

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Možnosti stanovení azorubinu v potravinách
a nápojích**

(rešeršní práce)

KAROLÍNA ŠTĚRBOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Dalibor Šatínský Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce doc.RNDr. Daliboru Šatínskému Ph.D. za jeho vstřícné jednání, věcné připomínky a cenné rady při psaní této bakalářské práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Dne

Podpis

OBSAH

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. POUŽITÉ ZKRATKY | 6 |
| 2. ÚVOD | 8 |
| 3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE | 9 |
| 4. TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 4.1 Potravinářská aditiva | 10 |
| 4.1.1 Potravinářská barviva..... | 11 |
| 4.1.1.1 Azobarviva | 13 |
| 4.1.2 Bezpečnost a kontrola přídatných látek v potravinách | 13 |
| 4.1.2.1 Značení | 13 |
| 4.1.2.2 Podmínky pro zařazení a používání potravinářských aditiv | 14 |
| 4.1.2.3 Kontrola potravinářských aditiv..... | 17 |
| 4.2 Azorubin | 18 |
| 4.2.1 Povolení k užívání | 18 |
| 4.2.2 Struktura a vlastnosti | 18 |
| 4.2.3 Výskyt a použití..... | 19 |
| 4.2.4 Maximální přípustné hodnoty | 19 |
| 4.2.5 Absorbce, distribuce, metabolismus a exkrece..... | 19 |
| 4.2.6 Toxicita | 20 |
| 5. ANALYTICKÁ ČÁST | 25 |
| 5.1 Stručný popis jednotlivých metod | 26 |
| 5.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny | 26 |
| 5.1.2 Extrakce na tuhou fázi..... | 26 |
| 5.1.3 Cloud point extrakce | 26 |
| 5.1.4 Chromatografie na tenké vrstvě..... | 27 |
| 5.1.5 Hmotnostní spektroskopie | 27 |
| 5.1.6 Diferenční pulzní polarografie | 28 |
| 5.1.7 Kapilární zónová elektroforéza..... | 29 |
| 5.1.8 Micelární elektrokinetická chromatografie..... | 29 |
| 5.1.9 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie..... | 29 |
| 5.2 Možnosti stanovení azorubinu | 31 |
| 5.2.1 Kvantitativní stanovení tartrazinu, azorubinu a žluti SY pomocí digitálního zpracování obrazů získaných chromatografií na tenké vrstvě..... | 31 |
| 5.2.2 Kvantifikace syntetických barviv v nápojích a kosmetice pomocí SPE a TLC | 31 |
| 5.2.3 Metoda pro rychlý důkaz syntetických barviv v nápojích | 32 |
| 5.2.4 Stanovení syntetických barviv v potravinách a nápojích pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie | 32 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.5 Stanovení potravinářských barviv v nealkoholických nápojích pomocí HPLC a UV/VIS detektoru..... | 33 |
| 5.2.6 Stanovení jedenácti potravinářských barviv z nápojů a potravin pomocí HPLC a detektorem diodového pole | 33 |
| 5.2.7 Stanovení osmnácti syntetických barviv rozpustných ve vodě pomocí LC-ESI-MS/MS | 33 |
| 5.2.8 Stanovení syntetických potravinářských barviv vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází spojenou s detektorem diodového pole | 34 |
| 5.2.9 Stanovení syntetických potravinářských barviv v rybích produktech metodou RP-HPLC | 34 |
| 5.2.10 Stanovení azorubinu, allura červeně a košenilové červeně ve sladkostech a nealkoholických nápojích pomocí diferenční pulzní polarografie | 35 |
| 5.2.11 Analýza umělých sladidel, konzervačních látek a barviv v nealkoholických nápojích pomocí kapilární elektroforézy | 35 |
| 5.2.12 Stanovení syntetických barviv ve zmrzlíně pomocí kapilární elektroforézy | 36 |
| 5.2.13 Stanovení červených potravinových barviv pomocí kapilární elektroforézy s detekcí laserem indukované fluorescence | 36 |
| 5.2.14 Stanovení syntetických barev ve sladkostech pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie | 36 |
| 5.2.15 Separace syntetických potravinářských barviv pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie | 37 |
| 5.2.16 Stanovení syntetických, ve vodě rozpustných barviv pomocí sekvenční injekční chromatografie..... | 37 |
| 5.2.17 Rychlá separace červených barviv pomocí sekvenční injekční chromatografie..... | 38 |
| 5.2.18 Stanovení potravinářských barviv v komerčních produktech digitální analýzou obrazu | 38 |
| 5.2.19 Oddělení a stanovení dvou syntetických barviv pomocí cloud point extrakce a spektrofotometrie | 38 |
| 6. ZÁVĚR | 44 |
| 7. SEZNAM TABULEK..... | 45 |
| 8. SEZNAM OBRÁZKŮ | 45 |
| 9. POUŽITÁ LITERATURA..... | 46 |

1. POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADI | přijatelná denní dávka (Acceptable Daily Intake) |
| CCFAC | Codex Committee on Food Additives and Contaminants |
| CPE | cloud point extrakce |
| ČR | Česká republika |
| DAD | detektor diodového pole (Diod Array detektor) |
| EFSA | Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority) |
| ESI | ionizace elektrosprejem |
| EU | Evropská unie |
| FAO | Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization of the United Nations) |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography) |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát |
| I.Č. | identifikační číslo (Colour index) |
| IPC | iontově-párová chromatografie (ion pair chromatography) |
| IR | infračervená spektrometrie |
| JECFA | Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives |
| LC | kapalinová chromatografie (liquid chromatography) |
| LD ₅₀ | letální dávka určující míru akutní toxicity |
| LIF | laserově indukovaná fluorescence |
| LOD | limit detekce (Limit of detection) |
| LOQ | limit kvantifikace (Limit of quantification) |
| MEKC | micelární elektrokinetická chromatografie |
| MS | hmotností spektroskopie (mass spectrometry) |
| NMR | nukleární magnetická resonance |
| NOAEL | No Observed Adverse Effect Level |
| OSN | Organizace spojených národů |
| RGB | hodnota intenzity červeného, zeleného a modrého kanálu |

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------|
| RP-HPLC | vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzní fází |
| SCF | Scientific Committee on Food |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SIC | sekvenční injekční chromatografie |
| SPE | extrakce na pevnou fázi (solid phase extraction) |
| SY | oranžová žluť (Sunset Yellow) |
| TLC | tenkovrstvá kapalinová chromatografie (thin layer chromatography) |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) |

2. ÚVOD

Azorubin je synteticky připravovaná látka, která se přidává do potravin především kvůli zvýšení atraktivity potravinového výrobku pomocí barvy. Přestože prošla řadou farmakokinetických a farmakodynamických studií, není zcela jasné, zda má výrazný vliv na lidské zdraví. Diskutuje se především o způsobování potravinové alergie či hyperaktivity u dětí. Jeho hodnota přijatelné denní dávky (ADI) je pouze orientační a nemusí se shodovat s reálným příjmem, což vystavuje člověka, a především děti většímu riziku nežádoucích účinků. Z důvodu nejasností ohledně působení potravinářských barviv na lidský organismus při vyšších koncentracích či při dlouhodobém užívání je vývoj přesnějších a citlivějších analytických metod pro jeho stanovení důležitý. Metody pro identifikaci a kvantifikaci potravinářských barviv se využívají především ke kontrole jejich množství stanovené zákonem v komerčně dostupných potravinách a nápojích.

Většina informací v této práci byla čerpána z internetových databází WebOfScience.com a ScienceDirect.com. Uvedené instrumentální a analytické metody byly sepsány z článků publikovaných v odborných časopisech mezi lety 2000 až 2018.

3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Zadáním a zároveň cílem této rešeršní práce bylo nalézt a uspořádat informace týkající se potravinářského barviva azorubin a dále sepsat metody a možnosti, jimiž lze toto barvivo stanovit.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Potravinářská aditiva

Potravinářské přídatné látky, neboli potravinářská aditiva, jsou definovány jako látky nebo jejich směsi, které se do potravin záměrně přidávají při výrobě, zpracování, skladování nebo balení za účelem zvýšení jejich kvality. Mají schopnost prodlužovat trvanlivost potravin, zvýrazňují nebo obnovují jejich barvu, zvyšují nebo regulují kyselost, mají zahušťovací vlastnosti, případně dodávají potravinám sladkou chuť a vůni [1,2].

Tyto látky se dle technologické funkce dělí na sladila, barviva, konzervanty, antioxidanty, nosiče, kyseliny, regulátory kyselosti, protispékavé látky, odpěňovače, plnidla, emulgátory, tavící soli, zpevňující látky, látky zvýrazňující chuť a vůni, pěnotvorné látky, želírující látky, lešticí látky, zvlhčující látky, modifikované škroby, balicí plyny, propelenty, kypřící látky, sekvestrany, stabilizátory, zahušťovadla a látky zlepšující mouku [3].

Potravinářská aditiva se dále rozlišují dle jejich původu. Aditiva přírodního původu jsou získávána ze semen, ovoce, zeleniny či mořských řas. K syntetickým aditivům se řadí antioxidanty, barviva, sladidla a okyselovadla. Mohou být identická s přírodními aditivami či vyráběná pomocí mikroorganismů. Poslední skupinou jsou aditiva získaná modifikací přírodních látek. Jsou to například emulgátory získané z jedlých olejů nebo zahušťovadla získaná modifikací škrobu nebo celulózy [2].

Hlavní nevýhodou přídatných látek je možnost u citlivých jedinců vyvolat reakce přecitlivělosti organismu nebo i alergické reakce. Některá relativně neškodná aditiva, např. dusitany, mohou být v těle za určitých podmínek přeměňována na toxičtější nitrosloucheniny. Proto je výrobce povinen uvádět obsah potenciálních alergenů na etiketě [1].

Mezi potravinářská aditiva se neřadí látky, které jsou samy potravinami, dále látky, které jsou přirozenými složkami potravin a veškeré pomocné látky, jako například minerály, vitamíny či jedlá sůl [2].

4.1.1 Potravinářská barviva

Potravinářská barviva jsou významnou skupinou sensoricky aktivních látek, které se přidávají do potravin především ke zvýšení atraktivity potravinového výrobku pomocí barev. Mohou nahradit barevné ztráty potravin po vystavení světlu, vzduchu, vlhkosti či změnám teploty, zvýrazňují přirozeně se vyskytující barvy nebo se přidávají do potravin, které jsou jinak bezbarvé [4].

