

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

Barviva v potravinovém průmyslu a jejich získávání

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Ivo Sural, Ph.D.

Vypracoval:

Štěpán Martinek

Lednice 2016

Zadání bakalářské práce

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: **Barviva v potravinovém průmyslu a jejich získávání** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Lednici dne 9. května 2016.

.....
Štěpán Martinek

PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování si zaslouží vedoucí bakalářské práce Ing. Ivo Sural, Ph.D., který mi poskytoval odborné rady a vedení ve všech fázích zpracování této bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	8
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
3.1 Přírodní a přírodně identická barviva	9
3.1.1 Polyenová barviva	11
3.1.1.1 Karoteny	11
3.1.1.2 Xanthofyly	12
3.1.2 Chinonová barviva	12
3.1.2.1 Benzochinony	12
3.1.2.2 Naftochinony	13
3.1.2.3 Antrachinony	13
3.1.3 Pteridinová barviva	13
3.1.4 Indolová barviva	14
3.1.5 Tetrapyrrolová barviva	15
3.1.5.1 Porfyrinová barviva	15
3.1.5.2 Fykobilinová barviva	16
3.1.6 Pyranová barviva	16
3.1.7 Karamely	17
3.2 Syntetická barviva	18
3.2.1 Azobarviva	18
3.2.2 Trifenylmethanová barviva	20
3.2.3 Xanthenová barviva	21
3.2.4 Chinolinová barviva	21
3.3 Získávání barviv – extrakce	22
3.3.1 Karoteny	23
3.3.2 Lutein	24

3.3.3	Lykopen.....	25
3.3.4	Annatto	25
3.3.5	Kurkumin.....	27
3.3.6	Košenila.....	27
3.3.7	Betanin.....	28
3.3.8	Chlorofyly a chlorofyliny	29
3.3.9	Anthokyany	30
3.4	Metody stanovení potravinářských barviv	32
3.4.1	Ultrafialová a viditelná spektrometrie	32
3.4.2	Chromatografické metody – kapalinová chromatografie (LC)	34
3.4.2.1	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	35
3.4.2.2	Papírová (PC) a tenkovrstvá (TLC) chromatografie.....	35
3.4.2.3	Iontově-výměnná chromatografie (IEC).....	35
3.4.2.4	Iontově-párová chromatografie (IPC).....	36
3.4.3	Elektromigrační metody – elektroforéza	36
3.4.3.1	Kapilární elektroforéza (CE)	36
3.4.4	Elektroanalytické metody – polarografie	37
3.4.4.1	Diferenční pulzní polarografie (DPP).....	37
3.5	Legislativa potravinářských barviv	38
3.5.1	Podmínky použití přídatných látek.....	39
3.5.2	Akceptovatelný denní příjem (ADI).....	40
3.5.3	Identifikace a označování potravinářských přídatných látek	41
4.	VLASTNÍ KOMENTÁŘ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE	43
5.	ZÁVĚR.....	44
6.	SOUHRN A RESUME.....	45
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46

1. ÚVOD

Potravinářská barviva jsou látky, které udělují potravině barvu, kterou by bez jejich použití neměla, nebo ji obnovují po příslušném technologickém procesu, kdy došlo k jejímu zeslabení nebo poškození. Barva potravin je důležitou vlastností, jelikož utváří první dojem u spotřebitele. Zákazník si spíše vybere sytě červený jahodový jogurt, než jahodový jogurt méně výrazně zbarvený, i když může obsahovat vyšší podíl jahod.

Existují dvě hlavní skupiny barviv. Barviva přírodní, včetně přírodně identických a barviva syntetická. Přírodní barviva patří mezi nejstarší přídavné látky, využívané při výrobě potravin. Jejich zdrojem jsou různé potravinářské suroviny nebo jiné přírodní materiály, rostlinného, živočišného nebo nerostného původu. Syntetická barviva se získávají chemickou syntézou, nejčastěji z vysoce přečištěných ropných produktů. Z důvodu levnější výroby a vyšší stálosti barev jsou syntetická barviva více využívána než barviva přírodní. Do potravin jsou barviva přidávána v nejrůznějších formách, mohou mít podobu prášku nebo se přidávají smíchané s jedlými tuky a oleji, případně v tekuté směsi s rozpouštědly. Naopak za potravinářská barviva se nepovažují látky, které se přidávají do potravin pro své aromatické, chuťové nebo výživové vlastnosti a mají vedlejší barvicí účinek a látky, určené k barvení nejedlých částí potravin.

S některými syntetickými barvivy jsou často spojovány různé nežádoucí účinky. Nejčastěji se jedná o dětskou hyperaktivitu, karcinogenitu, negativní působení na žaludeční sekreci a různé alergické reakce. Jde především o syntetická azobarviva. Nezbytná je kontrola dozorovými orgány, jak z hlediska množství barviva použitého v potravině tak i z hlediska obsahu jednotlivých barviv v potravinách. V posledních letech, kdy se značně zvyšuje zájem o zdravý životní styl, poptávka po přírodních barvivech stále stoupá.

2. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je zpracovat informace z oblasti potravinářských barviv. Vytvořit přehled potravinářských barviv, včetně jejich dělení. Popsat možnosti a technologické postupy získávání vybraných potravinářských barviv. Soustředit informace o možnostech detekce potravinářských barviv, včetně jejich stanovení pomocí instrumentální analýzy a nastínit legislativní aspekty potravinových barviv v České republice.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Obecně lze barevné látky rozdělit na barviva, která jsou obvykle zpracovatelná ve formě pravého či koloidního roztoku, jsou tedy rozpustná ve vodě nebo organických rozpouštědlech, a na laky. Laky jsou obvykle ve vodě nerozpustné pigmenty, které se v potravině rozptýlí a vytvoří disperzní směs. Používají se v potravinách založených na tučích či olejích nebo v potravinách, které pro rozpuštění běžných barviv neobsahují dostatek vody (například žvýkačky, bonbóny). Lakům vycházejícím z původní struktury barviv jsou připisovány stejné toxikologické vlastnosti, jako příslušným původním barvivům a měly by tedy mít i stejný vliv na lidské zdraví. Proto se laky označují stejnými E-kódy jako příslušná barviva a na etiketě se nerozlišují (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VRBOVÁ, 2001).

Použití daného barviva či laku pro určitou potravinu ovlivňují různé faktory. Jedná se především o fyzikální vlastnosti (pH, rozpustnost, odolnost vůči působení světla, kyslíku a teploty). Výběr může ovlivnit i typ obalového materiálu nebo trvanlivost potraviny. V neposlední řadě jsou to ekonomické, marketingové a legislativní aspekty (EMERTON, 2008).

Barviva lze dělit i podle barvy, způsobu vazby na materiál, biologické funkce v přírodním materiálu, fyzikálních vlastností a podobně. V této práci jsou barviva rozdělena dle zdroje (barviva přírodní, včetně přírodně identických a barviva syntetická) a chemické struktury.

3.1 Přírodní a přírodně identická barviva

Přírodní barviva jsou barevné látky, které syntetizují, akumulují či do prostředí vylučují živé buňky. Tyto látky jsou součástí potravin živočišného nebo rostlinného původu danou genetickými dispozicemi daného organismu. Mohou být také součástí jiných, než potravinářských materiálů přírodního původu (pigmenty hub, řas, lišejníků nebo mikroorganismů), ze kterých se získávají v původním stavu a jako takové, nebo strukturně pozměněné se využívají k barvení potravin.

Mezi přírodní barviva jsou obvykle řazeny také barvené látky, získané z přírodních surovin různými technologickými procesy, např. karamel a sladový extrakt, mědnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů, které se v přírodě nenacházejí (nebo jen v zanedbatelném množství). Neméně důležitými přírodními barvivy jsou anorganické látky (např.

uhličitan vápenatý, oxid železitý) a přírodně identická barviva, která jsou získávána chemickými reakcemi, avšak jejich struktura je identická s barvivy přírodními (VELÍŠEK, 2002).

V posledních letech se značně zvyšuje zájem o přírodní barviva. Velké množství přírodních barviv jsou běžně konzumovány jako součást každodenní stravy (anthokyany v ovoci, lutein a chlorofyly v listové zelenině aj.), a proto existuje názor, že musí být zdravotně nezávadné. Ve skutečnosti však nebylo provedeno takové množství pokusů, ověřujících zdravotní nezávadnost přírodních barviv, jako u barviv syntetických. Jejich odstín závisí na zdroji, ze kterého se barvivo získává (z důvodu, že barvivo není jen konkrétní látka ale směs barevných a doprovodných látek), metodě extrakce a čištění a řadě dalších faktorů.

Nevýhody přírodních barviv:

- Jsou náchylná k mikrobiální degradaci.
- Mají velkou proměnlivost barevných odstínů (liší se jednotlivé šarže).
- Jsou chemicky málo stabilní.
- Složení závisí na zdroji, geografickém původu a sezóně.
- Hrozí nebezpečí kontaminace nežádoucími toxickými kovy, insekticidy, herbicidy a mikroorganismy (KVASNIČKOVÁ, 2010).

Výhody přírodních barviv:

- Většinou jsou zdravotně nezávadná.
- Nezpůsobují alergické reakce, nebo jen minimálně.
- Jsou přirozeně přítomná v potravinách a jsou součástí každodenní stravy.
- Získávají se z obnovitelných zdrojů.
- Jsou běžně biologicky odbouratelné i z hlediska životního prostředí.

Přírodní a přírodně identická barviva se dle chemické struktury dělí na: polyenová barviva, chinonová barviva, pteridinová barviva, indolová barviva, tetrapyrrolová barviva a pyranová barviva.

3.1.1 Polyenová barviva

Polyenová barviva jsou nerozpustná či prakticky nerozpustná ve vodě. Jedná se o typicky lineární nenasycené konjugované uhlovodíky a jejich deriváty s většinou dvojných vazeb v konfiguraci *trans*. Mezi polyenová barviva řadíme karotenoidy, které hrají významnou roli v lidské výživě, jelikož mají funkci provitamínu A (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005).

Karotenoidy jsou velmi rozšířené oranžové a žluté pigmenty rostlin, hub, řas, mikroorganismů a živočichů. V rostlinách jsou karotenoidy asociovány s chlorofyly v chromoplastech, resp. chloroplastech (ŠIVEL a kol., 2013). Tyto látky lze rozdělit na dvě hlavní skupiny. Uhlovodíky, nazývané karoteny a kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, ketony aj.), které se nazývají xanthofyly (VELÍŠEK, 2002).

3.1.1.1 Karoteny

Karoteny (E 160a) jsou významná oranžová barviva, získávaná extrakcí rozpouštědlem z jedlých druhů rostlin, mrkve, rostlinných olejů, trávy, vojtěšky a kopřivy. Jsou přirozenou součástí lidské potravy a účinkují jako antioxidanty.

Beta-karoten (E 160aii) tvoří převážnou část karotenů, mohou zde však být přítomny i alfa-, gama-karoteny a další pigmenty. Jako potravinářské barvivo se většinou používá synteticky vyráběný beta-karoten. Přidává se do nápojů a sirupů s příchutí pomeranče, do zmrzlin, jogurtů, margarínů, sýrů atd. (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001).

Lykopen (E 160d) je nejjednodušším typem karotenů. Jedná se o červené barvivo nacházející se především v rajských jablkách a je také hlavním pigmentem šípků. Použití lykopenu je v České republice povoleno k barvení celé řady potravin, bohužel se ale prakticky nepoužívá (VELÍŠEK, 2002; VRBOVÁ, 2001).

Annatto (E 160b) je barvivo které má širokou škálu odstínu, od žluté přes červenou až po hnědou. Získává se z vnějších obalů semínek oreláníku barvířského (*Bixa orellana* L.). Hlavní barevnou složkou je bixin, monomethylester kyseliny diapokarotenové. Je rozpustný v olejích a používá se především pro barvení margarínů, mléčných výrobků, olejů a dalších potravin bohatých na tuky. V annattu je přítomen i demethylovaný produkt norbixin. Ten je rozpustný ve vodě a přidává se do dezertů, zmrzlin, pekařských výrobků, cukrovinek a do výrobků z obilnin. Využívá se také jako inkoust ke značení potravin a k barvení střívek uzenin (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VRBOVÁ 2001).

Kurkumin (E 100) je žluto-oranžové přírodní barvivo, pocházející z čerstvých i sušených oddenků kurkumy dlouhé (*Curcuma longa* L.). Využívá se k barvení mnoha potravin, například pekařských a mléčných výrobků, cukrovinek, žvýkaček, jogurtů, instantních polévek, hořčice a nealkoholických nápojů. Dováží se především z Indie, Číny, Pákistánu a označuje se též jako přírodní žlut' 3 nebo turmeric yellow (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VRBOVÁ, 2001).

3.1.1.2 Xanthofyly

Lutein (E 161b) je významné žluto-oranžové xanthofylové barvivo. Nachází se především v měsíčku lékařském (*Calendula officinalis* L.), v afrikánu (*Tagetes erecta* L.) a vaječném žloutku. Přidává se do zmrzlin, mléčných výrobků, nealkoholických nápojů a také do krmiv pro slepice, jelikož vylepšuje barvu vaječných žloutků.

