

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra analytické chemie



**ANALÝZA BARVIV V POTRAVINÁCH PLYNOVOU  
CHROMATOGRAPHIÍ – MOŽNOSTI A OMEZENÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Marcela Tesařová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. Pavla Kučerová, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D., za trpělivost, mnoho věcných připomínek a čas, který mi při vypracování této práce věnoval.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá možnostmi analýzy vybraných skupin barviv v potravinách za využití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Vybrané analyty (kurkumin, kvercetin, aglykony anthokyanů) byly extrahovány organickými rozpouštědly, přečištěny a následně derivatizovány pomocí silanizačního činidla BSTFA. Oproti tomu vzorky azobarviv (alizarinová a dimethylová žluť) a bixinu bylo možné detekovat po jednoduché extrakci či methyloaci diazomethanem. Na závěr byly navržené postupy aplikovány na složitější matrice (vzorky potravin) – rýže, cibule, červené fazole a červené víno. Práce ukazuje, že i když se plynová chromatografie nejeví jako vhodná metoda pro stanovení barviv, lze ji použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu řady potravinářsky významných barviv.

### **Klíčová slova**

Bixin, kurkumin, kvercetin, azobarviva, anthokyaniny, derivatizace, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie.

## **SUMMERY**

This thesis deals with the possibilities of analysis of selected groups of food dyes by using gas chromatography with mass spectrometry. Selected analytes (curcumin, quercetin, aglycones of anthocyanins) were extracted by the organic solvents, purified and silylated with a BSTFA reagent. Compared to that, samples of azodyes (alizarin yellow, dimethyl yellow) and bixin were detected after simple extraction or methylation with diazomethan. The suggested procedures were then applied to complex matrix (samples of foods) such as rice, onion, kidney beans and red wine. The thesis shows that even though gas chromatograpyh does not seem to be a suitable method for food dyes analysis, it can be used for qualitative as well as quantitative analysis of the whole range of significant food dyes.

### **Keywords**

Bixin, curcumin, quercetin, azodyes, anthocyanins, derivatization, gas chromatography, mass spectrometry

# OBSAH

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
2.1 BARVIVA.....	9
2.2 BARVIVA V POTRAVINÁCH A PŘÍRODNÍCH PRODUKTECH.....	11
2.2.1 Polyenová barviva.....	14
2.2.1.1 Bixin.....	18
2.2.1.2 Kurkumin.....	21
2.2.2 Pyranová barviva.....	23
2.2.2.1 Kvercetin.....	23
2.2.2.2 Anthokyaniny.....	24
2.2.3 Azobarviva.....	30
2.3 POTRAVINÁŘSKÁ LEGISLATIVA.....	33
2.4 ANALÝZA BARVIV.....	34
2.4.1 Analýza syntetických barviv.....	34
2.4.2 Analýza přírodních barviv.....	35
<b>3 PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
3.1 CHEMIKÁLIE.....	39
3.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	40
3.3 DERIVATIZACE VZORKŮ.....	41
3.3.1 Methylace diazomethanem.....	41
3.3.2 Silylace.....	42
3.4 POUŽITÉ POSTUPY.....	43
3.4.1 Analýza semen annato.....	43
3.4.2 Analýza azobarviv.....	43
3.4.3 Analýza kurkuminu.....	43
3.4.4 Analýza kvercetinu.....	44
3.4.5 Analýza anthokyaninů.....	44
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>45</b>
4.1 ANALÝZA BIXINU.....	45
4.2 ANALÝZA AZOBARVIV.....	47

4.3	ANALÝZA KURKUMINU .....	50
4.4	ANALÝZA KVERCETINU .....	53
4.5	ANALÝZA AGLYKONŮ ANTHOKYANOVÝCH BARVIV .....	56
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>64</b>

# 1 ÚVOD

Ve společnosti se stále více rozšiřuje zdravý životní styl. To znamená především péči o duševní a tělesné potřeby. S tímto je úzce spjata stravování. Lidé více kladou důraz na přírodní produkty. Nabídka ruku v ruce s poptávkou po přírodních produktech stále narůstá. Tento směr je ve většině ohledů správný a chvályhodný. S jídlem a konzumací obecně jsou však úzce spjaty umělé přídatné látky. Je třeba si uvědomit, že veškeré látky přidávané do potravin mají svůj význam, jsou přidávány pouze ve stanoveném maximálním množství a jsou kontrolovány státními orgány.

Jako téma diplomové práce jsem si vybrala jedno z nejpoužívanějších aditiv vůbec – barviva. Barviva se již od nepaměti získávala z přírodních zdrojů např. řepy červené, kopřivy dvoudomé. V posledních letech byla přírodní barviva nahrazena spíše barvivy syntetickými. Syntetická barviva jsou oblíbená především díky intenzivnější barvě a nižším výrobním nákladům.

Barviva v potravinách je příliš obsáhlé téma na to, aby mohlo být popsáno v jedné diplomové práci. Tato práce si proto ani takový cíl neklade. Teoretická část práce je zaměřena na srovnání několika nejrozšířenějších a významově důležitých skupin barviv, jak přírodních, tak syntetických. Tento obecný přehled o barvivech, jejich vlastnostech a použití je i stavebním pilířem pro část praktickou, která se blíže zabývá analýzou vybraných skupin barviv – azobarviva, bixin, kurkumin, kvercetin a aglykony anthokyaninů (malvidin, kyanidin, pelargonidin).



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 BARVIVA

Barviva jsou organické látky, které jsou schopné absorbovat viditelné záření (400 – 700 nm). [1] Nositelem barevnosti jsou tzv. chromofory – skupiny obsahující dvojně vazby např. azo-, nitro-, karbonylová. Barevnost je podmíněna rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb. Intenzitu zbarvení pak zvyšují auxochromy (skupina hydroxy-, amino- aj.). [4]

Barviva lze dělit podle různých kritérií: původu, barvy, chemické struktury, biologických funkcí v přírodním materiálu, fyzikálních vlastností krycí schopností apod. Jednotlivé kategorie se mohou do značné míry překrývat. [6]

Nejčastěji se barviva dělí podle původu:

- Přírodní barviva
- Syntetická barviva identická s přírodními
- Syntetická barviva [2]

Přírodní barviva jsou získávána z přírodních zdrojů: rostlinného, živočišného či minerálního původu. Patří mezi ně také barevné produkty získávané z přírodních surovin technologickými procesy např. karamel. K přírodním barvivům se řadí i měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů a anorganické pigmenty (oxid železitý, uhličitan vápenatý). [2]

Barviva z rostlinných zdrojů se získávají především z kořenů, květů, plodů nebo listů rostlin. Červené barvivo se získává z kořenů mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*), medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi*) řepy červené (*Beta vulgaris*) nebo orceinu, který se získává provzdušňováním amoniakálního extraktu z mechů *Rocella tinctoria*. Zdrojem žlutého barviva je heřmánek (*Chamomilla recutita*) či kručinka barvířská (*Genista tinctoria*). Hnědé barvivo lze získat z henny (*Lawsonia inermis*) a zelené z rdesna ptačího (*Persicaria maculosa*), borytu barvířského (*Isatis tinctoria*), kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) aj.

Typickým barvivem získaným z živočišných zdrojů je červenohnědé barvivo získávané z inkoustového vaku sépie obecné (*Sepia officinalis*). Karmínové barvivo

košenila z oplozených samiček červce nopálového (*Dactylopius coccus*) nebo tyrský purpur vyráběný ze schránek ostranek *Murex*.

Z minerálních barviv se běžně používá okr, bílé pigmenty (vápenec, oxid titaničitý), černý uhlík, zelený malachit či modrý azurit. [3]

V řemeslnické praxi se přírodní barviva většinou získají roztlučením rostlinného materiálu, který se vyluhuje v horké vodě. Často se při barvení používá mořidlo (směs síranu hlinitého a kyselého vinanu draselného), které usnadňuje vazbu na barvený materiál.

Přírodní barviva se nejčastěji klasifikují podle chemické struktury:

- Polyenová barviva
- Chinonová barviva
- Indolová barviva
- Pyranová barviva
- Oligopyrrolová barviva
- Pteridinová barviva
- Isochinolinová barviva [3]

Nejdůležitějšími skupinami rostlinných barviv jsou barviva polyenová (karotenoidy), pyranová (flavonoidy), pyrrolová a indolová (betalainy). [4]

Syntetická barviva identická s přírodními jsou látky, které se svou chemickou strukturou neliší od látek přírodních, z nichž jsou odvozené, ale jsou vyráběna chemickou syntézou. Příkladem je  $\beta$ -karoten, který slouží také jako provitamin A.

Syntetická barviva jsou stále velmi oblíbená v potravinářské praxi, a to především díky nižším výrobním nákladům. Dříve se syntetická barviva vyráběla z uhelného dehtu. V dnešní době se získávají z přečištěných ropných produktů. Barviva vzniklá chemickou syntézou se vyznačují větší stabilitou, lépe odolávají vnějším vlivům (světlo, teplo, vlhkost, oxidačně-redukční reakce) a intenzivnějším zabarvením v porovnání s barvivy přírodními. Dále pak neovlivňují organoleptické vlastnosti potravin, především chuť a vůni. Všechna syntetická barviva používaná k přibarvování potravin musí být sloučeniny rozpustné ve vodě. Nejpočetnější skupinou jsou barviva kyselá obsahující karboxylové, sulfonové a hydroxyskupiny (většina azobarviv). K barvení

potravin se většinou používají směsi několika barviv. Syntetická barviva se dodávají ve formě disperzí, past (pro barvení cukrářských a pekařských výrobků), vodných nebo nevodných roztoků (pro mléčné výrobky) či ve formě ve vodě nerozpustných laků (pro potraviny obsahující více tuků nebo nízký obsah vody). [2, 6]

Syntetická barviva klasifikovaná dle chemické struktury:

- Azobarviva
- Difenylmethanová a trifenylmethanová barviva
- Nitrobarviva
- Pyrazolová barviva
- Xanthenová barviva
- Anthrachinonová barviva
- Chinolinová barviva
- Indigoidní barviva [4]

## **2.2 BARVIVA V POTRAVINÁCH A PŘÍRODNÍCH PRODUKTECH**

Potravinářská aditiva jsou látky přidávané do potravin záměrně za účelem určité technologické funkce. Například konzervanty k uchování potravin, barviva ke zvýraznění barvy. V EU jsou všechna aditiva užívaná v potravinách označena písmenem E. Štítky produktů obsahují buď příslušný E kód nebo jméno dané látky (např. E100 nebo kurkumin). Mezi aditiva řadíme barviva, antioxidanty, emulgátory, stabilizátory, želírovací látky, zahuš'ovadla, konzervanty, sladidla aj.

Bezpečností potravin v EU se zabývá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), která má 3 hlavní úkoly:

Hodnocení bezpečnosti nových potravinářských aditiv nebo úprava použití stávajících přídatných látek, než mohou být povoleny pro použití v EU. Přehodnocení všech potravinářských aditiv, jejichž používání bylo povoleno před 20. 1. 2009. Přezkoumání některých přídatných látek v závislosti na nových vědeckých poznatcích a/nebo měnících se podmínkách použití.

Organizace EFSA v rámci zajištění bezpečnosti zavádí termín ADI (přijatelná denní dávka). ADI je množství látky, které může člověk konzumovat denně po celý svůj život bez rizika ohrožení svého zdraví. Udává se v mg/kg tělesné hmotnosti za den.

Potravinářská barviva řadíme mezi přídatné látky. Přidávají se do potravin za účelem (i) uchování barvy, abychom zabránily ztrátám po vystavení světlu, vzduchu, vlhkosti a změnám teploty, (ii) zvýšení sytosti barvy nebo (iii) zachování uniformity barvy (přírodní barviva postupem času ztrácí svou původní barvu, proto výrobci potravin dobarvují). [5]

Rostlinné pigmenty se nejčastěji používají v potravinářství, farmacii a kosmetice. Jedná se o zdravotně nezávadná barviva, jejichž využití se neustále rozšiřuje. [4]

Legislativa povoluje používat při výrobě potravin 42 barviv (viz Tabulka 1 a 2). Některá barviva jsou určena pouze k obarvování určitých potravin např. erythrosin pro koktejlové a kandované třešně, hněd' FK pro uzené ryby - kipry, kanthaxanthin pro štrasburské párky. Mnoho druhů potravin se nesmí přibarvovat vůbec např. nezpracované potraviny, mléko (neochucené), med, cukr. Barviva E102, E104, E110, E122, E124, E129 sice nebyla zakázána, ale výrobce při jejich použití musí na obal umístit upozornění „může nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“. [7]

Tabulka 1: Seznam povolených přírodních potravinářských barviv a anorganických pigmentů [7]

---

<b>E - kód</b>	<b>Název barviva</b>
E100	Kurkumin
E101	(i) Riboflavin (ii) Riboflavin-5'-fosfát
E120	Košenila, karmíny, karminová kyselina
E140	Chlorofyly, chlorofyliny: (i) Chlorofyly (ii) Chlorofyliny
E150a	Karamel
E150b	Kaustický sulfitový karamel
E150c	Amoniakový karamel
E150d	Amoniak-sulfitový karamel
E153	Medicínální uhlí

E160a	Karoteny (i) Směs karotenů (ii) $\beta$ -karoten
E160b	Annato, bixin, norbixin
E160c	Paprikový extrakt, kapsorubin, kapsanthin
E160d	Lykopen
E160e	$\beta$ -apo-8'-karotenal
E160f	Ethylester kyseliny $\beta$ -apo-8'-karotenové
E161b	Lutein
E161g	Kanthaxanthin
E162	Betalainová červeň, betanin
E163	Anthokyany (získané z ovoce a zeleniny fyzikálními procesy)
E170	Uhličitan vápenatý
E171	Oxid titaničitý
E172	Oxidy a hydroxidy železa
E173	Hliník (pigment)
E174	Stříbro (pigment)
E175	Zlato (pigment)

Tabulka 2: Syntetická potravinářská barviva

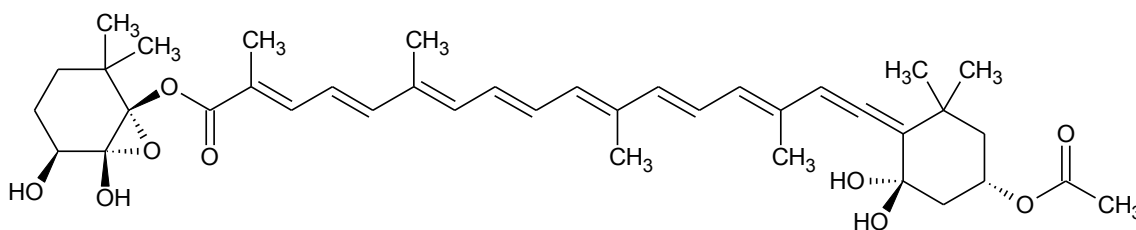
<b>E - kód</b>	<b>Název barviva</b>	<b>Barva</b>
E102	Tartrazin	Žlutá
E104	Chinolinová žlut'	Žlutá
E110	Žlut' SY	Oranžová
E122	Azorubin	Modročervená
E123	Amaranth	Modročervená
E124	Ponceau 4R	Červená
E127	Erythrosin	Červená
E128	Červeň 2G	Modročervená
E129	Červeň Allura AC	Červená
E131	Patentní modř V	Zelenomodrá
E132	Indigotin	Modrá
E133	Brilantní modř	Zelenomodrá
E142	Zeleň S	Zelená
E151	Čerň BN	Černá
E154	Hněď FK	Hnědá
E155	Hněď HT	Hnědá
E180	Litholrubin BK	Červená

### 2.2.1 Polyenová barviva

Polyenová barviva jsou charakteristická lineárním řetězcem konjugovaných dvojných vazeb, které se obvykle vyskytují v konfiguraci trans. Tyto látky jsou prakticky nerozpustné ve vodě. Nejdůležitější skupinou polyenových barviv jsou karotenoidy. [3]

#### Karotenoidy

Karotenoidy jsou obvykle žluté až červené isoprenoidní polyenové pigmenty, široce rozšířené v přírodě. Karotenoidy jsou syntetizovány všemi fotosyntetizujícími organismy, včetně fytoplanktonu, řas, vyšších rostlin a fototrofními bakteriemi. V rostlinách jsou karotenoidy asociovány společně s chlorofyly v chloroplastech. Poprvé byly izolovány z mrkve v roce 1831. Dnes známe zhruba 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidů. Nejrozšířenějším karotenoidem je fukoxanthin (obr. 1), který se hojně vyskytuje v mořských řasách. [8]



Obr. 1: Fukoxanthin

Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, skládající se z osmi isoprenových jednotek. Tento řetězec je zodpovědný za charakteristické barvy. K tomu aby karoten absorboval záření ve viditelné oblasti spektra, musí obsahovat aspoň 12 konjugovaných dvojných vazeb. Molekuly karotenoidů většinou tvoří 40 uhlíkových atomů. Přítomnost polyenového řetězce má za následek nestabilitu karotenoidů způsobenou vzdušnou oxidací, silnými kyselinami, oxidačními činidly, teplem a světlem.