Potravinářská barviva se dle jejich původu dělí na přírodní barviva, syntetická barviva identická s přírodními a syntetická barviva. Přírodní barviva jsou přirozenou součástí potravin živočišného nebo rostlinného původu, dále se vyskytují jako pigmenty řas, hub, lišejníků či mikroorganismů, ze kterých se získávají v původní nebo modifikované formě k barvení potravin. Řadíme sem například anthokyany, karoteny, chlorofyly a chlorofyliny, betalainy, riboflavin a karamel. Syntetická barviva identická s přírodními látkami se získávají chemickými reakcemi, ovšem jejich struktura je na rozdíl od barviv syntetických totožná se strukturou barviv přírodních. Příkladem je syntetický β -karoten. Syntetická barviva se dnes vyrábějí z vysoce přečištěných ropných produktů. Mají obecně intenzivnější barvu než barviva přírodní, stálý odstín barvy a nevňášejí do barvené potraviny charakteristické vůně a chuti. Také jsou levnější a stabilnější, proto našla široké uplatnění v potravinářské praxi [2,5]

Syntetická barviva se dále dle struktury dělí na azobarviva, fenylmethanová barviva, pyrazolonová barviva, nitrobarviva, xanthenová barviva, anthrachinonová barviva, chinolinová a indigoidní barviva. Syntetická barviva mohou být rozpustná v tucích nebo ve vodě. Dle fyzikálně-chemických vlastností se dělí na kyselá, zásaditá a neutrální [5].

Veškerá barviva povolená v České republice jsou ve vodě rozpustná. Nejvíce zastoupena jsou kyselá barviva obsahující sulfonové, karboxylové a hydroxylové skupiny. Náleží k nim většina azobarviv, některá fenylmethanová barviva, nitrobarviva a xanthenová barviva [5].

Tabulka 1 Výňatek ze seznamu barviv povolených při výrobě potravin [6]

| Číslo E | Barvivo | číslo C.I. |
|---------|--------------------|------------|
| E100 | Kurkumin | 75300 |
| E102 | Tatrazin | 19140 |
| E104 | Chinolinová žluť | 47005 |
| E110 | Žluť SY | 15985 |
| E120 | kyselina karmínová | 75470 |
| E122 | Azorubin | 14720 |
| E123 | Amarant | 16185 |
| E127 | Erythrosin | 45430 |
| E129 | Červeň Allura AC | 16035 |
| E131 | Patentní modř V | 42051 |
| E132 | Indigotin | 73015 |
| E133 | Brilantní modř | 42090 |
| E142 | Zeleň S | 44090 |
| E151 | Černá BN | 28440 |
| E155 | Hněd HT | 20285 |
| E163 | Anthokyany | |
| E170 | Uhlíčan vápenatý | 77220 |
| E171 | Oxid titaničitý | 77891 |
| E173 | Hliník | |
| E174 | Stříbro | |
| E175 | Zlato | |

Syntetická barviva musí obsahovat minimálně 85% čistého barviva, zbytek tvoří nečistoty ve formě anorganických solí, sloučenin kovů a organických látek [2].

V roce 2012 bylo dokončeno přehodnocení potravinářských barviv. Aby Evropská komise mohla používat aktuální hodnocení, požádala úřad EFSA o přehodnocení všech doplňkových látek schválených před 20. dubnem roku 2009. Jelikož potravinářské barvy byly mezi prvními povolenými přísadami, jejich přehodnocení bylo upřednostněno. Celkově EFSA přehodnotila 41 potravinových barev. S ohledem na nové poznatky EFSA snížila ADI pro několik potravinových barev. V důsledku toho v roce 2012 snížila Evropská komise maximální množství ADI u chinolinové žluti (E104), žluti SY (E110), a košenilové červeně A (E124) pro použití v potravinách. Dalším významným dopadem bylo stažení barvy červeň 2G z trhu v roce 2007 [7].

4.1.1.1 Azobarviva

Azobarviva tvoří nejpočetnější skupinu organických barviv, tudíž se v přírodě běžně nevyskytují. Jsou charakterizována azoskupinou $-N=N-$ (obvykle E-forma, trans), která je většinou napojena na benzenový či naftalenový kruh nebo heterocyklus. Azobarviva mohou mít odstíny od žluté až po černou, to závisí na počtu azoskupin a druhu arylového zbytku. Podle počtu azoskupin se dělí na monoazobarviva, diazobarviva, trisazobarviva a polyazobarviva. Jsou vyráběna synteticky diazotací a následnou kopulací diazoniových solí [14].

4.1.2 Bezpečnost a kontrola přídatných látek v potravinách

4.1.2.1 Značení

Podle Zákona o potravinách a předpisů Evropské unie musí být u balených potravin uvedeno mimo jiné i její složení, tj. seznam všech složek včetně aditiv. Přítomnost těchto látek musí být uvedena v sestupném pořadí dle toho, v jakém množství jsou v potravině obsaženy. Aditiva musejí být uváděna buď celým názvem nebo číselným kódem, který se skládá z velkého tiskacího písmene E a trojmístného nebo čtyřmístného čísla. Takovéto označení je mezinárodní a značí, že aditivum prošlo hodnocením bezpečnosti. Kromě názvu nebo kódu musí být na obalu výrobku uveden i název příslušné kategorie, do které látka patří. Pokud by mohla mít látka nepříznivý vliv na zdraví člověka, musí být tato skutečnost uvedena na obale [1,2]. Jedná se o žluť SY, chinolinovou žluť SY, azorubin, červeň allura, tartrazin a košenilovou červeň. U těchto

barviv musí být uveden dodatek, který varuje, že tyto barviva mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí [9].

Tabulka 2 Seznam označení jednotlivých kategorií [2]

| | |
|-------|---------------------------------------------------|
| E 1xx | barviva |
| E 2xx | konzervanty |
| E 3xx | antioxidanty a kyseliny |
| E 4xx | emulgátory, stabilizátory a zahušťovadla |
| E 5xx | vonné a chuť zvýrazňující látky |
| E 6xx | náhradní sladidla, potravinářské plyny a leštidla |

4.1.2.2 Podmínky pro zařazení a používání potravinářských aditiv

Aditiva mohou být v České republice dle nařízení 1333/2008 používána při výrobě potravin tehdy, pokud na základě dostupných vědeckých důkazů nepředstavuje použití při navrhované míře žádné zdravotní riziko pro spotřebitele, existuje-li odůvodněná technologická potřeba, které nelze dosáhnout jinými hospodářsky a technologicky proveditelnými prostředky, použití potravinářské přídatné látky neuvádí spotřebitele v omyl nebo musí poskytovat výhody a přínos pro spotřebitele [9].

Zvláštní podmínky platí pro potravinářská barviva. Kromě toho, že musí splňovat minimálně jednu z podmínek uvedených výše, musí také sloužit buď k obnovení původního vzhledu potravin, jejichž barva byla dotčena zpracováním, skladováním, balením a distribucí, nebo ke zvýšení vizuální přitažlivosti potravin, či k obarvení jinak bezbarvých potravin [9].

Každá přídatná látka, která má být schválena pro použití do potravin, musí projít přísným hodnocením zdravotní nezávadnosti. V roce 1963 byla organizacemi WHO a FAO založena komise Codex Alimentarius, v jejímž rámci pracuje výbor Codex Committee on Food Additives and Contaminants, který se zabývá přídatnými látkami a kontaminanty a dohlíží na zdravotní nezávadnost potravinářských aditiv v zemích OSN.

Tento výbor se za účasti jednotlivých zemí schází na pravidelných zasedáních a vydává doporučení pro používání jednotlivých přídatných látek. Objektivita hodnocení je zajišťována nezávislou komisí Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives složenou z toxikologů a dalších expertů z celého světa, kteří hodnotí výsledky na různých odborných pracovištích. Codex Alimentarius a organizace WHO/FAO vypracovaly všeobecnou normu pro potravinářská aditiva, tzv. General Standards on Food Additives [8,10,11].

Přídatné látky uvažované pro povolení na území EU musí být nejprve přehodnoceny Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority), zřízeným dne 28. ledna 2002. Obsahem jejich kontroly je technická a chemická specifikace daného aditiva, popis výrobního procesu, analytické metody používané pro stanovení obsahu, chemická reaktivita s potravou, souhrnné informace o současné autorizaci k použití, rozsah povolených dávek, farmakokinetické informace a toxikologické údaje. Stanoviska EFSA vycházejí z doporučení CCFAC a v zásadě se od nich neodchylují. Po souhlasu a celkovém zhodnocení bezpečnosti látky vydává Evropská komise směrnice, které jsou pro členské státy závazné. Komunikací a přenosem informací mezi EFSA a Českou republikou je pověřen Úřad pro potraviny Ministerstva zemědělství ČR [1,8,11].

Povolení používání potravinářských aditiv podléhá celé řadě zdravotních zkoušek. Je třeba zjistit hladinu akutní toxicity, subchronické a chronické toxicity, kancerogenity, mutagenity, teratogenity, možnou kumulaci v organismu, bioenergetické účinky, vliv na imunitu, potenciální vliv na reprodukci aj. Tyto zkoušky se provádí nejprve na zvířatech. Toxicita látky se sleduje na šesti modelech, z toho musí být minimálně tři druhy savců. Většinou se využívají drobní hlodavci, jako je myš, potkan či králík, ale i speciálně vyšlechtěná prasata, která představují model velmi blízký lidskému organismu [11,12].

Nejprve se stanoví maximální přípustná hladina aditiva, která nemá měřitelný toxický efekt, tzv. NOAEL. Jedná se o množství aditiva, které nezpůsobí žádnou zdravotní újmu při dlouhodobém podávání pokusným zvířatům. Tato hodnota se přepočte na hodnotu relevantní pro člověka. V dalším kroku se hodnota NOAEL vydělí tzv. bezpečnostním faktorem, který má většinou hodnotu 100, v případě toxické látky se

závažnými účinky 1000. Vypočítaná hodnota se nazývá přijatelná denní dávka - ADI. Hodnota ADI udává množství potravinového aditiva, které může být denně zkonsumováno, aniž by představovalo riziko pro zdraví člověka. Udává se v miligramech na jeden kilogram tělesné hmotnosti [2,11]. U azorubinu je povolená dávka ADI 0 - 4mg/kg [13].

Vyhláška ministerstva zdravotnictví 304/2004 Sb. uvádí přesné hodnoty ADI a přesný seznam barviv pro kojeneckou výživu. Ve vyhlášce jsou vyjmenována barviva určená výhradně k určitým účelům, potraviny, které lze barvit jen určitým barvivem a potraviny, které se naopak vůbec barvit nesmějí [17].