Kapsorubin a Kapsanthin (E 160c) jsou oranžové až červené karotenoidní látky získávané z mletých lusků papriky roční (*Capsicum annuum* L.). Používají se jako barvivo do uzenin, jogurtů, brambůrek, instantních polévek a sýru (VRBOVÁ, 2001).

3.1.2 Chinonová barviva

Tato skupina barviv, čítající až 200 zástupců má široké spektrum barevnosti od žluté, červené, hnědé až po černou. Chinonová barviva se nacházejí v různých částech vyšších rostlin, houbách, lišejnících, bakteriích a řasách. Některá barviva této skupiny se mohou vyskytovat i v určitých druzích hmyzu. Jsou odvozeny od jednoduchých chinonů, jejich dimerů a trimerů, redukovaných forem a produktů kondenzace. Mají proměnlivou strukturu, vyznačující se navázanými dvěma atomy kyslíku na deriváty aromatické struktury, pomocí dvojných vazeb a vzájemně se liší počtem hydroxylových skupin a dalšími substituenty. Chinonová barviva mají dlouhou historii, používala se k barvení textilií a kůží, kdy se některé rostliny výhradně k tomuto účelu pěstovaly. Později je však nahradila syntetická barviva. Dnes se některá barviva využívají v kosmetickém, farmakologickém i potravinářském průmyslu (VELÍŠEK, 2002).

Chinony lze rozdělit do tří významných skupin:

3.1.2.1 Benzochinony

Základní sloučeninou je žlutý benzo-1,4-chinon, nacházející se v listech brusinky obecné (*Rhodococcus vitis-idaea* L.) a medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi* L.).

V menším množství se vyskytuje v některých obilovinách (pšenice, rýže) a ovoci (především v hruškách). V rostlinách se vyskytuje ve formě prekurzoru barviva, jako bezbarvý glukosid hydrochinonu zvaný arbutin. Hydrolýzou sacharidasami a oxidací aglykonu (ne-cukerného zbytku) vzniká z tohoto prekurzoru barevný benzo-1,4-chinon.

3.1.2.2 Naftochinony

Naftochinony jsou podobně jako benzochinony v rostlinách přítomny ve formě glykosidů nebarevných redukovaných forem. Barevné formy mohou vznikat hydrolýzou glykosidu a oxidací aglykonu nebo oxidací glykosidu a následnou hydrolýzou. Mezi hlavní zástupce patří žluto-oranžový lawson, získávaný z listů středomořského keře henny bílé (*Lawsonia inermis* L.). Červeno-hnědý pigment juglon je obsažen v listech a nezralých plodech ořešáku královského (*Juglans regia* L.).

3.1.2.3 Antrachinony

Mezi nejznámější jednoduché antrachinony patří žluto-oranžový alizarin a červený purpurin. Tyto pigmenty se nacházejí v kořenu mořeny barvířské (*Rubia tinctorum* L.), ve formě glykosidu označovaného jako suberythrin (VELÍŠEK, 2002).

Košenila (E 120) je zástupcem potravinářských barviv živočišného původu. Jedná se o červené barvivo, ze skupiny antrachinonů, označované též jako karmín, šarlat či magenta. Získává se ze sušených, oplodněných těl samiček červce nopálového (*Dactylopius coccus* C.). Tento hmyz žije jako parazit na kaktusech rodu *Opuntia* a *Nopalea*. Hlavní barevnou složkou košenily je kyselina karmínová, která se vyskytuje jako glukosid, jehož aglykonem je antrachinonový derivát nazývaný kyselina kermesová (VELÍŠEK, 2002). Košenila má celou řadu využití, jako barvivo se v potravinářském průmyslu používá pro barvení cukrovinek, jogurtů, instantních polévek, džemů a krabích tyčinek. Ve farmacii se využívá k barvení potahovaných tablet, v kosmetickém průmyslu, například v rtěnkách a očních stínech (VRBOVÁ, 2001).

3.1.3 Pteridinová barviva

Základní strukturou pteridinových pigmentů je pteridin – heterocyklická sloučenina se dvěma aromatickými jádry. Tato žlutá látka byla poprvé izolována v roce 1889 z křídel motýlů (*Lepidoptera* sp.). Pteridin substituovaný v poloze C-2 aminoskupinou a v poloze C-4 hydroxyskupinou se nazývá pterin. Poměrně vysoké koncentrace pterinů můžeme nalézt jako pigmenty u obojživelníků, plazů, ryb a hmyzu. K pterinům patří také řada

biologicky aktivních látek, například kyselina listová, která má funkci vitamínu. Významnými pteridinovými barvivy jsou žlutý xanthopterin, bílý leukopterin a červený erythropterin. Leukopterin je pigmentem bělásků (*Pieris* sp.) a některých vos (*Vespula* sp.), xanthopterin se nachází v křídlech žluťáka (*Gonepteryx* sp.) (VELÍŠEK, 2002).

Riboflavin (E 101) je přírodní či přírodně identické oranžovo-žluté barvivo. Jedná se o derivát pteridinu a je zároveň velice důležitý pro lidské zdraví, jelikož je vitamínem B2. Přirozeně se vyskytuje v mléce, másle, sýru a zabarvuje je do žluta. Riboflavin používaný v potravinářství obvykle není získáván z přírodních zdrojů, ale je vyráběn synteticky. Používá se k barvení tavených sýrů, cukrovinek, instantních polévek a ovocných nápojů. Většinou je však přidáván jako vitamín, méně často jako barvivo.

Riboflavin-5'-fosfát (E 101a) je lépe rozpustnou formou riboflavinu a po požití se rozkládá na riboflavin. Přidává se do zavařenin, mléčných výrobků a cukrovinek (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VRBOVÁ, 2001).

3.1.4 Indolová barviva

Základní strukturou indolových barviv je indol (aromatická heterocyklická sloučenina). Derivátem indolu je indigo, jedno z nejstarších, již ve starověku využívaných barviv. Bývalo ceněnou obchodní komoditou, používalo se především k barvení textilií. Jeho zdrojem jsou indigovníky (*Indigofera tinctoria* L.) či (*Indigofera suffruticosa* M.), a také v Evropě rostoucí rostlina, boryt barvířský (*Isatis tinctoria* L.). Indigo se v těchto rostlinách vyskytuje ve formě glykosidu, zvaného indikan. Po enzymové hydrolýze je indikan oxidován na indigo. Dibromindigo je bromový derivát indiga, purpurové barvivo, známé také jako antický purpur, získávané ze středomořského plže – ostranky jaderské (*Bolinus brandaris* L.) (VELÍŠEK, 2002).

Indigotin (E 132) je modré barvivo, získávané sulfonací surového indiga, za zvýšené teploty a za přítomnosti kyseliny sírové (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012). Barvivo se přidává do mléčných výrobků, zmrzlin a dalších cukrovinek. Má také využití v lékařství, kde se používá jako činidlo pro zbarvování moče, při testování funkce ledvin. Můžeme ho nalézt i v krmivech pro domácí zvířata.

Betanin (E 162) neboli řepná červeň, je barvivo získávané z kořenů červené řepy (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). Jelikož se jedná o málo stabilní látku, používá se především

k barvení potravin s kratší trvanlivostí, například mléčných a masných výrobků nebo ovocných náplní (VRBOVÁ, 2001).

3.1.5 Tetrapyrrolová barviva

Tetrapyrroly jsou významnou skupinou barviv, tvořených čtyřmi pyrrolovými jádry. Jádra jsou spojena v porfyrinovém kruhu pomocí methinových můstků (porfyrinová barviva), nebo jsou uspořádána lineárně (fykobilinová barviva).

3.1.5.1 Porfyrinová barviva

Porfyrinová barviva lze dělit na rostlinná barviva chlorofylová a živočišná barviva hemová. Chlorofyly jsou zelená barviva z rostlin, která se účastní fotosyntézy. Vyskytují se ve všech rostlinách, řasách a některých mikroorganismech. Základní struktury většiny chlorofylů tvoří cyklický 17,18-dihydroporfyrin, odvozený od protoporfyrinu IX. Součástí jejich struktury je chelátově vázaný hořčík, resp. hořečnatý iont. Pro potravinářství jsou nejvýznamnější chlorofyl *a* a chlorofyl *b*, které se vyskytují ve vyšších rostlinách v poměru 3:1, a jejich rozkladné produkty feofytiny (VELÍŠEK, 2002).

Chlorofyly a chlorofyliny (E 140) jsou barviva získávaná ze zelených rostlin, například vojtěšky, špenátu či kopřivy. Jsou nestálá a snadno se rozkládají vlivem světla a kyselin. Používají se jako barvivo do jogurtů, džemů, zmrzlin a těstovin.

Mědnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů (E 141) se získávají s přírodních zelených pigmentů chlorofylů a chlorofylinů, nahrazením hořečnatého iontu mědnatým iontem. Jsou stabilnější než původní chlorofyly a chlorofyliny a přidávají se do cukrovinek, nealkoholických nápojů a žvýkaček (VRBOVÁ, 2001).

Hemová barviva jsou barviva živočišných tkání. Nejvýznamnější jsou metaloproteiny – myoglobin (červené barvivo svalové tkáně) a hemoglobin (barvivo červených krvinek). Červený hem z hemoglobinu se účastní přenosu kyslíku a je v organismu vázán na bílkoviny, např. globin přes histidinový zbytek. Strukturně podobný je myoglobin, který je odpovědný za více než 90 % barevnosti masa. Koncentrace myoglobinu v mase je proměnlivá a závisí nejen na druhu zvířete, ale také na jeho věku a druhu svaloviny (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VELÍŠEK, 2002).

3.1.5.2 Fykobilinová barviva

Fykobiliny jsou fotosyntetická barviva, vyskytující se zejména u zástupců sinic, skrytěk, rozsivek, hnědých řas, ruduch a krásnooček. Obecně se jedná o pigmenty, které mají svou stavbu podobnou žlučovým barvivům, vznikajícím u živočichů rozkladem hemu. Fykobiliny tvoří komplexy s proteiny, které se označují jako fykobiliproteiny. Podle barevnosti se dělí na modré fykokyaniny, červené fykoerythryny a lehce modré all- ofykokyaniny (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; Gate2Biotech, 2005).

3.1.6 Pyranová barviva

Mezi nejvýznamnější pyranová barviva patří anthokyany (E 163), obecně se vyskytující jako glykosidy. Mezi anthokyany řadíme kyanidin, mající v kyselém prostředí červenou barvu. Vyskytuje se v květech růže (*Rosa* sp.), plodech třešně (*Cerasus avium* L.) a brusinky (*Vaccinium vitis-idaea* L.). V alkalickém prostředí má kyanidin barvu modrou, např. chrpa (*Cyanus segetum* H.). Dalšími zástupci jsou červený pelargonidin z pelargonii (*Pelargonium* sp.), hnědý delfinidin z červeného vína, peonidin z tmavočervených pivonek (*Paeonia officinalis* L.) a červeno-hnědý malvidin z prvosenek (*Primula* sp.). Anthokyany se využívají k barvení řady potravin, především kyselých, kde je jejich zbarvení nejsytější. Získávají se zejména ze slupek červených hroznů a bezinek (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VRBOVÁ, 2001).

Další významnou skupinou pyranových barviv jsou flavonoidy. Jedná se o velice rozsáhlou skupinu, čítající až 4000 zástupců. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu (HANUŠTIK a kol., 2007). Podle stupně oxidace C řetězce rozlišujeme 7 podtříd flavonoidů (katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, anthokyanidiny, flavonoly a flavony). Žluto-oranžový kvercetin je flavonol, mající široké spektrum účinků, pomáhajících proti nemocem. Ve vysokých koncentracích se vyskytuje především v cibuli (až 300 mg/kg), jablcích, kapustě, červeném víně, zeleném a černém čaji. Je stálý, tepelnou úpravou nebo mražením se neničí. Hesperidin je žlutý flavanon, patřící do skupiny tzv. „citrusových“ flavonoidů. Typicky se vyskytuje v citrusech, odkud byl také poprvé izolován (Bezpečnost potravin A-Z, 2013). Katechiny a leukoanthokyanidiny jsou bezbarvé látky, avšak hnědé pigmenty, které z nich vznikají v reakcích enzymatického hnědnutí, jsou barvivy řady potravin. Luteolin je žlutý flavon, nacházející se ve formě 5-glukosidu v semenech jestřabiny lékařské (*Galega officinalis* L.) a ve formě

7-glukosidu v řebříčku obecném (*Achillea millefolium* L.) (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VELÍŠEK, 2002).

Santalové dřevo (E 166) je barvivo řadící se do skupiny isoflavonů. Hlavními barevnými látkami jsou zde oranžovo-červená až fialová barviva, označovaná jako santalin A, B a C. Santal bílý (*Santalum album* L.) je strom rostoucí především v Indii a Indonésii, odkud se také vyváží v množství až 50 tun ročně. V České republice je jeho používání pro potravinářské účely zakázané (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005; VRBOVÁ, 2001).

