

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Jana Petruchová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza syntetických potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie

Jana Petruchová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana Petruchová**
Osobní číslo: **C15257**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Analýza syntetických potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V dostupné literatuře vyhledejte a popište práce zabývající se analýzou potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie. Popište základní principy zmiňovaných metod. Uveďte základní dělení barviv podle struktury a využití.
2. V laboratoři proveďte optimalizaci separace vybraných standardů barviv a analýzu potravinářských vzorků.
3. Získané výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Jana Petruchová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce, panu doc. Ing. Petru Česlovi, PhD. za jeho odborné vedení, rady, poskytnutý čas a ochotu. Dále bych ráda poděkovala své rodině za umožnění studia a jejich plnou podporu.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá stanovením syntetických potravinářských barviv pomocí kapalinové chromatografie. Teoretická část se věnuje dělení, charakteristice a užití syntetických potravinářských barviv. Dále pak principu a instrumentaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie se zaměřením na hydrofilní interakce včetně možností stanovení barviv v různých potravinách či tělních tekutinách. Experimentální část je zaměřena na možnost separace těchto barviv pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie.

KLÍČOVÁ SLOVA

analýza, barviva, hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, kapalinová chromatografie, syntetická potravinářská barviva

TITLE

Analysis of synthetic food dyes using liquid chromatography.

ANNOTATION

Bachelor thesis deals with determination of synthetic food dyes by liquid chromatography. Theoretical part is devoted to classification of food dyes, their characteristics and using of synthetic food dyes. Then principle and instrumentation of liquid chromatography with specialization on hydrophilic interactions including options of determination of dyes in variable foodstuffs or body fluids. Experimental part is focused to option of separation of these dyes by using hydrophilic interaction liquid chromatography.

KEYWORDS

analysis, dyes, hydrophilic interaction liquid chromatography, liquid chromatography, synthetic food dyes

OBSAH

0	ÚVOD	11
1	TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1	Potravinářská barviva	12
1.1.1	Přírodní potravinářská barviva.....	13
1.1.2	Syntetická potravinářská barviva identická s přírodními	13
1.1.3	Syntetická potravinářská barviva.....	13
1.1.3.1	Azobarviva	15
1.1.3.1.1	Tartrazin	15
1.1.3.1.2	Ponceau 4R.....	16
1.1.3.1.3	Červeň Allura	17
1.1.3.2	Triarylmethanová barviva	17
1.1.3.2.1	Patentní modř V	18
1.1.3.2.2	Zeleň S	18
1.1.3.3	Xanthenová barviva.....	19
1.1.3.3.1	Erythrosin.....	19
1.1.3.4	Chinolinová barviva	20
1.1.3.4.1	Chinolinová žluť	20
1.1.3.5	Indigoidní barviva	21
1.1.3.5.1	Indigotin	21
1.2	Kapalinová chromatografie.....	22
1.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	23
1.2.1.1	Instrumentace	24
1.2.1.1.1	Čerpadla	24
1.2.1.1.2	Směšovací zařízení.....	25
1.2.1.1.3	Zařízení pro dávkování vzorku	25
1.2.1.1.4	Chromatografické kolony.....	25

1.2.1.1.5	Detektory.....	26
1.2.2	Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie.....	27
1.2.2.1	Mobilní fáze.....	27
1.2.2.2	Stacionární fáze	28
1.2.2.3	Mechanismus separace	29
1.3	Analýza syntetických potravinářských barviv kapalinovou chromatografií	29
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
2.1	Přístroje.....	33
2.2	Kolona a separační podmínky.....	33
2.3	Chemikálie	33
2.4	Postup analýzy	33
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4	SHRNUTÍ.....	39
5	CITOVANÁ LITERATURA	40
6	PŘÍLOHY	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Tartrazin	16
Obrázek 2: Ponceau 4R.....	16
Obrázek 3: Allura červeně.....	17
Obrázek 4: Patentní modř V	18
Obrázek 5: Zeleň S	19
Obrázek 6: Erythrosin.....	20
Obrázek 7: Chinolinová žlut'	21
Obrázek 8: Indigotin	22
Obrázek 9: Schéma HPLC chromatografu	24
Obrázek 10: Isokratická eluce pro směs barviv při 90 % (v/v) ACN.....	35
Obrázek 11: Gradientová eluce pro směs barviv, (A) gradient 1, (B) gradient 2, (C) gradient 3, (D) gradient 4.....	36
Obrázek 12: Gradientová eluce pro analyzované nápoje, (A) Bubee Pinky Fruit, (B) Powerade Mountain Blast.....	37
Obrázek 13: Gradientová eluce pro cukrovinku Skittles, (A) žlutý bonbón, (B) fialový bonbón, (C) růžový bonbón	38
Tabulka 1: Vlastnosti vybraných detektorů	27
Tabulka 2: Gradientový profil s objemovými procenty mobilní fáze	32
Tabulka 3: Objemové poměry H ₂ O(A) a CH ₃ CN (B) pro gradientovou eluci.....	34
Tabulka 4: Retenční časy standardů při isokratické eluci pro dvě opakování.....	35
Tabulka 5: Přírodní potravinářská barviva [56].....	48
Tabulka 6: Syntetická potravinářská barviva.....	49

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	Acetonitril
ADI	Přijatelný denní příjem
DAD	Detektor diodového pole
ECD	Detektor elektronového záchytu
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FLD	Fluorescenční detektor
HILIC	Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
JECFA	Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva
LC	Kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	Spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
NPLC	Kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
PDA	Detektor fotodiodového pole
PEEK	Polyetheretherketon
RPLC	Kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SPE	Extrakce tuhou fází
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

0 ÚVOD

Barviva jsou nedílnou součástí dnešního života a konkrétně barva potravin je jedním z prvních aspektů ovlivňující spotřebitele, protože dříve, než dané jídlo ochutnáme, ovlivňuje naše smysly barva, kdy nám třeba červené potraviny mají připomínat chuť jahod, malin, lesních plodů, nebo žlutá barva chuť vanilky či citronu.

Hlavní dělení potravinářských barviv je na barviva přírodní a syntetická. Za první syntetické potravinářské barvivo je považován fialový mauvein, syntetizovaný z anilinu, který objevil Sir William Henry Perkin v roce 1856 ve snaze syntetizovat chinin. William H. Perkin se pak i nadále věnoval syntéze umělých barviv, protože bylo zjištěno, že jsou mnohem stabilnější, jejich příprava levnější, a že můžeme získat širokou škálu odstínů pestrých barev, což vedlo k téměř celému nahrazení barviv přírodních. Avšak nové věci se ihned stávají středem pozornosti, a tak se lidstvo začalo zabývat zdravotními aspekty těchto syntetických barviv. Postupně byla některá barviva omezena nebo zakázána, přičemž i v současné době jsou přísně hlídána a testována za zjištění, zda nezpůsobují rakovinotvorná nebo jiná onemocnění. Pro analýzu syntetických potravinářských barviv je navrženo plno metod, ale jednou z nejvyužívanějších je kapalinová chromatografie. Za zmínku stojí i další metody zabývající se stanovením potravinářských barviv, a těmi jsou metody elektroanalytické nebo různé elektroforetické metody.

Rešeršní část této bakalářské práce se zabývá potravinářskými barvivy, kde je uvedeno jejich základní dělení, a především dělení syntetických potravinářských barviv, kde jsou provedeny stručné charakteristiky daných skupin barviv, s výčtem povolených barviv, které jsou taktéž uvedeny v příloze. Jednotlivé skupiny barviv jsou rozšířeny o vybraná barviva, ke kterým jsou uvedeny základní fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich možnosti použití. V této práci je taktéž věnována pozornost, v oblasti kapalinové chromatografie, HPLC, kde byla popsána především její instrumentace. Určitá pozornost je věnována i fázovému systému HILIC, který byl použit v experimentální části. Cílem této práce bylo nejen rozšíření dosavadních znalostí v oblasti syntetických potravinářských barviv a hydrofilní interakční kapalinové chromatografie, ale také zjištění, zda se touto metodou vybraná barviva vůbec dělí.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Potravinářská barviva

Potravinářská barviva jsou přídatné látky, které se do potravin přidávají za účelem zlepšení jejich dosavadních barev. Důvodem jejich použití je ztráta původní barvy potravin během procesu výroby, vlivem působení světla, vyšších teplot a dalších fyzikálních faktorů. Dále mohou sloužit k dodání barvy potravinám, které by jinak byly bezbarvé, k vylepšení potravin, jejichž barva není celistvá, či jen z důvodu marketingu, aby došlo ke zvýšení atraktivity výrobku [1].

Běžně jsou označována E kódem, tedy písmenem E a trojčíslicím 1xx, které nabývá hodnot 100 až 182 a platí celosvětově. Seznam povolených barviv v České republice je uveden v příloze (Tabulka 5 a 6). Mezi nepovolená přírodní potravinářská barviva patří Flavoxanthin (E161a), Kryptoxanthin (E161c), Rubixanthin (E161d), Violoxanthin (E161e), Rhodoxanthin (E161f), Šafrán (E164), Santalové dřevo (E166) a Orchil (E182) a mezi nepovolená syntetická potravinářská barviva patří Žlut' 2G (E107), Citronová červeň (E121), Červeň 2G (E128), Fast green FCF (E143) a Hněď FK (E154).

Jsou i potraviny, do kterých se barviva nesmí přidávat. Jedná se o minerální a pramenité vody, neochucené mléčné výrobky a do mléka samotného, tuků a olejů živočišného i rostlinného původu, kojenecké výživy, mouky, cukru, medu, masa, kořenících přípravků a dalších [1]. Avšak existují i výjimky, jako u másla, které se může dobarvovat karoteny či chleba, kam je možné přidat karamel. Veškeré další výjimky upravuje vyhláška č. 4/2008 Sb. §6 [2].

Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, se v §6 zabývá barvivy. Tento §6 pojednává o povolených barvivech a jejich povolených množstvích v potravinách, o situacích, kdy látka způsobuje zbarvení, ale není za barvivo považována, o případech, kdy nelze využít barviva při výrobě potravin, o barvivech určených k razítkování a dekoračnímu barvení skořápky vajec nebo o vymezení barviv, která nelze využít k účelu prodeje spotřebiteli [2]. Přičemž vyhláška č. 4/2008 Sb. byla v roce 2010 novelizována vyhláškou č. 130/2010 Sb., kde v §6 ruší odstavce 2 a 4 [3].

Obecně jsou pro potravinářská aditiva, jakožto i barviva, ale i další látky vymezeny přijatelné denní dávky (ADI – Acceptable Daily Intake), které jsou obvykle uváděny

v jednotkách mg dané látky na kg tělesné hmotnosti za den. Těmito hodnotami, ale i jinými věcmi se zabývají instituty EFSA (European Food Safety Authority) a JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). EFSA neboli Evropský úřad pro bezpečnost potravin je Evropská agentura založena Evropskou unií (EU), za účelem poskytnutí nezávislého vědeckého poradenství v oblasti rizik souvisejících s bezpečností potravin, krmiv, výživou, zdravím a blahem zvířat a taktéž i zdravím a ochranou rostlin. Navíc EFSA funguje nezávisle na Evropské legislativě, Evropských výkonných orgánech (parlament, komise) i členských státech EU. Díky tomu jí nic nebrání ve vytvoření včasných opatření pro spotřebitele [4]. Kdežto JECFA je Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva. Tento výbor je řízen společně Organizací spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO – Food and Agriculture Organization) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO – World Health Organization). JECFA se obvykle schází dvakrát za rok a zabývá se posuzováním rizik v oblasti nejen potravinářských aditiv, ale i reziduí veterinárních léčiv v živočišných produktech, přírodními toxiny a kontaminanty [5]. ADI povolených syntetických potravinářských barviv jsou uvedeny v příloze (Tabulka 6).

