

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Bakalářská práce

**Možnosti stanovení vybraných konzervantů
v potravinách a potravinových doplňcích**

(rešeršní práce)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci Možnosti stanovení vybraných konzervantů v potravinách a potravinových doplňcích vypracovala samostatně a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

Souhlasím, aby tato práce byla dále propůjčena ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne

v Hradci Králové

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Daliboru Šatinskému PhD., za jeho cenné připomínky a odborné rady, a za jeho trpělivost v průběhu vytváření této bakalářské práce.

1 Obsah

1	Obsah.....	4
2	Seznam použitých zkratk8	8
3	Cíl a zadání práce	11
4	Úvod	12
5	Teoretická část	13
5.1	Přídavné látky (aditiva)	13
5.1.1	Podmínky použití aditiv.....	13
5.1.2	Označování přídavných látek	13
5.1.3	Potravinová alergie.....	14
5.1.4	Potravinová intolerance	14
5.2	Konzervanty - antimikrobní látky, konzervační prostředky	14
5.3	Kyselina sorbová a sorbáty (E200, E202, E203)	15
5.3.1	Povolený denní limit kyseliny sorbové v potravinách	17
5.3.2	Toxikologie.....	17
5.3.3	Vlastnosti kyseliny sorbové a jejích solí	18
6	Analytická část.....	20
6.1	Chemické a toxikologické studie	20
6.1.1	Chemické a toxikologické studie přípravků vyplývající z interakce kyseliny sorbové a methylaminu v potravinářských podmínkách	20

6.1.2	Oxidační žluknutí v avokádovém pyré ovlivněné α -tokoferolem, kyselinou sorbovou a skladováním	21
6.1.3	Posouzení expozice potravinářských konzervačních látek (siřičitany, benzoová a sorbová kyselina) v Rakousku.....	22
6.1.4	Stabilita sorbové a askorbové kyseliny v balených zelených stolních olivách během dlouhodobého skladování při různých skladovacích podmínkách, a jejich vliv na parametry kvality.....	23
6.1.5	Snížení konzervačního obsahu a regulace kyseliny sorbové uvolněním z povrchového obalu.....	23
6.1.6	Stabilita kyselina sorbové v masných výrobcích díky snížené aktivitě vody.....	23
6.2	Analýza a stanovení v potravinách.....	24
6.2.1	Enzymatické stanovení kyseliny sorbové.....	24
6.2.2	Řízené uvolňování ve vodě rozpustných polymerních komplexů kyseliny sorbové s antimykotiky.....	25
6.2.3	Jednoduchá a rychlá metoda pro současné stanovení kyseliny benzoové a sorbové kyseliny v potravinách pomocí in-tube solid-phase mikroextrakce spolu s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	25
6.2.4	Optimalizace disperzivní Liquid-Liquid mikroextrakce a stanovení kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v nápojích pomocí plynové chromatografie.....	26
6.2.5	Přímá kvantifikace konzervantů kyseliny benzoové, sorbové a kofeinu v potravinách a nápojů pomocí superkritické fluidní chromatografie	26
6.2.6	Citlivé stanovení organických kyselin v konzervačních látkách u šťáv a nealkoholických nápojů na bázi sorpční extrakce a kapalinové chromatografie.....	27
6.2.7	Stanovení kyseliny benzoové a sorbové v Tabasco omáče pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie	27

6.2.8	Detekce konzervačních látek u sýrů kapalinovou chromatografií- tandemově s hmotnostní spektrometrií	28
6.2.9	Stanovení benzoátu, sorbanu, citrátu a ortofosfátů v nápojích pomocí dvourozměrné isotachoforetické metody.....	28
6.2.10	Vývoj vysokotlaké kapalinové chromatografie pro stanovení kyseliny benzoové, sorbové kyseliny a sacharinu ve víně	29
6.2.11	Analýza kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v thajských rýžových vínech a destilátech pomocí extrakce na pevné fázi a vysokoúčinné kapalinové chromatografie ..	29
6.2.12	Kvantitativní analýza kyseliny sorbové ve farmaceutických krémových přípravcích kapalinovou chromatografií	30
6.2.13	Současné stanovení konzervačních látek (kyselina benzoová, kyselina sorbová, methylparaben a propylparaben) v potravinách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	30
6.2.14	Stanovení kyseliny sorbové v moči plynovou chromatografií-hmotnostní spektrometrií	31
6.2.15	Stanovení benzoové a sorbové kyseliny v brazilských potravinách	31
6.2.16	Výskyt kofeinu, sacharinu, kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v nealkoholických nápojích a nektarech z Portugalska.....	32
6.2.17	Optimalizace postupů extrakce pro analýzu benzoové a sorbové kyseliny v potravinách.....	33
6.2.18	Stanovení kyseliny sorbové v margarínu a másle s pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	33
6.2.19	Stanovení kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v různých nápojích a potravinách pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie	34

6.2.20	Rychlá metoda pro současné stanovení kyseliny askorbové a kyseliny sorbové v ovocných šťávách kapilární zónovou elektroforézou.....	34
6.2.21	Vývoj RP-HPLC metody pro simultánní stanovení kyseliny benzoové, kyseliny sorbové, Natamycinu a lysozymu v těstovinách Filata a sýry	35
6.3	Shrnutí	35
6.3.1	Tabulka	36
7	Závěr	38
8	Seznam literatury.....	40

2 Seznam použitých zkratek

ADI	Přijatelný denní příjem
BA	Kyselina benzoová
BW	Povlak včelího vosku
C18	Oktadecyl – silikagelové částice
CA	Kyselina skořicová
CoA	Koenzym A
cITP	Kapilární izotachoforéza
CV	Variační koeficient
EDI	Odhadovaný denní příjem
FAO	Food And Agricultur of the United Nations
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv (Food and Drug Administration)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-MS	Plynová chromatografie tandemově s hmotnostní spektrometrií
GRAS	Generally Recognised As Safe (Obecně uznáváno jako bezpečné)
HEC	Hydroxyethylcelulóza

HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High- Performance Liquid Chromatography)
LE	Vedoucí elektrolyt
MECC	Micerní elektrokinetická kapilární chromatografie
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MP	Methylparaben
MPL	Maximální povolený limit
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PP	Propylparaben
PILM	Polymerní iontová kapalina na bázi monolitu
RSD	Relativní směrodatná odchylka
RP – LC/ESI – MS/MS	Reverzní kapalinová chromatografie s použitím elektrospreje a hmotnostní spektrometrie
SA	Kyselina sorbová
SCSE	Sorpční extrakce
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SPE	Extrakce pevným sorbentem
SPME	Mikroextrakce s pevnou fází

ttMA

trans, trans – mukonová kyselina

WG

Povlak z pšeničného lepku

3 Cíl a zadání práce

Cílem a zadáním práce bylo vyhledat a shromáždit informace, které se týkají kyseliny sorbové, jakožto konzervantu v potravinách, a seznámit se tak s možnostmi stanovení této kyseliny.

4 Úvod

Kyselina sorbová se vyskytuje běžně v přírodě, ale pro potravinové účely - jako konzervant, se vyrábí většinou synteticky. Používá se hlavně ve formě jejích solí – sorbany, které jsou v potravinách stabilnější. Její hlavní využití spočívá v antimikrobním a antifungálním účinku.

Studují se účinky po vstupu kyseliny sorbové do organismu, její toxicita, karcinogenita atd. Mnoho studií potvrdilo, že kyselina sorbová spolu se svými solemi, patří k nejméně toxickým přídatným látkám. Byly proto vyvinuty metody, které dále popisují toto prokazování. Jsou nezbytné pro kontrolu dodržování množství a koncentrace této kyseliny v potravinách dle daných norem, tak aby neohrožovala lidský život.

V této práci se tedy věnuji kyselině sorbové, jejímu vlivu na organismus, povoleným limitům, které neškodí zdraví, a dále jak kvalitativnímu, tak i kvantitativnímu stanovování.

Informace jsem čerpala hlavně z internetových serverů WebofScience.com a služby GoogleBooks, kde se tyto knihy nacházejí online.

Tato rešeršní práce nám tedy dovoluje nahlédnout do vývoje analytických metod, jejich validací a modernizací, které se v průběhu několika desítek let se používají pro potravinářské a farmaceutické účely.

5 Teoretická část

5.1 Přídavné látky (aditiva)

Potravinářská aditiva jsou látky, které se nekonzumují přímo jako potraviny, ale přidávají se do potravin pro technologické účely, např. pro konzervaci potravin. Přidávají se tak z důvodu prodloužení trvanlivosti potravin, zvýraznění nebo obnovy barvy, regulovanosti kyselosti a k zahušťování. Potravinám dodávají i sladkou chuť, aniž by se musel použít řepný cukr a některé se vyskytují v mnoha potravinách přirozeně (např. kyselina askorbová, octová atd.) [1].