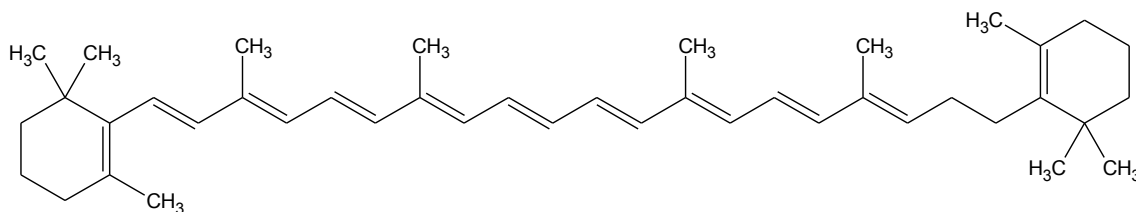
## Karotenoidy se dělí na tři skupiny:

- Karoteny – uhlovodíky
- Xanthofyly – kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů
- Apokarotenoidy - xanthofyly obsahující v molekule méně než 40 atomů uhlíku

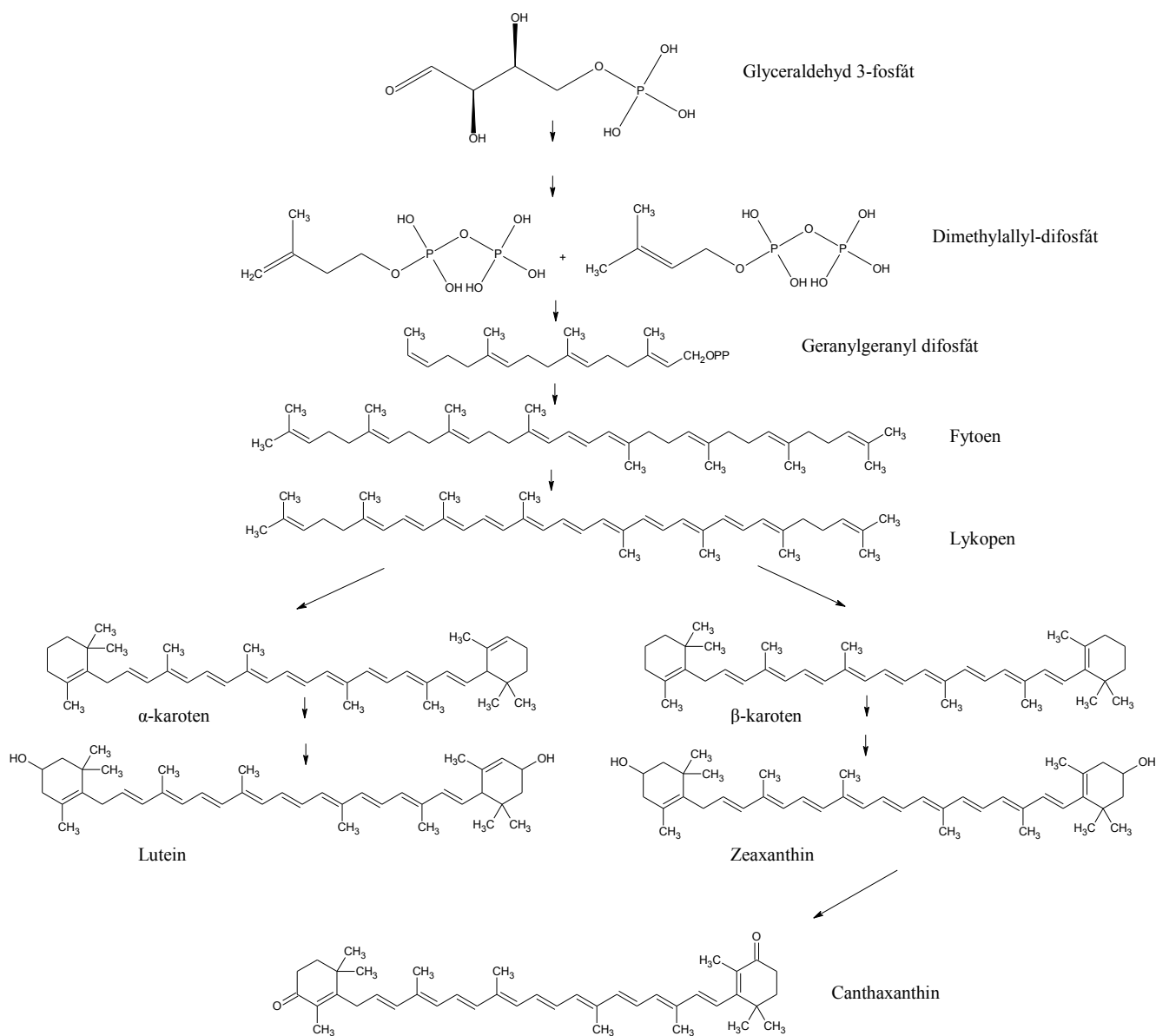
## Karoteny

Fytoen je nejjednodušším typem karotenů. Je to acyklický polynenasycený uhlovodík, který vzniká syntézou dvou molekul geranylgeranyl-difosfátu. Následnou izomerací vzniká trans – izomer fytofluenu. Oxidací fytofluenu vzniká  $\zeta$ -karoten, neurosporen a lykopen (systematickým názvem  $\psi,\psi$ -karoten), jako finální produkt biosyntézy (obr. 3).

Nejznámějším zástupcem této skupiny je  $\beta$ -karoten (obr. 2). Je nejdůležitějším provitaminem A, díky cyklizaci  $\beta$ -jononového kruhu na obou koncích uhlíkatého řetězce. Teoreticky se může rozštěpit na dvě molekuly vitamínu A. [9]



Obr. 2:  $\beta$ -karoten

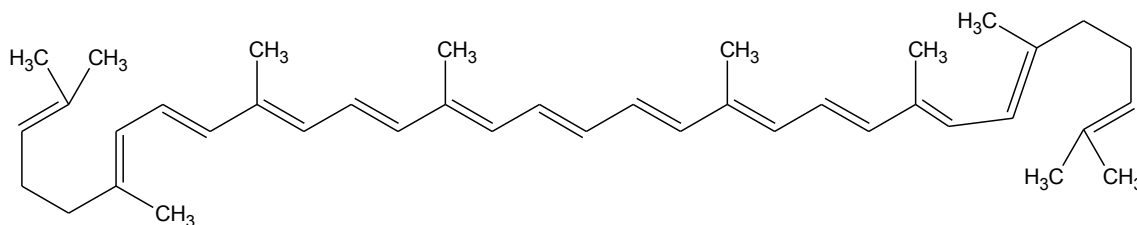


Obr. 3: Syntéza karotenů

## Lykopen

Lykopen (obr. 4) je přírodní pigment syntetizovaný rostlinami, mikroorganismy i zvířaty. Lykopen je hlavním pigmentem rajčat (*Lycopersicon esculentum*). V rajčatových produktech (rajčatová šťáva, kečup) představuje lykopen více než 60 % všech přítomných karotenoidů. Obsah lykopenu v rajčatech se liší dle odrůdy a zvyšuje se zráním ovoce. Lykopen se nachází také v melounech, růžových grapefruitech, mrkvi, paprice a červeném bobulovém ovoci (např. brusinky). [11]





Obr. 4: Lykopen

Lykopen je acyklický izomer  $\beta$ -karotenu tvořený 8 isoprenovými jednotkami. Z chemického hlediska je vysoce lipofilní a fotosenzitivní sloučenina. Molekula lykopenu je tvořena nenasyceným, přímým uhlovodíkovým řetězcem obsahujícím 11 konjugovaných a 2 nekonjugované dvojné vazby. Tato struktura je zodpovědná za jeho dobré antioxidační vlastnosti, v přítomnosti kyslíku se však snadno oxiduje a tím dochází k její degradaci. Ve své struktuře nemá  $\beta$ -jononový kruh, díky čemuž nepůsobí jako provitamin A. Lykopen z přírodních rostlinných zdrojů existuje převážně v all-trans konfiguraci (zhruba 90%), což je termodynamicky stabilnější forma. V této formě se však hůře vstřebává. Při tepelném zpracování rajčat a rajčatových produktů se mění all-trans forma na cis formu lykopenu, což vede ke zvýšení biologické dostupnosti (vyšší rozpustnost). [10]

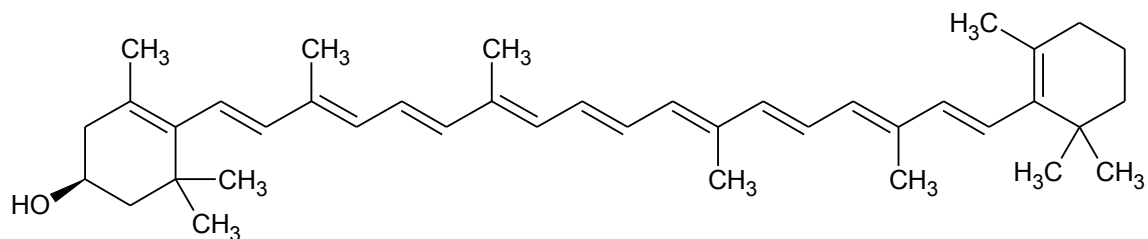
Lykopen patří mezi přírodní barviva hojně užívaná v celé řadě výrobků. Označuje se kódem E160d. Podle druhu potravin přechází jeho barevný odstín od žluté po červenou. Lykopen se získává extrakcí rozpouštědly z vybraných druhů zralých rajčat. Jako extrakční činidlo se používá ethylacetát nebo hexan. [14]

Lykopen se používá jako barvivo do dezertů, zmrzlin, cukrovinek, jemného i trvanlivého pečiva a ochucených nealkoholických nápojů. Lykopen se může používat v kombinaci s dalšími barvivy, avšak maximální povolené množství těchto směsí pro jednotlivé potraviny je regulováno směrnici 94/36/ES. [7]

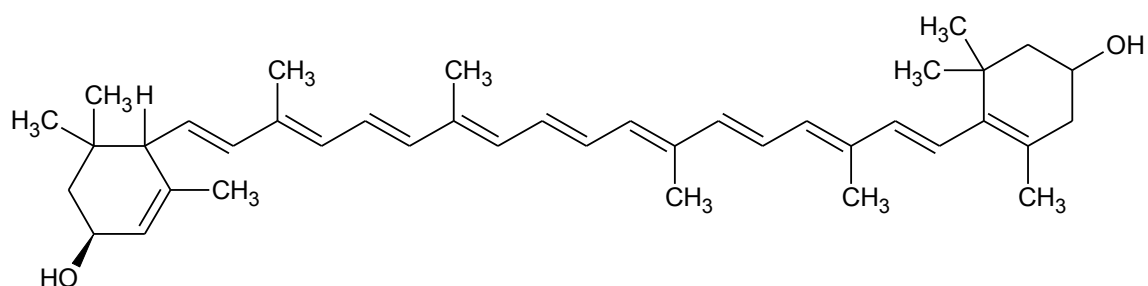
## Xanthofyly

Xanthofyly jsou hlavní karotenoidy rostlin, vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. V potravinách se běžně vyskytuje monohydroxysubstituovaný derivát alicyklických karotenů – kryptoxanthin (obr. 5). Kryptoxanthiny  $\alpha, \beta$  jsou prekurzory xanthofyly se dvěma hydroxylovými skupinami v molekule např. lutein. Lutein (obr. 6)

je účinným antioxidantem, důležitým především k ochraně zraku. Vyznačuje se neutralizací volných radikálů vznikajících působením UV paprsků na oční sítnici a zastavuje degenerativní změny na žluté skvrně. [9]



Obr. 5: Kryptoxantin



Obr. 6: Lutein

## Apokarotenoidy

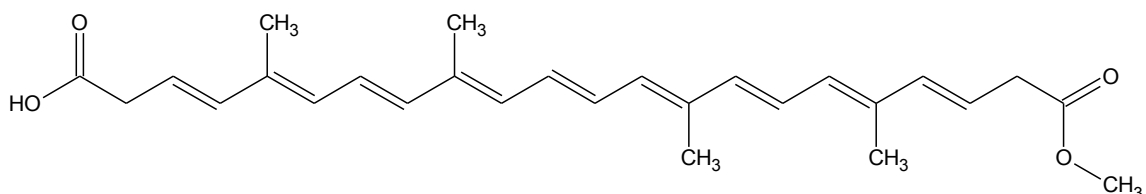
Apokarotenoidy tvoří malou, ale významnou skupinu xanthofylů. Vznikají štěpením molekuly karotenoidu. Nejvýznamnějším apokarotenoidem živočišných tkání je vitamin A. Dalšími významnými produkty katabolismu karotenoidů jsou bixin a krocetin. [9]

### 2.2.1.1 Bixin

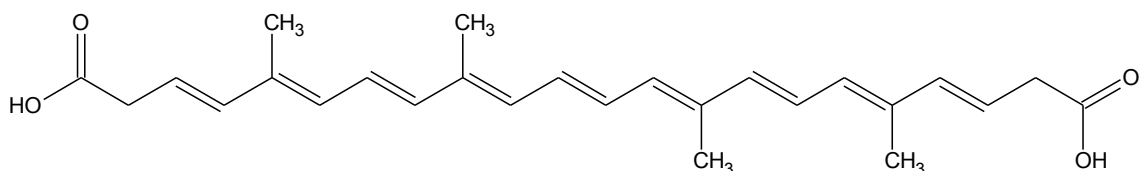
Bixin (obr. 7) neboli annato je jedním z nejstarších barviv získávaným ze semen tropického keře *Bixa Orellana* L. Plodem jsou červenohnědé shluky tobolek, které obsahují 10 – 15 semen. Semena jsou pokrytá tenkým pryskyřičným povlakem

obsahujícím barevný pigment. Rostlina pochází původem ze Střední a Jižní Ameriky. Již ve středověku se používala jako koření nebo k barvení potravin, kosmetiky a textilu. [15, 16]

Hlavním pigmentem je bixin (cis-bixin) – monomethylester kyseliny diapokarotenové. V pryskyřičném osemeni se nalézá demethylovaný produkt norbixin (obr. 8). Minimálně jsou zastoupeny pigmenty trans-bixin a cis-norbixin. Karboxylová část molekuly přispívá k rozpustnosti ve vodě, naopak esterová část přispívá k rozpustnosti v tucích. Alkalickou hydrolyzou se bixin převede na ve vodě rozpustnou volnou dikarboxylovou kyselinu - norbixin. Její isomerací vzniká all-trans-bixin, který je málo rozpustný v tucích a má charakteristickou červenou barvu. Annatto, stejně jako většina karotenoidů, je nestálý v přítomnosti kyslíku a světla. Tepelně je stálý. [3, 15]



Obr. 7: Bixin



Obr. 8: Norbixin

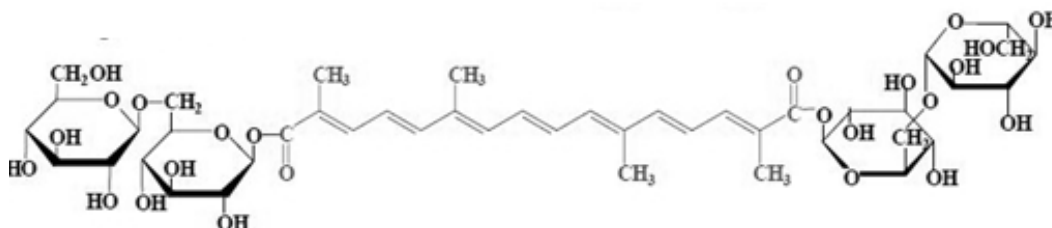
Annatto se získává ze semen alkalickou hydrolyzou, kdy se převede na ve vodě rozpustný norbixin. Označuje se jako barvivo E160b, které se vyznačuje oranžovým až červeným odstínem. Annatto se může přidávat pouze do určitých potravin např. margarín, jemné pečivo, zmrzliny, ochucené tavené sýry, uzené ryby, snacky na bázi

brambor a obilovin. Množství barviva přidávané do potravin je regulováno směrnici 94/36/ES. Nejvyšší povolené množství se pohybuje v rozmezí 10 – 50 mg/kg. [14, 15]

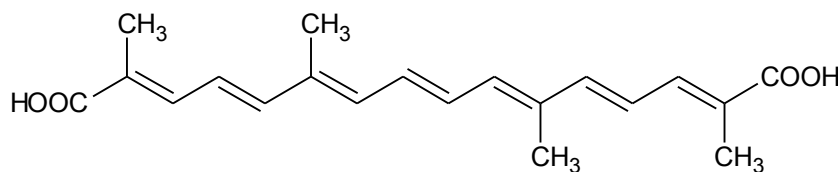
## Krocetin

Krocetin je obsažen v sušených bliznách šafránu setého (*Crocus sativus* L.). Šafrán je považován za světově nejdražší koření, vyznačuje se typickou vůní (jejím nositelem je safranal) a hořkou chutí (způsobenou látkou pikrokrocín vznikající oxidativním štěpením zeaxanthinu). [2, 17]

Krocetin (obr. 10) se v šafránu vyskytuje jako ester s disacharidem genciobiosou – krocín (obr. 9), který má žlutooranžové zbarvení a je dobře rozpustný ve vodě. Oranžovočervený aglykon krocetin je vlastním nositelem barevnosti a je již ve vodě nerozpustný.



Obr. 9: Krocín



Obr. 10: Krocetin

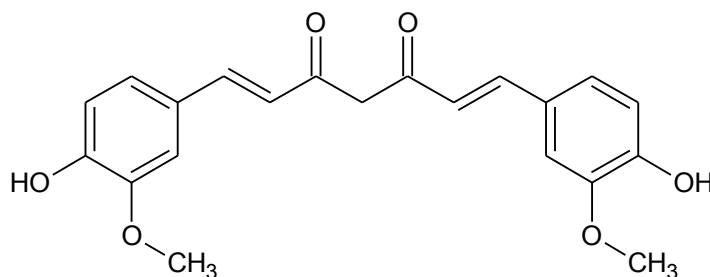
Šafrán se používá nejen jako koření, ale i barvivo. Vzhledem k jeho ceně se často falšuje. K získání 1 kg šafránu je potřeba posbírat květy z 150 000 – 200 000 rostlin. [18]

## Kurkuminoidy

Kurkuminoidy jsou skupinou fenolových sloučenin. Patří zde barviva kurkumy tzv. diarylheptanoidy (C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub>). [2]

### 2.2.1.2 Kurkumin

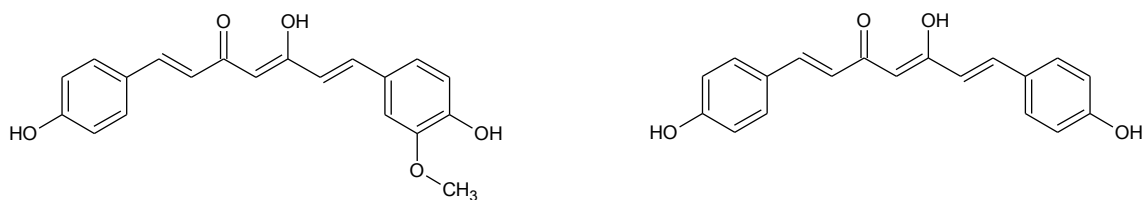
Kurkumin (obr. 11) je hlavní aktivní složkou kurkumy dlouhé (*Curvuma Longa*), v malém množství se nachází také v zázvoru. Pěstuje se v Číně, Pakistánu a Indii. Jedná se o žluté až oranžové přírodní barvivo v čisté formě vyráběné extrakcí ze sušených podzemních částí oddenků, které se dále přečišťuje krystalizací. Podle evropské směrnice 95/45/ES je vhodným rozpouštědlem pro extrakci např. aceton, oxid uhličitý, ethylacetát. V extraktu se přirozeně vyskytuje i menší množství olejů a pryskyřic. Obsah kurkuminu v oddencích se pohybuje v rozmezí 22,2 – 40, 4 mg/g. [2, 3, 19]



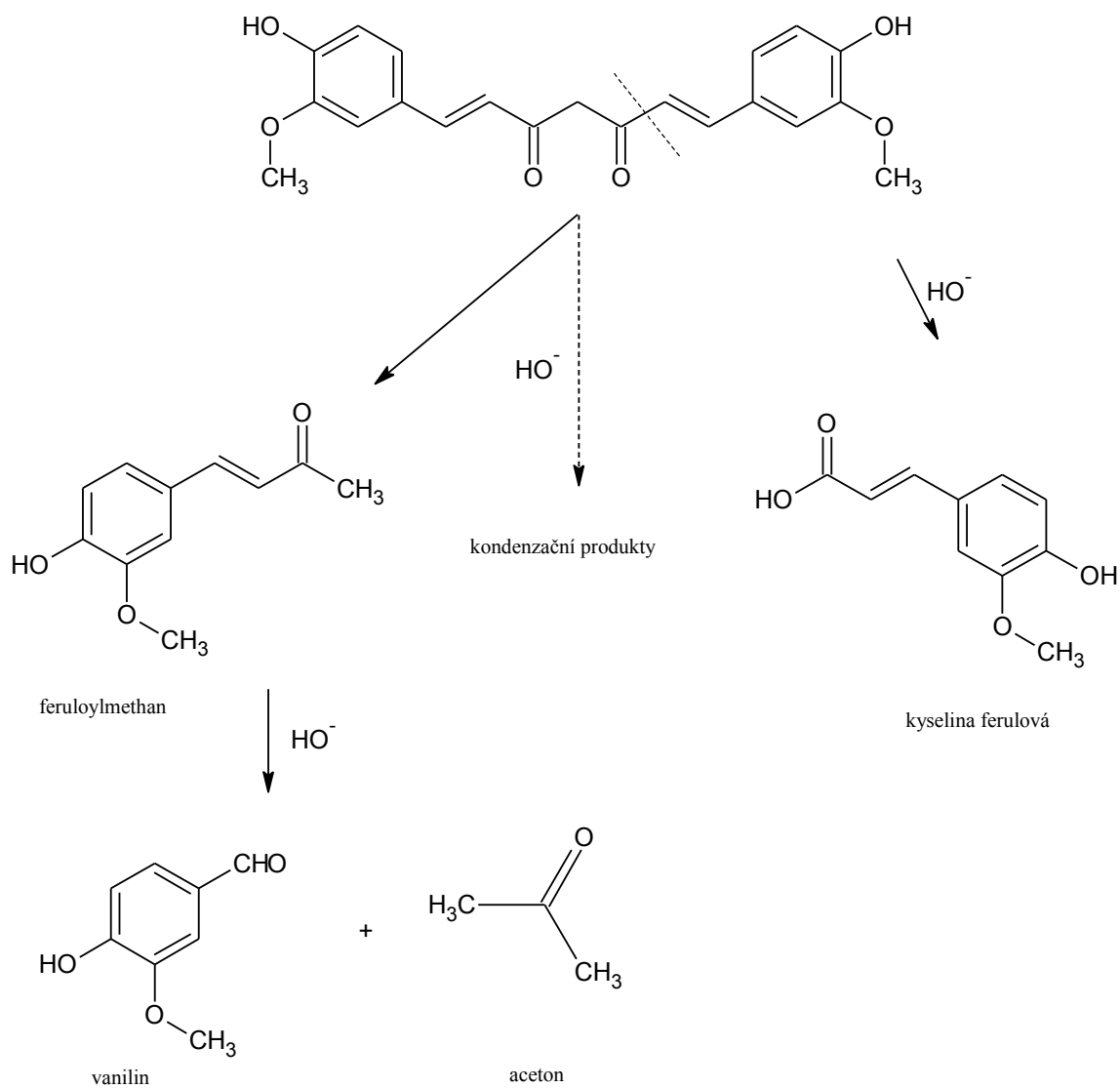
Obr. 11: Kurkumin

Kurkuma obsahuje 3 pigmenty – diketon kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin (obr. 12). Převládajícím pigmentem je lipofilní žlutooranžový kurkumin, který je prakticky nerozpustný ve vodě v kyselém a neutrálním pH. V alkáliích je naopak velmi dobře rozpustný. Kurkumin vykazuje keto-enol tautomerii v závislosti na použitém rozpouštědle, v 95 % však převažuje enol forma. Kurkumin se dobře rozpouští také v alkoholu a v tucích. Je stabilní při vysokých teplotách a v kyselém prostředí, ale nestálý v přítomnosti světla. Má antioxidační účinky. Základní barevné složky kurkuminu jsou relativně stabilní v kyselém pH, ale při pH  $\geq 7$  se rychle rozkládají. Na počátku degradace vzniká kyselina ferulová a feruloylmetan (obr. 13).

