena aditiva E 300 – E 312, Evropská

unie navíc povoluje užívání E 320, E 321 a E 324 (tabulka I). V potravinách mohou být obsaženy antioxidanty E 300 – E 312 a E 315, E 316, E 319 a E 586.³⁷⁻⁴⁰

Tabulka I Povolené syntetické antioxidanty ve výrobě potravin a krmiv

Č. EU	Doplňková látka	Sumární vzorec
E 300	Kyselina L-askorbová	$C_6H_8O_6$
E 301	L-askorbát sodný	$C_6H_7O_6Na$
E 302	L-askorbát vápenatý	$(C_6H_7O_6)Ca \cdot 2H_2O$
E 303	5,6-di-o-acetyl- L-askorbová kyselina	$C_{10}H_{12}O_8$
E 304	Kyselina 6- palmitoyl-L-askorbová	$C_{22}H_{37}O_7$
E 307	Syntetický alfatokoferol	$C_{29}H_{50}O_2$
E 308	Syntetický gamatokoferol	$C_{28}H_{48}O_2$
E 309	Syntetický deltatokoferol	$C_{27}H_{46}O_2$
E 310	Propylgalát	$C_{10}H_{12}O_5$
E 311	Oktylgalát	$C_{15}H_{22}O_5$
E 312	Laurylgalát	$C_{19}H_{30}O_5$
E 315	Kyselina erythorbová (synonymum: kys. isoaskorbová)	$C_6H_8O_6$
E316	Erythorban sodný (synonymum: isoaskorbát sodný)	$C_6H_7O_6Na \cdot H_2O$
E 319	Terciární butyl-hydrochinon (TBHQ)	$C_{10}H_{14}O_2$
E 320	Butylhydroxyanisol (BHA)	$C_{11}H_{16}O_2$
E 321	Butylhydroxytoluen (BHT)	$C_{15}H_{24}O$
E 324	Ethoxychin	$C_{14}H_{19}NO$
E 586	4-hexylresorcinol	$C_{18}H_{12}O_2$

Na obalech krmiv často není uvedeno, jaké antioxidanty a jaké množství krmivo obsahuje. Dostupná je pouze informace: „Obsahuje antioxidanty povolené EU“ (viz obr. 2). Výrobci jsou zavázáni uvádět pouze obsah povinně deklarovaných složek, tj. dusíkatých látek, tuku, vlákniny a popela, u krmiv pro hospodářská zvířata navíc lysin a methionin au krmiv pro ryby fosfor.⁴⁰

CZ		Hypoalergenní kompletní krmivo pro staré psy - seniory	
Složení: drůbeží maso a produkty drůbežního původu (>25 %), rýže, kukuřice, drůbeží tuk, sušená jablka, kukuřičný gluten, drůbeží hydrolyzovaný protein, přírodní chuť, lososový olej, pivovarské kvasnice, minerální látky, DL-methionin, L-lysin, prebiotika (mannan-oligosacharidy, frukto-oligosacharidy), glukosamin hydrochlorid, chondroitin sulfát, chelátová měď, chelátový zinek, organický selen, extrakt z juky.			
Pokyny pro krmení: Krmivo podávejte suché nebo zvlhčené. Při podávání je nutno zajistit přístup psa k nezávadné vodě. Denní dávka se bude měnit podle věku, výkonu, kondice a ročních období. Doporučená denní dávka je uvedena v krmné tabulce.			
Deklarované jakostní znaky v 1 kg			
dusíkaté látky	26,0 %	vitamin B ₆	4,4 mg
tuk	11,0 %	vitamin B ₁₂	0,05 mg
popel	6,0 %	niacinamid	22 mg
vláknina	2,5 %	pantothenan vápenatý	11 mg
vlhkost	10,0 %	biotin	0,66 mg
vápník	1,3 %	kyselina listová	0,55 mg
fosfor	0,9 %	cholinchlorid	1 250 mg
Aditiva v 1 kg:		zinek (Zn)	90 mg
měď (Cu)	8 mg	železo (Fe)	78 mg
vitamin A	16 500 m.j.	mangan (Mn)	39 mg
vitamin D ₃	1 650 m.j.	jod (I)	0,7 mg
vitamin E (alfatokoferol)	300 mg	kobalt (Co)	0,44 mg
glukosamin hydrochlorid	450 mg	selen (Se)	0,19 mg
chondroitin sulfát	250 mg	DL-methionin	2 500 mg
vitamin B ₁	4,4 mg	L-lysin	1 600 mg
vitamin B ₂	5,5 mg		
Spotřebujte nejpozději do data uvedeného na obalu. Skladujte v suchu a chladu.			
Obsahuje EU povolené antioxidanty. Hmotnost: 15 kg.			
Výrobce: NOVIKO s.r.o., Palackého třída 163, 612 00 Brno, tel.: +420 541 426 311-5, fax: +420 541 426 323, e-mail: calibra@calibra-krmivo.cz, www.calibra-krmivo.cz, r.č.: CZ 800391-01			

Obr. 2 Etiketa z krmiva pro psy

2.2.5 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH ANTIOXIDANTŮ

BHA

Butylhydroxyanizol je voskovitá pevná látka bílé až světle žluté barvy snadno rozpustná v ethanolu, methanolu, petroletheru, propylenglykolu, tucích a olejích, nerozpustná ve vodě. Komerčně dostupný butylhydroxyanizol je směsí dvou izomerů, 2-terc-butyl-4-hydroxyanizolu a 3-terc-butyl-4-hydroxyanizolu (obr. 3). Z 90% a více je zatoupen 3-terc-butyl-4-hydroxyanizol, který má vyšší antioxidační aktivitu.^{30,31,33}

Používá se ke stabilizaci jedlých tuků a olejů, masa, obilí, výrobků z brambor, pečiva, ořechů, žvýkaček a nápojů. Také se nachází v obalových materiálech, odkud může díky svým

lipofilním vlastnostem přecházet do potravin. Uplatňuje se též v kosmetice, farmacii a při výrobě syntetických kaučuků a ropných produktů.

Degradací BHA vznikají produkty 2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethoxy-3,3'-diterc-butylbiphenyl a 2',3-di-terc-butyl-2-hydroxy-4',5-dimethoxydiphenylether.^{30,31,33}



Obr. 3 Strukturální vzorce izomerů BHA:

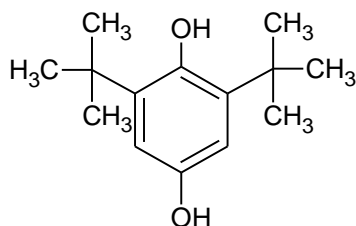
(A) 2-terc.butyl-4-hydroxyanizol

(B) 3-terc.butyl-4-hydroxyanizol

BHT

Systematický název této bílé až světle žluté krystalické látky se slabým fenolovým zápachem, rozpustné v methanolu, ethanolu, toluenu, acetonu, benzenu, isopropanolu, glycerolu, propylenglykolu a olejích a tucích, je 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen. (obr. 4).^{30,31,33}

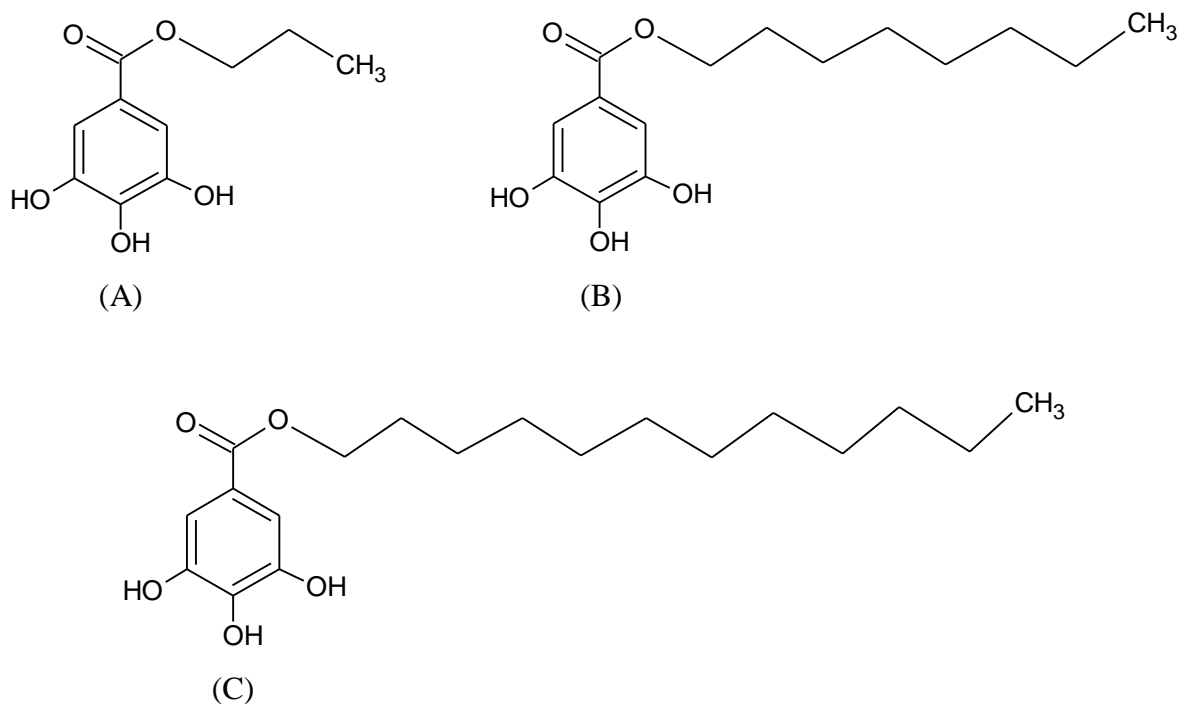
Butylhydroxytoluen se využívá ve stejných oblastech jako BHA, s nímž působí synergicky. Produkty degradace BHT jsou 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxybenzaldehyd; 2,6-di-terc-butylbenzochinon; 3,3',5,5'-tetra-terc-butyl-stilbenchinon; 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxybenzylalkohol a 3,3',5,5'-tetra-terc-butyl-4,4'-dihydroxy-1,2-difenylethan. Antioxidační aktivitu vykazují pouze dva poslední jmenované. Ve směsi s BHA mohou být přítomny další směsné produkty.^{30,31,33}



Obr.4 Strukturální vzorec BHT

GALÁTY

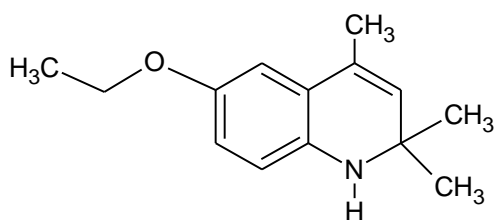
Do této skupiny antioxidantů se řadí estery kyseliny gallové a to propylgalát (obr. 5A), oktylgalát (obr. 5B) a laurylgalát (obr. 5C). Propylgalát je bílá krystalická látka s mírně nahořklou chutí, rozpustná ve vodě, ethanolu a diethyletheru. Za vysokých teplot je nestabilní. Oktyl- a laurylgalát jsou látky lipofilní, rozpustné v propylenglykolu, diethyletheru a acetonu. Za vysokých teplot vykazuje větší stabilitu než propylgalát. Galáty tvoří s kovy barevné komplexy, například s ionty železa modročerné barvy, což není kvůli zhoršení sensorických vlastností žádoucí. Proto je nutné používat je v kombinaci s chelatačními činidly, např. kyselinou askorbovou. S fenolovými antioxidanty vykazují synergickou činnost. Hlavním produktem jejich degradace je kyselina ellagová.^{30,31,33}



Obr. 5 Strukturní vzorec propylgalátu (A), oktylgalátu (B) a laurylgalátu (C)

