

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Rostlinná barviva – studium stability kurkuminu

Bakalářská práce

Autor práce: Monika Sekaninová

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Rostlinná barviva – studium stability kurkuminu " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu **Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D.** za věcné připomínky a odborné vedení při psaní mé bakalářské práce a panu **Ing. Vladimíru Pivcovi, CSc.** za praktické rady a pomoc při práci v laboratoři.

Souhrn

Potravinářská barviva jsou v dnešní době součástí většiny výrobků. Výrobci se snaží používat hlavně přírodní barviva, mezi něž patří také kurkumin. Ten se získává extrakcí z usušeného kořene byliny kurkumy dlouhé (*Curcuma Longa L*). Kurkumin je hojně používán v mnoha výrobcích, jako jsou oleje, zmrzliny, cukrovinky, výrobky z obilovin, pečivo, vejce, koření a další. Těmto produktům dodává žlutou barvu v požadovaných odstínech. Kurkumin je všeobecně známý také pro své pozitivní účinky na zdraví, kam patří protizánětlivé účinky, antioxidační aktivita, potlačování růstu bakterií, antirevmatická aktivita nebo antikarcinogenní účinek.

Kurkumin patří mezi polyenová barviva, která jsou omezeně rozpustná ve vodě. Vzhledem k tomu, že kurkumin má velmi nízkou rozpustnost, je také snížena jeho biologická dostupnost. Těmito problémy a jeho nízkou stabilitou se zabývají vědci po celém světě. Proto bylo cílem této práce zjistit stabilitu kurkuminu vzhledem k přírodním faktorům, jako jsou světlo, teplo, tma, chlad. Tyto podmínky byly vytvořeny v rámci laboratoře v různých kombinacích (světlo/teplo, světlo/chlad, tma/teplo a tma/chlad). Vzorek kurkumy byl zpracován na koncentrovaný extrakt za pomoci extrakce acetonem a následným zkoncentrováním na vakuové odparce. Pro vytvoření vzorků byla použita rozpouštědla aceton, ethanol a destilovaná voda. pH bylo upraveno pomocí NaOH a HCl. Vzorky byly rozděleny do vytvořených laboratorních podmínek. Po stanovených intervalech byla měřena absorbance na spektrofotometru a po 6 měsících byly výsledky zhodnoceny.

Nejstabilnější byly vzorky v rozpouštědle ethanolu v kombinaci s kyselinou. Tyto vzorky vykazovaly vysokou stabilitu i v rámci nepříznivých podmínek, které jsou dány světlem a teplem. Vyšší stabilitu vykazovaly všechny vzorky v podmínkách tma/chlad oproti stejným vzorkům v podmínkách světlo/teplo. Z výsledků vyplývá, že největší degradaci podléhaly vzorky na světle, proto je dobré výrobky s kurkuminem skladovat ve tmě a ideálně v kombinaci s chladem.

Klíčová slova: kurkumin, kurkuma, přírodní pigment, absorbance, stabilita

Summary

Nowadays the food colours are components of many products. The producers try to use mainly natural colours, to which curcumin belongs. Curcumin is obtained by an extraction from dried rhizomes of turmeric (*Curcuma longa L.*). It is profusely used in many products such as oils, ice creams, sweets, cereal products, pastry, egg products, spice and others. It gives yellow colour in a required shade to these products. Curcumin is well-known for its positive health effects such as inflammatory effect, antioxidant activity, suppression of bacterial growth, antirheumatic activity or anticarcinogenic activity.

Curcumin belongs to polyene colours, which are partially water-soluble. Because of very low solubility, the bioavailability of curcumin is decreased too. The scientists around the world deal with these problems and with its low stability. The aim of this thesis is to determine the stability of curcumin owing to the natural factors of light, heat, dark and cold. These conditions were created in laboratory in different combinations (light/heat, light/cold, dark/heat and dark/cold). The turmeric sample was processed into concentrated extract with the use of acetone extraction and was subsequently concentrated on a vacuum evaporator. The solvents acetone, ethanol and distilled water were used to create the samples. The pH was adjusted with the use of NaOH and HCl. The samples were put into created laboratory conditions. The absorbance was metered on spectrophotometer in established intervals and the results were evaluated six months later.

The samples dissolved in ethanol and acid were the most stable. These samples showed high stability also in unfavourable conditions given by light and heat. All samples in conditions dark/cold showed higher stability in comparison with the same samples in conditions light/heat. The results show that the samples stored in the light undergo the greatest degradation. It is therefore suitable to store the products with curcumin in the dark and ideally in cold.

Keywords: curcumin, Curcuma, natural pigment, absorbance, stability

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL PRÁCE.....	9
3	LITERÁRNÍ REŠERŽE	10
3.1	Potravinářská barviva	10
3.1.1	Účel	10
3.1.2	Dělení	10
3.1.3	Legislativa	11
3.2	Přírodní barviva	12
3.2.1	Charakteristika.....	12
3.2.2	Dělení	12
3.3	Kurkuma dlouhá	13
3.3.1	Produkty z kurkumy	13
3.3.2	Chemické složení	14
3.4	Kurkumin.....	16
3.4.1	Použití.....	17
3.4.2	Vliv kurkuminu na zdraví	18
3.5	Stabilita kurkuminu.....	19
3.5.1	Faktory prostředí	19
3.5.2	Mikrokapsulace.....	23
4	MATERIÁL A METODY.....	29
4.1	Materiál.....	29
4.1.1	Rostlinný materiál	29
4.1.2	Chemický materiál	29
4.1.3	Zařízení a laboratorní pomůcky	29
4.2	Metody.....	29
4.2.1	Příprava extraktu	29
4.2.2	Příprava vzorků	30
4.2.3	Umístění vzorků	30
4.2.4	Proměřování vzorků.....	32
4.2.5	Vyhodnocení výsledků	34

5	VÝSLEDKY	35
6	DISKUZE	38
7	ZÁVĚR	40
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
9	SEZNAM ZKRATEK	46
10	PŘÍLOHY	47

1 ÚVOD

V dnešní době jsou potravinářská barviva velmi diskutovaným tématem. Lidé jsou neustále „bombardováni“ informacemi o škodlivosti některých syntetických barviv, a proto začínají měnit svůj postoj a vyhledávají výrobky spíše s přírodními barvivy. To si uvědomují i výrobci, kteří ovšem také dobře vědí, že barva výrobku ovlivňuje naše vnímání kvality, a proto se snaží o co nejsytější barvy. Mnoho přírodních barviv je ovšem značně nestálých vzhledem k vlivům přírodního prostředí, a proto se všude po světě vědci zabývají právě stabilitou těchto barviv.

Mezi přírodní barviva patří i kurkumin, který dnes najdete v mnoha výrobcích. Kurkumin je získáván extrakcí z kořene rostliny *Curcuma longa L.*, má mnoho pozitivních účinků, mezi něž patří antirevmatická aktivita, protizánětlivé účinky, antioxidační aktivita, potlačování růstu bakterií nebo antikarcinogenní účinek. Toxické účinky byly dokázány až při vysokých dávkách, které člověk za normálních okolností nepřijme. Každopádně i tak byl stanoven přijatelný denní příjem na $0 - 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Hlavním problémem v použití kurkuminu a všeobecně i dalších přírodních barviv je jejich stabilita. Kurkumin je nerozpustný ve vodě a velmi špatně odolává přírodním faktorům, kterým je samozřejmě ve výrobcích neustále vystaven.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je zjistit teoretické informace o stabilitě kurkuminu a pomocí výsledků stanovit nejvhodnější podmínky pro uchování potravinářského barviva kurkuminu, případně výrobků s jeho obsahem. Pomocí metody spektrofotometrie budou stanoveny hodnoty absorpance. Na základě těchto hodnot bude stanoveno rozpouštědlo, ve kterém bude kurkumin nejstabilnější a také podmínky, při kterých bude docházet k nejmenší degradaci barviva. Vzhledem k úpravě pH vzorků, je také cílem zjistit, ve kterém pH je kurkumin nejstabilnější.

3 LITERÁRNÍ REŠERŽE

3.1 Potravinářská barviva

3.1.1 Účel

Barva je důležitá vlastnost potravin. Na základě barvy hodnotíme, zda je potravinu bezpečná a jestli nám bude chutnat (Mortensen, 2006).

Barviva jsou přidávána do potravin z několika důvodů:

- pro posílení barvy již přítomné v potravině, ale méně výrazné, než by spotřebitel očekával
- pro zajištění jednotnosti barvy v potravinách podléhajících šarži
- chceme-li obnovit původní vzhled potravin, jejichž barva byla ovlivněna zpracováním
- pro obarvení potravin, které by jinak byli prakticky bezbarvé (Hendry a Houghton, 1996).

3.1.2 Dělení

Potravinářská barviva mohou být rozdělena do čtyř kategorií:

- Syntetická barviva
- Přírodně identická barviva
- Přírodní barviva
- Anorganická barviva (Mortensen, 2006)

Syntetická barviva se nevyskytují v přírodě a jsou vyráběna chemicky (žluť SY, karmosin a tartrazin). Přírodně identická barviva jsou vyráběna chemickou syntézou tak, aby byla chemicky totožná s barvivy nalezenými v přírodě (β -karoten, riboflavin a kanthaxanthin). Přírodní barviva jsou získána z přírodního jedlého zdroje s využitím uznávané metody přípravy potravin (kurkumin, bixin a anthokyany) (Hendry a Houghton, 1996). Anorganická barviva jsou hlavně titan uhličitý, zlato a stříbro (Mortensen, 2006).

Barviva lze dále dělit podle barvy, chemického složení či struktury, způsobu vazby na materiál, biologické funkce v přírodním materiálu nebo fyzikálních vlastností, jako je rozpustnost (Čopíková et al., 2005).

3.1.3 Legislativa

Použití barviv ve výrobcích je regulováno pomocí evidence povolených barviv a stanovení povolených koncentrací. Pro usnadnění evidence mají potravinářské barvy přiděleny evidenční symboly tzv. E - kódy, které je charakterizují (Čopíková et al., 2005).

V současné době je Radou Evropské unie povoleno 43 barviv použitelných jako potravinářské přídatné látky, kdy každá z nich má přiřazené E číslo. Z těchto barviv je 17 synteticky vyrobených. V rámci EU je povoleno 13 přírodních barviv (Downham a Collins, 2000).

Předpisy EU (94/36/ES) stanovují následující:

1. seznam povolených potravinářských barviv (kurkumin, riboflavin, košenila, karamel, lykopen, anthokyaniny a další viz Příloha I)
2. seznam potravin, které nesmějí obsahovat přidaná barviva (nezpracované potraviny, mléko, oleje, těstoviny a další viz Příloha II)
3. seznam potravin, ke kterým mohou být přidána pouze určitá povolená barviva (pivo, máslo, ocet a další viz Příloha III)
4. seznam barviv, povolených výhradně pro určité účely (amarant, erythrosin, hliník, stříbro, annatto, zlato a další viz Příloha IV)
5. seznam barviv povolených v potravinách neuvedených v přílohách II a III
 - a) v množství quantum satis¹ (karamel, karoteny a další viz Příloha V)
 - b) v omezeném množství v různých potravinách (kurkumin, tartrazin, košenila, azorubín, lutein a další viz Příloha V) (Směrnice Evropského parlamentu a Rady, 1994).

¹ Pojmem "quantum satis" se rozumí, že není stanoveno nejvyšší množství. Barviva však musí být použita v souladu se správnou výrobní praxí v množství, které nepřevyšuje množství nezbytné k dosažení zamýšleného účelu, a za předpokladu, že neuvádějí spotřebitele v omyl.

3.2 Přírodní barviva

Pigment a barvivo jsou často zaměňovány. Přesněji řečeno, pigment je nerozpustný v daném prostředí a barvivo je to tam, kde je látka rozpustná. Příkladem jsou karotenoidy, které jsou barvivem v oleji, ale pigmentem ve vodě (Mortensen, 2006). Barviva bývají obvykle zpracovatelná ve formě pravého či nepravého roztoku, a dále se proto dělí na barviva rozpustná ve vodě, rozpustná v organických rozpouštědlech, na barviva disperzní a na pigmenty, které jsou obvykle nerozpustné a používají se v suspenzi (Čopíková et al., 2005).

3.2.1 Charakteristika

Barevné látky absorbují část viditelného spektra elektromagnetického záření v rozsahu 380 – 780 nm. Pro použití látky jako barviva či pigmentu je podstatné, aby látka měla i dostatečně velký absorpční koeficient ($10\,000$ až $40\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) a aby byla dostatečně stálá a netoxická (Čopíková et al., 2005).

3.2.2 Dělení

Přírodní barviva se dělí na:

- Živočišná
- Rostlinná
- Minerální

Mezi nejznámější živočišná barviva patří barvivo ze sépie, košenily a z ulit ostranky *Murex*. Rostlinná barviva jsou získávána z kořenů, plodů, květů, kůry a listů různých rostlin. Patří mezi ně např. barvivo z červené řepy (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*), světlice barvířské (*Carthamus tinctorius*), kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) a dalších. Jako minerální barvivo je nejčastěji používán okr, což je směs jílovitých hlín s charakteristicky barevnými oxidy. Do minerálních barviv řadíme vápenec, saze, malachit, azurit, pigmenty rumělka atd. (Čopíková et al., 2005).

3.3 Kurkuma dlouhá

Kurkuma dlouhá (*Curcuma longa* L.) je vytrvalá bylina, která patří do rodu *Curcuma* z čeledi *Zingiberaceae*. Bylo popsáno více než 100 druhů kurkumy, ale kurkuma dlouhá je komerčně nejdůležitější. Má jasně zelené listy, kónický žlutý květ a dosahuje zralosti po 7 až 10 měsících, když jsou sklizeny kořeny. Sušené mleté kořeny dávají jasně žlutý prášek, také známý jako žlutý zázvor nebo indický šafrán. Rostlina roste v teplých a deštivých oblastech Asie a Jižní Ameriky. Ovšem kultivována je v Indii, Indonésii, Číně, Jamajce a Peru. Hlavním producentem je Indie, která tvoří 75 % světové produkce. Nejvíce se vyrábí pro domácí spotřebu (Socaciu, 2007).

Kurkuma se používá jako barvivo a koření (Delgado-Vargas a Paredes-López, 2003). Získává se ze sušených mletých kořenů. Dává specifickou chuť a barvu. Používá se také jako přísada pro udržení svěžesti a zlepšení chutnosti. Kurkuma má významné biologické účinky a byla široce používána v tradiční indické a čínské medicíně (Socaciu, 2007).