Hydrolýzou feruloylmethanu se dále získává vanilin a aceton, jejichž množství roste s časem inkubace. [19, 20]



Obr. 12: Demethoxykurkumin (vlevo); bisdemethoxykurkumin (vpravo)



Obr. 13: Degradace kurkuminu

Kurkumin se označuje jako E100 nebo přírodní žluť 3 či kurkumová žluť. Kurkumin je používán k barvení mnoha potravin. Barvivo se používá k barvení mléčných a pekařských výrobků, instantních polévek, tuků, olejů, zmrzlin, vaječných produktů, koření, cukrovinek, hořčice a nápojů. Povolené množství kurkuminu se pohybuje v rozmezí 5 – 500 mg/ kg v závislosti na kategorii potravin. Základní barevné složky kurkuminu jsou účinnými antioxidanty, díky čemuž mohou např. potlačit žluknutí potravin. [20]

## **2.2.2 Pyranová barviva**

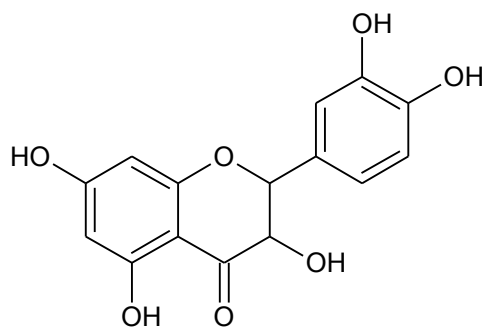
Pyranová barviva se nachází především v rostlinných květech a plodech. Dělí se do skupin dle základní struktury na (i) xanthony, (ii) flavonoidy, (iii) složitější pyranová barviva. V přírodě jsou nejčastěji vázány jako glykosidy, které dodávají rostlinám výrazné barvy od žluté přes červenou až k modré. Většina těchto sloučenin je biologicky aktivní. [2]

### **Flavonoidy**

Flavonoidy jsou barviva rostlinného původu, které se dělí do několika skupin: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthokyaniny. Tyto skupiny jsou v přírodě velmi rozšířené, zejména v ovoci, zelenině a semenech. Tyto látky se řadí mezi velmi účinné antioxidanty, díky své schopnosti zachycovat volné radikály. Dále mají účinky antibakteriální, protizánětlivé a vazodilatační. Konzumace těchto polyfenolických látek má příznivý vliv především na kardiovaskulární systém. [39] Významnou skupinu tvoří flavonoly (především kvercetin) a anthokyaniny.

#### **2.2.2.1 Kvercetin**

Kvercetin (obr. 14) je biologicky aktivní flavonoid nacházející se v celé řadě potravin např. cibule, jablka, kapusta, červené víno, zelený čaj. Má příznivé účinky na lidský organismus. Díky své chemické struktuře je velmi účinným antioxidantem, dokonce více než vitamíny C a E. V rostlinném materiálu se obvykle nevyskytuje volný, ale vázaný na určitý sacharid a vytváří tak stabilnější glykosid (rutin, kvercetrin). [39]



Obr. 14: Kvercetin

### 2.2.2.2 Anthokyaniny

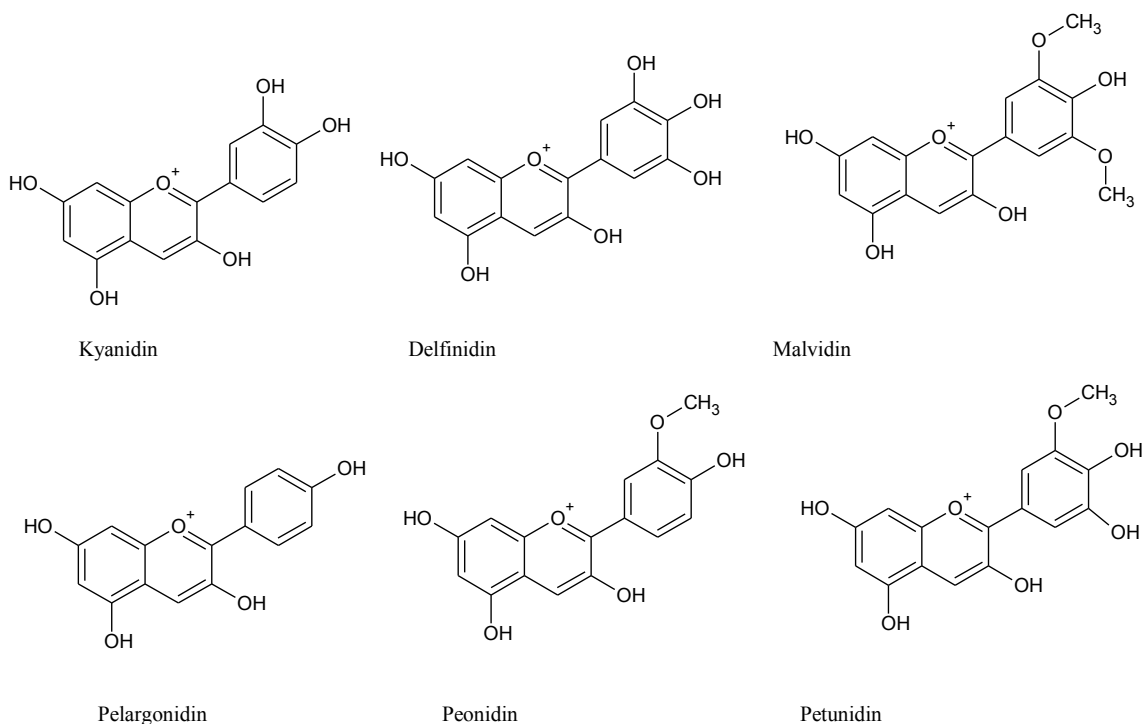
Anthokyaniny jsou rostlinná barviva patřící do skupiny flavonoidů, vznikají jako sekundární metabolity při biochemických procesech v buňce. Doposud bylo identifikováno zhruba 300 anthokyaninů, díky čemuž se řadí mezi nejpočetnější skupinu rostlinných barviv. Jedná se o hydroxy nebo methoxyderiváty 2-fenylbenzopyryliových solí. Anthokyaniny se skládají ze dvou složek: barevné části nazývané aglykon (anthokyanidin) a cukerné jednotky (např. glukosa, galaktosa, xylosa), která zvyšuje stabilitu molekuly. Cukerná jednotka bývá navázána glykosidickou vazbou na hydroxylové skupiny v poloze 3 a 5, výjimečně v polohách 3', 5' či 7 daného aglykonu. Tato část může být acylována fenolickými kyselinami např. kyselinou kávovou, ferulovou, kumarovou, hydroxybenzoovou. Ztráta cukerné jednotky v poloze 3 způsobuje rozklad aglykonu a nevratnou ztrátu barvy. Podle počtu cukrů navázaných na molekulu aglykonu dělíme anthokyaniny na monoglykosidy, diglykosidy, triglykosidy. [21, 22]

Anthokyaniny jsou v kyselém prostředí stabilní, vyskytují se ve formě flavyliového kationtu. Ten je tvořen dvěma aromatickými cykly (A, C) a jedním cyklem pyranovým (B). Uhlíky v poloze 2 a 4 jsou náchylné k nukleofilnímu ataku. Naopak uhlíky v poloze 6 a 8 jsou náchylné k elektrofilnímu ataku, díky přítomnosti hydroxyskupin. Při chemických transformacích anthokyaninů v potravinách se významně uplatňuje hydroxyskupina v poloze 5, kde může vznikat druhý pyranový kruh. [23]

Anthokyaniny částečně absorbují ve viditelné části spektra, díky čemuž tvoří širokou škálu barevných odstínů přecházejících od tmavě modrých přes fialové a



červené až po oranžové. Jsou přítomné v květech, plodech, listech, kořenech, ale i hlízách rostlin. Anthokyaniny jsou lokalizovány v buněčných vakuolách rostlin. Uvádí se, že v přírodě existuje 15 významných anthokyaninů. Z toho pouze 6 se užívá v potravinářství: kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin (obr. 15). Hlavními zdroji jsou hrozny révy vinné, třešně, švestky, jahody, maliny, hrušky aj. Mezi významné rostliny obsahující anthokyanová barviva patří např. lilek, černý rybíz, brusinka, oliva, červené zelí, ředkvičky. [2, 24]



Obr. 15: Aglykony anthokyaninů

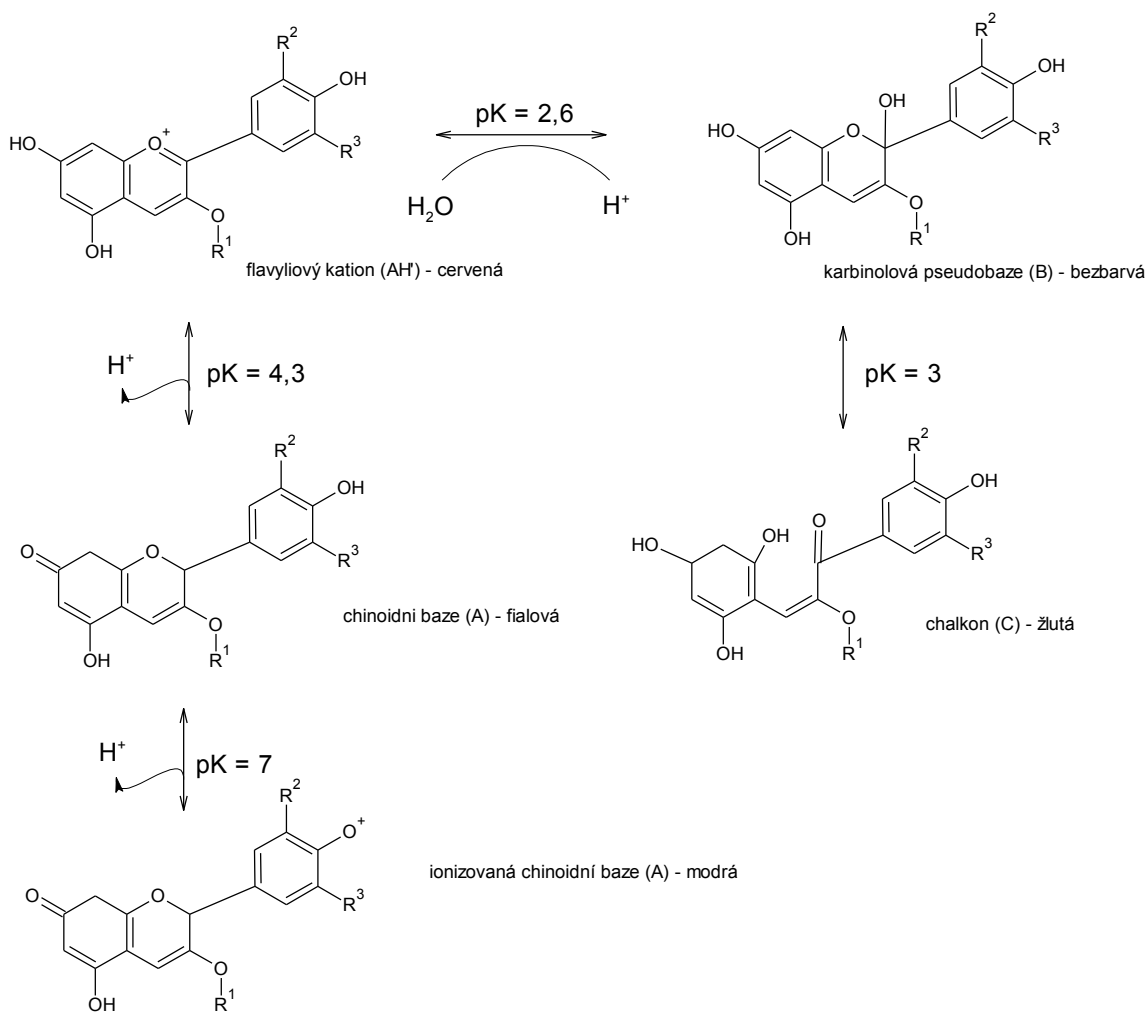
Anthokyaniny jsou značně nestabilní, reaktivní, snadno podléhají oxidaci, kondenzačním i destrukčním reakcím.

### Faktory ovlivňující stabilitu anthokyaninů:

#### Vliv pH

Zbarvení pigmentů ovlivňuje především pH prostředí (obr. 16). Anthokyaninové roztoky při  $\text{pH} < 3$  dosahují intenzivně červeného zbarvení, vyskytují se ve formě flavyliového kationtu. Při zvyšování pH dochází k ustanovení rovnováhy a odbarvování

červeného zbarvení. Nukleofilní adice vody na flavyliový kation dává vznik bezbarvé hemiacetalové formě (karbinolová pseudobaze), která může podlehnout otevření kruhu C za vzniku žlutého chalkonu (tautomerní rovnováha). Deprotonizací flavyliového kationtu vzniká přechodná modře zbarvená chinoidní anhydrobáze. K degradaci anthokyaninů dochází při  $\text{pH} \geq 8$ . V případě opětovného snížení  $\text{pH}$  na hodnotu 1, dochází k přeměně chinoidní báze a karbinolové pseudobaze zpět na flavyliový kation. Stabilitu barviv při daném  $\text{pH}$  mohou ovlivnit substituenty na kruhu B, stejně jako další hydroxy- a methoxy- skupiny. Anthokyaniny obsahující pouze jednu hydroxylovou skupinu na kruhu B jsou stabilnější než ostatní barviva. Hydroxylové skupiny podporují modré zbarvení a jsou méně stabilní. Naopak methylace hydroxylových skupin vede ke zvýšení stability sloučenin a podporuje především červené zbarvení. Také acylované anthokyaniny vykazují nižší citlivost na změnu  $\text{pH}$ , díky větší rozpustnosti ve vodě. [24, 25]



Obr. 16: Vliv  $\text{pH}$  na barvu anthokyanidinu v roztoku

## **Kopigmentační efekt**

Kopigmentace je jev, kdy dochází k molekulární asociaci pigmentů s jinými organickými složkami za vzniku barevných kopigmentačních sloučenin či komplexů. Tyto děje obecně vedou ke zvýšení absorbance a v některých případech i k posunu vlnových délek absorpčního maxima pigmentu. Nejběžnějšími kopigmenty jsou flavonoidy (flavanoly, flavonoly), ale i polysacharidy, mannoproteiny nebo kovové ionty. V případě, kdy je kopigmentační sloučeninou samotný anthokyanin dochází k dimeraci. Kopigmentem může být i kovový ion, což vede ke vzniku kovových komplexů. Tvorba komplexů nebo kopigmentace vede k bathochromnímu posunu ve viditelné části spektra, tudíž z červeného do modrého zabarvení. Absorpční maxima se zvýší o 5-20 nm. Bathochromní posun souvisí s červeným flavyliovým kationtem, stejně tak i s modrou chinoidní bází, avšak nárůst barevné intenzity je způsoben pouze stabilizací chinoidní baze. [24, 26]

## **Vliv kyslíku, peroxidů a enzymů**

Degradaci anthokyaninů způsobuje také kyslík, peroxidy a enzymy. Vzdušný kyslík oxiduje anthokyaniny na nebarevné či hnědé produkty. Oxidace probíhá jednak přímo nebo nepřímo prostřednictvím již zoxidovaných složek prostředí. Destrukci kyslíkem urychluje přítomnost alkoholu a světla, díky nimž vznikají dihydroflavonoly. Na destrukci anthokyaninů se podílí i peroxid vodíku, který se tvoří během oxidace kyseliny L-askorbové. Na ztrátě barvy se mohou podílet také některé enzymy rostlinných pletiv. Aktivita enzymů je dána odrudou a stářím rostlinného materiálu, způsobem zpracování či podmínkami kultivace. Označují se jako polyfenoloxidázy nebo o-difenoloxidázy, které katalizují oxidaci fenolických sloučenin s o-dihydroxyskupinami na o-chinony. Tyto o-chinony dále reagují mezi sebou a oxidují anthokyaniny za vzniku hnědě zabarvených produktů. [24]

## **Odbarvovací účinek oxidu siřičitého**

Oxid siřičitý se v potravinářství používá jako inhibitor mikrobiálního růstu. Odbarvování anthokyaninů je dáno nukleofilní reakcí, kdy oxid siřičitý atakuje flavyliový kation za vzniku bezbarvé hemiacetalové vazby. Uvádí se, že oxid siřičitý přednostně atakuje pozici C4. Okyselením materiálu na pH = 1 lze eliminovat odbarvovací účinek SO<sub>2</sub>, díky čemuž dochází k regeneraci anthokyaninů. [24]