5.1.1 Podmínky použití aditiv

Použití aditiv při potravinářské výrobě je důkladně regulováno. Mohou se používat pouze přídavné látky, které jsou schváleny pro použití v potravinách platných právních předpisů EU. Pro zařazení aditiv na seznam povolených přídavných látek je nutné posouzení bezpečnosti. Pro každou tuto potravinu a její přídavné látky jsou stanoveny limitní hodnoty, což jsou nejvyšší povolená množství [1].

5.1.2 Označování přídavných látek

Pro identifikaci aditiv v EU se používá jako označení číselný kód E, který se skládá z písmene E a trojmístného čísla, pro každou aditivní látku jiné. Přidělení tohoto kódu E znamená, že tyto látky prošly posouzením bezpečnosti a zároveň jsou povoleny v EU. Přídavné látky použité v konkrétní potravině musí být uvedeny na obale tak, že je uveden její název nebo číselný kód E. Jsou uvedeny v sestupném pořadí dle toho, v jakém množství jsou tyto látky obsaženy v potravině [1].

5.1.3 Potravinová alergie

Je to nepřiměřená reakce imunitního systému na určitou potravinu, zpravidla na její složku glykoprotein. Potravinové alergenů mohou vyvolávat i vážné vedlejší reakce. Často k vyvolání nežádoucí reakce postačí i stopové množství alergenní potraviny. Jsou např. arašídů, ryby, sója. Na rozdíl od potravinové intolerance zahrnuje alergie vždy reakci imunitního systému [1].

5.1.4 Potravinová intolerance

Není způsobena imunitní reakcí, ale poruchou metabolismu. Zpravidla se tu vyskytuje nedostatek nebo úplná absence biologických látek (nejčastěji enzymů), které se podílejí na trávení potravin nebo jejich složek. Příkladem je laktózová intolerance, která je způsobena nedostatkem laktázy, což je enzym, který štěpí mléčný cukr – laktózu [1].

5.2 Konzervanty - antimikrobní látky, konzervační prostředky

Konzervanty jsou látky, které prodlužují trvanlivost potravin. Chrání je proti degradaci, kterou způsobují mikroorganismy, a před růstem patogenních organismů [1]. Používají se hlavně při chemické konzervaci potravin (chemoanabióza potravin). Chemické látky, které jsou k chemoanabióze použity, potlačují pouze činnost mikroorganismů v potravě. Není vyloučeno, že při delším působení v dostatečné koncentraci, mohou určitá množství přítomných mikrobů i usmrtit. Inhibují mikroorganismy tím, že napadají jejich buněčné stěny, endoenzymy a složky buňky významné pro život patogena (např. DNA apod.) nebo jen pozměňují mikrobiální prostředí (např. pH) [2, 3].

Chemické konzervanty mají různou specifickou účinnost. Důležitým předpokladem pro jejich účinnost jsou vhodné reakční podmínky. Mezi nejdůležitější se považuje stupeň kyselosti potraviny, případně směsi potravin s konzervantem. Každý mikroorganismus má pro různě kyselé prostředí různou citlivost, což může ovlivnit činidla, která pak disociují. Konzervanty s povahou organických kyselin nebo jejich solí (např. kyselina sorbová) jsou vždy účinnější v prostředí s nižším pH, což má za následek potlačení disociace. Nedisociované molekuly mají lepší tendenci prostupovat cytoplazmatickou membránou do vnitřku buňky. Proto se pro nekyselé potraviny používají slabé až velmi slabé kyseliny a chemická činidla, která zpravidla vůbec nedisociují [2, 3].

Konzervační látky tvoří ani jedno procento ze všech přídatných látek, které jsou používány. Látky v kyselém prostředí jsou inhibitory řady plísní, kvasinek a některých bakterií (např. kyselina benzoová a sorbová a jejich soli). Používá se i mnoho dalších důležitých konzervantů a to např. parabeny – alkylestery kys. p-hydroxybenzoové, které jsou účinné i v mírně alkalickém prostředí. Dalšími konzervanty jsou oxid siřičitý a siřičitany (E 220-228), dusitany a dusičnany (E 249-252), bifenyl, orthofenylfenol, nisin, natamycin, kyselina propionová, kyselina boritá atd. Tyto konzervanty jsou používány jen v potravinách, které jsou pro ně určeny [4, 5].

5.3 Kyselina sorbová a sorbáty (E200, E202, E203)

Kyselina sorbová je přírodně identická látka, která se využívá v široké míře v potravinách. Nejčastěji se přidává do potravin v podobě solí - sorbát draselný a sorbát vápenatý, které jsou vedeny jako nejpoužívanější konzervanty [6]. Pokud je tělo normálně okysličováno, pak má poločas vstřebávání kyseliny sorbové v těle za normální kondice (podmínek) 40-110 min. Nicméně její draselné, vápenaté a sodné soli jsou používány běžněji pro svoji vyšší rozpustnost ve vodě a snadnější manipulaci, než je jejich kyselina [7].

Velice dobré účinky mají tyto látky na plísně, kvasinky a bakterie. Působí na ně přes jejich dehydrogenázový systém, který tyto konzervanty blokují. Velmi důležité jsou pro působení proti toxigenním plísním jako je *Aspergillus flavus* a *Aspergillus ochraceus*. Kyselina sorbová je špatně rozpustná ve vodě, proto se častěji využívají její soli tzv. sorbáty (sorbany) [2].

Kyselina sorbová se přirozeně vyskytuje v mnoha rostlinách, ale jako konzervant pro potraviny se vyrábí synteticky, hlavně pro kyselé potraviny. Je obsažena v čerstvých sýrech, mléčných výrobcích, masných výrobcích, šťávách, sirupech, nápojích, marmeládách, vínu, sušeném ovoci, kečupech, hořčicích, majonézách, cukrovinkách, margarínech, zálivkách na saláty a sterilizované zelenině a mnoho dalších [2, 4].

Používá se v koncentračním rozmezí 0,05 – 0,2 %. Je účinná hlavně v kyselé formě, jelikož nedisociované molekuly kyseliny sorbové mají větší konzervační účinnost než disociované. Její optimální pH je 5,5 až 6,5, ale i tak je poměrně nestabilní, proto závisí na pH potraviny. Rozhodujícím faktorem při rozhodování o použití této konzervační látky by měla být právě hodnota pH. Je citlivá na oxidace, což vede ke změně zbarvení. Je též nestabilní při vyšších teplotách nad 38°C. Tato látka by se neměla skladovat v barevných (hnědých a oranžových) skleněných lahvích, protože obsahují větší podíl kovů, jež by ji mohly degradovat [8].

Jelikož se kyselina sorbová a její soli v těle dobře metabolizují (pomocí beta-oxidace), patří k nejméně škodlivým potravinářským přísadám pro lidi. Využívá se také jako činidlo v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. I zde se ovšem vyskytl problém s podrážděním sliznice a pokožky již při koncentraci okolo 1%. U citlivějších lidí objevila na kůži kopřivka, proto se v tomto odvětví příliš nevyužívá [4].

V České republice se tyto konzervanty smějí používat, pouze však v omezeném množství. Sorbát sodný je u nás zakázán, ale např. v USA je jeho užití povoleno [4].

Tyto přídatné látky patří mezi látky se statutem GRAS (Generally Recognised As Safe) - tzn. že je americkou institucí FDA považována za bezpečnou. Nesmějí se však používat v jemném pečivu, chlebu, vlašském a pařížském salátu. Důvodem zákazu je možnost maskování přítomnosti patogenů způsobujících otravu z jídla [4].

5.3.1 Povolený denní limit kyseliny sorbové v potravinách

Kyselinou sorbovou, společně s benzoovou kyselinou, se konzervují pouze potraviny k tomu určené a to do nejvyššího povoleného množství (NPM – mg/kg). V ČR tato látka a její soli se mohou používat jen v množství od 200 mg/kg u slazených nápojů, u vína, medoviny, alkoholických nápojů nebo kukuřičné kaše polenty. V množství 1000 mg/kg se může pohybovat např. v sušeném ovoci, kompotech, salátech, olivách, sýrech. Ve větším množství, avšak pouze do 2000 mg/kg, se používá u jemného pečiva a cukrářských výrobků (s trvanlivostí delší než 5 dní), tavených sýrů, bramborových těst a roztíratelných tuků [9].