ETHOXYCHIN

Ethoxychin, 6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylchinolin, obsahující ve své struktuře dusíkatý heterocyklus (obr. 6), je čirá, viskózní kapalina světle žluté až tmavě hnědé barvy s merkaptanovým zápachem. Uplatnění nachází především v prevenci proti oxidaci karotenoidů.^{30,31,33} Velice účinný je při stabilizaci rybí moučky, proto je nejvíce využívaným antioxidantem v krmivech obsahujících rybí složku.⁴¹ Kromě toho je využíván i jako insekticid, pesticid a herbicid. Vlivem působení tepla a světla tvoří polymery.^{30,31,33}



Obr.6 Strukturální vzorec ethoxychinu

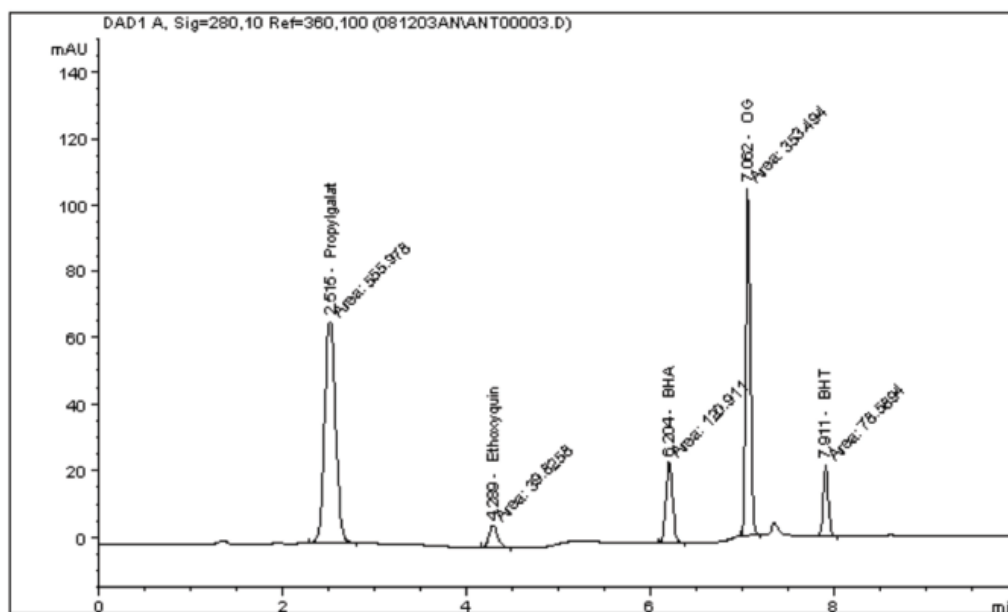
Všem těmto látkám jsou přisuzovány negativní účinky na zdraví. Butylhydroxytoluenu byly studiemi prokázány mutagenní, genotoxické a karcinogenní účinky na játra a plíce. Pokusy na zvířatech bylo zjištěno, že butylhydroxyanizol může způsobit benigní a maligní nádory a mohou vykazovat toxicitu pro reprodukční systém.^{42,43,44} Testováním galátů bylo zjištěno, že zpomalují růst, mohou způsobit anémii a onemocnění ledvin, jater a žaludku.⁴⁵ Ethoxychin může vyvolat onemocnění štítné žlázy, připisována mu je také toxicita pro reprodukci.⁴⁶

2.2.6 STANOVENÍ VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH ANTIOXIDANTŮ

V literatuře je uvedena řada studií zabývajících se monitoringem vybraných syntetických antioxidantů v různých matricích. Popsány jsou aplikace chromatografických, elektroanalytických a elektromigračních metod. Metoda pro simultánní stanovení všech těchto šesti antioxidantů v krmivech však nebyla doposud v literatuře popsána.

Výzkumní pracovníci Ústředního a kontrolního ústavu zemědělského v Lípě u Havlíčkova Brodu použili ke stanovení BHA, BHT, propylgalátu, oktylgalátu a ethoxychinu

v premixech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí s předúpravou vzorku extrakcí kapalina – kapalina směsí rozpouštědel o složení acetonitril : isopropanol : ethanol v poměru 2 : 1 : 1.⁴⁷ Separaci analytů provedli pomocí kolony C18 (4,6 mm x 150 mm; 5 μm) a mobilní fáze o průtoku 1 ml·min⁻¹ a složení methanol (A) a 1,5 % kyselina octová v gradientu od 55 % do 98 %. Výsledný chromatogram je na obrázku 7.

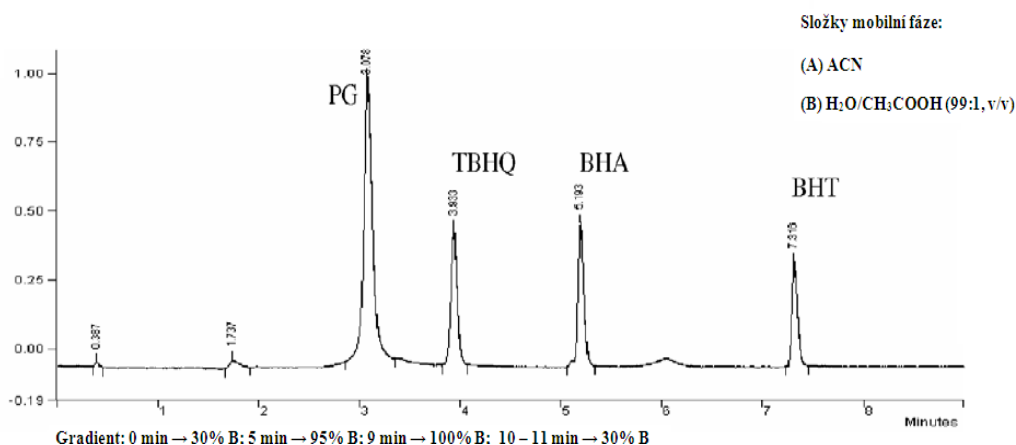


Obr. 7 Chromatogram separace PG, EQ, BHA, OG a BHT (převzato z cit.⁴⁷)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí byla také aplikována na stanovení propylgalátu, butylhydroxytoluenu, butylhydroxyanisolu a terc-butylhydrochinonu v rostlinném oleji, másle, margarínu a sýrech.⁴⁸ Látky byly vyextrahovány roztokem o složení methanol : voda v poměru 1 : 1. Separaci autoři provedli pomocí systému reverzních fází za použití kolony C18 a měnícím se poměru složek mobilní fáze, kterými byly acetonitril (A) a 1% kyselina octová (B). Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml·min⁻¹. Výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 8, ze kterého je patrné, že doba analýzy nepřekročila 8 minut a látky eluovaly v pořadí PG, TBHQ, BHA a BHT. Získané detekční limity jsou v tabulce II:

Tabulka II Limity detekce pro jednotlivé antioxidanty

PG	TBHQ	BHA	BHT
0,3 mg · l ⁻¹	0,5 mg · l ⁻¹	0,5 mg · l ⁻¹	0,5 mg · l ⁻¹

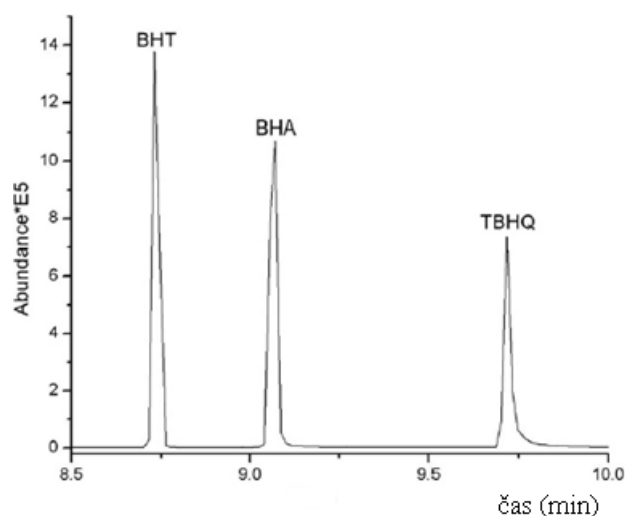


Obr. 8 Chromatogram separace PG, BHA, BHT a TBHQ v palmovém oleji, (převzato z cit.⁴⁸)

Prostřednictvím plynové chromatografie bylo kontrolováno množství BHA, BHT a TBHQ v rostlinných olejích. Analyty byly od matrice odděleny mikroextrakcí s acetonitrilem, ve kterém je olejová matrice méně rozpustná než v ethanolu nebo metanolu.⁴⁹ Acetonitrilový extrakt tedy tolik nezatěžuje kolonu a jeho použití značně přispívá k prodloužení životnosti kolony. Další výhodou mikroextrakce je nízká spotřeba vzorku a extrakčního činidla. Takto získaný extrakt byl podroben centrifugaci a bez dalšího přečištění nebo zakoncortování byl aplikován do plynového chromatografu spojného s hmotnostním spektrometrem opatřeným kvadrupólovým analyzátozem. Převedení analytů na iontovou formu bylo provedeno technikou ionizace elektronem. Vzniklé ionty byly identifikovány podle hodnoty m/z a retenčního času. Výsledný chromatogram je na obrázku 9 a meze detekce v tabulce III:

Tabulka III Limity detekce pro jednotlivé antioxidanty

BHA	BHT	TBHQ
0,001 mg · l ⁻¹	0,002 mg · l ⁻¹	0,004 mg · l ⁻¹



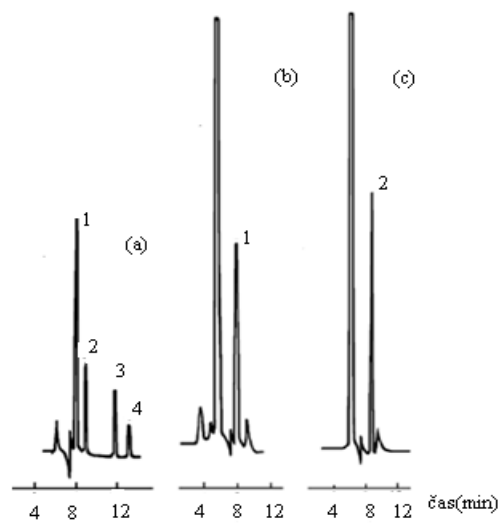
Obr. 9 Chromatogram separace BHA, BHT a TBHQ v rostlinných olejích, (převzato z cit.⁴⁹)

R. A. Medeiros a kol. vyvinuli metodu založenou na pulzní amperometrii s průtokovou injekční analýzou pro simultánní stanovení BHA a BHT ve vzorcích majonézy.⁵⁰ K tomuto účelu jim posloužila diamantová elektroda dopovaná borem ponořená do elektrolytu, kterým byl 30 % vodný roztok ethanolu obsahující dusičnan draselný o koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Touto metodou dosáhli detekčního limitu $0,030 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro BHA a $0,40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro BHT. Vyšší citlivosti bylo dosaženo square-wave voltametrií realizovanou použitím uhlíkové elektrody modifikované fosforečnanem měďnatým zakotveným v polyesterové pryskyřici, kterou byly kvantifikovány BHA a BHT ve vzorcích majonézy.⁵¹ Detekční limit pro BHA byl $7,2\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro BHT $9,3\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro současné stanovení BHA, BHT, TBHQ a propylgalátu byla použita elektrokinetická micelární chromatografie s elektrochemickou detekcí.⁵² Metoda byla úspěšně aplikována na reálné vzorky, kterými byly rostlinný olej, instantní houbová omáčka a rybí polévka. Uvedené antioxidanty byly ze vzorků vyextrahovány bezvodým ethanolom. Z obrázku 10, na kterém jsou znázorněny výsledné elektroforeotogramy, je patrné, že tato metoda poskytuje účinnou separaci a je poměrně rychlá. Bylo dosaženo následujících detekčních limitů (tabulka IV):

Tabulka IV Limity detekce pro jednotlivé antioxidanty

PG	TBHQ	BHA	BHT
$0,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,80 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obr. 10 Elektroforeotogram, (převzato z cit. ⁵²):