## **Působení teploty a světla**

Další faktory způsobující degradaci anthokyaninů jsou teplota a světlo. Rozkladné reakce závisí na teplotě i na struktuře barviva. Acylace anthokyaninů zvyšuje stabilitu vůči těmto vlivům. Jejich degradace může probíhat dvěma mechanismy. Buď se při tepelném rozkladu 3-glykosidů otevře heterocyklický kruh karbinolové báze za vzniku bezbarvého chalkonu, který se vzápětí mění na 3-glukosyl-5,7-hydroxykumarin. Nebo se po hydrolyze glykosidické vazby anthokyanidin přemění na chalkon, který dále vytváří  $\alpha$ -diketon, ten se pak rozkládá na příslušné fenolové deriváty. Anthokyaniny se nejlépe skladují v chladnu a temnu. [24]

## **Změny způsobené cukry a jejich rozkladnými procesy**

Cukry a jejich rozkladné produkty zvyšují destrukci anthokyaninů. Sloučeniny jako furfural a 5-hydroxymethylfurfural, tvořící se prostřednictvím Maillardovy reakce nebo oxidací kyseliny L-askorbové, mohou s anthokyaniny kondenzovat za vzniku hnědě zbarvených produktů. Tyto sloučeniny urychlují rozpad anthokyaninů už při nízkých koncentracích a jsou přímo závislé na teplotě. Negativní účinky všech cukrů se zvyšují v přítomnosti kyslíku. [24]

## **Kondenzační reakce**

Monomerní anthokyaniny se vyznačují nestabilitou a reaktivností, jsou odpovědné za barvu mladých vín. Jejich koncentrace prudce klesá se zráním červených vín, místo nich se tvoří stabilnější oligomerní a polymerní struktury. Polymerní struktury anthokyaninů jsou méně citlivé na změny pH a odolnější vůči odbarvování v přítomnosti oxidu siřičitého. Nepřímé kondenzační reakce anthokyaninů a polyfenolů jsou ovlivňovány nízkými koncentracemi acetaldehydu. Ten vzniká jako produkt oxidačně-redukčních reakcí např. během zrání vína. Acetaldehyd tvoří vazebného prostředníka mezi flavonoidy (původně bezbarvé) a anthokyaniny. Acetaldehyd se chová jako elektrofil a reaguje s nukleofilním barvivem v pozici C8 či C6. Vzniká kopigmentační sloučenina propojená skupinou  $\text{CH}_3\text{CH}$ . Vzniklý komplex stabilizuje modrou chinoidní formu a zvyšuje barevnou intenzitu roztoku. Dochází k tvorbě polymerů různých stupňů, převážně dimerů a trimerů, které způsobují batochromní posun. [24, 27]

## Tvorba kovových komplexů

V důsledku nestability anhydrobáze jsou anthokyanové roztoky bezbarvé při pH 3-7. Dříve uváděná kopigmentace a kondenzační reakce umožňují stabilizaci anthokyaninů, stejného výsledku lze dosáhnout vytvořením komplexní sloučeniny s ionty kovů. Barviva interagují s ionty železa, cínu, hliníku, hořčíku či mědi. Na rozdíl od kopigmentace, pouze anthokyaniny, které mají v B cyklu o-hydroxylové skupiny, jsou schopné se komplexně vázat s kovovými ionty. Tyto komplexy může tvořit kyanidin, delfidin a petunidin, nikoliv však pelargonidin, peonidin a malvidin. Interakce způsobují batochromní posun ve viditelné části spektra a stabilizují modrou chinoidní bázi. Kovové komplexy se vyskytují především v květinách. [24]

Zastoupení anthokyaninů v přírodě je velice variabilní. Rostliny obsahují buď jeden typ anthokyaninů (např. Petunia, jablka, lilek) nebo směs více barviv (např. rod Rosa a Tulipa či hrozný révy vinné). Obecně platí, že barviva okrasných rostlin jsou komplexnější, než u ovoce a zeleniny. Barviva květin zahrnují produkty polyglykosylace a polyacylace, dochází v nich také k vysoce regulované sérii biochemických pochodů, což vede k sadám různých sloučenin, které jsou zdrojem široké palety barev a odstínů.

Anthokyaniny se vyskytují především ve slupkách ovoce, výjimku tvoří třešně a jahody, u kterých se nachází v dužině.

Nejvýznamějším zdrojem anthokyaninů je réva vinná. Její evropské odrůdy obsahují pouze 3-monoglukosidy. Distribuce anthokyaninů v červených hroznech je velmi proměnlivá, závisí na druhu, odrůdě a celé řadě dalších podmínek. Převládajícím pigmentem je malvidin (42,6 % malvidin-3-glukosid a 20,5 % malvidin-3-acetylglukosid). V hroznech révy bylo identifikováno 5 aglykonů, kromě malvidinu, také kyanidin, peonidin, delfinidin a petunidin. Červená barva mladých vín je dána stejnými barvivy jako v hroznech, z nichž se extrahovaly při fermentaci. Během zrání dochází k změnám zabarvení. Reaktivní monomerní anthokyaniny mladých vín přechází na stabilnější oligomerní a polymerní struktury, čímž dochází ke stabilizaci tmavších červených pigmentů.

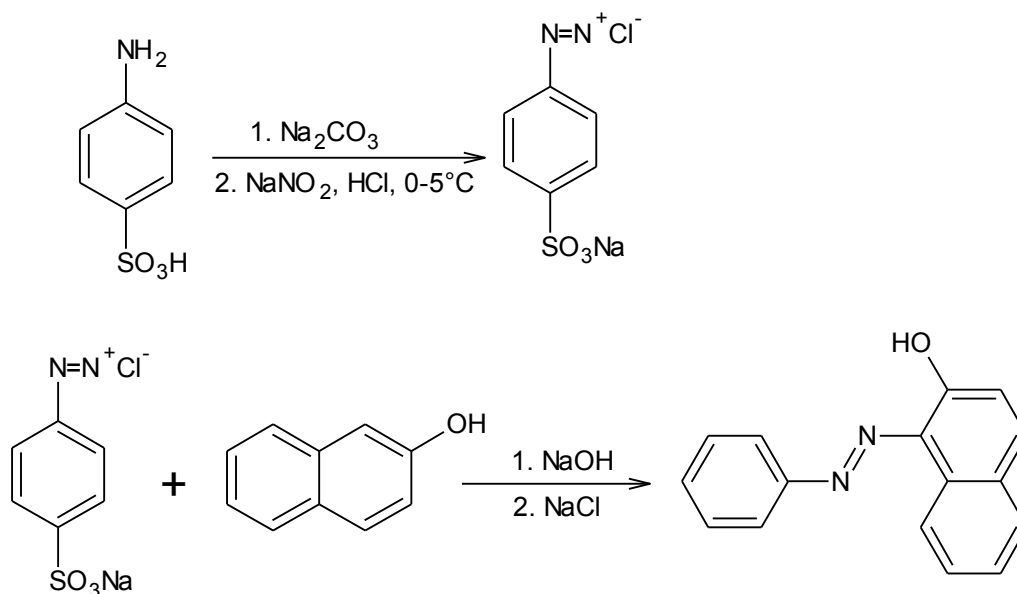
Anthokyaniny patří mezi potravinářská barviva, označují se E134. Barviva jsou vhodná jen pro kyselé potraviny, jelikož svojí intenzivní barvu mají jen v prostředí s pH

< 3,5. Nejčastěji se používají barviva získávána z hroznů révy vinné, u nichž je obsah anthokyaninů 0,3-7,5 g/kg. Dalším bohatým zdrojem jsou bezinky (plody bezu černého, červené hlávkové zelí a ibišek. [51]

### 2.2.3 Azobarviva

Azobarviva jsou látky obsahující funkční azoskupinu  $R-N=N-R'$ , na niž jsou navázané dva organické zbytky (alifatické, aromatické či heterocyklické). Podle počtu azoskupin se dělí na monoazo-, bisazo-, trisazo- až polyazobarviva).

Výroba barviv má 2 fáze: diazotaci a azokopulaci (obr. 17). K diazotaci se používá tzv. aktivní komponenta – většinou aromatický amin, příp. heterocyklická aminosloučenina. Jako pasivní kopulační komponenta se používá např. fenol, naftol, aromatické aminy či alifatické sloučeniny s aktivní  $-CH$  skupinou. Kopulace probíhá zpravidla do para polohy, ale v případě jejího obsazení do polohy ortho.



Obr. 17: Syntéza azobarviv

Syntetická azobarviva představují zhruba 70 % všech barviv používaných k dobarvování potravin v potravinářském průmyslu. Používají se především azobarviva žlutého a červeného zabarvení, naopak odstíny modré a hnědé barvy jsou méně časté.

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách musí být potraviny obsahující stanovená azobarviva (konkrétně – Tabulka 3) povinně označena upozorněním na obalu: „*látky mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí*“. [33]

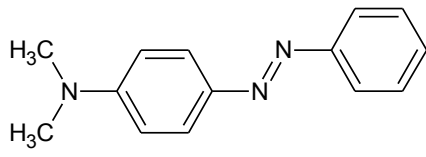
Tabulka 3: Syntetická barviva užívána pro barvení potravin

<b>Azobarvivo</b>	<b>E - kód</b>
Azorubin	E 122
Červeň Allura	E 129
Chinolinová žluť	E 104
Ponceau 4R	E 124
Tartrazin	E 102
Žluť SY	E 110

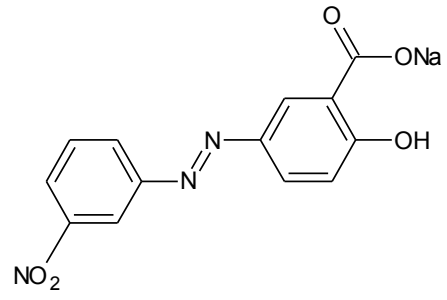
Barviva tartrazine (E 102), ponceau 4R (E 124) a amarant (E 123) vyvolávají řadu diskuzí. U citlivých osob mohou tato barviva způsobit řadu nežádoucích účinků. Nesnášenlivost barviv se může projevit jako kopřivka, angioedém, sípání, bolesti hlavy aj. [30]

Do potravin, stejně jako do textilií, hygienických prostředků a hraček se nesmí přidávat azobarviva, která při štěpení azoskupin uvolňují aromatické aminy. [31, 32] Proto je důležité vytvořit metody pro identifikaci těchto látek.

Těkavá azobarviva (např. dimethylová žluť či alizarinová žluť – Obr. 18, 19) se nesmí přidávat do potravinářských výrobků. Tuto skupinu barviv lze snadno analyzovat pomocí plynové chromatografie. [34, 35]



Obr. 18: Dimethylová žlut'



Obr. 19: Alizarinová žlut'



## 2.3 POTRAVINÁŘSKÁ LEGISLATIVA

Dodržování právních předpisů a nařízení kontrolují v České republice tyto instituce: Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Státní veterinární správa, Hygienická služba. Potravinářská legislativa je úzce spjata i se zákonem o ochraně spotřebitele.

Státní dozor dohlíží na dodržování stanovené legislativy – kontrolují, zda výrobci a distributoři dodržují příslušná nařízení ve všech fázích výroby, skladování a distribuce. Tyto orgány mají v kompetenci ukládat pokuty a navrhnout vhodná opatření při nedodržování právních předpisů, dle Nařízení 2004/882/ES o úředních kontrolách. Cílem legislativy je snižování negativních vlivů potravin na spotřebitele. [12]

Výrobci potravin jsou omezeni vyhláškou č. 4/2008 Sb., v aktuálním znění, kterou jsou stanoveny podmínky použití přídavných látek při výrobě - povinností každého výrobce je zajistit nezávadnost potravin od výroby až do momentu, kdy ji spotřebitel koupí. Všechna tato aditiva musí výrobce uvést na obale potravin v pořadí dle jeho množství. Uvádí se celý název nebo kód obsahující 4-5 symbolů, tento kód vždy začínám velkým písmenem E a je následován 3-4 místným číslem. Tento kód říká, že je dané aditivum evidováno v systému Evropské unie, takto označené látky jsou zdravotně nezávadné a jsou povoleny v potravinách ve stanovených koncentracích (jsou stanoveny nejvyšší přípustná množství).

Potravinový výrobek musí před uvedením do oběhu splňovat základní podmínky pro uvádění do oběhu (neplatí tedy pouze pro výrobce, ale i obchodníky uvádějící zboží na trh), tyto podmínky definuje např. zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích. Jsou zde stanoveny základní povinnosti, např. provozovatel, který uvádí potraviny do oběhu, musí skladovat potraviny v takových prostorách a za takových podmínek, které nijak neovlivní zdravotní nezávadnost a jakost potravin. Dále je povinen zabezpečit, aby ve všech fázích uvádění potravin do oběhu, byl k dispozici doklad o původu zboží. [13]

## 2.4 ANALÝZA BARVIV

Potravinová barviva lze rozdělit do dvou hlavních skupin - syntetická a přírodní - které se podstatně liší v charakteru, struktuře a chemických vlastnostech.

### 2.4.1 Analýza syntetických barviv

Syntetická potravinářská barviva zaručují intenzivní a stálé barevné zabarvení potravinářských výrobků. Náklady na produkci těchto barviv jsou podstatně nižší ve srovnání s barvivy přírodními.

Izolace syntetických barviv z potravin a nápojů začíná extrakcí, po níž obvykle následuje purifikace. Purifikace slouží k odstranění interferujících látek a zkoncentrování vzorku, který se dále identifikuje. Některé typy vzorků potravin je potřeba „předupravit“ před samotnou extrakcí. Předúprava vzorku zahrnuje např. odstranění tuků a zředění cukrů pomocí organických rozpouštědel, tyto látky by jinak bránily extrakci kvůli své „lepkavosti“ a sklonu tvořit emulze.

Pro stanovení syntetických potravinářských barviv byla vyvinuta řada analytických metod např. tenkovrstevná chromatografie, spektrometrie, voltametrie, diferenčně pulsní polarografie, kapilární elektroforéza, vysoko účinná kapalinová chromatografie a iontová chromatografie.

V minulosti se pro identifikaci barviv v potravinách používala především papírová chromatografie (PC), která stále nachází uplatnění v některých laboratořích, především díky relativně nízkým nákladům a jednoduché instrumentaci.

Nejjednodušší chromatografickou technikou pro analýzu směsí barviv je tenkovrstevná chromatografie (TLC). TLC je nejlepším řešením pro kvalitativní analýzu, poskytuje uspokojivé výsledky v krátkém čase. TLC s denzitometrickou detekcí se využívala především pro stanovení syntetických barviv v alkoholických i nealkoholických nápojích. V současnosti je tato metoda standardizována normou ISO 13496:2000, která se zabývá detekcí syntetických potravinářských barviv v mase a mastných výrobcích. [41, 42, 43]

Syntetická azobarviva jsou stanovována nejčastěji kapalinovou chromatografií s UV/VIS nebo MS detekcí, dále pak UV/VIS a infračervenou spektrometrií či GC/MS. Např. pro stanovení sulfonovaných azobarviv, které se používají v potravinách a nápojích, se používá HPLC v reverzním systému.

Mimo tyto metody se pro analýzu barviv v potravinách stále více využívá elektromigračních metod, především pak kapilární elektroforéza. Touto metodou je možné separovat kyselá aniontová barviva. Výhodou metody je malá spotřeba vzorku a pufru či krátká doba analýzy. Stanovení barviv touto metodou není standardizováno (na rozdíl od HPLC). [36, 37]

## 2.4.2 Analýza přírodních barviv

Chemická rozmanitost přírodních potravinářských barviv, složitost jejich struktur a široký rozsah aplikací v potravinách a nápojích přináší pestrou škálu analytických postupů.

### **Kurkumin** (E100)

Metody pro stanovení kurkuminu v potravinách jsou „vzácné“. Bylo vyvinuto pouze několik citlivých analytických metod pro stanovení kurkuminu z biologického materiálu, které slouží ke studiu jeho biologických účinků a farmakologických vlastností. Pro stanovení kurkuminu v potravinách se nejčastěji používá HPLC s DAD či fluorescenční detekcí. [41]

### **Karotenoidy** (E160a-f, E161b, E161g)

V dnešní době se v potravinářském průmyslu vyvíjí značné úsilí k tomu, aby se karotenoidy nepoužívaly do potravin pouze jako barviva, ale hlavně díky svým prospěšným účinkům na lidský organismus. V důsledku toho je drtivá většina metod extrakce a analýzy karotenů zaměřena na stanovení konkrétních karotenoidů v ovoci, zelenině aj. K dispozici je poměrně málo informací o metodách pro jejich stanovení v potravinách, v nichž se přirozeně nevyskytují. [41]

### **Annatto (E160b)**

Nejčastější metodou pro stanovení bixinu a norbixinu (a jejich izomerů) je HPLC.

Jedná se o metodu ekonomicky náročnější a instrumentálně složitější. Výhodou HPLC je především univerzální použití, lze separovat iontová i neiontová barviva či nepolární barviva (např. polyeny - karoteny). Tato metoda je mezinárodně uznávaná a komerčně dostupná. Jednou z nevýhod je poměrně velká spotřeba rozpouštědel. [36]

### **Analýza anthokyanů (E163)**

Stanovení anthokyaninů zahrnuje extrakci (z rostlinného materiálu či potravinářského výrobku), izolaci, přečištění a nakonec identifikaci jednotlivých anthokyaninů ve vzorku. Analýza anthokyaninů je komplikovaná, jelikož tyto sloučeniny snadno podléhají strukturálním změnám a komplexačním reakcím. Díky podobné struktuře a reaktivním vlastnostem je nelze snadno oddělit od ostatních flavonoidů. Pro přesnou kvantitativní analýzu je možné využít čisté standardy anthokyaninů.

Struktura aglykonu je tvořena 3 aromatickými jádry substituovanými hydroxylovými a methoxy skupinami. Tyto substituenty spolu s cukernou částí molekuly zajišťují její polární vlastnosti. Tradičně se k extrakci používají polární rozpouštědla jako voda, methanol či ethanol. Díky toxicitě methanolu se v potravinářském průmyslu dává přednost extrakcí směsí ethanol:voda. Vzhledem k nestabilitě molekuly se extrakce provádí při teplotě do 30°C a nízkém pH. Vzorek se nejdříve extrahuje za použití kyseliny chlorovodíkové či mravenčí. Nejběžněji používanou extrakční technikou je extrakce na pevné fázi (SPE), méně pak extrakce kapalina-kapalina (LLE). Při LLE extrakci se jako rozpouštědlo používá aceton, který je účinnější a poskytuje reprodukovatelnější výsledky.

V minulosti se pro identifikaci anthokyaninů a barviv obecně používala papírová (PC) a tenkovrstevná chromatografie (TLC), postupně bylo tyto techniky nahrazeny sofistikovanějšími metodami jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE).

Papírová chromatografie byla jednou z prvních metod používaných pro izolaci a přečištění některých anthokyaninů v závislosti na konkrétním vzorku a mobilní fázi. K separaci látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází (stacionární a mobilní). PC sice umožňuje dobré rozlišení pro některé směsi pigmentů, její nevýhodou je časová náročnost. Zavedení TLC poskytuje řadu výhod oproti PC např. menší množství vzorků pro analýzu, kratší doba eluce a lepší rozlišení. Obě tyto metody neumožňují získat větší množství čistých anthokyaninů. I přesto jsou stále používány v mnoha laboratořích (např. v potravinářském průmyslu), díky nízkým nákladům na analýzy.