5.3.2 Toxikologie

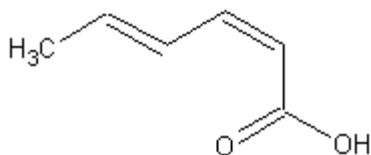
Sorbová kyselina a také její sorbáty se hodnotí jako jedny z nejméně toxických konzervantů. Mají však své nevýhody, např. v kosmetických a farmaceutických výrobcích mohou dráždit osoby s citlivější pokožkou [10]. Mohou také vyvolávat lokální alergické reakce. Přijatelným denním příjmem ADI pro kyselinu sorbovou je 25 mg/kg tělesné hmotnosti [6].

Na kyselinu sorbovou a její soli bylo provedeno mnoho studií na toxicitu/karcinogenitu/teratogenitu, jak akutní, krátkodobou, tak i chronickou. Většina testů ukazuje, že tyto látky mají velmi nízkou úroveň toxicity u savců. Nebyla prokázána karcinogenní aktivita ani u obsahu 10 % těchto konzervačních látek v potravinách. Jedná se tedy o non-mutagenní a non-klastogenní látky in vitro a in vivo. Nízká toxicita se vysvětluje hlavně tím, že sorbová kyselina je rychle metabolizována podobnými cestami jako metabolismus mastných kyselin. Hlášeno sice bylo několik případů, jako je nesnášenlivost se sliznicí, non-imunologická kopřivka a pseudoalergie, ale frekvence je nízká. Bylo zjištěno, že v extrémních podmínkách (vysoká koncentrace a teploty), může kyselina sorbová reagovat s dusitany, tím tvořit mutagenní produkty, avšak tyto mutageny za normálního použití nejsou zjistitelné [12].

V dalších rozsáhlých toxikologických studiích byla laboratorní zvířata krmena sorbáty. Studovala se tím akutní krátkodobá a chronická toxicita metabolických funkcí - mutagenita, karcinogenita, teratogenita a potenciální zhoršení reprodukce. Pokus byl prováděn na dvou skupinách myši (25 samic a 25 samců) s dávkami kyseliny sorbové denně 40 mg/kg celkové váhy zvířete. Za celé dva měsíce se neprokázaly žádné škodlivé účinky, jen játra testovaných myši byla ve srovnání se zdravými druhy poměrně větší [13].

5.3.3 Vlastnosti kyseliny sorbové a jejích solí

Kyselina sorbová (E 200)



Obrázek č.1: *Strukturní vzorec kyseliny sorbové* [45]

Název: E,E-2,4-hexandienová kyselina

Sumární vzorec: C₆H₈O₂

Molekulová hmotnost [g/mol]: Mr = 112,12

pKa = 4,76

Teplota tání: 134,5°C

Rozpustnost: ve vodě: 0,16 g při 20 °C/100 ml, 0,25 g/100 ml při 30 °C;

rozpustná v methanolu a etanolu [14].

Vlastnosti: Sorbová kyselina je inhibítorem plísní, kvasinek a bakterií, aktivní formou je nedisociovaná molekula kyseliny a to až 10 - 600krát účinnější než disociovaná [14].

Charakteristika: Může být příčinou alergických reakcí [14].

Jedná se o bílý prášek volně se vyskytující v přírodě např. v jeřábech - bobulích. Má jemně štiplavý zápach [15].

Výroba: Tato kyselina se získává právě z těchto bobulí horských jeřábů, ale pro potravinářské účely se vyrábí synteticky - chemickými reakcemi z různých sloučenin - např. z acetaldehydu nebo z petroleje [15].

Sorban vápenatý (Sorbát vápenatý) (E203)

Charakteristika: Může být příčinou alergie. Jedná se o další ze skupiny sorbátů, které se využívají jako konzervanty. Tak jako kyselina sorbová i sorbát vápenatý zabraňuje šíření bakterií, plísní a kvasinek v potravinách. Látka je špatně rozpustná v tucích [16].

Výroba: Sorban vápenatý se vyrábí syntetickou cestou a to chemickou reakcí spojením vápna s kyselinou sorbovou [16].

Sorban draselný (Sorbát draselný) (E202)

Charakteristika: Je to draselná sůl kyseliny sorbové. Má podobu bílého krystalického prášku. Tato látka se užívá jako konzervant, zabraňuje šíření plísní a kvasinek v potravinách, stejně jako předchůdci. Je dobře rozpustná ve vodě [17].

Výroba: Pro potravinářské účely se vyrábí syntetickou cestou. Ke kyselině sorbové se přidá hydroxid draselný. Také se může získávat z ropných derivátů [17].

Sorban sodný (Sorbát sodný) (E201)

Charakteristika: V ČR je tato látka zakázána. V USA je však povolena [18].

Jedná se o potravinový konzervant. Zabraňuje také růstu plísní a kvasinek nebo bakterií nacházejících se v potravinách. Také se může používat jako aditivum do obalů. Tento konzervant se následně uvolňuje do potraviny. Některé studie prokázaly potenciální slabou genotoxicitu, ale i tak je látka označena se statutem GRAS [18].

Výroba: Vyrábí se nejčastěji syntetickou cestou a to přidáním hydroxidu sodného do kyseliny sorbové [18].

6 Analytická část

6.1 Chemické a toxikologické studie

6.1.1 Chemické a toxikologické studie přípravků vyplývající z interakce kyseliny sorbové a methylaminu v potravinářských podmínkách

Kyselina sorbová má systém konjugovaných dvojných vazeb, díky němuž je schopna podstoupit reakci - nukleofilní adici. Byly kvantifikovány interakce mezi kyselinou sorbovou a aminem přítomných v endogenních složkách potravin. Bylo poukázáno na tvorbu nových produktů a studoval se základní mechanismus pomocí ethylsorbanu a různých aminů. Metody HPLC, GC, GC-MS a NMR umožnily izolaci a identifikaci výrobků. Tyto adiční reakce vedou k vytvoření lineárních monoadduktů při teplotě 20 ° C, a cyklických derivátů při teplotě 50 ° C. Z této studie mutagenity, zahrnující Amesův test a genotoxicitu s plazmidovou DNA, vyplynulo, že žádný z produktů neměl ani mutagenní, ani genotoxickou aktivitu [18].

6.1.2 Oxidační žluknutí v avokádovém pyré ovlivněné α -tokoferolem, kyselinou sorbovou a skladováním

Avokádo je nutričně bohatá potravina související s mnoha zdravými látkami velmi cennými jako zdroj energie s vysokým obsahem kvalitního tuku. Cílem této práce bylo zhodnotit oxidaci lipidů chlazeného avokádového pyré po přidání α -tokoferolu a/ nebo kyseliny sorbové jako antioxidantu a antimikrobiálních látek. Zkoumalo se vytvoření peroxidů a sekundárních oxidačních produktů v různě upravených podmínkách při skladování a balení v ochranné atmosféře. Přídavek α -tokoferolu výrazně snížil žluknutí lipidové frakce. Po přidání tohoto antioxidantu byla peroxidová formace inhibována po dobu alespoň 12 týdnů s malým účinkem přítomnosti kyseliny sorbové a dostupnosti kyslíku. Naopak absence α -tokoferolu ve složení přípravku předcházela produkci sekundárních oxidačních metabolitů a rychlé nasycení řetězců mastných kyselin. Poté bylo zjištěno, že kyselina sorbová má mírný oxidační efekt, čímž byl vysvětlen její antimikrobiální účinek se schopností prodloužit trvanlivost avokáda a jiných produktů [19].

6.1.3 Posouzení expozice potravinářských konzervačních látek (siřičitany, benzoová a sorbová kyselina) v Rakousku

Účelem posouzení expozice byl odhad potenciálního příjmu konzervačních látek u rakouského obyvatelstva. Údaje se zjišťovaly z různých skupin obyvatelstva, jako např. děti předškolního věku 3-6 let, ženy a muži ve věku 19-65 let. Míra konzervačních přísad v potravinách byla odvozena z předešlých analýz. Příjem konzervantů byl odhadnut a srovnán s příslušným denním příjmem (ADI). Za předpokladu, že spotřebitelé (všechny tyto skupiny) náhodně konzumují potraviny, které obsahují nebo neobsahují přídatné látky, je odhadovaný příjem všech studovaných konzervačních látek hluboko pod ADI. Expozice siřičitanů představovala 34 % u předškolních dětí, 84 % u žen a 89 % u mužů hodnoty ADI. Dále se odhaduje, že denní příjem kyseliny benzoové byl 32 % (předškolní děti), 31 % (muži) a 36 % (ženy) z ADI. U sorbové kyseliny hodnoty odpovídají 7 % ADI u dětí předškolního věku a 6% hodnoty ADI u dospělých. Za předpokladu, že spotřebitelé konzumují vždy potraviny obsahující aditiva je ADI překročen u siřičitanů mezi dospělými (119 a 124 %, v uvedeném pořadí). Hlavní přispívající do tohoto celkového příjmu siřičitanů bylo víno a sušené ovoce. Odhadovaný příjem kyseliny benzoové při překročení ADI ve všech skupinách obyvatelstva je 135 % u předškolních dětí, 124 % u žen a 118 % ADI u mužů. Příjem sorbové kyseliny je hluboko pod ADI, což představuje maximálně 30 % ADI u dětí předškolního věku. Nejvíce potravin obsahujících benzoovou a sorbovou kyselinou byly ryby a rybí výrobky. Dalšími častými zdroji sorbové kyseliny byly např. chléb, housky, toastový chléb, ovocné a zeleninové šťávy [20].