Potravinářská barviva se dělí na tři základní skupiny:

- Přírodní barviva
- Syntetická barviva identická s přírodními
- Syntetická barviva

1.1.1 Přírodní potravinářská barviva

Tato barviva mohou být původu rostlinného, živočišného, mikrobiálního nebo z nerostných zdrojů. Mohou se dělit na základě několika hledisek, a to podle chemické struktury, barev či zdroje původu [6]. Za největší výhodu přírodních barviv je považována jejich zdravotní nezávadnost, avšak více převažují nevýhody jako jejich barevná nestálost, odlišnosti barvy jednotlivých šarží, dodání nežádoucí chutě a vůně, náchylnost k napadení mikroorganismy a další [1].

1.1.2 Syntetická potravinářská barviva identická s přírodními

Tato barviva jsou vyráběna synteticky, ale jejich chemická struktura odpovídá přírodním. Mezi taková barviva patří β -karoten či riboflavin [7].

1.1.3 Syntetická potravinářská barviva

Syntetická potravinářská barviva byla v minulosti vyráběna z uhelného dehtu, avšak v současnosti jsou výchozími složkami vysoce rafinované ropné produkty [8]. Jsou

nejen levná, ale také vynikají svými intenzivními barvami a větší stabilitou než barviva přírodní. Dále nedochází k ovlivnění vůní a chutí, a kombinacemi jednotlivých barviv můžeme získat celou škálu odstínů, které nám přírodní barviva neposkytnou. Do určitého množství jsou zdravotně nezávadná [1; 9]. Přesto může při použití syntetických barviv docházet k negativním účinkům, jako jsou alergie, kopřivka či hyperaktivita, a to především u dětí. Proto je stále větší snaha o minimalizaci používání syntetických barviv a návratu k přírodním [10].

Jsou dostupná ve formě sulfonovaných sloučenin, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě nebo ve formě aluminiových laků, které jsou naopak ve vodě nerozpustné a lze je využít hlavně k barvení potravin obsahující více tuků. Ve srovnání se sulfonovanými barvivami tyto laky vykazují vyšší tepelnou i chemickou stabilitu [9].

V případě barviv Tartrazin (E102), Chinolinová žlut' (E104), Žlut' SY (E110), Azorubin (E122), Ponceau 4R (E124) a Allura červec' (E129) je třeba na obalech potravin uvádět doplňující informaci s názvem nebo E číslem daného barviva/barviv, že mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí, jak uvádí Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 v článku 24, jenž se odkazuje na přílohu V [11]. Poměrně málo využitelné barvivo je Litholrubin BK (E180), který je podle nařízení 1129/2011 možné v rámci EU použít jen pro barvení jedlé kůry sýrů [12].

Dělit se mohou podle několika hledisek:

a) Podle struktury molekuly

- **Azobarviva** – charakteristickým znakem je azoskupina propojující aromatické kruhy, které jsou často sulfonovány v podobě sodných solí
- **Triarylmethanová** – charakteristickým znakem jsou tři aromatické kruhy (arylové zbytky) propojené uhlíkem
- **Xanthenová** – základem je heterocyklus xanthen
- **Chinolinová** – základem je chinofalon, tedy cyklický keton s konjugovaným systémem vazeb
- **Indigoidní** – základem jsou dva indoxyly propojené dvojnou vazbou přes uhlíky č. 2

b) Podle rozpustnosti

- Rozpustná ve vodě
- Rozpustná v tucích

c) Podle fyzikálně chemických vlastností

- Kyselá
- Zásaditá
- Neutrální [9]

K barvivům rozpustným v tucích typicky patří barvivo Sudan I-IV, což jsou aromatická azobarviva červené barvy, která se používají především k barvení olejů a vosků. K barvení potravin jsou však zakázána pro jejich potenciální karcinogenní účinky. Ale i tak se mohou vyskytovat v potravinách dovážených ze zahraničí, a to především v mletém chilli, různých kořenících směsích, rajčatových produktech nebo palmových olejích [13; 14].

1.1.3.1 Azobarviva

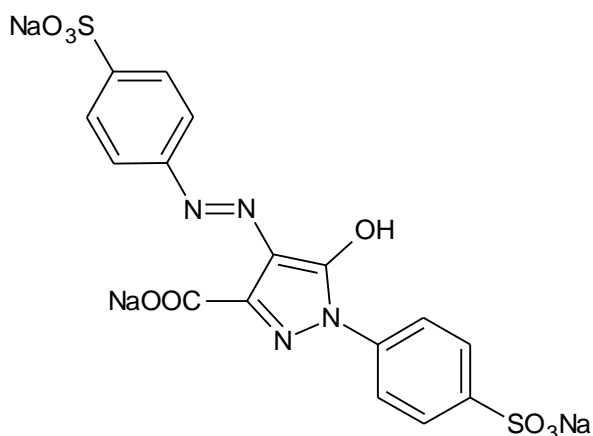
Mezi povolená azobarviva v ČR patří Tartrazin (E102), Žlutý SY (E110), Azorubin (E122), Amarant (E123), Ponceau 4R (E124), Červená Allura (E129), Černá BN (E151), Hněď HT (E155) a Litholrubin BK (E180).

Tato barviva obsahují minimálně jednu azoskupinu, kdy na každé straně je navázán minimálně jeden aromatický kruh, který je obvykle pro zajištění větší polarity sulfonován. Podle množství navázaných cyklů rozlišujeme mono-, di-, tri- a případně polyazobarviva [15]. Azobarviva obecně jsou rozsáhle používaná barviva, zabírají okolo 65 % trhu, a jejich využití je nejen v potravinářském průmyslu, ale také při barvení oděvů, hraček, kůží, plastů a kosmetiky. Při požití azobarviv dochází k jejich anaerobní redukci ve střevech pomocí bakterií rodu *Clostridium* a dalších hepatocytárních bakterií, které obsahují azoreduktasy, způsobující štěpení azo vazby za vzniku aromatických aminů [16].

1.1.3.1.1 Tartrazin

Systematický název: trisodná sůl 5-hydroxy-1-(4-sulfonátofenyl)-4-(4-sulfonátofenylazo)-H-pyrazol-3-karboxylátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 1)



Obrázek 1: Tartrazin

Sumární vzorec: $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$

Molekulová hmotnost: 534,37 g/mol [10, s. 264]

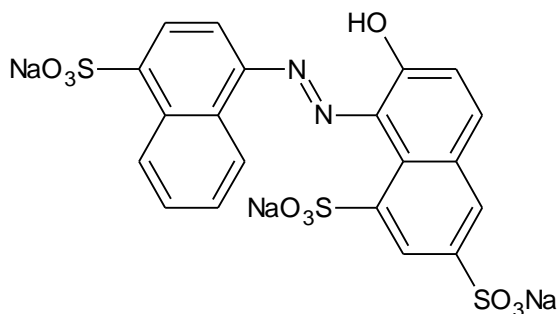
Synonyma: C.I. 19140 (Potravinářská žlut' 4), FD&C Yellow No.5, CAS 1934-21-0

Charakteristika: Hydrofilní sloučenina aniontové povahy, dostupná jako žlutooranžový prášek nebo granule. Dobře rozpustná ve vodě, glycerolu i koncentrované kyselině sírové, kde vytváří žluté roztoky, avšak je téměř nerozpustná v ethanolu [17]. Vyniká dobrou stabilitou a světlostálostí. V potravinách může být obsažena v různých směsích koření, ovocných džusech, konzervovaném ovoci, hořčicích, či zmrzlině [18, s. 93].

1.1.3.1.2 Ponceau 4R

Systematický název: trisodná sůl 2-hydroxy-1-(4-sulfonáto-1-naftylazo)naftalen-6,8-disulfonátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 2)



Obrázek 2: Ponceau 4R

Sumární vzorec: $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$

Molekulová hmotnost: 604,46 g/mol

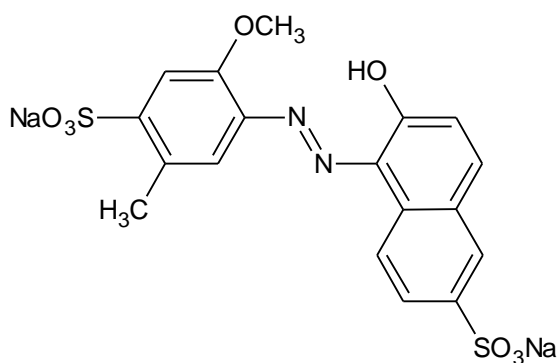
Synonyma: C.I. 16255 (Potravinářská červeň 7), Košenilová červeň A, New Coccine, CAS 2611-82-7

Charakteristika: Dostupná jako červený prášek a granule, velmi dobře rozpustná ve vodě a špatně v ethanolu. Má dobrou tepelnou a světelnou stabilitu. Lze jej kombinovat s jinými barvivy a je přidávána především do nealkoholických nápojů, sladkostí, zmrzlin nebo žvýkaček [17; 18].

1.1.3.1.3 Červeň Allura

Systematický název: disodná sůl 2-hydroxy-1-(2-methoxy-5-methyl-4-sulfonaftofenylazo) naftalen-6-sulfonátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 3)



Obrázek 3: Allura červeň

Sumární vzorec: C₁₈H₁₄N₂Na₂O₈S₂

Molekulová hmotnost: 496,42 g/mol

Synonyma: C.I. 16035 (Potravinářská červeň 17), Červeň AC, FD&C Red No. 40, CAS 25956-17-6

Charakteristika: Dostupná jako červeno-hnědý prášek, ve vodě a v kyselém prostředí vytváří červeně zabarvený roztok, v bazickém prostředí tmavě červený. V ethanolu je prakticky nerozpustná. Používá se k barvení nealkoholických nápojů, zmrzlin, dezertů a sladkostí [17; 18].

1.1.3.2 Triarylmethanová barviva

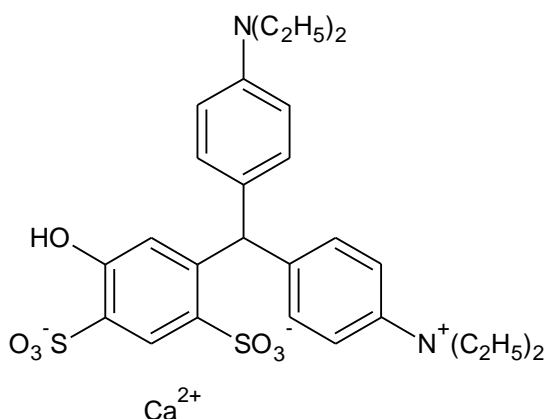
K povoleným potravinářským triarylmethanovým barvivům patří Patentní modř V (E131), Brilantní modř FCF (E133) a Zeleň S (E142).

Základem triarylmethanových barviv je centrální uhlík, na kterém jsou navázány tři aromatické kruhy, které jsou substituovány aminoskupinou, hydroxylovou či sulfonovou skupinou a v *para* poloze mohou obsahovat substituovaný amin [10]. Jejich základní dělení je na trifenylmethanová barviva (C.I. 42 000-43875), difenylnaftylmethanová barviva (C.I. 44 000-44 100) a deriváty trifenylmethanových barviv (C.I. 44 500-44 535) [19].

