

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

SILVIE KIELAROVÁ

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Azobarviva v potravinách

Silvie Kieľarová

Bakalářská práce
2019

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Azo dyes in food

Silvie Kieľarová

Bachelor work
2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Silvie Kielarová**
Osobní číslo: **C16062**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Azobarviva v potravinách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Definujte termín "azobarvivo" z chemického hlediska a s ohledem na platnou legislativu. Uveďte současný stav v oblasti používání azobarviv v potravinách.
2. Na základě terénního průzkumu zjistěte, jaká azobarviva se reálně používají jako potravinářská aditiva. Na základě rešerše za použití bibliografických databází knihovny UPa popište stručně charakteristiku, použití a zdravotní hodnocení vybraných azobarviv. Uveďte také metody analýzy azobarviv v potravinách.
3. Na základě experimentu zjistěte obsah vybraného azobarviva ve vzorcích s využitím spektrofotometrie. Výsledky vyhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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 směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.6.2019

Silvie Kielarová

Chci poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce, doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D., za odborné vedení v průběhu experimentu, rady, připomínky a trpělivost během zpracování mé bakalářské práce. Dále děkuji mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována potravinářským azobarvivům. Teoretická část je zaměřena na jejich chemické a fyzikální vlastnosti, využití v potravinářském průmyslu a rizika spojená s jejich konzumací. Dále jsou zde popsány metody jejich analýzy v potravinách. V praktické části byl spektrofotometricky stanoven obsah azobarviv v několika nealkoholických nápojích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Azobarviva, potravinářská barviva, aditiva, spektrofotometrie

TITLE

Azo dyes in food

ANNOTATION

This thesis deals with azo food dyes. The teoretical part is mainly about chemical and physical properties of azo dyes, their use in food industry and risks of their consumption. On top of that, there are described methods of analysis of azo food dyes in food. In the practical part the content of azo dyes was determined in several non-alcoholic beverages using spectrophotometry.

KEY WORDS

Azo dyes, food dyes, additives, spectrophotometry

Obsah

Úvod.....	11
1. Azobarviva.....	12
1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	12
1.2 Toxicita.....	12
1.3 Výroba.....	13
1.4 Metody stanovení v potravinách.....	14
1.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
1.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	15
1.4.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS).....	16
1.4.4 Kapilární elektroforéza (CE).....	16
1.4.5 Spektrofotometrie.....	17
1.5 Barviva povolená v EU a ČR.....	18
1.5.1 Tartrazin.....	19
1.5.2 Žlut' SY.....	20
1.5.3 Azorubin.....	21
1.5.4 Amarant.....	22
1.5.5 Ponceau 4R.....	23
1.5.6 Červeň Allura AC.....	24
1.5.7 Čerň BN.....	25
1.5.8 Hněď HT.....	26
1.5.9 Litholrubin BK.....	27
2. Experimentální část.....	29
2.1 Instrumentace, pomůcky a chemikálie.....	29
2.2 Příprava pufrů.....	29
2.4 Měření závislosti absorpance na pH.....	30
2.4.1 Závislost absorpance na pH pro tartrazin.....	30
2.4.2 Závislost absorpance na pH pro žlut' SY.....	32
2.4.3 Závislost absorpance na pH pro azorubin.....	33
2.4.4 Vyhodnocení.....	35
2.5 Stanovení obsahu azobarviv v sycené malinové limonádě.....	35
2.5.1 Úprava vzorku.....	35
2.5.2 Absorpční spektrum limonády.....	35
2.5.3 Příprava roztoků kalibrační křivky a vzorku.....	36
2.5.4 Měření a výsledky.....	36
2.6 Stanovení obsahu azobarviv v nutričním nápoji.....	38

2.6.1 Úprava vzorku.....	38
2.6.2 Absorpční spektrum nutričního nápoje	38
2.6.3 Příprava roztoků se standardními přísadami.....	39
2.6.4 Měření a výsledky	40
2.7 Stanovení obsahu azobarviv v léčivém přípravku.....	41
2.7.1 Úprava vzorku.....	41
2.7.2 Absorpční spektrum léčivého přípravku	42
2.7.3 Příprava roztoků se standardními přísadami.....	42
2.7.4 Měření a výsledky	43
Závěr	45
Seznam obrázků, tabulek a grafů:	46
Seznam literatury	47

Úvod

Barviva jsou senzory aktivní látky, které dodávají potravině její barvu. Některá barviva se v potravinách vyskytují přirozeně a některá jsou přidávána v procesu výroby, aby vypadala potravina pro spotřebitele atraktivněji. Většina konzumentů dá přednost potravině, která má intenzivní, ale zároveň přirozeně vypadající barvu před potravinou, která má barvu vybledlou.

Dělí se na barviva přírodní a syntetická. Mezi přírodní barviva se řadí antokyany, karotenoidy, chlorofyly, kurkumin, riboflavin a další. K syntetickým barvivům patří především azobarviva, erythrosin, chinolinová žlutá, indigotin a další.

Azobarviva tvoří přibližně 60-70 % barviv využívaných v potravinářském a textilním průmyslu. Mohou být použity v širokém rozmezí potravin – v pečivu, dezertech, alkoholických i nealkoholických nápojích, polévkách, koření, marmeládách, sušeném ovoci a oříškách, v rybích výrobcích a mnoha dalších. Teoreticky mohou azobarviva dodávat kompletní duhu barev, prakticky se využívají spíše azobarviva žluté a červené barvy.

V posledních letech se mnoho spotřebitelů snaží vyhýbat konzumaci potravin obsahujících azobarviva kvůli jejich možným účinkům na hyperaktivitu dětí. Tato skutečnost vede výrobce ke snaze omezit jejich použití v potravinách a nalezení alternativních barev, kterými azobarviva nahradí.

Cílem této bakalářské práce je zhodnotit nakolik je konzumace azobarviv nebezpečná, míru jejich využití v potravinách a změřit jejich koncentrace v několika nápojích ve kterých se konkrétně nachází.

1. Azobarviva

Potravinářská barviva se řadí mezi tzv. potravinářské přídatné látky. Potravinářské přídatné látky jsou látky, které se běžně nekonzumují přímo jakožto potraviny, ale záměrně se přidávají do potravin pro technologické účely. „Barvivy“ se rozumějí látky, které potravině dodávají barvu nebo barvu obnovují a zahrnují přírodní složky potravin a přírodních zdrojů, jež jako takové nejsou obvykle požívány jako potraviny a nejsou obvykle používány jako charakteristické složky potravin [1].

Azobarviva jsou syntetická barviva obsahující ve své struktuře alespoň jednu chromoforickou azo skupinu $N=N$ [2]. Nabývají intenzivního zbarvení a barvířských schopností teprve tehdy, když do jejich molekuly vstoupí auxochromní skupina - např. $-OH$, $-OR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$. Odstín barviva se může měnit podle substituentu vstupujícího do aromatického jádra [18].

1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Podle počtu azoskupin v molekule se dělí na monoazobarviva, disazobarviva a polyazobarviva. Azobarviva jsou mnohem stabilnější než většina přírodních potravinářských barviv. Jsou stabilní v širokém rozsahu pH, při vysokých teplotách a neblednou po vystavení světlu nebo kyslíku, což umožňuje jejich použití v téměř všech potravinách. Jedinou jejich nevýhodou je, že nejsou rozpustné v olejích a tucích – ovšem lze jimi barvit oleje, když se spojí s molekulou látky rozpustné v tucích nebo když se rozptýlí ve formě velmi malých částic [3].

1.2 Toxicita

Akutní toxicita azobarviv, definovaná podle kritérií EU pro klasifikaci nebezpečných látek, je dosti malá. Bezprostředně toxické hladiny azobarviv nelze dosáhnout konzumací potravin obsahujících azobarviva. Většina potravinářských azobarviv má hodnotu LD_{50} v rozmezí 250–2 000 mg/kg tělesné váhy, což znamená, že by muselo být zkonsumováno mnoho gramů azobarviv v jedné dávce pro dosažení letální dávky. Vzhledem jejich k vysoké rozpustnosti ve vodě se nekumulují v těle, ale jsou metabolizovány v játrech a vylučovány močí [3].

Nicméně některá azobarviva byla zakázána pro použití v potravinách kvůli jejich toxickým vedlejším účinkům, které nejsou způsobeny barvivy samy o sobě, ale produkty jejich degradace. Azo vazba je nejlabilnější částí molekuly azobarviva a může snadno podléhat enzymatickému štěpení u savců, včetně člověka. Azo vazba může být zredukována nebo

rozštěpena, což vede k rozdělení molekuly na dvě části. Tato reakce je katalyzovaná enzymem azo-reduktázou. U savců je azo-reduktáza přítomna v různých orgánech jako jsou játra, ledviny, plíce, srdce, mozek, slezina a svalová tkáň. Nejvyšší enzymatickou aktivitu má azo-reduktáza v játrech a ledvinách. U některých produktů degradace azobarviv byly zjištěny mutagenní a karcinogenní účinky, a proto bylo jejich využití v potravinách zakázáno [3].

Tvrdí se, že některá potravinářská barviva zvyšují nebo dokonce způsobují hyperaktivitu u dětí – zejména azobarviva. Toto tvrzení nebylo prokázáno, nicméně nebylo ani vyvráceno [3].

Nezpůsobují samy o sobě alergické reakce, ale mohou zhoršovat alergické reakce na jiné látky (např. léky). Podobně mohou zvyšovat symptomy lidí trpícími astmatem a podobnými potížemi [3].

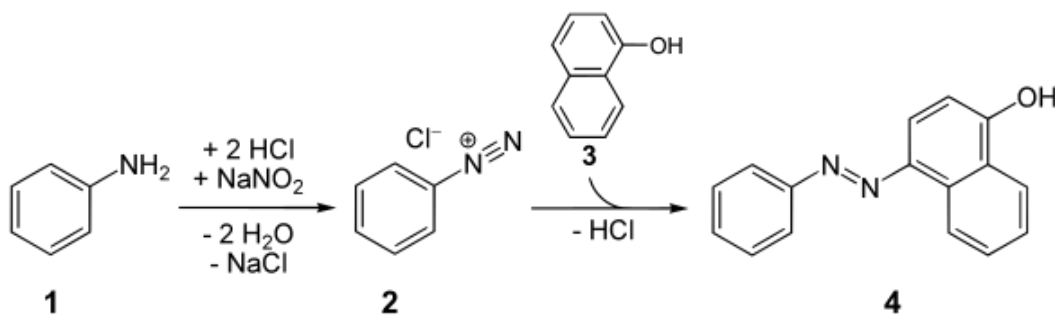
1.3 Výroba

Azobarviva a pigmenty jsou v průmyslovém měřítku vyráběny dvěma po sobě jdoucími reakcemi – diazotací a kopulací [Obr. 1].

První fáze – diazotace – zahrnuje zpracování primárního aromatického aminu (označovaného jako diazo složka) s dusitanem sodným v silně kyselém prostředí (především v prostředí HCl nebo H₂SO₄) při nízké teplotě (0–5 °C) za vzniku diazoniové soli. Při nedostatku kyseliny dochází reaguje vzniklá diazoniová sůl s ještě nezdiazotovaným aminem za vzniku azosloučeniny nebo poměrně stálé diazoaminosloučeniny. Po diazotaci většinou zůstává přebytek kyseliny dusičné. Ta způsobuje při dalších reakcích vznik vedlejších produktů, a proto se přebytek kyseliny dusité musí před kopulací odstranit. Rychlost reakce závisí na struktuře diazotovaného aminu, na reakční teplotě, na koncentraci reagujících látek, na rozpustnosti aminu a dalších faktorech. Reakci lze urychlit přidáním kyseliny bromovodíkové do reakce [18].

Ve druhé fázi – kopulaci – dochází k elektrofilní aromatické substituci, při které diazoniová sůl působí jako elektrofilní činidlo a reaguje s fenoly v zásaditém prostředí nebo aromatickými aminy v neutrálním nebo slabě kyselém prostředí za vzniku azobarviva. Reakce probíhá při pokojové teplotě [18].

Obrázek 1: Diazotace a kopulace [21]



1.4 Metody stanovení v potravinách

Před samotnou detekcí barviva je třeba extrakční metodou odstranit nečistoty, které by mohly znehodnotit výsledky analýzy. Nejčastější metody jsou extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce na pevné fázi (SPE), membránová filtrace nebo extrakce s využitím teploty zákalu micelárních roztoků (CPE).