3.1.7 Karamely

Karamel (E 150) je jedním z nejpoužívanějších barviv v potravinovém průmyslu, kde je nejvíce známý barvením kolových nápojů. Karamely vznikají zahříváním cukrů (glukozový sirup, sacharóza, dextróza). Rozeznáváme čtyři druhy karamelu, podle toho, jaké katalyzátory byly použity při jejich výrobě. Každý typ karamelu je vhodný pro jiné využití. **Jednoduchý karamel** (E 150a) neboli kulér, se přidává do vysokoprocenních alkoholických nápojů. **Kaustický sulfitový karamel** (E 150b) se využívá k barvení alkoholických nápojů obsahujících taniny a sladového chleba. **Amoniakový karamel** (E 150c) se používá v pivu, pečivu a omáčkách. **Amoniak-sulfitový karamel** (E 150d) se přidává do nealkoholických nápojů a kyselých potravin (CHAPMAN, 2011).

3.2 Syntetická barviva

Syntetická barviva se dnes získávají z vysoce přečištěných ropných produktů, na rozdíl od minulosti, kdy se pro jejich výrobu využíval uhelný dehet. Syntetická barviva musí obsahovat minimálně 85 % čistého barviva (pro potravinářský průmysl), zbytek mohou tvořit sloučeniny kovů, organické látky a anorganické soli (KLESCHT a kol., 2006).

Výhody syntetických barviv:

- Neovlivňují vůni a chuť potravin.
- Většinou mají intenzivnější barvu než přírodní.
- Jsou levnější a stabilnější než přírodní barviva.
- Lze u nich zajistit stálý odstín barvy.
- Různými kombinacemi jednotlivých barviv, lze získat řadu odstínů.

Nevýhody syntetických barviv:

- Syntetická barviva (především azobarviva) jsou často spojována s některými reakcemi přecitlivělosti (především kožní a dýchací projevy) a negativními projevy u dětí (hyperaktivita).
- UV záření může způsobovat odbarvení některých barviv (erythrosin).
- Nejčastější zástupci syntetických barviv (azobarviva) se snadno redukuje ionty kovů a některými redukčními činidly (např. kyselinou askorbovou nebo oxidem siřičitým) na bezbarvé produkty (KVASNIČKOVÁ, 2010).

Syntetická barviva se dle chemické struktury dělí na: azobarviva, trifenylmethanová barviva, xanthenová barviva a chinolinová barviva.

3.2.1 Azobarviva

Azobarviva jsou syntetické sloučeniny obsahující azoskupinu, tedy dva atomy dusíku vázané dvojnou vazbou ($-N=N-$). Většina azobarviv obsahuje pouze jednu azoskupinu (monoazobarviva), některé ale obsahují dvě (diazobarviva), tři (triazobarviva) nebo více azoskupin (polyazobarviva). Azobarviva mají širokou škálu barev, od žluté až po černou a představují 60-70 % všech barviv používaných v potravinách (Food-info, 2001a).

Žlut' SY (E 110) je žluto-oranžové barvivo, složené z 2-hydroxy-1-(4-sulfonafenylo)naftalen-6-sulfonanu disodného a vedlejších barevných látek, dohromady s chloridem sodným nebo síranem sodným. Nejčastěji se používá v hořčicích, pudincích, sušenkách a bonbonech (BABIČKA, 2012; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

Azorubin (E 122) je červené barvivo, v zásadě složené z 4-hydroxy-3-(4-sulfonafenylo)naftalen-1-sulfonanu disodného a dalších vedlejších barevných látek. Využívá se k barvení řady potravin, především pudinků, cukrovinek a lahůdek (BABIČKA, 2012; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

Amarant (E 123) je modro-červené barvivo složené z 2-hydroxy-1-(4-sulfonafenylo)naftalen-3,6-disulfonanu trisodného a vedlejších barevných látek. V ČR je povolen k barvení aperitivních vín, lihovin, rybích jiker a mlíčí (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001).

Ponceau 4R (E 124) je červené barvivo, složené z 2-hydroxy-1-(4-sulfonafenylo)naftalen-6,8-disulfonanu trisodného a jiných vedlejších barevných látek. Tato velice často používaná červeň je obvykle obsažena v pudincích, cukrovinkách a sladkém pečivu (BABIČKA, 2012; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

Červeň Allura AC (E 129) je složena z 2-hydroxy-1-(2-methoxy-5-methyl-4-sulfonafenylo)naftalen-6-sulfonanu disodného a dalších vedlejších barevných látek. Nachází se v nápojích a práškových směsích pro výrobu nápojů, bonbonech, dezertech a dalších cukrovinkách. Allura AC se také používá pro označování masa a masných výrobků (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001; Vyhláška č. 304/2004 Sb.).

Čerň BN (E 151) se skládá z 4-acetamido-5-hydroxy-6-[7-sulfonafenylo)naftalen-1,7-disulfonanu tetrasodného a dalších barevných látek. Používá se v polevách, omáčkách, zavařeninách, cukrovinkách a alkoholických i nealkoholických nápojích (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001).

Hněd' FK (E 154) je směs šesti syntetických azobarviv s jinými barvivy, chloridem sodným nebo síranem sodným. Toto barvivo je povolené pouze pro barvení uzených ryb (VRBOVÁ, 2001; Vyhláška č. 4/2008 Sb.).

Hněd' HT (E155) je červeno-hnědé barvivo, složené z 4,4'-(2,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-1,3-fenylenbisazo)di(naftalen-1-sulfonanu) disodného a vedlejších barevných látek. Díky svým čokoládovým odstínům je využíváné především pro barvení sypkých

směsí na výrobu čokoládových bábovek a dalších sladkostí. Hněď HT je povolena k označování masa a masných výrobků (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001; Vyhláška č. 4/2008 Sb.).

Litholrubin BK (E 180) je červené barvivo, chemicky složené z 3-hydroxy-4-(4-methyl-2-sulfonanofenylazo)-2-naftalenkarboxylanu vápenatého a vedlejších barevných látek. Litholrubin BK je povolen pouze pro barvení jedlých povrchových vrstev sýrů (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; Vyhláška č. 4/2008 Sb.).

Tartrazin (E 102) je oranžové barvivo, připravované z 4-amino-benzensulfonové kyseliny, která se diazotuje pomocí kyseliny chlorovodíkové a dusitanu sodného. Chemicky se označuje jako 5-hydroxy-1-(4-sulfonanofenyl)-4-(4-sulfonanofenylazo)-*H*-pyrazol-3-karboxylát. Tartrazin se používá k barvení mnoha druhů potravin, například mléčných a pekařských výrobků, polévek, omáček, hořčice, alkoholických a nealkoholických nápojů, žvýkaček a cukrovinek. Slouží také k barvení krmiv pro domácí zvířata. Tato látka je nejčastěji spojována s různými nežádoucími účinky, především s dětskou hyperaktivitou (KLESCHT a kol., 2006; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

3.2.2 Trifenylmethanová barviva

Trifenylmethanová barviva byla především v minulosti hojně využívána díky svým neobyčejně jasným a brilantním odstínům. Tyto sloučeniny však rovněž vykazují baktericidní účinky. Intenzita zbarvení těchto látek vyplývá ze skutečnosti, že jejich chromoforem je trifenylmethylový karbokation, stabilizovaný kladným konjugačním efektem amino-, alkylamino- či dialkylaminoskupin (HAMPL, PALEČEK, 2012).

Patentní modř V (E 131) je tmavě modré barvivo, složené ze sloučenin vápníku nebo sodíku v komplexní soli s vnitřní solí [4-(α -(4-diethylaminofenyl)-5-hydroxy-2,4-disulfonofenyl-methyliden)2,5-cyklohexadien-1-yliden]diethylamonného hydroxidu a vedlejších barevných látek. Používá se spíše ojediněle, pro barvení žvýkaček, sladkostí a nápojů. V medicíně se využívá k barvení lymfatických cév (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001).

Brilantní modř FCF (E 133) je chemicky složená z α -(4-(*N*-ethyl-3-sulfonanobenzylamino)fenyl- α -(4-*N*-ethyl-3-sulfonanobenzylamino)cyklohexa-2,5-dienyliden)toluen-2-sulfonanu disodného, jeho izomerů a vedlejších barevných látek. Často se používá

v kombinaci s jinými syntetickými barvivy, přidává se do nealkoholických nápojů, cukrářských a pekařských výrobků. Tato látka je rovněž povolena jako barvivo k označování masa a masných výrobků (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001; Vyhláška č. 304/2004 Sb.).

Zeleň S (E 142) je modro-zelené barvivo, složené z natrium-*N*-[4-[[4-(dimethylamino)fenyl](2-hydroxy-3,6-disulfo-1-naftalenyl)methylen]-2,5-cyklohexadien-1-yliden]-*N*-methylmethanaminia a vedlejších barevných látek. Obvykle se používá v kombinaci se žlutým barvivem, ve zmrzlínách, dezertech a dalších sladkostech (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; VRBOVÁ, 2001).

3.2.3 Xanthenová barviva

Xantheny mají široké spektrum barev, od žluté, červené až po modrou. Jsou charakteristické přítomností xanthenové struktury (kyslíkatá tricyklická sloučenina). Kromě potravinářství se xanthenová barviva používají i jako fluorescenční indikátory a laserová barviva (TCI Chemicals, 2013).

Erythrosin (E 127) je sytě červené barvivo, složené z monohydrátu 2-(2,4,5,7-tetra-jodo-3-oxido-6-oxoxanthen-9-yl)benzoátu disodného a vedlejších barevných látek. V České republice je erythrosin povolen pouze pro barvení koktejlových a kandovaných třešní, včetně ovocných salátů a nápojů, obsahujících třešně (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; Vyhláška č. 4/2008 Sb.).

3.2.4 Chinolinová barviva

Chinolinová žlut' SY (E 104) se připravuje sulfonací 2-(2-chinoly)indan-1,3-dionu nebo směsi obsahující přibližně dvě třetiny 2-(2-chinoly)indan-1,3-dionu a jednu třetinu 2-[2-(6-methylchinolyly)]indan-1,3-dionu. Skládá se ze sodných solí směsi disulfonanů (v prvé řadě), monosulfonanů a trisulfonanů výše uvedených sloučenin a vedlejších barevných látek. Chinolinová žlut' SY se nachází v energetických nápojích, bonbonech, čokoládových tyčinkách, pudincích a dalších cukrovinkách (BABIČKA, 2012; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

3.3 Získávání barviv – extrakce

Extrakce je základní separační metoda, využívaná k získávání potravinářských barviv. Při extrakci se jedna či více kapalných nebo pevných složek rozpouští v kapalině, která se s původní směsí nemísí, nebo se mísí jen omezeně. Na rozdíl od destilace, sublimace a krystalizace lze extrakci použít pro získání tepelně nestálých látek, protože se může provádět za laboratorní teploty nebo za chladu. Platí, že opakovaná extrakce menším množstvím rozpouštědla je účinnější než jedna extrakce celým množstvím rozpouštědla. Extrakce probíhá pomocí extrakčního činidla (rozpuštědla), které by nemělo být toxické, korozivní a hořlavé, s ohledem na zbytkový obsah v získaném barvivu. Při výběru činidla bývá také rozhodujícím faktorem snadnost jeho regenerace z roztoku (jak z hlediska toxicity, tak i technologicko-ekonomické stránky). Část suroviny, která se rozpustí v extrakčním činidle, se označuje jako extrakt. Zbylá část, ochuzená o podíl přešlý do extraktu se nazývá rafinát (SCHREIBEROVÁ, 2011).

Rozlišujeme několik základních způsobů extrakce:

- Extrakce z pevné fáze do kapaliny.
 - **Macerace** je nejjednodušší metoda extrakce, probíhající za nezvýšené teploty, při které se tuhá surovina zalévá rozpouštědlem a po vyluhování se filtruje. Macerace může být buď jednostupňová, kdy se objem rozpouštědla nemění, nebo vícestupňová, kdy se rozpouštědlo periodicky obměňuje.
 - **Digesce** je macerace za zvýšené teploty. Zahřátím se zvyšuje rychlost extrakce, může ale docházet k rozkladu termolabilních látek, mezi něž patří i barviva.
- Extrakce z kapalně fáze do kapaliny.
 - **Vytřepávání** slouží k převodu látek z jednoho rozpouštědla do druhého, na základě rozdílné rozpustnosti látek v obou rozpouštědlech. Rozlišujeme jednoduché vytřepávání, kdy se využívá pouze jeden podíl rozpouštědla a opakované vytřepávání, s použitím více menších podílů rozpouštědla. Vytřepávání se provádí v dělicí nálevce.
 - **Perforace** je kontinuální extrakce kapalin. Je časově náročnější, avšak účinnější než vytřepávání. Perforace se provádí v tzv. perforátoru (ZSHK, 2013).

- Superkritická fluidní extrakce (SFE).