Obsahuje dvě hlavní třídy sloučenin: kurkuminoidy odpovědné za žlutou barvu a sloučeniny dávající chuť a aroma. Barevný základ kurkumy se skládá ze tří hlavních fenolických derivátů, což je kurkumin, demethoxykurkumin a bis(demethoxy)kurkumin. V kurkumě bylo identifikováno i velké množství těkavých olejů, mezi něž patří α -turmeron, β -turmeron, ar-turmeron, ar-kurkumin, turmeronol, zingiberen a fellandren. Tyto sloučeniny jsou odpovědné za specifickou chuť kurkumy (Socaciu, 2007).

3.3.1 Produkty z kurkumy

Existují tři hlavní typy produktů z kurkumy a to esenciální olej, kurkumová pryskyřice a kurkumin. Esenciální olej z kurkumy je olej získaný destilací vodní párou z kurkumového prášku a obsahuje všechny těkavé aromatické složky koření a žádná barviva. Je přítomný v kurkumě v koncentraci 3 až 5 %. Existuje pouze malá komerční poptávka po tomto produktu. Pryskyřice z kurkumy je nejčastěji vyráběný extrakt a obsahuje chuťové sloučeniny a barvy ve stejném relativním poměru jako jsou obsaženy v koření. Získává se extrakcí rozpouštědlem z mleté kurkumy. Proces je totožný s metodami používanými při výrobě jiných pryskyřičných koření. Pryskyřičná koření mají několik výhod oproti mletému koření, hlavní je jejich vynikající mikrobiologická kvalita, standardizované organoleptické vlastnosti

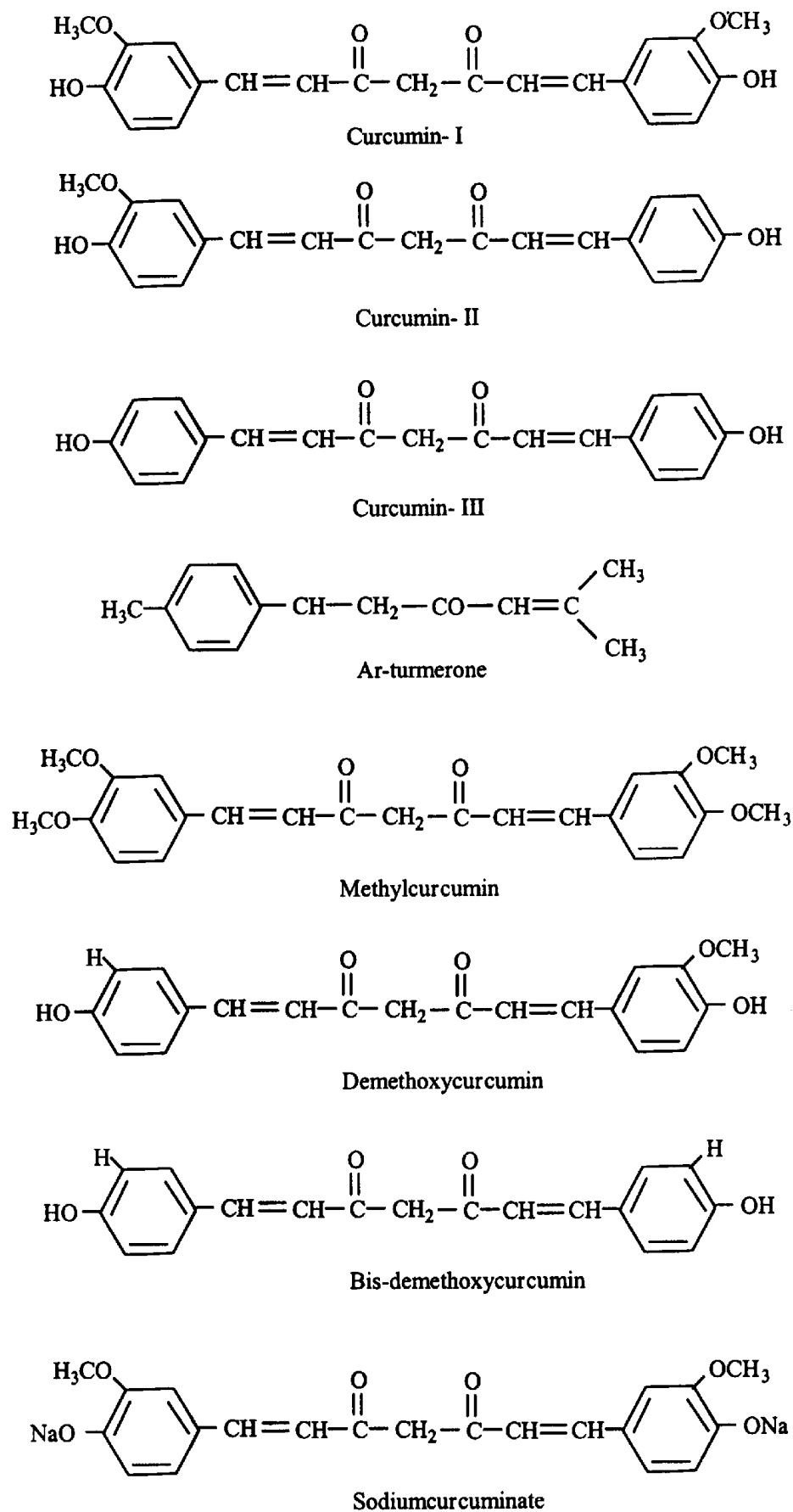
a osvobození od nečistot. Pro tyto důvody se použití pryskyřice trvale zvyšuje v průběhu posledních 30 let. Pryskyřice z kurkumy obvykle obsahují 37 až 55 % kurkuminu. Kurkumin je čistý barevný základ kurkumy a obsahuje jen velmi málo ze sloučenin dávajících chuť. Vyrábí se krystalizací z pryskyřice a jeho stupeň čistoty je kolem 95 %, což je standardní komerčně dostupná kvalita (Hendry a Houghton, 1996).

3.3.2 Chemické složení

Kurkuma obsahuje bílkoviny (6,3 %), tuk (5,1 %), minerální látky (3,5 %), sacharidy (69,4 %) a vodu (13,1 %).

Éterický olej (5,8 %) získaný destilací vodní párou z oddenků obsahuje fellandren (1 %), sabinen (0,6 %), cineol (1 %), borneol (0,5 %), zingiberen (25 %) a seskviterpeny (53 %).

Kurkumin (diferuloylmethan) (3 - 4 %) je zodpovědný za žlutou barvu kurkumy a zahrnuje kurkumin (dále značen jako kurkumin I) (94 %), demethoxykurkumin (dále značen jako kurkumin II) (6 %), a bis(demethoxy)kurkumin (dále značen jako kurkumin III) (0,3 %) (Chattopadhyay et al., 2004).



Obrázek 1. Chemické vzorce sloučenin nacházejících se v kurkumě (Chattophay et al., 2004)

3.4 Kurkumin

Kurkumin byl poprvé izolován v roce 1815 a jeho chemická struktura byla určena Roughley a Whiting v roce 1973. Má teplotu tání 176 až 177 °C, tvoří červenohnědé soli s alkáliemi a je rozpustný v ethanolu, alkáliích, ketonech, kyselině octové a chloroformu (Chattopadhyay et al., 2004).

Je to nejvýznamnější barvivo nacházející se v oddenku kurkumy (*Curcuma longa*). V přírodní kurkumě se vyskytuje zároveň se sloučeninami demethoxykurkuminem a bis(demethoxy)kurkuminem (Čopíková et al., 2005).

Kurkumin je oranžovo-žlutý krystalický prášek. Získává se extrakcí z usušeného kořene kurkumy. Proces extrakce vyžaduje surový materiál rozemletý do prášku. Ten je promýván vhodným rozpouštědlem. Po následné destilaci získáme pryskyřice, které jsou předmětem dalšího promývání pomocí selektivních rozpouštědel, kterými lze extrahovat kurkuminový pigment. JECFA specifikace uvádí jako vhodná rozpouštědla aceton, methanol, ethanol a isopropanol. Evropská komise ve směrnici 95/45/EC uvádí aceton, oxid uhličitý, ethylacetát, dichlormethan, n-butanol, methanol, ethanol a hexan jako vhodná rozpouštědla pro extrakci. Po extrakci je kurkumin získán krystalizací. Tento celý proces poskytuje kurkuminový prášek, což je potravinářské barvivo s více než 90 % barvicích látek a s velmi malým množstvím těkavých olejů a dalších látek přírodního původu (JECFA, 2004).

JECFA specifikace definují kurkumin pouze získaný z přírodních zdrojů. Kurkumin může být připraven i synteticky, ale v této formě nesmí být použit jako potravinářská přídatná látka (JECFA, 2004).

Kurkumin patří mezi polyenová barviva, která jsou lineárními nenasycenými konjugovanými uhlovodíky a jejich deriváty s většinou dvojných vazeb v konfiguraci *trans*. Jsou nerozpustné či prakticky nerozpustné ve vodě (Čopíková et al., 2005).

Lipofilní žlutooranžový kurkumin má maximální vlnovou délku 425 nm. Označuje se též jako přírodní žluť 3 nebo turmeric yellow (Čopíková et al., 2005). Jeho barevný odstín je velmi podobný tartrazinu (Hendry a Houghton, 1996).

Čistý 95% kurkumin není ideální produkt pro přímé použití v potravinářském průmyslu, protože je nerozpustný ve vodě a má nízkou rozpustnost v jiných rozpouštědlech. Je tedy obvyklé, že kurkumin bývá převeden do vhodné formy. V mnoha zemích je toho dosaženo rozpuštěním kurkuminu ve směsi rozpouštědla a povoleného emulgátoru. V této formě přípravek obsahuje 4 až 10 % kurkuminu a je snadno mísitelný s vodou. Polysorbát 80 je nejčastěji používaný emulgátor, protože

je ideálním nosičem kurkuminu. Komerčně dostupné jsou i jiné formy, včetně suspenzí kurkuminu v rostlinném oleji a disperzí na škrobu, ale ty nejsou tak běžně používané (Hendry a Houghton, 1996).

Kurkumin má nízkou biologickou dostupnost, proto se pouze stopová množství objeví v krevní plazmě. Většina perorálně přijatého kurkuminu je vylučována stolicí a močí. Jednou z příčin snížené biologické dostupnosti kurkuminu je fakt, že je téměř nerozpustný ve vodě při kyselém nebo neutrálním pH. Další příčinou je jeho snížená stabilita ve vodném prostředí (Niu et al., 2012).

3.4.1 Použití

Kurkumin je používán pro barvení mnoha potravin. Kodex stanovující normy pro přídatné látky uvádí seznam těchto potravin. Kurkumin je zde uveden pro použití do tuků, olejů, tukových emulzí, zmrzlin, ovocných a zeleninových výrobků, cukrovinek, výrobků z obilovin, pečiva, masa a masných výrobků, ryb a rybích výrobků, vajec a výrobků z nich, koření, polévek, omáček, také do potravin určených pro zvláštní výživu a do nápojů. Použité hladiny kurkuminu se pohybují v rozmezí od 5 do 500 mg.kg⁻¹ v závislosti na kategorii potravin (JECFA, 2004).

Kurkumin má velmi jasnou žlutou barvu i při nízkých dávkách, proto se barva stává snadno sytou. Je tedy třeba stanovit minimální úroveň dávky, potřebné pro požadovanou barvu. Úrovně dávky jsou často velmi nízké, obvykle v rozmezí od 5 do 20 ppm. Pro produkty, kde je vyžadována žlutá barva (vejce), může být jeho odstín příliš zelený nebo oranžový, proto musí být použit v kombinaci s jiným barvivem. Tím je obvykle barvivo annatto (Hendry a Houghton, 1996).

Kurkumin se hlavně používá do vanilkové zmrzliny, nejčastěji v kombinaci s norbixinem. Směs obsahuje asi 20 ppm kurkuminu a 12 ppm norbixinu. Do jogurtů se používá 5 ppm kurkuminu, což dodá výrobku přijatelnou citrónovou barvu. Tradičně se kurkumin používá do koláčů a sušenek. Zde se používá směs kurkuminu (10 – 15 ppm) a annatta, s přídavkem norbixinu (5 – 10 ppm). Řezné plochy je třeba chránit vhodným obalem před delším vystavením světlu. Obecně platí, že kurkumin je vhodný pro použití do cukrovinek, které ovšem nejsou vystaveny světlu. Sorbety a vodní led mohou být úspěšně obarveny množstvím 5 až 15 ppm, nízké pH nepředstavuje žádný problém. Každopádně samotný kurkuminový roztok by neměl být mražen, protože by mohlo dojít k jeho vysrážení. Není vhodné jeho použití

do ochucených mlék s dlouhou životností, které jsou baleny v průhledných lahvích. V tomto případě je světlo limitujícím faktorem (Hendry a Houghton, 1996).

3.4.2 Vliv kurkuminu na zdraví

Kurkumin byl používán v tradiční medicíně po mnoho let. Používal se jako domácí lék na různá onemocnění, včetně žlučových cest, nechutenství, na kašel, jaterní poruchy a revmatismus. Za posledních několik desítek let se stanovila jeho biologická a farmakologická aktivita. Kurkumin má příznivý účinek na žaludek. U králíků bylo dokázáno, že zvyšuje sekreci hlenu a ten pak slouží jako ochrana proti podráždění. Pozitivní účinky má také na střevo, protože vlivem kurkuminu dochází ke zvyšování aktivity střevní lipázy, sacharázy a maltázy. Kurkumin chrání játra a ve slinivce zvyšuje aktivitu pankreatické lipázy, amylázy, trypsinu a chymotrypsinu. V rámci nervového systému snižuje závažnost patologických změn, a tak chrání před poškozením způsobeným infarktem myokardu. U krys má významný hypocholesterický účinek. Antirevmatická aktivita byla stanovena u pacientů, u kterých se projevilo zlepšení příznaků po podání kurkuminu. Zvyšuje hojení ran u diabetiků, má protizánětlivé účinky, antioxidační aktivitu. Kurkumin působí jako silná antikarcinogenní látka, potlačuje růst bakterií (*Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Lactobacillus*), plísní a virů (Chattopadhyay et al., 2004).