LLE neboli extrakce rozpouštědlem je založena na rozdělení látek na základě jejich relativní rozpustnosti ve dvou různých nemísitelných rozpouštědlech jako jsou voda, ethanol, methanol, isopropyl alkohol a další.

SPE užívá sorbenty jako C₁₈, polyamid, gelovou permeační chromatografii a styren-divinylbenzen polymer a rozpouštědlo k extrakci azobarviva z matrice potravin. Před provedením extrakce je třeba omýt a připravit patry.

Membránová filtrace využívá tenkou vrstvu polopropustné hmoty k oddělení složek vzorku působením vnější síly na membránu za využití vody jako ředidla. Filtr má většinou velikost pórů pro oddělení barviv 0,45 μm.

CPE je ekologickou alternativou metody LLE. Slouží nejen k vyčištění vzorku, ale také k jeho zakoncentrování. Oproti jiným metodám využívá minimum toxických organických rozpouštědel. Metoda spočívá ve vzniku zákalu, když se roztok obsahující neionogenní povrchově aktivní látku polyoxyethylenového typu zahřívá a míchá před tím, než se nechá usadit. Kapalina se v důsledku dehydratace povrchově aktivního činidla během procesu usazování rozdělí na vodné a povrchově aktivní fáze.

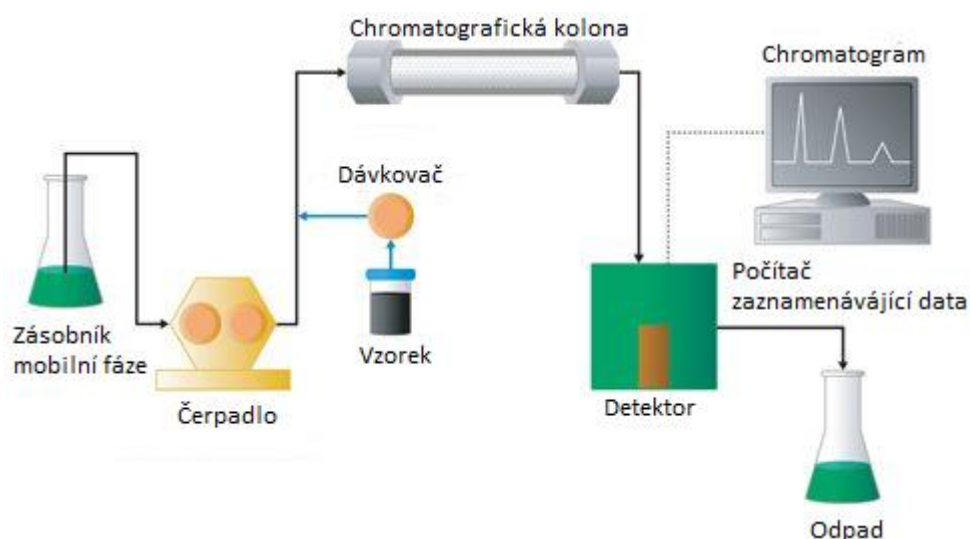
K samotnému stanovení obsahu azobarviv ve vzorku se využívají metody HPLC, TLC, spektrofotometrie, CE a elektrochemické techniky [12].

1.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC provádí separaci látek ve vzorku na základě jejich interakce s částicemi naplně kolony. HPLC většinou využívá detekce pomocí UV/Vis, PDA, MS nebo DAD detektoru a mobilní fáze bývá vybrána podle charakteru vzorku [12].

Vzorek je do přístroje vstřikován dávkovačem a dále je mobilní fází unášen skrze kolonu obsahující fázi stacionární, během čehož dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází [Obr. 2]. Mobilní fáze obsahující rozseparované složky tzv. eluát dále putuje do detektoru, který na základě různých fyzikálně-chemických postupů detekuje jednotlivé složky [13].

Obrázek 2: Schéma HPLC [22]



1.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie je založena na rozdělení látek ve vzorku mezi mobilní a stacionární fázi. Stacionární fáze je nejčastěji hliníková destička pokrytá silikagelem a mobilní fází jsou organická rozpouštědla - tzv. vyvíjecí soustava.

Vzorek se nanese na jedno místo destičky, které pak označujeme start. Poté se destička vloží do vyvíjecí komory obsahující rozpouštědlo, které okamžitě začne vzlihat silikagelem vzhůru. Při svém postupu silikagelem narazí na látky ve skvrně a začne je dělit. K určení, o jaké látky ve vzorku jde je třeba mít připravené standardy očekávaných látek [14].

1.4.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)

Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem používá systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem jako detektorem, přičemž v bodě, kdy kapalná mobilní fáze opouští kolonu, se kapalná vzorek rozprašuje za vzniku mikroskopického aerosolu. Ten se rychle odpařuje a uvolňuje ionizované molekuly analytu, které pak lze separovat v hmotnostním spektrometru [15].

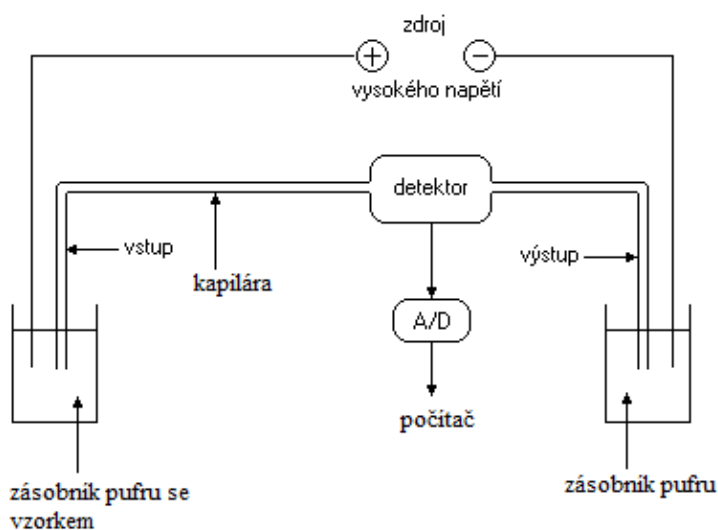
Výhodou této metody je vysoká přesnost výsledků a její použití je vhodné především pro vzorky obsahující mnoho sloučenin.

1.4.4 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza rozděljuje látky ve vzorku na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Při separaci se projevují dva jevy – elektroforéza a elektroosmóza.

Elektroosmóza vzniká na vnitřním povrchu kapiláry, kde se stýká kapalná roztok s pevnou stěnou kapiláry. Na místě styku vzniká elektrická dvojitá vrstva, jejíž pevná část je tvořena vnitřní stěnou kapiláry a většinou bývá nabitá nepohyblivým plošným elektrickým nábojem. Tento náboj je kompenzován vrstvičkou pohyblivého opačného náboje v kapalně části dvojitá vrstva. Napětí vyvolávající elektroforetický pohyb analyzovaných iontů má vzhledem ke kapiláře podélný směr a nemůže způsobit pohyb nabitě pevné části dvojitá vrstva (kapiláry). Naproti tomu vrstvička opačného náboje v kapalině blízko stěny podlehně působení hnacího pole a dá se do pohybu směrem k příslušnému pólu, čímž strhne celý průřez kapaliny v kapiláře. Tomuto jevu se říká elektroosmóza. Na rozdíl od elektroforézy, při které putují pouze nabitě ionty a zbytek roztoku je v klidu, teče při elektroosmóze celý roztok najednou, pohybuje se jako píst. Rychlost elektroosmotického toku je všude stejná – jak u stěny, tak uprostřed kapiláry [19]. Na Obr. 3 je uvedeno schéma zapojení kapilární elektroforézy.

Obrázek 3: Schéma kapilární elektroforézy [23]

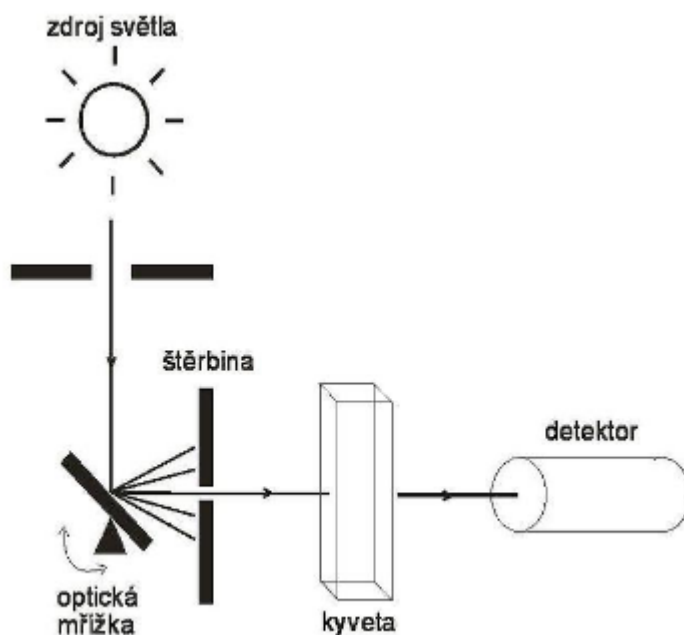


1.4.5 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je založená na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem, kdy je část záření absorbována částicemi vzorku. Absorpcí fotonu se mění energie molekuly a vzniká excitovaný atom, kdežto část záření projde roztokem a je následně detekována přístrojem. Množství světla propuštěného, odraženého nebo pohlceného jistou látkou je závislé na vlnové délce záření a na koncentraci zkoumané látky [20].

Spektrofotometry jsou technicky složitější a dokonalejší přístroje plně ovladatelné pomocí počítače pro spektrofotometrická stanovení, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek. Dělí se na jednopaprskové a dvoupaprskové spektrofotometry. Jednopaprskové spektrofotometry měří pouze vystupující tok záření, proto se nejprve musí provést referenční měření rozpouštědla a teprve potom se může měřit vzorek, zatímco dvoupaprskové spektrofotometry měří jedním paprskem slepý vzorek a druhým měří zkoumaný vzorek [20]. Na Obr. 4 je uvedeno schéma spektrofotometru.

Obrázek 4: Schéma spektrofotometru [24]



1.5 Barviva povolená v EU a ČR

V EU a ČR je povoleno používání následujících barviv v potravinách: tartrazin, žluť SY, azorubin, amarant, ponceau 4R, červeň allura AC, černě BN, hněď HT, litholrubin BK. V Tab. 1 jsou uvedeny názvy barviv, jejich „E kódy“ a barva.

Tabulka 1: Potravinářská azobarviva povolená v EU

Kód	Název	Barva
E 102	Tartrazin	žlutá
E 110	Žluť SY	žluto-oranžová
E 122	Azorubin	červená
E 123	Amarant	červeno-modrá
E 124	Ponceau 4R	červená
E 129	Červeň Allura AC	červená
E 151	Černě BN	fialovo-černá
E 155	Hněď HT	červeno-hnědá
E 180	Litholrubin BK	červená

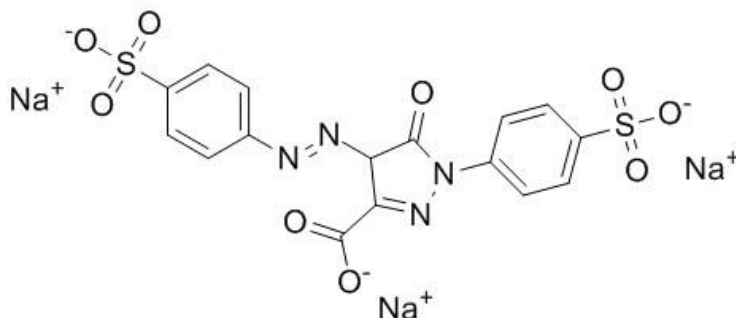
Dříve se v potravinách využívaly také barviva žluť 2G a hněd' FK, jejichž použití je kvůli jejich škodlivým účinkům v ČR v nynější době zakázáno.

1.5.1 Tartrazin

Tartrazin neboli CI potravinářská žluť 4 je syntetické barvivo sytě žluté barvy označované v seznamu „éček“ kódem E 102.

Jedná se především o trisodnou sůl 4,5-dihydro-5-oxo-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenyl-azo)-1H-pyrazol-3-karboxylové kyseliny [Obr. 5]. Jeho sumární chemický vzorec je $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ [7]. Je klasifikován jako monoazobarvivo [4].