(a) směsi standardů (1- PG, 2- TBHQ, 3- BHA, 4- BHT)

(b) vzorku houbové omáčky

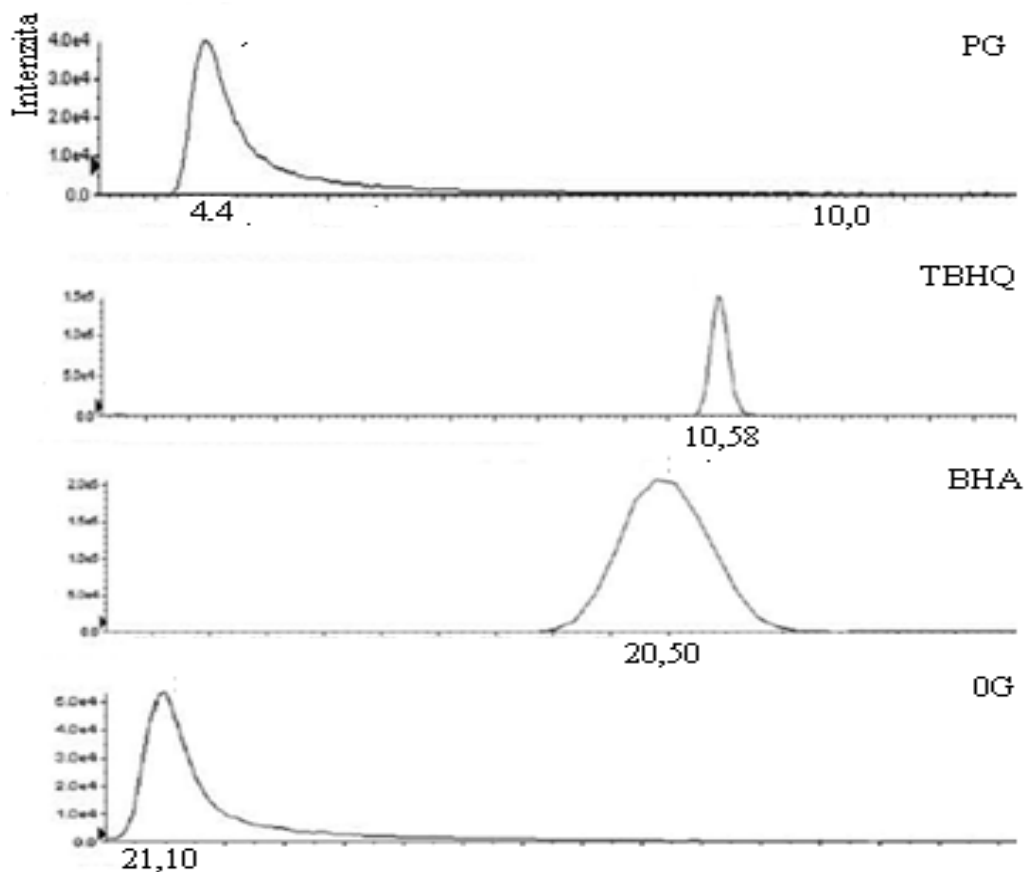
(c) vzorku rybí polévky

2.2.7 STANOVENÍ VYBRANÝCH ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE VE SPOJENÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

Společně s jinými fenolovými antioxidanty (2,4,5-trihydroxybutyrofenonem, di-terc-butyl-4-hydroxymethylfenolem, nordihydroguaiareovou kyselinou, 4-hexylresorcinolem) a konzervanty (2-naftolem, 4-fenylfenolem, 2,4-dichlorofenoxyoctovou kyselinou) byly pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií sledovány BHA, TBHQ, propylgalát a oktylgalát v olivovém, řepkovém, arašídovém, kukuřičném a slunečnicovém oleji.⁵³ Analyty byly z matrice vyizolovány extrakcí kapalina – kapalina za použití acetonitrilu nasyceného hexanem. Po homogenizaci vzorku a centrifugaci po přidání rozpouštědla byla horní acetonitrilová vrstva odebrána a spodní olejová vrstva opět extrahována. Spojené extrakty byly zředěny acetonitrem na objem 10 ml. Takto upravený vzorek byl dávkován do kapalinového chromatografu na kolonu C18 (150 mm x 2,1 mm; 3,5 μ m). Nalezené optimální podmínky separace byly následující:

- teplota kolony: 35°C
- mobilní fáze: (A): H₂O
(B): acetonitril
- průtok: 200 μ l/min
- gradient: 0 min → 10 % B
10 min → 30 % B
12 min → 60 % B
25 min → 90 % B
26 min → 10 % B

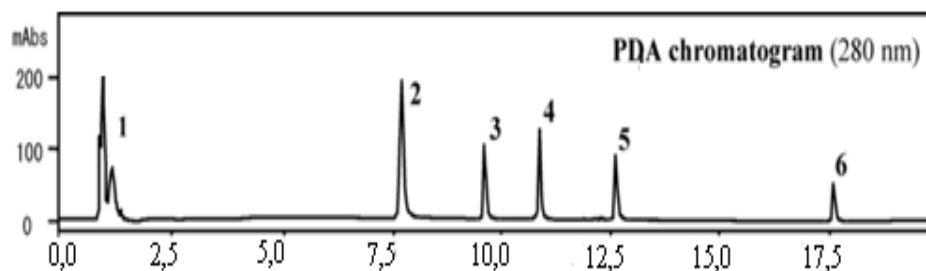
Separční HPLC systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem. Látky byly ionizovány elektrosprejem nastaveným na negativní mód a vzniklé ionty deprotonovaných molekul [M - H]⁻ byly detegovány průletovým analyzátozem. Retenční časy PG, TBHQ, BHA a OG jsou na obrázku 11.



Obr. 11 Chromatogramy ze spojení HPLC- MS (převzato z cit.⁵³)

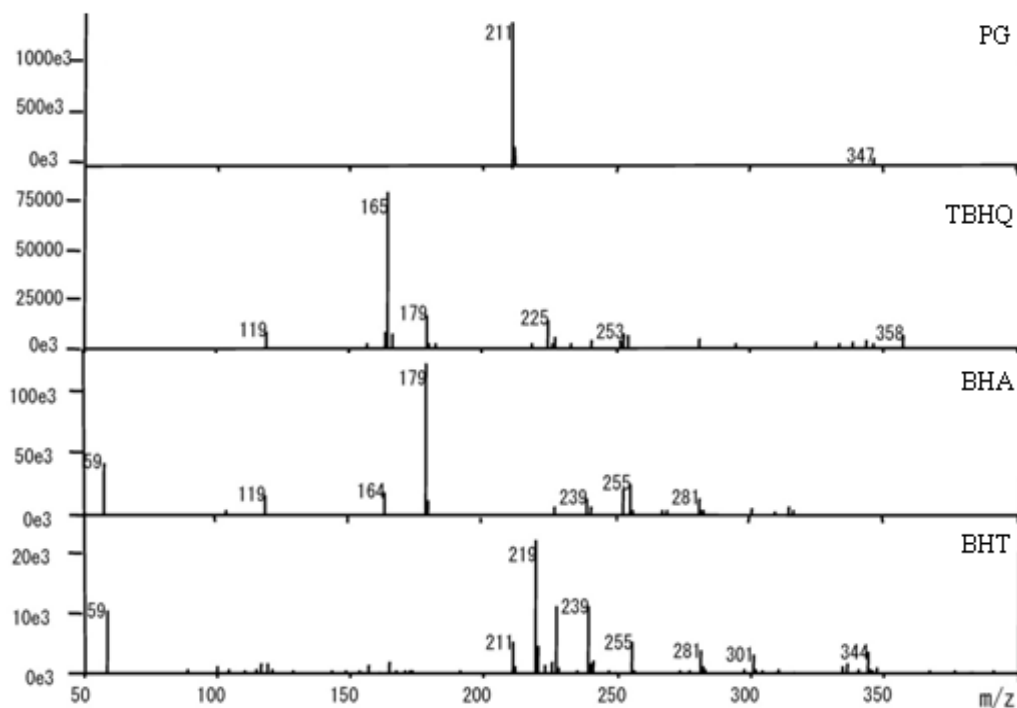
Metoda HPLC - MS se uplatnila při sledování BHA, BHT, PG, TBHQ a nordihydroguaiaretové kyseliny (NDGA) v nikumanu, olivovém oleji, arašídovém másle, omáčce na těstoviny a žvýkačkách.⁵⁴ Sledované látky byly ze všech vzorků vyextrahovány extrakční směsí o složení acetonitril, 2-propanol, ethanol (poměr rozpouštědel 2 : 1 : 1) obsahující 0,1 % kyseliny askorbové (AA). Takto upravené vzorky byly zchlazeny v mrazničce, následně přefiltrovány a zředěny vodou tak, aby poměr filtrátu a vody byl 1 : 5. Ze zředěného filtrátu byly extrakcí na pevné fázi odstraněny lipidy. Tento krok byl díky absenci tuku u žvýkaček vynechán.

Optimální podmínky separace byly hledány použitím standardů technikou LC s detektorem diodového pole, přičemž k detekci látek byla využita vlnová délka 280 nm. Separace látek je na obr. 12.



Obr. 12 Chromatogram separace standardů ve spojení s PDA detektorem (převzato z cit.⁵⁴); (1-AA, 2-PG, 3-TBHQ, NDGA, 5-BHA, 6-BHT)

Nalezené optimální podmínky byly aplikovány v systému HPLC - MS. Látky byly ionizovány elektrosprejem. Ve spektru měřeném v negativním módu analyty poskytují signál deprotonované molekuly $[M-H]^-$ (obr. 13).



Obr. 13 Hmotnostní spektra vybraných antioxidantů, (převzato z cit.⁵⁴)

Metoda HPLC - MS se uplatnila při sledování BHA, BHT, α -tokoferolu a α -tokoferol acetátu a dalších látek skupiny parabenů v kosmetických přípravcích.⁵⁵ Samotnému stanovení předcházela úprava vzorků superkritickou fluidní extrakcí pomocí oxidu uhličitého (za podmínek 14 000 kPa a 65°C). Látky byly separovány v systému reverzních fází (kolona C18, mobilní fáze: methanol a voda). Látky byly stanoveny pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejem (v negativním režimu) a kvadrupólem. Ve spektru byly pozorovány charakteristické ionty deprotonovaných molekul $[M-H]^-$. V tabulce V jsou pro vybrané analyty shrnuty retenční časy a detekční limity získané touto analýzou.

Tabulka V Charakteristiky sledovaných analytů

Analyt	Sledovaný ion (m/z)	Retenční čas	LOD
BHA	179	11,8 min	99 ng/g
BHT	219	16,1 min	87 ng/g

Spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem vybaveným elektrosprejem a průletovým analyzátozem byla monitorována rezidua antibiotik a jiných veterinárních léčiv a také ethoxychinu v krevetách.⁵⁶ Autoři této studie testovali různé varianty přípravy vzorků (extrakci acetonitrilem s následným přečištěním SPE extrakcí, extrakci trichloroctovou kyselinou a extrakci dispergovanou tuhou fází). Nejlepší výtěžnosti dosáhli extrakcí acetonitrilem s následným přečištěním SPE. Separaci provedli na koloně C18 (50 mm x 4,6 mm; 1,8 μ m) s gradientovou elucí mobilní fáze (voda s 0,1 % kyselinou mravenčí (A) a acetonitril (B)), (tabulka VI).