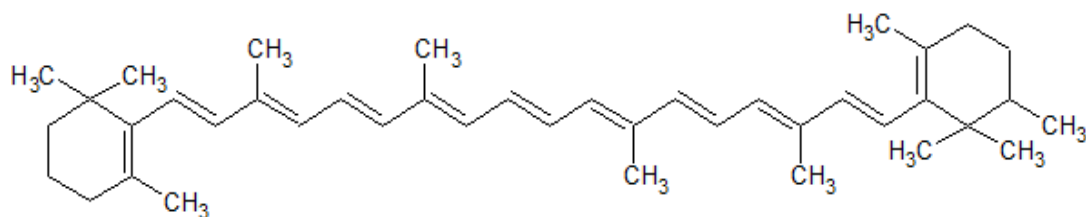
SFE je metoda extrakce, kde extrakčním činidlem je tekutina v superkritickém (nadkritickém) stavu. Superkritická tekutina je látka, která se nachází ve stavu nad svým termodynamickým kritickým bodem, tzn. nad kritickou teplotou a kritickým tlakem. Tekutiny v superkritickém stavu mají vlastnosti mezi plynem a kapalinou, jsou dobře stlačitelné a lze snadno měnit jejich hustotu, která se u nadkritických tekutin blíží kapalinám, přičemž difuze se blíží plynům. Nejčastěji se pro superkritickou extrakci používá oxid uhličitý. Superkritickou extrakci oxidem uhličitým lze využít k extrakci barviv, antioxidantů, vitamínů, antimikrobiálních i aromatických látek (SINGH a AVULA, 2012).

3.3.1 Karoteny

Proces získávání a purifikace karotenů ze surového palmového oleje je rozdělen do několika kroků. Nejprve jsou karoteny extrahovány ze surového palmového oleje během interesterifikace. Karoteny se poté koncentrují na obsah větší než 20 % molekulární destilací. Nakonec mohou být karoteny čištěny od vosků, tuků, olejů, pomocí kapalinové chromatografie na silikagelových kolonách (EMERTON, 2008).

Karoteny mohou být také získávány extrakcí éterickými oleji z řas (*Dunaliella salina* T.), rostoucích ve velkých slaných jezer oblasti Whyalla v Jižní Austrálii. V obou případech je výsledným produktem 20–30% suspenze v rostlinném oleji. Olejová suspenze může být rozptýlena ve vodě, společně s emulgátory a antioxidanty, za vzniku emulze (kdy se v dispergované olejové fázi nachází vlastní karoteny). Karotenový prášek vzniká sušením na nosiči, kterým může být modifikovaný škrob nebo maltodextrin (EMERTON, 2008; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

Beta-karoten sice není nejrozšířenějším karotenoidem v přírodě, ale je pravděpodobně nejznámějším karotenoidem využívaným jako potravinářské barvivo. Jakožto uhlovodík je karoten přirozeně rozpustný v oleji. Beta-karoten se nejčastěji získává fermentací směsných kultur hub (*Blakeslea trispora* T.). Beta-karoten se extrahuje z biomasy ethylacetátem nebo isobutylacetátem, následně propan-2-olem a poté se nechá vykrytalizovat. Vykrytalizovaný produkt obsahuje především all-*trans* izomery a jeho čistota je vyšší než 96 % (EMERTON, 2008; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

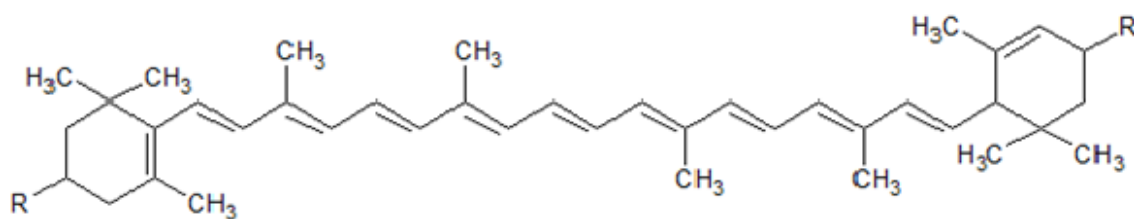


Obrázek 1: *Strukturní vzorec β -karotenu* (EMERTON, 2008)

3.3.2 Lutein

Lutein se získává extrakcí několika možnými rozpouštědly: methanolem, ethanolem, propan-2-olem, hexanem, acetonem, methylethylketonem nebo oxidem uhličitým, buď jako vedlejší produkt při extrakci chlorofylů, nebo přímou extrakcí ze sušených a rozemletých květů aksamitníku vzpřímeného (*Tagetes erecta* L.). Hlavní barevný základ se skládá z karotenoidů, z nichž převážnou část tvoří lutein a jeho estery mastných kyselin. Mohou být přítomny i vosky, oleje a tuky, pocházející z výchozího materiálu.

Typický luteinový extrakt obsahuje 10 % luteinu (především ve formě esteru), přestože rafinací může být dosaženo až 30% koncentrace. Lutein je ve své volné nebo esterifikované formě rozpustný v oleji, proto se ředění provádí rostlinnými oleji. Během technologického procesu se vlivem světla, vzdušného kyslíku a kyselin katalyzuje izomerie *trans*-luteinu na *cis*-lutein. Výrobci luteinu pro komerční účely nabízí lutein nebo lutein ester v práškové nebo olejové formě (EMERTON, 2008; ŠIVEL a kol., 2013).



Lutein (R = OH) Lutein ester (R = mastná kyselina)

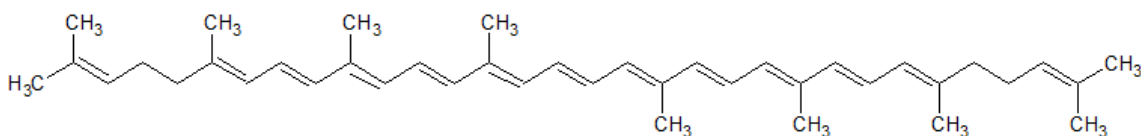
Obrázek 2: *Strukturní vzorec luteinu a jeho esteru mastné kyseliny* (EMERTON, 2008)

3.3.3 Lykopen

Lykopen lze získávat extrakcí pomocí rozpouštědel ze zralých rajčat (*Lycopersicon esculentum* L.), které jsou nejbohatším přírodním zdrojem lykopenu. Lykopen lze dle legislativy extrahovat pomocí těchto rozpouštědel: oxid uhličitý, ethylacetát, aceton, propan-2-ol, ethanol, methanol a hexan. V praxi se však nejčastěji extrahuje z rajčatové dužiny pomocí ethylacetátu nebo hexanu. Rozpouštědlo se následně odstraní odpařením a vzniká koncentrovaný lykopen oleoresin (EMERTON, 2008).

Lykopen se získává i z hub (*Blakeslea trispora* T.), extrakcí z houbové biomasy, kdy je následně pročištěn pomocí krystalizace a filtrace. Jedinými rozpouštědly povolenými při výrobě jsou propan-2-ol a isobutylacetát a to vzhledem k nařízení Komise (EU) č. 231/2012.

Lykopen lze vyrábět i synteticky, Wittigovou kondenzací syntetických meziproductů běžně používaných při výrobě ostatních karotenoidů pro potravinářský průmysl. Syntetický lykopen je směs geometrických izomerů lykopenu, složených především z all-*trans*-lykopenu, 5-*cis*-lykopenu a menších množství dalších izomerů. Komerční lykopenové přípravky určené pro potravinářské účely mají formu suspenzí v rostlinných olejích nebo prášku dispergovatelného ve vodě (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).



Obrázek 3: Strukturální vzorec all-*trans*-lykopenu (EMERTON, 2008)

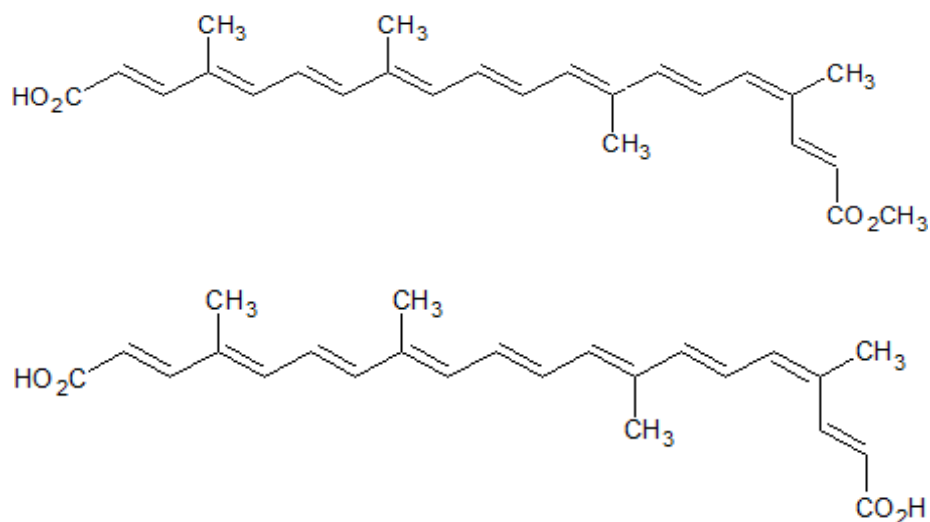
3.3.4 Annatto

Annatto je barvivo, získávané z vnějších obalů semen oreláníků barvířského (*Bixa orellana* L.). Oreláník je tropická rostlina, pocházející původem z Jižní Ameriky, v současnosti se pěstuje i v dalších tropických oblastech, jako je Indie, Východní Afrika a Jamajka. Hlavními zdroji oreláníku využívaného ke komerčním účelům jsou Peru, Brazílie a Keňa, které dohromady zajišťují většinu světové produkce. Dominantními barevnými složkami semen annatto jsou diapo-karotenoidy s 25 atomy uhlíku v molekule, bixin a norbixin, které jsou zastoupené v *cis* i *trans* izomerní formě (EMERTON, 2008). V současné době existují tři hlavní komerční způsoby extrakce barviv ze semen annatto, a to extrakce rozpouštědly, alkalická extrakce a extrakce rostlinnými oleji. Při extrakci semen

rostlinnými oleji (za sníženého tlaku, při teplotě do 130 °C) dochází k částečné izomerizaci 9'-*cis*-bixinu na all-*trans* izomer zvaný *trans*-bixin. Extrakty obsahují 0,2 až 0,5 % směsi obou pigmentů v různých poměrech, v závislosti na podmínkách extrakce. Vzniklý *trans*-bixin je červený, v tučích poměrně dobře rozpustný a relativně stabilní pigment (VELÍŠEK, 2002).

Bixin lze také získávat extrakcí rozpouštědly, kterými mohou být hexan, aceton, methanol, dichlormethan nebo oxid uhličitý. Po extrakci dochází k odstranění rozpouštědla. Bixinový prášek obsahuje několik barevných složek, z nichž hlavní látkou je bixin, vyskytující se v obou formách, *cis* i *trans* (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).

Norbixin se získává extrakcí semen annatto vodným roztokem zásad (hydroxid sodný nebo draselný) při teplotách do 70 °C. Norbixin, neboli 9'-*cis*-norbixin je oranžová, v polárním prostředí rozpustná, dikarboxylová kyselina. Její izomerizací vzniká v tučích málo rozpustný, červeně zbarvený all-*trans*-norbixin. Během extrakce dochází také k rozkladu 9'-*cis*-bixinu na oranžové až světle žluté produkty. Hlavním produktem je 14-methylhydrogen-4,8-dimethyltetradeka-2,4,6,8,10,12-hexaen-1,14-diová kyselina. Tato sloučenina se vyskytuje v různých stereoizomerech, jako all-*trans* izomer, 15-*cis*-, 13-*cis*- a 9-*cis* izomer. Vznikají i další příbuzné sloučeniny s 18 a 13 atomy uhlíku v molekule, *m*-xylen, toluen aj. (VELÍŠEK, 2002).

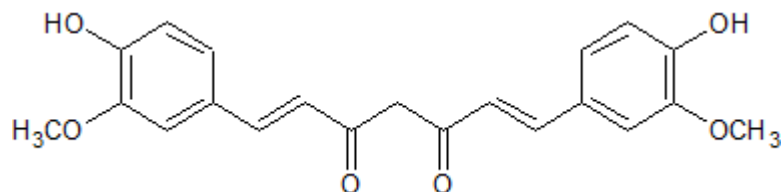


Obrázek 4: Strukturní vzorec *cis*-bixinu a *cis*-norbixinu (EMERTON, 2008)

3.3.5 Kurkumin

Kurkumin se získává z usušené hlízy nebo oddenků rostliny kurkumy dlouhé (*Curcuma longa* L.). Kurkumin se extrahuje rozpouštědlem z rozemletých hlíz, v několika krocích, za účelem získání vysoce purifikovaného kurkuminu, o čistotě vyšší než 90 %. Primární extrakcí v rozpouštědle se získá výtažek, obsahující přibližně 35–40 % kurkuminu, spolu s aromatickými látkami a vosky. Výtažek může být následně zpracováván další extrakcí rozpouštědly, při které se odstraní charakteristická pikantní chuť a vůně. Aby se získal koncentrovaný kurkuminový prášek, extrakt se pročišťuje krystalizací (EMERTON, 2008; CHAPMAN, 2011).