Obrázek 5: Chemický vzorec tartrazinu



Je vysoce stabilní při vystavení zásadám a kyselinám s výjimkou kyseliny askorbové, hydroxidu sodného a oxidu siřičitého. Je relativně stabilní při vystavení světlu a teple – nerozkládá se při extruzi a pečení. Je rozpustný ve vodě a nerozpustný v alkoholu [2].

Používá se ve formě žlutého prášku nebo granulí [2]. Komerčně je dostupný nejčastěji ve formě sodné soli, ale také ve formě aluminium lake, která je nerozpustná ve vodě [4]. Méně časté je využití ve formě draselné a vápenaté soli [8].

Maximální absorpance dosahuje ve vodě při vlnové délce 426 nm [4].

Vyrábí se cyklickou kondenzací diethylesteru oxalacetátu s p-sulfofenylhydrazinem v alkalickém prostředí. Následnou diazotací s kyselinou sulfanilovou vzniká tartrazin [6].

ADI pro tartrazin je 0-7,5 mg/kg tělesné hmotnosti [4]. U citlivých jedinců může při nadměrné konzumaci vyvolávat alergické reakce a astmatické záchvaty. Může způsobovat svědící kopřivku, purpuru, otoky, rýmu, migrény a rozmazané vidění. Tyto vedlejší účinky se vyskytují zejména u lidí trpících nesnášenlivostí aspirinu a u alergických astmatiků [5].

Potraviny obsahující tartrazin musí být označeny větou „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ [4].

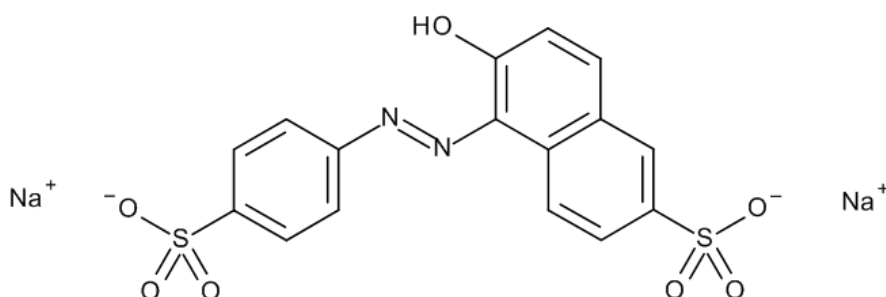
Typické využití v potravinářském průmyslu jsou nealkoholické nápoje, konzervované výrobky, dezerty, nakládané okurky, sušené ovoce, rozpustné nápoje a koření [4,8,10]. Lze nahradit použitím riboflavinu, kurkuminu, chinolinové žluti nebo beta-karotenu [8].

1.5.2 Žlutí SY

Žlutí SY neboli Cl potravinářská žlutí 3 je barvivo žluto-oranžové barvy označované v seznamu „éček“ kódem E 110.

Jedná se především o disodnou sůl kyseliny 6-hydroxy-5-[(4-sulfofenyl)-azo]-2-naftalen-sulfonové [Obr. 6]. Její sumární vzorec je $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$ [7]. Řadí se mezi monoazobarviva [4].

Obrázek 6: Chemický vzorec žluti SY



Je rozpustná ve vodě a glycerolu a nerozpustná v ethanolu. V koncentrovaném roztoku má načervenalý odstín, který ředěním žloutne. Barvivo je stabilní při teplotách extruze, při pH 3-8 a v přítomnosti organických kyselin a zásad používaných při výrobě potravin, jako jsou kyselina citrónová nebo uhličitan sodný [2]. Je nestabilní při styku s NaOH, kyselinou askorbovou a oxidem siřičitým [8].

Používá se ve formě hnědo-oranžového prášku nebo granulí, nebo ve formě nerozpustného pigmentu aluminium lake [7]. Méně se využívá ve formě draselné nebo vápenaté soli [8].

Maximální absorpance dosahuje ve vodě při vlnové délce 485 nm [4].

ADI pro žlutí SY je 0-2,5mg/kg tělesné hmotnosti. Nebylo prokázáno, že by toto barvivo mělo karcinogenní nebo mutagenní účinky. Může vyvolávat alergické reakce u citlivých jedinců [9]. Potraviny obsahující toto barvivo musí být označeny větou „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ [4].

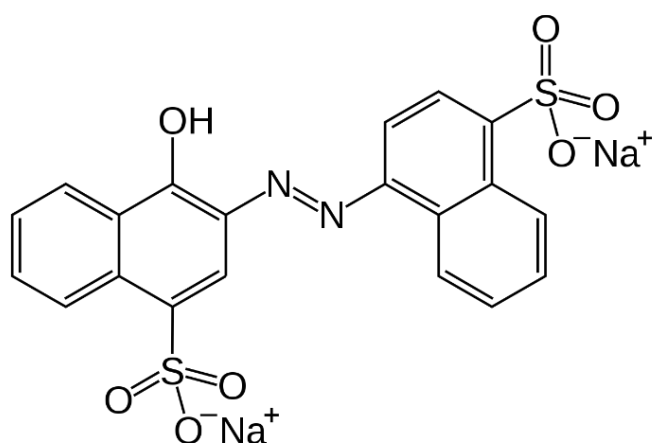
Často bývá využíváno ve směsi s tartrazinem jako barvivo do nízkotučných pomazánek. Dále se používá k barvení pekařských výrobků, cukrovinek, zmrzliny, omáček, polévek a nápojů [2,4,8,10]. Lze nahradit v potravinách použitím annatta, papriky, beta-karotenu nebo kyseliny karmínové [8].

1.5.3 Azorubin

Azorubin neboli CI potravinářská červeň 3 je syntetické barvivo červeno-modré barvy označované v seznamu „éček“ kódem E 122. Je známý také pod názvem karmoisin.

Jedná se především o směs 4-hydroxy-3-(4-sulfonato-1-naftylazo)-1-naftalensulfonátu disodného a vedlejších barvicích látek s chloridem sodným a/nebo síranem sodným jako hlavními nebarevnými složkami [Obr. 7]. Jeho sumární vzorec je $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$ [7]. Je klasifikován jako monoazobarvivo [4].

Obrázek 7: Chemický vzorec azorubinu



Je rozpustný ve vodě a v 5 % ethanolu. Je stabilní při vystavení světlu a při teplotách do 105°C. Bledne při vystavení oxidu siřičitému a v zásaditém prostředí [8].

Maximální absorpance dosahuje ve vodě při vlnové délce 516 nm [4].

Využívá se ve formě červeno-hnědého prášku nebo granulí, nebo ve formě nerozpustného pigmentu aluminium lake. Může být také použit ve formě vápenaté nebo draselné soli [8].

ADI pro azorubin je 0-4 mg/kg tělesné hmotnosti. Potraviny obsahující toto barvivo musí být označeny větou „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ [4].

Používá se k barvení pekařských výrobků, nealkoholických nápojů, konzervovaného ovoce a zeleniny, zmrzlin, cukrovinek, dezertů a cereálních výrobků [4,8,10]. V potravinách lze

nahradit použitím barviv karmín, ponceau 4R, červeně allura, erythrosinu, betaninu nebo antokyanů v kyselém médiu [8].

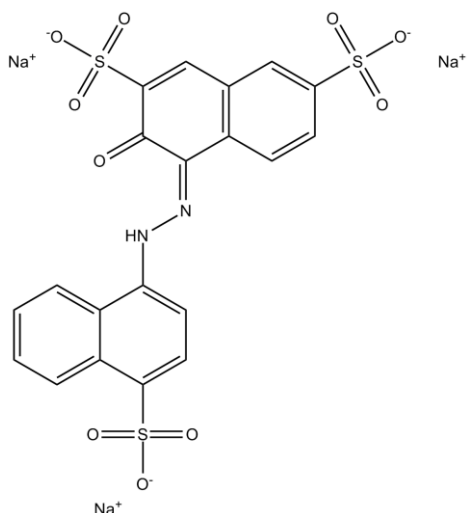
V USA a Kanadě je jeho použití k barvení potravin zakázáno [8].

1.5.4 Amarant

Amarant neboli CI potravinářská červen 9 je syntetické barvivo červeno modré barvy, které je v seznamu „éček“ označováno kódem E 123. Má mírně modřejší odstín než azorubin [4].

Jedná se především o směs 3-hydroxy-4-(4-sulfonato-1-naftylazo)-2,7-naftalendisulfonátu trisodného a vedlejších barvicích látek s chloridem sodným a/nebo síranem sodným jako hlavními nebarevnými složkami [Obr. 8]. Jeho sumární vzorec je $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$. Je klasifikován jako monoazobarvivo [7].

Obrázek 8: Chemický vzorec amarantu



Je rozpustný ve vodě a v 5 % ethanolu. Je stabilní vůči působení světla a při teplotách do 105°C. Bledne při vystavení oxidu siřičitému a v zásaditém prostředí. V zásaditém prostředí má intenzivnější modrý odstín [8].

Maximální absorpance dosahuje ve vodě při vlnové délce 520 nm [4].

Využívá se ve formě červeno-hnědého prášku nebo granulí, nebo v nerozpustné formě zvané aluminium lake. Kromě formy sodné soli se v menší míře využívá i ve formě soli draselné nebo vápenaté [8].

ADI pro amarant je 0-0,015 mg/kg tělesné váhy [4]. Bylo prokázáno že způsobuje růst nádorů u kryš. Nicméně nebylo ani dokázáno ani vyvráceno, že by měl amarant stejný účinek na člověka [3].

Jeho použití je povoleno pouze k barvení aperitivních vín, alkoholických nápojů a rybích jiker a mlíčí [4,8,10]. Lze nahradit použitím barviv karmínu, červeně allura AC, erythrosinu, ponceau 4R, betanin nebo antokyanů v kyselém médiu [8].

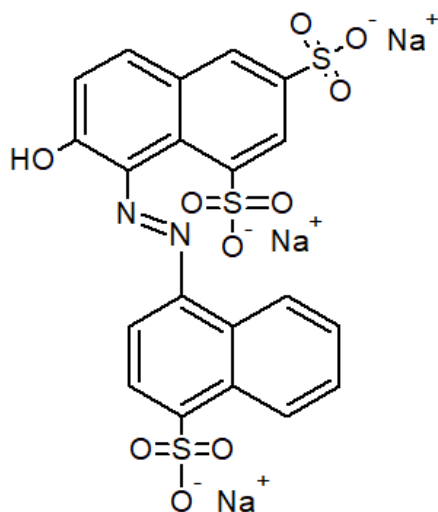
V USA je jeho použití v potravinách zakázáno úplně [4].

1.5.5 Ponceau 4R

Ponceau 4R neboli Cl potravinářská červeně je syntetické barvivo jasně červeně barvy, které je v seznamu „éček“ označováno kódem E 124.

Jedná se o směš 2-hydroxy-1-(4-sulfonato-1-naftylazo)-6,8-naftalendisulfonátu trisodný a vedlejších barevných látek s chloridem sodným a/nebo síranem sodným jako hlavními nebarevnými složkami [Obr. 9]. Jeho sumární vzorec je $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3 \cdot 1,5 H_2O$. Řadí se mezi monoazobarviva [7].

Obrázek 9: Chemický vzorec ponceau 4R



Je rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v 5 % ethanolu. Má dobrou stabilitu vůči působení světla a teploty do 105 °C. Bledne v zásaditém prostředí a při styku s kyselinou askorbovou a oxidem siřičitým [8].

Využívá se pro vytvoření sytě červeného odstínu typického pro potraviny s příchutí jahod, třešňi nebo červeného rybízu [4].

Maximální absorpance dosahuje ve vodě při vlnové délce 505 nm [4].

Je dostupný ve formě červeno-hnědého prášku nebo granulí, nebo v nerozpustné formě zvané aluminium lake. Může být použit i ve formě draselné nebo vápenaté soli [8].

ADI pro ponceau 4R je 0-0,7 mg/kg tělesné váhy. Potraviny, které toto barvivo obsahují musí být označené větou „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ [4].

Používá se k barvení nealkoholických nápojů, dekorací, dezertů, konzervovaných kompotů, pečiva, omáček, rybích výrobků a dalších potravin [4,8,10]. Lze nahradit například použitím karmínu, karmoisinu, erythrosinu, betaninu nebo antokyanů v kyselém médiu [8].