Kurkumin byl zkoumán i po stránce toxicity. Může být toxický pro játra, pokud ho používáme ve vysokých dávkách a dlouhodobě. Je tedy nutné ho omezit u lidí s jaterním onemocněním, u alkoholiků a u těch, co užívají léky zatěžující játra. Může způsobit kožní problémy a žaludeční vředy. Lidé s onemocněním žlučníku by měli kurkumin používat pouze na radu lékaře. Toxický účinek kurkuminu závisí na druhu zvířete, dávce a délce užívání (Balaji a Chempakam, 2010). Proběhla studie u Wistar potkanů, kdy byli potkani rozděleni do tří skupin: s nízkou, střední a vysokou dávkou kurkuminu. Studie probíhala v rámci dvou generací potkanů a bylo zjištěno, že v druhé generaci měla mláďata potkanů malou tělesnou hmotnost. Výsledky byly přezkoumány skupinou JECFA a ta stanovila přijatelný denní příjem (ADI) pro kurkumin na 0 - 3 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti (Ganiger et al., 2007).

3.5 Stabilita kurkuminu

3.5.1 Faktory prostředí

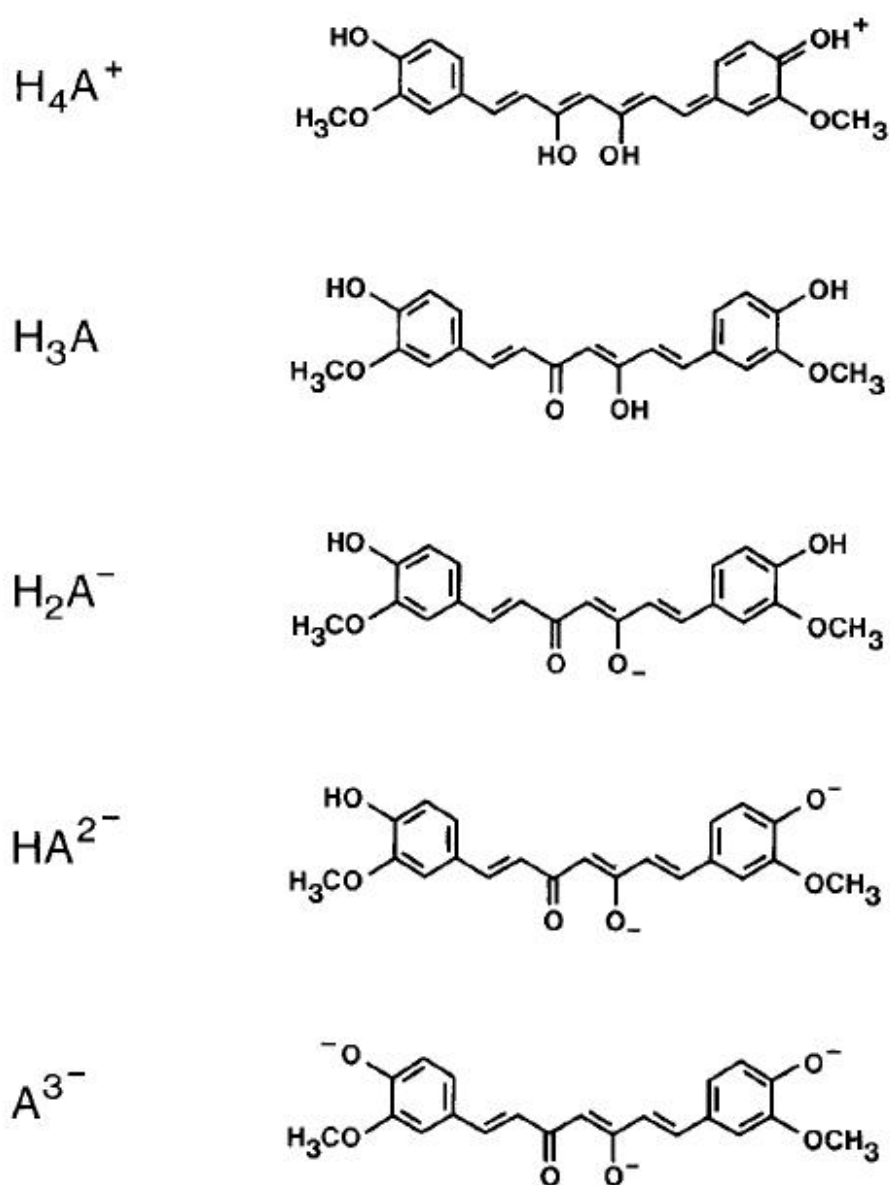
3.5.1.1 Vliv pH

Hendry a Houghton (1996) uvedli, že pro kurkumin rozpuštěný ve vodném prostředí platí: V kyselém prostředí má citrónově žlutou barvu, na rozdíl od zásaditého prostředí (pH nad 9,0), ve kterém má barvu výrazně oranžovou. Obecně platí, že kationty způsobují oranžovohnědý odstín. SO₂ snižuje intenzitu barvy rozpuštěného kurkuminu, hlavně když je SO₂ více než 100 ppm.

Velíšek a Cejpek (2008) publikovali, že kurkumin může existovat v nejméně dvou tautomerních formách, keto a enol, přičemž enolová forma je více stabilní v roztoku. Dle Niu et al. (2012) je degradace kurkuminu ve vodném roztoku způsobena reaktivní keto - enol skupinou. V kyselém a neutrálním prostředí převažuje keto forma a při vyšším tedy zásaditém pH převažuje stabilnější enol forma. V kyselém pH pod 6,5 je vyšší stabilita kurkuminu spojena s konjugovanou dien strukturou. Při neutrálním pH (7,0) dochází k rychlé degradaci volného kurkuminu, což může být způsobeno zničením této konjugované dien struktury v důsledku ztráty protonu z aktivovaného atomu uhlíku v centrální heptadienové vazbě v molekule kurkuminu.

Wang et al. (1997) ve své studii zjistili, že ve fosfátovém pufru o pH 7,2 a teplotě 37 °C dojde k degradaci více než 90 % kurkuminu za 30 minut. Zvýšení stability v kyselém pH přispívá konjugovaná struktura dienu. Nicméně pokud se hodnota pH upraví na neutrální podmínky, dojde k odstranění protonu z fenolické skupiny, což má za následek zničení této struktury. Stabilita kurkuminu byla zlepšena snížením hodnoty pH, nebo přidáním glutathionu, N-acetyl-L-cysteinu nebo askorbové kyseliny. Socaciu (2007) uvedla, že stabilitu lze zvýšit také přidáním galové, citronové nebo gentisové kyseliny, protože tyto kyseliny působí jako stabilizátory. Tønnesen a Karlsen (1985) se zabývali stabilitou kurkuminu v různých hodnotách pH. V methanolu při pH > 7 nebyly vidět žádné rozdíly u dvou vzorků s různou koncentrací kurkuminu. Kdežto při pH < 7 byla degradační reakce cca 100 krát rychlejší ve zředěném roztoku, což bylo způsobeno nízkou rozpustností kurkuminu v tomto rozmezí pH. Když je hodnota pH < 1, kurkumin má červenou barvu, které označuje protonovou formu (H₄A⁺). Kurkumin v roztoku o pH 1 - 7 je žluté barvy. V tomto rozsahu pH, je většina kurkuminu v neutrální formě (H₃A). Při dané koncentraci je rozpustnost kurkuminu nízká v této oblasti pH. Kurkumin se vysráží po

cca 3 dnech skladování a jeho degradace je pomalá. Při $\text{pH} > 7,5$ dojde ke změně barvy na oranžovo-červenou. pK_a hodnota pro disociaci na enol formu, která se vypočítává od prvního inflexního bodu, je zjištěno, že je 7,75 - 7,80. Rychlostní konstanta pro degradaci kurkuminu v tomto pH je vysoká, a udává poločas života kurkuminu méně než 10 minut. V oblasti $\text{pH} 8,20 - 8,50$ je kurkumin v rovnováze mezi třemi formami, H_3A , H_2A^- , a HA^{2-} . Druhý inflexní bod křivky je pozorován při $\text{pH} 8,55 \pm 0,05$ a třetí je pozorován při $\text{pH} 9,05 \pm 0,05$. Ty označují hodnoty pK_a pro disociaci protonů z fenolů v molekule kurkuminu.



Obrázek 2. Formy kurkuminu při různých hodnotách pH (Tønnesen a Karlsen, 1985)

Priyadarsini (2009) uvedl vhodná rozpouštědla pro kurkumin. Jedná se o methanol, ethanol, dimethyl-fumarát, dimethylsulfoxid, chloroform a acetonitril. Dále je kurkumin mírně rozpustný v hexanu, cyklohexanu, chloridu uhličitém, tetrahydrofuranu, dioxanu a *tert*-butanolu. V roztoku vykazuje kurkumin silnou absorpci v UV - VIS oblasti s absorpčním maximem v rozmezí od 408 do 434 nm. Ve většině polárních rozpouštědel je absorpční maximum 420 nm, přičemž u rozpouštědel s donory a akceptory vodíkové vazby je absorpční maximum kolem 430 - 434 nm, s výjimkou methanolu, kde je to 423 – 428 nm. Kurkumin je stabilní při nízké hodnotě pH ve vodných roztocích alkoholu, ale podstoupí hydrolyzu a chemickou degradaci při neutrálním pH. Socaciu (2007) uvedla, že hlavní produkt rozkladu při pH 7,2 je *trans*-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal, dále vzniká vanilin, ferulová kyselina a feruloylmetan.

Price and Buescher (1997) zkoumali degradaci pigmentů kurkuminu, demethoxykurkuminu a bis(demethoxy)kurkuminu v alkalickém prostředí. Všechny tři pigmenty reagovaly podobně na alkalické pH s rychlým nárůstem degradace od pH 7,5 do 10,2. Když bylo pH v rozsahu 10,2 až 11,95, rychlost rozkladu pigmentů se snížila. Bis(demethoxy)kurkumin byl více odolný proti alkalické degradaci než kurkumin a demethoxykurkumin v každé hodnotě pH. Pfeiffer et al. (2003) se zabývali stabilitou kurkuminoidů v neutrálním pH v plodovém telecím séru. Vytvořili dva vzorky o odlišném složení kurkuminu, mono(demethoxy)kurkuminu a bis(demethoxy)kurkuminu. Vzorky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu a inkubovány ve fosfátovém pufru o pH 7,4 nebo v médiu s 0 %, 5 % nebo 10 % plodového telecího séra. Byly použity různé koncentrace kurkuminoidů v rozsahu od 5 do 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin v 5% atmosféře CO₂. Kurkuminoidy byly rozloženy velmi rychle (více než 90 % za 12 h), když bylo sérum vynecháno, ale byly stabilnější v přítomnosti séra. Byl také studován účinek koncentrace a času na stabilitu kurkuminoidů, bylo zjištěno, že všechny tři kurkuminoidy byly nestabilní. Navíc tři kurkuminoidy zobrazovali různé stability: kurkumin byl nejméně stabilní a bis(demethoxy)kurkumin byl nejstabilnější kurkuminoid. Nestabilita není závislá na složení, ale závisí na koncentraci kurkuminoidů a nejvíce byla výrazná v nízkých koncentracích.

3.5.1.2 Vliv světla

Hendry a Houghton (1996) uvádějí, že kurkumin je citlivý na světlo a tento faktor omezuje jeho použití v potravinách. Tønnesen et al. (1986) zjistili, že kurkumin vykazuje fotodekompozici při vystavení UV záření, a to jak v roztoku, tak v pevném stavu ve formě tenkého filmu. V důsledku ozáření dojde k cyklizaci produktu. Fotochemická stabilita v roztoku je silně závislá na druhu rozpouštědla. Socaciu (2007) charakterizovala produkty rozkladu kurkuminu vystaveného světlu jako vanilin, vanilinové kyseliny, ferulaldehyd, ferulová kyselina a 4-vinylguajakol.

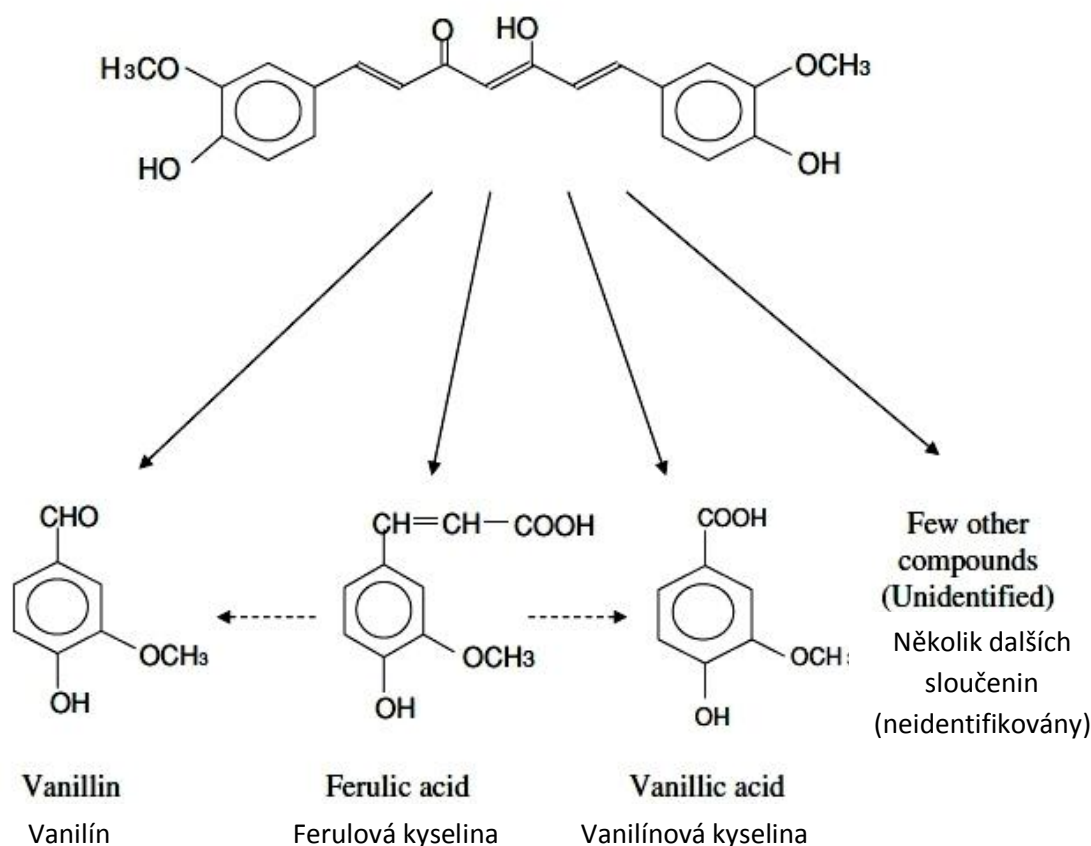
3.5.1.3 Vliv skladování

Tønnesen a Karlsen (1985) tvrdí, že kurkumin není vhodný pro použití v mnoha produktech, protože dochází k jeho odbarvení při skladování za alkalických podmínek. Stabilitu v průběhu skladování sledovali Souza et al. (1997). Byl sledován vliv vodní aktivity na stabilitu kurkuminoidů během skladování při teplotě 21 (+/-) 1 °C. Vzorky byly uloženy pod dusík/tma, dusík/světlo, vzduch/tma a vzduch/světlo při vodní aktivitě 0,33, 0,57 a 0,97. Vzorky byly analyzovány spektrofotometricky na obsah kurkuminoidů ve specifických časových intervalech. Bylo pozorováno, že kurkuminoidy jsou citlivé na světlo, nicméně kombinované účinky vzduchu a světla byly více škodlivé. Vodní aktivita neměla na stabilitu žádný vliv. Sowbhagya et al. (2005) zkoumali stabilitu ve vodě rozpustného kurkuminového barviva v extrudovaném potravinářském výrobku během skladování. Produkty byly pokryty vrstvou barviva, uloženy do polypropylenových sáčků a následně skladovány při teplotě 27 °C a 65% relativní vlhkosti vzduchu. U vzorků byl hodnocen jas, odstín a sytost. V průběhu 10 týdnů došlo u vzorků k poklesu jasu až o 30 %. Ke změně odstínu došlo v rozpětí 8 týdnů, ale nejvýraznější změna byla v počáteční fázi skladování (první týden). Po 10 týdnech skladování vzorky obsahovaly 77 % kurkuminu, ale trvanlivost výrobku byla 6 týdnů vlivem okolních podmínek.