Výrobek se skládá z kurkuminů, tj. barevného základu látek 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dionu a jeho dvou derivátů bez methoxy skupiny, a to v různém poměru. Může obsahovat také menší množství olejů a pryskyřic, které se v kurkumě přirozeně vyskytují. Kurkumin se také využívá jako hliníkový lak; kdy obsah hliníků je nižší než 30 %. Pro extrakci jsou povolena pouze tato rozpouštědla: oxid uhličitý, aceton, octan ethylnatý, *n*-butanol, ethanol, methanol, dichlormethan, propan-2-ol a hexan (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).



Obrázek 5: *Strukturní vzorec kurkuminu* (EMERTON, 2008)

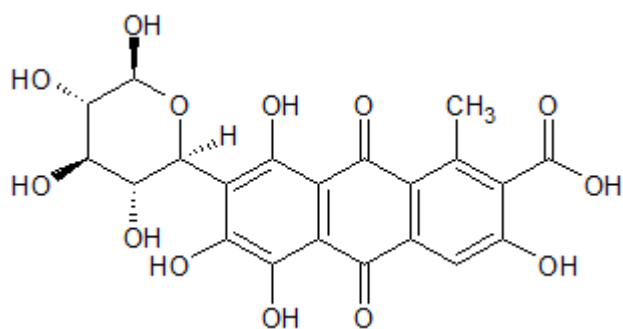
3.3.6 Košenila

Karmíny a kyselina karmínová se získávají z vodných, vodně alkoholických nebo alkoholických extraktů košenily, pocházející ze sušených těl samiček červce nopálového (*Dactylopius coccus* C.). Tento hmyz se vyskytuje na určitých odrůdách kaktusů rodu *Opuntia* a *Nopalea*, rostoucích na Kanárských ostrovech, v Chile a Peru (EMERTON, 2008). Hmyz se usmrcuje ponořením do horké vody, působením slunečního záření, parou nebo teplem. Následně musí být hmyz vysušen na 30 % své původní tělesné hmotnosti, aby nedošlo k rozkladu těl. Na výrobu 1 kg košenily je třeba přibližně 155 000 kusů těl červce nopálového (Food-info, 2001b).

Kyselina karmínová se vyrábí extrakcí horkou zásadou a následnou filtrací, sloužící

k odstranění nečistot. Kyselina karmínová snadno tvoří komplexy s kationty hliníku při vysokých teplotách, za vzniku hliníkových laků (karmínů), ve kterých se předpokládá přítomnost hliníku a kyseliny karmínové v molárním poměru 1:2. Karmín je rozpustný ve studené vodě i zředěných kyselinách, mírně rozpustný v alkoholu a dobře rozpustný ve zředěných alkalických roztocích. Vyznačuje se také extrémní stabilitou vůči teplu, světlu a oxidaci.

V komerčních výrobcích je barevným základem sůl karmínové kyseliny, kdy možnými kationty jsou: amonný, draselný, sodný či vápenatý a to včetně jejich kombinací. Komerční výrobky mohou obsahovat částečně bílkovinný materiál, pocházející z původního hmyzu, dále volné karmíny a malé množství nevázaných hliníkových kationtů (EMERTON, 2008; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).



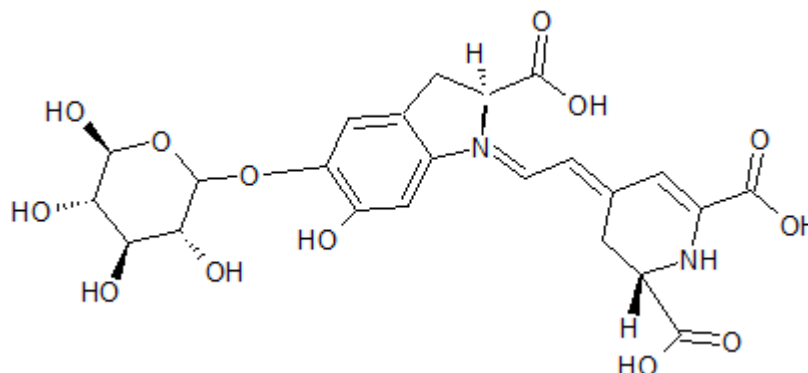
Obrázek 6: *Strukturní vzorec kyseliny karmínové (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005)*

3.3.7 Betanin

Betanin se vyrábí z kořenů červené řepy (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.), lisováním rozdrcené řepy ve formě vylisované šťávy nebo vodnou extrakcí rozsekaných kořenů řepy a následným obohacením aktivní látkou (např. kyselinou askorbovou). Získaná šťáva je následně podrobena ultrafiltraci a pasterizaci. Šťáva obsahuje 0,4–1,0 % betaniu a zahušťuje se na hodnotu 70 ° Brix (jednotka vyjadřující obsah rozpustné sušiny v roztoku). Koncentrát může být poté sušen v rozprašovací sušárně na nosiči (maltodextrin), za vzniku prášku obsahujícího přibližně 0,35 % betaninu.

Barvivo se skládá z různých látek, všechny patří do třídy betalainů. Hlavní barevný základ se skládá z betakyaninů (červená), ve kterých betanin tvoří 75–95 %. Mohou být přítomna i menší množství betaxanthinu (žlutá) a rozkladné produkty betalainů (světle hnědá). Barevný odstín se může značně lišit, v závislosti na odrůdě plodiny a stáří červené

řepy. Kromě barevných látek obsahuje šťáva nebo extrakt cukry, soli a bílkoviny přirozeně se vyskytující v červené řepě (EMERTON, 2008; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).



Obrázek 7: *Strukturní vzorec betaninu* (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005)

3.3.8 Chlorofyly a chlorofyliny

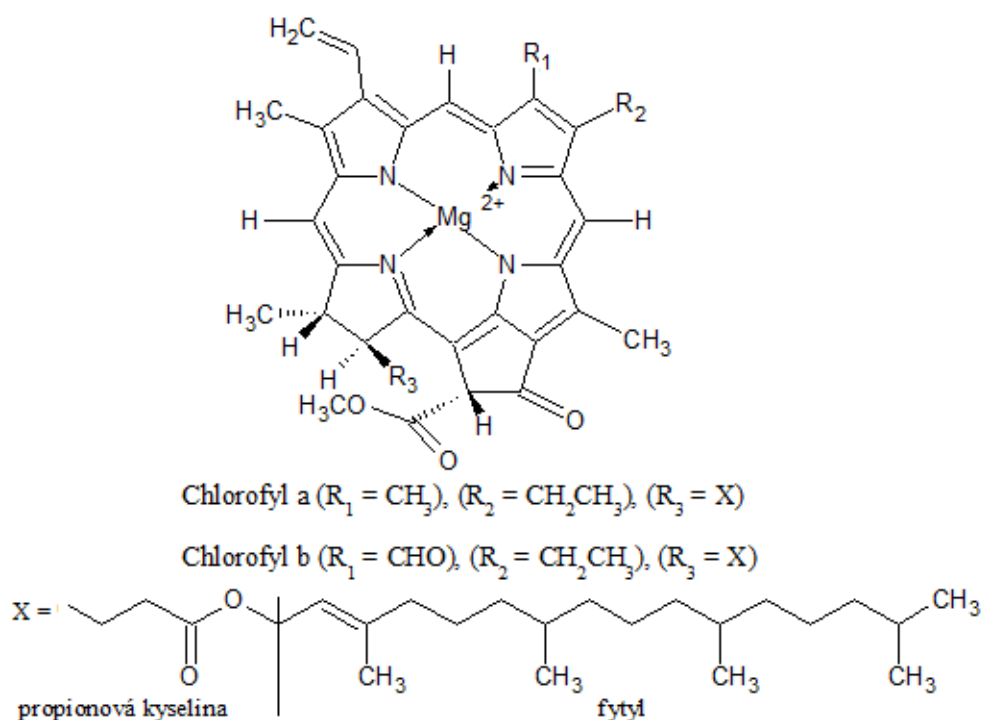
Chlorofyly se získávají extrakcí rozpouštědlem, z trávy, vojtěšky, kopřivy a dalších rostlinných materiálů. Po extrakci dochází k postupnému odstraňování rozpouštědla, kdy se může přirozeně přítomný hořčík z koordinační sloučeniny chlorofylů odstranit a to z části či zcela, aby vznikly odpovídající feofytiny. Hlavními barevnými látkami jsou feofytiny a chlorofyly. Extrahovaný produkt, ze kterého bylo odstraněno rozpouštědlo, obsahuje i karotenoidy, přítomny jsou také vosky, oleje a tuky pocházející z výchozího rostlinného materiálu. Pro extrakci lze použít následující rozpouštědla: aceton, dichlormethan, ethanol, methanol, propan-2-ol a hexan (FAO, 2006).

Alkalické soli chlorofylinů se získávají saponifikací rozpouštědlových extraktů z jedlých rostlinných materiálů. Saponifikace odstraňuje methyl- a fytosterové skupiny a může částečně štěpit cyklopentenový kruh. Kyselé skupiny jsou neutralizovány, aby se vytvořily sodné, anebo draselné soli.

Mědnaté komplexy chlorofylů se vyrábí přidáním soli mědi k látce získané extrakcí rozpouštědlem z jedlého rostlinného materiálu. Základními barevnými látkami jsou zde feofytiny mědi, obsaženy jsou i karotenoidy, tuky a vosky.

Alkalické soli mědnatých komplexů chlorofylinů se získávají přidáním mědi k produktu získaného saponifikací rozpouštědlových extraktů, z jedlých rostlinných materiálů.

Po přidání mědi k přečištěným chlorofylinům jsou neutralizovány kyselé skupiny, aby se vytvořily draselné, anebo sodné soli (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).



Obrázek 8: *Strukturní vzorec chlorofylu a, chlorofylu b* (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005)

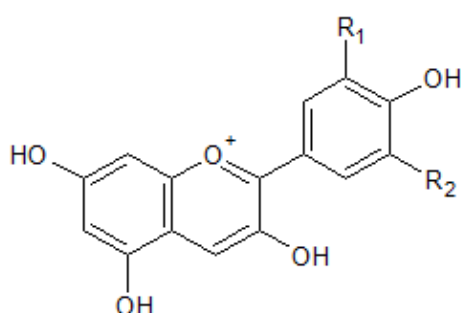
3.3.9 Anthokyany

Anthokyany se vyrábí extrakcí nebo macerací z různých druhů ovoce a zeleniny. Hlavními komerčními zdroji jsou slupky hroznů révy vinné, maliny, černý rybíz, černý bez, třešně, černá mrkev a červené zelí (EMERTON, 2008). Polární charakter anthokyanů umožňuje jejich rozpustnost v různých rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol, aceton a voda.

Anthokyany lze extrahovat acetonem z rostlinných materiálů s přidavkem chloroformu, který rozděljuje další extrahované materiály a částečně čistí pigmenty. Přídavek chloroformu má za následek separaci polárních látek (anthokyany, fenolické látky, cukry, organické kyseliny a další ve vodě rozpustné sloučeniny) a nepolárních látek (lipidy, karotenoidy, chlorofyly). Výhodou této metody je produkce extraktů bez lipofilních nečistot. Extrakce methanolem zahrnuje maceraci rostlinného materiálu v methanolu, obsahujícím malé koncentrace minerálních kyselin (např. kyseliny chlorovodíkové). Extrakce methanolem je snadná, rychlá a účinná metoda. Methanolvá extrakce je o 20 % účinnější než extrakce ethanolem, avšak kvůli toxicitě methanolu se preferuje ethanol.

Extrakt může obsahovat značné množství doprovodných látek, které mohou mít vliv na stabilitu a analýzu těchto pigmentů. Čištění pomocí extrakce tuhou fází (adsorpce) umožňuje odstranění interferujících sloučenin, přítomných v surovém extraktu. Pevnou fází je buď silikagel, nebo oxid hlinitý, který absorbuje příměsi a nečistoty (WROLSTAD a kol, 2005).

Výsledným produktem je kapalina, pasta nebo prášek s mírným charakteristickým zápachem. Výrobky se uvádí na trh podle své barvivosti stanovené chemickou analýzou. Obsah barviva není vyjadřován v množstevních jednotkách (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012).



Pelargonidin ($R_1 = H$), ($R_2 = H$)

Peonidin ($R_1 = H$), ($R_2 = OCH_3$)

Kyanidin ($R_1 = H$), ($R_2 = OH$)

Petunidin ($R_1 = OH$), ($R_2 = OCH_3$)

Delfinidin ($R_1 = OH$), ($R_2 = OH$)

Malvidin ($R_1 = OCH_3$), ($R_2 = OCH_3$)

Obrázek 9: *Strukturní vzorec anthokyanů* (ČOPÍKOVÁ a kol., 2005)

3.4 Metody stanovení potravinářských barviv

3.4.1 Ultrafialová a viditelná spektrometrie

Principem ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového (UV) a viditelného (VIS) záření, v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm, pomocí zředěných roztoků barviv. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Molekulová absorpční spektra vznikají na základě kombinace původních a excitovaných 3 typů hladin: elektronových, rotačních a vibračních. Měření zářivého toku neboli fotometrie je podstatou přístrojů pro tuto optickou metodu.