Tabulka VI Gradientová eluce

min.	B(%)	průtok (ml·min ⁻¹)
0	10	0,5
1	10	0,5
11	100	0,5
16	100	0,5

Analýzu provedli v pozitivním ionizačním módu. Látky identifikovali na základě přesné správné hodnoty m/z protonovaných molekul $[M+H]^+$, pro ethoxychin činila 218,1539. K přesnější identifikaci byla využita fragmentace. Ve spektru ethoxychinu byly sledovány dva píky, základní pík 218,1539 m/z (100%) a fragment 202,1226 m/z (37%). Autorům se podařilo vyvinout poměrně citlivou metodu. Detekční limit pro ethoxychin byl $7,10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Ještě o něco nižšího LOD ($3,60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) docílili vědci, kteří sledovali ethoxychin s mnoha dalšími rezidui pesticidů v olivovém oleji. K tomuto účelu využili metodiku uvedenou v předchozím případě.⁵⁷

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

Měření bylo prováděno pomocí kapalinového chromatografu (Agilent 1100 Series, Agilent), sestávajícího z autosampleru, termostatu kolon, gradientové binární pumpy, degasseru a UV detektoru, a pomocí hmotnostního spektrometru (LCQ DECA) s elektrosprejem (ESI) a analyzátozem iontovou pastí (Thermo Fisher Scientific) (obr. 14).

K experimentu byly použity standardy buthylhydroxyanizolu, buthylhydroxytoluenu, propylgalátu, oktylgalátu, laurylgalátu a ethoxychinu (všechny od firmy Sigma - Aldrich).

K přípravě mobilních fází byla použita přečištěná voda (Milipore, Molsheim, Francie), methanol (Baker, pro HPLC), acetonitril (HPLC grade, J.T. Baker), octan amonný p.a (Sigma - Aldrich) a 98% kyselina mravenčí p.a (Sigma - Aldrich).

Pro přípravu extrakční směsi byl použit ethanol (Lachema), isopropanol (Sigma - Aldrich), acetonitril (HPLC grade, J.T. Baker). Analyzováno bylo kompletní krmivo pro psy (Royal Canin).



Obr. 14 Instrumentace

3.2 Pracovní postup

Příprava zásobních roztoků standardů a směsi standardů

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky standardů antioxidantů rozpuštěním 20 mg dané látky ve 20 ml 90 % methanolu ve vodě (v/v). Výsledná koncentrace tedy byla $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Do vialky bylo napipetováno 100 μl každého standardu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzniklá směs byla doplněna 90 % methanolu ve vodě (v/v) na objem 1000 μl . Výsledná koncentrace každého antioxidantu tedy byla $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Optimalizace separace

Nástřikem 10 μl této směsi do kapalinového chromatografu s UV detekcí při 280 nm byly optimalizovány podmínky separace. Ta byla provedena v systému reverzních fází pomocí kolony C18 o rozměrech 15 cm x 2,1 mm a velikosti částic 2,7 μm (Ascentis Express C18; SUPELCO Analytical). Práce s touto kolonou byla limitována maximálním průtokem $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlakem 400 bar. Testovány byly mobilní fáze o různém složení.

Analýza kompletního krmiva pro psy

2 g kompletního krmiva pro psy byly rozetřeny v třecí misce a převedeny do dělicí nálevky. Vzorek byl po dobu 30 minut protřepáván 2 x 10 ml extrakční směsi o složení acetonitril – isopropanol – ethanol (poměr rozpouštědel byl 2 : 1 : 1).⁴⁷ Po usazení krmiva byl vzniklý extrakt převeden do kádinky. Ze spojených extraktů byly filtrací na skládaném filtru odstraněny zbylé částičky krmiva. Následně byl ještě extrakt přefiltrován mikrofiltrem o velikosti 0,22 μm . 2 ml přefiltrovaného extraktu byly napipetovány do ependorfky a zakonzertovány odpařením rozpouštědla do sucha. K odparku bylo přidáno 100 μl 90 % methanolu ve vodě (v/v). Takto upravený vzorek byl aplikován do kapalinového chromatografu.

Identifikace antioxidantů

Antioxidanty byly identifikovány pomocí HPLC – MS za podmínek ionizace: zamlžovacím plynem byl dusík, napětí na sprejovací kapiláře 5 kV, teplota vyhřívané kapiláry 200 °C, napětí na vyhřívané kapiláře 15 V pro pozitivní mód, resp. -15 V pro negativní mód. Optimální podmínky pro HPLC jsou diskutovány v kapitole Výsledky a diskuze.

Stanovení antioxidantů a výtěžnosti (recovery) extrakce

Kvantifikace a stanovení výtěžnosti extrakce byly provedeny kapalinovou chromatografií s UV detekcí při 280 nm. K tomuto účelu byly provedeny vždy 3 analýzy:

1. vzorku krmiva
2. směsi standardů
3. krmiva s přidavkem standardů před extrakcí

Ke 2 g vzorku kompletního krmiva bylo přidáno 10 µl každého standardního roztoku o koncentraci 1 g.l⁻¹ a doplněn 90 % methanolem ve vodě (v/v) na 100 µl. Výsledná koncentrace daného antioxidantu byla tedy 100 µg.ml⁻¹.

4. krmiva s přidavkem standardů po extrakci

(K odparkům vzorku kompletního krmiva bylo přidáno 10 µl každého standardního roztoku o koncentraci 1 g.l⁻¹).

Hodnota výtěžnosti byla vypočítána z tří průměrných hodnot plochy píku daného antioxidantu dle následujícího vzorečku (VIII):

$$\text{Výtěžnost [\%]} = \frac{\text{průměr}_{\text{st.přidavek před extrakcí}} - \text{průměr}_{\text{granule bez přidavku standardu}}}{\text{průměr}_{\text{st.přidavek po extrakci}} - \text{průměr}_{\text{granule bez přidavku standardu}}} \cdot 100 \quad (\text{VIII})$$

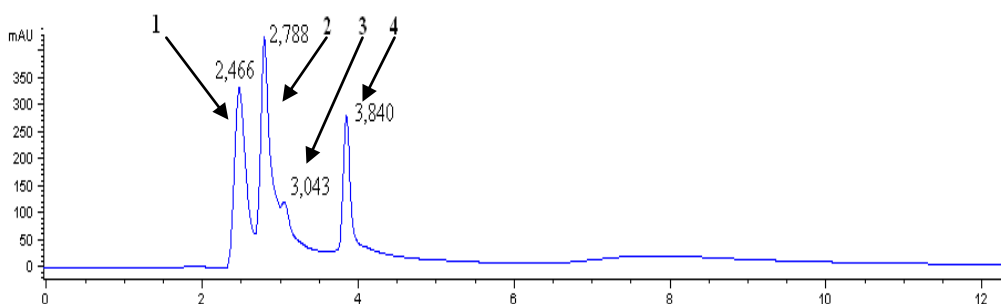
Množství antioxidantu bylo zjištěno tímto výpočtem (IX):

$$\text{Obsah antioxidantu [mg.kg}^{-1}\text{]} = \frac{\text{průměr}_{\text{granule bez přidavku standardů}}}{\text{průměr}_{\text{před extrakcí}} - \text{průměr}_{\text{granule bez přidavku}}} \cdot \frac{10}{2} \quad (\text{IX})$$

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

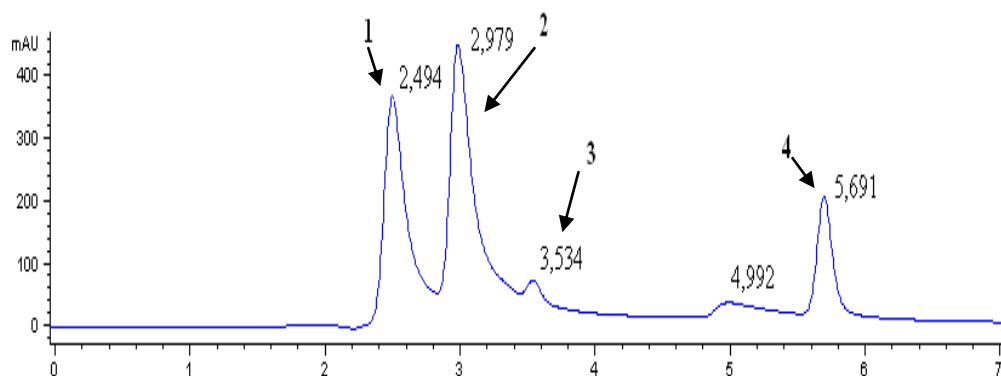
Cílem práce bylo vyvinout metodu s účinnou separací všech látek v co nejkratší době analýzy. Tyto parametry je možné ovlivnit složením a průtokem mobilní fáze. Dalším požadavkem byla vysoká citlivost detekce.

Nejdříve byla použita izokratická eluce s mobilní fází o složení acetonitril : voda 90 : 10 (v/v; 0,150 ml.min⁻¹). Doba analýzy nepřesahovala 6 min., ale toto složení mobilní fáze neposkytlo potřebnou separaci všech analytů (obr.15).

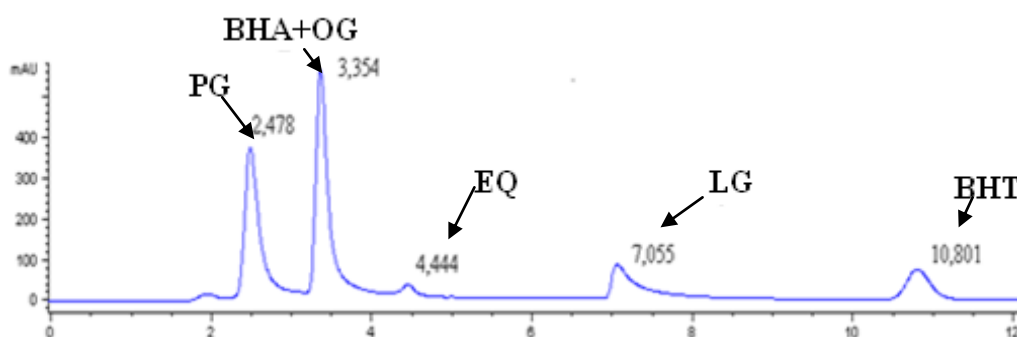


Obr. 15 Chromatogram separace směsi standardů za použití mobilní fáze acetonitril : voda, 90 : 10 (v/v; 0,150 ml.min⁻¹)

Bylo potřeba zvýšit retenci látek snížením obsahu organické složky v mobilní fázi. Při 80 % acetonitrilu v mobilní fázi se zlepšilo rozlišení píku 2 a 3 a došlo k oddělení další látky (pík v čase 4,992). Separace všech látek však nebylo dosaženo (obr. 16). Při 70 % acetonitrilu v mobilní fázi se výrazně zvýšila vzdálenost mezi píky, které patří ethoxychinu, propylgalátu a BHT (obr. 17). Ve snaze změnit selektivitu separace byl proveden stejný experiment s methanolem, který navíc má v systému reverzních fází nižší eluční sílu. Jeho použitím lze tedy zvýšit retenci analytů.

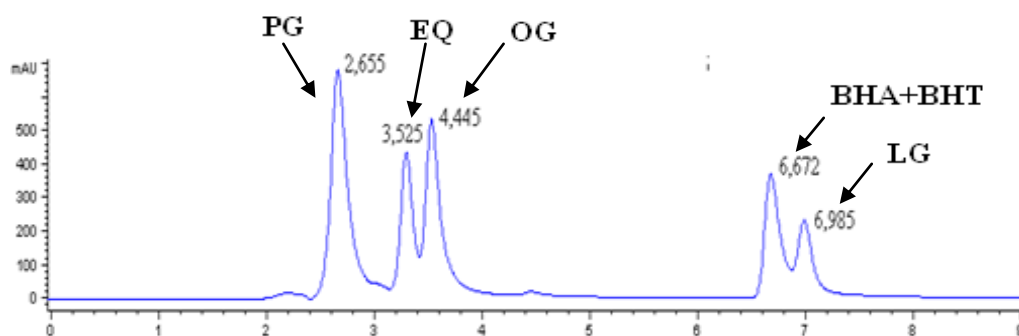


Obr. 16 Chromatogram separace směsi standardů za použití mobilní fáze acetonitril : voda, 80 : 20 (v/v; 0,150 ml.min⁻¹)



Obr. 17 Chromatogram separace směsi standardů za použití mobilní fáze acetonitril : voda, 70 : 30 (v/v; 0,150 ml.min⁻¹)

Při použití 90 % CH₃OH nedošlo k separaci BHA a BHT. Analýza také poskytovala špatné rozlišení EQ a OG a píku LG od píku odpovídající neseparované dvojici BHA a BHT ($t_R = 6,672$ min), (obr. 18). V dalším kroku bylo testováno snížení obsahu methanolu v mobilní fázi. Separace však i nadále nebyla vyhovující a navíc došlo k prodloužení doby analýzy. Zkrácení analýzy zvýšením průtoku mobilní fáze nebylo kvůli tlaku možné.