3.5.1.4 Vliv teploty

Hendry a Houghton (1996) uvedli, že kurkumin je v podstatě stabilní vůči teplu, a tak odolá pečení. Suresh et al. (2009) se zabývali stabilitou kurkuminu při tepelném zpracování a zjistili, že v průběhu tepelného zpracování kurkuminu jsou tvořeny jeho geometrické izomery. Během působení tepla dochází u kurkuminu k tvorbě několika odvozených sloučenin, což jsou menší molekuly s nižší molekulovou hmotností

vzniklé rozkladem kurkuminu. Což vede k posunu do jiných absorpčních spekter, která jsou typická pro vanilinovou kyselinu, ferulovou kyselinu a vanilin. Ferulová kyselina se může vlivem pyrolytického zpracování rozkládat na vanilin a vanilinovou kyselinu. Nelze tedy odvodit, zda tyto sloučeniny vznikly z mateřské molekuly kurkuminu nebo již z vytvořené ferulové kyseliny. Tvorba těchto sloučenin dokazuje zranitelnost diketonového mostu při působení tepla na molekulu kurkuminu. Nejvíce citlivý na teplo je první atom uhlíku v alkylovém řetězci, který spojuje dvě benzenová jádra.



Obrázek 3. Sloučeniny vznikající působením tepla (Suresh et al., 2009)

3.5.2 Mikrokapsulace

Ke stabilizaci se používá mikrokapsulace. Používá se hlavně pro přírodně identická a přírodní barviva. Mikrokapsulace si klade za cíl zcela zachytit pigmentové částice v ochranné síti, která pigment izoluje a stabilizuje. Pigment je pak odolný vůči faktorům, které mohou způsobit ztrátu barvy nebo ji pozměnit. Těmito faktory mohou být oxidace, anebo vystavení pigmentu kyselým podmínkám. Ochrana, kterou poskytují zapouzdření, závisí na matrici, účinnosti nátěru a bodu v čase, kdy dojde

k uvolnění pigmentu (Downham a Collins, 2000). Boruah et al. (2012) se zabývali látkou, kterou lze stabilizovat kurkumin, a to chitosanem [(1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glukan]. Chitosan je lineární polysacharid s unikátními fyzikálně - chemickými vlastnostmi, včetně pevné struktury, biologické rozložitelnosti a vysoké odolnosti vůči teplu. Kromě toho chitosan účinně reaguje s povrchově aktivními látkami ve vodných roztocích. Vzhledem k vysokému obsahu aminových funkčních skupin a hydroxylových skupin, může chitosan absorbovat řadu barviv, mezi něž patří i pigment kurkumin s vysokou afinitou na značně vysoké pH (pH = 7,0 – 10,5). Kurkumin se na chitosan váže prostřednictvím jednotky glukosaminu přes hydroxylové skupiny. Ty reagují s hydrofobním vnitřkem chitosanu a ten pak působí jako bariéra mezi kurkuminem a vodným prostředím a způsobuje potlačení hydrolytické degradace kurkuminu. Proto v přítomnosti chitosanu při pH 7,4 dochází ke zpomalení rozkladu kurkuminu přibližně 3x. Tapal a Tiku (2012) zjistili, že stabilizovat lze i pomocí sójového bílkovinného izolátu (SPI). Jedná se o frakci bílkovin vyrobené ze sóji. SPI je výlučně složeno ze dvou kulových bílkovinných frakcí tzv. 7S (β -conglycinin) a 11S (glycinin). Tapal a Tiku (2012) vytvořili vodný roztok SPI a v něm byl rozptýlen kurkumin. Po odstranění volného kurkuminu centrifugací, byl sprejovým sušením získán zapouzdřený kurkumin ve formě SPI/kurkuminového komplexu. Kurkumin byl tedy zapouzdřen do SPI pomocí sprejového sušení za vzniku prášku. Tento prášek byl pro studium stability rozpuštěn ve vodě, simulované žaludeční a střevní tekutině. Stabilita byla vyhodnocena na základě měření absorbance při 425 nm v různých časových intervalech. Rozpuštěnost kurkuminu ve vodě se významně zvyšuje při nárůstu koncentrace SPI, který tvoří s kurkuminem rozpustný komplex, což je velice podstatné, protože samotný kurkumin je prakticky nerozpustný ve vodě. Sušený prášek byl rozpuštěn ve vodě na čirý roztok. K rozpuštění došlo rychle a snadno, bez vzniku znatelné sraženiny. Kromě toho, byl SPI/kurkumin komplex zcela rozpuštěn v simulovaných žaludečních a střevních tekutinách. Tapal a Tiku (2012) došli k závěru, že více než 80 % kurkuminu bylo stabilních v SPI - kurkumin komplexu rozpuštěného ve vodě, simulované žaludeční a střevní tekutině po 12 hodin. Vazba na proteiny tedy napomáhá rozpouštění a brání degradaci. Přesněji dochází k vazbě kurkuminu na hydrofobní oblasti proteinových molekul. Niu et al. (2012) studovali mikrokapsulaci kurkuminu do liposomu. Ten obsahuje ve své fosfolipidové dvojvrstvě hydrofobní i hydrofilní části pomocí níž mohou být jiné molekuly zapouzdřeny. Po zapouzdření

kurkuminu byla měřena stabilita liposomálního kurkuminu v pufru fosforečnanu sodného o pH 7,0, při kterém je kurkumin téměř nerozpustný. Liposomální kurkumin neprodělal žádné výrazné změny po jednom měsíci skladování, což naznačuje dobrou pevnost kurkuminu v liposomu, i přestože byl kurkumin o velikosti nanometrů a také mohlo docházet k elektrostatickému odpuzování mezi liposomálními částicemi. Niu et al. (2012) dále měřili absorpční spektrum zapouzdřeného kurkuminu a volného kurkuminu pro srovnání stability. Volný kurkumin vykazoval maximální absorpci při 425 nm. K vyhodnocení stability byly použity změny relativní intenzity. Po 180 minutách inkubování při 25 °C při pH 7,0 byly naměřeny hodnoty relativní intenzity liposomálního kurkuminu 0,855 a volného kurkuminu 0,311. Výsledky ukazují, že zapouzdření kurkuminu do liposomu může účinně zlepšit stabilitu a zpomalit rychlost degradace kurkuminu, protože keto - enol skupina je chráněna před vodným prostředím uvnitř fosfolipidové dvojvrstvy. Paramera et al. (2011a) zkoumali mikrokapsulaci kurkuminu do buněk kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Buňky kvasinek mají výhodu ve srovnání s liposomy. Kvasinky mají totiž vnější tlusté stěny, které obsahují glukanovou síť, vrstvu manoproteinů a malé množství chitinu. Stěna zajišťuje mechanickou pevnost buňky a umožňuje molekulám šířit se volně. Naopak buněčná membrána je hlavní propustnou bariérou pro vstup molekul. Část kvasinek byla podrobena plazmolýze. Plazmolyzované a neplazmolyzované kvasinky, a to lyofilizované nebo živé, byly hodnoceny pro svou schopnost zapouzdřit kurkumin. Bylo zjištěno, že prázdné kvasinky nevydávají fluorescenci, ale všechny připravené mikrokapsle fluorescenci vyzařovaly, což naznačuje, že nezávisle na podmínkách přípravy (plazmolýza, lyofilizace) byl kurkumin zapouzdřen v kvasinkách. Mikrokapsle byly vystaveny vysokým teplotám. Byly stabilní do teploty 262 °C, kdežto nezapouzdřený kurkumin se začal rozkládat již při 204 °C. Zdá se, že mikrokapsulace do kvasinek zvyšuje tepelnou stabilitu kurkuminu. Paramera et al. (2011b) také porovnávali stabilitu kurkuminu zapouzdřeného do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyklodextrinu a modifikovaného škrobu s ohledem na faktory životního prostředí, jako jsou teplota, světlo, vlhkost nebo citlivost ke kyslíku. U všech forem zapouzdření bylo též měřeno rozpouštění v simulovaném žaludku a pankreatických šťávách. Všechny zapouzdřené formy kurkuminu byly schopny uvolnit jejich obsah v simulované žaludeční šťávě. Výsledky ukázaly, že již od počátku vystavení simulované gastrointestinální kapalině byla vyšší koncentrace rozpuštěného kurkuminu, který byl

původně zapouzdřen, než u volného kurkuminu. Maximální koncentrace rozpuštěného kurkuminu bylo dosaženo téměř po 3 hodinách pro β -cyklodextriny a modifikovaný škrob, po 12 hodinách pro nezapouzdřený kurkumin a po 48 hodinách pro kvasinkové mikrokapsle. Je tedy zřejmé, že rozpuštění kurkuminu, který byl zapouzdřen v β -cyklodextrinech a modifikovaném škrobu bylo poměrně rychlé, kdežto u kvasinkových mikrokapslí docházelo k rozpouštění postupně a trvalo to několik desítek hodin. Vzorky byly dále vystaveny syntetické pankreatické šťávě o pH 8. Koncentrace kurkuminu ve všech testovaných vzorcích byla zpočátku zvýšena, pravděpodobně v důsledku vysoké hodnoty pH, kdy je kurkumin odloučen a tím má lepší rozpustnost ve vodě. Další expozice, ale koncentraci snížila, což bylo způsobeno alkalicky labilní povahou kurkuminu. Nejvyšší rychlost degradace byla pozorována u nezapouzdřeného kurkuminu a u kurkuminu zapouzdřeného do β -cyklodextrinu. Pro vyhodnocení faktorů životního prostředí byly vzorky vystaveny světelnému záření po 30 dní a následně porovnány s nezapouzdřeným kurkuminem. U kvasinkových mikrokapslí došlo ke zvýšení stability až 2,6 krát narozdíl od β -cyklodextrinu, u kterého došlo spíše k posílení nestability. Naopak u zapouzdřené formy modifikované škrobu došlo ke zvýšení fotostability, ale po 30ti dnech nebyly hodnoty významně odlišné od nezapouzdřeného kurkuminu. Zapouzdření kurkuminu do β -cyklodextrinu a modifikovaného škrobu také zvýšilo skladovatelnost, zejména při nižších hodnotách vlhkosti, ale výrazně méně ve srovnání s kvasinkovými buňkami. Celkově byl v průběhu skladování kurkumin degradován oxidačními jevy. Nejvyšší ztráty kurkuminu byly pozorovány u relativní vlhkosti nad 75 %, kdy přítomnost vody zvyšuje mobilitu kurkuminu přes matici k povrchu kapsle, kde může být více náchylný k oxidaci. Nicméně, zapouzdření, zejména do kvasinky, mohou omezit oxidační degradaci při zvýšené relativní vlhkosti. Kurkuminové mikrokapsle v kvasinkových buňkách byly také lépe chráněny proti tepelné degradaci než nezapouzdřené nebo zapouzdřené v β -cyklodextrinu a modifikovaném škrobu, které ovšem měly stabilizující účinky při tepelném rozkladu kurkuminu, zejména za oxidativních podmínek. Jak uvádí Tomren et al. (2007) cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy s hydrofilním vnějším povrchem a lipofilní centrální dutinou. Komplexy hydrofilních léčiv s cyklodextrinem jsou tvořeny začleněním lipofilních léčiv nebo lipofilní léčivé jednotky do dutiny uprostřed cyklodextrinu. Lipofilní dutina chrání lipofilní molekuly před vodným prostředím, zatímco polární vnější povrch molekuly cyklodextrinu poskytuje rozpouštěcí efekt.