6.1.4 Stabilita sorbové a askorbové kyseliny v balených zelených stolních olivách během dlouhodobého skladování při různých skladovacích podmínkách, a jejich vliv na parametry kvality

Byl studován vliv sorbátu na stabilitu na španělských stolních olivách za různých podmínek při skladování po dobu jednoho roku. Zkoumaly se faktory jako je konzervace (pasterizace vs. non-pasterizace), skladovací teplota (zahřívání vs. chlazení), obalový materiál (skleněná láhev vs. plast), doba skladování, a přítomnost nebo nepřítomnost antioxidantů (kyselina askorbová). Kyselina sorbová byla stabilní v pasterizovaných vzorcích, stejně jako v chlazených nepasterizovaných vzorcích, a to jak v nepřítomnosti, tak i v přítomnosti kyseliny askorbové. V nepasterizovaných vzorcích skladovaných při pokojové teplotě kyselina sorbová postupně vymizela, což by mohlo být způsobeno bakteriemi. Sorban kromě toho negativně ovlivňuje parametry jako je barva, vůně a chuť. Výraznější vůně a chutě byly zjištěny spíše ve vzorcích, ve kterých sorban byl degradován [21].

6.1.5 Snížení konzervačního obsahu a regulace kyseliny sorbové uvolněním z povrchového obalu

Cílem této studie je snížit celkové množství přidávaných konzervantů v potravinách. V této studii se tedy používá jedlý obal na povrchu potraviny k udržení efektivní konzervační schopnosti, díky níž jsou mikroorganismy inhibovány. Byl posuzován gelový agar jako model potraviny s antimikrobiálním jedlým obalem z pšeničného lepku (WG) nebo včelího vosku (BW), obsahující kyselinu sorbovou jako účinnou látku. Zásadní význam pro predikci růstu mikroorganismů se klade na povrchovou koncentraci kyseliny sorbové v obalu. V případě povlaku WG povlak povrch koncentrace klesne pod 10 % počáteční hodnoty již po 1 hodině, zatímco v případě povlaku BW, zůstává koncentrace vyšší než 75 % i po jednom týdnu. Simulace byla realizována pomocí bakterie *Saccharomyces cerevisiae* [22].

6.1.6 Stabilita kyseliny sorbové v masných výrobcích

Tato studie zkoumala chování kyseliny sorbové v trvanlivém mase v průběhu zpracování při různých teplotách a při prudkých změnách teplot u skladování. V masných systémech uložených na 70 °, 80 ° a 90 ° C, se po cca 3 dnech snížila hodnota kyseliny sorbové. Tato změna byla pravděpodobně způsobena omezenou dostupností kyslíku a / nebo inhibičním účinkem neenzymatických produktů Browning (slouží k ničení sorbátu). V masných systémech uložených na 33 °, 45 ° a 57 ° C byla míra rozkladu konstantní s časem. Ukázalo se, že u masových výrobků hrál důležitou roli rozklad sorbátů [23].

6.2 Analýza a stanovení v potravinách

6.2.1 Enzymatické stanovení kyseliny sorbové

Tato metoda byla vyvinuta pro enzymatické stanovení kyseliny sorbové na základě spektrofotometrického měření sorbyl koenzymu A při 300 nm. Kyselina sorbová je převedena na sorbyl CoA s pomocí acyl CoA syntetázy a adenosintrifosfátu. Absorbance měřená při 300 nm je specifická pro sorbyl CoA a jeho hodnota je přímo úměrná množství kyseliny sorbové v roztoku vzorku. Všechny části enzymatické analýzy byly prováděny na automatickém odstředivém analyzátoru. Metoda je velmi jednoduchá, přesná, spolehlivá a proto vhodná i pro běžné stanovení, zejména pro vysokou rychlost analýzy [24].

6.2.2 Řízené uvolňování polymerních komplexů kyseliny sorbové rozpustných ve vodě s antimykotiky

Bylo syntetizováno šest ve vodě rozpustných polymerních komplexů kyseliny sorbové s polyvinylpyrrolidonem, které měly různé molekulové hmotnosti. Komplexy byly charakterizovány jako nízkomolekulární a vysokomolekulární látky. Antifungální potence komplexů byla testována metodou makrodiluce, kterou se zjišťuje citlivost hub na antimykotika. Kyselina sorbová, stejně jako komplexy, vykazovala minimální inhibiční koncentrace (MIC) - nižší u sorbátu draselného. Bylo prokázáno, že u MIC nízkomolekulárních komplexů je až 4 krát nižší MIC pro kvasinky a až 3krát nižší MIC než u kyseliny sorbové nebo vysokomolekulárních komplexů. Použily se druhy *Candida*, *Aspergillus parasiticus* a *viridicatum* a *Penicillium* [25].

6.2.3 Jednoduchá a rychlá metoda pro současné stanovení kyseliny benzoové a sorbové v potravinách pomocí in-tube solid-phase mikroextrakce spolu s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Jednoduchá, rychlá a citlivá metoda pro současné stanovení kyseliny benzoové a sorbové v potravinách byla vyvinuta spojením in-tube pevné fáze mikroextrakce (SPME) s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a UV detekcí. Modifikovaný diethylamin vykazoval vysokou extrakční schopnost vůči benzoové a sorbové kyselině. Zvolena byla také monolitická kapilární kolona jako extrakční médium. Pro dosažení optimální extrakce byly zkoumány parametry jako je pH, anorganické soli a obsah organických rozpouštědel v matrici. Po jednoduchém ředění s 0,02 M fosforečnanem sodným (pH 4,0), byly vzorky limonád, šťáv, omáček a džemů přímo aplikovány pro extrakci. Pro kandované vzorky bylo nutné přidání malého množství acetonitrilu. Pro oba analyty byly korelační koeficienty vyšší než 0,999. Detekční limity pro benzoovou a sorbovou kyselinu byly 1,2 a 0,9 ng /ml. Byly získány relativní směrodatné odchylky a to menší než 4,4 a 9,9%. Výtěžnosti látek ze vzorků potravin činily rozsah 84,4 až 106 %. Vyvinutím této metody bylo prokázáno, že je vhodná pro běžné monitorování kyseliny benzoové a sorbové v různých typech vzorků potravin [26].

6.2.4 Optimalizace disperzivní Liquid-Liquid mikroextrakce a stanovení kyseliny sorbové a benzoové v nápojích pomocí plynové chromatografie

Byla vyvinuta nová a rychlá metoda pro přímé stanovení stopových množství kyseliny sorbové a benzoové s disperzní mikroextrakcí kapalina-kapalina a plynovou chromatografií s ionizačním plamenovým detektorem. Postup separace sorbové a benzoové kyseliny se provádí na obecné chromatografické koloně bez předchozí derivatizace. Za optimálních podmínek byla kalibrační křivka lineární v rozmezí 0,5-20 mg/l. Relativní směrodatná odchylka byla 11 % až 13 %. Výsledek limitu detekce byl 0,2 mg/l pro kyselinu sorbovou a 0,5 mg/l pro kyselinu benzoovou. Průměrné výtěžnosti byly 31 % až 39 % pro obě kyseliny. Metoda se používá pro stanovení sorbové a benzoové kyseliny jako konzervační přísady v nápojových vzorcích [27].