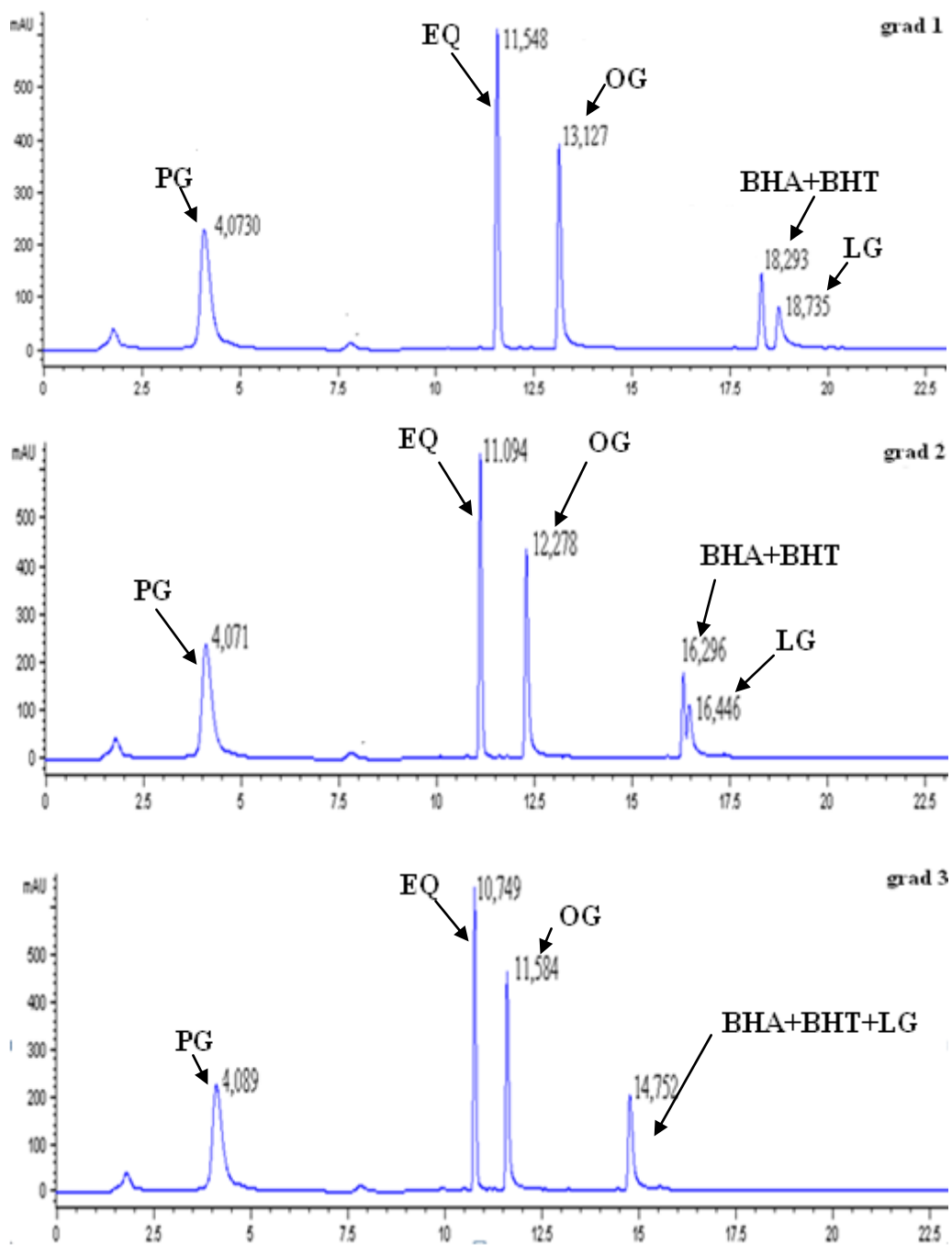


Obr. 18 Chromatogram izokratické eluce za použití mobilní fáze metanol : voda, 90 : 10 (v/v; 0,150 ml.min⁻¹)

Vzhledem k potřebě zvýšit retenci málo zadržovaných látek a zároveň neúměrně neprodlovovat dobu analýzy, bylo přistoupeno k využití gradientové eluce. Ze zkoušených gradientů byly pro ukázkou zvoleny gradienty 1, 2 a 3 (viz tabulka VII). Výsledné chromatogramy jsou na obrázku 19, který demonstruje ovlivnění retence obsahem organické složky v mobilní fázi na konci gradientu. S vyšším obsahem organické složky retence klesá a zkracuje se tak doba analýzy. Ovšem na úkor rozlišení separace. Kromě toho, že nedochází k separaci BHA a BHT, zhoršuje se separace LG od této dvojice.

Tabulka VII Gradienty za použití CH₃OH; (průtok 0,150 ml.min⁻¹)

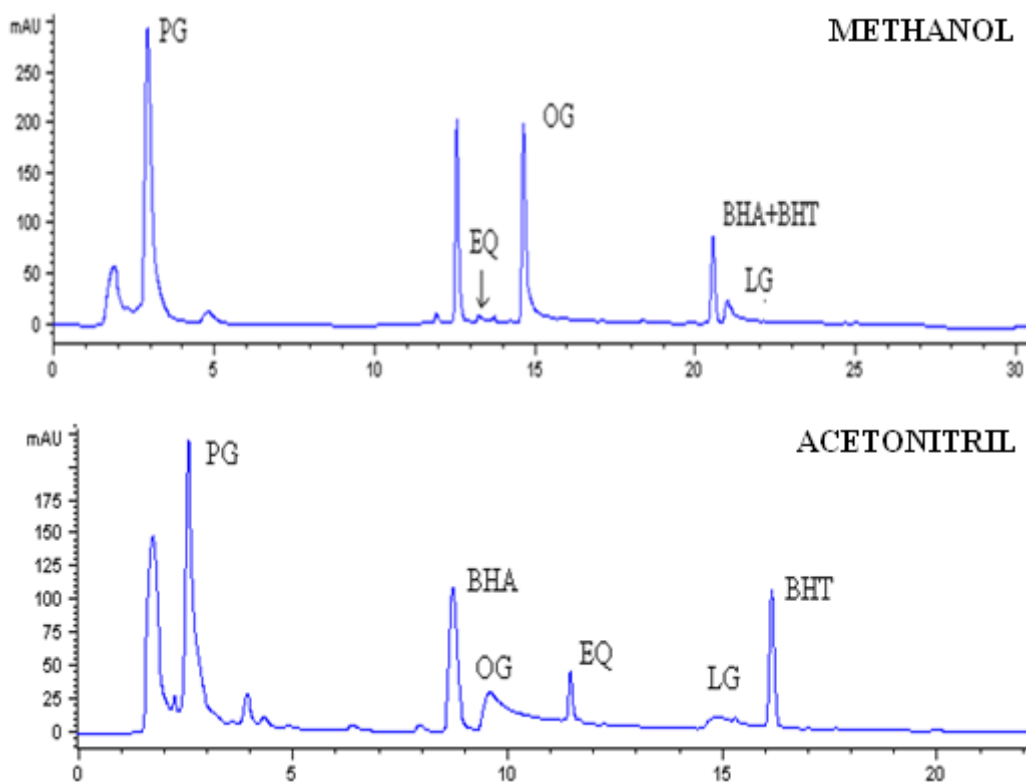
Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3	
Čas (min)	% CH ₃ OH	Čas (min)	% CH ₃ OH	Čas (min)	% CH ₃ OH
0	50	0	50	0	50
3	50	3	50	3	50
5	90	5	95	5	100
18	90	18	95	18	100



Obr.19 Chromatogramy získané pro gradienty 1, 2 a 3 (viz tab. VII)

Gradient 1 byl aplikován na mobilní fázi, ve které byl zaměněn methanol za acetonitril. Dochází k významné změně pořadí eluce a zlepšení separace kritického páru BHA a BHT, které se v případě methanolu neseperoaly. Použití acetonitrilu kromě změny selektivity

umožňuje separaci všech analyzovaných látek a dokonce i v kratší době analýzy (22 min. pro methanol; 17 min. pro acetonitril). Je zřejmé, že v případě analýz směsi analytů nabízí acetonitril lepší selektivitu (obr. 20).



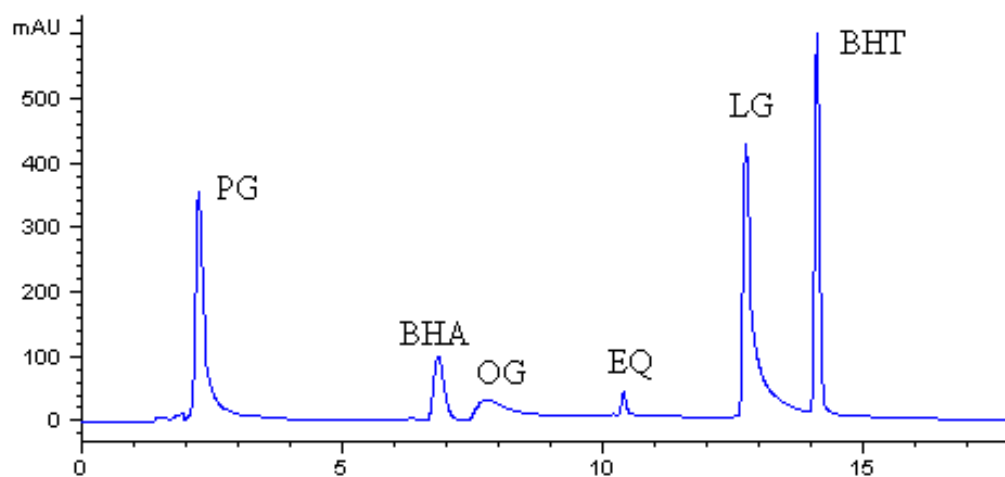
Obr. 20 Srovnání methanolu a acetonitrilu při gradientu 1

S cílem dále zkrátit dobu analýzy byl zvýšen průtok mobilní fáze. Zatímco u methanolu nebylo možné dosáhnout dostatečně vysokého průtoku ani při teplotě kolony 40 °C (i při nižší viskozitě byl překročen tlakový limit), u acetonitrilu bylo možné vzhledem k nižší viskozitě mobilní fáze vyšší průtoky využít.