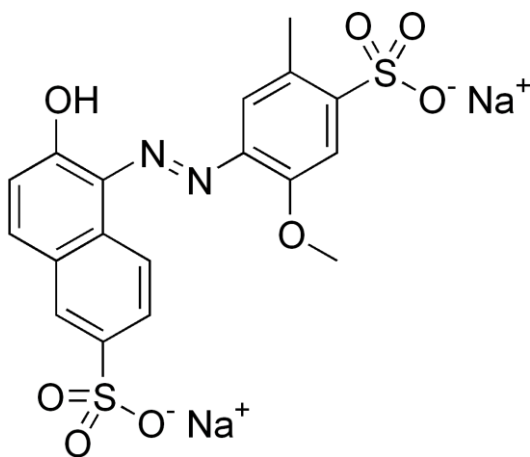
V USA je jeho použití v potravinách zakázáno [4].

1.5.6 Červeň Allura AC

Červeň allura AC neboli Cl potravinářská červeň 17 je syntetické barvivo červené barvy, které je v seznamu „éček“ označováno kódem E 129.

Jedná se především o disodnou sůl kyseliny 6-hydroxy-5-[(2-methoxy-5-metyl-4-sulfofenyl)azo]-2-naftalensulfonové [Obr.10]. Sumární vzorec červeně allura AC je $C_{18}H_{14}N_2O_8S_2Na_2$. Je řazen mezi monoazobarviva [7].

Obrázek 10: Chemický vzorec červeně allura AC



Je rozpustný ve vodě a v 5 % ethanolu. Je vysoce stabilní vůči působení světla a teploty [8]. V zásaditém prostředí získává namodralý odstín. Má nízkou stabilitu v přítomnosti oxidačních a redukčních činidel [4]. Bledne působením kyseliny askorbové [8].

Má slabší barvicí účinky než jiná barviva, a proto se musí používat ve větší koncentraci pro dosažení požadovaného odstínu [4].

Maximální absorpance dosahuje ve vodě při vlnové délce 504 nm [4].

Využívá se ve formě tmavě červeného prášku nebo granulí, nebo v nerozpustné formě aluminium lake. Kromě formy sodné soli se v menší míře využívá i ve formě soli draselné nebo vápenaté [8].

ADI pro červeně allura AC je 0-7 mg/kg tělesné váhy. Potraviny, které toto barvivo obsahují musí být označené větou „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ [4]. Jeden z produktů degradace červeně allura způsobuje rakovinu močového měchýře u zvířat, když je přítomen ve velké koncentraci [3].

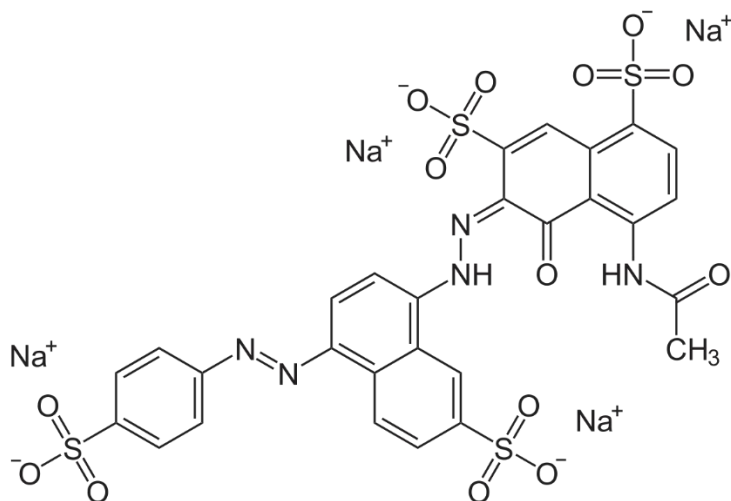
Používá se k barvení nealkoholických i alkoholických nápojů, cukrovinek, konzervovaných kompotů, dezertů, oříšků, omáček a dalších potravin [4,8,10]. Lze nahradit použitím barviv karmoisinu, erythrosinu, ponceau 4R, betaninu nebo antokyanů v kyselém médiu [8].

1.5.7 Čerň BN

Čerň BN neboli brilantní čerň BN je syntetické barvivo fialovo černé barvy, které je v seznamu „éček“ označováno kódem E 151.

Jedná se o směs 4-acetamido-5-hydroxy-6-((7-sulfonato-4-[(4-sulfonatofenyl)diazenyl]naftalen-1-yl)diazenyl)naftalen-1,7-disulfonátu tetrasodného a vedlejších barevných látek s chloridem sodným a/nebo síranem sodným jako hlavními nebarevnými složkami [Obr.11]. Její sumární vzorec je $C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$. Je klasifikována jako bisazobarvivo [7].

Obrázek 11: Chemický vzorec černě BN



Je rozpustná ve vodě a 5 % ethanolu. Má velmi dobrou stabilitu vůči působení světla, ale je nestabilní ve vyšších teplotách. Je poměrně rezistentní vůči působení kyselin obsažených v ovoci a zásaditým podmínkám. V přítomnosti oxidu siřičitého a kyseliny askorbové bledne [8].

Sama o sobě má Čern BN fialový až modro-černý odstín, ale je primárně určena k míchání s jinými barvivy k dosažení odstínů fialových a purpurových [4].

Má maximální absorpenci ve vodě při vlnové délce 570 nm [4].

Je dostupný ve formě černého prášku, granulí nebo v nerozpustné formě aluminium lake. Kromě sodné soli se využívá i ve formě soli draselné nebo vápenaté [4,8].

ADI pro čern BN je 0-5 mg/kg tělesné váhy [4]. Ve střevech může být bakteriemi přeměněn na potenciálně nebezpečné látky [3].

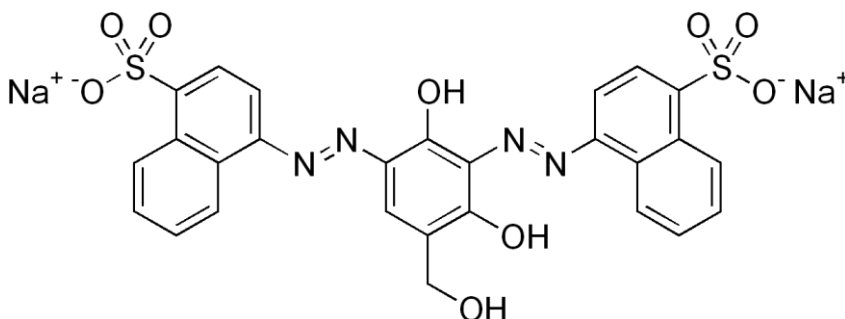
V potravinářském průmyslu se využívá k barvení cukrovinek, nealkoholických i alkoholických nápojů, marmelád, zavařenin a kaviáru [4,8,10].

1.5.8 Hněď HT

Hněď HT neboli Cl potravinářská hněď 3 je syntetické barvivo hnědočervené barvy, které je v seznamu „éček“ označováno kódem E 155.

Jedná se o směs 4,4'-(2,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-1,3-fenylen-bisazo)di-1-naftalen-sulfonátu disodného a vedlejších barevných látek s chloridem sodným a/nebo síranem sodným jako hlavními nebarevnými složkami [Obr. 12]. Její sumární vzorec je $C_{27}H_{18}N_4Na_2O_9S_2$. Řadí se mezi bisazobarviva [7].

Obrázek 12: Chemický vzorec hnědi HT



Je rozpustná ve vodě a propylenglykolu a nerozpustná v ethanolu. Je vysoce stabilní vůči světlu a teplu. Je stabilní do teploty 200 °C což ji dělá vhodnou pro použití do pečených

výrobků. Zkratka HT značí „high temperature“. Je také velmi stabilní v přítomnosti ovocných kyselin a v zásaditém prostředí. Bledne působením oxidu siřičitého [4,8].

Maximální absorpce dosahuje ve vodě při vlnové délce 460 nm.

Používá se ve formě červeno-hnědého prášku, granulí nebo v nerozpustné formě aluminium lake. Lze použít i ve formě draselné nebo vápenaté soli [8].

ADI pro hněd' HT je 0-1,5 mg/ kg tělesné váhy [4].

Používá se k barvení pečiva, čokolád, dezertů, cukrovinek, dekorací, polévek, omáček, koření a rybích výrobků [4,8,10]. V ČR (a v celé EU) se smí používat pouze k barvení rybích výrobků z korýšů [10]. Lze nahradit v potravinách karamellem [8].

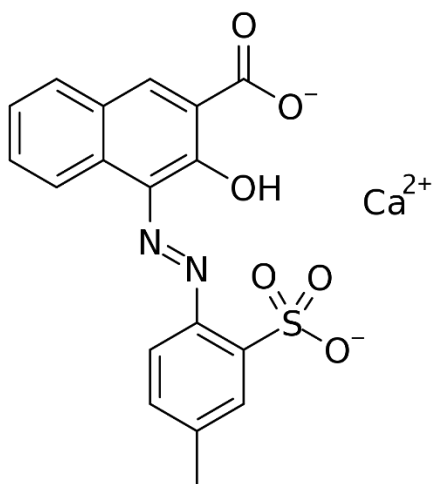
V USA a Kanadě je její použití zakázáno úplně [8].

1.5.9 Litholrubin BK

Litholrubin BK je syntetické barvivo červené barvy označované v seznamu „éček“ kódem E 180.

Jedná se o 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulfofenyl)azo]-2-naftalenkarboxylát vápenatý [Obr. 13]. Jeho sumární vzorec je $C_{18}H_{12}CaN_2O_6S$ [11]. Jedná se o monoazobarvivo.

Obrázek 13: Chemický vzorec litholrubinu BK



Vyskytuje se přirozeně v semenech vojtěšky, palmovém oleji nebo v dýních [10].

Je nerozpustný ve vodě i v ethanolu, ale rozpustný v oleji a uhlovodíkových rozpouštědlech [8].

Je dostupný ve formě červeného prášku [8].

Maximální absorpce dosahuje v dimethylformamidu při vlnové délce 442 nm [4].

V potravinářském průmyslu se využívá výhradně k barvení kůry tvrdého sýra. Větší využití nachází v kosmetickém průmyslu [4].

V USA, Kanadě a Austrálii je jeho použití v potravinách zcela zakázáno [8].

2. Experimentální část

Úkolem experimentální části bylo stanovit obsah azobarviv v nápojích v niž jsou deklarována. Ke stanovení byla využita molekulární spektrofotometrie.

2.1 Instrumentace, pomůcky a chemikálie

Seznam použitých přístrojů:

Analytické váhy, pH metr, ultrazvuková lázeň, UV/VIS spektrofotometr, počítač se softwarem UV Probe Version 2.70 (Shimadzu Corporation)

Pomůcky:

Běžné laboratorní sklo, mikropipeta se špičkami, potřeby na vážení, stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,45 μm , injekční stříkačka, plastové kyvety, kapátka, filtrační papíry

Chemikálie:

Standardy tartrazinu (E 102), žlutí SY (E 110), azorubinu (E 122) o neznámé čistotě, 0,2 M hydroxid sodný, kyselina boritá, kyselina fosforečná, kyselina octová

2.2 Příprava pufrů

Pufr neboli tlumivý roztok je definován jako konjugovaný pár kyseliny (nebo zásady), který je schopný udržovat v jistém rozmezí stabilní pH i po přidání silné kyseliny či zásady do systému. Konjugovaným párem chápeme kyselinu (resp. zásadu) a její sůl, která se vytvoří po přidání zásady (resp. kyseliny) do systému. Jedná se o dvojici látek, které přecházejí jedna ve druhou příjmem/ztrátou jednoho protonu [16].

Při měření byl použit univerzální Britton-Robinsonův pufr, který se skládá z 0,4 M kyseliny borité, 0,4 M kyseliny fosforečné, 0,4 M kyseliny octové a 0,2 M hydroxidu sodného.

Do skleněných zásobních lahví byly připraveny pufrы o přibližném pH 3, 5, 7, 10 a 12 [Tab. 2]. Pomocí pH metru byly upraveny hodnoty pH přikapáváním hydroxidu sodného na přesné pH 3,5,7,10 a 12.

Tabulka 2: Poměr kyseliny a zásady pro přípravu Britton-Robinsonova pufru

<i>pH</i>	<i>Objem směsi kyselin [ml]</i>	<i>Přibližný objem NaOH [ml]</i>
3	40	7,8
5	40	15,2
7	40	21
10	40	31
12	40	40

2.3 Příprava standardních roztoků barviv

Na analytických váhách bylo naváženo přibližně 20 mg barviv tartrazinu (E 102), žluti SY (E 110) a azorubinu (E 122) v práškové formě o neznámé čistotě [Tab. 3]. Prášky byly kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk. Baňky byly doplněny destilovanou vodou po rysku a obsah řádně promíchán.