UV/VIS spektrometrii lze doplňkově využívat ke kvantifikaci látek, tedy k identifikaci neznámých látek, porovnáváním naměřených spekter se známými spektry. Analýza však není dostatečná k učinění závěru o průkaznosti identifikace, protože ne všechny přechody jsou v UV/VIS oblasti, a také protože běžné laboratorní spektrometry nemají vysokou citlivost (v rámci rozlišení jednotlivých rotačních a vibračních hladin).

UV/VIS spektrometrie se hojně využívá k určení koncentrace barviv, které mají absorpční pásy ve viditelné oblasti spektra. Pracuje obvykle metodou kalibrační křivky. Ultrafialová a viditelná spektrometrie je využívána i v průtočných celách detektorů různých separačních metod, například kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie. Měření se provádí buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech (KLOUDA, 2003).

Možností analýz pomocí UV/VIS spektrometrie je mnoho, například EL-SHEIKH a AL-DEGS (2013) popsali možnost stanovení několika barviv současně, kdy tři syntetická barviva (tartrazin, červeně allura AC, žlutě SY) byla stanovena ve čtyřech nealkoholických nápojích různých příchutí. Barviva byla stanovena bez předešlé separace, pomocí multikomponentní spektrometrické analýzy. Dosažené výsledky byly srovnatelné s výsledky běžných chromatografických metod. Také GÜLER (2005) se zabýval identifikací více barviv najednou, a to šesti (tartrazin, žlutě SY, ponceau 4R, azorubin, indigotin, erythrosin) ve 140 vzorcích cukrovinek a 96 instantních nápojích. Identifikace a stanovení bylo provedeno pomocí UV/VIS spektrometrie, na základě srovnání absorpčních spekter standardů barviv a vzorků.

Jednotlivé molekuly barviv se liší absorpcí záření, respektive každá molekula má své charakteristické absorpční spektrum, které je výsledkem její chemické struktury intera-

gující se zářením. Absorpční spektrum se skládá z jednoho a více maxim, kde je výraznější absorpce záření. Nejvyšší maximum, které je zároveň v měřené oblasti spektra (v tomto případě tedy UV/VIS) je důležitým údajem pro spektrometrii a udává se jako hodnota vlnové délky v nanometrech (nm), při které je nejvýraznější absorpce.

Jak moc dané barvivo absorbuje, je dáno jeho extinkčním koeficientem (uvedeným pro konkrétní absorpční maximum). Extinkční koeficient je stanoven pomocí absorbance při definovaných podmínkách (délka optické dráhy vzorkem 1 cm, koncentrace látky 1 %). Čím je hodnota extinkčního koeficientu vyšší, tím barvivo více absorbuje při stejné koncentraci – proto má tmavší odstín než barvivo s nižší hodnotou. Absorpční maxima a extinkční koeficienty jsou uvedeny v tabulce 1 (OPEKAR, 2002).

Tabulka 1: *Spektrometrické údaje potravinářských barviv, včetně užitého rozpouštědla* (EMERTON, 2008; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012)

Barvivo	Absorpční max. [nm]	Rozpouštědlo	Extinkční koeficient [$E_{1\%1cm}$]
Norbixin	485	Roztok KOH	2870
Bixin	502	Chloroform	2870
Anthokyany	515-535	Methanol	300
β -apo-8'-karotenal	460-462	Cyklohexan	2640
β -karoten	453-456	Cyklohexan	2500
Směs karotenů	440-457	Cyklohexan	2500
Betanin	535	Vodný roztok	1120
Kanthaxantin	485	Chloroform	2200
Karamel	610	Vodný roztok	
Kyselina karmínová	494	Roztok HCL	139
Chlorofyly	409	Chloroform	700
Chlorofyliny	405	Vodný roztok (pH 9)	700
Mědnaté komplexy chlorofylů	422	Chloroform	540
Mědnaté komplexy chlorofylinů	405	Vodný fosforečnanový roztok	565
Kurkumin	426	Ethanol	1607
Lutein	445	Chloroform/ethanol	2250
Lykopen	465-475	Hexan	3450
Paprikový extrakt	462	Aceton	2100
Riboflavin	444	Vodný roztok	328
Riboflavin-5'-fosfát	375	Vodný roztok	250
Červeň allura AC	504	Vodný roztok	540
Amarant	520	Vodný roztok	440
Čerň BN	570	Vodný roztok	530
Brilantní modř FCF	630	Vodný roztok	1630
Hněď HT	460	Vodný roztok	403
Azorubin	516	Vodný roztok	510
Erythrosin	526	Vodný roztok	1100
Zeleň S	632	Vodný roztok	1720
Indigotin	610	Vodný roztok	480

Litholrubin BK	422	Dimethylformamid	200
Patentní modř V	638	Vodný roztok	2000
Ponceau 4R	505	Vodný roztok	430
Chinolinová žluť SY	411	Vodný roztok	865
Žluť SY	485	Vodný roztok	555
Tartrazin	426	Vodný roztok	530

3.4.2 Chromatografické metody – kapalinová chromatografie (LC)

Chromatografie je separační metoda, založená na oddělování složek obsažených ve vzorku. Běžně je v chromatografii vzorek separován pomocí dvou fází o jiných polaritách, nejčastěji tzv. chromatografií s obrácenými fázemi (RP). Existují však i jiné metody, například gelová permeační chromatografie (GPC), iontově výměnná chromatografie (IEC) a jiné, které jsou však využívány méně. V chromatografii je stacionární fáze nepohyblivá a mobilní fáze pohyblivá. Principiálně se vzorek nanáší na začátek stacionární fáze a mobilní fází je poté soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zadržovány (resp. absorbovány na jejím povrchu, v případě RP). Rozdílnou afinitou ke stacionární fází neboli rovnováhou mezi stacionární a mobilní fází se složky vzorku separují. Nejdříve z kolony vycházejí látky, s polaritou blízkou mobilní fází a nakonec látky s opačnou polaritou, tedy blíže ke stacionární fází. Chromatografii lze využít ke kvantitativní i kvalitativní analýze vzorku, kdy za samotnou separaci analyty prochází detektorem či několika detektory (KLOUDA, 2003; PRAUS a VONTOROVÁ, 2015).

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. O separaci složek vzorku zde rozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace dochází k rozdělení analytu mezi mobilní a stacionární fází. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Kapalinová chromatografie umožňuje analýzu za laboratorní teploty, bez nutnosti převodu kapalných vzorků na plynné (jak je nutné v případě plynové chromatografie). Je vhodná pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou, tenkovrstvou a papírovou kapalinovou chromatografii (KLOUDA, 2003).

CHEN a kol. (2014) popsali způsob stanovení sedmi syntetických barviv (tartrazin, amarant, košenila, žluť SY, červeň allura AC, brilantní modř FCF, erythrosin) ve víně a nealkoholických nápojích. Pro získání barviv byla využita extrakce magnetickou tuhou fází. Barviva byla následně separována a stanovena ultra rychlou kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (UFLC-MS/MS).

3.4.2.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Využívá k separaci látek dostatečně malé částice sorbentu, které sice kladou prostupující kapalině značný odpor, ale značně zvyšují účinnost separace. Součástí HPLC je vysokotlaké čerpadlo (v řádech jednotek až desítek MPa), které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou s menšími rozměry částic (OPEKAR, 2002).

YOSHIOKA a ICHIHASHI (2008) popsali způsob stanovení 40 syntetických barviv v cukrovinkách a nápojích. Analýza byla provedena během 19 minut, pomocí HPLC-DAD (diode array detector). VACHIRAPATAMA a kol. (2008) analyzovali sedm syntetických barviv (tartrazine, amarant, ponceau 4R, sudan I, žluť SY, zeleň S, brilantní modř FCF) v potravinách a nápojích s využitím HPLC. V obou uvedených pracích byla barviva stanovena současně, bez předešlé separace, během jediné analýzy.

3.4.2.2 Papírová (PC) a tenkovrstvá (TLC) chromatografie

V papírové chromatografii je stacionární fází chromatografický papír. U tenkovrstvé chromatografie je stacionární fází tenká vrstva sorbentu (silikagel), která je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii) (KLOUDA, 2003).

ANDRADE a kol. (2014) zjišťovali obsah syntetických barviv (žluť SY, tartrazine, amarant, brilantní modř FCF) v pomerančových a hroznových nápojích. Barviva byla identifikována tenkovrstvou kapalinovou chromatografií a jejich koncentrace byla následně zjištěna iontově párovou HPLC. ALBUQUERQUE a kol. (2015) zkoumali chemické složení přírodního barviva annatto. Barvivo bylo extrahováno superkritickou fluidní extrakcí (SFE) a kvalitativně analyzováno tenkovrstvou kapalinovou chromatografií.

3.4.2.3 Iontově-výměnná chromatografie (IEC)

V iontově-výměnné chromatografii je stacionární fází měnič iontů. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celulóza, dextran aj.) s vhodnými funkčními skupinami zásadité nebo kyselé povahy. Iontoměniče můžeme rozdělit na anexy a katexy. Anexy mají zásadité funkční skupiny (běžně aminoskupiny) a slouží k výměně aniontů. Katexy mají kyselé funkční skupiny (běžně karboxylové skupiny) a slouží k výměně kationtů (KLOUDA, 2003).

3.4.2.4 Iontově-párová chromatografie (IPC)

Iontově-párová chromatografie pracuje na podobném principu jako iontově-výměnná chromatografie. Do mobilní fáze je přidáván ionogenní detergent, který se jednak naváže na stacionární fázi, zároveň ale může v roztoku tvořit s analytem opačného náboje hydrofobní iontový pár, který následně interaguje se stacionární fázi hydrofobní interakcí. Během jedné separace je možné současně dělit látky kyselé, zásadité i neutrální (VŠCHT, 2014).

Stanovení sulfonovaných azobarviv metodou IPC podrobně popsali JANOŠ a kol. (2011). V jejich práci bylo testováno několik chromatografických systémů, pro stanovení různých typů komerčně dostupných barviv. DOŠEK a kol. (2013) analyzovali syntetická barviva ponceau 4R a azorubin v nealkoholických nápojích, metodou iontově párové chromatografie a diferenční pulzní polarografie. Výsledky naznačují, že obě metody jsou vhodné pro stanovení azobarviv v nealkoholických nápojích, sirupech a podobných materiálech.

3.4.3 Elektromigrační metody – elektroforéza

Elektroforéza je založena na migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Prostředí mezi elektrodami je tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Vzorek je zpravidla nanášen do středu nosiče, který je napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře nasycené parami rozpouštědla. Anionty migrují ke kladnému pólu, kationty k zápornému pólu a neutrální částice se nepohybují. Odlišnou rychlostí migrace složek vzorku se vytvářejí oddělené zóny jednotlivých složek, které se následně analyzují vhodným detektorem (KLOUDA, 2003; PRAUS a VONTOROVÁ, 2015).

3.4.3.1 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilára obsahuje základní elektrolyt, který vede proud. Konec kapiláry je ponořen do zásobníku s elektrolytem, společně s elektrodami, mezi nimiž je vloženo vysoké napětí (10–30 kV). Vzorek se dávkuje v malém objemu do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor, obvykle fotometrický. Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram, který je podobný chromatogramu. Poloha píku určuje kvalitu,

plocha nebo výška píku kvantitu. Existuje řada separačních technik, které doplňují kapilární elektroforézu o další možnosti (např. kapilární zónová elektroforéza CZE, kapilární gelová elektroforéza CGE, kapilární elektrochromatografie CEC aj.) (KLOUDA, 2003; PRAUS a VONTOROVÁ, 2015).

GIOVINE a BOCCA (2003) kvantitativně analyzovali tři syntetická barviva (ponceau 4R, azorubin, žluť SY) ve zmrzlínách, pomocí kapilární zónové elektroforézy. Uvádějí vynikající výsledky při použití této metody, srovnatelné s metodou HPLC. PRADO a kol. (2006) využili kapilární elektroforézu k ověření obsahu syntetických barviv v alkoholických nápojích.

3.4.4 Elektroanalytické metody – polarografie

Polarografie se využívá k určení výskytu a koncentrace neznámých látek v roztoku. Princip je založen na měření proudu procházejícího roztokem, při plynule zvětšovaném napětí, vkládaném mezi dvojici elektrod, které jsou ponořené do roztoku, v němž probíhá elektrolýza. V polarografii se k měření využívá odkapávající rtuťová kapková elektroda, jejíž povrch se neustále obnovuje, což zajišťuje dokonalou reprodukovatelnost měření (PRAUS a VONTOROVÁ, 2015).

3.4.4.1 Diferenční pulzní polarografie (DPP)

V diferenční pulzní polarografii se na elektrodu vkládá lineárně rostoucí stejnosměrné polarizační napětí, k němuž se před koncem kapky přidává pravoúhlý napěťový puls o amplitudě řádově desítek mV a době trvání desítek ms. Registruje se rozdíl proudů změřených před začátkem a před koncem pulzu. Tato závislost rozdílů proudu na vkládaném napětí se nazývá polarografická křivka, která má tvar píku. DPP je mnohem citlivější než klasická polarografie a lze jí stanovit i látky o nízkých koncentracích (až 10^{-8} mol/dm³) (OPEKAR, 2002; PRAUS a VONTOROVÁ, 2015).