Obecně nepoužívanější metodou pro stanovení anthokyaninů je HPLC. Základy kapalinové chromatografie položil ruský botanik Cvet na počátku minulého století. K rozvoji této metody však dochází až od padesátých let minulého století. Metoda se používá pro kvantitativní i kvalitativní stanovení anthokyaninů. V dnešní době se pro HPLC používají především reverzní stacionární fáze. Nejčastější detekční metodou je UV/Vis spektrometrie. Anthokyaniny mají specifické absorpční maximum při ~ 520 nm. Obecně platí, že spektrální vlastnosti anthokyaninů jsou ovlivněny počtem methoxylových a hydroxylových skupin na aglykonu, stejně tak i cukernou částí molekuly. V posledním desetiletí se rozvinulo spojení HPLC s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). MS je velmi citlivá a selektivní metoda, která umožňuje identifikaci a kvantifikaci neznámých sloučenin ve vzorku. Pro lepší určení struktury molekul zkoumané látky se využívá spojení s nukleární magnetickou rezonancí (HPLC/NMR).

Další běžnou technikou využívanou pro stanovení anthokyaninů je kapilární elektroforéza (CE). V posledních letech roste význam této metody díky schopnosti separovat složité směsi anthokyaninů. Kapilární elektromigrační techniky se dělí podle různého principu separace analytů do 6 skupin. Pro separaci anthokyaninů se nejčastěji používá kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MECK). CE je tradičně spojena s UV/Vis detekcí, stále častěji však využívá detekci MS. Použití CE/MS poskytuje jednoznačnou identifikaci.

Pro analýzu některých flavonoidů a anthokyaninů lze uplatnit také plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí. GC/MS je citlivá a selektivní metoda, která byla

použita např. pro identifikaci a stanovení polyfenolů (pelargonidin, kvercetin, katechin, epikatechin aj.) ve vzorku lidské moči. [48]

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 CHEMIKÁLIE

- Aceton, p.a., Lach-Ner, ČR
- BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilil)trifluoracetamid), p.a., Fluka, Švýcarsko
- Destilovaná voda
- Dichlormethan, p.a., Lach-Ner, ČR
- Dusitan sodný, p.a., Lach-Ner, ČR
- Ethylacetát, p.a., Lach-Ner, ČR
- Hexan, p.a., Lach-Ner, ČR
- HMDS (hexamethyldisilazan), p.a., Fluka, Švýcarsko
- Hydroxid sodný (10 %), p.a., Lachema N.P. Brno, ČR
- Kyselina chlorovodíková (36 %), p.a., Lach-Ner, ČR
- Kyselina mravenčí (99,5 %), p.a., Sigma-aldrich
- Kyselina sírová (konc., 26 %), p.a. Lach-Ner, ČR
- Kyselina trifluoroctová, p.a., Sigma-aldrich
- Methanol, p.a., Lach-Ner, ČR
- N-methylmočovina, p.a., Fluka, Švýcarsko
- Pyridin (99,5 %), p.a., Lach-Ner, ČR

#### Standardy:

- Alizarinová žluť, p.a., Sigma-aldrich
- Dimethylová žluť, p.a., Sigma-aldrich
- Methanilová žluť, p.a., Sigma-aldrich
- Kvercetin, p.a., Sigma-aldrich
- Fisetin, p.a., Sigma-aldrich
- Kyanidin, p.a., Sigma-aldrich
- Malvidin, p.a., Sigma-aldrich
- Pelargonidin, p.a., Sigma-aldrich

## 3.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE

- Analytické váhy NewClassic MS205
- Odstředivka Eppendorf 5702
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic
- Automatické mikropipety, plastové špičky
- Termoblok Evaterm
- SPE kolonky SBD-L, HLB
- Laboratorní sklo, centrifugační zkumavky, laborární stojan a držáky, pipety, odměrné baňky, hodinové sklo, krimpovací kleště a krimpovací vialky, headspace vialky, skleněné tyčinky a ocelové špachtle, eppendorfy, pH metr

Chromatografické analýzy standardů a vzorků byly provedeny na plynovém chromatografu HP 6890 s hmotnostním detektorem 5973N (Agilent, Palo Alto, CA, USA) nebo plynovém chromatografu HP 7890A s hmotnostním detektorem MS 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Byla použita nepolární kapilární kolona HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m). Nosným plynem bylo helium (99.998 %; průtoková rychlost 0,9 ml/min). K vyhodnocení dat byl použit program MSD ChemStation E. a elektronická databáze spekter NIST 08 Mass Spectral Library.

Většina analýz byla provedena s lineárním teplotním programem 50°C – 2 min - 10°C/min - 300°C – 15 min při teplotě nástřikového prostoru 280°C. Při analýze vysokovroucích látek (silanizované anthokyaniny) byla teplota nástřiku zvýšena na 300°C a konečná teplota kolony na 320°C. Dávkován byl 1  $\mu$ l vzorku s dávkovacím pulsem 140 kPa, 0,4 min.

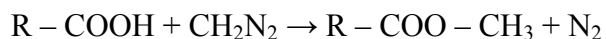


### 3.3 DERIVATIZACE VZORKŮ

Většina vzorků byla upravena jednoduchou derivatizací (silylace, methylace).

#### 3.3.1 Methylace diazomethanem

Jednou z nejrychlejších esterifikačních reakcí je vytvoření methylesteru z kyseliny reakcí s diazomethanem (obr. 20). Tato metoda je využívána nejen proto, že je reakce rychlá, ale také proto, že má velký výtěžek a nevyskytují se téměř žádné vedlejší reakce. Reakce probíhá za pokojové teploty (pro reakci není třeba extrémních podmínek).



Obr. 20: Schéma diazotace

Diazomethan je žlutý plyn, karcinogenní, nestálý, připravován a používán v malých množstvích. Explosivní, je třeba se vyvarovat přehřátí. Obvykle se používá jako etherický roztok. Díky žluté barvě působí jako svůj vlastní indikátor a jeho přítomnost je dobře patrná.

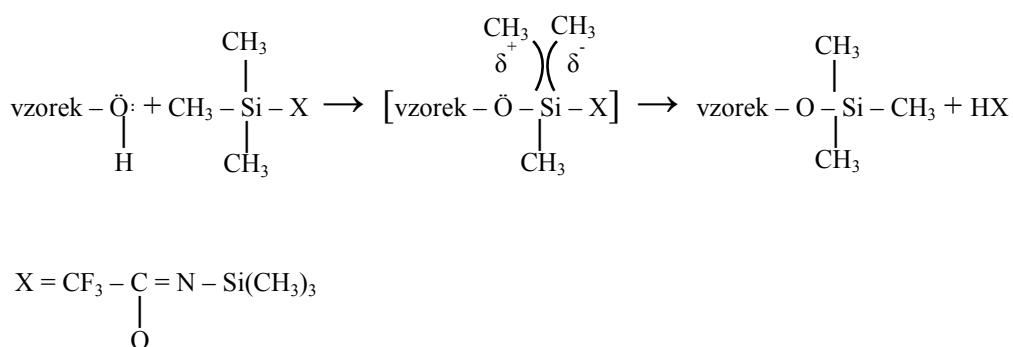
#### **Příprava etherického roztoku diazomethanu:**

Diazomethan byl připraven alkalickou hydrolyzou N-nitroso-N-methylmočoviny. 11,1 g N-methylmočoviny a 12 g dusitanu draselného se rozpustilo v 80 ml destilované vody. K této směsi bylo postupně přidáváno, za stálého míchání a chlazení, 25-30 ml 3,17 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Následně se roztok nechal 2 hodiny stát. Poté byla zfiltrována vzniklá N-nitroso-N-methylmočovina, opatrně rozpuštěna v 50 ml diethyletheru a rozložena přikapáním 30 ml 40 % KOH. Po 10 minutách byl odebrán etherický roztok diazomethanu a uskladněn při -20 °C. [28, 29]

### 3.3.2 Silylace

Jednou z nejběžnějších derivatizačních reakcí je silylace, díky které dochází ke vzniku těkavých derivátů TMS (obr. 21). Tyto deriváty jsou tepelně stabilní a méně polární ve srovnání s původní látkou.

BSTFA je velmi rozšířené a univerzální činidlo pro trimethylsilylaci např. alkoholů, alkaloidů, aminů a biogenních aminů, karboxylových kyselin, fenolů a steroidů.



Obr. 21: Schéma silanizace

Toto činidlo působí na danou sloučeninu a dochází tak k nahrazení aktivního vodíku v polární skupině trimethylsilylovou skupinou  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Tyto reakce probíhají nejčastěji v přítomnosti pyridinu. Pyridin působí, jako rozpouštělo a katalyzátor. Reakční směs je třeba zahřívat, teplota a doba zahřívání se liší pro jednotlivé analyty.

Výhodou BSTFA a jeho vedlejších produktů derivatizace (trimethylsilyltrifluoracetamid a trifluoracetamid) je značná těkavost, což způsobuje menší interferenci látek v chromatogramu. [29, 38]

## **3.4 POUŽITÉ POSTUPY**

### **3.4.1 Analýza semen annato**

Příprava vzorku vycházela z článku [47]. Vzorek byl připraven ze semen annato alkalickou hydrolýzou a následnou derivatizací diazomethanem.

Do zkumavky bylo naváženo 250 mg semen annato a 1 ml 10 % NaOH. Extrakt byl zahříván po dobu 1 hodiny na 80°C. Po ochlazení byl vzorek 3 minuty centrifugován. Poté byla odebrána vrchní alkalická vrstva. Vzorek byl okyselen 4 ml HCl. Následně extrahován 1 ml dichlormethanu a následně 1 ml ethylacetátu. Odebrána spodní vrstva extraktu do krimpovací vialky a odpařena do sucha. Nakonec byl vzorek derivatizován dvěma podíly diazomethanu (2 x 1 ml), zakoncentrován pomocí proudu dusíku na objem 0,5 ml a analyzován pomocí GC-MS.

### **3.4.2 Analýza azobarviv**

2 mg barviva (dimethylová žluť, alizarinová žluť) byly extrahovány do 0,5 ml methanolu. 100 µl roztoku dimethylové žluti bylo odebráno do krimpovací vialky a doplněno do 1 ml methanolem. Takto připravený vzorek byl analyzován. Z druhé vialky bylo odebráno 100 µl roztoku alizarinové žluti, který byl následně odpařen, derivatizován 1 ml etherického roztoku diazomethanu, znovu odpařen a rozpuštěn v 1 ml methanolu.

### **3.4.3 Analýza kurkuminu**

Pyrolýza kurkuminu: K 200 mg mleté kurkumy (koření) byly přidány 2 ml methanolu. Roztok byl několik minut umístěn do ultrazvuku, poté byl zcentrifugován. Extrakt nad usazeninou byl odebrán do čisté vialky. Extrakce se opakovala ještě 2x. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml extraktu a zředěn 5 ml methanolu.

Vzorky rýže: Do dvou kádinek bylo naváženo 30 g rýže. Do první kádinky se přidalo 10 mg šafránu a 80 ml vody. Do druhé kádinky se přidalo 100 mg kurkumy a 80 ml vody. Oba vzorky se 30 minut povařily. Po ochlazení vzorku se z každé kádinky odebraly 3 g uvařené rýže, přidaly se 4 ml methanolu a nechaly se v ultrazvuku 45 min.

Poté se vzorky zcentrifugovaly. Extrakt vzorků byl odebrán do krimpovacích vialek a odpařil se na 0,5 ml. Zbylou rýži ještě extrahujeme 2 ml methanolu, extrakt přidáme k původním vzorkům a opět odpaříme na 0,5 ml. Takto připravené vzorky byly analyzovány GC-MS.

#### **3.4.4 Analýza kvercetinu**

Vzorek cibule: K 100 mg suchých cibulových slupek byly přidány 4 ml roztoku fisetinu (vnitřní standard,  $c = 0,25$  mg/ml) v methanolu. Roztok byl extrahován 1 hod. v ultrazvuku, poté byl extrakt převeden do 10 ml odměrné baňky. Extrakce se opakovala 4x (4 ml, 3 ml, 2x 2 ml MeOH). Z celkového extraktu bylo odebráno 0,5 ml vzorku. Vzorek se odpařil a silanizoval 60  $\mu$ l BSTFA a 60  $\mu$ l pyridinu při 80 °C 30 minut. Nakonec se přidalo 880  $\mu$ l hexanu a analyzovalo pomocí GC-MS.

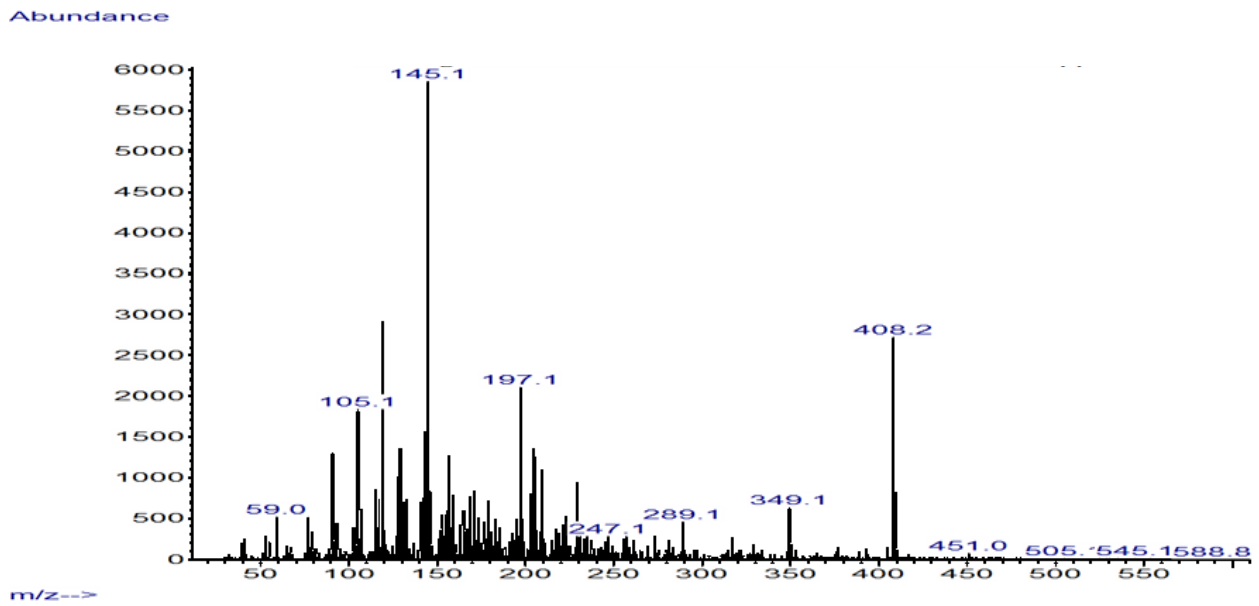
#### **3.4.5 Analýza anthokyaninů**

Vzorky vína: K 5 ml vína bylo přidáno 5 ml 3M HCl. Roztok byl 1,5 hod. hydrolyzován při 105 °C. Poté byly vzorky zchlazeny proudem studené vody a zcentrifugovány. Odebral se kapalný podíl vzorku. 5ml extraktu bylo převedeno do 50 ml odměrné baňky a doplněno na definovaný objem. Takto připravený vzorek byl nanesen na HLB kolonky. Kondicionace kolonky 2 x 1 ml 5 %HCOOH v MeOH, poté 1 ml 0,05 M HCl, nanést vzorek, poté promýt 1 ml 0,05 M HCl. Eluce vzorku 4x 0,5 ml 5 % HCOOH v MeOH. Dále byl vzorek odpařen a silanizován (100  $\mu$ l pyridin + 100  $\mu$ l BSTFA), poté bylo přidáno 300  $\mu$ l hexanu a vzorek byl analyzován na GC-MS.

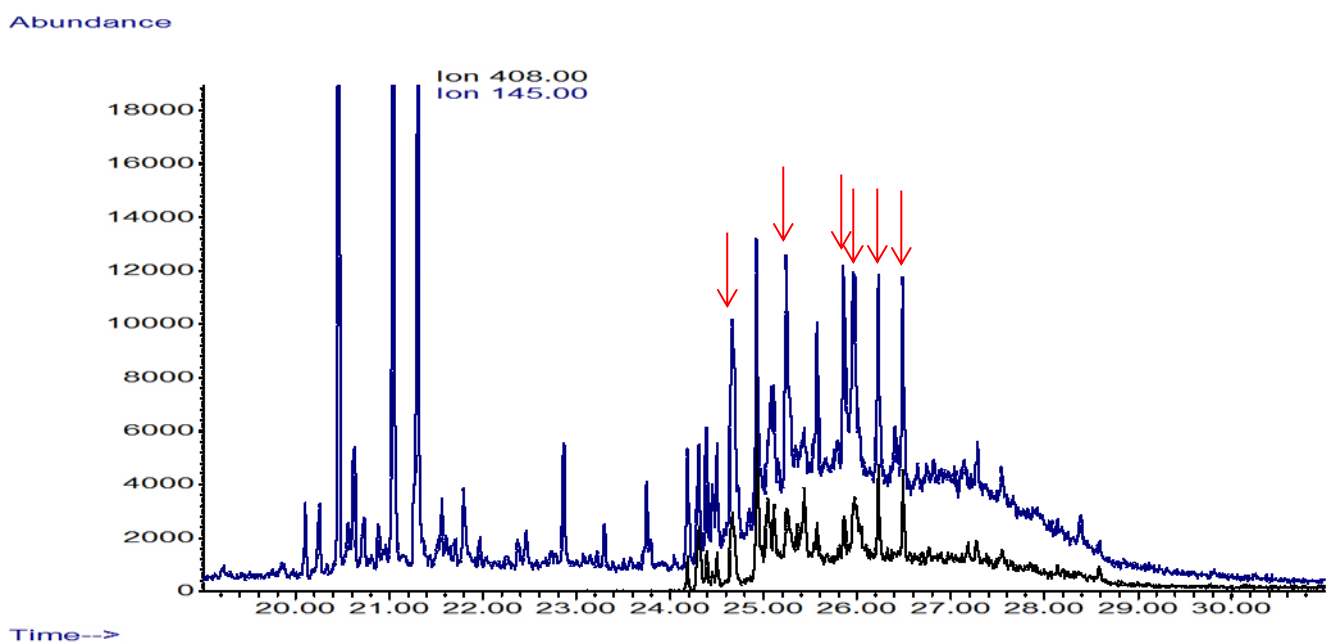
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 ANALÝZA BIXINU

Struktura bixinu je tvořena nenasyceným isoprenoidním řetězcem s dvěma karboxylovými skupinami, z nichž jedna je esterifikována methanolem a druhá zůstává volná (obr. 7). Vedle bixinu se vyskytuje i norbixin se dvěma volnými karboxylovými skupinami (obr. 8). Pro izolaci těchto barviv se využívá hydrolýzy a extrakce působením roztoku alkalického hydroxidu. Pro analýzu pomocí GC/MS je možné s výhodou převést dikarboxylovou kyselinu, případně monomethyl ester, na společný produkt – dimethylester, tzv. methylbixin. Hmotnostní spektrum methylbixinu je popsáno v literatuře [44]. Dominantním iontem ve spektru je ion 145 m/z, dále 197, 349 m/z a molekulární ion 408 m/z (obr. 22). Při analýze vzorku izolovaného ze semen annato byl získán chromatogram, kde podobné hmotnostní spektrum přísluší několika píkům eluovaným v čase 24 až 27 min (Obr. 23). Lze předpokládat, že uvedená serie píků přísluší izomerům bixinu, které pravděpodobně vznikly v důsledku spontánní izomerace vlivem vysoké teploty během nástřiku a plynově chromatografické separace. Vzhledem k značnému počtu dvojných vazeb v molekule (celkem 9 dvojných vazeb v uhlovodíkové části molekuly) lze předpokládat vznik velkého množství především geometrických (cis – trans) izomerů methylbixinu čemuž odpovídá velké množství detekovaných píků s podobnými hmotnostními spektry. Pro kvantitativní analýzu bixinu by bylo nutné vyhodnotit píky všech detekovaných izomerů, což je pro praktické využití nevýhodné. Jistým řešením by mohlo být potlačení izomerace pečlivou optimalizací podmínek a/nebo vhodnou chemickou konverzí analytu (například katalytickou hydrogenací při nástřiku vzorku). Za daných podmínek je metoda využitelná spíše pro kvalitativní detekci bixinu ve vzorku.