Rychlost degradace závisí na stupni ochrany podle použitého druhu cyklodextrinu, struktury kurkuminoidu nebo hodnotě pH roztoku. Zapouzdření kurkuminu s cyklodextriny také řešili López-Tobar et al. (2012). Zjistili, že β -cyklodextriny ovlivňují strukturu kurkuminu více než γ -cyklodextriny vzhledem k jejich menší velikosti dutiny. Ovšem u γ -cyklodextrinů je účinnost zapouzdření vyšší kvůli lepší interakci polyfenolů s dutinou. K interakci dochází prostřednictvím tvorby vodíkové vazby mezi fenolovou skupinou OH a OH skupinou z cyklodextrinu. Zapouzdření vede k isomeraci kurkuminu z enol keto formy na diketo isomer, který je méně reaktivní a tak se zvyšuje biologická dostupnost kurkuminu. Szente et al. (1998) posuzovali stabilizační efekt cyklodextrinů na kurkuminoidy. Efekt byl posouzen na základě ztráty organických těkavých látek v rozmezí teplot od 65 do 130 °C. Volná forma kurkuminu ztratila více než 80 % svých těkavých organických látek po zahřátí. Volný kurkumin obsahoval také malé množství kurkuminové pryskyřice v teplotním rozsahu 140 – 200 °C. Komplex β -cyklodextrinu s pryskyřicí kurkumy omezil únik pouze na 20 % z obsahu kurkumy při zahřátí až na 130 °C. Komplexací kurkumy byly těkavé složky tepelně odolné v teplotním rozmezí 65 až 90 °C. Tepelný rozklad z pevného komplexu začal až při 140 °C. Szente et al. (1998) připravili první komplexy kurkumin / β -cyklodextrin a pryskyřice / β -cyklodextrin v květnu roku 1981. Sledovali, jak se kurkuminový obsah těchto vzorků mění během skladování v uzavřených bezbarvých skleněných lahvičkách za normálních skladovacích podmínek. Byly odebrány vzorky pravidelně během posledních 14 let a neporušený kurkuminový obsah těchto vzorků byl stanoven pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Výsledky dlouhodobé skladovací zkoušky jsou, že komplexace cyklodextrinu poskytuje pozoruhodné zlepšení trvanlivosti kurkuminu a méně výraznější účinek na pryskyřice kurkumy, v porovnání s analytickým standardním kurkuminem a výtažkem z kurkumy uložených v mrazáku pod dusíkem v uzavřených ampulích. Jak uvedli Tønnesen et al. (2002) různé cyklodextriny zvyšují rozpustnost kurkuminu, nicméně fotochemická stabilita kurkuminu se snižuje v porovnání s kurkuminem v roztoku organických rozpouštědel. To je způsobeno nepolárním prostředím nebo stericky omezeným reakčním polem uvnitř dutiny cyklodextrinu. Míra fotodegradace byla nižší u kurkumin/ethanol/fosfátového pufru o pH 5, než u komplexu kurkumin/cyklodextrin. Rychlost degradace se snížila přidáním alkoholu do systému, což naznačuje, že polarita může mít menší význam než interakce mezi kurkuminem a médiem s ohledem na fotochemickou reaktivitu. Wang et al. (2009) využili pro

mikrokapsulaci želatinu, která má velmi dobrou rozpustnost ve vodě, dobře tvoří film, je poživatelná a zvyšuje stabilitu. Byl proveden experiment s rozpustností, kdy volný kurkumin nebyl ve vodě jako rozpouštědlo a při normální teplotě rozpuštěn, zatímco zapouzdřený kurkumin byl rozpuštěn okamžitě po 4 minutách. Kapsulovaný kurkumin upravený sprejovým sušením byl rozpuštěn po 2 minutách. Pro kurkumin, jehož teplota zahřívání byla 100 °C spolu se zvyšující se dobou zahřívání, hodnoty absorbance volného kurkuminu rychle klesaly, zatímco u kapsulovaného kurkuminu před a po sprejovém sušení byly vyrovnané. Došlo ke zlepšení tepelné odolnosti. Při vystavení kurkuminu kyselému prostředí (pH 1 až pH 6) dochází se snižující se hodnotou pH ke snížení stability kurkuminu. Snížený poměr absorbačních hodnot pro kapsulovaný kurkumin před a po sprejovém sušení byl 3,3 a 2,6 %, zatímco u volného kurkuminu byl 15,7 %. U kapsulovaného kurkuminu došlo ke zlepšení odolnosti vůči kyselému prostředí. Munin a Edwards-Lévy (2011) uvádí, že kurkumin ve formě nanočástice, prodlužuje retenční čas v těle a zlepšuje biologickou dostupnost, perorální biologická dostupnost kapsulovaného kurkuminu a kopolymeru poly(mléčné-co-glykolové kyseliny) (PLGA) jako matice byla 22 krát vyšší než u volného kurkuminu.

Lin et al. (2009) vytvořili mikroemulzi, což je směs vody, olejové složky a povrchově aktivní látky, která může snižovat povrchové napětí mezi olejem a vodou. Lin et al. (2009) provedli studii, která hledala stabilní mikroemulzi pro zvýšení biologické dostupnosti kurkuminu. Porovnávali pět rozpouštědel jako je destilovaná voda, ethyloleát, mátový olej, sojový olej a isopropylmyristát. Jako povrchově aktivní látky byly přidány Lecitin a Tween 80. Následně byla zkoumána stabilita kurkuminu v různých mikroemulzích. Výsledky ukázaly, že kurkumin byl nejstabilnější v mikroemulzi složené z destilovaná voda:lecitin a tween 80 (v molárním poměru 0,3): ethyloleát v poměru 10:1,7:0,4. Stabilní byl po dobu dvou měsíců.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byl použit vzorek kořene rostliny *Curcuma longa L.* Přesněji šlo o kořen krájený (sklizeň 2011) zakoupený u Natura Waldemar Grešík, Děčín.

4.1.2 Chemický materiál

Pro extrahování látek z rostlinného materiálu byla použita rozpouštědla aceton p.a. (Lach-ner, s.r.o.), ethanol denaturovaný 1 % lékárenského benzínu (lihovar Liho Blanice, Mladá Vožice) a destilovaná voda (Katedra chemie ČZU). Pro úpravu pH byly použity roztoky 35% HCl p.a. (Lach-ner, s.r.o.) a 10% NaOH p.a. (Lach-ner, s.r.o.).

4.1.3 Zařízení a laboratorní pomůcky

- ruční mixér
- filtrační aparatura
- vakuová destilační kolona
- laboratorní nádobí (kádinky)
- skleněná kyveta

4.2 Metody

4.2.1 Příprava extraktu

Vzorek sušeného kořene kurkumy byl ručním mixérem mixován s acetonem do vytvoření macerátu. Tento macerát byl důkladně promýván přes filtrační papír, aby byly odstraněny zbytky částic kurkumy a došlo k uvolnění požadovaných sloučenin. Jako rozpouštědlo byl použit aceton. Po získání dostatečného množství extrahovaného vzorku (asi 500 ml) byla provedena vakuová destilace na odparce, na níž byl získán koncentrovaný extrakt. Byl změřen objem extraktu a ten následně zředěn acetonem v poměru extrakt : aceton = 1 : 4.

4.2.2 Příprava vzorků

Ze zředěného extraktu bylo do sedmi odměrných baněk odpipetováno 0,5 ml. Do tří odměrných baněk byl ke zředěnému roztoku přidán 10% hydroxid sodný v množství 0,5 ml pro vytvoření alkalického prostředí, do dalších dvou odměrných baněk byla přidána 35% kyselina chlorovodíková v množství 0,5 ml pro vytvoření kyselého prostředí. Zbylé dvě odměrné baňky byly ponechány pouze se zředěným roztokem. Vzorky byly doplněny po rysku rozpouštědly acetonem, ethanolem a destilovanou vodou, aby se vytvořily tyto kombinace:

1. zředěný extrakt + NaOH + destilovaná voda
2. zředěný extrakt + NaOH + aceton
3. zředěný extrakt + NaOH + ethanol
4. zředěný extrakt + HCl + aceton
5. zředěný extrakt + HCl + ethanol
6. zředěný extrakt + nic + aceton
7. zředěný extrakt + nic + ethanol

Následně každý ze sedmi vzorků byl rozdělen do 4 lahviček, konečný počet vzorků byl tedy 28 ks.



4.2.3 Umístění vzorků

Vzorky byly umístěny do vytvořených laboratorních podmínek. Podmínky světlo/teplo byly vytvořeny umístěním vzorků na světlém místě na lednici v laboratoři v průsvitných lahvičkách za teploty 25 – 30 °C.

Podmínky světlo/chlad byly zastoupeny umístěním vzorků do prosklené lednice, která udržovala teplotu v rozsahu 5 – 7 °C. Lahvičky byly ponechány bez obalu, což umožnilo přístup světla ke vzorkům.

Podmínky tma/teplo byly vytvořeny pomocí alobalu, kdy byly lahvičky se vzorky obaleny alobalem, a bylo tedy zamezeno přístupu světla ke vzorku. Tyto vzorky byly umístěny na stejné místo jako vzorky z podmínek světlo/teplo, a byly tedy vystaveny teplotě 25 – 30 °C.

Poslední podmínky tma/chlad byly vytvořeny umístěním vzorků do prosklené lednice s teplotou 5 – 7 °C. Lahvičky byly opět obaleny alobalem pro zamezení přístupu světla.

Tabulka 1 - Složení a umístění vzorků			
Základ	Rozpouštědlo	Úprava pH	Laboratorní podmínky
extrakt : aceton 1 : 4	Destilovaná voda	NaOH	Světlo/teplo
			Světlo/chlad
			Tma/teplo
			Tma/chlad
	Aceton	NaOH	Světlo/teplo
			Světlo/chlad
			Tma/teplo
			Tma/chlad
	Ethanol	NaOH	Světlo/teplo
			Světlo/chlad
			Tma/teplo
			Tma/chlad
	Aceton	HCl	Světlo/teplo
			Světlo/chlad
			Tma/teplo
			Tma/chlad
	Ethanol	HCl	Světlo/teplo
			Světlo/chlad
			Tma/teplo
			Tma/chlad
Aceton	/	Světlo/teplo	
		Světlo/chlad	
		Tma/teplo	
		Tma/chlad	
Ethanol	/	Světlo/teplo	
		Světlo/chlad	
		Tma/teplo	
		Tma/chlad	

4.2.4 Proměňování vzorků

Pro proměňování byla používána stále stejná kyveta. Jednalo se o 1 cm skleněnou kyvetu z důvodu použití organického rozpouštědla acetonu, který by mohl plastovou kyvetu poškodit.

Proměňování vzorků probíhalo na přístroji spektrofotometr (spektrofotometr Helios γ , Thermo, Electron corporation, Great Britain). Spektrofotometr byl nulován na destilovanou vodu, protože bylo zjištěno, že organická rozpouštědla aceton, ethanol a destilovaná voda mají téměř stejnou absorpční kapacitu. Vzorky byly po každém měření vráceny zpět do příslušné lahvičky. Mezi každým dalším měřením byla kyveta vypláchnuta a osušena.

Na základě vzorků extrakt/nic/aceton, extrakt/NaOH/ethanol a extrakt/nic/ethanol byly stanoveny vlnové délky 417 nm, 461 nm a 425 nm, ve kterých bylo pokaždé měřeno (tyto hodnoty odpovídaly absorpčním maximům).

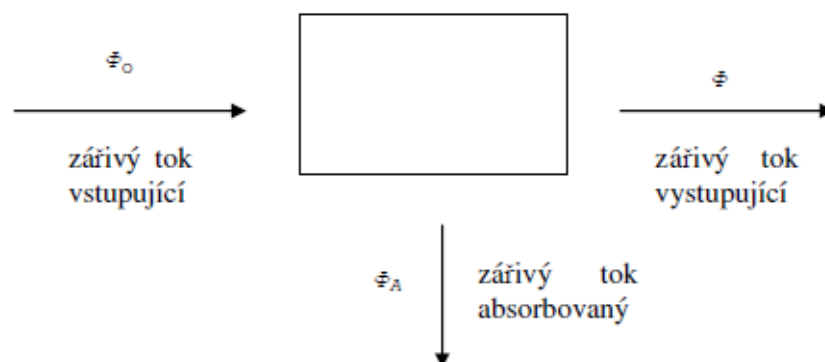
Na začátku výzkumu byly vzorky měřeny dvakrát týdně po dobu cca měsíce (23.4. – 21.5.). V následujících pěti týdnech bylo měřeno každé pondělí (28.5., 4.6., 11.6., 18.6., 25.6.). Další měření byla prováděna po třech nebo čtyřech týdnech (16.7., 16.8., 6.9., 4.10.). U většiny vzorků již byly hodnoty absorpce konstantní, proto bylo poslední měření provedeno 11.10.

4.2.4.1 Spektrofotometrie ve viditelné oblasti světla

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami (Sinica, n.d.).

Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny absorpcí ultrafialového (190 až 400 nm) a viditelného záření (400 až 800 nm). Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrofotometry. Při absorpčním měření je ze vstupujícího toku záření Φ_0 část absorbována vzorkem (absorbovaný zářivý tok Φ_A) a v ideálním případě zbytek projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ (Sinica, n.d.). Podíl zářivých toků Φ a Φ_0 se nazývá propustnost neboli transmittance: $\tau = \Phi / \Phi_0$.

Na většině spektrofotometrů lze také odečíst hodnotu absorpce A , tj. záporně vzatý logaritmus propustnosti: $A = -\log \tau = \log (\Phi_0 / \Phi)$



Obrázek 4. princip absorpční spektrofotometrie (Sinica, n.d.)

Konstrukčně se spektrofotometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové. Absorpční spektrofotometr je tvořen čtyřmi základními částmi:

1. Zdroj záření - zdrojem spojitého elektromagnetického záření pro viditelnou oblast je běžně wolframová nebo halogenová žárovka.
2. Monochromátor - je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Rozkladným prvkem může být hranol nebo reflexní mřížka. Pro viditelnou oblast spektra, tj. 400 - 800 nm, je hranol ze skla. Natáčením rozkladného prvku se postupně zobrazují jednotlivé monochromatické obrazy vstupní štěrbinu na štěrbinu výstupní.
3. Absorpční prostředí - tvoří kyveta s roztokem. Pro viditelnou oblast jsou okénka kyvety ze skla. Absorpční prostředí tvoří většinou roztok látky ve vhodném rozpouštědle. Nejběžnějším je destilovaná voda.
4. Detekční systém - je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro detekci záření ve viditelné oblasti se používají fotonky nebo fotonásobiče, selénové hradlové fotočlánky, fotoodpory apod. Signál z detektoru se zpracovává v zesilovači a jeho výstup se zobrazí na číslicovém displeji (Sinica, n.d.).

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na reflexní mřížce nebo hranolu vychází z výstupní štěrbinu svazek přibližně monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Střední hodnotou tohoto intervalu je nastavená vlnová délka. Velikost intervalu je závislá na konstrukci přístroje. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá

monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud se převádí na digitální výstup (Sinica, n.d.).

4.2.5 Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly zaneseny do tabulek a následně vytvořeny grafy sjednocující různé podmínky a na základě těchto grafů byla vyhodnocena stabilita v jednotlivých organických rozpouštědlech a laboratorních podmínkách.