Tabulka 3 Seznam potravin, které nesmějí obsahovat přidaná barviva [8]

| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Nezpracované potraviny |
| 2 | Mléko, kysané mléčné výrobky, neochucené podmásli, neochucená smetana, neochucené čerstvé sýry, máslo z mléka koz a ovcí |
| 3 | Oleje a tuky živočišného a rostlinného původu |
| 4 | Vaječný žloutek, bílek, vaječná melanž |
| 5 | Mouka, mlýnské výrobky, škrob, chléb, těstoviny |
| 6 | Cukry |
| 7 | Rajčatový protlak, rajčatové polokonzervy, studené omáčky na bázi rajčatové šťávy, kečup |
| 8 | Ovocné a zeleninové šťávy a nektary, produkty z ovoce, zeleniny, brambor |
| 9 | Výběrové džemy, rosoly, jednoduché marmelády, povidla, klevely, kaštanové pyré, med |
| 10 | Maso, ryby, drůbež, zvěřina, měkkýši, koryši a produkty z nich |
| 11 | Kakaové a čokoládové výrobky |
| 12 | Pražená káva, čaj, extrakty z čaje včetně ovocných a bylinných |
| 13 | Koření, směsi koření, sůl, náhrady soli |
| 14 | Víno, hroznový mošt, hroznová šťáva, ovocné a obilné pálenky |
| 15 | Kojenecká a dětská výživa |

| | |
|----|------------------------------|
| 16 | Vinný ocet |
| 17 | Slad a výrobky ze sladu |
| 18 | Minerální vody a stolní vody |

4.1.2.3 Kontrola potravinářských aditiv

Je nutné průběžně sledovat a zohledňovat nové vědecké informace při hodnocení podmínek používání přídatných látek. Z toho důvodu probíhá v každém členském státě EU monitoring spotřeby a používání těchto látek, který v ČR zajišťuje Národní referenční laboratoř při Státním zdravotním ústavu. Kontrolou nad dodržováním právních předpisů je pověřena Státní zemědělská a potravinářská inspekce a Státní veterinární správa České republiky [2,11].

4.2 Azorubin

Azorubin, jinými názvy též Carmoisine, Azorubin S, Food Red 3 nebo Acid Red 14, je synteticky vyráběné potravinářské barvivo červené až hnědé barvy, používané k dobarvování různých druhů potravin a nápojů. Patří do skupiny kyselých azobarviv, rozpustných ve vodě. Na potravinovém štítku ho najdeme pod označením E122 [15].

4.2.1 Povolení k užívání

V roce 1983 byl azorubin uznán komisí Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives jako povolená potravinářská přídatná látka v rámci EU a v roce 1984 toto stanovisko potvrdil vědecký výbor Scientific Committee on Food. Před vstupem do EU bylo toto barvivo v České republice zakázáno, v USA je jeho používání zakázáno dodnes [13].

4.2.2 Struktura a vlastnosti

Sumární vzorec: $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$

Systematický název: 4-hydroxy-3-[(E)-(4-sulfonato-1-naftyl)diazenyl]naftalen-1-sulfonát disodný

Molekulární hmotnost: 502,423 g/mol

Vzhled: červeno-hnědé krystaly

Bod tání: vyšší než 300 °C

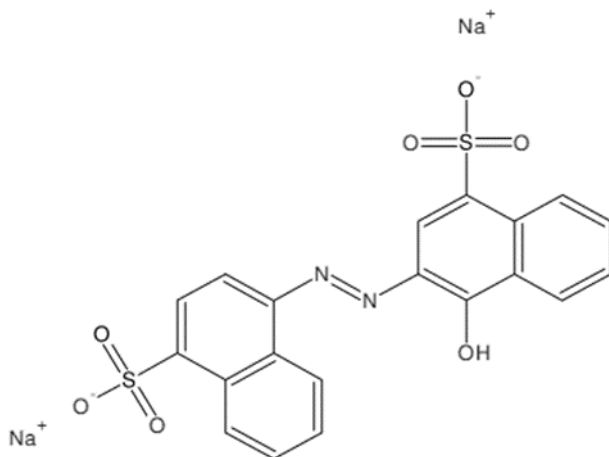
Rozpustnost:

- 50-100 mg/ml při 19 °C
- rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu, nerozpustný v rostlinných olejích

Absorpce: maximální při 516 nm

Čistota: minimálně 85% musí tvořit barevné látky [15]

Struktura:



Obrázek 1 vzorec azorubinu [13]

4.2.3 Výskyt a použití

Azorubin se používá především v potravinách s příchutí jahody či maliny. Pro svou schopnost dodat jídlu sytě červenou barvu se přidává do některých ovocných jogurtů, marmelád, marcipánu, cukrovinek, limonád, pudinků, želé, zmrzlin, doplňků stravy, sirupů aj. Zabarvuje potraviny do červena i v případě, že jsou vyrobeny bez ovoce [13,18].

4.2.4 Maximální přípustné hodnoty

Maximální hodnotu azorubinu v potravinách a nápojích definuje směrnice Evropského parlamentu a Rady 1994/36/ES. Maximální povolený obsah azorubinu v potravinách činí 50-500 mg/kg, v alkoholických nápojích je tato hodnota do 200 mg/l a v nealkoholických nápojích do 50 mg/l. Povolená ADI této látky je 0-4 mg/kg/den. ADI byla vypočítána organizací EFSA pomocí odhadů denního příjmu potravin a nápojů obsahujících azorubin jak u dospělého člověka, tak dětí do 5 let [13, 22].

4.2.5 Absorbce, distribuce, metabolismus a exkrece

Po perorálním podání se syntetická barviva vstřebávají do organismu buď ze žaludku nebo ze střev. Dále jsou částečně vylučována játry a ledvinami a zbytek se ukládá do organismu. S kumulací v organismu souvisí alergické a jiné reakce. Existuje jediná výjimka, kdy se barvivo nevstřebává do organismu, a to barvivo na inertním nosiči, jež

se bez jakékoli metabolizace vyloučí stolicí [17]. Azobarviva mohou být redukovány azoreduktázami v intestinálních bakteriích, jaterních buňkách a povrchové mikroflóře kůže. Tímto způsobem může dojít k uvolnění aromatických aminů. O možné karcinogenitě těchto aminů se vedou diskuze a provádějí několikeré testy [23].

Při výzkumu pomocí radiokarbonové metody datování s použitím ¹⁴C se ukázalo, že absorpce azorubinu je omezená. U myší, kterým byla podána jednorázová perorální dávka ¹⁴C-azorubinu, byl jeho výskyt pozorován po osmi hodinách distribuce v játrech, plicích, varlately, slezině a plazmě. Naopak u potkanů po podání ¹⁴C-azorubinu nebyla zjištěna žádná radioaktivita v plicích, varlately ani ve slezině, ovšem při tomto testu nebyla stanovena žádná časová specifikace. Kromě nemodifikovaného azorubinu bylo ve stolici nalezeno pět neidentifikovatelných metabolitů. V moči byla stanovena kyselina naftoová, kyselina 2-amino-1-nafto-4-sulfonová, 1,2-naftochinon-4-sulfonát a čtvrtý neidentifikovatelný metabolit. Většina radioaktivity byla vyloučena stolicí a močí během prvních 24 hodin a celková dávka pak během 72 hodin [13].

4.2.6 Toxicita

Přidatné látky v potravinách mohou vyvolávat jednak alergické reakce, ale daleko častěji potravinovou intoleranci, která není způsobena imunitní reakcí, ale nedostatkem nebo úplnou absencí enzymů, které jsou zodpovědné za zpracování potravin nebo její složky [48].

Velký problém tvoří markantní rozdíly mezi subjektivním pocitem intolerance či změnou chování a expozičními testy. V dánské studii mělo 6,6% školních dětí nebo jejich rodičů pocit, že dítě má potíže po požití přídatných látek v potravinách. Ovšem v expozičních testech reagovalo na směs potravinářských barviv a konzervačních látek pouze 2% dětí [49].

Akutní orální toxicita

Pomocí studie orální toxicity na myších a potkanech byla organizací JECFA stanovena hladina LD₅₀ pod 10 000mg/kg/den. Dále byly provedeny akutní testy toxicity při intraperitoneálním a intravenózním podání, avšak tyto studie nejsou relevantní pro toxikologické hodnocení potravinářských přídatných látek [13].

Krátkodobá a subchronická toxicita

Při testu Goldblatta a Frodshama z roku 1952 byl podán 0,1% roztok azorubinu po dobu 28 dní, což odpovídá denní spotřebě přibližně 15 mg. Nebyly zaznamenány žádné toxické účinky.

Test Gaunta a kol. z roku 1967 probíhal na skupině krys, rozdělených dle pohlaví. Krysy byly vystaveny účinkům azorubinu po dobu 90 dní v množství 0, 25, 50, 250 nebo 500 mg/kg/den. Nebyly zaznamenány žádné škodlivé účinky v rámci tělesné hmotnosti, spotřeby stravy, hematologie či parametrů funkce ledvin a jater. Pouze u samic vystavených dávce azorubinu 500 mg/kg/den byla zjištěna zvýšená hmotnost ledvin. Na základě těchto výsledků uvádějí autoři testu bezpečnou hladinu azorubinu 250 mg/kg/den. Vzhledem k tomu, že zvýšená hmotnost ledvin byla bez patologického nálezu a nebyly nalezeny žádné spontánní nádory vyvolané sloučeninou, nebyla tato hladina azorubinu zohledněna JECFA ani SCF.

Ve studii Holmese a spol. z roku 1978 byly potkani krmeni dávkami 0, 1000, 2000, 3000 nebo 4000 mg/kg/den po dobu 9 týdnů. U dvou nejvyšších dávek bylo zaznamenáno snížení přírůstku tělesné hmotnosti, na základě kterých autoři uvedli jako bezpečnou hladinu azorubinu 2000 mg/kg/den. Dále v tomto testu nebyly pozorovány žádné toxické účinky.

Skupiny miniaturních prasat ve studiích Gaunta a spol. z roku 1969 dostávaly azorubin v dávkách 0, 250, 500 a 1000 mg/kg/den smíchané se stravou po dobu 90 dnů. Nebyla zaznamenána žádná nežádoucí toxikologie nebo patologie. Autoři tudíž stanovily hladinu bez nežádoucích účinků na 1000 mg/kg/den [13].

Genotoxicita

Ve studii vědců Haveland-Smitha a Combese z roku 1980 byla vystavena *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* účinku 5 mg/ml azorubinu. V tomto testu nebyl nalezen žádný důkaz mutagenního potenciálu.

Další studie Sankaranarayanan a Murthyho z roku 1979 prokázaly, že azorubin nezpůsobil konverzi mitotického genu u *Sacharomyces cerevisiae* při koncentraci 5 mg/ml. Nebylo pozorováno ani významné zabíjení buněk či inhibice buněčného dělení.

V novějším výzkumu z roku 2003 odborníci Zaharia a Pavel testovali čtyři druhy potravinářských barviv. Autoři prokázali významné změny v morfologii somatických

chromozomů u *Secale cereale* za přítomnosti azorubinu. Tento test ovšem nebyl uznán jako standardní test toxicity, tudíž k němu není přihlíženo.