Tabulka 3: Přesné navážky a koncentrace standardních roztoků barviv

<i>Barvivo</i>	<i>Navážka [mg]</i>	<i>Koncentrace [mg/l]</i>
<i>E 102</i>	20,4	204
<i>E 110</i>	20,7	207
<i>E 122</i>	20,7	207

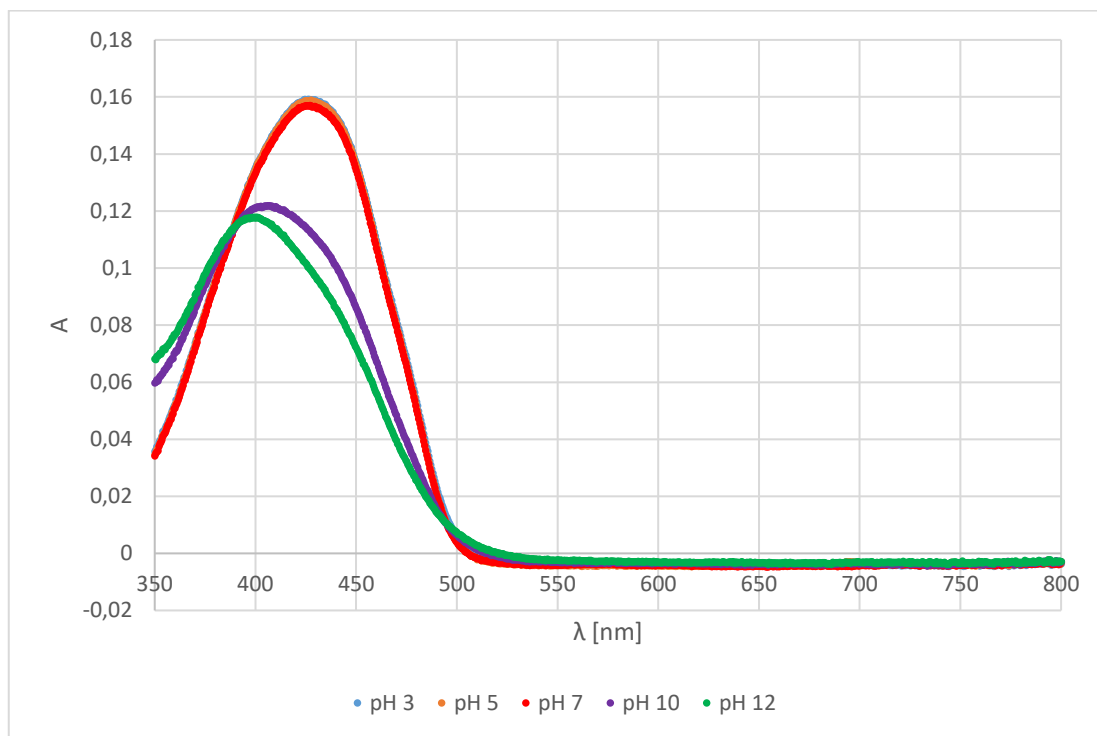
2.4 Měření závislosti absorbance na pH

2.4.1 Závislost absorbance na pH pro tartrazin

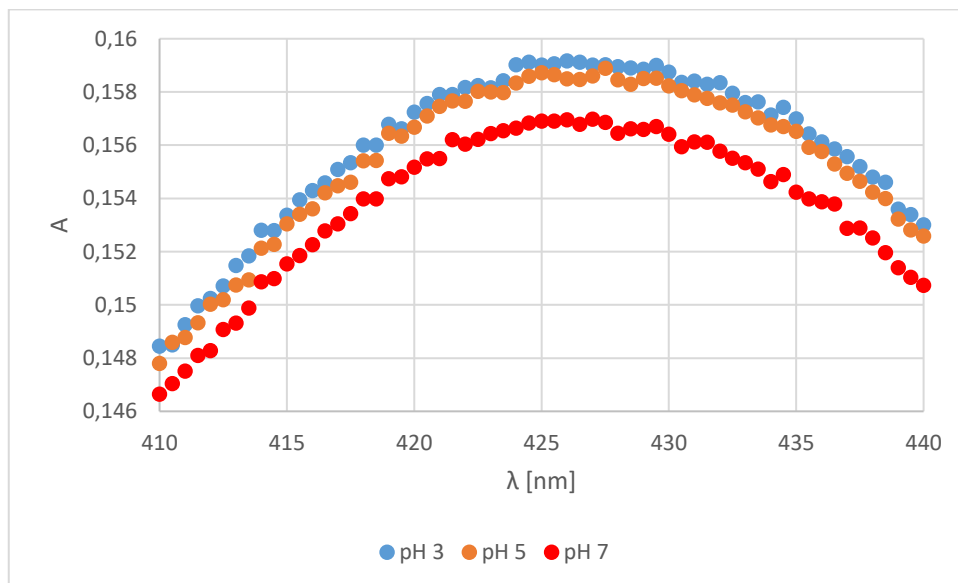
Do pěti 10 ml odměrných baněk bylo mikropipetou odpipetováno po 200 μ l zásobního roztoku E 102 o koncentraci 204 mg/l a každá z nich byla doplněna jedním z pufrů o pH 3, 5, 7, 10 a 12 po rysku.

U každého z roztoků byla proměřena pomocí spektrofotometru absorbance v rozmezí vlnových délek 350-800 nm [Graf 1]. Jako srovnávací roztok byla použita destilovaná voda.

Graf 1: Závislost absorbance na pH u tartrazinu (E 102) při koncentraci 204 mg/l



Graf 2: Závislost absorbance na pH u tartrazinu (E 102) při koncentraci 204 mg/l - detail vrcholu



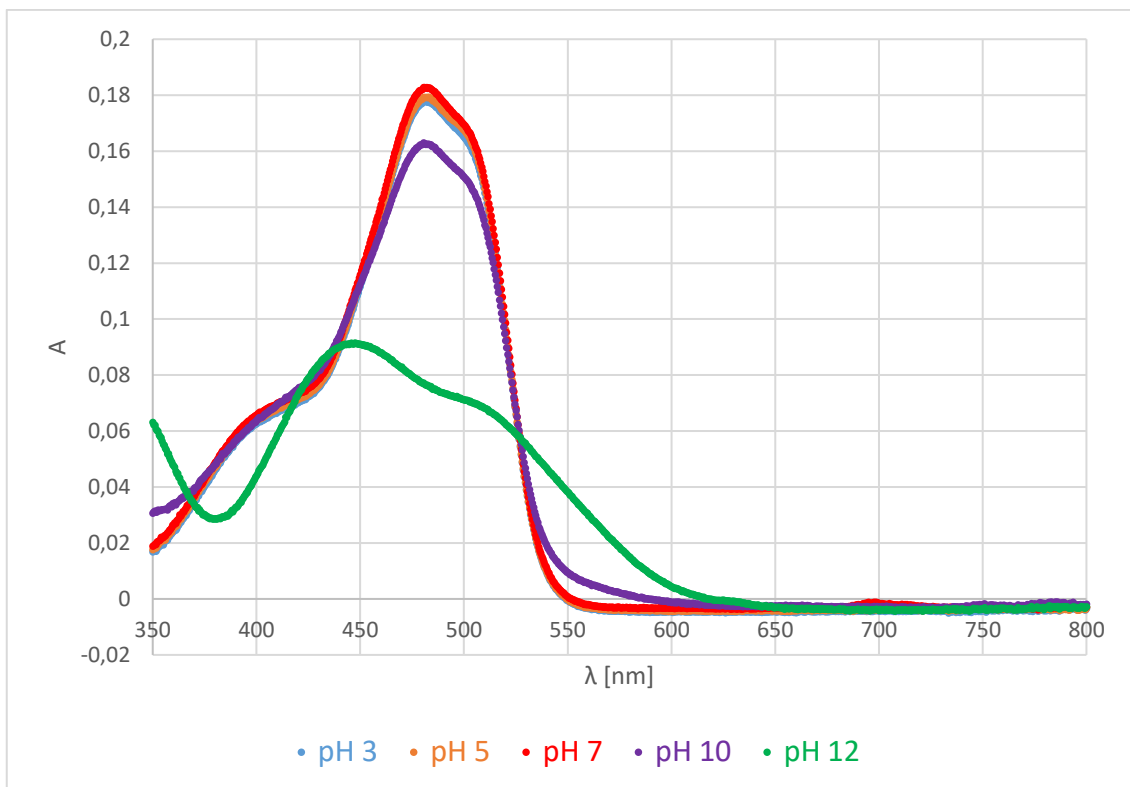
Tatrazin je stabilní při kyselém až neutrálním pH, přičemž nejvyšší absorbance dosahuje při pH 3 [Graf 1,2]. V zásaditém prostředí dochází k úbytku absorbance a posunu maxima absorbance k menším vlnovým délkám. Absorpčního maxima dosahuje roztok tartrazinu při vlnové délce 427 nm [Graf 2].

2.4.2 Závislost absorbance na pH pro žlut' SY

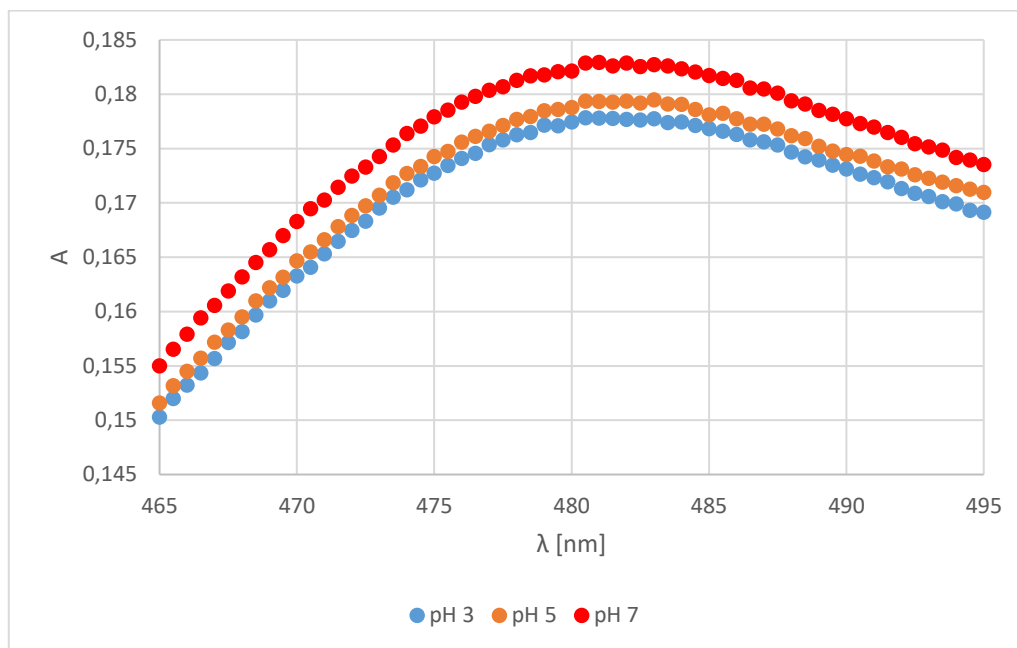
Do pěti 10 ml odměrných baněk bylo mikropipetou odpipetováno po 200 μ l zásobního roztoku E 110 o koncentraci 207 mg/l a každá z nich byla doplněna jedním z pufrů po rysku.

U každého z roztoků byla proměřena pomocí spektrofotometru absorbance v rozmezí vlnových délek 350-800 nm [Graf 3]. Jako srovnávací roztok byla použita destilovaná voda.