6.2.5 Přímá kvantifikace konzervantů kyseliny benzoové, sorbové a kofeinu v potravinách a nápojích pomocí superkritické fluidní chromatografie

Byl zjišťován obsah benzoátu, sorbátu a kofeinu v široké škále nápojů a potravin, pomocí superkritické fluidní chromatografie (SFC). Hodnotilo se zde patnáct nápojů a deset tekutých potravin. Benzoát a sorbát byly původně přítomny ve vzorcích v podobě kyselin, sodné nebo draselné soli. Vodné vzorky byly před zaváděním do kolony zředěny 3:1 okyseleným metanolem. Tyto roztoky byly eluovány pomocí 8,5 % metanolu, který obsahoval 0,3 % kyseliny octové při 50 ° C a tlaku 150 bar. Metoda byla v širokém rozsahu lineární. Korelační koeficienty byly pro všechny tři vzorky větší než 0,999. RSD byla menší než 1%. Výsledky souhlasily s obsahem kofeinu na etiketách. Překvapivě bylo zjištěno, že analýza kyselin benzoové a sorbové a kofeinu pomocí SFC je ve srovnání s HPLC 7 krát rychlejší a vylučuje použití acetonitrilu [28].

6.2.6 Citlivé stanovení organických kyselin v konzervačních látkách u šťáv a nealkoholických nápojů na bázi sorpční extrakce a kapalinové chromatografie

Tato jednoduchá, efektivní a citlivá metoda byla vyvinuta pro současné stanovení kyseliny sorbové (SA), benzoové (BA) a skořicové (CA) ve šťávách a nealkoholických nápojích, což je sorpční extrakce (SCSE) s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a s detekcí diodovým polem. SCSE na základě polymerní iontové kapaliny na bázi monolitu (PILM), jako extrakčního média, byla použita k získání koncentrace těchto tří organických kyselin. Aby bylo dosaženo optimálních extrakcí, prošetřovaly se různé parametry včetně desorpčních rozpouštědel, pH, iontové síly v matrici vzorku, extrakčního a desorpčního času. Podle optimalizovaných podmínek extrakce byly získány meze detekce 0,16, 1,08, 0,18 mg/l ($S/N = 3$) a limity kvantifikace 0,52, 3,42, 0,61 ($S/N = 10$). Metoda též prokázala dobrou linearitu, opakovatelnost a také výhody jako jsou jednoduchost i nízké náklady. Nakonec, byla navržená metoda úspěšně aplikována na stanovení SA, BA, a CA v reálných šťávách a nealkoholických nápojích [29].

6.2.7 Stanovení kyseliny benzoové a sorbové v Tabasco omáče pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie

Tento rychlý a spolehlivý způsob je uveden pro stanovení konzervačních přísad (kyseliny benzoové a sorbové) v Tabasco omáče. Využívá se zde vysoce účinné kapalinové chromatografie následované UV detekcí s diodovým polem pro identifikaci a kvantifikaci těchto dvou konzervačních látek. Díky homogenizaci byla získána kyselina benzoová a sorbová ze vzorků Tabasco omáček pomocí metanol - amonného pufru (25:75). Všechny vzorky byly před analýzou filtrovány, čímž se odstranily zbytečné částice matrice. Vysoce účinná kapalinová chromatografie pro stanovení konzervačních látek byla provedena za použití C-18 kolony (2,1 x 50 mm, 1,7 mm) a UV detekce při 226 nm pro kyselinu benzoovou a 258 nm pro kyselinu sorbovou. Relativní směrodatná odchylka změn byla méně než 2,2%. Standardní výtěžnosti byly v rozmezí 97,8 - 102,4 % [30].

6.2.8 Detekce konzervačních látek u sýrů kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Nesprávné použití konzervačních látek v sýrech může ohrozit bezpečnost potravin a poškodit spotřebitele. Tato metoda je užitečná jak pro výrobce, tak i pro kontrolní orgány. V tomto výzkumu byla vyvinuta kapalinová chromatografie tandemově s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem pro stanovení šesti konzervantů (kyselina benzoová, citronová, hexamethylentetramin, lysozym Natamycin, Nisin a kyselina sorbová) v sýrech. Konzervační látky byly extrahovány ze sýrů a analyzovány pomocí RP-LC/ESI-MS/MS. Pro hodnocení touto metodou byly použity tři typy vzorků (tvrdý sýr, těstoviny Filata a měkký sýr). Vzhledem k vlivu matrice byla provedena kvantifikace pro každý typ sýra nebo jeho výrobek pomocí kalibrační křivky. Např. pro komerční vzorky sýrů byla tato metoda použita s velice dobrými výsledky. Předpokladem je, že tato metoda je rychlá, spolehlivá a vhodná jak pro potvrzení přítomnosti, tak i zjištění kvantifikace konzervačních přísad v sýrech [31].

6.2.9 Stanovení benzoátu, sorbanu, citrátu a ortofosfátů v nápojích pomocí dvourozměrné izotachoforetické metody

Dvourozměrná kapilární isotachoforetická metoda (cITP-cITP) je elektrolytický systém skládající se ze dvou vedoucích elektrolytů (LE1): [10 mM HCl + beta-alanin (pH 3,9) + 0,1 % hydroxyethylcelulóza (HEC)] a (LE2): [10 mM HCl + kyselina aminokapronová (pH 5,00) + 0,1 % HEC], a z 5 mM kapronové kyseliny jako koncového elektrolytu. Byly použity dvě metody detekce, vodivostní a UV-Vis pro stanovení vybraných potravinářských konzervačních látek a přísad. Pro praktickou použitelnost bylo navrženo simultánní stanovení benzoanů, sorbanů, citrátů a fosforečnanů ve 12 vzorcích nápojů. Navrhovaná metoda dosahovala linearitu s korelačním koeficientem mezi 0,9992 a 0,9999 v koncentračním rozmezí 10-100 mg/l pro orthofosfáty a citrátové ionty, 20-100 mg/l pro sorbany) a 40-120 mg/l pro benzoany. Detekční limity pro všechny studované ionty byly 0,85 - 3,1 mg/l, zatímco kvantifikace byla 2,8 - 10 mg/l. Variační koeficienty vyšly pro pětinasobné analýzy všech iontů v rozmezí 0,4 a 9,1 %. Získané výtěžky byly 97-104 % a potvrdily přesnost navrhované cITP-cITP metody pro stanovení testovaných potravinářských přísad [32].

6.2.10 Vývoj vysokotlaké kapalinové chromatografie pro stanovení kyseliny benzoové, sorbové a sacharinu ve víně

Metoda HPLC pro stanovení benzoové, sorbové kyseliny a sacharinu byla vyvinuta proto, aby se kontrolovalo, zda není překročen jejich obsah ve víně. Vzorky vín byly předem upraveny reextrakcí. Následně se použila HPLC za optimalizovaných podmínek pomocí izokratické eluce. K chromatografií byla použita reverzní fáze s kolonou C18 (4,6 x 250 mm), mobilní fáze (s průtokem 1,0 ml /min) skládající se z roztoku methanolu a octanu amonného s izokratickou elucí. Vlnová délka detektoru byla 230 nm. Doba analýzy trvala 5 min. Metoda je jednoduchá, rychlá, spolehlivá a reprodukovatelná [33].

6.2.11 Analýza kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v thajských rýžových vínech a destilátech pomocí extrakce na pevné fázi a vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Extrakce na pevné fázi (SPE) se používá k úpravám vzorků pro vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Tato metoda byla vyvinuta pro rychlé stanovení kyseliny benzoové a sorbové v thajském rýžovém víně a ostatních destilačních produktech. Extrakce SPE vykazovala výtěžnosti pro stanovení kyseliny benzoové (až 95,7 %) a kyseliny sorbové (95,2 %). Průměrná relativní směrodatná odchylka (RSD) pro obě kyseliny byla 1,99 %. Procentuální výtěžnosti v reálných vzorcích byly až 92,6 % pro kyselinu benzoovou a 93,7 % pro kyselinu sorbovou v rýžovém víně a 92,7 % pro kyselinu benzoovou a 92,5 % kyselinu sorbovou v destilátu. Detekční limity byly 0,2 mg /l pro kyselinu benzoovou a 0,1 mg/ l pro kyselinu sorbovou. Celkový experimentální čas pro každý vzorek byl 15 min s 1,56 % RSD. Výsledky ukazují, že všechny zjištěné údaje byly nižší než maximální povolená koncentrace těchto kyselin pro potravinářské přídatné látky. Tato SPE-HPLC technika se ukázala být rychlá a přesná pro analýzu benzoové a sorbové kyseliny v alkoholických nápojích [34].

6.2.12 Kvantitativní analýza kyseliny sorbové ve farmaceutických krémových přípravcích kapalinovou chromatografií

Metoda popisuje kvantitativní analýzu kyseliny sorbové v krémech. Byla zde použita polystyren-divinylbenzenová kolona (250 × 4,6 mm), která se udržuje při teplotě 60 °C. Mobilní fází byl acetonitril - fosfátový pufr (pH 7,0) a voda (1:5:94) s průtokem 1,0 ml/min. UV detekce byla provedena při 254 nm. Vzorek (krém) se před analýzou zpracoval se směsí hexanu a mobilní fáze. Metoda ukázala dobrou opakovatelnost a linearitu. Ve většině krémů se zkoumala hlavně stabilita kyseliny sorbové, která ve těchto vzorcích byla nedostatečná [35].