1.1.3.2.1 Patentní modř V

Systematický název: vápenatá nebo sodná sůl 2-[(4-diethylaminofenyl)-(4-diethylimino-2,5-cyklohexandien-1-yliden)methyl]-4-hydroxy-1,5-benzendisulfonátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 4)



Obrázek 4: Patentní modř V

Sumární vzorec: sodná sůl: $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Na$, vápenatá sůl: $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2 \frac{1}{2} Ca$

Molekulová hmotnost: sodná sůl: 528,68 g/mol, vápenatá sůl: 579,72 g/mol [10, s. 266]

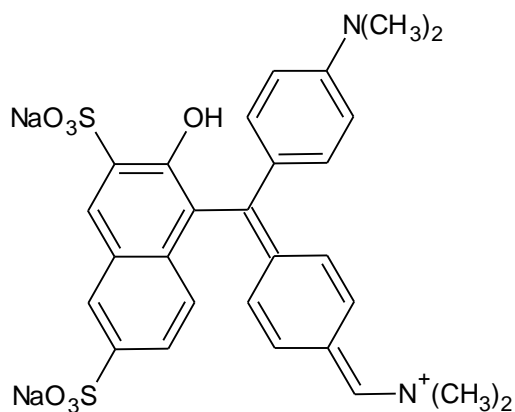
Synonyma: C.I. 42051 (Potravinářská modř 5), CAS 3536-49-0

Charakteristika: Dostupná jako modrý prášek či granule. Dobře rozpustná ve vodě, ale špatně v ethanolu [17]. Může se kombinovat s Tartrazinem nebo Chinolinovou žlutí za vzniku zelené barvy. Používá se například k barvení cukrovinek a alkoholických nápojů [18, s. 101].

1.1.3.2.2 Zeleň S

Systematický název: disodná sůl 5-[4-(dimethylamino)- α -(4-dimethyliminocyklohexa-2,5-dienyliden)benzyl]-6-hydroxy-7-sulfonáto-naftalen-2-sulfonátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 5)



Obrázek 5: Zeleň S

Sumární vzorec: $C_{27}H_{25}N_2Na_2O_7S_2$

Molekulová hmotnost: 576,63 g/mol [10, s. 266]

Synonyma: C.I. 44090 (Potravinářská zeleň 4), Brilantní zeleň BS, CAS 3087-16-9

Charakteristika: Dostupná jako tmavě modrý nebo tmavě zelený prášek a granule. Rozpustná ve vodě a trochu i v ethanolu, kde vytváří modrozelené až modré roztoky [17]. Ve spojení s Tartrazinem a Chinolinovou žlutí slouží pro přípravu zelených odstínů, ale také hnědé a černé barvy v kombinaci s jiným barvivem. Může být obsažena v konzervovaném hrášku, nealkoholických nápojích a cukrovinkách [18, s. 105]

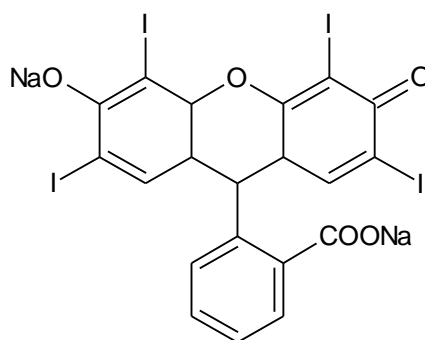
1.1.3.3 Xanthenová barviva

Základem těchto barviv je xanthen s amino- nebo hydroxy- skupinou v poloze *meta*, přičemž je k hlavnímu kruhu připojen další aromatický kruh. Mezi jediné povolené xanthenové barvivo patří Erythrosin (E127) [10].

1.1.3.3.1 Erythrosin

Systematický název: monohydrát disodné soli 2-(2,4,5,7-tetrahydro-3-oxido-6-oxoxanthen-9-yl)benzoátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 6)



Obrázek 6: Erythrosin

Sumární vzorec: $C_{20}H_6I_4Na_2O_5 \cdot H_2O$

Molekulová hmotnost: 897,88 g/mol [10, s. 267]

Synonyma: C.I. 45430 (Potravinářská červen 14), FD&C Red 3, CAS 568-63-8

Charakteristika: Dostupný jako červenohnědý prášek nebo granule. V neutrálním vodném prostředí vytváří červený roztok, v kyselém žlutohnědou sraženinu a v alkalickém červenou sraženinu [17]. Vyniká dobrou stabilitou vůči zahřívání a vysokou stabilitou i v přítomnosti oxidu siřičitého. V EU je povolen přídavek pouze do třešňových koktejlů a kandovaných třešní [18, s. 99, 100].

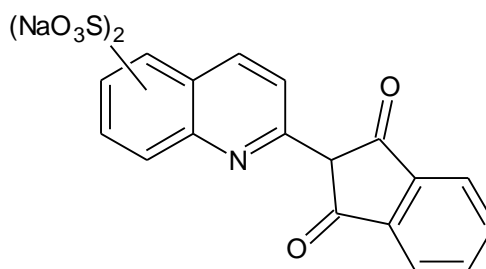
1.1.3.4 Chinolinová barviva

Chinolinová barviva obsahují pouze malé množství derivátů, kdy jediným povoleným barvivem v ČR je Chinolinová žlut' (E104) [10]. Jak vyplývá z názvu, obsahují chinolin neboli benzopyridin, jehož deriváty mají velký význam v lékařství. Tyto deriváty mají plno příznivých vlastností jako jsou antimalarické, antimikrobiální a antivirotické účinky, také mají příznivý vliv na snížení vysokého krevního tlaku nebo mohou být součástí antidepresiv [20].

1.1.3.4.1 Chinolinová žlut'

Systematický název: disodná sůl 2-(2-chinoly)indan-1,3-diondisulfonátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 7)



Obrázek 7: Chinolinová žlut'

Sumární vzorec: C₁₈H₉NNa₂O₉S₂

Molekulová hmotnost: 477,38 g/mol [10, s. 268]

Synonyma: C.I. 47005 (Potravinářská žlut' 13), CAS 8004-92-0

Charakteristika: Dostupná jako žlutý prášek a granule, která je směsí monosulfonátu s převahou disulfonátu [17]. Vyniká dobrou tepelnou stabilitou, světlostálostí a odolává i ovocným kyselinám a oxidu siřičitému. Je dobře rozpustná ve vodě a používá se k přípravě potravin zelenožluté barvy, nejčastěji nealkoholických nápojů, cukrovinek, omáček a koření [18, s. 94]

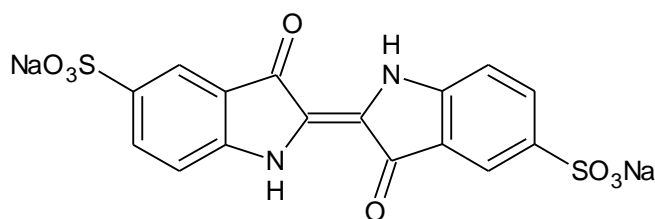
1.1.3.5 Indigoidní barviva

Indigoidní barviva jsou založena na syntéze Indiga, což je přírodní barvivo, které lze taktéž získat z rostliny *Indigofera tinctoria* L., neboli indigovníku pravého. Syntetická příprava Indiga spočívá v reakci fenyglycinu s taveninou hydroxidu sodného a draselného s přídavkem amidu sodného, která vede ke vzniku indoxylu, který se spontánně oxiduje a dimerizuje za vzniku Indiga [15]. Nejvýznamnějším syntetickým potravinářským barvivem této skupiny je Indigotin (E132).

1.1.3.5.1 Indigotin

Systematický název: disodná sůl 3,3'-dioxo-2,2'-bi-indolylden-5,5'-disulfonátu

Strukturní vzorec: (viz Obrázek 8)



Obrázek 8: Indigotin

Sumární vzorec: $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$

Molekulová hmotnost: 466,36 g/mol [10, s. 268]

Synonyma: C.I. 73015 (Potravinářská modř 1), FD&C Blue No. 2, CAS 860-22-0, Indigo karmín

Charakteristika: Dostupný jako modro-hnědý až červeno-hnědý prášek a granule. Je rozpustný ve vodě, kdy v neutrálním prostředí vytváří modrý roztok, v kyselém prostředí modrofialový a v bazickém prostředí žlutozelený až zelený roztok. V ethanolu je méně rozpustný než ve vodě [17; 18] V organických rozpouštědlech jako je benzen a chloroform, je nerozpustný [21]. Často se používá v kombinaci s jinými barvivy a je přidáván do nealkoholických nápojů, sladkostí, pečiva a zmrzlin [18, s. 102]. Svůj význam má také v lékařství, kde je používán na testování ledvinných funkcí, k endoskopickému vyšetření rakoviny žaludku a k úpravě katetru při chemoterapii jaterních nádorů [22].

1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC – Liquid Chromatography) je separační metoda založena na mnohonásobném ustanovení rovnováhy separovaných složek směsi mezi stacionární (pevnou) a mobilní fází (pohyblivou), které jsou navzájem nemísitelné. Mobilní fází je tedy kapalina a stacionární fází buď pevná látka nebo kapalina, kdy převažuje právě látka pevná. Vzorek je nanášen na začátek stacionární fáze a je unášen mobilní fází, v závislosti na interakcích mezi dělenou směsí a stacionární fází, přičemž dochází k postupnému dělení směsi [23].

Kapalinovou chromatografií je možné dělit na základě několika kritérií:

- a) Podle separačního mechanismu
 - Adsorpční chromatografie
 - Rozdělovací chromatografie
 - Ionově-výměnná chromatografie
 - Gelová permeační chromatografie
 - Afinity chromatografie
- b) Podle uspořádání stacionární fáze
 - Kolonová (sloupcová) chromatografie
 - Plošná (planární) chromatografie
 - Papírová chromatografie
 - Tenkovrstvá chromatografie
 - Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
- c) Podle pracovního provedení
 - Eluční chromatografie
 - Vytěšňovací chromatografie
 - Frontální chromatografie
- d) Podle účelu
 - Analytická
 - Preparativní

1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

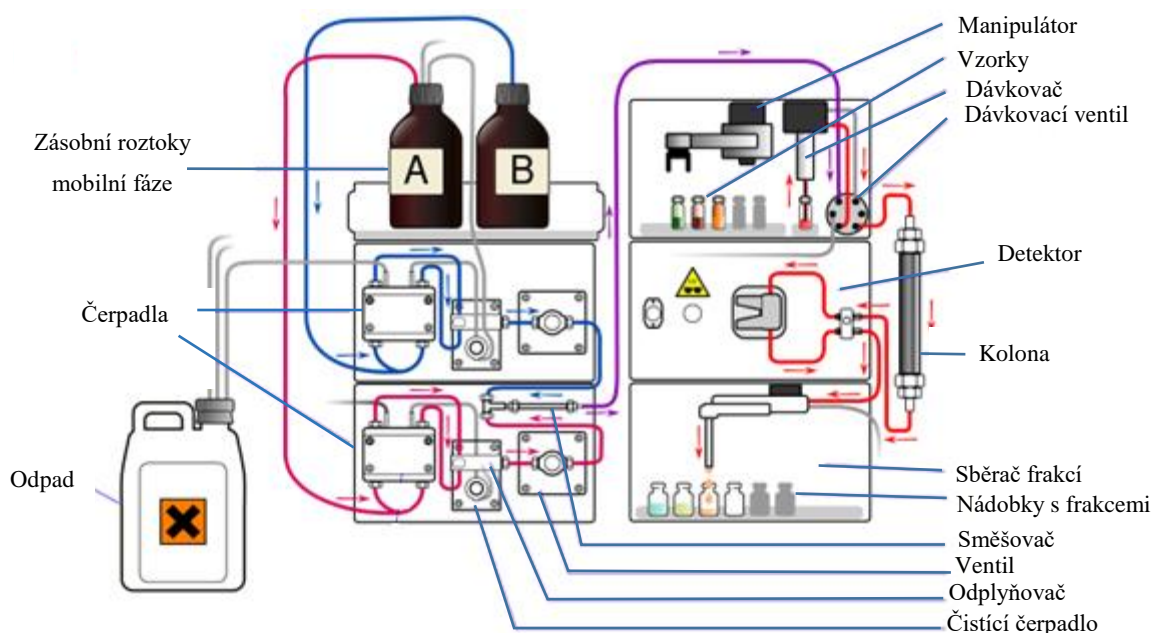
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je jedna z nejčastěji používaných separačních technik, jež vyniká svou rychlostí, účinností a dobrou opakovatelností. Je vhodná pro separaci širokého spektra látek od jednoduchých molekul až po polymerní sloučeniny.