V roce 1992 hodnotili Jung a kol. genotoxicitu sulfonovaných aromatických aminů vzniklých metabolizováním azorubinu. Na základě několika testů in vitro a in vivo dospěli k závěru, že sulfonované aromatické aminy, na rozdíl od jejich nenasycených analogů, nemají žádný nebo velmi nízký genotoxický potenciál. Dále autoři dospěli k závěru, že vystavením se látkám metabolického štěpení azorubinu člověk neriskuje žádné významné genotoxické riziko [13].

Chronická toxicita a kancerogenita

Při studii Masona a kol. z roku 1974 byl myším podáván azorubin v hladinách 0, 14, 71, 375 nebo 1786 mg/kg/den po dobu 80 týdnů. Po této době se ukázalo, že hladina 1786 mg/kg/den indukovala významné snížení hladiny hemoglobinu u samic a sníženou objemovou kapacitu buněk u samců. Na základě těchto výsledků byla stanovena hodnota NOAEL 375 mg/kg/den. Je pravděpodobné, že SCF a JECFA použily tuto studii pro výpočet současného ADI azorubinu.

Další studie neprokázaly chronickou toxicitu ani karcinogenitu nebo dle EFSA nebyly toxikologicky relevantní [13].

Reprodukční a vývojová toxicita

Ve studii provedené Holmesem a kol. v roce 1978 byli potkani krmeni po dobu 9 týdnů azorubinem v hladinách 0, 1320, 2760, 4500 nebo 6920 mg/kg/den. Při nejvyšších dvou hodnotách byl zaznamenán významný vliv na tělesnou hmotnost u obou pohlaví, což vedlo ke stanovení nejvyšší hladiny bez účinků 2760 mg/kg/den.

Další výzkum Holmese a kol. rozšířil předešlou studii na generaci F2, při kterém pokračovali v krmení potkanů v dávkách 0, 160, 370 nebo 970 mg/kg/den do 1 roku věku. Bylo pozorováno zvýšení relativní hmotnosti štítné žlázy u obou pohlaví při hladině 970 mg/kg/den. Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen žádný mikroskopický důkaz dysfunkce štítné žlázy, byl tento účinek považován za toxikologicky nevýznamný. Ačkoliv byly škodlivé účinky zaznamenány na úrovni 970 mg/kg/den, byla stanovena bezpečná hladina azorubinu na 400 mg/kg/den.

Při studii Forda a spol. z roku 1987 byla generace potkanů F0 krmena dávkou 0, 100, 400 nebo 1200 mg/kg/den azorubinu po celou dobu březosti a laktace. Z generace F1 byla náhodně vybrána skupina potkanů, u kterých se pokračovalo s podáváním azorubinu po dobu 110 až 115 týdnů. Výsledky studie prokázaly změnu tělesné hmotnosti a hmotnosti cév a sníženou koncentraci glukózy v séru. Histopatologické vyšetření ukázalo, že vysoká dávka azorubinu vyvolala u samců hyperplazii močového měchýře a u samic zvýšený výskyt cyst a hyperplazii intimy krevních cév pankreatu. Ačkoliv jsou pozorované účinky nepochybně účinkem azorubinu, absence paralelních nálezů u opačných pohlaví snižuje sílu této souvislosti. Vzhledem k výsledkům této studie byla stanovena bezpečná hladina azorubinu 400 mg/kg/den. Tento výzkum byl též použit SCF a JECFA ke stanovení současné ADI [13].

Hypersenzitivita

Nedávné studie z roku 2003 poukazují na to, že citlivost na potravinářské přídatné látky není vzácná u pacientů trpících chronickou kopřivkou, atopickým ekzémem či astmatem, kdy právě přídatná látka v potravine navodí akutní vzplanutí této nemoci. Předchozí studie žádné hypersenzitivní účinky neprokázaly [13,49].

Hyperaktivita u dětí

V posledních několika letech se významně řeší otázka, zda mohou potravinářská barviva souviset se zvýšenou hyperaktivitou u dětí, případně přispívat k rozvoji hyperkinetické poruchy (ADHD). Jedná se o neuro-vývojovou poruchu charakterizovanou poruchou pozornosti, impulzivitou a hyperaktivitou [51].

Ve studiích Rowa z roku 1988 proběhlo testování osmi dětí, kterým bylo 18 týdnů podáváno 50 mg azorubinu nebo placebo. Ve skupině, kde byl podáván azorubin byla zaznamenána extrémní podrážděnost, nepokoj a poruchy spánku.

Testy Cartera a spol. z roku 1993 poukazují na zhoršené chování a horší výsledky v psychologických testech při podávání směsi potravinářských barviv dětem.

Asi nejvýznamnější je studie McCanna z roku 2007. Studie zahrnovala testy na 153 tříletých dětech a 144 dětech ve věku od 8 do 9 let. Byla jim podávána směs A, která obsahovala košenilovou červeň, tartrazin, žluť SY a azorubin v kombinaci s benzoátem sodným. Tato směs vyvolala výrazně zvýšené známky hyperaktivity a poruchy chování u

tříletých dětí. Směs B obsahovala barviva azorubin, žluť SY, chinolonovou žluť a červeň allura opět v kombinaci s benzoátem sodným. Tato směs zvýšila hyperaktivitu jak u tříletých dětí, tak i poruchy chování a pozornosti u dětí ve věku 8 až 9 let. Klinická významnost tohoto testu zůstává ale stále nejasná, proto se k němu nepřihlíží při posuzování bezpečnosti těchto barviv [13].

Některé další studie poukazují na to, že by omezení příjmu potravinářských barviv mohlo vést ke zlepšení syndromů poruchy ADHD, kdy přibližně 8% dětí reagovalo na léčbu dietou bez těchto přísad.

Dle EFSA jsou však studie nedostatečné především kvůli chybějícímu vztahu mezi dávkou a účinkem, absencí biologického mechanismu účinku na změny chování či sledování směsí, nikoliv jednotlivých barviv. Většina výzkumů vychází pouze z pozorování rodičů či učitelů ve škole, což není relevantní ukazatel pro klinické hodnocení. Největším problémem je skutečná konzumovaná dávka, která může být u některých dětí velice variabilní a i několikanásobně vyšší než je bezpečná denní dávka (ADI)[52,53].

5. ANALYTICKÁ ČÁST

Povolené množství syntetických barviv v potravinách je přísně kontrolováno a regulováno z důvodů jejich potenciálního rizika pro lidské zdraví. Je třeba eliminovat nadměrný obsah barviv či jejich nehlášenou přítomnost v potravinách. Proto je zapotřebí vyvíjet stále přesnější a spolehlivější metody způsobu detekce barviv v potravinách a nápojích.

Metody založené na měření absorbance jsou problematické z hlediska překrývání absorpčních spekter u směsí různých barviv. Tyto barviva je třeba nejprve separovat. Metody zahrnující techniky jako je tenkovrstvá chromatografie (TLC), tenkovrstvá chromatografie s digitálním zpracováním obrazu, spektrofotometrie na pevné fázi nebo rozpouštěcí voltametrie vyžadují časově náročnou úpravu vzorku. Další metody používající elektrokinetickou chromatografii nebo kapilární elektroforézu jsou vhodné pro analýzu iontových a hydrofilních sloučenin, ovšem vykazují malou citlivost při velmi malém objemu vzorku. Někteří autoři článků použili k detekci barviv diferenční pulsní polarografii či izotachoforézu, nicméně nejpoužívanější metoda je stále vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), iontově-párová chromatografie (IPC) a iontově výměnná chromatografie, jelikož vykazují vysokou citlivost a dostatečnou separační účinnost pro rozlišení potravinových barviv [21]. Přehled jednotlivých metod stanovení uvedený níže je doplněn dvěma souhrnnými tabulkami.

5.1 Stručný popis jednotlivých metod

5.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny, neboli liquid-liquid extrakce, je převedení stanovovaného analytu z jednoho rozpouštědla do druhého, které se s původním mísí jen omezeně. Tuto soustavu dvou fází většinou představuje voda, jakožto polární rozpouštědlo, a organické méně polární rozpouštědlo. Řídí se dle Nernstova rozdělovacího zákona, který říká, že analyt se rozděluje mezi dvě prakticky nemísitelná rozpouštědla, je při určité teplotě konstantní a nezávisí na absolutní hodnotě koncentrací. Toto tvrzení však platí pouze v případě, že nedochází ke změnám iontové síly vodného roztoku nebo disociaci analytu v organické fázi. Látka tak přechází z jedné fáze do druhé až do okamžiku ustanovení rovnováhy. Poměr koncentrace látky v obou fázích se určuje pomocí rozdělovací konstanty. Tento způsob extrakce je velmi rychlý, jednoduchý, účinný a snadno odděluje stanovovaný analyt od ostatních rušivých složek [42,43].

5.1.2 Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi, neboli solid phase extrakce, funguje na principu zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu a jeho následném vymytí. Kapalná matrice obsahující analyt protéká přes tuhý sorbent. Analyt ulpívá v důsledku mezimolekulárních interakcí na sorbentu, kdyžto matrice volně protéká. Poté se analyt z kolony vymyje rozpouštědlem o vyšší eluční síle. Oproti extrakce z kapaliny do kapaliny je tato metoda více selektivní, úspornější vzhledem k použitým rozpouštědlům a umožňuje snadnou automatizaci [50].

5.1.3 Cloud point extrakce

Povrchově aktivní látka, tzv. tenzid je zpravidla amfifilní a skládá se z hydrofobní části umístěné směrem dovnitř a hydrofilní části směřující ven. Vyskytují se většinou ve formě monomerů, ale i dimerů nebo trimerů. Pokud jejich koncentrace vzroste nad kritickou micelární koncentraci, monomery se začnou shlukovat a tvořit micelu.

Principem CPE je vložení tenzidu do vodné fáze obsahující analyt. Vodná fáze se zahřeje na určitou teplotu specifickou pro daný tenzid, tzv. cloud point teplotu a dochází k tvoření micel, a tak i tvorbě zákalu. Následně dojde k pohlcení analytu micelami a vytvoří se tak dvě fáze, vodná a micelární. Micelární fáze tedy obsahuje hydrofobní a nepolární sloučeniny zachycené uvnitř micely [37].

5.1.4 Chromatografie na tenké vrstvě

Jedná se o chromatografii v plošném uspořádání. Stacionární fázi představuje vrstva sorbentu, jehož částice bývají menší než 10 μm . Nejvíce se používá silikagel, oxid křemičitý či vrstva celulózy. TLC funguje především na principu adsorpční chromatografie, pro silně polární a anorganické látky se využívá i rozdělovacího či iontově výměnného principu. Vzorek je po nanesení na tzv. startovací linii a vložení do uzavřené komory unášen mobilní fází, kterou tvoří vhodné rozpouštědlo. Nejčastěji se užívá optické detekce. Identifikace látky probíhá na základě porovnání retenčních faktorů se standardy, což je poměr vzdáleností skvrny analytu od čela a čela od startu [42,43].