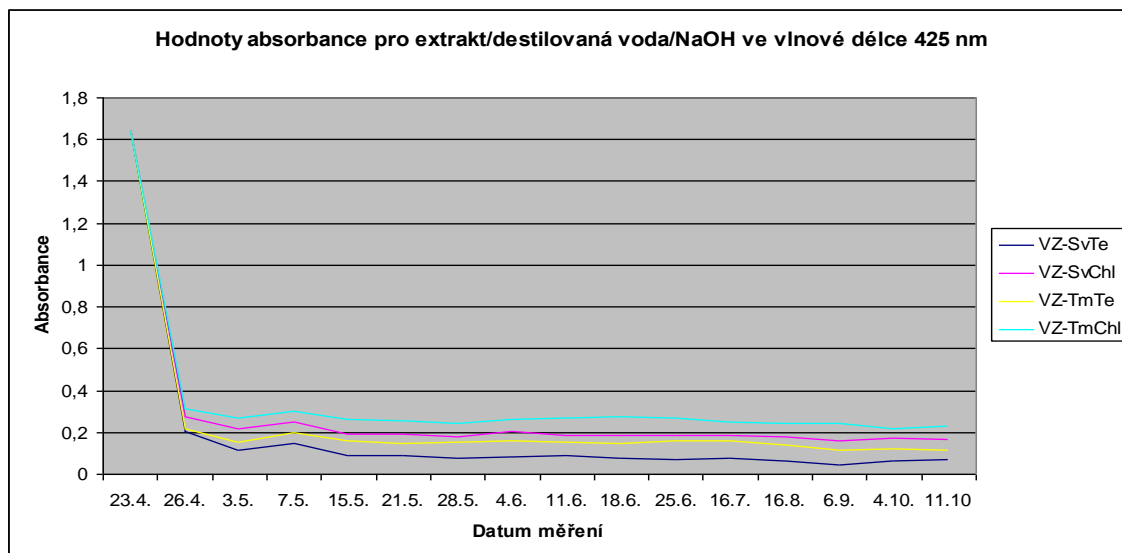
5 VÝSLEDKY

Do výsledků a následně i diskuze je zahrnuta pouze část výsledků. Větší část bude zhodnocena v rámci Diplomové práce.

K největším změnám absorbance docházelo během prvního týdne měření. V každé nastavené vlnové délce se hodnoty liší, proto nelze u všech vzorků jednoznačně říci, zda docházelo k poklesu nebo nárůstu. Z naměřených hodnot v Tab. 2 je vidět, že v rámci vlnové délky 425 nm došlo během prvních tří dnů k poklesu hodnot u 50 % vzorků. Stejný poměr byl zaznamenán u vlnové délky 417 nm. Ve vlnové délce 461 nm došlo k poklesu u 75 % vzorků. Po dalších 7 dnech

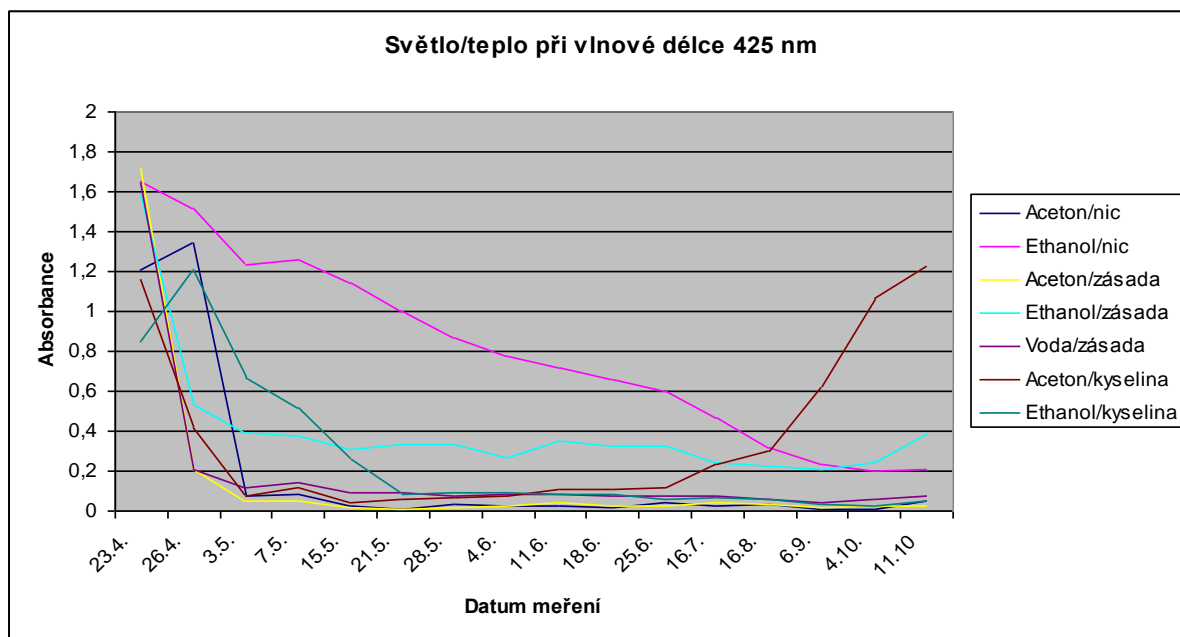
Tabulka 2 - Změna absorbance ve vlnové délce 425 nm					
Vzorek	Datum měření			Měřeno po	
	23.4.2012	26.4.2012	3.5.2012	3 dnech	11 dnech
AN-SvTe	1,2080	1,3396	0,0710	0,1316	-1,2686
AN-SvChl	1,2080	1,5667	1,4174	0,3587	-0,1493
AN-TmTe	1,2080	1,5981	1,5736	0,3901	-0,0245
AN-TmChl	1,2080	1,6148	1,6216	0,4068	0,0067
EN-SvTe	1,6484	1,5149	1,2364	-0,1335	-0,2784
EN-SvChl	1,6484	1,6648	1,6683	0,0164	0,0035
EN-TmTe	1,6484	1,6976	1,6843	0,0491	-0,0133
EN-TmChl	1,6484	1,7163	1,7085	0,0678	-0,0077
AZ-SvTe	1,7160	0,2122	0,0496	-1,5037	-0,1625
AZ-SvChl	1,7160	0,9728	0,8145	-0,74313	-0,1583
AZ-TmTe	1,7160	1,1489	1,0896	-0,5671	-0,0592
AZ-TmChl	1,7160	1,1663	1,1628	-0,5496	-0,0035
EZ-SvTe	1,5801	0,5304	0,3900	-1,0496	-0,1404
EZ-SvChl	1,5801	0,9920	0,8402	-0,5880	-0,1518
EZ-TmTe	1,5801	0,8276	0,5710	-0,7524	-0,2566
EZ-TmChl	1,5801	1,0744	0,9681	-0,5056	-0,1062
VZ-SvTe	1,6389	0,2042	0,1153	-1,4346	-0,0889
VZ-SvChl	1,6389	0,2749	0,2153	-1,3639	-0,0596
VZ-TmTe	1,6389	0,2164	0,1537	-1,4224	-0,0627
VZ-TmChl	1,6389	0,3161	0,2702	-1,3227	-0,0459
AK-SvTe	1,1569	0,4126	0,0724	-0,7442	-0,3402
AK-SvChl	1,1569	1,5126	1,3489	0,3557	-0,1637
AK-TmTe	1,1569	1,6569	1,6206	0,5000	-0,0362
AK-TmChl	1,1569	1,6726	1,6365	0,5156	-0,0361
EK-SvTe	0,8501	1,2048	0,6683	0,3546	-0,5364
EK-SvChl	0,8501	1,6854	1,6534	0,8353	-0,0320
EK-TmTe	0,8501	1,7187	1,6645	0,8685	-0,0541
EK-TmChl	0,8501	1,7394	1,7300	0,8893	-0,0094

došlo k poklesu hodnot již u 92,9 % vzorků ve všech vlnových délkách. Největší pokles v rámci prvního týdne měření byl u vzorků v destilované vodě s roztokem NaOH a následně se již hodnoty pro tyto vzorky téměř neměnily (Graf 1).



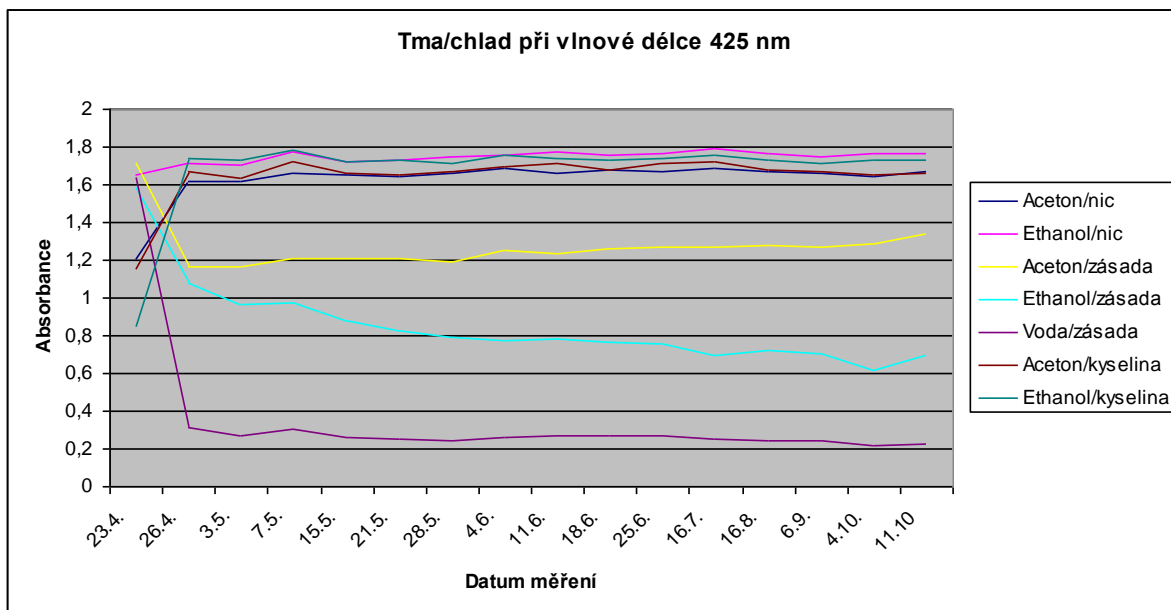
Graf 1

Všechny vzorky byly nejméně stabilní v podmínkách světlo/teplo. V těchto podmínkách došlo k rychlému poklesu hodnot absorbance pro všechny rozpouštědla. K pozvolnému poklesu hodnot absorbance docházelo u kurkuminu v ethanolu, který ale na konci měření měl stejnou hodnotu jako ostatní vzorky (Graf 2).



Graf 2

Konstantní hodnoty absorbance vykazovala většina vzorků v podmínkách tma/chlad. K poklesu hodnot došlo pouze u těch vzorků, které byly v zásaditém prostředí a to pro všechna použitá rozpouštědla. Poté se hodnoty již neměnily. Z Grafu 3 je patrné, že v zásaditém prostředí a vlnové délce 425 nm má nejmenší pokles absorbance aceton. Tento výsledek je i v rámci vlnové délky 417 nm. Při 461 nm je nejstabilnější v zásaditém prostředí ethanol.



Graf 3

V podmínkách tma/teplo měly konstantní hodnoty vzorky: kurkumin/ethanol, kurkumin/aceton, kurkumin/ethanol/kyselina a kurkumin/aceton/kyselina. U vzorků umístěných do podmínek světlo/chlad měly konstantní hodnoty již jen vzorky v ethanolu a ethanolu s kyselinou.

6 DISKUZE

Kurkumin je barvivo s označením E100 a patří mezi povolená potravinářská barviva. Vzhledem k původu barviva patří do přírodních barviv, která často vykazují nízkou stabilitu. Ve svém výzkumu jsem se tedy zaměřila na stabilitu kurkuminu vystaveného uměle vytvořeným přírodním podmínkám a hlavně byl zkoumán vliv rozpouštědla a pH.

Z výsledků je patrné, že kurkumin je nejméně stabilní v destilované vodě. Pro zjištění stability v tomto rozpouštědle byl ovšem použit pouze vzorek s NaOH, ve kterém se kurkumin rozpustil, což potvrzuje Chattopadhyay et al. (2004) tvrzením, že je kurkumin rozpustný v alkáliích. Z Grafu 1 (viz Výsledky) je evidentní, že u kurkuminu rozpuštěného ve vodě v alkalickém prostředí dojde k velmi rychlé degradaci. Stejných výsledků dosáhli i Price a Buescher (1997), kteří tvrdí, že u nich došlo k rychlé degradaci při pH v rozmezí 7,5 – 10,2 a Tønnesen a Karlsen (1985), které zjistili, že degradace kurkuminu ve vodě je vysoká při $\text{pH} > 7,5$.

Použití vzorku pouze s destilovanou vodou nebylo možné, protože kurkumin nebyl rozpuštěn, což přesně koresponduje s tvrzením Čopíkové et al. (2005). Vzorky s destilovanou vodou a kyselinou nebylo možné použít, protože u nich tak jako ve výzkumu Tønnesen a Karlsen (1985) došlo k vytvoření sraženiny a hlavně byl kurkumin velmi špatně rozpustný, což potvrzuje ve své práci i Niu et al. (2012).

Velmi špatnou stabilitu vykazovaly i ostatní vzorky v alkalickém prostředí, a i přestože Tønnesen a Karlsen (1985) používali jako médium vodu, shodují se jejich výsledky s mými pro vzorky právě v tomto prostředí. Uvedli, že nejrychlejší rozklad je v pH 7,75 - 7,80. Do těchto hodnot pH v mé práci spadá pouze vzorek aceton/zásada v podmínkách světlo/teplo a z Tabulky 2 (viz Výsledky) je evidentní, že u něj po 3 dnech došlo k největšímu poklesu ze všech vzorků.

Nejstabilnější byly tedy vzorky v kyselém prostředí a to hlavně při použití rozpouštědla ethanolu. V ethanolu byl kurkumin velmi dobře rozpuštěn, jak uvedli i Chattopadhyay et al. (2004) a Priyadarsini (2009). Vysoká stabilita je způsobena přítomností kyseliny, která podle Wang et al. (1997) zapříčiní vznik konjugované struktury dienu kurkuminu. Vliv na stabilitu má ovšem i ethanol, protože Priyadarsini (2009) tvrdí, že kurkumin je stabilní při nízké hodnotě pH ve vodných roztocích alkoholu. Tyto moje vzorky sice nebyly ve vodném roztoku, ale jejich stabilitu zřejmě zvyšovaly právě faktory jako přítomnost alkoholu a kyseliny.