6.2.13 Současné stanovení konzervačních látek (kyselina benzoová, sorbová, methylparaben a propylparaben) v potravinách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

HPLC metodou se umožňuje oddělení a současné určení konzervačních látek benzoové (BA) a sorbové kyseliny (SA), methyl-(MP) a propylparabenů (PP). Tyto extrakty se eluují pomocí mobilní fáze methanol-acetátového pufru (pH 4,4) (35:65) a poté se toto složení mobilní fáze změní na methanol-acetátový pufr (pH 4,4) (50:50). Vlnová délka detektoru byla nastavena na 254 nm, kde za těchto podmínek bylo dosaženo výsledku již za méně než 23 min. Byly vyhodnoceny také charakteristiky analytické extrakce, jako je mez detekce, mez stanovitelnosti, lineární rozsah a reprodukovatelnost. Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení 67 potravin (hlavně dovážených), zahrnující nealkoholické nápoje, džemy, omáčky, konzervované ovoce, zeleninu, ovoce a další [36].

6.2.14 Stanovení kyseliny sorbové v moči plynovou chromatografií tandemově s hmotnostní spektrometrií

Průměrný denní příjem potravinářských konzervačních kyselin se odhaduje v rozmezí 0,01 až 1,1 mg/ kg. V organismu se kyselina sorbová metabolizuje na oxid uhličitý. Menší část této kyseliny budou převedeny na trans, trans -mukonovou kyselinu (ttMA), která se vylučuje do moči. ttMA slouží pak v moči jako biomarker pro expozici benzenu. Zde se sleduje kyselina sorbová v organismu, zejména při užití nízkých dávek této kyseliny. Za tímto účelem byly vyvinuty jednoduché, robustní a rychlé metody pro stanovení kyseliny sorbové v moči ve stopovém množství. K moči (10 ml) se přidá 10 ml vody a 5 ml 8 M kyseliny chlorovodíkové. Vzorek se poté destiluje pomocí automatického destilačního zařízení. Celkem 100 ml destilátu se extrahuje na pevné fázi. Po promytí byla kyselina sorbová eluována se 4 ml methanolu. Výsledná kyselina sorbová (methyl ester) se extrahuje v heptanu. Konečná analýza se provádí GC-MS za vzniku fragmentů iontů m/z 126 pro analyt a m/z 140 pro vnitřní standard. Limit detekce byl 0,7 ng/l moči a RSD z 69 duplicitních stanovení byla 7,5 %. V kontrolované experimentální studii bylo zjištěno, že kyselina sorbová v moči je ukazatelem vstřebávání kyseliny sorbové v organismu a že tato kyselina je převedena na ttMA. Přibližně 0,1 % kyseliny sorbové je vylučováno v nezměněné formě do moči během 24 hodin [37].

6.2.15 Stanovení benzoové a sorbové kyseliny v brazilských potravinách

Byly k dispozici různé značky nealkoholických nápojů, ovocných šťáv, margarínů, jogurtů a sýrů na brazilském trhu. Z těchto vzorků byly analyzovány kyseliny benzoová a sorbová pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detektorem fotodiodového pole. Obsah těchto kyselin byl v adekvátním rozmezí. Nebyly zjištěny hodnoty nad hranicí limitů, pouze v jednom vzorku se zjistil zvýšený obsah konzervačních látek vzhledem k daným normám, které povolují platné právní předpisy v Brazílii. Podle výsledků lze předpokládat, že skutečné využití benzoanů a sorbanů je výrazně nižší než maximální povolené limity [38].

6.2.16 Výskyt kofeinu, sacharinu, kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v nealkoholických nápojích a nektarech z Portugalska

Vysoce účinná kapalinová chromatografie je metoda pro stanovení kyseliny benzoové a sorbové, kofeinu a sacharinu v nealko nápojích a nektarech, která se provádí pomocí UV detekce při 220 nm. Dosáhne chromatografické separace pomocí kolony typu C18 (250 × 4,6 mm) a mobilní fáze KH_2PO_4 při pH 4,2. V 19 nealkoholických nápojích byla zjištěna kyselina benzoová, z toho bylo 11 nealkoholických neperlivých nápojů, kde byla průměrná koncentrace 158 mg/l a 8 nápojů na bázi minerální vody s průměrnou koncentrací 148 mg/l. Kyselina sorbová byla zjištěna v 15 vzorcích, z toho v 7 nealkoholických neperlivých s průměrnou koncentrací 172 mg/l a v 8 nápojích na bázi minerální vody s průměrnou koncentrací 188 mg /l. Sacharin a kofein se neprokázaly v nealkoholických nápojích na bázi minerální vody. Maximální povolená úroveň (MPL) kyseliny benzoové byla překročena v deseti nealkoholických nápojích, MPL kyseliny sorbové ve třech vzorcích a MPL pro sacharin v jednom vzorku [39].

6.2.17 Optimalizace postupů extrakce pro analýzu benzoové a sorbové kyseliny v potravinách

Benzoová a sorbová kyselina jsou nejvíce běžně používané konzervační přísady v potravinách. Obvykle jsou analyzovány metodou RP-HPLC. Vzhledem ke složitosti a rozmanitosti potravinového složení, je nutné připravit vzorek již před analýzou pro spolehlivou extrakci těchto konzervačních přísad z matric. Byly optimalizovány konkrétní extrakční postupy pro analýzu džemů, stolních oliv, roztíratelných tuků, omáček, ovocných šťáv a vín. Byly zvoleny různé druhy potravinových matric, včetně těch s vysokým obsahem cukru, vysokým obsahem tuku a obsahem alkoholu. Chromatografické separace bylo dosaženo za použití kolony typu C18, mobilní fáze octanu a metanolu (pH = 4,4) (65:35) s průtokem 1,4 ml /min a UV detekcí při 235 nm. Koncentrace konzervačních přísad ve vzorcích byla vypočtena pomocí metody vnějšího standardu. Kyseliny benzoová a sorbová, které byly obsaženy v džemech, želé a stolních olivách, byly po homogenizaci efektivně extrahovány methanolem. Zpětně získané výtěžky byly vyšší než 98 %, CV nižší než 2,9 %. Konzervační extrakce z ovocných šťáv (pomeranč, jablko a ananas) a vín byly eluovány s methanolem. Průměrné výtěžky těchto kyselin byly vyšší než 94 %, CV byl nižší než 4,0 %. Bylo analyzováno 87 komerčních vzorků (stolní olivy, džemy, želé, roztíratelné tuky, omáčky, ovocné šťávy a stolní vína). Všechny tyto vzorky odpovídaly hodnotám v právních předpisech [40].

6.2.18 Stanovení kyseliny sorbové v margarínu a másle pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Postup je uveden pro separaci a stanovení kyseliny sorbové, jako derivátu 4-brommethyl-6,7 dimethoxykumarínu, pomocí reverzní fáze u vysoce účinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí s vnitřním standardem kyselinou enantovou. Kyselina sorbová se oddělí ze vzorků margarínu a másla destilací s vodní párou. Obsah kyseliny sorbové se také určuje pomocí UV a viditelné spektrofotometrické metody, zjistilo se však, že hodnoty SA u této metody byly vyšší než hodnoty naměřené na reverzní fázi vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií z důvodu přítomnosti rušivých látek ve vzorcích [41].

6.2.19 Stanovení kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v různých nápojích a potravinách pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie

Je zde popsána rychlá metoda pro identifikaci a kvantifikaci kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v různých nápojích a potravinách pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Tuto separaci zahrnuje použití 68 cm dlouhé kapilární kolony, která obsahuje dodecylsulfát sodný a hydrogenfosforečnan sodný s pH 9,2. MECC postup vykazuje podobnou opakovatelnost jako metoda HPLC, ale je rychlejší, účinnější a méně nákladný na provoz. Tento postup může být také použit pro screening kyseliny sorbové a benzoové v nápojích pomocí ftalátu jako vnitřního standartu [42].