5.1.5 Hmotnostní spektroskopie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, kterou lze stanovit relativní četnost iontů v závislosti na jejich poměru hmotnosti k náboji. Jedná se o destrukční metodu, která umožňuje určení relativní molekulové hmotnosti. Hmotnostní spektrum je součet hmotnostních spekter jednotlivých komponent a podává nám informaci o molekule jako celku a informuje o přítomnosti funkčních skupin. K identifikaci neznámé látky je nezbytná spolupráce s jinými metodami, např. NMR, IR spektroskopie aj. Ke vzniku hmotnostního spektra je zapotřebí tří kroků, a to ionizace, separace iontů a jejich detekce.

Ionizační techniky se dělí na tvrdé a měkké. Při tvrdé technice ionizace molekula získává nadbytek vnitřní energie a dochází k rozsáhlé fragmentaci. Jedná se například o elektronovou ionizaci, při které dochází k emisi elektronů, které narážejí do molekul analytu. Tím dojde k vyražení elektronu z analytu za vzniku kationtu a řady fragmentů. Měkké techniky se vyznačují menším množstvím energie a minimální fragmentací. Řadí

se sem ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku či MALDI.

Způsob separace závisí na zvoleném analyzátoru. Magnetický analyzátor separuje ionty na základě rozdílného zakřivení jejich dráhy v magnetickém či elektrickém poli. Analyzátor doby letu rozděluje ionty na základě různé rychlosti letu, cyklotron využívá rozdílné frekvence cyklického pohybu iontů, iontová past a kvadrupólový analyzátor využívají rozdílné oscilace iontů při stejnosměrném či vysokofrekvenčním střídavém napětí.

Jako detektor pak slouží Faradayova klec či elektronový násobič. Faradayova klec funguje na principu vzniku napěťového pulzu při dopadu pozitivního iontu na kolektor, kdy je velikost pulzu úměrná počtu iontů. Při použití elektronového násobiče dochází k dopadu iontů na dynodu a vyzáření sekundárních elektronů, které dopadají na další dynody. Vzniká tak zesílený signál, který odpovídá počtu iontů na první dynodě [44,45].

5.1.6 Diferenční pulzní polarografie

Polarografie je elektroanalytická metoda sloužící ke stanovení koncentrace analytu. Základní součástí je indikační rtuťová kapková elektroda a referenční elektroda tvořena rtutí na dně nádoby či druhou, většinou kalomelovou elektrodou. Analyzovaný roztok obsahuje stanovované aktivní ionty a základní elektrolyt, tvořený nejčastěji solí alkalických kovů. Napětí vložené na elektrodový systém se během analýzy lineárně zvyšuje a sleduje se protékající proud. Nejprve systémem protéká nepatrný proud a elektroda je plně polarizovaná. Tento proud se nazývá nabíjecí. Poté začne na kapce rtuti probíhat redukce aktivních iontů ve stále větším množství, což se projeví narůstající hodnotou proudu. Tento proud se nazývá difúzní. Třetí fází je dosažení limitního difúzního proudu, kdy dojde k ustálení procházejícího proudu a nemění se ani se vzrůstajícím napětím. Hodnota limitního difúzního proudu je přímo úměrná koncentraci analytu.

Diferenční pulzní polarografie se liší tím, že jsou na elektrodu vkládány kromě stejnosměrného potenciálu i pulzy, které zvyšují citlivost metody až o tři řády. Je to dáno tím, že kapacitní proud se při nízkých koncentracích stává srovnatelný s elektrolytickým proudem, který chceme měřit. Citlivost metody zvýšíme měřením proudu těsně před odtržením kapky od elektrody, jelikož kapacitní proud je na začátku tvoření kapky

nejvyšší a těsně před odtržením klesá na minimální hodnotu. Naopak elektrolytický proud se zvyšuje úměrně s růstem kapky a je tedy největší těsně před jejím odtržením [42].

5.1.7 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza využívá rozdílné rychlosti migrace jednotlivých iontů dělené směsi v elektrickém poli. Jedná se tedy o separační metodu s různými možnostmi detekce. Migrační prostředí tvoří vodivý roztok, který je v kontaktu s elektrodami. Rychlost pohybu iontů je závislá na intenzitě elektrického pole, což je vyjádřeno jako elektroforetická pohyblivost. Průběh separace je často ovlivněn tzv. elektroosmotickým tokem, který umožňuje současnou separaci aniontů i kationtů. Všechny nabitě částice poté putují směrem ke katodě, kde nejrychleji budou kationty, poté neutrální částice a nakonec anionty [42].

5.1.8 Micelární elektrokinetická chromatografie

Mechanismus této separace je obdobný jako u kapilární zónové elektroforézy, ovšem micelární elektrokinetická chromatografie umožňuje separovat i molekuly, které elektrický náboj nenesou. V roztoku základního elektrolytu je přítomný tenzid, tedy povrchově aktivní látka, která při překročení své kritické micelární koncentrace tvoří micely. Negativně nabitě micely se v elektrickém poli pohybují směrem k anodě, ovšem při použití neutrálního či bazického elektrolytu je elektroosmotický tok unáší směrem ke katodě. Separovaný analyt je rozdělován mezi hydrofobní vnitřek micely a hydrofilní elektrolyt. Jelikož micely putují opačným směrem, než je unáší elektroosmotický tok, bude migrační čas analytu tím větší, čím silnější je interakce mezi ním a micelou. Tak dochází k účinné separaci neutrálních molekul. Většina přístrojů pro MEKC využívá k detekci spektrofotometrický detektor [46].

5.1.9 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je separační metoda, při které dochází k rozdělení analyzované směsi látek mezi mobilní a stacionární fázi v důsledku mnohonásobného opakovaného ustanovování rovnováhy. Jednotlivé složky analytu se oddělují na základě odlišných

interakcí s těmito dvěma fázemi. Mezi tyto interakce se řadí např. vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly, Londonovi disperzní síly či vazba dipól-dipól. Při normálním uspořádání se používá polární stacionární fáze a méně polární mobilní fáze. U HPLC s reverzní fází se využívá sorbentu s nepolárním charakterem, tvořeným většinou dlouhými uhlíkatými řetězci, a polární mobilní fází. Samotná detekce probíhá až za kolonou ve vhodném detektoru, který může fungovat na principu spektrofotometrie, luminiscence, polarimetrie, refraktometrie, hmotnostní detekce, infračervené spektroskopie, NMR či elektroanalytických metod [46,47].

5.2 Možnosti stanovení azorubinu

5.2.1 Kvantitativní stanovení tartrazinu, azorubinu a žluti SY pomocí digitálního zpracování obrazů získaných chromatografií na tenké vrstvě

Ke stanovení množství tartrazinu, azorubinu a žluti SY byla zvolena metoda, která kombinuje vysoce výkonnou tenkovrstvou chromatografii s digitálním zpracováním záznamů. Jako stacionární fáze byl použit pórovitý silikagel s navázanými 3-aminopropylými skupinami a mobilní fázi tvořila směs isopropanolu, diethyletheru a amoniaku v poměru 2:2:1. Analyzovaná barviva byla ve formě sušených koncentrovaných šťáv, ze kterých se odebíraly 2 až 3 g, které byly následně zředěny na 100 ml a analyzovány bez dalšího zpracování. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí speciálního softwaru. Hodnota barvy se vypočítá odečtením přídatku intenzity RGB z bílé. RGB je sada hodnot pro červený (R), zelený (G) a modrý (B) kanál. Vzhledem k hodnotě standardní chyby měření, která činila 0,03 – 0,2%, a limitu detekce 5,21 – 9,34 ng/spot je tato metoda vhodná a spolehlivá pro kvantifikaci potravinových barviv [19].

5.2.2 Kvantifikace syntetických barviv v nápojích a kosmetice pomocí SPE a TLC

Nejprve byl tartrazin, košenilová červeň, brilantní modř, žluť SY a azorubin izolovány z ústní vody a nápojů pomocí SPE kolonky naplněné oxidem křemičitým modifikovaným NH_2 . Následně byly barviva stanoveny pomocí tenkovrstvé kapalinové chromatografie. Jako stacionární fáze byl použit standardní silikagel a mobilní fáze byla tvořena směsí chloroformu, isopropanolu a amoniaku v poměru 1:3:1. Kvantifikace byla provedena pomocí denzitometrického skenování, pro azorubin při vlnové délce 500 nm. Celková výtěžnost byla průměrně vyšší než 90% a opakovatelnost byla dostatečná k tomu, aby byla tato metoda doporučena pro rutinní kvantifikaci výše zmíněných barviv v kapalných matricích [20].

5.2.3 Metoda pro rychlý důkaz syntetických barviv v nápojích

Hlavním cílem této metody bylo vyvinout snadný průkaz přítomnosti či nepřítomnosti syntetických barviv v nápojích pro rychlé odlišení nápoje z přírodních surovin od syntetického nápoje nízké kvality. To by mohlo nahradit další metody pro důkaz barviv, které jsou mnohdy velmi složité a časově a finančně náročné. Principem této metody je selektivní adsorpce syntetických barviv na speciálně vytvořený adsorbent, který nereaguje s přírodními sloučeninami. U nápojů s obsahem syntetických barviv dojde ke změně barvy vzorku, zatímco u nápoje s přírodními barvivy zůstává barva vzorku stejná, jelikož nedojde k žádné adsorpci. Speciálně vytvořený Riosorb je chitosan obsahující adsorbent z hub řádu Mucorales a vykazuje vysokou adsorpční aktivitu vůči syntetickým barvivům, a naopak nízkou adsorpční aktivitu vůči barvivům přírodním, proto je vhodným adsorbentem pro tuto metodu. Výsledkem je porovnání intenzity a odstínu zbarvení vzorku před a po adsorpci na Riosorb. Samotná analýza trvá několik minut a spodní hranice limitu detekce byla stanovena na 1 mg/100ml. Metoda je ze své podstaty velmi univerzální, avšak neselektivní k určení konkrétního syntetického barviva [33].

5.2.4 Stanovení syntetických barviv v potravinách a nápojích pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie

Tato metoda popisuje stanovení barviv z pevné i kapalné matrice. 4 g pevné matrice byly zředěny ethanolem a vodou v poměru 1:1, homogenizovány a extrahovány pomocí SPE s polyamidovou kolonou. Z nápojů byl odstraněn plyn pomocí ultrazvukové lázně. Poté byl nápoj zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:1 a následně centrifugován a filtrován. Vzorek se detekoval pomocí HPLC-DAD. Pro úspěšné oddělení všech sedmnácti barviv byla použita kolona s reverzní fází Luna C8 a gradientová eluce směsí acetonitrilu a octanu sodného. Detektor diodového pole byl nastaven tak, aby detekoval barviva v rozmezí od 240 do 700 nm. Celková doba separace trvala 35 minut. Metoda je rychlá, použitelná pro rutinní analýzu s dobrými parametry linearity, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Umožňuje detekci současně červených, žlutých a modrých barviv [21].