Například pro analýzu netěkavých organických sloučenin je výhodnější užití metody HPLC oproti plynové chromatografii, jelikož sloučeniny jsou rozpuštěné, a zároveň i analyzované v roztoku, kdy je často dostačující pro separaci pokojová teplota [17].

Největší rozvoj HPLC nastal v 70. letech minulého století, kdy bylo docíleno optimalizace kolon, systému pro dávkování vzorku, tak aby nebylo třeba zastavení toku mobilní fáze a průtokových detektorů. Na automatizaci měl významný podíl rozvoj počítačové techniky, která umožňovala lepší zpracování dat a snazší ovládní přístroje [24].

1.2.1.1 Instrumentace

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je založena na použití vysokých tlaků (až 150 MPa) k pohánění mobilní fáze a analytu přes stacionární fázi v koloně, která je naplněna mikro částicemi. Kapalinový chromatograf (Obrázek 9) je konstruován z několika základních částí, mezi něž patří zásobníky mobilní fáze, čerpadla, čidlo pro měření tlaku, dávkovač vzorku, kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení tvořené z počítače, integrátoru nebo zapisovače. Jako další doplňující zařízení mohou obsahovat filtry, odplyňovací zařízení, či jímač frakcí.



Obrázek 9: Schéma HPLC chromatografu¹

1.2.1.1.1 Čerpadla

Vysokotlaká čerpadla se používají pro dávkování mobilní fáze, která je díky čerpadlu poháněna dál přes kolonu až do detektoru. Jsou schopná pracovat do tlaků typicky 40 MPa, ale novější jsou schopna pracovat až na 150 MPa. Čerpadla musí být sestavena z takových materiálů, jako je nerezová ocel nebo titan, které odolají chemické korozi i agresivním mobilním fázím (organickým rozpouštědlům, tlumivým roztokům). Čerpadla musí nasávat mobilní fázi plynule a bez kolísání při pracovních tlacích s předem určeným průtokem. Pro práci s analytickými kolonami se používá průtok od 0,1 do 10 ml/min a pro práci s mikrokolonami od 0,001 do 0,1 ml/min [24; 26]

¹ převzato a upraveno podle [25]

1.2.1.1.2 Směšovací zařízení

V případě užití dvou a více mobilních fází nebo gradientové eluce, je třeba, aby chromatograf obsahoval směšovací zařízení, které mísí kapaliny podle aktuálních požadavků. Toto zařízení může pracovat za atmosférického tlaku, v případě že je umístěné před vysokotlakým čerpadlem, nebo ve vysokých tlacích, kdy je umístěné mezi čerpadlem a kolonou. Nízko-tlaké směšování je oproti vysokotlakému levnější, avšak je zde vysoké riziko vzniku bublinek, a proto je třeba aby v tomto případě, bylo zařízení doplněno o odplyňovač mobilní fáze [27].

1.2.1.1.3 Zařízení pro dávkování vzorku

Nejjednodušší možností je přímý nástřik pomocí injekční stříkačky na začátek kolony, avšak touto metodou nezískáváme dostatečně dobrou reprodukovatelnost, a tudíž se nehodí pro kvantitativní analýzu. Navíc tuto metodu nelze použít při pracovních tlacích vyšších než cca 5 MPa [24]. Lepších výsledků dosahujeme pomocí dávkovacího ventilu, kdy není třeba zastavení toku mobilní fáze. Dávkovací ventil má dvě polohy, plnicí a zaváděcí. Obsahuje smyčku, která je plněna za atmosférického tlaku a po přepnutí polohy je vzorek následně unášen za vysokého tlaku mobilní fází. Ventil je možné ovládat manuálně nebo funguje jako automatický dávkovač [28].

1.2.1.1.4 Chromatografické kolony

Používají se kolony náplňové, jejichž obal je nejčastěji z nerezové oceli, ale můžeme se setkat také s kolonami z titanu, tvrzeného skla nebo plastických hmot, jako je polyetereterketon (PEEK) [28]. Konce kolon jsou opatřeny fritami, aby nedošlo k odplavení náplně, a jsou uloženy v termostátové skříni. Mohou mít délku od 3 cm do 30 cm s vnitřním průměrem 0,5 až 4 mm. Své vysoké účinnosti dosahují díky částicím, kterými jsou naplněny, jejichž střední průměr se pohybuje mezi 1 a 10 μm . Kvůli takovým velikostem, je třeba pracovat s vyššími tlaky (do 40 MPa), aby bylo dosaženo určitého průtoku mobilní fáze a přijatelné doby analýzy [26]. Náplně jsou nejčastěji ze silikagelu nebo jeho chemických modifikací, dále mohou být z oxidu hlinitého, zirkoničitého, grafitického uhlíku, agarosy, hydroxyapatitu, nebo ze styren-divinylbenzenu [26; 29]. Částice náplně mohou být pórovité, povrchově pórovité, pelikulární nebo pórovité mikroparticulární [24].

Pro poměrně vysoké pořizovací ceny HPLC kolon je třeba zajistit jejich co nejdelší životnost. Kolony obvykle poškozují mechanické částice v závislosti na jejich velikosti. Ty větší ($>2 \mu\text{m}$) zpravidla ucpávají póry frit, menší částice, které procházejí fritou, se usazují

v pórech sorbentu. Oba případy vedou ke zvýšení tlaku. Před mechanickými nečistotami je možné kolony chránit filtrací mobilní fáze i vzorku. Jinou možností je použití předfiltrů, umístěných před kolonou nebo užitím předkolon [30].

1.2.1.1.5 Detektory

Současné detektory jsou nejčastěji koncentrační, tzn. poskytují signál úměrný hmotnostní koncentraci látek v eluátu. Výjimkou jsou hmotnostně-spektrometrické detektory a detektory fungující na základě rozptylu světla, jejichž odezva je úměrná látkovému množství separovaných složek vzorku [26]. Rozlišujeme:

- **UV/Vis detektory** – jsou založeny na absorpci monochromatického světla, o vlnové délce v rozsahu 190–800 nm, chromofory v eluátu. Jsou tvořeny třemi základními částmi (zdrojem monochromatického světla, průtočnou celou a detekčním zařízením, kterým je fotodioda nebo fotonásobičová trubice). Lze je rozdělit na detektory s fixní vlnovou délkou, s volitelnou vlnovou délkou a detektory fotodiodového pole (PDA – Photodiode array) Vynikají svou jednoduchostí, spolehlivostí, jsou relativně levné i poměrně citlivé [31].
- **Fluorescenční detektory** (FLD – Fluorescence detector) – jsou založeny na absorpci ultrafialového záření a následném uvolnění části excitační energie ve formě fluorescenčního záření, které má nižší energii a delší vlnovou délku. Je vysoce citlivý a selektivní, navíc látky nefluoreskující můžeme převést na fluoreskující deriváty vhodnými činidly [29; 31].
- **Elektrochemické detektory** (ECD – Electron Capture Detector) – měří procházející proud způsobený oxidací nebo redukcí látek na povrchu pracovní elektrody, na kterou je vkládáno konstantní napětí. ECD jsou tvořeny třemi elektrodami, pomocnou, referenční a měrnou, která může být ze skelného uhlíku, grafitové pasty, zlata, platiny, niklu, mědi nebo rtuti [32]. ECD je vhodný při užívání polární mobilní fáze, tudíž pro měření v systému s obrácenými fázemi a při iontové výměnné separaci. Pro svou dobrou cenu a výkon je vhodný pro rutinní měření biologických a enviromentálních vzorků [31].

K dalším detektorům patří vodivostní, refraktometrický, coulometrický, hmotnostní spektrometr, ELSD detektor (Evaporative Light Scattering Detector), spektrometrický detektor pracující v infračervené oblasti spektra, detektor diodového pole a mnohé další [29; 31]. Shrnutí jednotlivých vlastností výše popsaných detektorů můžeme porovnat v Tabulce č. 1.

Tabulka 1: Vlastnosti vybraných detektorů²

	UV/Vis	FLD	ECD
Měřená odezva	Absorbance	Intenzita fluorescence	El. proud
Destruktivita	Nedestruktivní	Nedestruktivní	Destruktivní
Gradientová eluce	Ano	Ano	Ne
Minimální detekovatelná koncentrace [g/ml]	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^{-12}$
Selektivita	Střední	Velmi vysoká	Vysoká
Robustnost	Výborná	Dobrá	Špatná
Závislost odezvy na průtoku	Ne	Ne	Ano

1.2.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Název hydrofilní interakční kapalinová chromatografie neboli HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) byl navržen v roce 1990 Andrew J. Alperem [34], přičemž v současné době je tento fázový systém považován jako kombinace kapalinové chromatografie v systému s normálními fázemi (NPLC – Normal Phase Liquid Chromatography), kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RPLC – Reversed Phase Liquid Chromatography) a iontové chromatografie (IC – Ion Chromatography). Stacionární fáze je polární jako u NPLC, avšak mobilní fáze je obdobná jako u RPLC, kterou je směs vody a polární organické látky jako je acetonitril (ACN) [35]. V případě, že je voda v mobilní fázi nahrazena jinou polární látkou, nejčastěji alkoholem, jako je methanol, ethanol nebo jiný, jedná se o nevodnou HILIC metodu (NA-HILIC, *non-aqueous HILIC*) [36].

Metoda HILIC je vhodná pro separaci polárních látek, jejichž retence je v RPLC příliš nízká, a naopak v NPLC, kde se používají nepolární organické mobilní fáze, je retence příliš vysoká [37]. Mezi první separované látky touto metodou patřily sacharidy, peptidy a fosforylované aminokyseliny nebo oligonukleotidy [34]. V současné době má vysoké využití v oblasti analýzy životního prostředí, potravin, léčiv a tenzidů [37].

1.2.2.1 Mobilní fáze

Jak již bylo zmíněno, mobilní fáze je polární a nejčastěji obsahuje jako hlavní komponentu ACN. Ten zaujímá ve směsi více jak 50 % (v/v), přičemž větší množství obvykle

² převzato a upraveno dle [31; 33]

vede ke zvýšení afinity sorbentu vůči hydrofilním látkám [34]. Dalšími polárními příměsemi může být kromě ACN i aceton, který má nejnižší eluční sílu, propanol, dioxan nebo methanol, který má hned po vodě největší eluční sílu [35]. Z toho plyne, že eluční síla roste s rostoucí polaritou rozpouštědla. Dále je doporučeno, aby byla voda pufrována, protože obsažení pufru v eluentu vede ke snížení elektrostatických interakcí mezi nabitými analyty a silanovými skupinami stacionární fáze, což obvykle vede ke snížení retence [38]. Nejčastěji užívanou solí je octan amonný, ale můžeme se setkat i s mravenčanem amonným, kyselinou trifluoroctovou [39], fosforečnanem triethylaminu nebo chloristanem sodným [40].

1.2.2.2 Stacionární fáze

Mezi první používané stacionární fáze patřil nemodifikovaný oxid křemičitý, jehož jednou z vlastností je, že neuvolňuje ligandy, což je vhodné pro užití v kapalinové chromatografii ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (případně LC/MS/MS), kde by uvolněné ligandy mohly způsobit falešné píky ve spektru. V těsné návaznosti byl používán oxid křemičitý s chemicky navázaným aminopropylem, který spadá do amino-modifikovaných silikagelů. Tato stacionární fáze byla používána jako první vázaná stacionární fáze pro běžnou separaci uhlovodíků [38]. Polární, chemicky vázané, stacionární fáze jsou obvykle připravovány chemickou reakcí, kdy dochází k modifikaci povrchu silikagelu. Jako činidla jsou používány trialkoxysilany obsahující polární a alkylové skupiny [41]. K dalším užívaným modifikovaným silikagelům patří stacionární fáze s chemicky vázanými amidovými, diolovými, nitrilovými, cyklodextranovými a polysukcinoimidovými polárními skupinami, od kterých jsou odvozené další stacionární fáze, které užívají obchodní názvy jako PolyGlycoplex, PolyHydroxyethyl A, PolyCAT A, nebo PolySulfoethyl A [42]. K částicovým náplním patří i organické polymerní materiály, jako je styren-divinylbenzenová pryskyřice, které obsahují zwitteriontové nabitě povrchové skupiny nebo iontoměničce [41]. Tyto iontově-výměnné pryskyřice jsou vhodné pro separaci silně polárních látek, avšak neelektrolytů jako jsou sacharidy, kdy bylo prokázáno že retence těchto látek se zvyšuje se zvyšující se koncentrací ethanolu při užití mobilní fáze ethanol-voda [43].