Graf 3: Závislost absorbance na pH u žluti SY (E 110) při koncentraci 207 mg/l



Graf 4: Závislost absorbance na pH u žluti SY (E 110) při koncentraci 207 mg/l – detail vrcholu

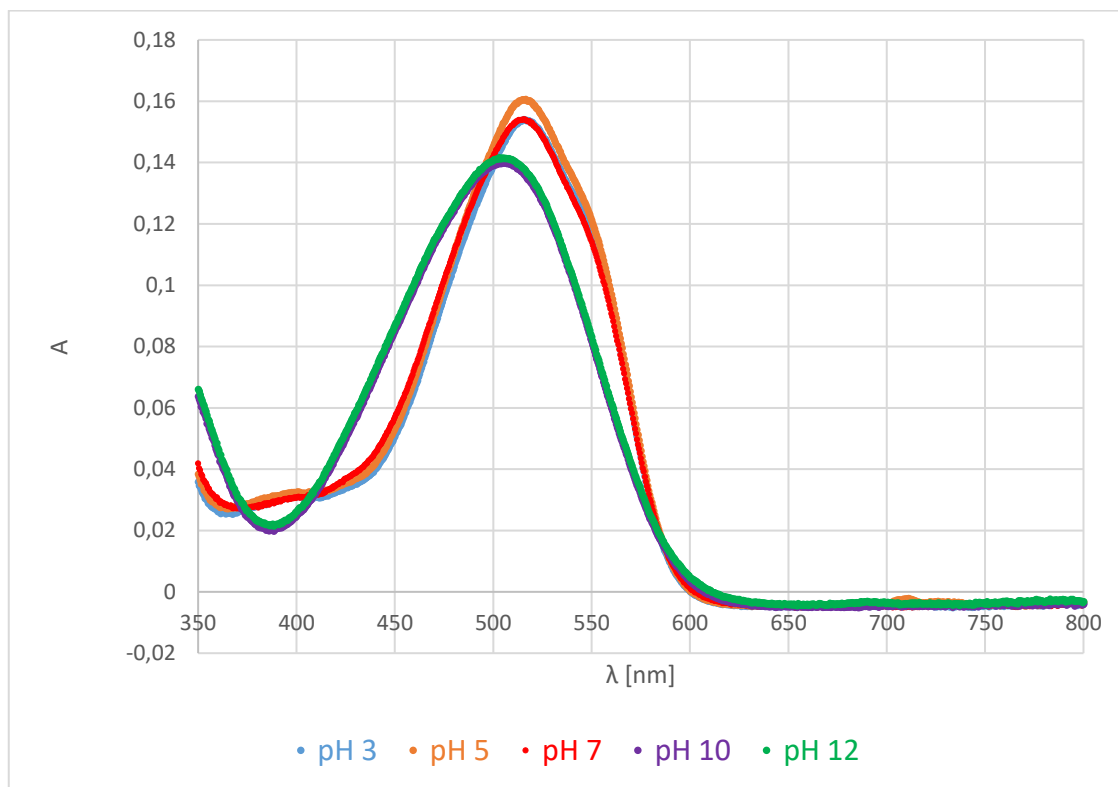


Žluť SY je opět stabilní v kyselém až neutrálním pH a nejvyšší absorbance dosahuje při pH 7 [Graf 3,4]. Se stoupajícím pH dochází k rapidnímu úbytku absorbance a posunu absorpčního maxima k menším vlnovým délkám. Při měření byla stanovena vlnová délka absorpčního maxima 481–483 nm [Graf 4].

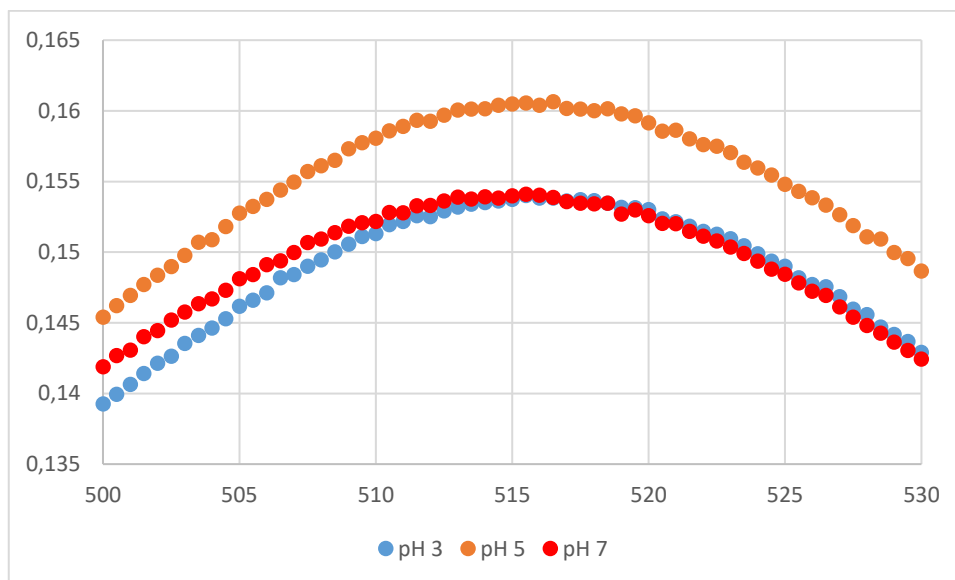
2.4.3 Závislost absorbance na pH pro azorubin

Do pěti 10 ml odměrných baněk bylo mikropipetou odpipetováno po 200 μ l zásobního roztoku E 122 o koncentraci 207 mg/l a každá z nich byla doplněna jedním z pufrů po rysku. U každého z roztoků byla proměřena pomocí spektrofotometru absorbance v rozmezí vlnových délek 350–800 nm [Graf 5]. Jako srovnávací roztok byla použita destilovaná voda.

Graf 5: Závislost absorbance na pH u azorubinu (E 122) při koncentraci 207 mg/l



Graf 6: Závislost absorbance na pH u azorubinu (E 122) při koncentraci 207 mg/l - detail vrcholu



Azorubin je stabilní při kyselém až neutrálním pH a nejvyšší absorbanci má při pH 5 [Graf 5,6]. Oproti předchozím dvěma barvivům je relativně stabilní i v zásaditém prostředí, kdy dochází k mnohem menšímu úbytku absorbance a posunu vlnové délky absorpčního maxima. Maximální absorbance dosahuje roztok azorubinu při vlnové délce 516 nm [Graf 6].

2.4.4 Vyhodnocení

Všechny 3 standardní roztoky vykazovaly vysokou stabilitu při kyselém až neutrálním pH, přičemž hodnota absorbancí při pH 5 odpovídá průměru pro všechny 3 barviva, a proto byla veškerá následující měření provedena v prostředí pufru o pH 5.

2.5 Stanovení obsahu azobarviv v sycené malinové limonádě

Úkolem bylo stanovit spektrofotometricky obsah azobarviv v sycené malinové limonádě značky aro (výrobce FONTEA a.s., Veselí nad Lužnicí, Česká republika), ve které je deklarováno barvivo azorubin (E 122). Stanovení jsem provedla metodou kalibrační křivky.

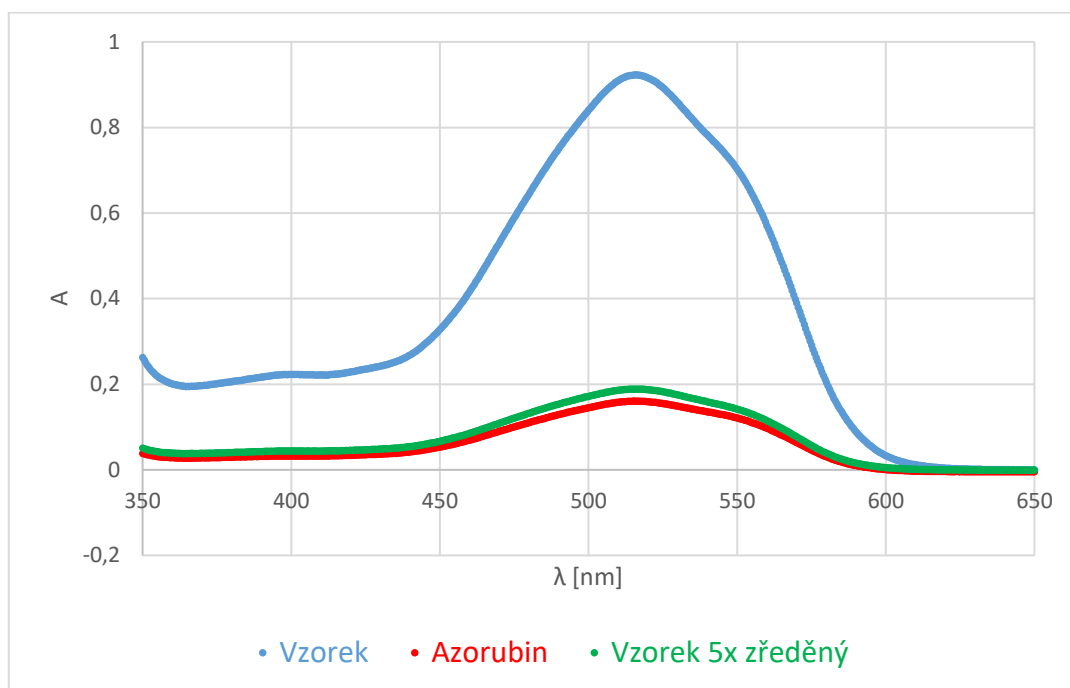
2.5.1 Úprava vzorku

Průhledný vzorek červené barvy byl přelit do kádinky a odplyněn na ultrazvukové lázni. Poté bylo přikapáváním NaOH za současného měření pH metrem upraveno pH vzorku na hodnotu 5.

2.5.2 Absorpční spektrum limonády

Proměřila jsem absorbanci vzorku v rozmezí vlnových délek 350–650 nm. Protože maximální hodnota absorbance dosahovala mnohem vyšších hodnot než absorbance standardního roztoku [Graf 7], zředila jsem vzorek 5x pufrem a opět změřila absorpční spektrum ve stejném rozmezí vlnových délek.

Graf 7: Absorpční spektrum vzorku limonády a standardního roztoku azorubinu o koncentraci 207 mg/l



2.5.3 Příprava roztoků kalibrační křivky a vzorku

Do 10 ml odměrných baněk bylo odpipetováno 200, 300, 400, 500 a 600 μ l zásobního roztoku azorubinu o koncentraci 207 mg/l a všechny byly doplněny pufrům o pH 5. Do 25 ml odměrné baňky bylo napipetováno 5 ml vzorku a baňka byla doplněna pufrům.

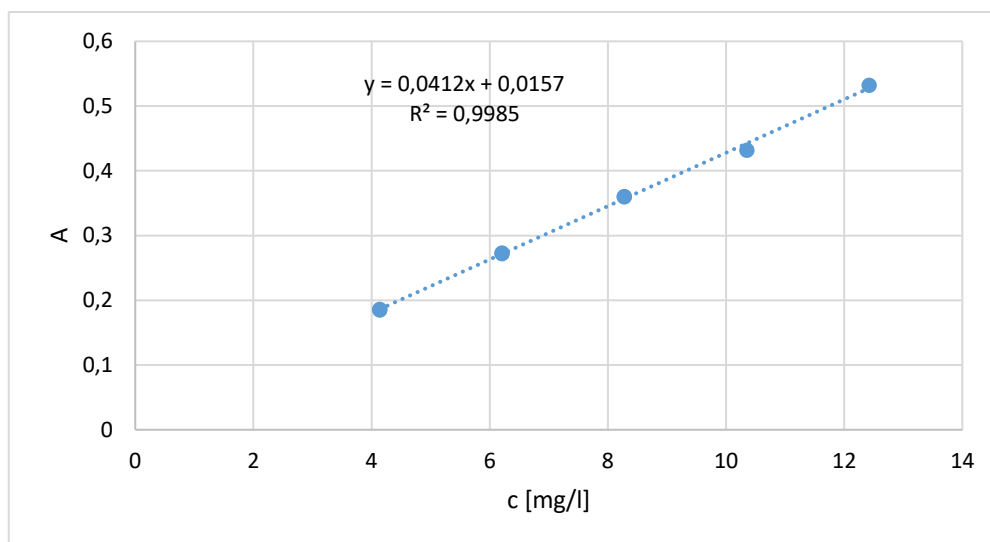
2.5.4 Měření a výsledky

Byly změřeny absorbance všech roztoků kalibrační křivky a 5x zředěného vzorku při vlnové délce 516 nm, při které dosahuje azorubin absorpčního maxima [Graf 6]. Měření bylo opakováno u kalibračních roztoků 2x a u vzorku 3x. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu [Graf 8] a z rovnice regrese byl vypočítán obsah azorubinu ve vzorku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4. Tab. 5 obsahuje hodnoty naměřené pro zředěný vzorek.