Obr. 22: Hmotnostní spektrum methylbixinu



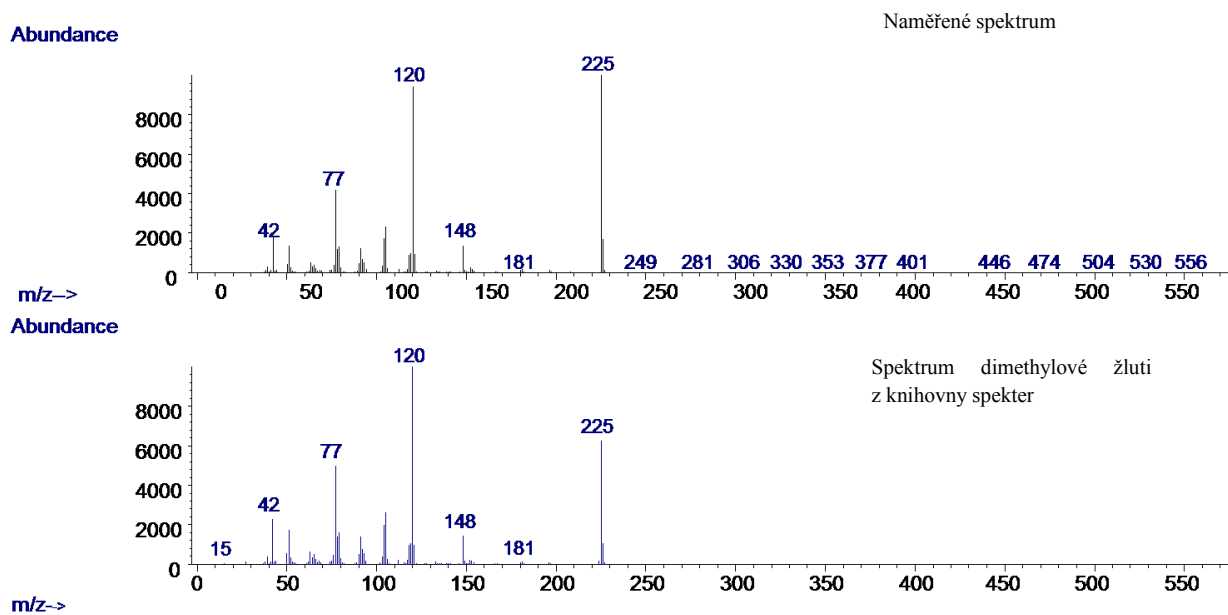
Obr. 23: Iontový chromatogram pro ionty 145 a 408 m/z; izomery bixinu po derivatizaci diazomethanem

## 4.2 ANALÝZA AZOBARVIV

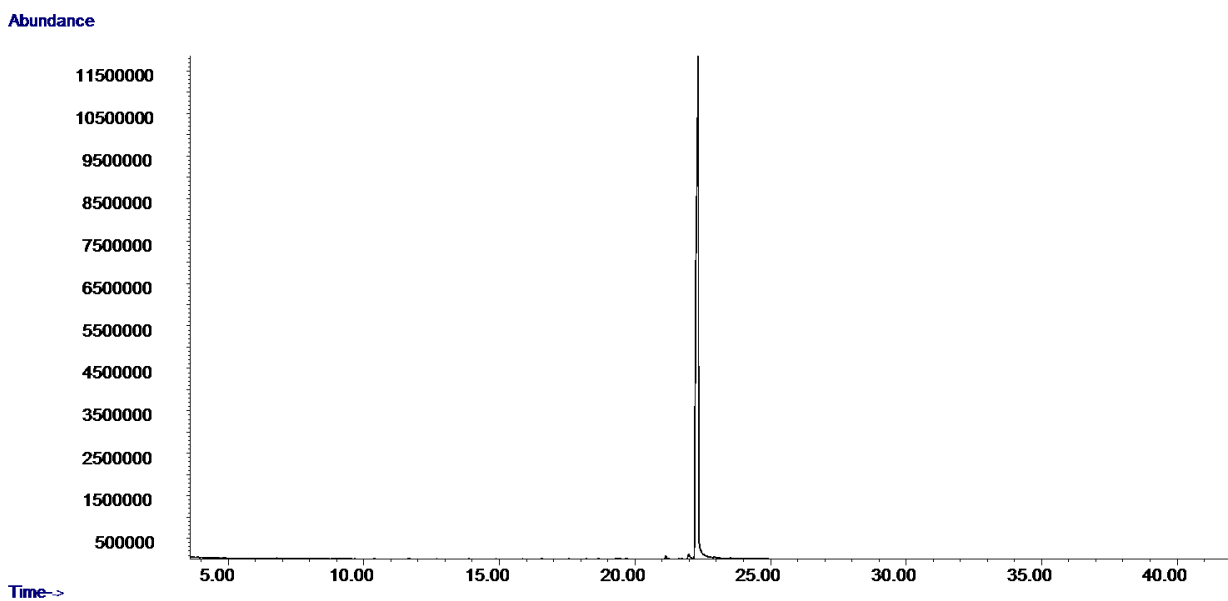
Azobarviva jsou diskutovanou skupinou barviv díky svým možným nežádoucím účinkům. Doposud nebylo prokázáno, že by jednotlivá azobarviva nebo jejich kombinace v množství určeném legislativou vyvolaly závažné nežádoucí účinky u spotřebitelů. [5, 53]

Skupina azobarviv, kterými se zabývá tato část práce, by se dle současné legislativy neměla v potravinách vyskytovat, tudíž analýzy neprobíhaly na vzorcích potravin, ale pouze na standardech barviv (Sigma-Aldrich).

V rámci této studie byly testovány tři modelové sloučeniny reprezentující tři strukturální typy azobarviv: metanilová žluť (sulfonované azobarvivo), alizarinová žluť (azobarvivo s karboxylovou skupinou) a dimethylová žluť (azobarvivo bez kyselých skupin). Sulfonované azobarvivo se za uvedených podmínek nepodařilo převést na derivát vhodný pro plynovou chromatografii a během experimentální práce se nepodařilo nalézt podmínky dovolující detekci metanilové žluťi. Naproti tomu karboxylovou skupinu alizarinové žluťi bylo možno methylovat jednoduchou derivatizací a detekovat jako jediný pík s hmotnostním spektrem odpovídajícím příslušnému dimethylderivátu (methoxy-methylester) (obr. 26 a 27). Dimethylová žluť bez dalších polárních (kyselých) skupin byla detekována bez derivatizace a dalších úprav v nativní formě (obr. 24 a 25).

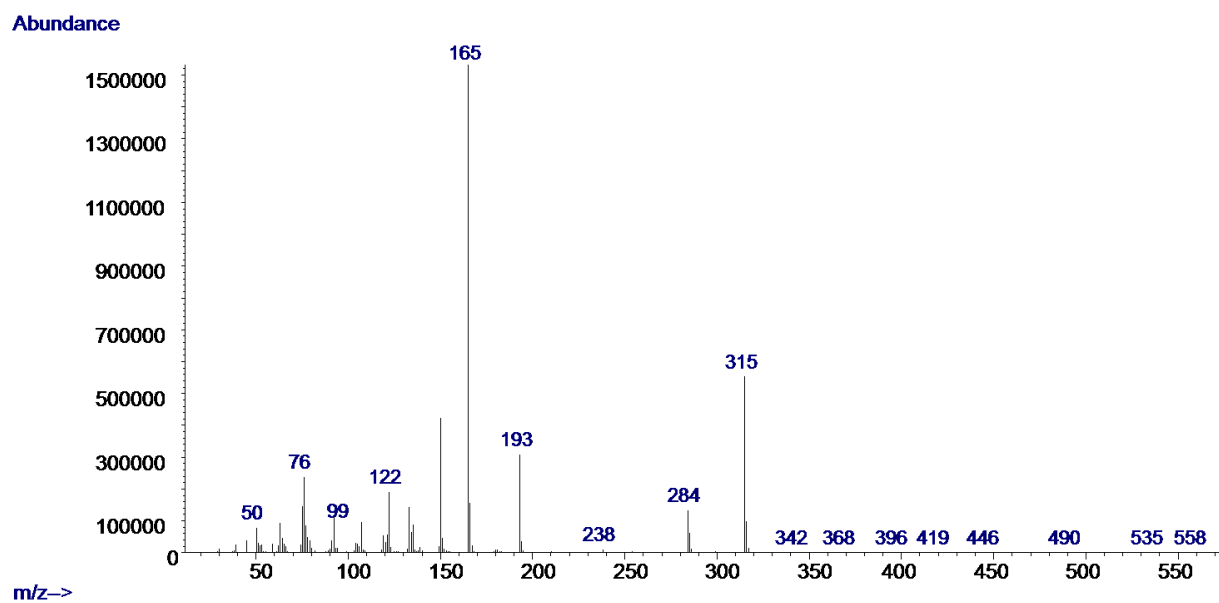


Obr. 24: Hmotnostní spektrum dimethylové žlutí; porovnání s knihovnou spekter NIST 2008.

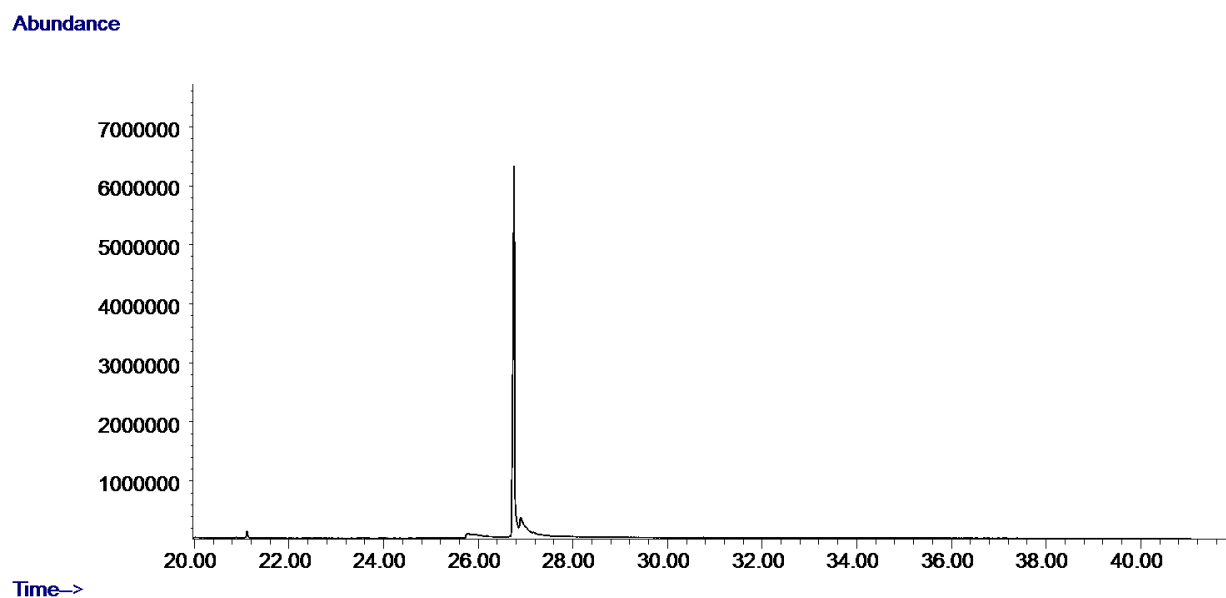


Obr. 25: Iontový chromatogram pro ion 120 m/z, dimethylová žlutí (standard)





Obr. 26: Hmotnostní spektrum alizarinové žlutí

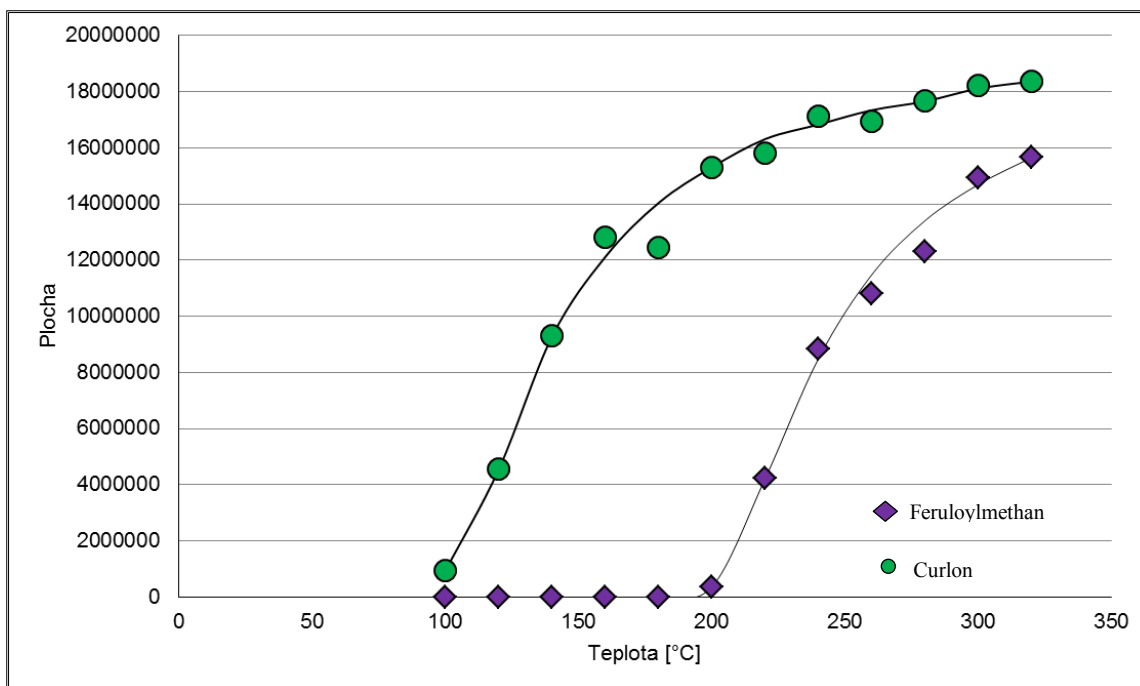


Obr. 27: Ionový chromatogram pro ion 165 m/z; alizarinová žluť po derivatizaci diazomethanem (standard)

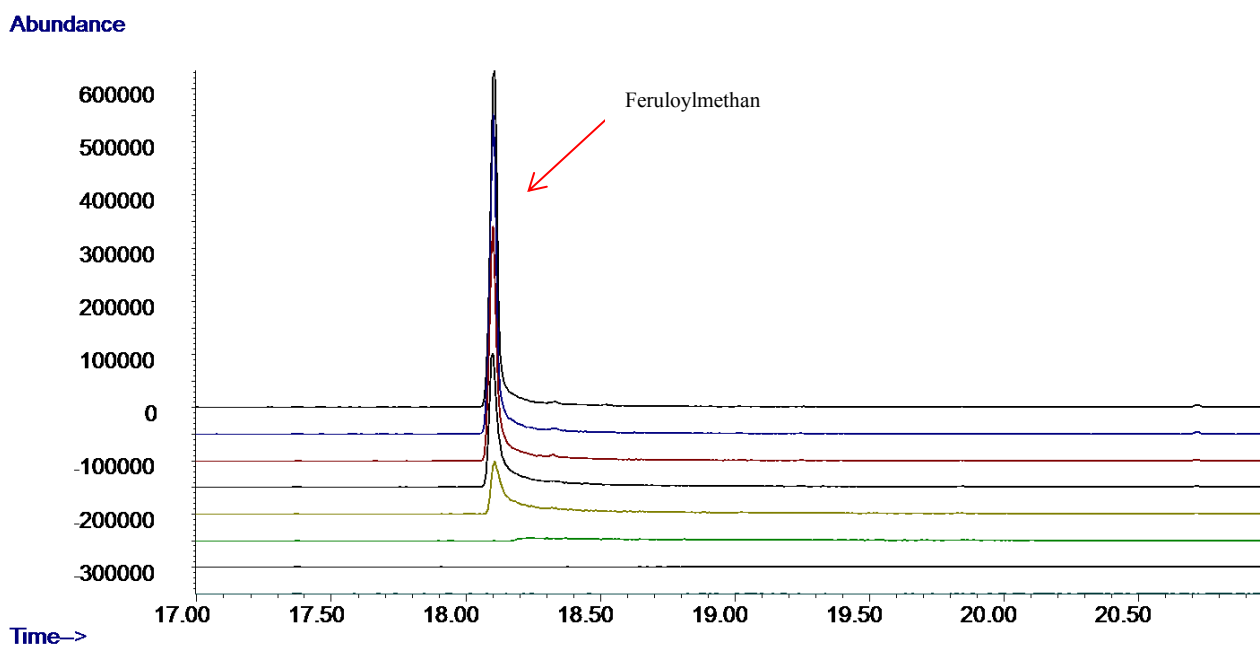
### 4.3 ANALÝZA KURKUMINU

Kurkumin je barvivo intenzivní žluté barvy. Molekula kurkuminu obsahuje dvě aromatická jádra, spojená uhlovodíkovým řetězcem a několik polárních kyslíkatých skupin (hydroxylové, karbonylové a methoxylové skupiny). Kurkumin je ceněný pro své antioxidační vlastnosti. V podmínkách plynové chromatografie ho však nelze detekovat, jelikož není dostatečně tepelně stálý. V chromatogramu extraktů obsahujících kurkumin je však možné detekovat pík, jehož hmotnostní spektrum odpovídá feruloymethanu – předpokládanému produktu pyrolytického štěpení molekuly kurkuminu. Feruloymethan se začíná objevovat při teplotě nástřikového prostoru 200°C a jeho množství se zvyšuje s rostoucí teplotou nástřiku. Srovnatelně velká molekula curlonu (meziprodukt biosyntézy kurkuminu přirozeně se vyskytující v kurkumě a příslušných extraktech) je přitom detekována již při teplotách nástřiku okolo 100°C (obr. 29). Lze předpokládat, že pokud by ve vzorku byla přítomna srovnatelná molekula feruloymethanu, měla by být detekována za srovnatelných podmínek. Jestliže se začíná objevovat teprve při teplotách o 100°C vyšších, pak se zřejmě jedná o látku, která ve vzorku přítomna není, ale vzniká v důsledku pyrolytického rozkladu jiné složky (kurkuminu) teprve při vyšších teplotách. Za těchto podmínek by bylo možné považovat pyrolytický produkt za marker prokazující přítomnost kurkuminu ve vzorku.