Odlišným typem jsou monolitické kolony, jejichž náplň je jednodílná a připravována přímo v koloně. Tyto náplně zajišťují vyšší permeabilitu kolony a tím i rychlejší separaci v závislosti na pracovním tlaku, který je vhodnější volit nižší. Monolitické kolony jsou založeny opět na oxidu křemičitém nebo se jedná o organické polymery [41].

Jelikož se metoda HILIC poměrně rychle vyvíjí, je plno nových inovací v rámci kolon jako je například modifikace silikagelu aminokyselinami (cysteinem a cystinem) [44; 45], peptidy [46] a cyklopeptidy [47] nebo polymery, jak uvádí Li a kolektiv [48], jenž připravili modifikovaný silikagel s dendritickým polymerem, který vychází z aktivace silikagelových částic 3-aminopropyl-triethoxysilanem a následnou reakcí s 1,4-butandioldyglycidyl etherem, poté se epoxy skupina terminuje za pomoci anilinu. Celý proces je opakován třikrát, aby došlo k nárůstu dendritického polymeru na kvarterním aminu.

1.2.2.3 Mechanismus separace

Separace spočívá v tom, že dochází k tvorbě vodné vrstvy na povrchu náplně kolony. Vzniká tak difuzní vrstva s gradientem koncentrace vody směrem do mobilní fáze a stacionární fáze se pak chová jako přenašeč vody [49]. Dochází tak k distribuci látek přes tuto vrstvu, přičemž přispívají i proton-donor-akceptorové a iontové interakce s náplní kolony, také vodíkové můstky, což vede ke zvýšení retence [50].

1.3 Analýza syntetických potravinářských barviv kapalinovou chromatografií

V literatuře lze nalézt řadu prací, které se zabývají analýzou syntetických potravinářských barviv kapalinovou chromatografií [51-55] avšak nejčastěji využívanou metodou je HPLC.

Můžeme se ale setkat i s využitím tenkovrstvé chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) v kombinaci s iontovou párovou HPLC, jako to provedl de Andrade a kol. [51], kteří analyzovali brazilské sycené pomerančové a hroznové nápoje na přítomnost Tartrazinu, Amaranthu, Žlutí SY a Brilantní modři (E102, E123, E110, E133). Pro získání barviv byla provedena extrakce pevnou fází (SPE) s C18 kolonkou a následnou separací pomocí TLC s mobilní fází tvořenou 8 ml isopropylalkoholu a 3 ml hydroxidu amonného. Na základě výpočtu retardačního faktoru (R_f) pro standardy i vzorky, byla identifikována přítomnost jednotlivých barviv. Ke stanovení množství jednotlivých barviv byla použita iontová párová HPLC s PDA detektorem s vlnovou délkou 450 nm pro E102 a E110, 595 nm pro E133 a 525 nm pro E123. Byly použity dvě odlišné mobilní fáze, obě tvořené vodou a methanolem, avšak jedna obsahovala navíc 0,08 M octan amonný. Mobilní fáze bez octanu byla použita k isokratické analýze barviv a mobilní fáze obohacená o 0,08 M octan amonný, byla použita pro promytí kolony mezi jednotlivými analýzami. Závěrem je, že TLC poskytuje dostatečně rychlou identifikaci na přítomnost barviv, avšak v některých vzorcích, kde byla uvedena přítomnost Tartrazinu, nebyl analýzou nalezen či dokonce místo Tartazinu byla nalezena

přítomnost Žlutí SY. Dále jeden vzorek hroznového nápoje obsahoval vyšší množství barviva, než povoluje brazilská legislativa.

Analýzou potravinářských barviv ve vitamínech se zabývala Šuleková a kol. [52]. Analyzovali vitamíny A, C, D, E a B-komplex od různých výrobců, kde měla být přítomna syntetická potravinářská barviva jako Tartrazin, Žlutě SY, Ponceau 4R, Chinolinová žlutě (E102, E110, E124, E104) a jedno nesyntetické barvivo Košenila (E120). Se zjištěním λ_{MAX} jednotlivých barviv pomocí UV/Vis spektrofotometrie mohly provést kvantifikaci jednotlivých barviv pomocí RP-HPLC s DAD detektorem měřícím v rozmezí 190-800 nm, s kolonou se stacionární fází C18, temperovanou na 40 °C a isokratickou elucí. Jako mobilní fázi použili ACN a směs CH₃COONa:CH₃OH v poměru 10:90 (v/v) pro analýzu žlutě zbarvených kapslí a 20:80 (v/v) pro analýzu do červena zbarvených kapslí.

Příprava jednotlivých vzorků vitamínů spočívala ve zvážení, rozpuštění v teplé vodě, odplynění v ultrazvuku (15 min) a následné centrifugaci při 19 000 rpm po dobu 15 minut. Analyzováno bylo vždy 20 μ l vzorku po dobu 10 min s průtokem mobilní fáze 1,2 ml/min pro červené vitamíny a 1,0 ml/min pro žluté vitamíny. Zjištěné koncentrace barviv byly přepočítány a porovnány s ADI jednotlivých barviv a bylo zjištěno, že aby člověk překonal povolené ADI, musel by zkonzumovat řádově stovky, u některých vzorků i tisíce kapslí denně. Všechna barviva jsou tedy v přiměřeném množství v jednotlivých analyzovaných vitamínech.

Analýzou 11 syntetických potravinářských barviv pomocí HPLC s DAD detekcí se zabýval i Rejczak a kol. [53], kteří se věnovali stanovení barviv v nápojích, v tvrdých bonbonech a kaviárech. Nápoje byly před analýzou pouze zředěny, avšak pro bonbony byla využita extrakce pomocí SPE a extrakce disperzní tuhou fází (MSPD – Matrix Solid Phase Dispersion) pro kaviár. Ve vzorcích potravin byla hledána přítomnost Tartrazinu, Žlutě SY, Azorubinu, Amaranthu, Ponceau 4R, Červeně 2G, Allura červeně, Patentní modři, Brilantní modři, Brilantní zelení a Brilantní černí (E102, E110, E122, E123, E124, E128, E129, E131, E133, E142, E151). Pro RP-HPLC byla zvolena mobilní fáze tvořena vodou s 50 mM octanem amonným (A) a acetonitrilem (B) a kolonou s fenylovou stacionární fází, která je vázána etherovou vazbou. Dále byla použita gradientová eluce, kdy na začátku bylo udržováno 5 % (v/v) složky B, která pak lineárně stoupala na obsah 40 % během 20 minut s průtokem 1 ml/min. Celková analýza je cenově dostupná a s jednoduchou, robustní metodou HPLC-DAD se tak může stát vhodnou alternativou drahé LC-MS/MS v oblasti analýzy barviv.

Na rozdíl od převažujících článků zabývajících se stanovením barviv v potravinách, Li a kol. [54] analyzovali přítomnost Allura červeně (E129) nejen ve třech čínských pokrmech, ale také v moči, kterou získali od 103 dobrovolníků, kteří tato vybraná jídla konzumovali minimálně jednou týdně v posledních dvou letech. K analýze byla využita LC-MS/MS s využitím vnitřního standardu, a to trypanové modře, která je azobarvivem a strukturně podobná E124, avšak se nevyužívá jako potravinářské barvivo.

Analýza byla provedena gradientovou elucí tvořenou vodou (A) a methanolem (B), kdy obě mobilní fáze obsahovaly 20 mM octanu amonného. Vzorky jídla byly připraveny důkladným promícháním a lyofilizací, kdy okolo 50 mg prášku bylo vloženo do 2 ml zkumavky, kam byla přidána i směs methanolu s vodou (20:80, v/v) s 10 μ M trypanové modři. Směs byla dále odplyněna a centrifugována na 16000 rpm po dobu 10 min s chlazením na 4 °C. Supernatant byl odebrán a uskladněn při -80 °C do doby analýzy. Vzorky moči (90 μ l) byly taktéž smíchány s trypanovou modří (10 μ l) a 400 μ l směsi methanolu a ACN (50:50, v/v). Po centrifugaci byl supernatant použit k analýze. Jako kolona byla zvolena C18 kolona (150 \times 2,1 mm, 5 μ m), temperována na 30 °C, avšak teplota v autosampleru byla udržována na 4°C. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 300 μ l/min a její složení bylo v prvních 15 minutách 0-100 % B, 100 % B v 15-18 min, 0 % B v 18,1-23 min.

Výsledné množství Allura červeně v analyzovaných pokrmech se pohybovalo v rozmezích 2,85 až 8,38 mg/g nelyofilizované váhy. Po přepočítání bylo zjištěno, že kdyby 60 kg člověk snědl celou porci daného jídla, byla by překročena hodnota ADI. K určení množství E124 v moči, byla třeba stanovit koncentrace kreatininu, kde byla užitá metoda dle Jaffého. Medián E124 v moči byl 22,29 nM/mM kreatininu (95% interval spolehlivosti je mezi 19,48 a 25,03 nM/mM kreatininu). Dále podle jejich analýzy je možná spojitost mezi vyššími dávkami E129 a vysokým krevním tlakem, avšak pro potvrzení, by byla třeba analyzovat větší rozsah populace.

Jedním z nejnovějších článků zabývajících se analýzou syntetických potravinářských barviv je od Floriano a kol. [55], kteří analyzovali šest syntetických potravinářských barviv ve sportovních nápojích. Stanovovali Tartrazin, Žlut' SY, Amaranth, Ponceu 4R, Indigotin a Brilantní modř (E102, E110, E123, E124, E132, E133), které jako první vyextrahovali pomocí metody disperzní extrakce na pevné fázi (d-SPE). Následná analýza byla provedena pomocí HPLC techniky s UV/Vis detekcí, kdy detektor snímal analyty při λ_{MAX} jednotlivých barev a tj. při 430, 480, 510 a 610 nm. Byla použita C18 kolona (250 \times 4,6 mm, s 5 μ m

částicemi) a jako mobilní fáze byl použit 0,13 M octan amonný (A) a směs (B) methanolu s acetonitrilem (80:20 v/v). Analýza probíhala pomocí gradientové eluce, kdy profil tohoto gradientu je uveden v tabulce 2 s průtokem mobilní fáze 1,2 ml/min.

Tabulka 2: Gradientový profil s objemovými procenty mobilní fáze

t [min]	A [%]	B [%]
0	80	20
1	80	20
10	50	50
15	20	80
16	20	80
19	80	20

V tomto systému mělo nejnižší retenci E102 s retenčním časem 6,9 min, následovalo E123 (8,1 min), E132 (8,6 min), E124 (10,3 min), E110 (11,2 min) a jako poslední bylo vyloučeno E133 s retenčním časem 16,4 min. Výsledkem analýzy bylo, že množství barviv v analyzovaných nápojích se nacházelo v limitech Brazilské legislativy a že užití d-SPE je mnohem rychlejší a levnější pro extrakci barviv z nápojů než běžné SPE.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje

Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) sestavený z binárního čerpadla, autosampleru, termostatovaných kolon a UV detektoru s proměnnou vlnovou délkou

Ultrazvuková vana Sonorex (Bandelin, Berlín, Německo)

Stolní centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo)

Analytické váhy (Kern, Balingen, Německo)

2.2 Kolona a separační podmínky

Analýza byla provedena na koloně Kinetex HILIC, délka 100 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm . Teplota analýzy byla nastavena na 25 °C, analyty byly dávkovány s objemem 1 μl a průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min. Absorbance byla měřena při 240 nm.