3.5 Legislativa potravinářských barviv

V České republice všechny potraviny spadají pod zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích. Druhy a podmínky použití přídatných látek definuje vyhláška č. 130/2010 Sb., a vyhláška č. 122/2011 Sb., kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb.

V zemích EU podmínky použití potravinářských přídatných látek stanovuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Specifická kritéria pro čistotu barviv používaných v potravinách definuje směrnice Komise 95/45/ES, která je novelizována směrnicemi: 1999/75/ES, 2001/50/ES, 2004/47/ES, 2006/33/ES. Jednotné povolovací řízení pro potravinářské přídatné látky, potravinářské enzymy a látky určené k aromatizaci potravin vymezuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1331/2008, ze dne 16. prosince 2008. Dne 11. listopadu 2011 vyšlo nařízení Komise (EU) č. 1130/2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, zavedením seznamu potravinářských přídatných látek Unie a nařízení Komise 1129/2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. Nařízení Komise (EU) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012 stanovuje specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008

Nařízení Komise (EU) č. 232/2012 ze dne 16. března 2012 mění přílohu II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, a upravuje podmínky použití a úroveň použití u chinolinové žluti (E 104), žluti SY (E 110) a ponceau 4R (E 124). Dne 15. května 2014 bylo vydáno nařízení Komise (EU) č. 505/2014, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, v případě používání karamelových barviv (E 150a-d) v pivu a sladových nápojích. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) musí do prosince 2020 nově posoudit bezpečnost všech přídatných látek, které byly schváleny před 20. lednem 2009. Časový harmonogram posuzování těchto přídatných látek stanovuje nařízení Komise (EU) č. 257/2010 ze dne 25. března 2010.

3.5.1 Podmínky použití přídatných látek

Použití přídatných látek v potravinách je platnými právními předpisy velmi přísně regulováno. Při výrobě potravin lze použít pouze přídatné látky, které byly schváleny příslušnými právními předpisy. Před zařazením přídatné látky na seznam povolených aditiv vyhodnocuje její nezávadnost Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA).

Barviva mohou být zařazena na seznam přídatných látek, pouze pokud kromě toho, že slouží jednomu nebo více účelům podle čl. 6, odst. 2 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, slouží jednomu nebo více z těchto účelů:

- obnovení původního vzhledu potravin,
- zvýšení vizuální přitažlivosti potravin,
- obarvení jinak bezbarvých potravin.

Pro jednotlivé potraviny a přídatné látky jsou stanoveny limitní hodnoty – nejvyšší povolené množství. Potraviny, které jsou dále zpracovávány, smějí obsahovat přídatné látky pouze v případě, že jsou přídatné látky povolené i v potravinách, které se z nich vyrábí. U některých přídatných látek není stanoveno nejvyšší povolené množství konkrétní číselnou hodnotou. V takovém případě se uplatňuje zásada *quantum satis*, tzn., použije se pouze nezbytně nutné množství (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008; SZPI, 2015).

Barviva se nesmí přidávat do potravin uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2: *Potraviny, které je zakázáno barvit* (BABIČKA, 2012)

Č.	Potravina
1.	Nezpracovaných potravin.
2.	Přírodních minerálních vod a balených pramenitých vod.
3.	Neochuceného plnotučného, polotučného a odtučněného mléka pasterovaného nebo sterilovaného včetně ošetření vysokou teplotou UHT, neochucené smetany.
4.	Mléka ochuceného kakaem nebo čokoládou, zahuštěného mléka, neochucené sušené smetany, neochuceného podmásí, neochuceného kysaného mléka, neochucených čerstvých sýrů.
5.	Olejí a tuků živočišného a rostlinného původu, másla z mléka koz a ovcí.
6.	Vaječného žloutku, bílku, vaječné melanže, sušených, tekutých, koncentrovaných, hluboce zmrazených nebo koagulovaných vaječných výrobků.
7.	Mouky, škrobu a ostatních mlýnských výrobků.
8.	Chleba a výrobků z chlebového těsta, těstovin a gnocchi.
9.	Cukrů včetně všech monosacharidů a disacharidů.
10.	Rajčatového protlaku, rajčatových polokonzerv, studených omáček na bázi rajčatové šťávy, kečupů.
11.	Ovocných a zeleninových šťáv a nektarů.

12.	Výrobků z ovoce, zeleniny, brambor a hub, sterilovaných, nakládaných nebo sušených, zpracovaného ovoce, zeleniny, brambor a hub.
13.	Výběrových (extra) džemů, výběrových rosolů a kaštanových pyrů, Crème de pruneaux.
14.	Masa ryb, drůbeže, zvěřiny, měkkýšů, korýšů a produktů z nich.
15.	Kakaových a čokoládových výrobků s výjimkou nečokoládových náplní těchto výrobků.
16.	Pražené kávy, cikorkové kávoviny a extraktů z ní, čaje, extraktů z čaje včetně ovocných a bylinných přípravků na bázi čaje, ovoce a směsi pro přípravu čaje.
17.	Koření, směsi koření, soli, náhražek soli.
18.	Potravin určených pro výživu kojenců a malých dětí.
19.	Medu.
20.	Vinného octa, sladu, a výrobků ze sladu.
21.	Obilných destilátů Korn, Kornbarnd, ovocných lihovin, ovocných destilátů včetně ovocných průtahových.
22.	Sambuca, Maraschino, Mistrá.
23.	Sangria, Clarea, Zurra.

3.5.2 Akceptovatelný denní příjem (ADI)

Akceptovatelný denní příjem (Acceptable Daily Intake, ADI) je množství přídavné látky, vyjádřené v mg/kg tělesné hmotnosti, které může být konzumováno každý den po celý život, bez zřetelného zdravotního rizika. Při stanovování ADI určité potravinářské přídavné látky se berou v úvahu všechny nežádoucí účinky, které mohou být způsobeny konzumací této přídavné látky. Ty jsou následně testovány, nejčastěji na experimentálních zvířatech.

Hladina množství látky, která nezpůsobuje na testovaném organismu žádné pozorovatelné nežádoucí účinky, se označuje NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Podělíme-li tuto hodnotu bezpečnostním faktorem (číslem 100) dostaneme hodnotu ADI (BABIČKA, 2012; Bezpečnost potravin A-Z, 2011)

V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty ADI některých potravinářských barviv.

Tabulka 3: Akceptovatelný denní příjem barviv (EMERTON, 2008; EFSA, 2008; EFSA, 2010a; EFSA, 2010b; EFSA, 2013; Nařízení Komise (EU) č. 232/2012; Nařízení Komise (EU) č. 505/2014)

Syntetická barviva		Přírodní a přírodně identická barviva	
Barvivo	ADI [mg/kg t.hm./den]	Barvivo	ADI [mg/kg t.hm./den]
Červeň allura AC	7	Bixin	12
Amarant	0,15	Norbixin	0,6
Čeřň BN	5	Beta-karoten	5
Brilantní modř FCF	10	Lykopen	0,5
Hněď HT	1,5	Amoniakový karamel	100
Azorubin	4	Košeniła	5
Erythrosin	0,1	Mědnaté komplexy chlo-rofylinů	15
Zeleň S	5		

Indigotin	5	Kurkumin	3
Litholrubin BK	1,5	Lutein	2
Patentní modř V	5	Riboflavin	0,5
Ponceau 4R	0,7	Riboflavin-5'-fosfát	0,5
Chinolinová žluť SY	0,5	Kanthaxanthin	0,03
Žluť SY	1		
Tartrazin	7,5		

3.5.3 Identifikace a označování potravinářských přídatných látek

Mezinárodní systém číslování (International Numbering System, INS) byl vytvořen Výborem pro potravinářské přídatné látky a kontaminanty CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants). Tento systém umožňuje identifikaci potravinářských aditiv na seznamu přísad podle čísla, které nahrazuje specifický název přídatné látky. V rámci Evropské unie byl pro identifikaci potravinářských aditiv vytvořen systém E-kódů, zahrnující aditiva, toxikologicky nezávadná. Seznam INS-kódů ale zahrnuje i přídatné látky, jejichž toxikologická nezávadnost nebyla dosud potvrzena, proto je podstatně rozsáhlejší než seznam E-kódů (Bezpečnost potravin A-Z, 2011).

Potravinářská barviva jsou označena hodnotami E-kódů 100–180. Kompletní seznam potravinářských barviv povolených v zemích EU včetně jejich E-kódu je uveden v tabulce 4.

(¹) Identifikační číslo C.I. (Colour Index) zaručuje identifikaci barviv při používání názvů v cizích jazycích.

Tabulka 4: Seznam potravinářských barviv (Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011; Vyhláška č. 4/2008 Sb.)

Číslo E	Název barviva	Číslo C.I. (¹)
E 100	Kurkumin	75 300
E 101	i) Riboflavin ii) Riboflavin-5'-fosfát	
E 102	Tartrazin	19 140
E 104	Chinolinová žluť SY	47 005
E 110	Žluť SY (synonyma Sunset Yellow FCF, Gelborange S)	15 985
E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	75 470
E 122	Azorubin (synonymum Carmoisin)	14 720
E 123	Amarant (synonymum Viktoriarubín O)	16 185
E 124	Ponceau 4R (synonymum košenilová červeň A)	16 225
E 127	Erythrosin	45 430
E 129	Červeň allura AC / Červeň AC	16 035
E 131	Patentní modř V	42 051
E 132	Indigotin (synonymum Indigocarmin)	73 015
E 133	Brilantní modř FCF (synonymum Brilliant blue FCF)	42 090
E 140	Chlorofyly a chlorofyliny	75 810 a 75 815

E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů	75 815
E 142	Zeleň S	44 090
E 150a	Karamel	
E 150b	Kaustický sulfitový karamel	
E 150c	Amoniakový karamel	
E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	
E 151	Čerň BN (synonymum Brilliant black BN)	28 440
E 153	Rostlinná uhlíková čerň	
E 155	Hněď HT	20 285
E 160a	i) Směs karotenů a ii) Beta-karoten	75 130 a 40 800
E 160b	Annatto, bixin, norbixin	75 120
E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin	
E 160d	Lykopen	75 125
E 160e	Beta-apo-8'-karotenal	40 820
E 161b	Lutein	
E 162	Betalainová červeň, betanin	
E 163	Anthokyany	
E 170	Uhličitan vápenatý	77 220
E 171	Oxid titaničitý (synonymum Titanová běloba)	77 891
E 172	Oxidy a hydroxidy železa	77 491 – 77 499
E 173	Hliník	
E 174	Stříbro	
E 175	Zlato	
E 180	Litholrubin BK	

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 musí být potraviny, obsahující barvivo nebo směs barviv uvedených v tabulce 5, opatřeny na etiketě doplňující informací „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“.

Tabulka 5: Barviva, která musí být označena doplňující informací (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008).

Číslo E	Název barviva
E 102	Tartrazin
E 104	Chinolinová žlut' SY
E 110	Žlut' SY
E 122	Azorubin
E 124	Ponceau 4R
E 129	Červeň allura AC

4. VLASTNÍ KOMENTÁŘ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE

Osobně shledávám zajímavým řešením použití modrého barviva z bakterií (*Streptomyces coelicolor*), dosud nevyužívaného v potravinovém průmyslu. Barvivo bylo získáno kultivací této bakterie z půdy, v množství až 3 g/l. Za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) bylo zjištěno, že se jedná směs deseti sloučenin. Rozpustnost barviva byla testována v kyselém i alkalickém prostředí, stabilita barviva byla ověřována při expozici světla, tepla a v přítomnosti oxidačních a redukčních činidel. Výsledky ukázaly, vysokou stabilitu barviva při působení světla i tepla. Barvivo bylo rovněž zcela rezistentní vůči běžným oxidantům a reduktantům a nebyl zjištěn žádný vliv na stabilitu barviva v přítomnosti běžně používaných potravinářských aditiv (vitamín C, benzoát sodný). Ani většina testovaných kovů stabilitu barviva neovlivnila, s výjimkou vysokých koncentrací olovnatých a železnatých iontů. Na základě předběžných zkoušek toxicity, prováděných na myších, bylo barvivo klasifikováno jako netoxická látka. Toto barvivo by tak dle mého názoru vhodně přispělo k rozšíření nabídky přírodních barviv v potravinářském průmyslu (ZHANG a kol., 2006).

Při zpracovávání bakalářské práce mě zaujalo i červené barvivo extrahované z vonokvětky (*Osmanthus fragrans* Lour.), které se pro barvení potravin také dosud nevyužívá. Autoři poukazují na dobrou rozpustnost barviva v kyselém i alkalickém prostředí. Barvivo mělo rovněž dobré termostabilní vlastnosti, při teplotách 25–100 °C. Jeho barevný projev však ovlivňuje hodnota pH roztoku. Při pH 1–5 bylo zbarvení jasně červené, při pH 7–10 přecházelo do hnědo-červených tónů a při pH nad 10 bylo zelené. Byla zjištěna vysoká citlivost barviva k chemické oxidaci, proto by při jeho rafinaci a zpracování neměla být použita oxidační činidla. Stabilita barviva byla zkoumána v přítomnosti siřičitanu sodného, chloridu sodného, aminokyselin, organických kyselin, cukrů, kovových iontů a žádná z těchto látek neměla vliv na stabilitu toho barviva. Kromě barvení potravin, by tato látka mohla být pro své výborné pohlcování volných radikálů využívána i jako účinný antioxidant (CASTELLAR a kol., 2006).