Výsledky stability v podmínkách světlo, teplo, tma a chlad není možné přesně porovnat s autory, protože žádný z nich neměl stejné podmínky jako já. Každopádně z mých výsledků je evidentní, že nejvíce byl kurkumin náchylný na vystavení světlu, což ve své studii uvádí i Hendry a Houghton (1996) a Souza et al. (1997). Proto je světlo limitujícím faktorem pro použití kurkuminu v potravinách. Podle Tønnesen et al. (1986) je to způsobeno tím, že kurkumin vykazuje fotodekompozici při vystavení UV záření, a to jak v roztoku, tak v pevném stavu ve formě tenkého filmu. V důsledku ozáření dojde k cyklizaci produktu.

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala zjištěním poznatků o stabilitě potravinářského barviva kurkuminu v rámci vytvořených laboratorních podmínek.

- Byly získány poznatky o stabilitě kurkuminu v roztoku.
- Destilovaná voda je jako rozpouštědlo nevhodná, u roztoku dojde k rychlé degradaci bez ohledu na podmínky.
- Nejstabilnější je kurkumin v rozpouštědle ethanolu.
- Ke stabilizaci kurkuminu přispívá kyselé prostředí.
- V alkalickém prostředí je kurkumin rozpustný, ale značně nestabilní.
- K největší degradaci dochází u kurkuminu vystaveného světlu.

Poznatky z bakalářské práce budou využity při zpracování diplomové práce.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Balaji, S., Chempakam, B. 2010. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). Food and chemical toxicology. 48 (10). 2951-2959.
- Boruah, B., Saikia, P. M., Dutta, R. K. 2012. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan – surfactant system: A spectroscopic study. Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry. 245 (1.říjen 2012). 18-27.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R. K. 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Current science. 87 (1). 44-53.
- Čopíková, J., Uher, M., Lapčík, O., Moravcová, J., Drašár, P. 2005. Přírodní barevné látky. Chemické listy. 99 (11). 802-816.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press. Boca Raton (Florida). p. 327. ISBN: 1-58716-076-5
- Downham, A., Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. International journal of food science and technology. 35 (1). 5-22
- Ganiger, S., Malleshappa, H. N., Krishnappa, H., Rajashekhar, G., Ramakrishna, V., Sullivan, F. 2007. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. Food and chemical toxicology. 45 (1). 64–69.
- Hendry, G. A. F., Houghton, J. D., 1992. Natural food colorants. Blackie. Glasgow. p. 280. ISBN: 0-216-93146-0

- JECFA (Stankovic, I.). Curcumin. 61st JECFA - Chemical and Technical Assessment (CTA) [online]. FAO. 2004. [cit. 2013-02-15]. Dostupné z <<http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/61/Curcumin.pdf> >
- Lin, C. C., Lin, H. Y., Chen, H. C., Yu, M. W., Lee, M. H. 2009. Stability and characterisation of phospholipid - based curcumin – encapsulated microemulsions. *Food chemistry*. 116 (4). 923-928.
- López-Tobar, E., Blanch, G. P., Ruiz del Castillo, M. L., Sanchez-Cortes, S. 2012. Encapsulation and isomerization of curcumin with cyclodextrins characterized by electronic and vibrational spectroscopy. *Vibrational spectroscopy*. 62 (září 2012). 292-298.
- Mortensen, A. 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*. 78 (8). 1477-1491.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*. 3 (4). 793-829.
- Niu, Y., Ke, D., Yang, Q., Wang, X., Chen, Z., An, X., Shen, W. 2012. Temperature – dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7,0. *Food chemistry*. 135 (3). 1377-1382.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., Karathanos, V. T. 2011a. Microencapsulation of curcumin in cell of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food chemistry*. 125 (3). 892-902.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., Karathanos, V. T. 2011b. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food chemistry*. 125 (3). 913-922.

- Pfeiffer, E., Höhle, S., Solyom, A. M., Metzler, M. 2003. Studies on the stability of turmeric constituents. *Journal of food engineering*. 56 (2-3). 257-259.
- Price, L. C., Buescher, R.W. 1997. Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. *Journal of food science*. 62 (2). 267-269.
- Priyadarsini, K. I. 2009. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solution, bio-mimetics and living cells. *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry reviews*. 10 (2). 81-95.
- Sinica, A. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra [online]. VŠCHT (n.d.) [cit. 2013-03-17]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/36/ES ze dne 30. června 1994 [online] [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31994L0036:CS:HTML>
- Socaciu, C. 2007. Food colorants: chemical and functional properties. CRC Press. London. p. 633. ISBN: 978-0-8493-9357-0
- Souza, C. R. A., Osme, S. F., Glória, M. B. A. 1997. Stability of curcuminoid pigments in model system. *Journal of food processing and preservation*. 21 (5). 353-363.
- Sowbhagya, H. B., Smitha, S., Sampathu, S. R., Krishnamurthy, N., Bhattacharya, S. 2005. Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. *Journal of food engineering*. 67 (3). 367-371.

- Suresh, D., Gurudutt, K. N., Srinivasan, K. 2009. Degradation of bioactive spice compound: curcumin during domestic cooking. *European food research and technology*. 228 (5). 807-812.
- Szente, L., Mikuni, K., Hashimoto, H., Szejtli, J. 1998. Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*. 32 (1). 81-89.
- Tapal, A., Tiku, P. K. 2012. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. *Food chemistry*. 130 (4). 960-965.
- Tomren, M. A., Másson, M., Loftsson, T., Tønnesen, H. H. 2007. Studies on curcumin and curcuminoids. XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin. *International journal of pharmaceutics*. 338 (1-2). 27-34.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. 1985. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und –forschung*. 180 (5). 402-404.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J., van Henegouwen, G. B. 1986. Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und –forschung*. 183 (2). 116-122.
- Tønnesen, H. H., Másson, M., Loftsson, T. 2002. Studies on curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International journal of pharmaceutics*. 244 (1-2). 127-135.
- Velíšek, J., Cejpek, K. 2008. *Biosynthesis of food components*. Osis. Tábor. p. 497. ISBN: 978-80-86659-12-1

- Wang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, X. 2009. Study on microencapsulation of curcumin pigment by spray drying. *European food research and technology*. 229 (3). 391-396.
- Wang, Y. J., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y., Lin, J. K. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 15 (12). 1867-1876.

9 SEZNAM ZKRATEK

kurkumin I – kurkumin

kurkumin II – demethoxykurkumin

kurkumin III – bis(demethoxy)kurkumin

AN – aceton/nic = v roztoku je použit pouze aceton jako rozpouštědlo

AZ – aceton/zásada = v roztoku je použit aceton jako rozpouštědlo a pro úpravu pH použit NaOH

AK – aceton/kyselina = v roztoku je použit aceton jako rozpouštědlo a pro úpravu pH použita HCl

EN – ethanol/nic = v roztoku je použit pouze ethanol jako rozpouštědlo

EZ – ethanol/zásada = v roztoku je použit ethanol jako rozpouštědlo a pro úpravu pH použit NaOH

EK – ethanol/kyselina = v roztoku je použit ethanol jako rozpouštědlo a pro úpravu pH použita HCl

VZ – voda/zásada = v roztoku je použita voda jako rozpouštědlo a pro úpravu pH použit NaOH

SvTe – světlo/teplo

SvChl – světlo/chlad

TmTe – tma/teplo

TmChl – tma/chlad

10 PŘÍLOHY

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I – Seznam povolených potravinářských barviv

Příloha II – Potraviny, které nesmějí obsahovat přidaná barviva kromě těch, která jsou stanovena v přílohách III, IV nebo V

Příloha III – Potraviny, ke kterým mohou být přidávána pouze určitá povolená barviva

Příloha IV – Barviva povolená výhradně pro určité účely

Příloha V – Barviva povolená v potravinách neuvedených v přílohách II a III

Příloha I – Seznam povolených potravinářských barviv		
E číslo	Obecný název	Identifikační číslo "Colour Indexu" nebo popis
E 100	Kurkumin	75300
E 101	i)Riboflavin ii)Riboflavin-5'-fosfát	nevedeno
E 102	Tartrazin	19140
E 104	Chinolinová žluť	47005
E 110	Žluť SY (Sunset Yellow FCF, Gelborange S)	15985
E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	75470
E 122	Azorubín (Carmoisin)	14720
E 123	Amarant	16185
E 124	Ponceau 4R (košenilová červeň A)	16255
E 127	Erythrosin	45430
E 128	Červeň 2G	18050
E 129	Červeň Allura AC	16035
E 131	Patentní modř V	42051
E 132	Indigotin (Indigocarmine)	73015
E 133	Brilantní modř FCF	42090
E 140	Chlorofyly a chlorofyliny: i)Chlorofyly ii)Chlorofyliny	75810 75815
E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů i)Měďnaté komplexy chlorofylů ii)Měďnaté komplexy chlorofylinů	75815
E 142	Zeleň S	44090
E 150a	Karamel	nevedeno
E 150b	Kaustický sulfitový karamel	nevedeno
E 150c	Amoniakový karamel	nevedeno
E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	nevedeno
E 151	Čerň BN (čerň PN)	28440
E 153	Rostlinná uhlíková čerň	nevedeno
E 154	Hněď FK	nevedeno
E 155	Hněď HT	20285
E 160a	Karoteny i)směs karotenů ii)β-karoten	75130 40800
E 160b	Annatto, bixin, norbixin	75120
E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin	nevedeno
E 160d	Lykopen	nevedeno
E 160e	β-apo-8' – karotenal (C 30)	40820
E 160f	Ethylester kyseliny β-apo-8' - karotenové (C 30)	40825
E 161b	Lutein	nevedeno
E 161g	Kanthaxanthin	nevedeno
E 162	Betalainová červeň, betanin	nevedeno
E 163	Anthokyany	Připravené fyzikálními postupy z ovoce a zeleniny
E 170	Uhlíčan vápenatý	77220
E 171	Oxid titaničitý	77891
E 172	Oxidy a hydroxidy železa	77491 77492 77499
E 173	Hliník	nevedeno
E 174	Stříbro	nevedeno
E 175	Zlato	nevedeno
E 180	Litholrubin BK	nevedeno

Příloha II – Potraviny, které nesmějí obsahovat přidaná barviva kromě těch, která jsou stanovena v přílohách III, IV nebo V
1. Nezpracované potraviny
2. Všechny vody plněné do lahví nebo balené
3. Mléko, polotučné a odtučněné mléko, pasterované nebo sterilované (včetně UHT mléka) (neochucené)
4. Mléko ochucené čokoládou
5. Kysané mléko (neochucené)
6. Trvanlivé mléko ve smyslu směrnice 76/118/EHS
7. Podmáslí (neochucené)
8. Smetana a sušená smetana (neochucené)
9. Oleje a tuky živočišného a rostlinného původu
10. Vejce a výrobky z vajec ve smyslu čl. 2 odst. 1 směrnice 89/437/EHS
11. Mouka, ostatní mlýnské výrobky a škroby
12. Chléb a podobné výrobky
13. Těstoviny a gnocchi
14. Cukry, včetně všech mono- a disacharidů
15. Rajčatový protlak a rajčatové konzervy
16. Studené omáčky na bázi rajčatové šťávy
17. Ovocné šťávy a ovocné nektary ve smyslu směrnice 75/726/EHS a zeleninové šťávy
18. Ovoce, zelenina (včetně brambor) a houby – sterilované, nakládané nebo sušené; výrobky zpracované z ovoce, zeleniny (včetně brambor) a hub
19. Výběrový džem (Extra), výběrový rosol (Extra) a kaštanový krém ve smyslu směrnice 79/693/EHS; crème de pruneaux
20. Ryby, měkkýši, koryšci, maso, drůbež a zvěřina a výrobky z nich (netýká se hotových pokrmů z nich)
21. Kakaové výrobky a čokoládové složky výrobků z čokolády ve smyslu směrnice 73/241/EHS
22. Pražená káva, čaj, pražená čekanka; čajové a cikorkové extrakty; přípravky na bázi čaje, bylin, ovoce a obilovin pro přípravu čajů a směsí a instantní směsí z těchto výrobků
23. Sůl, náhrady soli, koření a směsi koření
24. Víno a ostatní výrobky ve smyslu nařízení (EHS) č. 822/87
25. Korn, Kornbrand, ovocné alkoholické nápoje, ovocné lihoviny, Ouzo, Grappa, Tsikoudia z Kréty, Tsipouro z Makedonie, Tsipouro z Thesálie, Tsipouro z Tyrnavosu, Eau de vie de marc marque nationale luxembourgeoise, Eau de vie de seigle marque nationale luxembourgeoise, London gin ve smyslu nařízení (EHS) č. 1576/89
26. Sambuca, Maraschino a Mistra ve smyslu nařízení (EHS) č. 1180/91
27. Sangria, Clarea a Zurra ve smyslu nařízení (EHS) č. 1601/91
28. Vinný ocet
29. Výživa pro kojence a malé děti ve smyslu směrnice 89/398/EHS, včetně výživy pro kojence a malé děti s narušeným zdravím
30. Med
31. Slad a výrobky ze sladu
32. Zrající a nezrající sýry (neochucené)
33. Máslo z ovčího a kozího mléka