6.2.20 Rychlá metoda pro současné stanovení kyseliny askorbové a sorbové v ovocných šťávách kapilární zónovou elektroforézou

Pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí při vlnové délce 270 nm bylo vyvinuto rychlé stanovení kyseliny askorbové a sorbové. Byla optimalizována volba elektrolytu, vlnová délka a čas dávkování. Kyseliny askorbová a sorbová byly dobře odděleny v kyselině borité (pH = 8,0) a inkubovaly se 5 min. Lineární rozsahy při optimálním stavu jsou 2,54-352 mg/l pro kyselinu askorbovou a 1,08-336,39 mg/l pro kyselinu sorbovou a detekční limit 1,70 mg/l pro kyselinu askorbovou a 0,54 mg/l pro kyselinu sorbovou. Ostatní organické kyseliny v ovocných šťávách neměly žádný vliv na detekci. Tato metoda je velmi jednoduchá a může být použita k detekci kyseliny askorbové a sorbové v ovocných šťávách [43].

6.2.21 Vývoj RP-HPLC metody pro současné stanovení kyseliny benzoové, kyseliny sorbové, natamycinu a lysozymu v těstovinách filata a sýrech

Konzervační látky jsou běžně používány při výrobě sýrů a jejich použití je přísně regulováno zákony EU. Proto se vyvinulo současné stanovení konzervačních látek jako je kyselina sorbová a benzoová, lysozym a natamycin v těstovinách filata a v sýrech. Jednotný způsob detekce a kvantifikace konzervačních přísad v sýrech, jako jsou kyseliny benzoová a sorbová, natamycin a lysozym, je založený na RP-HPLC s UV detekcí. Konzervační přísady byly získány z různých sýrů a odděleny od sebe touto jednoduchou RP-HPLC pomocí gradientové eluce. Zpětně získané výtěžky byly vždy vyšší než 91%. RDS byla v rozmezí od 1 % do 7 %. Pomocí kalibračních křivek se provedla kvantifikace. Tato metoda měla uspokojivé výsledky [44].

6.3 Shrnutí metod ke stanovení konzervantů v potravinách

Většinou je kyselina sorbová stanovována jako analyt v různé matrici s jinými konzervanty nebo jinými látkami, ale nejčastěji však s kyselinou benzoovou. Je stanovována hlavně pomocí HPLC, GC, elektromigračních metod a modifikovanými chromatografickými metodami. V následující tabulce budou uvedeny souhrnné výsledky nalezených metod stanovení.

6.3.1 Tabulka

Tabulka č.1: Přehled metod ke stanovení kyseliny sorbové a jiných látek v různých maticích

Typ metody	Analyzovaná látka	Matrice	Detektor	Limit detekce	Poznámky	Zdroj
HPLC	KS, kyselina benzoová	limonády, šťávy, omáčky a džemy	-	1,2 a 0,9 ng/ ml	spojení in-tube pevné fáze mikroextrakce	(26)
	KS, kyselina benzoová a skořicová kyselina	šťávy a nealkoholické nápoje	diodové pole	0,16,1,8, 0,18 mg/l	se sorpční extrakcí	(29)
	KS, kyselina benzoová	Tabasco omáčka	UV detekce, diodové pole	-	-	(30)
	KS, kyselina benzoová, sacharin	víno	-	-	-	(33)
	KS, kyselina benzoová	rýžové víno thajské, destiláty	-	0,2 KB, 0,1 KS mg/l	s extrakcí pevným sorbentem	(34)
	KS, kyselina benzoová, methylparaben a propylparaben	nealkoholické nápoje, džemy, omáčky, konzervované ovoce, zelenina, sušené zeleniny a ovoce	-	-	-	(36)
	KS, kyselina benzoová	brazílské potraviny-ovocné šťávy, margaríny, jogurty a sýry	diodové pole	-	-	(38)
	KS, kofeinu, sacharin, kyselina benzoová	nealkoholické nápoje a nektary v Portugalsku	UV detekce	-	-	(39)
	kyselina sorbová	margarín, máslo	fluorescence, UV a Vis detekce	-	-	(41)
	Fotometrie	KS, sorbyl CoA	-	-	-	-
GC	KS,kyselina benzoová	nápoje	-	0,2 mg/ l	s ionizačním plamenovým ionizátorem	(27)
	KS,	moč	hmotnostní	0,7	-	(37)

			spektrometrie	ng/ml		
					moči	
superkritická fluidní chromatografie	KS, kyselina benzoová, kofein	nápoje	-	-	-	(28)
kapalinová chromatografie	KS, kyselina benzoová, kyselina citronová, hexamethylentetramin, lysozym Natamycin, Nisin	sýry	-	-	tandemově s hmotnostní spektrometrií, ionizace elektrosprejem	(31)
	kyselina sorbová	krémy	UV detekce	-	-	(35)
2D izotachofórze	KS, benzoát, sorban, citrát a ortofosfát	nápoje	vodivosti a UV-Vis	0,85 -3,1 mg / l	-	(32)
micelární elektrokinetická kapilární chromatografie	KS, kyselina benzoová	nápoje	-	-	-	(42)
kapilární zónová elektroforéza	KS, kyselina askorbová	ovocné šťávy	UV detekce	1,70 KA, 0,54 KS mg/l	-	(43)

Legenda tabulky:

KS...kyselina sorbová

KB ...kyselina benzoová

KA ...kyselina askorbová

GC ...plynová chromatografie

HPLC ...vysoce účinná plynová chromatografie

- ... data nebyla prostudována

7 Závěr

Cílem této práce bylo vytvoření přehledu o potravinovém konzervantu - kyselině sorbové, jeho účinku na organismus, jeho toxicitě a shromáždění informací o metodách, díky nimž se tato látka v potravinách stanovuje.

První část, teoretická, pojednává o obecných informacích o přídatných látkách, jejich podsoškách – konzervantech, konkrétně o kyselině sorbové. Zde byly studovány její limity, povolená množství, jež jsou dané legislativou státu, a její vlastnosti, do kterých patří toxicita, karcinogenita a mutagenita. Podle studií, které jsou stručně uvedeny i v analytické části, bylo zjištěno, že kyselina sorbová a její soli obsažené v potravinách nejsou organismu, v dávkách, které povolují normy, nijak škodlivé.

Analytická část obsahuje nejprve shrnutí metod, používající se ke stanovení konzervantů v potravinách. V této práci se mapují metody za posledních desítek let. Je tu tedy možno sledovat vývoj a modernizaci těchto metodik. Jelikož se kyselina sorbová do určitých potravin přidává často, je nutné pomocí těchto metod potraviny kontrolovat, a proto se tyto metody neustále vyvíjejí. Bylo zjištěno, že za posledních 10 let se původní metoda HPLC již nevyužívá tak často, jako spíše modifikovaná HPLC a techniky, které s ní mohou být kombinované a vylepšené. Stále se rozvíjí kolony (revezní HPLC) a mobilní fáze (gradientový tok). Společně s těmito metodami nastal velký rozvoj také pro GC metody tandemované s hmotnostní spektrometrií a elektromigrační separace. U těchto separací se využívá široké spektrum detektorů, např. vodivostní detektory, které jsou využívány hlavně v posledních sedmi letech.

Díky detektorům se začala rozvíjet také laboratorní počítačová technologie, která většinou podává přesné a správné výsledky. Jejich softwarové programy velmi usnadňují práci a vyhodnocují výsledky automaticky a srozumitelně. Většinou jsou spojeny se statistickými a grafickými programy.

Snaha o zpřesnění, zdokonalování a urychlení analýzy potravin, farmaceutických výrobků i jiných látek, vede také k vylepšování preanalytických fází, např. derivatizace a extrakce vzorků (při analýze GC a složitých matic).

K analýzám se začaly hojně využívat velmi rychlé a jednoduché enzymové a radiační metody, kterých se využívá k navázání protilátek na analyt.

Kyselina sorbová a jiné konzervační látky nejsou, až na výjimky, tělem syntetizovány. Proto jsou do organismu přijímány převážně jako xenobiotika, se kterými se tak jedinec musí vypořádat. Tyto látky totiž za určitých okolností vytvářejí různé patologické změny, tím poškozují buňky, různé enzymy, tkáně a jiné části organismu. Hodnoty a limity těchto látek je nutné neustále kontrolovat. Díky metodám, které jsou v této práci uvedeny, se analýza konzervačních látek neustále modernizuje a tím se usnadňuje kontrola přídatných látek a kvalita potravin.