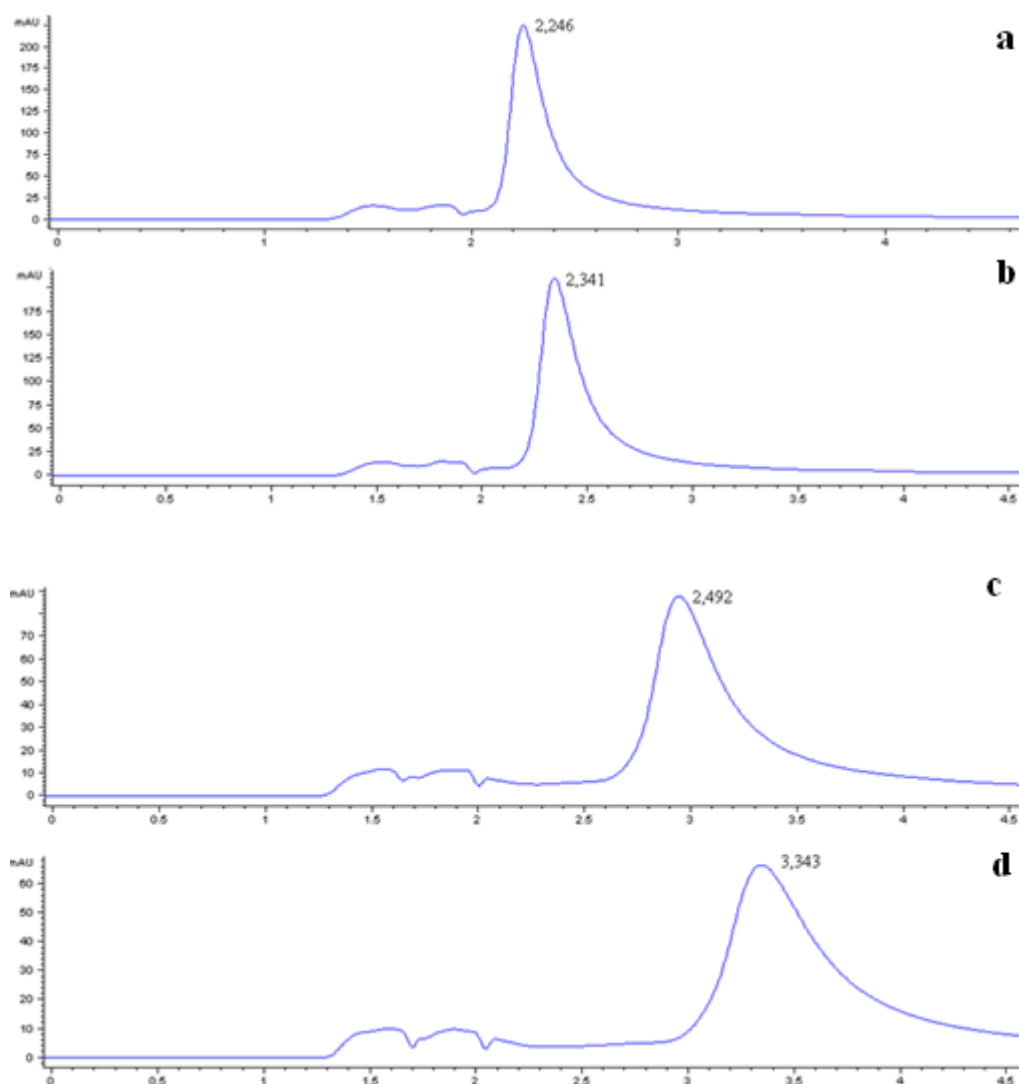
V dalších krocích byly zkoušeny varianty gradientů, což nakonec vedlo k požadovanému řešení. U gradientu 4 (viz tabuka VIII) byla separace uspokojivá a doba analýzy byla již kratší než 15 min. (obr. 21). Propylgalát ale vycházel z kolony téměř s mrtvým časem, což je nevhodné pro analýzu vzorků, kdy se mohou v mrtvém čase z kolony vymývat složky matrice a interferovat s analytem. Bylo potřeba zvýšit jeho retenci dalším snížením obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Retence PG byla změřena při 45 %, 40 %, 35 % a 30 % acetonitrilu ve vodě (v/v), (obr. 22).

Tabulka VIII Gradient 4 (acetonitril; průtok 0,200 ml·min⁻¹)

Gradient 4		
Čas (min)	A(%)	B(%)
0	50	50
3	50	50
6	90	10
30	90	10
30,1	50	50
40	50	50



Obr. 21 Chromatogram za použití gradientu 4



Obr. 22 Porovnání retence propyl galátu:

a – acetonitril : voda 45 : 55 (v/v; 0,200 ml.min⁻¹)

b – acetonitril : voda 40 : 60 (v/v; 0,200 ml.min⁻¹)

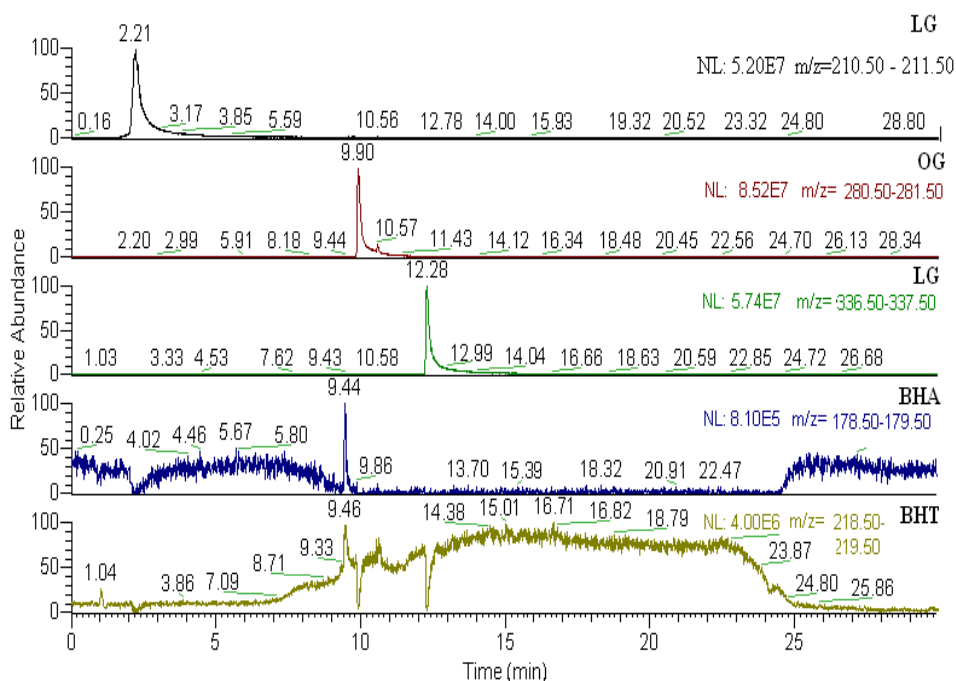
c – acetonitril : voda 35 : 65 (v/v; 0,200 ml.min⁻¹)

d – acetonitril : voda 30 : 70 (v/v; 0,200 ml.min⁻¹)

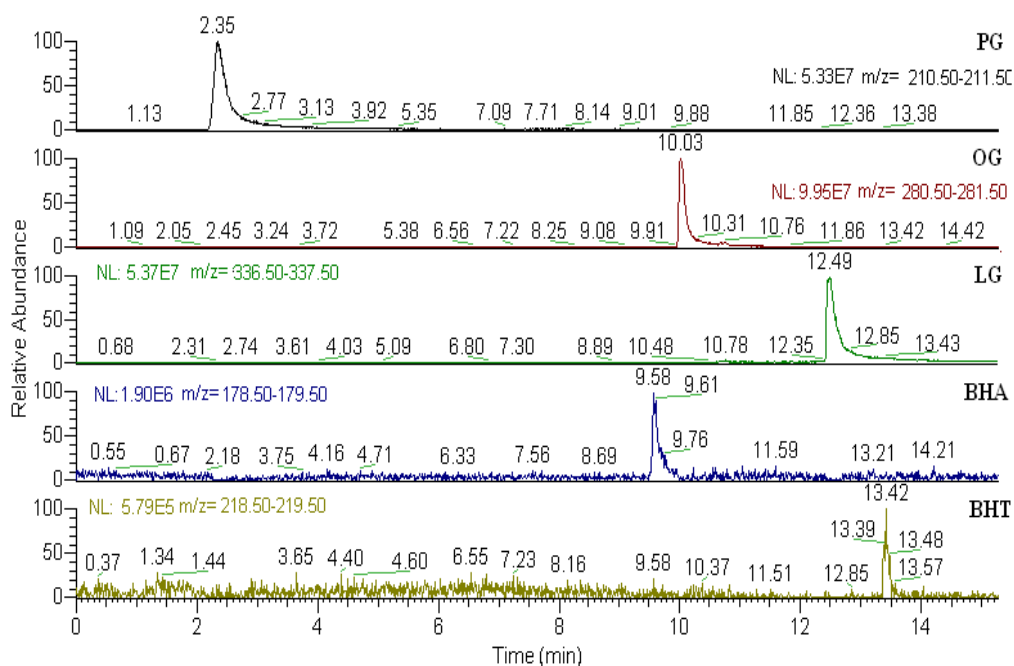
Je zřejmé, že pro dosažení retence PG, je nutné pracovat při nízkém obsahu acetonitrilu (30%), což znamená provádět gradient přes širší rozsah obsahu organického rozpouštědla v mobilní fázi a je nutné také počítat s vyšším tlakem vzhledem k vyšší viskozitě mobilní fáze na počátku gradientu.

Pro eliminaci chvostování píků galátů byl vyzkoušen přidavek 1 % kyseliny mravenčí a použití 1 mmol·l⁻¹ a 5 mmol·l⁻¹ octanu amonného. Nízké koncentrace octanu amonného byly

voleny s ohledem na riziko menší efektivity ionizace. Ani v jednom případě nedošlo ke zlepšení tvaru píku. Stejný experiment byl proveden pomocí HPLC – MS. Tomuto kroku předcházela přímá nástrika standardů do iontového zdroje a ladění hmotnostního spektrometru. Proměřen byl pozitivní i negativní mód. Na základě hodnot m/z a retenčních časů, které korespondovaly s retenčními časy z HPLC – UV byly identifikovány jednotlivé antioxidanty. V negativním módu bylo možné sledovat PG, BHA, OG a LG (obr. 23). EQ byl pozorován v pozitivním módu. BHT odezvu neposkytoval, pokud nebyl přidán octan amonný (obr. 23). Za použití mobilní fáze s přidavkem $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu amonného ale došlo ke zvýšení ionizace BHT a bylo možné jej v negativním módu zaznamenat (obr. 24).



Obr. 23 HPLC – MS analýza bez přidavku octanu amonného do mobilní fáze



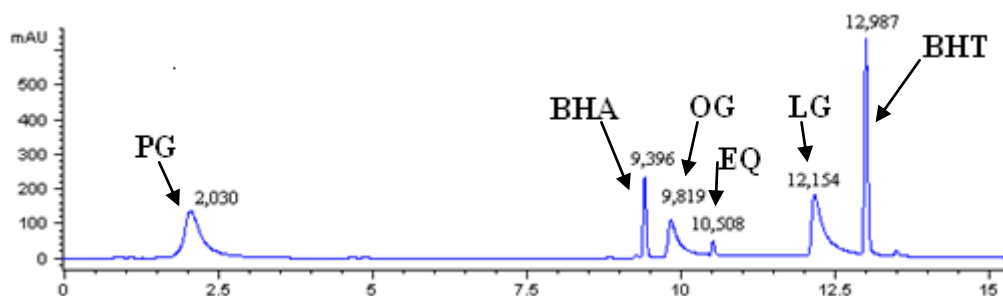
Obr. 24 HPLC – MS analýza s přidavkem octanu amonného v mobilní fázi ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Na základě doposud prezentovaných experimentů bylo možné navrhnout vhodné složení mobilní fáze pro dosažení požadované separace i pro hmotnostně spektrometrickou detekci analytů.

S ohledem na separaci analytů i odezvu v hmotnostním spektrometru byly zvoleny následující podmínky pro další měření (tab XI). Chromatogram pro konečný gradient mobilní fáze je na obrázku 25.