Příloha III - Potraviny, ke kterým mohou být přidávána pouze určitá povolená barviva			
Potraviny	E číslo	Povolené barvivo	Nejvyšší množství
Sladový chléb	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuevedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuevedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuevedeno
Pivo	E 150a	Karamel	quantum satis
Cidre bouché	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuevedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuevedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuevedeno
Máslo (včetně másla se sníženým a zvýšeným obsahem tuku)	E 160a	Karoteny	quantum satis
Margarín, minarin, ostatní tukové emulze, bezvodé tuky	E 160a	Karoteny	quantum satis
	E 100	Kurkumin	quantum satis
	E 160b	Annatto, bixin, norbixin	10 mg/kg
Sýr Sage Derby	E 140	Chlorofyly Chlorofyliny	quantum satis
	E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a Chlorofylinů	neuevedeno
Zrající sýry zbarvené oranžově, žlutě a lomeně bíle, neochucené tavené sýry	E 160a	Karoten	quantum satis
	E 160c	Paprikový extrakt	
	E 160b	Annatto, bixin a norbixin	15 mg/kg
Sýr Red Leicester	E 160b	Annatto, bixin a norbixin	50 mg/kg
Sýr Mimolette	E 160b	Annatto, bixin a norbixin	35 mg/kg
Sýr Morbier	E 153	Rostlinná uhlíková čern	quantum satis
Červeně mramorovaný sýr	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	125 mg/kg
	E 163	Anthokyany	quantum satis
Ocet	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuevedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuevedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuevedeno
Whisky, Whiskey, obilné lihoviny (jiné než Korn nebo Kornbrand, nebo Eau de vie de seigle marque nationale luxembourgeoise), vinný destilát, rum, Brandy, Weinbrand, lihoviny z matolin (jiné než Tsikoudia a Tsipouro a Eau de vie de marc marque nationale luxembourgeoise), Grappa invecchiata, Bagaceira velha ve smyslu nařízení (EHS) č. 1576/89	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuevedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuevedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuevedeno
Nápoje na bázi aromatizovaných vín (kromě nápoje Bitter Soda) a aromatizovaná vína ve smyslu nařízení (EHS) č. 1601/91	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuevedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuevedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuevedeno

Příloha III - Potraviny, ke kterým mohou být přidávána pouze určitá povolená barviva pokračování			
Potraviny	E číslo	Povolené barvivo	Nejvyšší množství
Americano	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuedeno
	E 163	Anthokyany	neuedeno
	E 100	Kurkumin 100 mg/l (jednotlivě nebo v kombinaci)	neuedeno
	E 101	i)Riboflavin ii)Riboflavin-5'-fosfát	neuedeno
	E 102	Tartrazin	neuedeno
	E 104	Chinolinová žluť	neuedeno
	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	neuedeno
	E 122	Azorubín (Carmoisin)	neuedeno
	E 123	Amarant	neuedeno
	E 124	Ponceau 4R	neuedeno
	Bitter Soda, Bitter Vino ve smyslu nařízení (EHS) č. 1601/91	E 150a	Karamel
E 150b		Kaustický sulfitový karamel	neuedeno
E 150c		Amoniakový karamel	neuedeno
E 150d		Amoniak-sulfitový karamel	neuedeno
E 100		Kurkumin	100 mg/l (jednotlivě nebo v kombinaci)
E 101		i)Riboflavin ii)Riboflavin-5'-fosfát	neuedeno
E 102		Tartrazin	neuedeno
E 104		Chinolinová žluť	neuedeno
E 110		Žluť SY (Sunset Yellow FCFGelborange S)	neuedeno
E 120		Košenila, kyselina karmínová, karmíny	neuedeno
E 122		Azorubín (Carmoisin)	neuedeno
E 123		Amarant	neuedeno
E 124		Ponceau 4R (košenilová červeň A)	neuedeno
E 129		Červeň Allura AC	neuedeno
Likérová vína a kvalitní likérová vína vyráběná v určitých regionech	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuedeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuedeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuedeno

Příloha III - Potraviny, ke kterým mohou být přidávána pouze určitá povolená barviva pokračování			
Potraviny	E číslo	Povolené barvivo	Nejvyšší množství
Zelenina nakládaná v octě, slaném nálevu a v oleji (kromě oliv)	E 101	i)Riboflavin ii)Riboflavin-5'-fosfát	quantum satis
	E 140	Chlorofyly a chlorofyliny	neuveđeno
	E 150a	Karamel	neuveđeno
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuveđeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuveđeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuveđeno
	E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů	neuveđeno
	E 160a	Karoteny i)Směs karotenů ii)β-karoten	neuveđeno
	E 162	Betalainová červeň, betanin	neuveđeno
	E 163	Anthokyany	neuveđeno
Extrudované, expandované obilné snídaně a obilné snídaně ochucené ovocným aromatem	E 150c	Amoniakový karamel	quantum satis
	E 160a	Karoteny	quantum satis
	E 160b	Annatto, bixin, norbixin	25 mg/kg
	E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin	quantum satis
Obilné snídaně ochucené ovocným aromatem	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	200 mg/kg (jednotlivě nebo v kombinaci)
	E 162	Betalainová červeň, betanin	neuveđeno
	E 163	Anthokyany	neuveđeno
Džemy, rosoly a marmelády ve smyslu směrnice 79/693/EHS, a jiné podobné ovocné přípravky včetně nízkokalorických výrobků	E 100	Kurkumin	quantum satis
	E 140	Chlorofyly a chlorofyliny	neuveđeno
	E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů	neuveđeno
	E 150a	Karamel	neuveđeno
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	neuveđeno
	E 150c	Amoniakový karamel	neuveđeno
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	neuveđeno
	E 160a	Karoteny i)Směs karotenů ii)β-karoten	neuveđeno
	E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin	neuveđeno
	E 162	Betalainová červeň, betanin	neuveđeno
	E 163	Anthokyany	neuveđeno
	E 104	Chinolinová žluť	100 mg/kg (jednotlivě nebo v kombinaci)
	E 110	Žluť SY	neuveđeno
	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	neuveđeno
	E 124	Ponceau 4R, Košenila	neuveđeno
	E 142	Zeleň S	neuveđeno
	E 160d	Lykopen	neuveđeno
	E 161b	Lutein	neuveđeno

Příloha III - Potraviny, ke kterým mohou být přidávána pouze určitá povolená barviva pokračování			
Potraviny	E číslo	Povolené barvivo	Nejvyšší množství
Tepelně opracované uzené masné výrobky, paštiky a sekaná	E 100	Kurkumin	20 mg/kg
	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	100 mg/kg
	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	quantum satis
	E 150c	Amoniakový karamel	quantum satis
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	quantum satis
	E 160a	Karoteny	20 mg/kg
	E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin	10 mg/kg
E 162	Betalainová červeň, betanin	quantum satis	
Luncheon Meat	E 129	Červeň Allura AC	25 mg/kg
Breakfast sausages s minimálním obsahem obilné složky 6 %	E 129	Červeň Allura AC	25 mg/kg
Hamburgerové maso s minimálním obsahem rostlinné nebo obilné složky 4 %	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	100 mg/kg
	E 150a	Karamel	quantum satis
	E 150b	Kaustický sulfitový karamel	quantum satis
	E 150c	Amoniakový karamel	quantum satis
	E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	quantum satis
Uzený masný výrobek Chorizo; Salchichon	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	200 mg/kg
	E 124	Ponceau 4R, Košenilová červeň A	250 mg/kg
Sobrasada	E 110	Žluť SY	135 mg/kg
	E 124	Ponceau 4R, Košenilová červeň A	200 mg/kg
Pasturmas (jedlý vnější povrch)	E 100	Kurkumin	quantum satis
	E 101	i)Riboflavin ii)Riboflavin-5'-fosfát	neuveдено
	E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny	neuveдено
Sušené granulované brambory a bramborové vločky	E 100	Kurkumin	quantum satis
Processed Mashy and Garden Peas (v konzervách)	E 102	Tartrazin	100 mg/kg
	E 133	Brilantní modř FCF	20 mg/kg
	E 142	Zeleň S	10 mg/kg

Příloha IV - Barviva povolená výhradně pro určité účely			
E číslo	Barvivo	Potravina	Nejvyšší množství
E 123	Amarant	Aperitivní vína, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, včetně výrobků s obsahem alkoholu nižším než 15 % (obj.)	30 mg/l
		Rybí jikry a mlíčí	30 mg/kg
E 127	Erythrosin	Koktejlové a kandované třešně	200 mg/kg
		Třešně Bigareaux v cukerném nálevu a v koktejlech	150 mg/kg
E 128	Červeň 2G	Breakfast sausages s minimálním obsahem obilné složky 6 %	20 mg/kg
		Hamburgerové maso s minimálním obsahem rostlinné nebo obilné složky 4 %	neuveďeno
E 154	Hněď FK	Uzené ryby – kipry	20 mg/kg
E 161g	Kanthaxanthin	Štrasburské párky	15 mg/kg
E 173	Hliník	Vnější povrch cukrovinek určených k dekoraci cukrářských výrobků a pečiva	quantum satis
E 174	Stříbro	Vnější povrch cukrovinek	quantum satis
		Ozdoby čokoládových cukrovinek a čokolády	neuveďeno
		Likéry	neuveďeno
E 175	Zlato	Vnější povrch cukrovinek	quantum satis
		Ozdoby čokoládových cukrovinek a čokolády	neuveďeno
		Likéry	neuveďeno
E 180	Litholrubin BK	Jedlé povlaky sýrů	quantum satis
E 160b	Annatto, bixin, norbixin	Margarín, minarín, ostatní tukové emulze, bezvodé tuky	10 mg/kg
		Ozdoby a povrchové vrstvy potravin	20 mg/kg
		Jemné pečivo	10 mg/kg
		Zmrzliny	20 mg/kg
		Likéry včetně alkoholizovaných nápojů s obsahem alkoholu nižším než 15 % (obj.)	10 mg/l
		Ochucené tavené sýry	15 mg/kg
		Zrající sýry zbarvené oranžově, žlutě a lomeně bíle, neochucené tavené sýry	15 mg/kg
		Dezerty	10 mg/kg
		Uzené ryby	10 mg/kg
		Jedlé povlaky sýrů a jedlá střívká	20 mg/kg
		Sýr Red Leicester	50 mg/kg
		Sýr Mimolette	35 mg/kg
		Extrudované, expandované obilné snídaně a obilné snídaně ochucené ovocným aromatem	25 mg/kg
		"Snacky": suché, slané snacky na bázi brambor, obilovin nebo škrobu:	
—Extrudované nebo expandované snacky	20 mg/kg		
—Ostatní slané snacky a obalená ořechová jádra	10 mg/kg		

Příloha V - Barviva povolena v potravinách neuvedených v přílohách II a III	
část 1	
Tato barviva mohou být použita v potravinách uvedených v příloze V části 2 a v ostatních potravinách neuvedených v přílohách II a III v množství quantum satis.	
E číslo	Barvivo
E 101	i)Riboflavin ii)Riboflavin-5'-fosfát
E 140	Chlorofyly a chlorofyliny
E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů
E 150a	Karamel
E 150b	Kaustický sulfitový karamel
E 150c	Amoniakový karamel
E 150d	Amoniak-sulfitový karamel
E 153	Rostlinná uhlíková čern
E 160a	Karoteny
E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin
E 162	Betalainová červen, betanin
E 163	Anthokyany
E 170	Uhličitan vápenatý
E 171	Oxid titaničitý
E 172	Oxidy a hydroxidy železa
Část 2	
Tato barviva mohou být v níže uvedených potravinách používána jednotlivě nebo v kombinaci až do nejvyššího množství uvedeného v tabulce. V ochucených nealkoholických nápojích, ve zmrzlinách, v dezertech, v jemném a trvanlivém pečivu a v cukrovinkách mohou být barviva použita až do limitu uvedeného v příslušné tabulce, avšak množství jednotlivého barviva E 110, E 122, E 124 a E 155 nesmí překročit 50 mg/kg nebo mg/l.	
E 100	Kurkumin
E 102	Tartrazin
E 104	Chinolinová žluť
E 110	Žluť SY (Sunset Yellow FCFGelborange S)
E 120	Košenila, kyselina karmínová, karmíny
E 122	Azorubín, Carmoisin
E 124	Ponceau 4R (košenilová červen A)
E 129	Červen Allura AC
E 131	Patentní modř V
E 132	Indigotin (Indigocarmine)
E 133	Brilantní modř FCF
E 142	Zeleň S
E 151	Čern BN, Čern PN
E 155	Hněď HT
E 160d	Lykopen
E 160e	β -apo-8' - karotenal (C 30)
E 160f	Ethylester kyseliny β -apo-8' - karotenové (C 30)
E 161b	Lutein
Potravina	Nejvyšší množství
Ochucené nealkoholické nápoje	100 mg/l
Kandované ovoce a zelenina, Mostarda di frutta	200 mg/kg
Kompoty ovoce červené barvy	200 mg/kg
Cukrovinky	300 mg/kg
Jedlé ozdoby a polevy	500 mg/kg

Příloha V - Barviva povolena v potravinách neuvedených v přílohách II a III	
Část 2 - pokračování	
Jemné a trvanlivé pečivo (například snídaňové pečivo, sušenky, koláče a oplatky)	200 mg/kg
Zmrzliny	150 mg/kg
Ochucené tavené sýry	100 mg/kg
Dezerty včetně ochucených mléčných výrobků	150 mg/kg
Studené omáčky, kořenící směsi (například karí, Tandoori), nálevy, chuťovky, Chutney a Piccalilli	500 mg/kg
Hořčice	300 mg/kg
Pasty z ryb a koryšů	100 mg/kg
Předvařené jedlé části koryšů	250 mg/kg
Náhražky lososa	500 mg/kg
Surimi	500 mg/kg
Rybí jikry a mlíčí	300 mg/kg
Uzené ryby	100 mg/kg
Jedlé povlaky sýrů a jedlá střívka	quantum satis
Potraviny určené k náhradě celodenní stravy nebo jednotlivého pokrmu při kontrole nadváhy	50 mg/kg
Potraviny určené k náhradě celodenní stravy a doplňky výživy určené k podávání pod lékařským dohledem	50 mg/kg
Tekuté doplňky stravy a dietní doplňky	100 mg/l
Pevné doplňky stravy a dietní doplňky	300 mg/kg
Polévky	50 mg/kg
Analogy masa a rybího masa na bázi rostlinných bílkovin	100 mg/kg
Lihoviny a ostatní alkoholické nápoje (včetně výrobků s obsahem alkoholu nižším než 15 % (obj.)), kromě těch, které jsou uvedeny v přílohách II nebo III.	200 mg/l
Aromatizovaná vína, nápoje a koktejly na bázi aromatizovaných vín ve smyslu nařízení (EHS) č. 1601/91, kromě těch, které jsou uvedeny v přílohách II nebo III.	200 mg/l
Ovocná vína (nešumivá nebo perlivá) Cidr (kromě cidre bouché) a perry Aromatizovaná vína a aromatizovaný cidr a perry	200 mg/l
"Snacky": suché, slané snacky na bázi brambor, obilovin nebo škrobu:	
—Extrudované nebo expandované snacky	200 mg/kg
—Ostatní slané snacky a obalená ořechová jádra	100 mg/kg