Tabulka 4: Hodnoty absorpance kalibračních roztoků standardu azorubinu o koncentraci 207 mg/l

Objem standardního roztoku [ml]	Přesná koncentrace [mg/l]	Absorbance 1	Absorbance 2
0,2	4,14	0,186	0,185
0,3	6,21	0,273	0,272
0,4	8,28	0,36	0,36
0,5	10,35	0,432	0,447
0,6	12,42	0,532	0,526

Graf 8: Kalibrační křivka standardního roztoku azorubinu o koncentraci 207 mg/l



Tabulka 5: Absorbance vzorku 5x zředěného

	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 3
Vzorek	0,192	0,198	0,198

Výpočet:

$$y = 0,0412x + 0,0157$$

$$Abs = 0,0412 c + 0,0157$$

$$c = \frac{Abs - 0,0157}{0,0412} \cdot f_{zř}$$

$$c_1 = \frac{0,192 - 0,0157}{0,0412} \cdot 5 = 21,396 \text{ mg/l}$$

$$c_2 = \frac{0,198 - 0,0157}{0,0412} \cdot 5 = 22,124 \text{ mg/l}$$

$$c_3 = \frac{0,198 - 0,0157}{0,0412} \cdot 5 = 22,124 \text{ mg/l}$$

$$\emptyset c = 21,881 \text{ mg/l}$$

Ve vzorku byl metodou kalibrační řady stanoven obsah azorubinu 21,881 mg/l. Podle EFSA spadá azorubin do skupiny 3 neboli potravinářských barviv s kombinovaným maximálním limitem. Tento maximální limit odpovídá v nealkoholických nápojích koncentraci 100 mg/kg všech barviv z této skupiny v jednom výrobku [17]. Vzhledem k tomu, že analyzovaná limonáda žádné jiné barvivo neobsahuje, splňuje tento limit stanovený EFSA.

2.6 Stanovení obsahu azobarviv v nutričním nápoji

Další stanovení bylo provedeno v ananasovém nutričním nápoji CARNITINE značky NUTREND (výrobce NUTREND D.S., Olomouc, Česká republika), ve kterém jsou deklarována barviva tartrazin (E 102) a žlutý SY (E 110). Stanovení bylo provedeno metodou vícenásobného standardního přídatku.

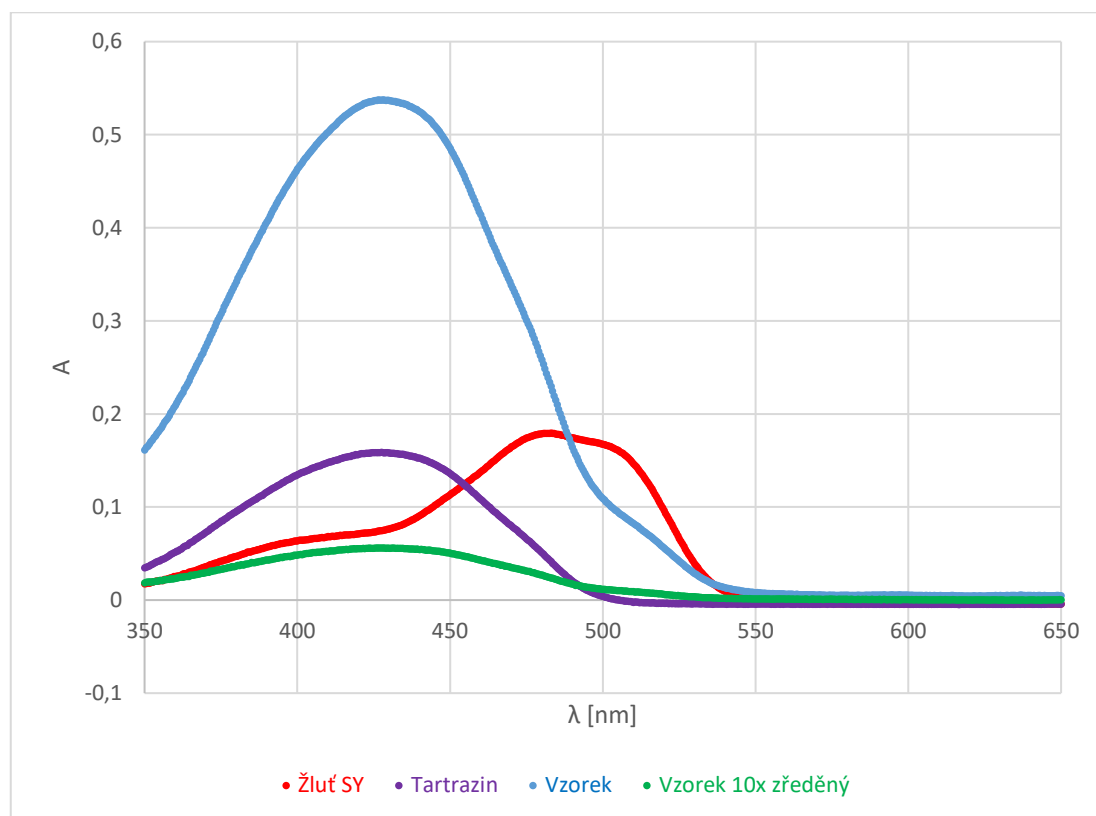
2.6.1 Úprava vzorku

Mírně zakalený vzorek žluté barvy byl přelit do kádinky a odplyněn na ultrazvukové lázni. Poté bylo přikapáváním NaOH za současného měření pH metrem upraveno pH vzorku na hodnotu 5. Takto upravený vzorek byl přefiltrován přes stříkačkový filtr, aby byly odstraněny případné nerozpuštěné částice, které by mohly rušit stanovení.

2.6.2 Absorpční spektrum nutričního nápoje

Byla proměřena absorbance vzorku v rozmezí vlnových délek 350-650 nm. Protože maximální hodnota absorbance dosahovala mnohem vyšších hodnot než absorbance standardních roztoku [Graf 9], vzorek byl zředěn 10x pufrem a opět bylo změřeno absorpční spektrum ve stejném rozmezí vlnových délek.

Graf 9: Absorpční spektrum vzorku nutričním nápoji a standardních roztoků tartrazinu o koncentraci 204 mg/l a žlutí SY o koncentraci 204 mg/l



Vzorek dosahuje absorpčního maxima při stejné vlnové délce jako standardní roztok tartrazinu [Graf 9]. Z toho lze soudit, že obsah barviva tartrazinu je ve vzorku mnohonásobně větší než obsah žlutí SY. Vzhledem k malému rozdílu mezi vlnovými délkami absorpčních maxim obou barviv nebylo možné stanovit tyto barviva vedle sebe, a proto bylo dále stanoveno jen majoritní barvivo vzorku tartrazin. Ke stanovení obou barviv by musela být použita separační metoda – např. HPLC.

2.6.3 Příprava roztoků se standardními přídávky

Do 25 ml odměrných baněk bylo odpipetováno po 2,5 ml upraveného vzorku. Do první odměrné baňky nebyl přidán standardní roztok, ale pouze byla doplněna pufrem. Do dalších 4 baněk bylo přidáno 0,5; 0,75; 1 a 1,25 ml standardního roztoku tartrazinu o koncentraci 207 mg/l a všechny byly doplněny pufrem po značku.

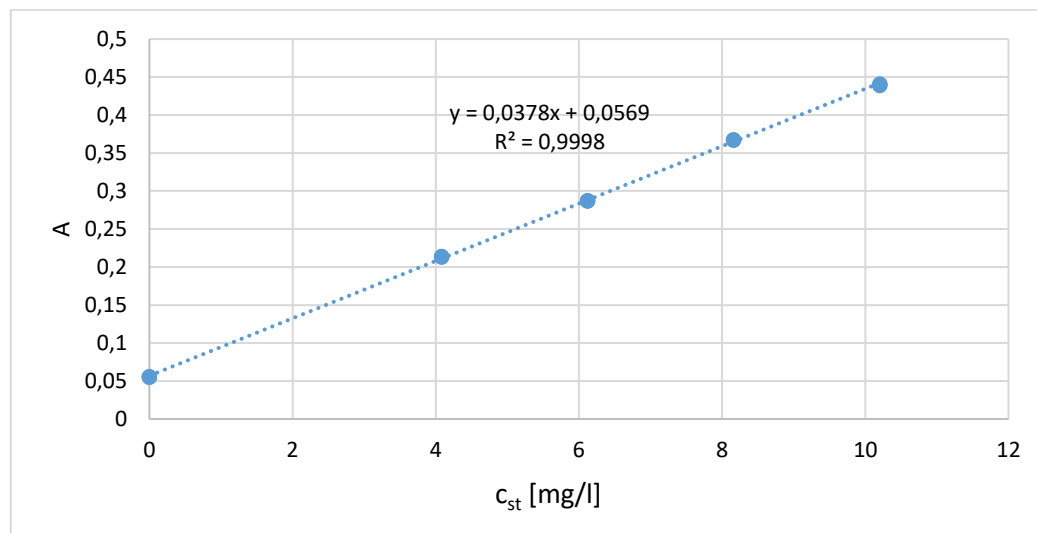
2.6.4 Měření a výsledky

Byly změřeny absorbance vzorku a roztoků se standardním přidavky při vlnové délce 427 nm, při které dosahuje tartrazin absorpčního maxima [Graf 2]. Měření bylo opakováno u všech roztoků 3x. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu [Graf 10] a z rovnice regrese byl vypočítán obsah tartrazinu ve vzorku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 6.

Tabulka 6: Absorbance vzorku nutričního nápoje a roztoků se standardními přidavky tartrazinu o koncentraci 204 mg/l

Objem standardního přidavku [ml]	Přesná koncentrace [mg/l]	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0	0	0,055	0,056	0,055
0,5	4,08	0,214	0,214	0,213
0,75	6,12	0,287	0,287	0,287
1	8,16	0,367	0,367	0,367
1,25	10,2	0,439	0,440	0,441

Graf 10: Závislost absorbance na koncentraci standardního přidavku tartrazinu o koncentraci 204 mg/l



Výpočet:

$$y = 0,0378x + 0,0569$$

$$Abs = 0,0378 c + 0,0569$$

$$Abs = k \cdot c \rightarrow c = \frac{Abs}{k}$$

$$c_1 = \frac{0,055}{0,0378} = 1,455 \text{ mg/l}$$

$$c_2 = \frac{0,056}{0,0378} = 1,481 \text{ mg/l}$$

$$c_3 = \frac{0,055}{0,0378} = 1,455 \text{ mg/l}$$

$$\emptyset c = 1,464 \text{ mg/l}$$

$$c_x = \emptyset c \cdot f_{zř} = 1,464 \cdot 10 = 14,64 \text{ mg/l}$$

Ve vzorku byl metodou vícenásobného standardního přídávku stanoven obsah tartrazinu 14,64 mg/l. Podle EFSA spadá tartrazin opět do skupiny 3 neboli potravinářských barviv s kombinovaným maximálním limitem. Tento maximální limit odpovídá v nealkoholických nápojích koncentraci 100 mg/kg všech barviv z této skupiny v jednom výrobku. Ovšem žluť SY se do této skupiny neřadí a je pro něj stanovený zvlášť maximální limit 20 mg/l. Z těchto údajů vidíme, že maximální limit obsahu žluti SY je 5x menší než limit pro tartrazin [17]. Z toho lze soudit, že výrobek musí skutečně obsahovat minimum žluti SY oproti tartrazinu a lze tudíž toto barvivo zanedbat.

2.7 Stanovení obsahu azobarviv v léčivém přípravku

Posledním vzorkem ke stanovení byl léčivý přípravek Coldrex Max Grip s příchutí lesní ovoce (výrobce SmithKline Beecham, S.A., Madrid, Španělsko) v němž jsou deklarována barviva žluť SY (E 110) a azorubin (E 122). Stanovení bylo opět provedeno metodou vícenásobného standardního přídávku.