Tabulka IX Zvolený gradient pro separaci šesti sledovaných antioxidantů (acetonitril; $0,350 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

Čas (min)	A(%)	B(%)
0	100	0
3	0	0
8	0	100
20	100	100
20,1	100	0



Obr. 25 Chromatogram pro konečný gradient mobilní fáze:

A = acetonitril : voda 30 : 70 (v/v) s 1mM CH₃COONH₄

B = acetonitril : voda 10 : 90 (v/v) s 1mM CH₃COONH₄ (průtok: 350 μl·min⁻¹)

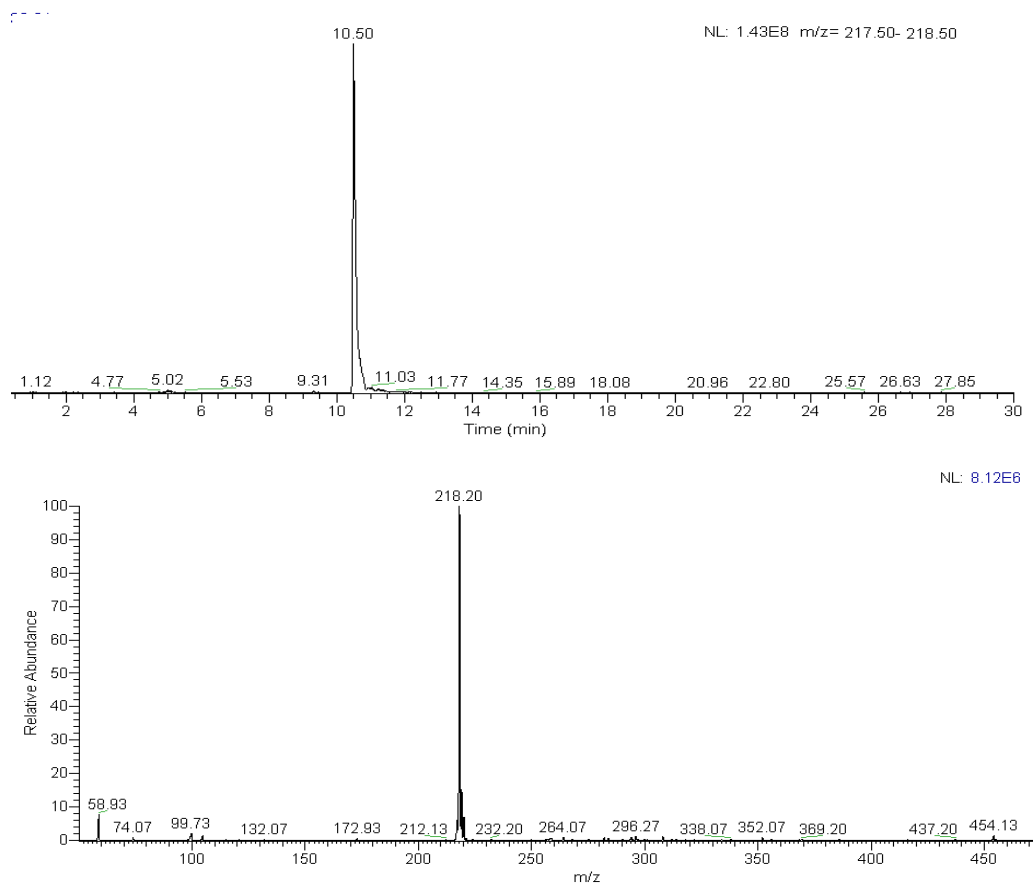
Navržené separační podmínky dovolují vzájemnou separaci všech šesti analytů na základní linii, jsou vhodné i pro spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií a doba analýzy nepřekračuje 15 min. Je třeba upozornit, že menší hodnota retenčních časů PG oproti obr. 21 není dána nižší retencí ale zvýšením průtoku mobilní fáze z 200 μl·min⁻¹ na 350 μl·min⁻¹ (obr.22, obr.25).

ANALÝZA KOMPLETNÍHO KRMIVA PRO PSY

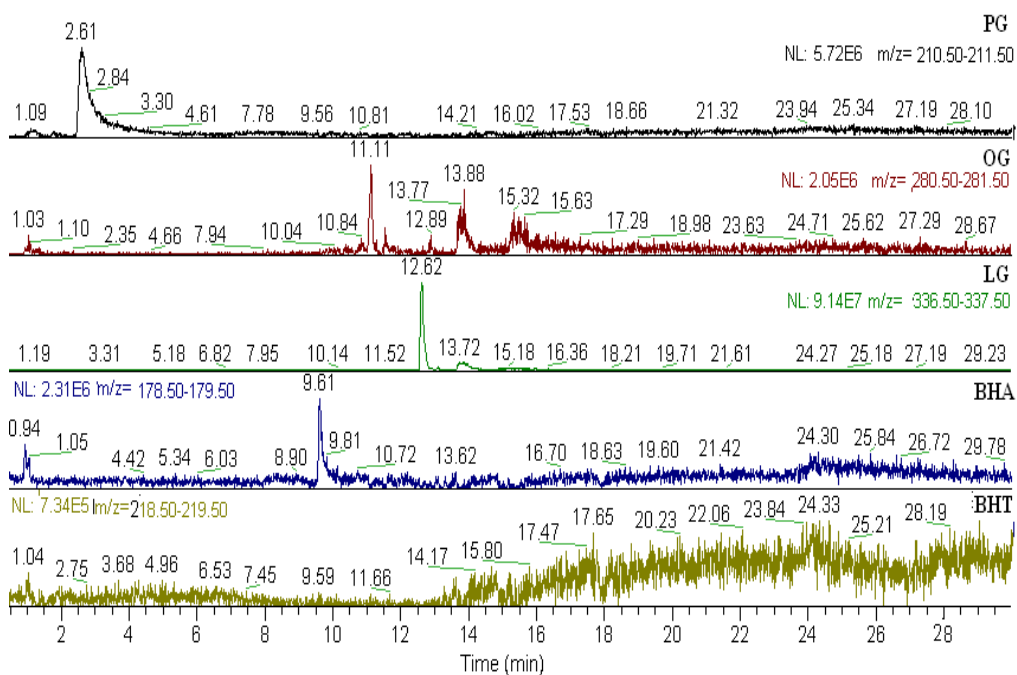
Zvolené separační podmínky byly aplikovány na identifikaci jednotlivých antioxidantů ve vzorku kompletního krmiva upraveného dle postupu v kapitole 3.2. Identifikace byla provedena na základě retenčního času hodnoty m/z protonované molekuly [M+H]⁺ (v případě ethoxychinu) a deprotonované molekuly [M-H]⁻ (v případě ostatních antioxidantů) a fragmentačních spekter.

Ve spektru získaném proměřením vzorku v pozitivním módu byl identifikován intenzivní pík s hodnotou m/z 218,27 patřící ethoxychinu (obr 26). Proměřením vzorku v negativním módu (obr.27) byl pozorovatelný pík o hodnotě m/z = 211,27 patřící PG (obr. 28), pík o m/z = 337,00 patřící LG (obr. 29) a pík s hodnotou m/z = 179,07 příslušející BHA (obr. 30). V chromatogramu HPLC – MS jsou vidět i píky pro m/z odpovídající OG, ale jejich retenční časy (11,11 min. a 13,88 min.) nekorespondují s retenčním časem z této nalezené metody. Lze tedy konstatovat, že tento antioxidant nebyl v krmivu obsažen.

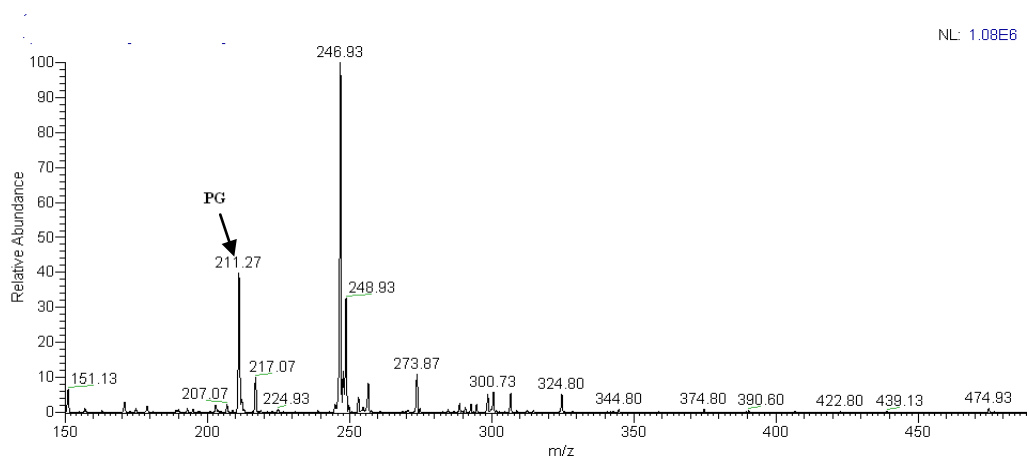
V krmivu byla prokázána přítomnost 4 antioxidantů ze sledované skupiny látek a to PG, LG, EQ a BHA.



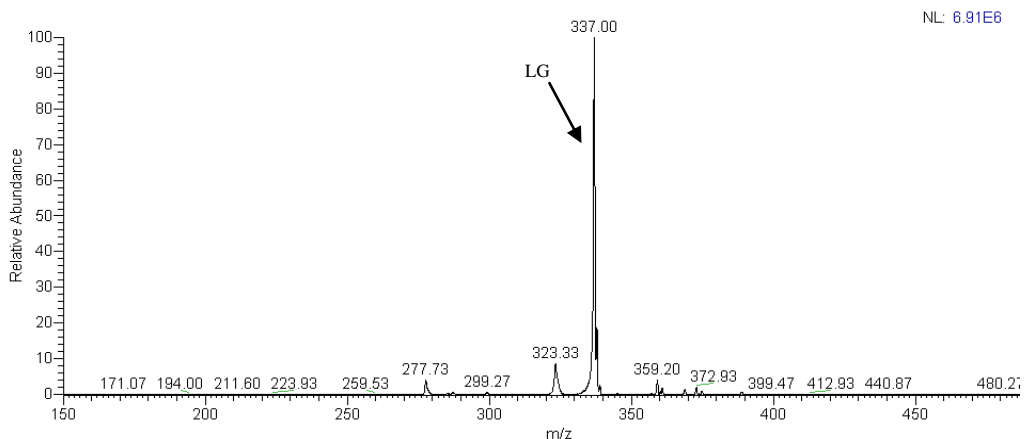
Obr.26 HPLC-MS analýza krmiva v pozitivním módu pro EQ



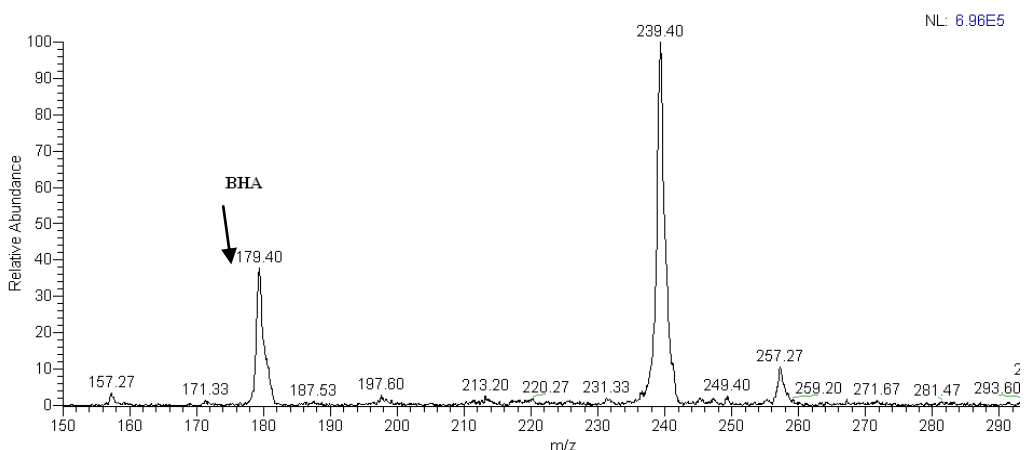
Obr. 27 Chromatogram HPLC - MS získaný analýzou krmiva v negativním módu



Obr. 28 MS spektrum v negativním módu – PG



Obr. 29 MS spektrum v negativním módu – LG



Obr. 30 MS spektrum v negativním módu – BHA

STANOVENÍ VÝTĚŽNOSTI EXTRAKCE

Kromě identifikace bylo provedeno i stanovení metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Integrací plochy píků získaných ze spojení kapalinové chromatografie s UV detekcí (tab. X) byla stanovena výtěžnost extrakce a provedena kvantifikace antioxidantů. Pro ukázkou těchto postupů bylo zvoleno BHA. V tabulce X jsou zaznamenány hodnoty plochy píku BHA získaných analýzou standardů, analýzou krmiva bez přídavku standardů, analýzou krmiva se standardním přídavkem po extrakci a analýzou krmiva se standardním

přídavkem před extrakcí. Každá analýza byla provedena třikrát. Ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota plochy píku daného antioxidantu pro danou analýzu a směrodatná odchylka (tab. X).