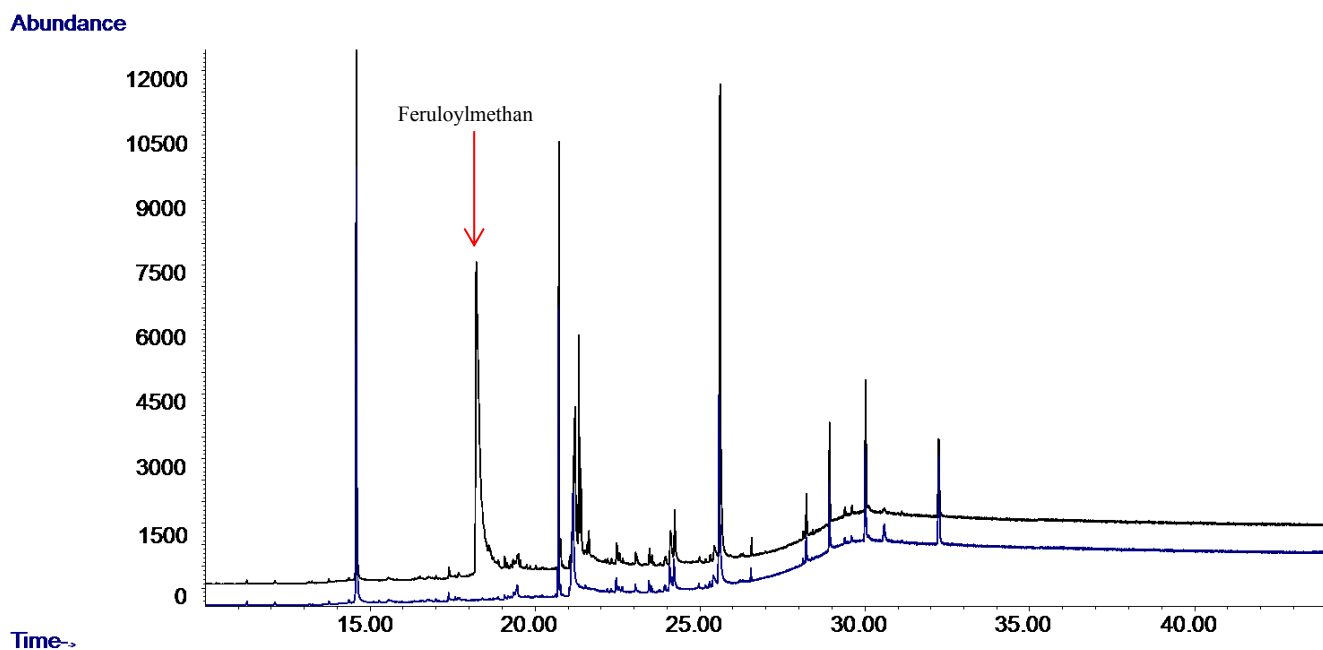
Důkaz kurkuminu založený na detekci feruloymethanu byl využit k odlišení dvou vzorků rýže obarvených v prvním případě vysoce ceněným šafránem a ve druhém případě kurkumou jako náhražkovým barvivem. Na obr. 30 je zřetelně patrný pík feruloymethanu (retenční čas 18,2 min) v extraktu ze vzorku rýže obarvené kurkumou, zatímco v rýži obarvené šafránem tento pík detekován není.



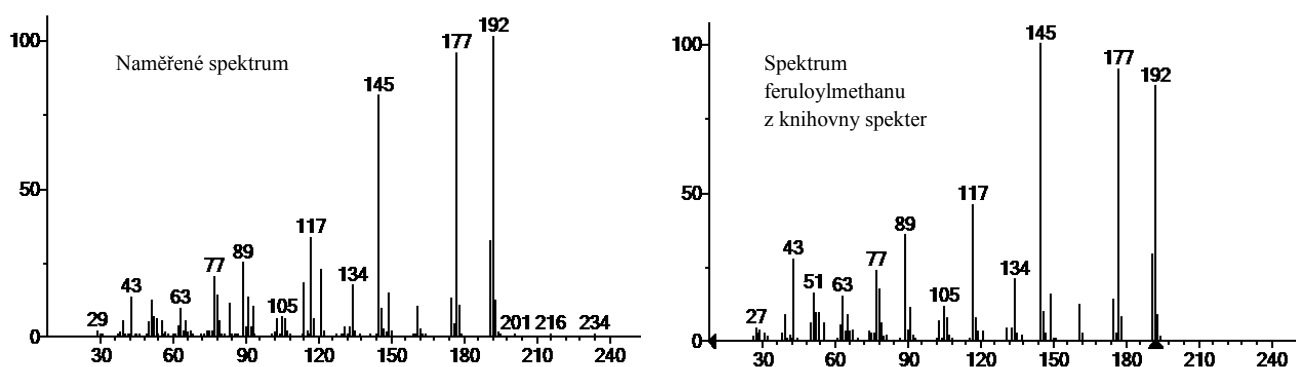
Obr. 28: Závislost plochy píku curlonu a feruloymethanu na teplotě nástřiku



Obr. 29: Vznik feruloymethanu v nástřikovém prostoru; počáteční teplota nástřikového prostoru 180 °C zvyšující se po 20 °C na konečnou teplotu 320 °C



Obr. 30: Ionový chromatogram pro ion 192 m/z; analýza vzorku rýže obarvené kurkumou a šafránem při teplotě nástřikového prostoru 340 °C



Obr. 31: Hmotnostní spektrum píku v čase 18,2 min.; porovnání s knihovnou spekter NIST 2008

## 4.4 ANALÝZA KVERCETINU

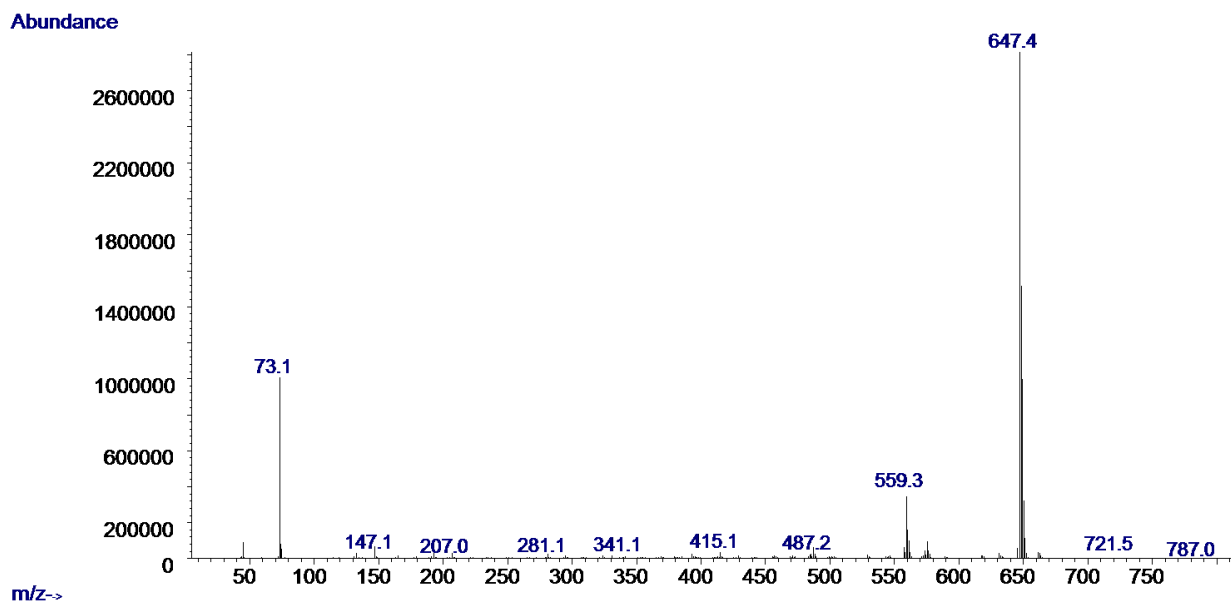
Kvercetin je jedním z nejrozšířenějších flavonoidů v lidské stravě. Je to jeden z nejsilnějších antioxidantů mezi polyfenoly, také byly prokázány jeho antivirové, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Kvercetin je látka intenzivně žluté barvy obsažená v cibuli, jablkách, hroznech, červeném víně, černém a zeleném čaji [45, 46]. Struktura molekuly je tvořena třemi aromatickými jádry substituovanými pěti hydroxylovými skupinami. Díky přítomnosti hydroxylových skupin tvoří kvercetin celou řadu derivátů, především glykosidy a ethery. [49]

Pro izolaci barviva se využila opakovaná extrakce rozpouštědlem. Kvůli polárnímu charakteru molekuly byl pro extrakci vybrán methanol. Výsledný extrakt byl odpařen, silanizován pomocí silanizačního činidla BSTFA a analyzován metodou GC/MS. Dominantním iontem ve spektru je ion 647 m/z a 559 m/z. Chromatogram extraktu z cibulových slupek a hmotnostní spektrum TMS derivátu kvercetinu (obr. 33 a 32).

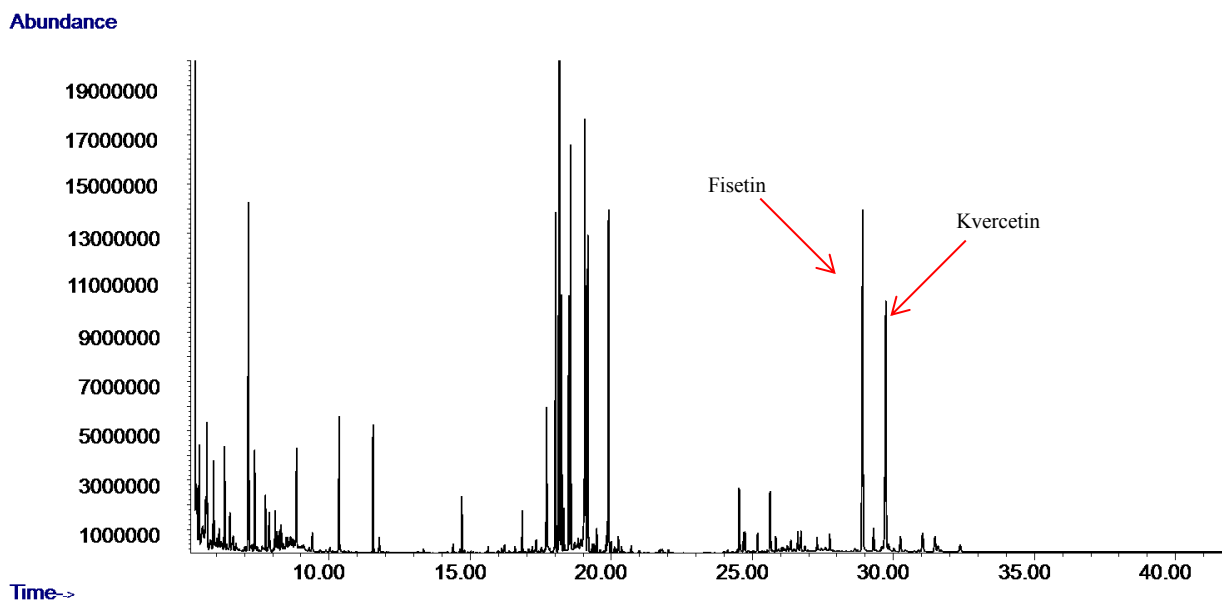
Kvercetin byl stanovován ve slupkách červené a žluté cibule. Pro kvantifikaci cílové látky byla použita metoda vnitřního standardu (ISTD). Jako vnitřní standard byl použit roztok fisetinu v methanolu o koncentraci 0,25 mg/ml. Pro výslednou koncentraci vzorku platí:

$$c_i = R_{is} \cdot \frac{V_s}{V_i} \cdot \frac{A_i}{A_s} \cdot c_s$$

Vypočtené koncentrace byly korigovány odezвовým faktorem určeným nezávislou analýzou standardu. Kalibrační závislosti fisetinu a kvercetinu použité pro výpočet odezвовého faktoru jsou uvedeny na obr. 34. Hodnota odezвовého faktoru činila 0,48. Nalezené koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4. Z uvedených hodnot je zřejmé, že žlutá cibule obsahuje více kvercetinu než červená a slupky ze svrchní části cibule (blíže nati a fotosyntetizujícím pletivům) obsahují větší množství kvercetinu než slupky ze spodní části cibule (blíže kořenům).



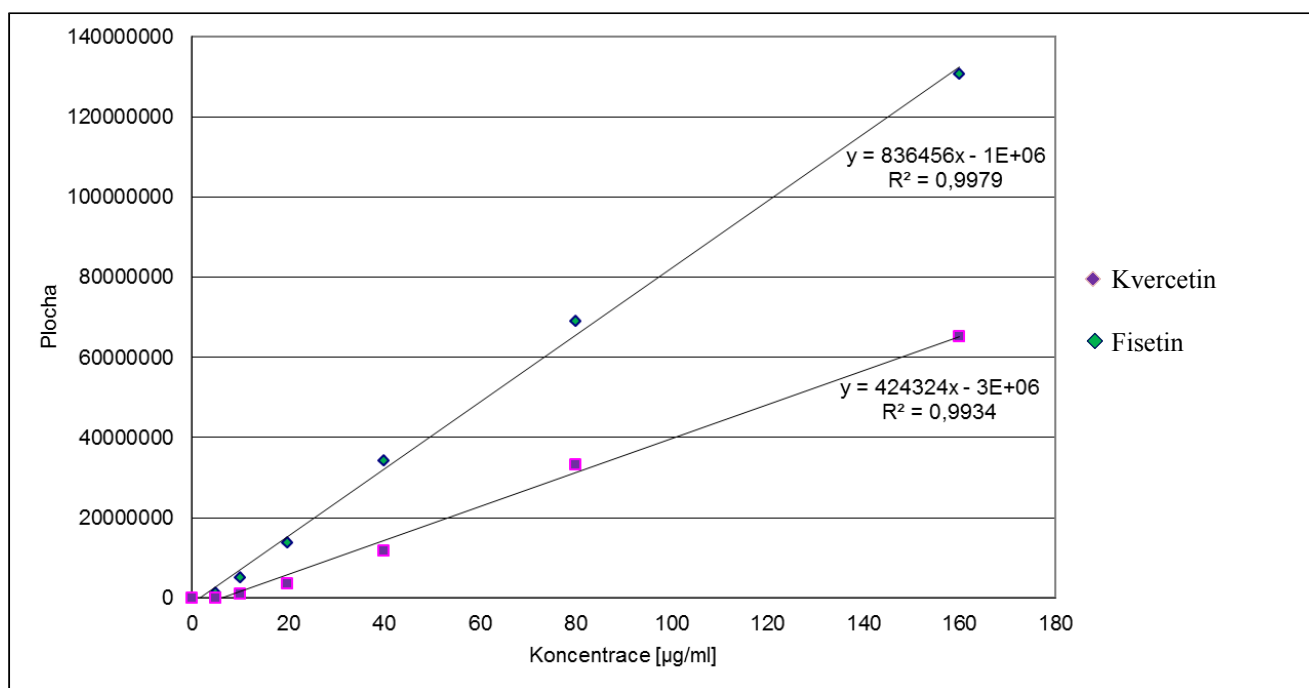
Obr. 32: Hmotnostní spektrum derivatizovaného kvercetinu z cibulových slupek



Obr. 33: Chromatogram extraktu z cibule; celkový iontový proud

Tabulka 4: Obsah kvercetinu ve slupkách červené a žluté cibule

Vzorek	Kvercetin (% m/m)
Cibule červená, vnější slupka z vrchní části cibule	0,81
Cibule červená, vnější slupka ze spodní části cibule	0,31
Cibule červená, vnitřní slupka z vrchní části cibule	0,77
Cibule červená, vnitřní slupka ze spodní části cibule	0,66
Cibule žlutá, vnější slupka z vrchní části cibule	3,55
Cibule žlutá, vnější slupka ze spodní části cibule	0,28
Cibule žlutá, vnitřní slupka z vrchní části cibule	0,96
Cibule žlutá, vnitřní slupka ze spodní části cibule	0,25



Obr. 34: Graf kalibrační závislosti kvercetinu a fisetinu

## 4.5 ANALÝZA AGLYKONŮ ANTHOKYANOVÝCH BARVIV

Anthokyany jsou přírodní pigmenty, které propůjčují rostlinným pletivům celou škálu barev od červené přes fialovou až po modrou. V rostlinných materiálech se zřídka vyskytuje samostatný aglykon, většinou je anthokyanidin glykosilován pro zvýšení stability molekuly. Jak už bylo řečeno dříve, tyto sloučeniny mají silné antioxidační vlastnosti, což je způsobeno tím, že mají ve své struktuře nedostatek elektronů, a tak jsou velmi reaktivní vůči kyslíkovým radikálům. [40, 50, 52]

V této studii jsem se zaměřila na aglykony pyranových barviv, přesněji pelargonidin, malvidin a kyanidin. Tato barviva jsem vybrala na základě podobné struktury (všechny vychází z flavonoidového kationtu s různým počtem navázaných substituentů).

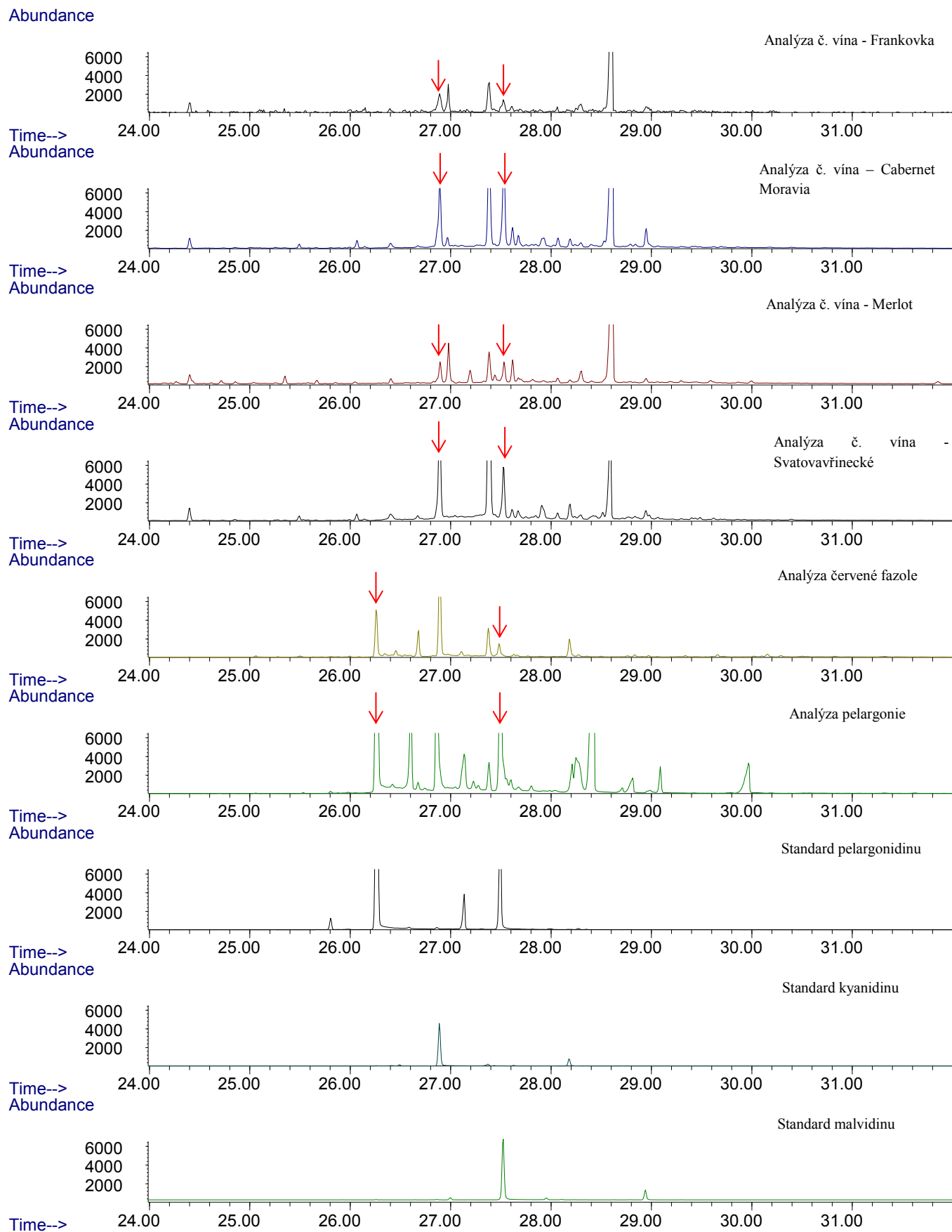
Při přípravě vzorků se využívá toho, že v kyselém prostředí dochází k odštěpení cukerné složky molekuly a uvolnění barviva, proto jsem pro izolaci barviv použila roztok kyseliny chlorovodíkové při zvýšené teplotě (105 °C; 1,5 hod). V případě těchto vzorků byla degradace umocněna i tepelně (100°C). Poté byly vzorky zchlazeny a byla odebrána kapalná část vzorku, ve které se nachází uvolněné aglykony. Dále byl hydrolyzát purifikován pomocí SPE extrakce. Protože tato barviva nejsou těkavá, bylo potřeba vzorky nasilanizovat pomocí BSTFA, což umožnilo vzorky analyzovat pomocí GC/MS.