2.3 Chemikálie

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Octan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Destilovaná voda – připravena na zařízení Mili-Q Reference system (MERCK Millipore, Darmstadt, Německo)

Sada syntetických potravinářských barviv UPa (E102, E124, E129)

Potravinové vzorky s možným obsahem studovaných barviv: BUBEE Pinky Fruit, POWERADE Mountain Blast, SKITTLES Crazy Sours

2.4 Postup analýzy

Byly připraveny čerstvé mobilní fáze octanu amonného, o koncentraci 50 mM, a acetonitrilu. Rozpuštěním přibližně 1 mg od každého syntetického potravinářského barviva (E102, E124, E129) v 1 ml destilované vody a jejich následným desetinásobným zředěním byly připraveny standardy jednotlivých barviv a jejich směs, u kterých byla provedena analýza isokratickou i gradientovou elucí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve fázovém systému HILIC. Použité poměry mobilních fází v gradientové eluci jsou uvedeny dále (Tabulka 3) i poměry pro isokratickou eluci s vyhodnocenými retenčními časy jsou taktéž uvedeny (Tabulka 4).

Dále byly analyzovány reálné vzorky, zakoupené v obchodním řetězci Albert. Vzorky nápojů byly připraveny o celkovém objemu 0,5 ml obsahující originální tekutinu a pak i 10x zředěné. Příprava nápojových vzorků byla doplněna o odplynění v ultrazvukové lázni a centrifugaci při 12000 rpm. Vzorky bonbonů byly rozpuštěny v 10 ml vody, taktéž byly centrifugovány a analyzovány byly nezředěné tak i 10x zředěné. Takto připravené vzorky byly analyzovány při gradientové eluci s gradientovým profilem č. 4 (Tabulka 3). Pro analýzy při isokratické i gradientové eluci byla nastavena doba analýzy na 10 minut. Přesnější použité podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 2.2. Kolona a separační podmínky.

Tabulka 3: Objemové poměry H₂O(A) a CH₃CN (B) pro gradientovou eluci

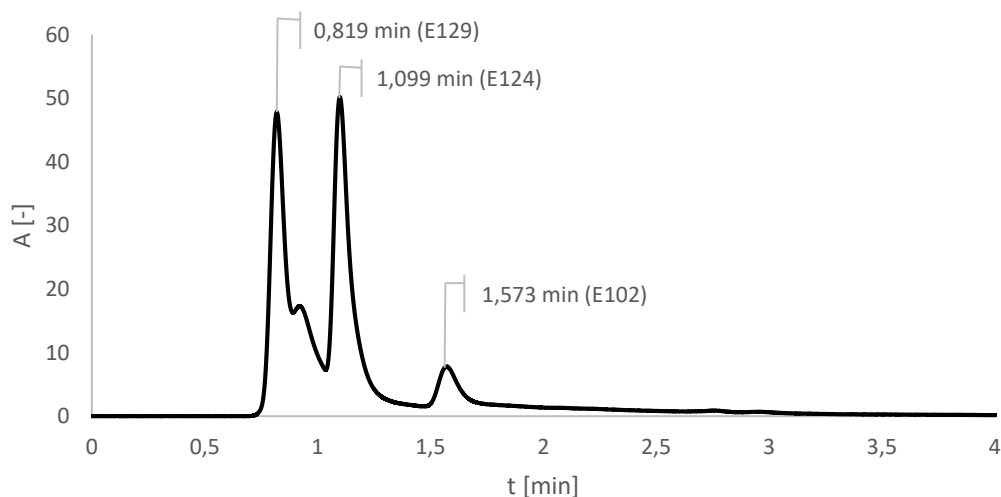
t [min]	Grad 1		Grad 2		Grad 3		Grad 4	
	A [%]	B [%]	A [%]	B [%]	A [%]	B [%]	A [%]	B [%]
0	1	99	10	90	20	80	1	99
8	80	20	30	70	40	60	60	40
9	80	20	30	70	40	60	60	40
10	1	99	10	90	20	80	1	99

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jako první byla provedena analýza standardů při isokratické eluci, kdy se měnily poměry ACN a H₂O od 40 % (v/v) po 1 % (v/v) vody (Tabulka 4). Ze zaznamenaných hodnot je dále patrné, že při větším množství vody se barviva téměř nedělila a že od 5 % (v/v) vody měla E102 tak vysokou retenci, že se ani nevytloučila. Nejlepšími separačními podmínkami, které byly prozkoumány, byla eluce s 10 % (v/v) vody, 90 % (v/v) ACN, (Obrázek 10).

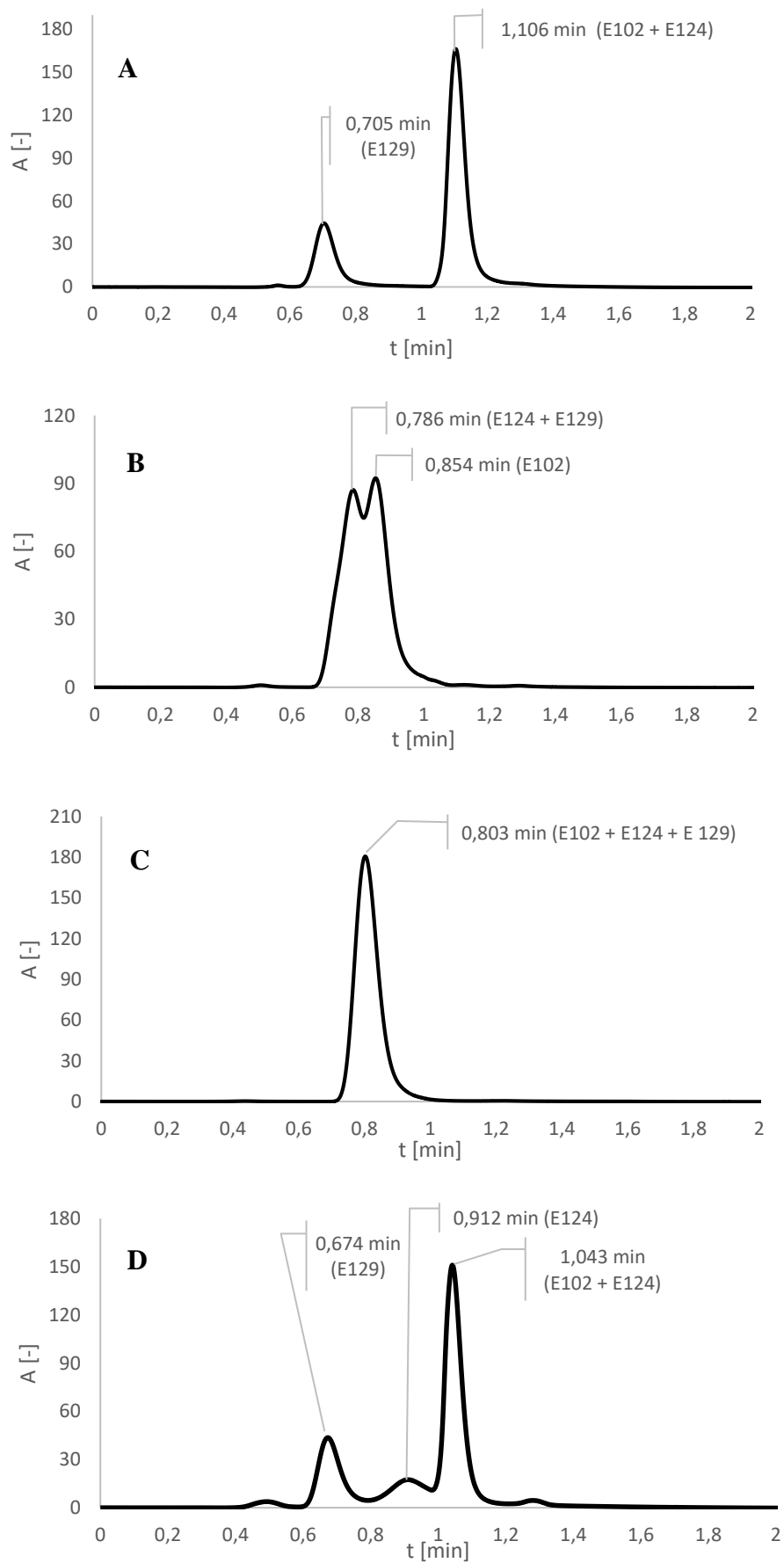
Tabulka 4: Retenční časy standardů při isokratické eluci pro dvě opakování

CH ₂ O [%]	t _{E102} [min]		t _{E124} [min]		t _{E129} [min]	
	1. měření	2. měření	1. měření	2. měření	1. měření	2. měření
40	0,798	0,797	0,798	0,796	0,807	0,807
30	0,818	0,819	0,811	0,812	0,811	0,811
20	0,892	0,892	0,851	0,849	0,818	0,818
10	1,573	1,573	1,099	1,098	0,819	0,821
5	-	-	0,923	0,925	0,793	0,791
4	-	-	0,791	0,789	0,769	0,769
3	-	-	0,727	0,727	0,751	0,75
2	-	-	0,674	0,675	0,765	0,768
1	-	-	1,134	1,14	1,13	1,129



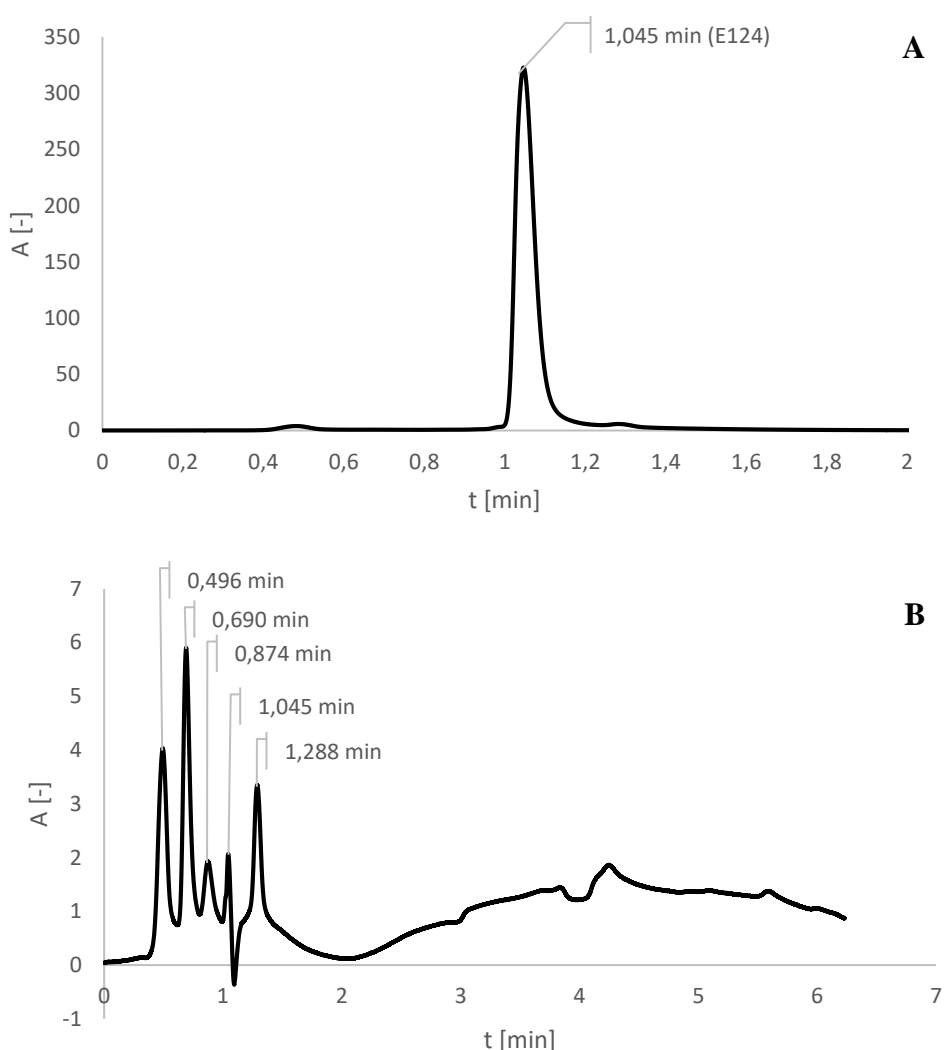
Obrázek 10: Isokratická eluce pro směs barviv při 90 % (v/v) ACN

Dalším krokem byla gradientová eluce, kdy byla provedena analýza při čtyřech různých gradientech, kde poměry ACN a vody jsou uvedeny ve výše zmíněné tabulce 3. Ze záznamů všech čtyř gradientů směsi standardů (Obrázek 11), můžeme vyčíst, že lepší dělení probíhalo při prudším nárůstu obsahu vody v mobilní směsi (Obrázek 11 A, D), a že při pomalém nárůstu obsahu vody se barviva nedělila (Obrázek 11 B, C).