5.2.5 Stanovení potravinářských barviv v nealkoholických nápojích pomocí HPLC a UV/VIS detektoru

Hlavním cílem této metody bylo stanovení pěti syntetických potravinářských barviv v nealkoholických nápojích s obsahem přírodních barviv. Konkrétně se jednalo o tartrazin, chinolinovou žluť, žluť SY, azorubin a košenilovou červeň. Po homogenizaci a odplynění vzorku v ultrazvukové lázni byly vzorky nadávkovány přímo na kolonu s reverzní fází Tracer Analytica ODS bez jakékoliv preanalytické úpravy. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a octanu amonného. Analyty byly stanovovány UV/VIS detektorem při vlnové délce 414 nm. Pro azorubin byl limit detekce stanoven na 0,6 mg/l a limit kvantifikace na 2,0 mg/l. Metoda je jednoduchá, rychlá, finančně nenákladná a široce použitelná pro nealkoholické nápoje [26].

5.2.6 Stanovení jedenácti potravinářských barviv z nápojů a potravin pomocí HPLC a detektorem diodového pole

Jedenáct barviv bylo stanovováno metodou HPLC/DAD z alkoholických i nealkoholických nápojů a pevných bonbónů. Obě matrice potřebovaly vlastní preanalytickou úpravu. Nápoje byly zředěny octanem amonným a odplyněny v ultrazvukové lázni. Pevné bonbóny byly rozemlety, rozpuštěny v deionizované vodě a extrahovány pomocí SPE. Jako eluent byl zvolen roztok vodního amoniaku s methanolem. Poté byly všechny vzorky dávkovány do HPLC systému a separovány na koloně Synergi Polar RP-18 pomocí gradientové eluce. Mobilní fázi A tvořil octan amonný a mobilní fázi B acetonitril. Pro detekci byl použit detektor diodového pole. Identifikace barviv byla provedena na základě porovnání retenčních časů jednotlivých píků s UV/VIS spektry v knihovně. Tato metoda se ukázala jako vhodná pro rutinní použití v analýze potravinářských barviv [40].

5.2.7 Stanovení osmnácti syntetických barviv rozpustných ve vodě pomocí LC-ESI-MS/MS

Tato metoda umožnila stanovit osmnáct různých syntetických barviv z čokoládových výrobků, cukru, želé a zmrzliny. Každá matrice byla zpracována odlišným způsobem. Čokoládové výrobky a zmrzlina byly homogenizovány a upraveny na pH 3.5 - 4 pomocí kyseliny octové. Cukr byl rozpuštěn ve vodě a smíchán s kyselinou

octovou a acetonitrilem. Poté byly všechny vzorky přečištěny pomocí SPE. Všechna barviva byla eluována roztokem vodného amoniaku v ethanolu. Analýza byla provedena systémem HPLC na koloně Acquity BEH C18 za gradientové eluce. Mobilní fázi A byla voda s octanem amonným a mobilní fázi B tvořil acetonitril. Po separaci byly analyty detekovány pomocí MS detektoru. Ionizace vzorku byla provedena elektrosprejem a k detekci a kvantitativní analýze byla použita tandemová hmotnostní spektroskopie. Oproti UV/VIS detekci je tato metoda citlivější a selektivnější [41].

5.2.8 Stanovení syntetických potravinářských barviv vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází spojenou s detektorem diodového pole

Touto metodou bylo stanoveno 13 různých syntetických potravinářských barviv, včetně azorubinu, a ve vodě rozpustných barviv v potravinách jako jsou džemy, ovocné ochucené náboje a alkoholické nápoje. Pevné vzorky byly homogenizovány, 10 g bylo rozpuštěno v 50 ml destilované neionizované vody a následně filtrováno. Kapalně vzorky byly jednoduše zředěny. Pro separaci byla použita kolona Discovery C18 a mobilní fáze složená z acetonitrilu a methanolu v poměru 2:8 a 1% roztoku octanu amonného s pH 7,5. Úspěšné oddělení všech sloučenin bylo dosaženo za použití optimalizované gradientové eluce během 29 minut. Detektor diodového pole byl nastaven na vlnovou délku mezi 350 a 800 nm. Limit detekce byl stanoven na 0,06 mg/l. Tato metoda tedy umožňuje analýzu až 13 barviv najednou a ve velmi nízkých koncentracích [25].

5.2.9 Stanovení syntetických potravinářských barviv v rybích produktech metodou RP-HPLC

V tomto experimentu autoři vyvinuli metodu pro stanovení sedmi syntetických barviv v potravinách bohatých na bílkoviny a tuky. Vzorky byly nejprve homogenizovány a extrahovány pomocí směsi amoniaku a methanolu. Po centrifugaci a dekantaci supernatantu proběhla úprava pH vzorku na neutrální a extrakce tuhými fázemi s použitím polyamidové kolony. Izolovaná barviva byla oddělena a analyzována systémem HPLC na koloně Symmetry C18 s gradientovou elucí. Mobilní fázi tvořil pufr octanu amonného a rozpouštědla amoniak, methanol a acetonitril. Detektor diodového pole analyzoval barviva v rozsahu 300–750 nm. Taktéž byla v této studii řešena otázka potravin

s vysokým obsahem tuků, které musejí být před extrakcí eliminovány organickým rozpouštědlem, jinak by mohlo dojít k tvorbě emulze a obtížné dekantaci supernatantu. Tato metoda vykazovala vysoký výtěžek extrakce a nízké hodnoty relativní směrodatné odchylky stanovení [32].

5.2.10 Stanovení azorubinu, allura červeně a košenilové červeně ve sladkostech a nealkoholických nápojích pomocí diferenční pulzní polarografie

Účelem této metody byla detekce azorubinu, košenilové červeně a červeně allura v sirupech, sodovce a sladkostech pomocí diferenční pulzní polarografie. Jako elektrolyt byl zvolen fosfátový pufr s pH 9, díky němuž byla zajištěna dobrá separace jednotlivých píků a tedy možnost měřit všechna tři barviva najednou. Výsledky diferenční pulzní polarografie byly porovnány s výsledky měřenými pomocí HPLC. Relativní rozdíl měření těchto dvou metod byl minimální, proto lze říci, že diferenční pulzní polarografie může být vhodnou alternativou k HPLC technice [24].

5.2.11 Analýza umělých sladidel, konzervačních látek a barviv v nealkoholických nápojích pomocí kapilární elektroforézy

Cílem této metody bylo vyvinout rychlou efektivní metodu, při které by došlo k separaci a stanovení potravinářských barviv, sladidel a konzervačních látek současně. Sacharin, kyselina sorbová, kyselina benzoová, aspartam, brilantní modř, košenilová červeně, azorubin a další syntetické látky byly stanovovány metodou kapilární elektroforézy v nealkoholických nápojích. Všechny stanovované látky jsou dobře rozpustné ve vodě, obsahují alespoň jednu ionizovatelnou funkční skupinu a mají dostatečnou absorpenci při 200 nm. Pro stanovení potravinářských barviv byl experimentálně zvolen 20 mM pufr složený z roztoku uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného o pH 9.5. Pořadí migrace kofeinu, brilantní modře a zeleného barviva bylo výrazně ovlivněno přítomností 62 mM tenzidu SDS. Měřené vzorky byly kvantifikovány změřením plochy pod píkem na elektroferogramu. Limit kvantifikace této metody činil 0,01 mg/l [27].

5.2.12 Stanovení syntetických barviv ve zmrzlíně pomocí kapilární elektroforézy

V této studii autoři stanovovali žluť SY, azorubin a Ponceaur 6R ve vzorcích zmrzliny. Aby bylo možné tyto azobarviva separovat, je nejprve nutno provést extrakci do 30 ml směsi ethanolu a 5% hydroxidu amonného. Pro samotnou elektroforézu byla použita kapilára s oxidem křemičitým a celkovou délkou 50 cm. Separace proběhla za teploty 30 °C pomocí pufru připraveného ze směsi 25 mM fosforečnanu sodného a 25 mM boritanu sodného. Píky na elektroferogramu byly identifikovány srovnáním retenčních časů a s absorpčními spektry naměřenými pomocí detektoru diodového pole a kvantifikovány použitím vnějšího standardu. Z hlediska reprodukovatelnosti, citlivosti a linearity je tato metoda srovnatelná s HPLC. Konkrétně u azorubinu činila výtěžnost extrakce z matrice zmrzliny 93,41% a relativní směrodatná odchylka se rovnala 1,73%. Mez detekce byla stanovena na 5µg/kg. Hlavní výhodou této metody jsou nízké finanční náklady na analýzu [28].

5.2.13 Stanovení červených potravinových barviv pomocí kapilární elektroforézy s detekcí laserem indukované fluorescence

Při této metodě bylo separováno a stanoveno pět syntetických potravinářských barviv z třešňového kompotu a višňového sirupu. Separace proběhla pomocí kapilární elektroforézy při napětí +17 kV. Azobarviva vykazovala nejintenzivnější fluorescenci v borátovém pufru, avšak separace byla nedostatečná, proto byl nakonec zvolen fosfátový pufr. K detekci byl použit spektrofluorimetr. Jelikož excitační maxima všech stanovovaných barviv leží v rozmezí od 520 nm do 560 nm, mohl být jako zdroj záření použit laser. Konkrétně azorubin v tomto experimentu vykazoval excitaci při 556 nm. Tato metoda byla srovnána s detekcí pomocí UV/VIS spektrofotometru a bylo dokázáno, že LOD i LOQ jsou výrazně nižší u LIF detekce [39].

5.2.14 Stanovení syntetických barev ve sladkostech pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie

Pomocí MEKC lze stanovit látky, které se obtížně separují častěji používanou kapilární zónovou elektroforézou. Rozdílem je přítomnost micel v roztoku elektrolytu. V tomto případě byl roztok elektrolytu tvořen ze směsi acetonitrilu, deoxycholátu

sodného, boritanu sodného a dihydrogen ortofosfátu draselného. V rozmezí 20 minut bylo stanoveno deset barviv včetně azorubinu. Jejich koncentrace byla měřena UV detektorem při 214 nm. Výsledek měření korespondoval s výsledky naměřenými pomocí HPLC, taktéž je tento postup rychlejší a méně nákladný [29].