8 Seznam literatury

1. **Přídavné látky (aditiva).** *Státní zemědělská a potravinářská inspekce.* Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&nid=11324&chnum=1&hl=konzervanty> [2.2.2013]
2. INGR I.: **Základy konzervace potravin,** *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita,* Brno, 1999, ISBN 80-7157-396-5
3. Vyhlášky č. 304/2004 Sb., stanovující druhy a podmínky použití přídavných a pomocných látek při výrobě potravin
4. VRBOVÁ T.: **Víme, co jíme aneb průvodce „Éčky” v potravinách,** *EcoHouse, Praha,* 2001, str. 268, ISBN 80-238-7504-3
5. **Přídavné látky v potravinách.** *Vědecký výbor pro potraviny.* Dostupné z: http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/adit_2003_1_deklas.pdf [15.3.2013]
6. WOOD R., FOSTER L., DAMANT A. , KEY P.: **Analytical Methods for Food Additives.** 1. vydání, *Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC,* 2004, ISBN 1 85573 722 1, str. 320
7. CAUVAIN S. P.: **Bread Making: Improving Quality,** 1. Vydání, *Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC,* 2003, str. 502, ISBN 1 85573 553 9
8. KULSHRESHTHA A.K., SINGH O.N., WALL M. G.: **Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing,** *AAPS,* 2010, str. 121, ISBN 978 1 4419 1086 8
9. Předpis č. 4/2008 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídavných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4/souvislosti> [18.3.2013]

10. VELÍŠEK J.: **Chemie potravin 3.**, 1. Vydání, Tábor : *OSSIS*, 1999, str. 368, ISBN 80-902391-5-3.
11. WALKER R.: **Toxicology of sorbic acid and sorbates**, č. 7, 1990, str. 671 – 676
12. DESHPANDE S. S.: **Handbook of Food Toxicology**, *Marcel Dekker, Inc.*, New York, 2002, str. 271, ISBN 0 8247 0760 5
13. **Fyzikálně- chemická charakteristiká kyseliny sorbové.** Dostupné z:
http://hplc1.sweb.cz/Preservatives/ch_sorbic.htm [2.2.2013]
14. **Emulgátory. Seznam éček. Kyselina sorbová.** Dostupné z:
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E200>[2.2.2013]
15. **Emulgátory. Seznam éček. Sorban vápenatý.** Dostupné z:
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E203>[2.2.2013]
16. **Emulgátory. Seznam éček. Sorban draselný.** Dostupné z:
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E202>[2.2.2013]
17. **Emulgátory. Seznam éček. Sorban sodný.** Dostupné z:
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E201>[2.2.2013]
18. FERRAND C., MARC F., FRITSCH P., CASSAND P., BLANQUAT G.: **Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food conditions**, *Amino Acids*, svazek 18, vydání 3., květen 2000, str. 251 -263
19. MARTÍNEZ-ELEZ P., SOLIVA-FORTUNY R., MARTÍN-BELOSSO O.: **Oxidative rancidity in avocado purée as affected by α -tocopherol, sorbic acid and storage atmosphere**, *European Food Research and Technology*, svazek 226, vydání 1-2, listopad 2007, str. 295-300,

20. MISCHEK D., KRAPFENBAUER-CERMAK C.: **Exposure assessment of food preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid) in Austria**, *Food Additives and Contaminants Part a-chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, svazek 29, vydání 3, 2012, str. 371-382
21. CASADO F. J., SÁNCHEZ A. H., REJANO L. A OSTATNÍ: **Stability of sorbic and ascorbic acids in packed green table olives during long-term storage as affected by different packing conditions, and its influence on quality parameters**, *Food Chemistry*, svazek 122, vydání 3, říjen 2010, str. 812-818
22. GUILLARD V., ISSOUPOV V., REDL A. A OSTATNÍ: **Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial rating**, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, svazek 10, vydání 1, leden 2009, str. 108-115
23. CAMPOS C., ALZAMORA S. M., GERSCHENSON L. N.: **Sorbic acid stability in meat products of reduced water activity**, *Meat Science*, svazek 41, vydání 1, 1995, str. 37-46
24. HOFER K., JENEWEIN D.: **Enzymatic determinativ of sorbic acid**, *European Food Research and Technology*, svazek 211, vydání 1, červen 2000, str. 72-76
25. CHERVALOS E., TZATZARAKIS M., TSATSAKIS A., PETRIKKOS G.: **Controlled release of water-soluble polymeric complexes of sorbic acid with antifungal activities**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, svazek 57, vydání 5-6, prosinec 2001, str. 770-775
26. WEN Y., WANG Y., FENG Y.: **A simple and rapid method for simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in food using in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, svazek 388, vydání 8, srpen 2007, str. 1779-1787
27. KOKYA T. A., FARHADI K., KALHORI A. A.: **Optimized Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Determination of Sorbic Acid and Benzoic Acid in Beverage Samples by Gas Chromatography**, *Food Analytical Methods*, svazek 5, vydání 3, červen 2012, str. 351-358

28. BERGER T. A., BERGER B. K.: **Rapid Direct Quantitation of the Preservatives Benzoic and Sorbic Acid (and Salts) Plus Caffeine in Foods and Aqueous Beverages Using Supercritical Fluid Chromatography**, *Chromatographia*, svazek 76, vydání 7-8, duben 2013, str. 393-399
29. LIN F., NONG S., HUANG X., YUAN D.: **Sensitive determination of organic acid preservatives in juices and soft drinks treated by monolith-based stir cake sorptive extraction and liquid chromatography analysis**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, svazek 405, vydání 6, únor 2013, str. 2077-2081
30. CHEN ZY., LIU W., CUI ZW., A DALŠÍ.: **Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Tobacco Sauce by Ultra Performance Liquid Chromatography**, *Asian Journal of Chemistry*, svazek 24, vydání 11, listopad 2012, str. 4923-4925
31. FUSELLI F., GUARINO C., LA MANTIA A. A DALŠÍ.: **Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Journal of Chromatography B-analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, svazek 906, říjen 2012, str. 9-18
32. JASTRZEBSKA A., KURZAWA M., HRYNCZYSZYN P., SZLYK E.: **Determination of Benzoate, Sorbate, Citrate and Orthophosphate ions in Beverage Samples Using Two-dimensional Isotachopheric Method**, *Journal of Analytical Chemistry*, svazek 67, vydání 2, únor 2012, str. 172-178
33. ZHANG YL., GAO JS., WANG H.: **Research on High Pressure Liquid Chromatography Method of Benzoic Acid, Sorbic Acid, Saccharin Sodium in Wine**, *Proceedings of the Seventh International Symposium Viticulture and Enology*, 2011, str. 260-267
34. TECHAKRIENKRAI I., SURAKARNKUL R.: **Analysis of benzoic acid and sorbic acid in Thai rice wines and distillates by solid-phase sorbent extraction and high-performance liquid chromatography**, *Journal of Food Composition and Analysis*, svazek 20, vydání 3-4, květen 2007, str. 220-225

35. ALUOCH-ORWA J., QUINTENS I., HOOGMARTENS J.: **Quantitative analysis of sorbic acid in pharmaceutical team formulations by liquid chromatography on poly (styrene - divinylbenzene)**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, svazek 5, vydání 3, květen 1997, str. 155 -161
36. SAAD B., BARI F., IDIRIS M. S., KAMARUDZAMAN A. A OSTATNÍ: **Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, svazek 1073, vydání 1-2, květen 2005, str. 393-397
37. RENNER T., BAER-KOETZLE M, SCHERER G.: **Determination of sorbic acid in urine by gas chromatography–mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, svazek 847, vydání 1-2, červen 1999, str. 127-133
38. TFOUNI S. A. V., TOLEDO M. C. F.: **Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food**, *Food Control*, svazek 13, vydání 2, březen 2002, str. 117-123
39. LINO C. M., PENA A.: **Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment**, *Food Chemistry*, svazek 121, vydání 2, červenec 2010, str. 503-508
40. MOTA F. J. M., FERREIRA I., CUNHA S., BEATRIZ M. A OSTATNÍ: **Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs**, *Food Chemistry*, svazek 82, vydání 3, srpen 2003, str. 469-473
41. BURINI G., DAMIANI P.: **Determination of sorbic acid in margarine and butter by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**, *Journal of Chromatography*, svazek 543, 1991, str. 69-80
42. PANT I., TRENERRY V. C.: **The determination of sorbic acid and benzoic acid in a variety of beverages and foods by micellar electrokinetic capillary chromatography**, *Food Chemistry*, svazek 53, vydání 2, 1995, str. 219-226

43. TANG Y., WU M.: **A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis**, *Talanta*, svazek 65, vydání 3, únor 2005, str. 794-798
44. GUARINO CH., FUSELLI F.K, LA MANTIA A., LONGO L.: **Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses**, *Food Chemistry*, svazek 127, vydání 3, srpen 2011, str. 1294-1299
45. **Strukturní vzorec kyseliny sorbové**. Dostupné z:
http://hplc1.sweb.cz/Preservatives/Figures/sorbic_acid.PNG [16.4.2013]