Obrázek 11: Gradientová eluce pro směs barviv, (A) gradient 1, (B) gradient 2, (C) gradient 3, (D) gradient 4

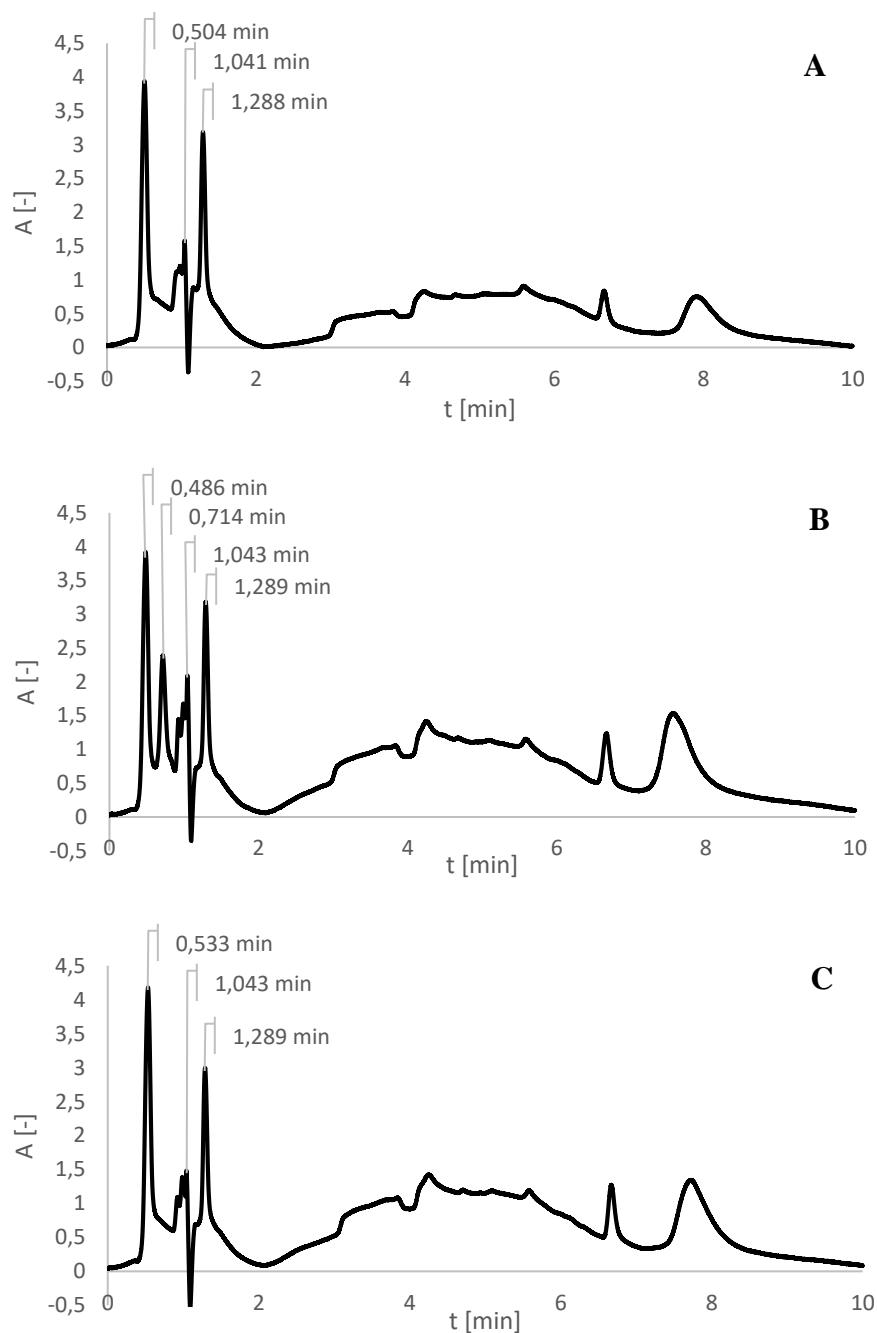
Pro analýzu reálných vzorků byl následovně zvolen gradient č. 4 (Obrázek 11 D), při kterém sice nedošlo k úplnému rozdělení směsi barviv, ale i tak je z daných gradientů nejlepší. Jelikož se při gradientu č. 3 (Obrázek 11 C) barviva vůbec nerozdělila, při gradientu č. 2 (Obrázek 11 B) v podstatě také ne a u gradientu č. 1 (Obrázek 11 A) se oddělila pouze E129. Jednotlivé záznamy separací vzorků potravin jsou taktéž uvedeny (Obrázek 12 a 13). Na nápoji Bubee byla ve složení uvedena přítomnost E124 (Ponceau 4R), a na nápoji Powerade barvivo E133 (Brilantní modř FCF). Můžeme se však domnívat, že jediný výrazný pík v záznamu nápoje Bubee (Obrázek 12 A) by odpovídal na přítomnost výrobcem uvedené E124, která se shoduje i s retenčním časem naší standardní směsi (Obrázek 11 D).



Obrázek 12: Gradientová eluce pro analyzované nápoje, (A) Bubee Pinky Fruit, (B) Powerade Mountain Blast

Dalšími analyzovanými potravinovými vzorky byla cukrovinka Skittles (Obrázek 13), kde ze směsi různých barev bonbonů byly zvoleny barvy bonbonů žlutá, fialová a růžová, přičemž výrobce Skittles ve složení výrobku uvádí přítomnost, kromě přírodních

potravinářských barviv i syntetická potravinářská barviva jako E132 (Indigotin) a E133 (Brilantní modř FCF).



Obrázek 13: Gradientová eluce pro cukrovinku Skittles, (A) žlutý bonbón, (B) fialový bonbón, (C) růžový bonbón

Avšak vzhledem k neprovedené analýze standardních barviv, přesněji E132 a E133, které byly taktéž obsaženy v potravinových vzorcích, nelze ani potvrdit skutečnou přítomnost barviv uvedených ve složení výrobku. Dále také kvůli absenci spektrálních záznamů jednotlivých barviv není jednoznačně možné určit obsah těchto barviv ve vzorcích.

4 SHRNU TÍ

Na základě provedené rešerše lze konstatovat, že kapalinová chromatografie, především HPLC, je velmi využívaná metoda pro analýzu syntetických potravinářských barviv v potravinách jako jsou nápoje, sladkosti, džusy, mléčné ale i masné výrobky. Přičemž nejčastěji používaným detektorem je DAD detektor případně spojení hmotnostního spektrometru s HPLC jako metoda tandemová spektrofotometrie.

Cílem experimentální části bylo zjištění, zda pomocí HPLC v systému HILIC lze separovat syntetická potravinářská barviva. V první fázi byla provedena isokratická eluce tří standardů barviv (E102, E124, E129), kdy bylo zjištěno, že k nejlepšímu dělení došlo při složení mobilní fáze $\text{CH}_3\text{COONa}:\text{CH}_3\text{CN}$ (10:90, v/v), kdy došlo k úplné separaci barviv. V další fázi byla provedena gradientová eluce, taktéž pomocí HILIC, kdy byly zkoumány celkem čtyři různé gradienty. Na základě analýzy standardů barviv se z těchto zvolených gradientů projevil jako nejvhodnější, ale ne dokonalý, gradient č. 4, který byl použit pro separaci potravinových vzorků. Nedokonalost gradientu č.4 spočívala v neúplném oddělení E102 a E124, což mohlo být způsobeno i použitím starších vzorků barviv nebo degradací standardů. Jelikož nebyla provedena spektrometrická analýza barviv s určením vlnové délky s maximální absorbancí, nebylo možné potvrdit skutečnou přítomnost daného barviva ve vzorku. Avšak byly alespoň porovnány retenční časy vybraných barviv.

Lze s jistotou říci, že se používání syntetický potravinářských barviv neustále zmenšuje, a to na základě potenciálních rizik z karcinogenních a mutagenních účinků, hyperaktivity dětí a alergických potíží, což se projevilo i při výběru potravinových vzorků, kdy například téměř veškeré červené a žluté nápoje, ale i jiné potraviny, jsou v současné době v České republice barveny výtažky z červené řepy, černé mrkve, karoteny nebo riboflavinem.

5 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] BABIČKA, Luboš. *Přídavné látky v potravinách: publikace České technologické platformy pro potraviny*. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2012, s. 13 - 15. ISBN 978-809-0509-634.
- [2] ČESKO. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídavných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2008, částka 3. ISSN 1211-1244.
- [3] ČESKO. Vyhláška č. 130/2010 kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídavných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2010, částka 46.
- [4] *European Food Safety Authority* [online]. [cit. 2018-03-28]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu>
- [5] *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [online]. 2018 [cit. 2018-03-28]. Dostupné z: <http://www.fao.org/home/en/>
- [6] SIGURDSON, Gregory, Peipei TANG a Mónica GIUSTI. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. 2017, **8**(1), 261-280 [cit. 2017-12-09]. DOI: 10.1146/annurev-food-030216-025923. ISSN 1941-1413. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-030216-025923>
- [7] MSAGATI, Titus. *The chemistry of food additives and preservatives*. Ames (IA): Wiley-Blackwell, 2013, p. 132 [cit. 2018-02-05]. ISBN 978-1-118-27414-9.
- [8] AMCHOVA, Petra, Hana KOTOLOVA a Jana RUDA-KUCEROVA. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, **73**(3), 914-922 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.09.026. ISSN 02732300. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230015300751>
- [9] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999, s. 186-187. ISBN 80-902391-5-3.

- [10] CLARK, Matthew, ed. *Handbook of textile and industrial dyeing: Applications of dyes*. Cambridge (UK): Woodhead Publishing Ltd, 2011, p. 253-268. ISBN 978-1-84569-696-2.
- [11] ČESKO. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2008.
- [12] Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2011, s. 241. ISSN 1977-0626.
- [13] *Dictionary of food science and technology*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2009, p. 408. ISBN 978-1-4051-8740-4.
- [14] Nepovolená barviva Sudan I - IV zatím české spotřebitele neohrožují, jsou však nebezpečná. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Brno, 2018 [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/nepovolena-barviva-sudan-i-iv-zatim-ceske-spotrebitele-neohrozuji-jsou-vsak-nebezpecna.aspx?q=JmNobnVtPTEmaGw9c3VkYW4%3d>
- [15] CHRISTIE, Robert M. *Colour chemistry*. 2nd ed. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry, 2015. ISBN 978-1-84973-328-1.
- [16] RAFII, F., J.D. HALL a C.E. CERNIGLIA. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*. 1997, **35**(9), 897-901. DOI: 10.1016/S0278-6915(97)00060-4. ISSN 02786915
- [17] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *Food chemicals codex* [online]. 10th ed. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention, 2016 [cit. 2018-05-09]. ISBN 978-1-5231-0167-2. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFCCE0031/food-chemicals-codex/food-chemicals-codex>
- [18] SALTMARSH, Mike. *Essential guide to food additives*. 4th ed. Cambridge (UK): RSC Publishing, 2013, p. 91-120. ISBN 9781849735605.