5.2.15 Separace syntetických potravinářských barviv pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie

Tato metoda představuje rychlou separaci a detekci patnácti syntetických potravinových barviv pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie. K separaci byly použity kapiláry z oxidu křemičitého, jako vhodný pufr byl zvolen roztok 200 mM kyseliny borité, upravený na pH 7,5-9,5 hydroxidem sodným s přidavkem acetonitrilu. V pufru byly přítomny povrchově aktivní látky SDS, CHAPS a deoxycholát sodný. Všechna barviva byla oddělena během dvaceti minut a detekována pomocí UV detektoru při vlnové délce 210 nm. Limit detekce pro azorubin byl stanoven na 0,41 µg/ml a relativní směrodatná odchylka činila 1,89% [34].

5.2.16 Stanovení syntetických, ve vodě rozpustných barviv pomocí sekvenční injekční chromatografie

Tato metoda byla vyvinuta v roce 2002 na Katedře analytické chemie Faf UK. Klíčovým bodem této metody je zapojení chromatografické monolitické kolony, jako separačního prvku, do neseparačního systému sekvenční injekční analýzy. V tomto případě byla použita kolona Chromolith CN se středně polární stacionární fází k oddělení tří syntetických barviv, a to azorubinu, zeleně S a žlutě SY v lécích proti kašli pomocí gradientové eluce. Jednu mobilní fázi tvořil roztok octanu amonného o pH 6,7 a druhou mobilní fází byla voda. Spektrofotometrický detektor proměřoval vzorky při vlnových délkách 480, 516 a 630 nm. Mez detekce byla u azorubinu stanovena na 0,15 mg/l a mez kvantifikace činila 0,50 mg/l. Tato metoda je velmi rychlá a šetrná k životnímu prostředí díky absenci organických rozpouštědel v mobilní fázi. [30,31].

5.2.17 Rychlá separace červených barviv pomocí sekvenční injekční chromatografie

Tato metoda umožňuje stanovit dvě povolená červená barviva v nealkoholických nápojích, a to azorubin a košenilovou červeň. Separace byla provedena na monolitické koloně Merck Chromolith s polární -CN stacionární fází. Vzorek byl eluován pomocí rozdílného gradientu, který zajišťovaly různé koncentrace fosforečnanu amonného jakožto mobilní fáze. Pro detekci byla použita vlnová délka 500 nm. Tato metoda vykazovala vysokou selektivitu a zároveň splnila požadavky zelené chemie [36].

5.2.18 Stanovení potravinářských barviv v komerčních produktech digitální analýzou obrazu

Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu analýzy potravinářských barviv pomocí digitalizace obrazu z plochého skeneru, která byla použita pro současné stanovení čtyř běžných potravinářských barviv, a to azorubinu, brilantní modře, žlutě SY a chinolinové žlutě. V tomto případě nejsou potřeba žádné předchozí separační kroky, pouze zředění deionizovanou vodou. Vzorky se nakapou na filtrační papír a umístí na skleněnou desku skeneru. Vzniklý digitální obraz je sbírka dat uložených v pixelech, ze kterých lze pomocí speciálně vytvořeného programu vyhodnotit intenzitu jednotlivých barev. Identifikace jednotlivých barviv proběhla pomocí TLC. Výsledky této metody byly porovnány s výsledky HPLC a nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl [35].

5.2.19 Oddělení a stanovení dvou syntetických barviv pomocí cloud point extrakce a spektrofotometrie

Hlavním cílem této metody bylo zjednodušit úpravu vzorku před analýzou a zároveň stanovit dvě syntetická barviva, azorubin a brilantní modř, která spolu často interferují. Jako tenzid byl zvolen Triton X-100. Pufr k úpravě optimalizovaného pH 5 byl tvořen ze směsi hydroxidu sodného a kyseliny octové. Do skleněné zkumavky byl přidán i elektrolyt chlorid sodný, který snižuje teplotu zákalu a tím urychluje tvorbu micel. Aby došlo k překročení kritické micelární koncentrace, byla zkumavka s činidly a analytem inkubována v termostátové lázni při teplotě 76°C po dobu 30 minut. Následně byla ponořena do ledové lázně pro zvýšení viskozity micelární fáze, která je usazena na dně zkumavky. Po odstranění vodné fáze byla absorbance analytu měřena při 522 nm pro

azorubin a 640 nm pro brilantní modř. Oproti LLE je tato metoda účinnější, méně nákladná a využívá méně toxických činidel [38].

Tabulka 4 Souhrnné informace o separačních metodách ke stanovení azorubinu

| Metoda | Stanovovaná látka | Substance | Kolona/kapilára | Mobilní fáze/pufr | Extrakce | Detektor | Čas analýzy [min] | LOD/LOQ | Zdroj |
|--------|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------|---------------------|-------------------|------------------------------------|-------|
| TLC | E110, E122, E102 | sušená koncentrovaná šťáva | Nano-SIL NH ₂ (100x100 mm) | isopropanol/diethylether/ amoniak 2:2:1 | --- | specifický software | --- | 5,21-9,34 ng/spot (LOD) | 19 |
| TLC | E102, E124, E133, E110, E122 | ústní voda, nápoje | Merck silikagel (100x200 mm) | chloroform/isopropanol/ amoniak 1:3:1 | SPE | denzitometr | 20 | 0,04-0,09 g/spot (LOQ) | 20 |
| HPLC | 17 barviv včetně E122 | potraviny, nápoje | Luna C8 (150x4,6 mm, 3µm) | acetonitril/octan sodný (gradient) | SPE | DAD | 35 | --- | 21 |
| HPLC | 13 barviv včetně E122 | džem, ovocné nápoje, alkoholické nápoje | Discovery C18 (250x4,6 mm, 5 µm) | acetonitril/methanol/ 1% octan amonný pH 5 (gradient) | --- | DAD | 29 | 0,06 mg/l (LOD) | 25 |
| HPLC | E102, E110, E122, E124, E104 | nealkoholické nápoje | Tracer Analytica ODS (150x4 mm, 5 µm) | methanol/octan amonný pH 5 (gradient) | --- | UV/VIS detektor | 30 | 0,60 mg/l (LOD) 2,00 mg/l (LOQ) | 26 |

| | | | | | | | | | |
|------|------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|-----|--------------|------------------|---------------------------------------|-----------|
| HPLC | E110, E122, E123, E124, E127, E129, E128 | rybí produkty | Symmetry C18 (150x4,6 mm, 5 µm) | octan amonný/amoniak/methanol/acetonitril | SPE | DAD | 26 | 1,30 µg/ml | 32 |
| HPLC | 9 barviv včetně E122 | nápoje, bonbóny | Synergi Polar RP (150x4,6 mm, 4 µm) | octan amonný/acetonitril (gradient) | SPE | DAD | --- | 0,01 µg/ml (LOD) 0,029 µg/ml (LOQ) | 40 |
| HPLC | 17 barviv včetně E122 | čokoláda, želé, zmrzlina | Acquity BEH C18 (100x2,1 mm, 1,7 µm) | voda/octan amonný/acetonitril (gradient) | SPE | ESI-MS/MS | 27 | 2,00 µg/kg (LOD) 10,00 µg/kg (LOQ) | 41 |
| SIC | E142, E110, E122 | léky proti kašli | Chromolith CN (5x4,6 mm) | octan amonný pH 6,7/voda (gradient) | --- | VIS detektor | --- | 0,15 mg/l (LOD) 0,50 mg/l (LOQ) | 30, 31 |
| SIC | E122, E104 | nealkoholické nápoje | Merck Chromolith (50x4,6 mm) | fosforečnan amonný pH 6 (gradient) | --- | VIS detektor | 3min/ analýza | 0,45 mg/l (LOD) 1,50 mg/l (LOQ) | 36 |

| | | | | | | | | | |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------|-----|--------------------------------------------|----|
| CE | KS, KB, sacharin, aspartam, E133, E122, E124, E110, E104, E151, E142 | nealkoholické nápoje | křemenná kapilára Hewlett-Packard (485 mm, 50 µm) | uhličitan sodný/hydrogenuhlčitan sodný pH 9,5 | --- | DAD | 15 | 0,01 mg/l (LOQ) | 27 |
| CE | E110, E122, E124 | zmrzlina | křemenná kapilára (500 mm, 75 µm) | 25 mM fosforečnan sodný/25 mM boritan sodný (gradient) | LLE | DAD | --- | 5,00 µg/kg (LOD) | 28 |
| CE | E127, E122, E123, E124, E128 | višňový sirup, třešňový sirup | křemenná kapilára (300 mm, 50 µm) | fosfátový pufr pH 11 | --- | Spektro- fluorimetr | 20 | 0,50 µg/ml (LOD) 1,10 µg/ml (LOQ) | 39 |
| MEKC | E142, E133, E127, E129, E132, E110, E122, E124, E102, E123 | sladkosti | křemenná kapilára (650 mm, 50 µm) | acetonitril/deoxycholát sodný/boritan sodný/dihydrogenfosfore čnan draselný | --- | UV-detektor | 20 | --- | 29 |
| MEKC | 12 barviv včetně E122 | farmaceutické výrobky | křemenná kapilára (500 mm, 50 µm) | 200 mM kyselina boritá pH 7,5-9,5/ NaOH/acetonitril | SPE | UV detektor | 20 | 0,41 µg/ml (LOD) | 34 |

Tabulka 5 Souhrnné informace o ostatních metodách ke stanovení azorubinu

| Metoda | Stanovovaná látka | Substance | Detektor | LOD/LOQ | Zdroj |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------|
| Extrakce | E102, E104, E110, E122, E123, E124, E128, E129, E132, E133 | nápoje (víno, džus, koktejl) | --- | 1mg/100ml (LOD) | 33 |
| Diferenciální pulzní polarografie | E122, E124, E129 | sirupy, sladkosti, sodovka | kapková rtuťová elektroda | 42,00 µg/l (LOD) | 24 |
| Digitální analýza obrazu | E104, E122, E133, E110 | čokoláda, nealkoholické nápoje | speciálně vytvořený program | 7,23 mg/l (LOD) 24,11 mg/l (LOQ) | 35 |
| CPE | E122, E133 | želé, bonbóny | VIS detektor | 0,017 µg/ml | 38 |

6. ZÁVĚR

Cílem této rešeršní práce bylo vyhledat a sepsat důležité informace o azorubinu, který se řadí mezi potravinářská barviva. Dále bylo cílem shromáždit analytické metody, kterými lze azorubin stanovit v potravinách, nápojích či lécích.

První část je teoretická a obsahuje informace ohledně potravinářských doplňků, barviv, legislativy, a především je zaměřena na azorubin, jeho chemické a fyzikální vlastnosti, metabolismus a především toxicitu, jelikož ta je v dnešní době velice diskutována, ale stále nepotvrzena.