Tab. X Tabulka ploch píku BHA

	(1)	(2)	(3)	(4)
plocha 1	845,5	969,5	1509,6	1409,7
plocha 2	796,9	821,9	1931,3	1493,8
plocha 3	548,7	883,9	1952,4	1465,4
průměr	730,4	891,8	1797,8	1456,3
směrodatná odchylka	159,2	74,2	249,8	42,78

Pro kvantitativní analýzu nebyla využita kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, ale s UV detekcí. Ukázalo se, že citlivost HPLC – UV není dostatečná pro propylgalát, jehož koncentrace v krmivu byla příliš nízká. U dalších analytů (LG a EQ) byla zjištěna velmi nízká výtěžnost. Pro poslední analyt BHA byla hodnota výtěžnosti 68 % a jeho obsah v krmivu $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Nižších mezí detekce by bylo možné dosáhnout modifikací metody pro zpracování vzorku a použitím HPLC – MS pro detekci. K tomu by bylo nutné najít vhodné vnitřní standardy. Možnost použití značených standardů se ukázala ekonomicky příliš nákladná.

5. ZÁVĚR

V literatuře byla popsána řada analytických metod vhodných pro analýzu syntetických antioxidantů v různých matricích. Metody jsou převážně založeny na chromatografické separaci s UV detekcí a předúpravě vzorku extrakcí kapalina – kapalina.

Bylo zjištěno, že analýza těchto antioxidantů není popsána pro zvířecí krmiva. Důvodem může být to, že není nutné uvádět jejich přesné množství na etiketách výrobků.

Pro skupinu šesti syntetických antioxidantů byly nalezeny vhodné separační podmínky umožňující separaci během jedné chromatografické analýzy. Vzhledem ke značně rozdílné retenci sledovaných látek bylo nezbytné využít gradientovou eluci a vhodnou volbu organického rozpouštědla, kdy se ukázalo, že acetonitril poskytuje v tomto případě pro separaci lepší selektivitu než methanol. Zároveň bylo využito jeho nižší viskozity, což dovolilo, v kombinaci s vyšší teplotou kolony (40°C), zvýšit průtok mobilní fáze, aniž by byl překročen tlakový limit kolony. Tato skutečnost přispěla ke zkrácení doby analýzy pod 15 minut. Separace byla prováděna s UV a hmotnostně spektrometrickou detekcí. Bylo zjištěno, že pro ionizaci BHT je důležitý přídavek octanu amonného do mobilní fáze, který zvyšoval signál této látky. Hmotnostně spektrometrická detekce v kombinaci s vyvinutou separací dovoluje na základě hmotnostních spekter a retenčních časů identifikovat sledované antioxidanty ve vzorcích ale pro kvantifikaci touto metodou nebyl k dispozici z cenových důvodů vhodný izotopicky značený standard. Alternativou pro kvantitativní analýzu pak byla UV detekce, i když se u ní projevila menší citlivost oproti hmotnostní spektrometrii. Pro provedení analýz vzorku krmiv byla nezbytná extrakce látek, která vycházela z postupu, popsaného v literatuře pro premixy. Ukázalo se však, že daný postup z hlediska návratnosti není vhodný pro všechny studované analyty. Vyvinutá metoda byla aplikována při analýze krmiva pro psy, ve kterém byla prokázána přítomnost čtyř ze šesti sledovaných antioxidantů. Kvantifikace byla provedena metodou standardního přídavku pro BHA, přičemž zjištěný obsah byl 5,0 mg·kg⁻¹, což je obsah, který není v rozporu s požadavky legislativy.

6. LITERATURA

1. Kopmpra T.: *Obecná hygiena potravin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno, 2004.
2. Čížková H.: *Metody a kriteria pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. Key Publishing. Ostrava, 2011.
3. <http://kvalitapotravin.webnode.cz/falsovani-a-prodej-menehodnotnych-potravin/>, staženo 24.4.2012.
4. Linda P., Czarnecki-Maulden, Gail L.: *American Journal of Veterinary Research* 51, 808 (1990).
5. Ballin Z. N., Vogensen K. F., Karlsson H. A.: *Meat Science* 83, 165 (2009).
6. Mamone G., Picariello G., Caira S.: *J. of Chromatography A* 1216, 7130 (2004).
7. Leitner A., Castro-Rubio F., Marina M. L., Lindnerp W.: *Journal of proteome research* 5, 2424 (2006).
8. Trujillo A. J., Casals I., Guamisa B.: *J. of Chromatography A* 870, 371 (2000).
9. Czerwenka Z., Müller L., Lindner W.: *Food Chemistry* 122, 901 (2010).
10. Arnold A., Arrey N. T., Karas M., Persike M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2844 (2011).
11. Cocchi M., Vascellari M., Gallina A., Agnoletti F., Angeletti R., Mutinelli F.: *J. Vet. Med. Sci.* 72, 103 (2010).
12. Jasicka-Misiak I., Poliwoda A., Dereń M., Kafarski P.: *Food Chemistry* 131, 1149 (2012).
13. Bartáková K., Dračková M., Borkovcová I., Vorlová L.: *Czech J. Food Sci.* 29, 328 (2011).
14. Chernetsova S. E., Revelsky I. A., Morlock G.E.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 325 (2011).
15. Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M. I., Piu P. C., Scanu R., Tapparo A., Sanna G.: *Talanta* 68, 1390 (2006).
16. Hui L., Qi-jun P.: *Lihua Jianyan, Huaxue Fence* 44, 570 (2008).

17. Simsek A., Bilsel M., Goren A. C.: *Food Chemistry* 130, 1150 (2012).
18. Pfammatter E., Maury V., Thethaz C.: *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 95, 585 (2004).
19. Buňka F., Hrabě J., Vospěl B.: *Senzorická analýza potravin I*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Zlín, 2010.
20. Jarošová A.: *Senzorické hodnocení potravin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno, 2001.
21. Falasconi M., Concina I., Gobbi E., Sberveglieri V., Pulvirenti A., Sberveglieri G.: *International Journal of Electrochemistry* 2012, 715763 (2012).
22. Oladipupo B.; Stough J.; Guthrie N.: *AIP Conference Proceedings* 1362, 75 (2011).
23. Campagnoli A., Pinotti L., Tognon G., Cheli F., Baldi A., Dell'Orto V.: *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement* 8, 253 (2004).
24. Rudnitskaya A., Polshin E., Kirsanov D., Lammertyn J., Nicolai B., Saison D., Delvaux F. R., Delvaux F., Legin A.: *Analytica Chimica Acta* 646, 111 (2009).
25. Gutiérrez M., Llobera A., Ipatov A., Vila-Planas P., Mínguez S., Demming S., Büttgenbach S., Capdevila F., Domingo C., Jiménez-Jorquera C.: *MDPI - Open Access Publishing, Sensors* 11, 4840 (2011).
26. Kovacs Z., Kantor D. B., Fekete A.: *Elelmiszervizsgalati Kozlemenyek* 54, 151 (2008).
27. Štípek S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing. Praha 2000.
28. Young S. I., Woodside V. J.: *J Clin Pathol* 54, 176 (2001).
29. Caballero B., Trugo L., Finglas P.: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Johns Hopkins University in Maryland. Maryland (2003).
30. Velišek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin II*. OSSIS. Tábor (2009).
31. Velišek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin I*. OSSIS. Tábor (2009).
32. Shahidi F.: *Baley's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons. (2005).
33. <http://class.fst.ohio-state.edu/fst821/Lect/AA.pdf>, staženo dne 20.4.2012.
34. Soucek D. M., Khattab T., Wu J.: *Progress in Organic Coatings* 73, 435 (2012).
35. Pokorný J.: *Eur.J.Lipid Sci. Technol.* 109, 629 (2007).

36. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, o potravinářských přídatných látkách.
37. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.
38. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003, o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat.
39. Vyhláška č. 356/2008 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech.
40. Lundebye A. K., Hove H., Mage A., Bohne V.J.B , Hamre K.: *Food Additives and Contaminants* 27, 1652 (2010).
41. Wexler F.: *Encyclopedia of Toxicology*. National Library of Medicine in Bethesda, Bethesda (2006).
42. European Food Safety Authority: *Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive*. EFSA Journal 9,2392 (2011), <http://www.efsa.europa.eu/cs/Satellite>, staženo 13.3.2012.
43. European Food Safety Authority: *Scientific Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive*, EFSA Journal 10,2588 (2012), <http://www.efsa.europa.eu/cs/Satellite>, staženo 13.3.2012.
44. Nakagawa Y., Tayama S.: *Arch Toxicol* 69, 204 (1995).
45. European Food Safety Authority: *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ethoxyquin*. EFSA Journal 8,1710 (2010), <http://www.efsa.europa.eu/cs/Satellite>, staženo 13.3.2012.
46. Saad B.: *Food Chemistry* 105, 289 (2007).
47. Mašková M., Vaňkátová V.: *Bulletin Ústředního a kontrolního ústavu zemědělského* 3, 34 (2009),
staženo: www.ukzuz.cz/Uploads/111634-7-Bulletin+NRL+32009pdf.aspx dne 29.4.2012.
48. Saad B., Sing Y. Y., Nawi M. A., Hashim N. H., Ali A. M., Saleh M. I., Sulaiman S. F., Talib K. M., Ahmad K.: *Food Chemistry* 105, 389 (2007).
49. Ding M., Zou J.: *Food chemistry* 131, 1051 (2012).
50. Medeiros R. A., Lourenção B. C., Rocha F. R. C., Fatibello F. O.: *Anal. Chem* 82, 8658 (2010).
51. Freitas K. H., Fatibello. F. O.: *Talanta* 81, 1102 (2010).

52. Yueqing Guan, Qingcui Chu, Liang Fu, Ting Wu, Jiannong Ye: *Food Chemistry* 94, 157 (2006).
53. Li X. Q., Ji Ch., Sun Y. Y. , Yang M. L., Chu X. G.: *Food Chemistry* 113, 692 (2009).
54. Tsuji S., Nakanoi M., Terada H., Tamura Y., Tonogai Y.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 46, 63 (2005).
55. Lee M. R., Lin Ch. Y., Li Z. G., Tsai T. F.: *J. Chrom. A* xxx, xxx (2006).
56. Pulido M. V., López B. G, Reyes J. F. G, Martos N. R. , Díaz A. M: *Talanta* 85, 1419 (2010).
57. López B. G., Reyesa J. F. G., Albab A. R. F., Díaz A. M.: *J.Chrom. A* 1217, 3736 (2010).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA – kyselina askorbová

BHA – butylhydroxyanizol

BHT – butylhydroxytoluen

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA – enzymaticky řízená

ESI – ionizace elektrosprejem

EQ – ethoxychin

FT – ICR – iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPTLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie na tenké vrstvě

IRMS – hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů

LC – kapalinová chromatografie

LG - laurylgalát

LOD – limit detekce

MALDI – desorpční ionizace laserem za přítomnosti matrice

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

NDGA - nordihydroguaiaretová kyselina

NMR – nukleární magnetická rezonance

OG – oktylgalát

PCR – polymerázová řetězová reakce

PG – propylgalát

RFLP – polymorfismus délek restrikčních fragmentů

SPE – extrakce tuhou fází

TOF – průletový analyzátor