- [19] THETFORD, Dean, Elena RIGANTE, Inez VAN DER WERF a Lugia SABBATINI. Triphenylmethane a Related Dyes. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [online]. Hoboken (NJ), 2000, **127**, 229-239 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1002/0471238961.2018091620080520.a01. ISBN 0471238961. ISSN 01652370. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471238961.2018091620080520.a01>
- [20] NARWAL, Sangeeta, Sanjiv KUMAR a Prabhakar VERMA. Synthesis a therapeutic potential of quinoline derivatives. *Research on Chemical Intermediates*. 2017, **43**(5), 2765-2798. DOI: 10.1007/s11164-016-2794-2. ISSN 0922-6168. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11164-016-2794-2>
- [21] LEWIS, Richard J., ed. *Sax's dangerous properties of industrial materials*. 11th ed. Inc. Hoboken: Wiley&Sons, 2004, p. 1749. ISBN 9780471476627.
- [22] SATOH, Ken-ichi, Nozomu SAKAMOTO, Yutaka SHINOHE, Maki SATOH a Shigeharu JOH. Indigo Carmine-Induced Bradycardia in a Patient During General Anesthesia. *Anesthesia and Analgesia* [online]. 2001, **92**(1), 276-277 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1097/00000539-200101000-00056. ISSN 0003-2999. Dostupné z: https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2001/01000/Indigo_Carmine_Induced_Bradycardia_in_a_Patient.56.a.spx
- [23] SEIDLEROVÁ, Jana, Daniela PLACHÁ a Gabriela KRATOŠOVÁ. *Analytická chemie odpadních materiálů*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita, 2006, s.102. ISBN 80-248-1010-7.
- [24] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [25] Preparative HPLC.svg. In: *Wikimedia Commons* [online]. b.r. [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative_HPLC.svg
- [26] JANDERA, Pavel. Pokroky v technice vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro analýzu organických látek. In: HELÁN, Václav. *Analýza organických látek*. 2., upr. a dopl. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2005. ISBN 80-86380-29-7.

- [27] WILSON, Ian D., a Colin F. POOLE, eds. *Handbook of methods and instrumentation in separation science*. Burlington (MA): Elsevier/Academic Press, 2009, p. 471. ISBN 978-0-12-375095-2.
- [28] FANALI, Salvatore, Paul R. HADDAD, Colin F. POOLE a Marja-Liisa RIEAKKOLA, eds. *Liquid chromatography: Fundamentals and instrumentation*. 2nd ed. Elsevier, 2017, p. 420-422. ISBN 978-0-12-805393-5.
- [29] HIGSON, Séamus. *Analytical chemistry*. New York: Oxford University Press, 2004. ISBN 978-0-19-850289-0.
- [30] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Prodloužení životnosti HPLC kolon. In: HELÁN, Václav. *Analýza organických látek*. 2., upr. a dopl. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2005. ISBN 80-86380-29-7.
- [31] ANDERSON, Jared, Alain BERTHOD, Verónica ESTÉVEZ a Apryll STALCUP, eds. *Analytical separation science*. Weinheim: Wiley-VCH, 2015. ISBN 978-3-527-33374-5.
- [32] FLANAGAN, Robert, David PERRETT a Robin WHELPTON. *Electrochemical detection in HPLC: Analysis of drugs and poisons*. Cambridge (UK): RSC, 2005, p. 21-26. ISBN 0854045325.
- [33] DOUŠA, Michal. Tabulka: vlastnosti detektorů. *HPLC.cz* [online]. b.r. [cit. 2018-03-14]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/table_detectors.html
- [34] ALPERT, Andrew. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*. 1990, **499**, 177-196. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3. ISSN 00219673.
- [35] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231-247 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5308-5>

- [36] BICKER, Wolfgang, JunYan WU, Michael LÄMMERHOFER a Wolfgang LINDNER. Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings*. *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(16-17), 2971-2978 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1002/jssc.200800246. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200800246>
- [37] JANDERA, Pavel. HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemagazín*. 2011, (2), 8-9. ISSN 1210-7409.
- [38] HEMSTRÖM, Petrus a Knut IRGUM. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, **29**(12), 1784-1821 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1002/jssc.200600199. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600199>
- [39] MCCALLEY, David. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1171**(1-2), 46-55. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.047. ISSN 00219673.
- [40] LINDNER, Herbert, Bettina SARG, Christoph MERANER a Wilfried HELLIGER. Separation of acetylated core histones by hydrophilic-interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996, **743**(1), 137-144. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00131-8. ISSN 00219673.
- [41] JANDERA, Pavel. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **692**(1-2), 1-25 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.047. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011002728>
- [42] IKEGAMI, Tohru, Kouki TOMOMATSU, Hirotaka TAKUBO, Kanta HORIE a Nobuo TANAKA. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1184**(1-2), 474-503 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.01.075. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308002112>

- [43] SAMUELSON, Olof a Birgit SWENSON. Partition chromatography on ion-exchange resins: Separation of sugars. *Analytica Chimica Acta*. 1962, **16**(28), 426-432.
- [44] SHEN, Aijin, Zhimou GUO, Xiaoming CAI, Xingya XUE a Xinmiao LIANG. Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1228**, 175-182 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.086. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311016281>
- [45] XU, Luan, Tong ZHAO, Xingmei GUAN, Wanjin TANG, Xiaoyasn LIU a Haixia ZHANG. Preparation, chromatographic evaluation and comparison of cystine- and cysteine-bonded stationary phases. *Analytical Methods* [online]. 2014, **6**(7), 2205-2214 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1039/C3AY42218F. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3AY42218F>
- [46] RAY, Sudipta, Makoto TAKAFUJI a Hirotaka IHARA. Chromatographic evaluation of a newly designed peptide-silica stationary phase in reverse phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography: Mixed mode behavior. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1266**, 43-52 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.10.004. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312015427>
- [47] LI, Jiao, Yuanyuan LI, Tong CHEN, Luan XU, Xiaoyan LIU, Xiaoli ZHANG a Haixia ZHANG. Preparation, chromatographic evaluation and comparison between linear peptide- and cyclopeptide-bonded stationary phases. *Talanta* [online]. 2013, **109**, 152-159 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.02.005. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013000787>
- [48] LI, Yun, Jiajia YANG, Jing JIN, Xiaoli SUN, Longxing WANG a Jiping CHEN. New reversed-phase/anion-exchange/hydrophilic interaction mixed-mode stationary phase based on dendritic polymer-modified porous silica. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1337**(1337), 133-139 [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.044. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731400291X>

- [49] NEUE, Uwe, Chris HUDALLA a Pamela IRANETA. Influence of pressure on the retention of sugars in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(6-7), 838-840 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1002/jssc.200900628. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900628>
- [50] JANDERA, Pavel. Pokroky v současné vysokoúčinné kapalinové chromatografii. *Chemagazín*. 2016, **26**(2), 8-10. ISSN 1210-7409.
- [51] DE ANDRADE, Francisca, Maria FLORINDO GUEDES, Ícaro PINTO VIEIRA, Francisca PEREIRA MENDES, Paula SALMITO RODRIGUES, Carla COSTA MAIA, Maria MARQUES ÁVILA a Luzara DE MATOS RIBEIRO. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chemistry* [online]. 2014, **157**(157), 193-198 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.100. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614001320>
- [52] ŠULEKOVÁ, Monika, Alexander HUDÁK a Miroslava SMRČOVÁ. The Determination of Food Dyes in Vitamins by RP-HPLC. *Molecules* [online]. 2016, **21**(10), 1368 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.3390/molecules21101368. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/10/1368>
- [53] REJCZAK, Tomasz a Tomasz TUZIMSKI. 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* [online]. 2017, **10**(11), 3572-3588 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1007/s12161-017-0905-3. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-017-0905-3>
- [54] LI, Kefeng, Yonghong XIA, Guolin MA, Yanna ZHAO a Venkataramana PIDATALA. New LC-MS/MS Method for the Analysis of Allura Red Level in Takeaway Chinese Dishes and Urine of an Adult Chinese Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, **65**(12), 2588-2593 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05310. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b05310>

- [55] FLORIANO, Luana, Lucila RIBEIRO, Nathália SAIBT, Nelson BANDEIRA, Osmar PRESTES a Renato ZANELLA. Determination of Six Synthetic Dyes in Sports Drinks by Dispersive Solid-Phase Extraction and HPLC-UV-Vis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2018, **29**(3), 602-608. DOI: 10.21577/0103-5053.20170173. ISSN 0103-5053.
- [56] VRBOVÁ, Tereza. *Víme, co jíme? aneb: Průvodce "Ěčky" v potravinách*. Praha: EcoHouse, 2001. ISBN 80-238-7504-3.

6 PŘÍLOHY

Tabulka 5: Přírodní potravinářská barviva [56]

E kód	Název	Barva
E100	Kurkumin	Žlutá až oranžová
E101	Riboflavin	Oranžovožlutá
E120	Košenila	Červená
E140	Chlorofyly a chlorofyliny	Zelená až olivově zelená
E141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů	Olivově zelená
E150a	Karamel	Hnědá
E150b	Kaustický sulfitový karamel	Hnědá
E150c	Amoniakový karamel	Hnědá
E150d	Amoniak sulfitový karamel	Hnědá
E153	Uhlík z rostlinné suroviny	Černá
E160a	Karoteny	Žlutá až oranžová
E160b	Annatto, Bixin, Norbixin	Žlutá až červenooranžová
E160c	Paprikový extrakt, Kapsanthin, Kapsorubin	Oranžová až červená
E160d	lykopen	Červená
E160e	Beta-apo-8-karotenal	Oranžová
E161b	Lutein	Žlutá
E161g	Kanthaxantin	Růžová až červená
E162	Betanin	Červená až fialová
E163	Antokyany	Červená až modrá
E170	Uhličitany vápenaté	Bílá
E171	Oxid titaničitý	Bílá
E172	Oxidy a hydroxidy železa	Žlutá, červená až černá
E173	Hliník	Stříbrná
E174	Stříbro	Stříbrná
E175	Zlato	Zlatá

Tabulka 6: Syntetická potravinářská barviva

E kód	Název	Barva [56]	λ_{MAX}^3 [nm] [18]	ADI [mg/kg/den] EFSA [4] / JECFA [5]
E102	Tartrazin	Citronově žlutá	426	0-7,5
E104	Chinolinová žlut'	Zelenožlutá	411	0-0,5 / 0-5
E110	Žlut' SY	Žlutá	485	0-4
E122	Azorubin	Červená	515	0-4
E123	Amarant	Červenomodrá	520	0-0,15 / 0-0,5
E124	Ponceau 4R	Červená	505	0-0,7 / 0-4
E127	Erythrosin	Červená	526	0-0,1
E129	Červeň Allura	Červená	504	0 / 0-7
E131	Patentní modř	Modrá	638	0-15 / -
E132	Indigotin	Tmavě modrá	610	0-5
E133	Brilantní modř FCF	Modrá	630	0-6 / 0-12,5
E142	Zeleň S	Modrozelená	632	0-5 / -
E151	Brilantní čern' BN	Černá	570	0-5 / 0-1
E155	Hněď HT	Červenohnědá	460	0-1,5
E180	Lithorubin BK	Červená	442 ⁴	- / -

³ Absorpční maxima ve vodném prostředí.⁴ Absorpční maximum v dimethylformaidu (E180 je ve vodě nerozpustné).