Druhá, analytická část, je zaměřena na stanovení azorubinu v potravinách, nápojích a lécích. Nutno podotknout, že azorubin se nikdy nestanovuje samostatně, ale v kombinaci s jinými přídatnými látkami. Co se metod týče, stále převažuje HPLC s použitím reverzní stacionární fáze. Daleko více se využívá DAD na úkor UV/VIS spektrofotometru. Za zmínku stojí i úspěšné použití sekvenční injekční chromatografie a do popředí se dostávají i elektromigrační metody, jako je kapilární elektroforéza či micelární elektrokinetická chromatografie.

Metody pro stanovení potravinářských aditiv jsou stále zdokonalovány, jelikož se jedná o potenciální nebezpečné látky a je velmi důležité sledovat a kontrolovat jejich množství v potravinách a nápojích. Dále je kladen stále větší důraz na rychlost analýzy a ochranu životního prostředí, je tedy třeba využívat šetrnější metody a rozpouštědla. To bylo dosaženo v případě analýzy azorubinu pomocí chromatografických technik s využitím monolitických kolon a středně polárních stacionárních fází. Přehled jednotlivých metod stanovení azorubinu je stručně komentován a doplněn přehledovými tabulkami.

7. SEZNAM TABULEK

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabulka 1 Výňatek ze seznamu barviv povolených při výrobě potravin [6] | 12 |
| Tabulka 2 Seznam označení jednotlivých kategorií [2] | 14 |
| Tabulka 3 Seznam potravin, které nesmějí obsahovat přidaná barviva [8] | 16 |
| Tabulka 4 Souhrnné informace o separačních metodách ke stanovení azorubinu | 40 |
| Tabulka 5 Souhrnné informace o ostatních metodách ke stanovení azorubinu | 43 |

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---------------------------------------|----|
| Obrázek 1 vzorec azorubinu [13] | 19 |
|---------------------------------------|----|

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. VRKOSLAVOVÁ J., WINKLEROVÁ D. Ěčka-noční můra mnoha z nás. Státní zdravotní ústav [online]. [cit. 2017-11-10]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/uploads/documents/czpz/vyziva/legislativa/ecka-nocni-mura.pdf>
2. HRNČIŘÍKOVÁ I., MANDELOVÁ L. Ěčka v potravinách. Brno: Computer Press 2006. Strana 11,12,20-22. ISBN 80-251-1292-6.
3. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Přídavné látky (aditiva). [online]. 2017-07-18 [cit. 2017-11-10]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&docType=ART&nid=11324>
4. European Food Safety Authority. Food colours. [online]. [cit. 2017-11-11]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-colours>
5. VELÍŠEK J. Chemie potravin. 1. vydání, Tábor: OSSIS, 1999. 3. svazek. Strana 1, 186–191. ISBN 80-902391-5-3.
6. Ministerstvo zemědělství. Vyhláška č. 4/2008 Sb. [online]. [cit. 11.11.2017] Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065004.html>
7. WOUTERSEN R. Re-valuation of food colours: EFSA completes major programme. European Food Safety Authority [online]. 2016 [cit. 2017-11-11]. Dostupné z <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160914a>
8. . Vědecký výbor pro potraviny. Přídavné látky (aditiva) v potravinách [online]. 2004 [cit. 2017-11-11]. Dostupné z <http://docplayer.cz/3218851-Pridatne-latky-aditiva-v-potravinach.html>
9. Úřední věštník Evropské unie. Nařízení evropského parlamentu a rady č. 1333/2008. [online]. 2008-12-31 [cit. 2017-11-15]. Dostupné z <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:CS:PDF>
10. PERLÍN C., TUREK B. Potraviny a údajná chemická rizika. Potravinářská revue 2010(7). Strana 25-27.
11. KUČEROVÁ J., KOTOLOVÁ H. Toxicita barviv používaných v léčivých přípravcích. Praktické lékárenství 2013(9). Strana 83-89.

12. Ministerstvo zemědělství. Hodnocení bezpečnosti aditiv v rámci EU. [online]. 2012-01-02 [cit. 2017-11-18]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/hodnoceni-bezpecnosti-aditiv-v-evropske.html>
13. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E122) as a food additive. EFSA Journal 2009;7(11). Strana 1332.
14. CANOV M. Azobarviva. [online]. 2003-05-14 [cit. 2017-11-19]. Dostupné z <http://canov.jergym.cz/barva/azo.html>
15. Open chemistry database. Carmoisine. [online]. 2005-11.20 [cit. 2017-11-22]. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6321394#section=Top>
16. POLLMER U., HOICKE C., GRIMM H. Víš, co jíš? Je jídlo jed? Olomouc: Fontána 2006. str. 117, ISBN 80-733-6092-6.
17. RŮŽKOVÁ B. Barviva a jejich vliv na lidský organismus. Medical Tribune 2012(6).
18. Zdraví národa. Seriál o "éčkách" – Barviva aneb pěkná červená díky dehtu. [online]. 2015-05-15 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <https://www.zdravinaroda.cz/clanky/serial-o-eckach-barviva-aneb-pekna-cervena-diky-dehtu>
19. SOPONAR F., CATALIN MOT A., SARBU C. Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A 2008; 1188(2). Strana 295–300.
20. SOBANSKA A.W., PYZOWSKI J., BRZEZINSKA E. SPE/TLC/Densitometric Quantification of Selected Synthetic Food Dyes in Liquid Foodstuffs and Pharmaceutical Preparations. Journal of analytical methods in chemistry 2017;9525472. ISSN: 2090-8865
21. BONAN J., FEDRIZZI G., MENOTTA S., CAPRAI E. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. Dyes and Pigments 2013;99(1). Strana 36–40.
22. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/36/ES ze dne 30. června 1994 o používání barviv v potravinách.

23. HILDEBRAND S., SCHMAHL F.W., WODARZ R., KIMMEL R., DARTSCH P.C. Azo dyes and carcinogenic amomeric amies in cell cultures. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1999;72. Strana 52–56.
24. CHANLON S., JOLY-POTTUZ L., CHATELUT M., VITTORI O., CRETIER J.L. Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceaur 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography. *Journal of Food Composition and Analysis* 2005;18(6). Strana 503-515.
25. MINIOTI K.S., SAKELLARIOU CH.F., THOMAIDIS N.S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta* 2007;583(1). Strana 103-110.
26. GARCIA-FALCÓN M.S., SIMAL-GÁNDARA J. Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up. *Food Control* 2005;16(3). Strana 293-297.
27. FRAZIER R.A., INNS E.L., DOSSI N., AMES J.M., NURSTEN H.E. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. *Journal of Chromatography A* 2000;876(1,2). Strana 213-220.
28. DEL GIOVINE L., PICCIOLI BOCCA A. Determination of synthetic dyes in ice.cream by capillary electrophoresis. *Food Control* 2003;14(3). Strana 131–135.
29. THOMPSON C.O., TRENERRY V.C. Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* 1995;704(1). Strana 195-201.
30. DAVLETBAEVA P., CHOCHOLOUŠ P., BULATOV A., ŠATÍNSKÝ D., SOLICH P. Sub-1 min separation in sequential injection chromatography for determination of synthetic water-soluble dyes in pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* 2017;143. Strana 123-129.
31. SOLICH P. Výzkumné zaměření skupiny analytické chemie [online]. 2012-11-16 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z http://download.bionet.upol.cz/BioNet/20121116_01_Solich/20121116_01_Solich.pdf

32. KARANIKOLOPOULOS G., GERAKIS A., PAPADOPOULOU K., MASTRANTONI I. Determination of synthetic food colorants in fish products by an HPLC-DAD method. *Food Chemistry* 2015;177. Strany 197-203.
33. KOMISSARCHIK S., NYANIKOVA G. Test systems and method for express detection of synthetic food dyes in drinks. *LWT – Food Science and Technology* 2014;58(2). Strana 315-320.
34. JAWORSKA M., ANUSZEWSKA E. Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system: Application to pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A* 2005;1081(1). Strana 42-47.
35. SOROURADDIN M.H., SAADATI M., MIRABI. Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. *Journal of Food and Drug Analysis* 2015;23(3). Strana 447-452.
36. CHOCHOLOUŠ P., DĚDKOVÁ L., BOHÁČOVÁ T., ŠATÍNSKÝ D., SOLICH P. Fast separation of red colorants in beverages using cyano monolithic column in Sequential Injection Chromatography. *Microchemical Journal* 2017;130. Strana 384-389.
37. HAGAROVÁ I., Spojenie extrakcie s využitím teploty zázalku micenárnych roztokov s metódami atómovej spektrometrie na separáciu, prekoncentráciu a špeciáciu kovov. *Chemické listy* 2009;103. Strana 712-720.
38. POURREZA N., GHOMI M. Simultaneous cloud point extraction and spectrophotometric determination of carmoisine and brilliant blue FCF in food samples. *Talanta* 2011;84(1). Strana 240-243.
39. RYVOLOVÁ M., TÁBORSKÝ P., VRÁBEL P., KRÁSENSKÝ P., PREISLER J. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2007;1141(2). Strana 206-211.
40. REJCZAK T., TUZIMSKI T., Application of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector for Simultaneous Determination of 11 Synthetic Dyes in Selected Beverages and Foodstuffs. *Food Analytical Methods* 2017;10(11). Strana 3572-2588.

41. FRÉDÉRIC M., OBERSON J.M., MESCHIARI M., MUNARI C. Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food Chemistry* 2014;197. Strana 1249-1255.
42. MAJER J. *Analytická chemia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. Martin: Osveta 1989, 1. vydání.
43. ZÝKA J. a kol. *Analytická příručka I. díl*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1988.
44. ZÝKA J. a kol. *Analytická příručka II. díl*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1988. Strana 400,401.
45. VŘEŠŤÁL J. a kol. *Hmotnostní spektrometrie*. Masarykova Univerzita v Brně 2000. ISBN 80-210-2283-3. Strana 4-14.
46. NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha 2013, 1. vydání. ISBN 978-80-260-4243-3. Strana 61-92, 129-140, 178-180.
47. NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha 2013, 1. vydání. ISBN 978-80-260-4244-0.
48. PAVELKOVÁ K., BUREŠOVÁ P. *Potravinové alergie, intolerance a přecitlivělost na potraviny* [online]. 2015-07-27. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/potravinova-alergie-intolerance-a-precitlivelost-na-potraviny.aspx>
49. *Vědecký výbor pro potraviny. Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance* [online]. 2003-11-19. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: http://web.archive.org/web/20050307061622/http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/alerg_2003_3_deklas.pdf
50. KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. Ostrava 2003. ISBN 80-86369-07-2. Strana 46.
51. *Asociace dospělých pro hyperaktivní děti. O ADHD* [online]. 2009. [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <http://www.adehade.cz/o-adhd/>
52. NIGG J.T., LEWIS K., EDINGER T., FALK M. Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, and Synthetic Food Color Additives. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 2012;51. Strana 86-97.

53. AMCHOVA P., KOTOLOVA H., RUDA-KUCEROVA J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2015;73(3). Strana 914-922.