Myslím si, že se v budoucnu nejspíš setkáme s dalšími variantami přírodních barviv, jejich zavedení na trh však bude vyžadovat postup schválení odpovídající potravině (složce potravin) nového typu.

5. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo sepsat literární rešerši o barvivech využívaných v potravinovém průmyslu a jejich získávání. Barviva byla rozdělena do skupin podle zdroje, ze kterého se získávají a podle jejich chemické struktury. V této části byli zahrnuti nejčastější zástupci potravinářských barviv (přírodních, přírodně identických i syntetických), včetně jejich charakteristik a nejčastějšího využití.

Způsob získání byl popsán na několika zástupcích přírodních a přírodně identických potravinářských barviv. Přírodní barviva se nejčastěji získávají extrakčními technikami z přírodních materiálů, syntetická barviva chemickou syntézou z ropných produktů. Při extrakci se nejvíce využívají organická rozpouštědla (propan-2-ol, hexan, aceton aj.), která mají významnou roli při získávání přírodních extraktů. Při výběru extrakčního činidla bývá rozhodující především jeho toxicita a schopnost regenerace z barviva, jak z hlediska ekonomické tak i technologické stránky. Komerční barviva určená pro potravinářský průmysl bývají distribuována v různých formách (prášková, disperzní, rozpustná ve vodě, v tucích, organických rozpouštědlech atd.).

Dále byly zahrnuty nejčastější metody detekce potravinářských barviv, včetně jejich stanovení pomocí instrumentální analýzy. Stanovení barviv (především těch syntetických) v potravinách je velmi důležité, s ohledem na lidské zdraví. Z tohoto pohledu se kterákoliv metoda poskytující kvalitní informace o nízkých koncentracích sledovaných barviv, jeví jako perspektivní. Jestliže je i ekonomicky dostupná, můžeme ji považovat za optimální.

Barvení potravin je v ČR přísně regulováno platnými právními předpisy České republiky a Evropské unie. Tyto právní předpisy mimo jiné definují podmínky, za kterých je možné potraviny barvit a zároveň vymezují potraviny, které se barvit nesmí. Důležitá je také identifikace potravinářských barviv, která se v EU kromě názvu označují pomocí evidenčního kódu, který je stanoven pro každé potravinářské aditivum. Podstatné je, že každý spotřebitel může učinit svou vlastní volbu a vybrat si takový výrobek, který mu svým složením nejvíce vyhovuje.

6. SOUHRN A RESUME

Barviva v potravinovém průmyslu a jejich získávání

Tato práce obsahuje základní přehled nejvyužívanějších potravinářských barviv přírodních, přírodně identických a syntetických. Barviva jsou rozdělena do skupin, podle jejich chemické struktury (polyenová barviva, indolová barviva, trifenylmethanová barviva aj.). Získávání barviv pomocí extrakčních technik je znázorněno na několika zástupcích barviv přírodního původu. V práci jsou rovněž uvedeny nejpoužívanější analytické metody (UV/VIS spektrometrie, chromatografie, elektroforéze a polarografie), využívané k detekci a stanovení potravinářských barviv. Podmínky barvení potravin jsou definovány platnými právními předpisy České republiky a Evropské unie, které jsou také součástí této práci.

Klíčová slova

přírodní barviva, syntetická barviva, pigmenty, analýza, extrakce

RESUME

Colorants in food industry and their acquisition

This bachelor thesis contains an overview of the most used natural, nature-identical and synthetic food colorants. Colorants are divided into groups according to their chemical structure (polyene colorants, indole colorants, triphenylmethane colorants etc.). Acquisition of colorants by extraction techniques is shown in several representatives of natural colorants. The thesis also contains some most frequently used analytical methods (UV/VIS spectrometry, chromatography, electrophoresis and polarography), which are used for detection and determination of food colorants. Terms of coloring foodstuffs are defined by the applicable laws of the Czech Republic and the European Union, which are also part of this work.

Key words

natural colorants, synthetic colorants, pigments, analysis, extraction

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBUQUERQUE, C. L. C., SANTANA A. L., MEIRELES M. A. A. Thin layer chromatographic analysis of annatto extracts obtained using supercritical fluid. *Food and Public Health*. 2015, roč. 5, s. 127–137. ISSN 2162-8440.

ANDRADE, F. I., GUEDES, M. I. F., VIEIRA, I. G. P., a kol. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chemistry*. 2014, roč. 157, s. 193–198. ISSN 0308-8146.

Azo dyes. *Food-info* [online]. 2001a [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/colour/azo.htm>.

BABIČKA, L. *Přídavné látky v potravinách: publikace České technologické platformy pro potraviny*. 1. vyd. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2012, 67 s. ISBN 978-80-905096-3-4.

CASTELLAR, M., OBÓN, J., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006. roč. 86, s. 122–128. ISSN: 1097-0010.

Chlorophylls. *FAO: Combined Compendium of Food Additive Specifications* [on-line]. 2006 [cit. 2015-22-11]. Dostupný z: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-128.pdf>.

Cochineal, Carmine, Carmin acid (E 120). *Food-info* [online]. 2001b [cit. 2015-22-11]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/colour/cochineal.htm>.

ČESKO. Vyhláška č. 304/2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 20. 5. 2004.

ČESKO. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 15. 2. 2008.

ČESKO. Vyhláška č. 130/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 1. 6. 2010.

ČESKO. Vyhláška č. 122/2011 Sb., kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, ve znění vyhlášky č. 130/2010 Sb. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2. 5. 2011.

ČESKO. Zákon č. 110/1997 Sb., zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 1. 9. 1997.

ČOPIKOVÁ, J., UHER, M., LAPČÍK, O., a kol. Přírodní barevné látky. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 11, s. 802–816. ISSN 0009-2770.

DOŠEK, M., TRÍSKOVÁ, D., FIKAROVÁ, J. Stanovení syntetických barviv E 122 (Azorubin) a E 124 (Ponceau 4R) v nealkoholických nápojích metodou iontově interakční chromatografie a diferenční pulzní polarografie. *Chemické listy*. 2013, roč. 107, s. 233–235. ISSN 0009-2770.

EFSA. Use of lycopene as a food colour. *EFSA Journal* [online]. 2008, roč. 674, s. 1–66 [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/674>.

EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of amaranth (E 123) as a food additive. *EFSA Journal* [online]. 2010a, roč. 8, č. 7, s. 1–41 [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1649>.

EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of brown HT (E 155) as a food additive. *EFSA Journal* [online]. 2010b, roč. 8, č. 3, s. 1–31 [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1536>.

EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of patent blue V (E 131) as a food additive. *EFSA Journal* [online]. 2013, roč. 11, č. 3, s. 1–35 [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2818>.

EL-SHEIKH, A. H., AL-DEGS, Y. S. Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices. *Dyes and Pigments*. 2013, roč. 97, s. 330–339. ISSN: 0143-7208.

EMERTON, V. *Food colours*. Surrey, UK: Leatherhead Pub., 2008, 197 s. ISBN 978-1905224-44-9.

EU. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1331/2008 ze dne 16. 12. 2008, kterým se stanoví jednotné povolovací řízení pro potravinářské přídatné látky, potravinářské enzymy a látky určené k aromatizaci. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, ze dne 16. 12. 2008 o potravinářských přídatných látkách. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. 11. 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Nařízení Komise (EU) č. 1130/2011 ze dne 11. 11. 2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách zavedením seznamu potravinářských přídatných látek Unie schválených pro použití v potravinářských přídatných látkách, potravinářských enzymech, potravinářských aromatech a živinách. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Nařízení Komise (EU) č. 231/2012 ze dne 9. 3. 2012, kterým se stanoví specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Nařízení Komise (EU) č. 232/2012 ze dne 16. 3. 2012, který se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o podmínky použití a

úrovně použití u chinolinové žluti (E 104), žluti SY (E 110) a ponceau 4R (E124). In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Nařízení Komise (EU) č. 505/2014, ze dne 1. 10. 2014, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o používání karamelových barviv (E 150a-d) v pivu a sladových nápojích. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

EU. Směrnice Komise 95/45/ES ze dne 26. 7. 1995, kterou se stanoví specifická kritéria pro čistotu týkající se barviv pro použití v potravinách. In: *EUR-Lex* [právní informační systém].

Extrakce. *VOŠ zdravotnická a SŠ zdravotnická Hradec Králové* [online]. 2012 [cit 2016-30-1]. Dostupné z: <http://lat.zshk.cz/vyuka/extrakce.aspx>.

Flavonoidy. *Bezpečnost potravin A-Z* [online]. 2013 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92217.aspx>.

Fykobiliny. *Gate2Biotech* [online]. 2005 [cit. 2015-10-22]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=408>.

GIOVINE, L. D., BOCCA, A. P. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. *Food Control*. 2003, roč. 14, s. 131–135. ISSN 0956-7135.

GÜLER, Z. Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in turkey using UV/VIS spectrophotometry. *Journal of Food Quality*. 2005, roč. 28, s. 98–108. ISSN 1745-4557.

HAMPL, F., PALEČEK J. *Farmakochemie*. 1. vyd. VŠCHT v Praze. Praha: 2012, 413 s. ISBN: 80-7080-495-5.

HANUŠTIK P., MIKELOVÁ R., ADAM V., a kol. Funkční potraviny – také s flavonoidy? *Kvalita potravin*. 2007. roč. 7, č. 1, s. 20–21. ISSN 1213-6859.

CHAPMAN, S. *Guidelines on approaches to the replacement of tartrazine, allura red, ponceau 4R, quinoline yellow, sunset yellow and carmoisine in food and beverages*. UK: Campden Technology Limited, 2011, 36 s.

CHEN, X. H., ZHAO, Y. G., SHEN, H. Y., a kol. Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2014, roč. 1346, s. 123–128. ISSN 0021-9673.

JANOŠ, P., HEJDA, S., AGAPOVÁ, E., a kol. Stanovení sulfonovaných azobarviv metodou iontově interakční chromatografie v reverzním systému. *Chemické listy*. 2011, roč. 105, s. 943–947. ISSN 0009-2770.

KLESCHT, V., HRNČIŘÍKOVÁ I., MANDELOVÁ L. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006, 108 s. ISBN 80-251-1292-6.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

KVASNIČKOVÁ, A. Potravinářská barviva: přírodní místo syntetických. In: *Bezpečnost potravin A-Z* [online]. 2010 [cit. 2015-11-14]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/potravinarska-barviva-prirodni-misto-syntetickych.aspx>.

OPEKAR, F. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0553-1.

Potravinářské přídatné látky. *Bezpečnost potravin A-Z* [online]. 2011 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/potravinarska-aditiva.aspx>.

PRADO, M. A., BOAS, L. F. V., BRONZE, M. R., a kol. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2006, roč. 1136, s. 231–236. ISSN 0021-9673.

PRAUS, P., VONTOROVÁ, J. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.

Přidatné látky (aditiva). *SZPI* [online]. 2015 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/pridatne-latky-aditiva.aspx>.

SCHREIBEROVÁ, L. *Chemické inženýrství I*. Vyd. 3., rozš. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2011, 294 s. ISBN 978-80-7080-778-1.

SINGH, R. K., AVULA, R. I. *Supercritical fluid extraction in food processing*. Boca Raton: CRC Press, 2012. s. 195–222. ISBN: 978-1-4398-4595-0.

ŠIVEL, M., KLEJDUS, B., KRÁČMAR, S., KUBÁŇ, V. Lutein – významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické listy*. 2013, roč. 107, č. 6, s. 456–463. ISSN 0009-2770.

VACHIRAPATAMA, N., MAHAJAROENSIRI, J., VISESSANGUAN, W. Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008, roč. 16, s. 77–82. ISSN 1021-9498.

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Vyd. 2., upr. Tábor: OSSIS, 2002, 319 s. ISBN 80-86659-02-X.

VRBOVÁ, T. *Víme, co jíme? Aneb Průvodce „Éčky“ v potravinách*. Praha: EcoHouse, 2001, 268 s. ISBN 80-238-7504-3.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *VŠCHT v Praze* [online]. 2014 [cit 2016-07-03]. Dostupné z: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_1.pdf.

WROLSTAD, Ronald E., a kol. *Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components*. John Wiley & Sons, Inc: Copyright, 2005, 624 s. ISBN 978-0-471-71817-8.

Xanthene dyes. TCI Chemicals [online]. 2013 [cit 2016-03-26]. Dostupné z: http://www.tcichemicals.com/eshop/en/ca/category_index/03459/.

YOSHIOKA, N., ICHIHASHI, K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. *Talanta*. 2008, roč. 74, s. 1408–1413. ISSN 0039-9140.

ZHANG, H., ZHAN, J., SU, K., ZHANG, Y. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*. *Food Chemistry*. 2006, roč. 95, s. 186–192. ISSN: 0308-8146.