Experiment byl prováděn na vzorcích červeného vína (odrůdy Merlot, Frankovka, Cabernet Moravia, Svatovavřínecké), červených fazolích a květech pelargonie (obr. 35). Tyto vzorky byly srovnány se standardy barviv. Na obr. 35 můžeme pozorovat standard malvidinu (v retenčním čase 27,54 min.), pelargonidinu (v retenčním čase 26,28 min.) a kyanidinu (v retenčním čase 26,89 min.).

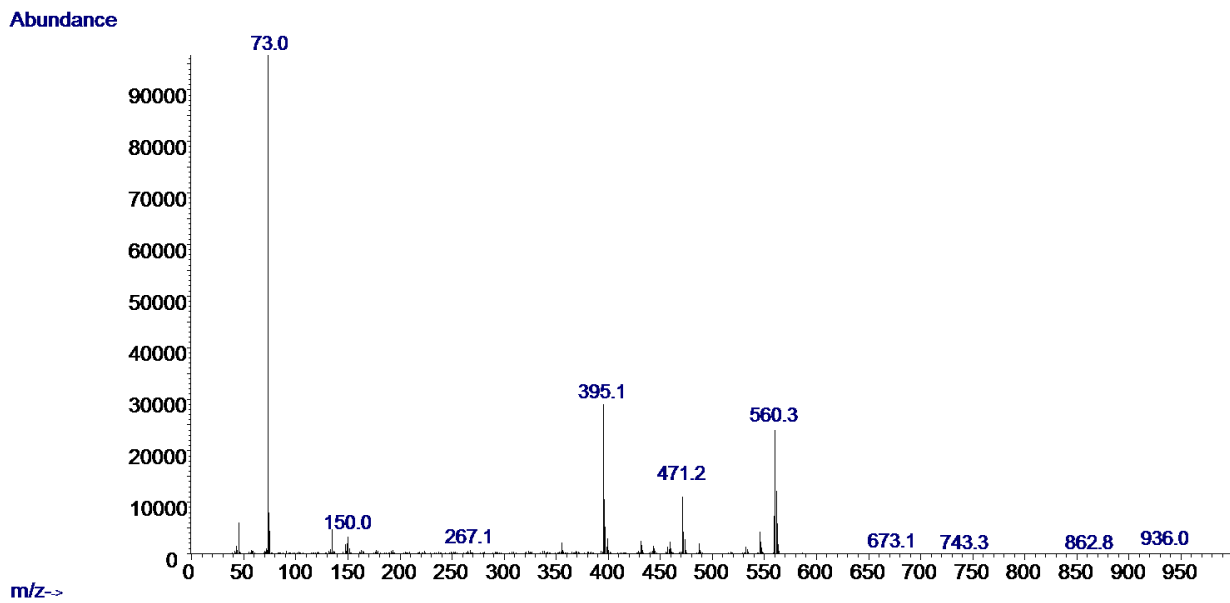
Ze získaných hmotnostních spekter byl vybrán ion 395 m/z  $[C_{18}H_{31}O_4Si_3]^+$ , který je společný pro všechny tři sledované aglykony. Jednotlivé aglykony lze rozlišit na základě molekulárních iontů. Molekulární ion 560 m/z (obr. 36) pro pelargonidin, molekulární ion 620 m/z (obr. 37) pro malvidin a molekulární ion 648 m/z (obr. 38) pro kyanidin.



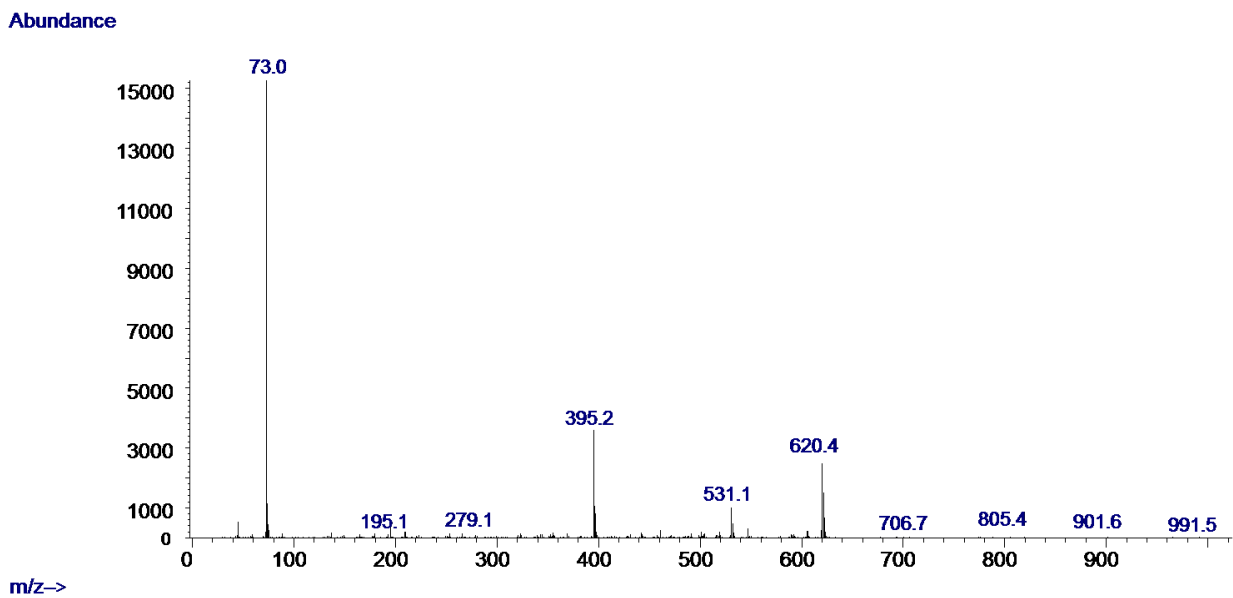
I přesto, že se předpokládá, že GC není vhodná pro detekci anthokyanů, tato studie prokázala, že při dodržení postupu – hydrolýza, přečištění pomocí SPE, silanizace – je stanovení barviv pomocí této metody možné. Ve všech sledovaných vzorcích byl detekován nejvýše hydroxylovaný (resp. methoxylovaný) malvidin. Nejmenší molekula pelargonidinu byla detekována v květech pelargonie a ve slupkách červených fazolí. Kyanidin byl nalezen jako převládající aglykon ve vzorcích vín, s výjimkou kabernetu, kde byl převládající složkou malvidin.



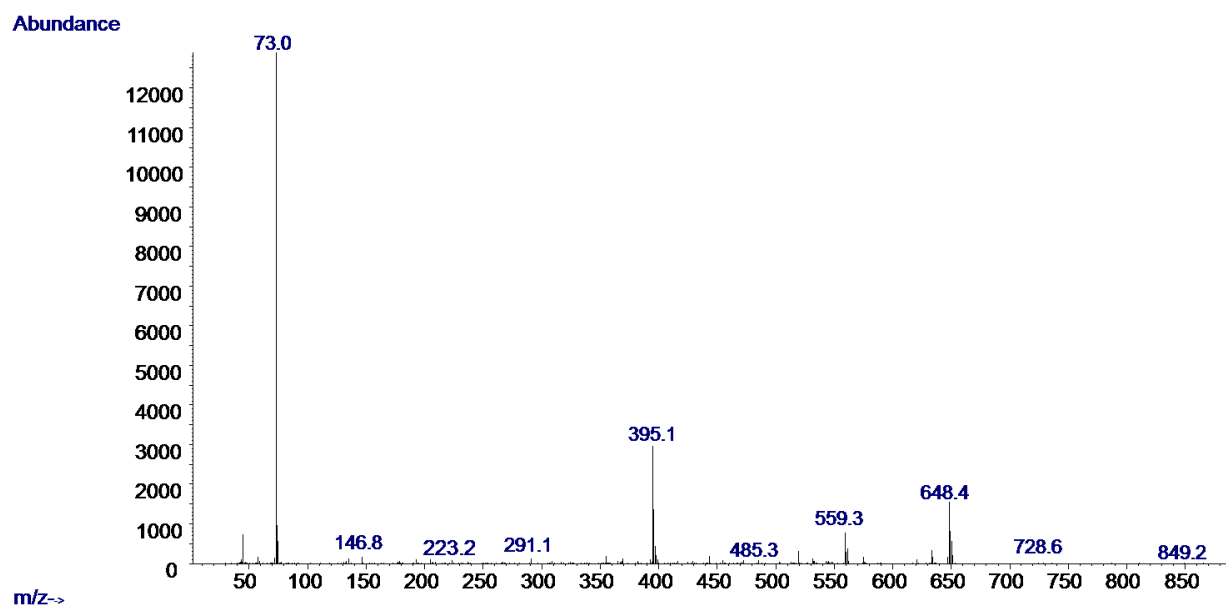
Obr. 35: Analýza trimethylsilylderivátů aglykonů anthokyaninových barviv (rekonstruované iontové chromatogramy pro ion 395 m/z)



Obr. 36: Hmotností spektrum pelargonidinu



Obr. 37: Hmotnostní spektrum malvidinu



Obr. 38: Hmotnostní spektrum kyanidinu

## 5 ZÁVĚR

Tato studie si kladla za cíl otestovat vybrané skupiny barviv užívaných v potravinách metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Plynová chromatografie se považuje za metodu nevhodnou pro stanovení barviv, proto bývá první volbou metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie či kapilární elektroforéza. Jelikož tvoří barviva pestrou skupinu látek s různými chemickými strukturami, vybrala jsem takové skupiny, které sejevily jako vhodné po jednoduché úpravě vzorku.

Teoretická část práce shrnuje základní poznatky o vybraných skupinách zkoumaných barviv, jejich využití v potravinářském průmyslu a jejich stanovení pomocí různých metod.

Praktická část se zaměřuje především na extrakci, purifikaci a identifikaci barviv (bixin, kurkumin, dimethylová a alizarinová žluť, kvercetin a aglykony anthoyanů – malvidin, kyanidin, pelargonidin) pomocí metody GC/MS.

Bylo zjištěno, že kvantitativní stanovení methylbixinu v semenech annato je problematické díky vzniku velkého množství geometrických izomerů. Za daných podmínek je metoda využitelná spíše pro kvalitativní analýzu.

Vybraná azobarviva (dimethylová a alizarinová žluť) bylo možné detekovat po jednoduché úpravě vzorku, pouze sulfonované azobarvivo se za daných podmínek nepodařilo převést na derivát vhodný pro GC.

Stanovení kurkuminu bylo založeno na detekci feruloymethanu, což bylo využito k odlišení dvou vzorků rýže obarvených vysoce ceněným šafránem a kurkumou jako náhražkovým barvivem.

Kvercetin byl stanovován ve slupkách červené a žluté cibule. Pro kvantifikaci cílové látky byla použita metoda vnitřního standardu (fisetin). Z naměřených dat vyplývá, že nejvíce kvercetin obsahují suché vnější slupky žluté cibule odebrané z vrchní části cibule.

Ač se to nepředpokládalo, pomocí GC/MS byly detekovány i aglykony anthokyaninů (malvidin, kyanidin a pelargonidin) v červených vínech, slupkách fazolí a v květech pelargonie.

## 6 SEZNAM ZKRATEK

ADI	příjatelná denní dávka
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EFSA	evropský úřad pro bezpečnost potravin
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina
MECK	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PC	papírová chromatografie
SPE	extrakce na pevné fázi
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TMS	trimethylsilylová skupina

## 7 LITERATURA

1. Zollinger H.: Color Chemistry: synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. Weinheim (1987).
2. Velíšek J.: Chemie potravin 3.1.vyd. Tábor: OSSIS, 368 (1999).
3. Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašák P.: Přírodní barevné látky. Chem. Listy 99, 802 – 816 (2005).
4. Šlampová A., Smělá D., Vondráčková A., Jančářová I., Kubáň V.: Stanovení syntetických barviv v potravinách separačními metodami. Chem. Listy 95, 163 – 168 (2001).
5. <http://www.efsa.europa.eu> - staženo 10.4.2014
6. Kučerová J., Kotolová H.: Toxicita barviv používaných v léčivých přípravcích. Praktické lékárenství. 9, 2 (2013).
7. SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 94/36/ES ze dne 30. června 1994 o barvivech pro použití v potravinách
8. Krinsky N.I., Mayne S.T., Sies H.: Carotenoids in Health and Disease. New York (2004).
9. Šivel M., Klejdus B., Kráčmar S., Kubáň V.: Lutein – významný karotenoid ve výživě člověka. Chem. Listy 107, 456-463 (2013).
10. Rao A.V., Agarwal S.: Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. J Am Coll Nutr. 19(5), 563-569 (2000).
11. Roldán-Gutiérrez M. J., Luque de Castro D. M.: Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. Trend in Analytical Chemistry. 20(2), 163-170 (2007).
12. <http://web.vscht.cz/~kocourev/files/Uvod-PL-skript.pdf> - staženo 13.4.2014
13. <http://www.chempoint.cz/aditiva-v-potravinach-a-jejich-e-kody> - staženo 13.4.2014
14. Emerton V., Choi E.: Essential guide to food additives. Leatherhead Food International Ltd, (2008).
15. MacDougall B.D.: Colour in food: Improving quality. Woodhead Publishing Limited, (2002).



16. Mercadante Z.A., Steck A., Pfander H.: Isolation and identification of new apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1050-1054, (1997).
17. Escribano J., Alonso G. L., Coca-Prados M., Fernandez J. A.: Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters.* 100(1-2), 23 – 30, (1996).
18. <http://www.anamneza.cz/Safran-Nejdrzsi-koreni-na-svete/clanek/9> - staženo 15.4.2014
19. <http://examine.com/supplements/Curcumin/> - staženo 16.4.2014
20. Stankovic I.: Curcumin: Chemical and technical assessment. FAO, (2004).
21. Kurka O., Myjavcová R., Bednář P.: Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností. *Chem. Listy* 105, 39-39 (2011).
22. Drábek J., Jalůvková M., Frébort I.: Kvantitativní PCR detekce nepovoleného přibarvení vína bezinkami (*Sambucus nigra*). *Chem. Listy* 101, 550-555 (2007).
23. S.J. Bloor: Deep blue anthocyanins from blue *Dianella* berries, *Phytochemistry* 58, 923-927 (2001).
24. Balík J.: Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech. Mendlova univerzita v brně, (2010).
25. Clifford N. M.: Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 50(7), 1063-1072, (2000).
26. Boulton R.: The copigmentation of anthocyanins and its role in color of red wine. A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52(2), 67-87, (2001).
27. Somers T. C., Wescombe L. G.: Evolution of red wines – II. An assessment of the role of acetaldehyde. *Vitis* 26(1), 27-36, (1987).
28. Kurka O., Myjavcová R., Bednář P.: Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností. *Chem. Listy* 105, 37 – 39, (2001).
29. Blau K., Halket M. J.: *Handbook of Derivatives for Chromatography.* IM Publications LLP, (2009).
30. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1778.pdf> - staženo 3.1.2015
31. [http://www.khsova.cz/01\\_legislativa/files/84\\_2001.pdf](http://www.khsova.cz/01_legislativa/files/84_2001.pdf) - vyhláška MZ 84/2001 Sb.

32. [http://www.reachonline.eu/REACH/CS/REACH\\_CS/clanekXVII.html](http://www.reachonline.eu/REACH/CS/REACH_CS/clanekXVII.html) - staženo 3.1.2015
33. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. Prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách
34. <http://www.e-chembook.eu/cs/acidobazicke-indikatory> - staženo 3.1.2015
35. <http://canov.jergym.cz/indikato/priklady/acidobaz.html> - staženo 3.1.2015
36. Došek M., Třísková 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. *Chem. Listy* 107, 233 – 235, (2013).
37. Mellon F., Self R., Startin J. R.: *Mass spectrometry of natural substances in food*. The Royal Society of Chemistry, (2000).
38. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/derivatization-reagents/silylation.html> - staženo 4.1.2015
39. [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2003\\_07\\_04.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2003_07_04.pdf) - citace dopsat
40. Welch C. R., Wu Q., Simon J. E.: Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr Anal Chem.* 4(2), 75 – 101, (2008).
41. <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/419e.pdf> - staženo 10.4.2015
42. Scotter M.J.: *Colour additives for foods and beverages*. Woodhead Publishing, 260, (2015).
43. Sha O., Zhu X., Feng Y., Ma W.: Determination of Sunset Yellow and Tartrazine in food samples by combining ionic liquid-based aqueous two-phase system with high performance liquid chromatography. *J Anal Methods Chem.* (2014).
44. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids*. Springer Basel AG, (2004).
45. <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/2067.pdf> - staženo 18.4.2015
46. Materska M.: Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 58(4), 407 – 413, (2008).
47. Scotter M.J., Wilson L.A., Appleton G.P., Castle L.: Analysis of annatto (Bixa orellana) food coloring formulations. 2. Determination of aromatic hydrocarbon thermal degradation products by gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 48(2), 484 – 488, (2000).

48. Magiera S., Uhlschmied C., Rainer M., Huck Ch. W., Baranowska I., Bonn G. K.: GC-MS method for the simultaneous determination of  $\beta$ -blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56, 93 – 102, (2011).
49. Stankovic I.: Curcumin – chemical and technical assessment. FAO, (2004).
50. Choung M. G., Choi B. R., An Y. N., Chu Y. H., Cho Y. S.: Anthocyanin profile of Korean cultivated Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7040 – 7043, (2003).
51. Gould K., Davies K., Winefield Ch.: Anthocyanins – biosynthesis, functions and applications. Springer Science, (2009).
52. Qin Ch., Li Y., Niu W., Ding Y., Shang X.: Analysis and characterisation of anthocyanins in Mulberry Fruits. Vol. 28, 117 – 126, (2010).
53. Hong J. Y., Park N. H., Yoo K. H., Hong J.: Comprehensive impurity profiling and quantification of Sudan III dyes by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatogram A*, 1297, 186 – 195, (2013).
54. Pérez-Urquiza M., Beltrán J. L.: Determination of the dissociation constants of sulfonated azo dyes by capillary zone electrophoresis and spectrophotometry methods. *Journal of Chromatography A*, 917(1-2), 331 – 336, (2001).