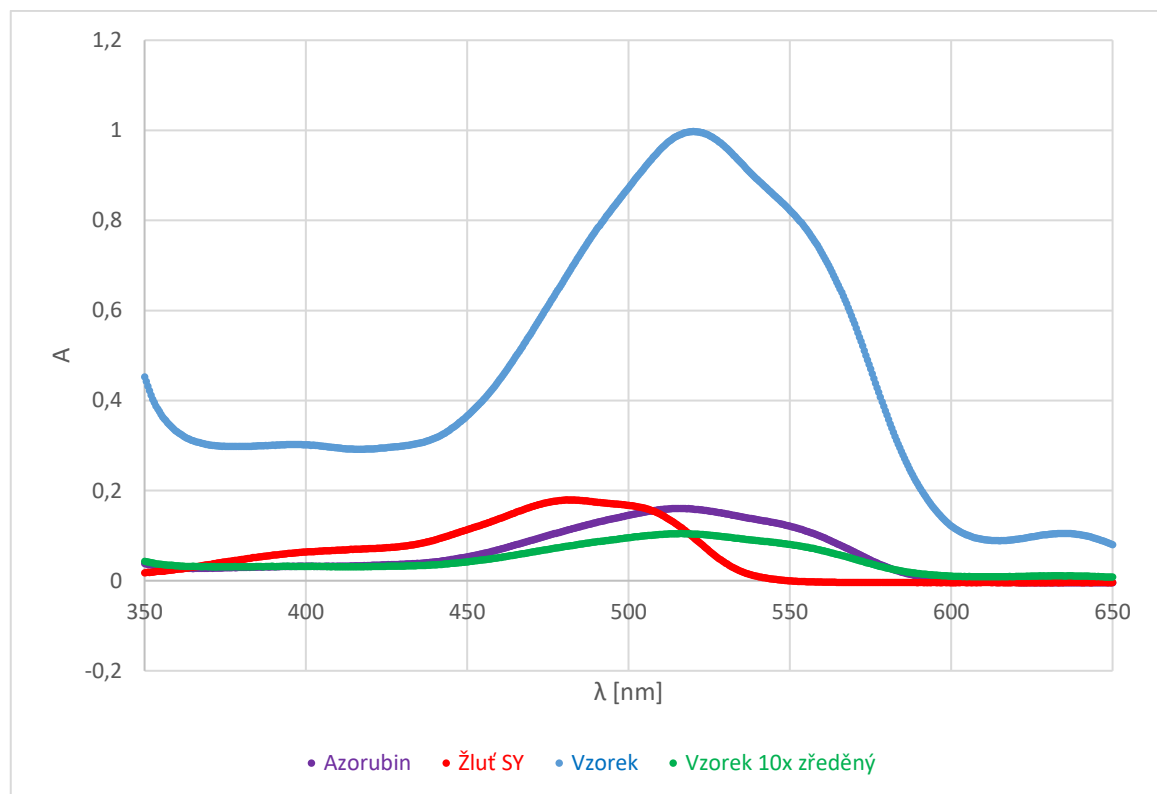
2.7.1 Úprava vzorku

Vzorek v práškové formě o hmotnosti 7,6 g byl rozpuštěn ve 140 ml destilované vody a odplyněn v ultrazvukové lázni. Přikapáváním 0,2 M NaOH bylo upraveno pH vzorku na hodnotu 5. Byl přefiltrován přes stříkačkový filtr, aby byly odstraněny nerozpuštěné částice, které by mohly rušit stanovení.

2.7.2 Absorpční spektrum léčivého přípravku

Byla proměřena absorbance vzorku v rozmezí vlnových délek 350-650 nm. Protože maximální hodnota absorbance dosahovala mnohem vyšších hodnot než absorbance standardních roztoku [Graf 11], vzorek byl zředěn 10x puřem a opět bylo změřeno absorpční spektrum ve stejném rozmezí vlnových délek.

Graf 11: Absorpční spektrum vzorku léčivého přípravku a standardních roztoků žluti SY o koncentraci 207 mg/l a azorubinu o koncentraci 207 mg/l



Vzorek dosahoval absorpčního maxima při stejné vlnové délce jako standardní roztok azorubinu [Graf 11]. Z toho lze soudit, že obsah barviva azorubinu je ve vzorku mnohonásobně větší než obsah žluti SY. Vzhledem k malému rozdílu mezi vlnovými délkami absorpčních maxim obou barviv nebylo možné stanovit obě barviva vedle sebe, a proto bylo dále stanoveno jen barvivo, kterého vzorek obsahoval více, a to byl azorubin.

2.7.3 Příprava roztoků se standardními přířavky

Do 25 ml odměrných baněk bylo odpipetováno po 2,5 ml upraveného vzorku. Do první odměrné baňky nebyl přidán standardní roztok, ale pouze byla doplněna puřem. Do dalších

4 baněk bylo přidáno 0,5; 0,75; 1 a 1,25 ml standardního roztoku azorubinu o koncentraci 207 mg/l a všechny byly doplněny pufrem po značku.

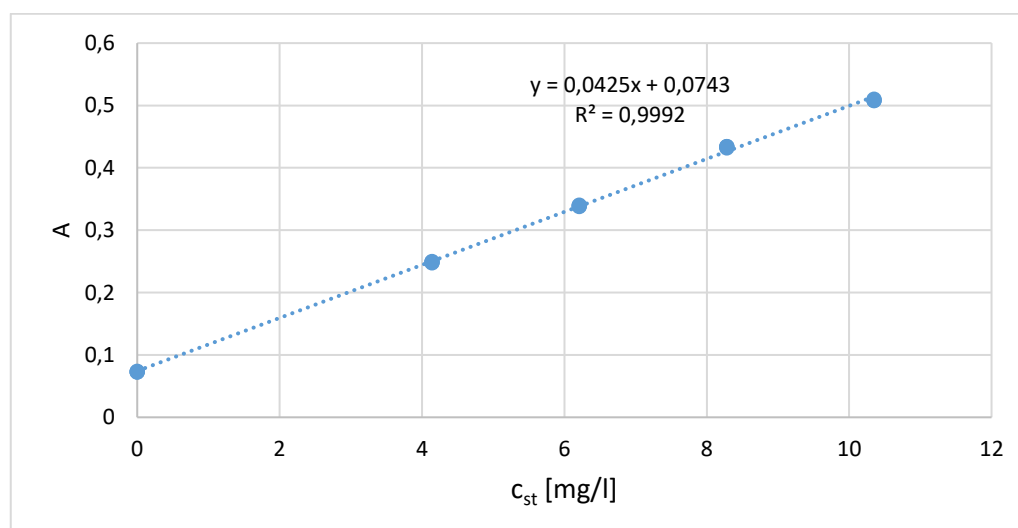
2.7.4 Měření a výsledky

Byla změřena absorbance vzorku a roztoků se standardním přidavky při vlnové délce 516 nm, při které dosahuje azorubin absorpčního maxima [Graf 6]. Měření bylo opakováno u všech roztoků 3x. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu a z rovnice regrese byl vypočítán obsah azorubinu ve vzorku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 7.

Tabulka 7: Absorbance vzorku léčivého přípravku a roztoků se standardními přidavky azorubinu o koncentraci 207 mg/l

Objem standardního přidavku [ml]	Přesná koncentrace [mg/l]	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0	0	0,073	0,074	0,073
0,5	4,14	0,250	0,249	0,248
0,75	6,21	0,338	0,340	0,339
1	8,28	0,432	0,434	0,434
1,25	10,35	0,508	0,510	0,508

Graf 12: Závislost absorbance na koncentraci standardního přidavku azorubinu o koncentraci 207 mg/l



Výpočet:

$$y = 0,0425x + 0,0743$$

$$Abs = 0,0425 c + 0,0743$$

$$Abs = k \cdot c \rightarrow c = \frac{Abs}{k}$$

$$c_1 = \frac{0,073}{0,0425} = 1,718 \text{ mg/l}$$

$$c_2 = \frac{0,074}{0,0425} = 1,741 \text{ mg/l}$$

$$c_3 = \frac{0,073}{0,0425} = 1,718 \text{ mg/l}$$

$$\emptyset c = 1,726 \text{ mg/l}$$

$$c_x = \emptyset c \cdot f_{zř} = 1,464 * 10 * \frac{140}{1000} = 2,05 \text{ mg/tableta}$$

Ve vzorku byl metodou vícenásobného standardního přídatku stanoven obsah azorubinu 2,05 mg na tabletu o hmotnosti 7,6 g. Pokud budeme brát Coldrex Max Grip jako nealkoholický nápoj, bude splňovat limity dané EFSA pro obsah azobarviv v potravinách.

Závěr

Úkolem bakalářské práce bylo vyhledat azobarviva, která se v aktuální době využívají v potravinách. S využitím literatury a internetových databází byla charakterizována konkrétní azobarviva, která současná legislativa povoluje pro použití v potravinářském průmyslu. Byla popsána jsem jejich zdravotní rizika a metody jejich stanovení v potravinách.

Během terénního průzkumu bylo zjištěno, že výrobci značně omezili v posledních letech přidávání azobarviv do svých výrobků, pravděpodobně kvůli odporu konzumentů k syntetickým barvivům a kvůli jejich možným špatným účinkům na chování dětí.

Nejpoužívanější azobarviva jsou tartrazin (E 102), žlutí SY (E 110), azorubin (E 122) a ponceau 4R (E 124). V současné době nalézají největší využití k barvení alkoholických a v menším množství nealkoholických nápojů, rybích výrobků, omáček, kompotů a bonbónů.

V praktické části byl spektrofotometricky stanoven obsah azobarviv ve 3 nealkoholických nápojích: malinové limonádě Aro, ananasovém nutričním nápoji Carnitine značky NUTREND a v léčivém přípravku s příchutí lesního ovoce Coldrex Max Grip.

V malinové limonádě značky Aro byl metodou kalibrační křivky stanoven obsah azorubinu 21,881 mg/l. V nutričním nápoji společnosti NUTREND byl metodou vícenásobného standardního přídatku stanoven obsah tartrazinu 14,64 mg/l. V léčivém přípravku Coldrex Max Grip byl metodou vícenásobného standardního přídatku stanoven obsah azorubinu 2,05 mg na tabletu o hmotnosti 7,6 g.

Ve všech třech vzorcích splňoval obsah azobarviv limit daný EFSA.

Seznam obrázků, tabulek a grafů:

Obrázek 1: Diazotace a kopulace [21]	14
Obrázek 2: Schéma HPLC [22].....	15
Obrázek 3: Schéma kapilární elektroforézy [23]	17
Obrázek 4: Schéma spektrofotometru [24]	18
Obrázek 5: Chemický vzorec tartrazinu.....	19
Obrázek 6: Chemický vzorec žluti SY.....	20
Obrázek 7: Chemický vzorec azorubinu	21
Obrázek 8: Chemický vzorec amarantu	22
Obrázek 9: Chemický vzorec ponceau 4R.....	23
Obrázek 10: Chemický vzorec červeně allura AC.....	24
Obrázek 11: Chemický vzorec černě BN.....	25
Obrázek 12: Chemický vzorec hnědi HT.....	26
Obrázek 13: Chemický vzorec litholrubinu BK.....	27

Pozn.: Všechny vzorce byly kresleny v aplikaci ACD/ChemSketch 12.01, Advanced chemistry development, Inc.

Tabulka 1: Potravinářská azobarviva povolená v EU	18
Tabulka 2: Poměr kyseliny a zásady pro přípravu Britton-Robinsonova pufru.....	30
Tabulka 3: Přesné navážky a koncentrace standardních roztoků barviv.....	30
Tabulka 4: Hodnoty absorbance kalibračních roztoků standardu azorubinu o koncentraci 207 mg/l ...	37
Tabulka 5: Absorbance vzorku 5x zředěného.....	37
Tabulka 6: Absorbance vzorku nutričního nápoje a roztoků se standardními přísadkami tartrazinu o koncentraci 204 mg/l.....	40
Tabulka 7: Absorbance vzorku léčivého přípravku a roztoků se standardními přísadkami azorubinu o koncentraci 207 mg/l.....	43

Graf 1: Závislost absorbance na pH u tartrazinu (E 102) při koncentraci 204 mg/l	31
Graf 2: Závislost absorbance na pH u tartrazinu (E 102) při koncentraci 204 mg/l - detail vrcholu	31
Graf 3: Závislost absorbance na pH u žluti SY (E 110) při koncentraci 207 mg/l	32
Graf 4: Závislost absorbance na pH u žluti SY (E 110) při koncentraci 207 mg/l – detail vrcholu	33
Graf 5: Závislost absorbance na pH u azorubinu (E 122) při koncentraci 207 mg/l.....	34
Graf 6: Závislost absorbance na pH u azorubinu (E 122) při koncentraci 207 mg/l - detail vrcholu	34
Graf 7: Absorpční spektrum vzorku limonády a standardního roztoku azorubinu o koncentraci 207 mg/l	36
Graf 8: Kalibrační křivka standardního roztoku azorubinu o koncentraci 207 mg/l.....	37
Graf 9: Absorpční spektrum vzorku nutričním nápoji a standardních roztoků tartrazinu o koncentraci 204 mg/l a žluti SY o koncentraci 204 mg/l	39
Graf 10: Závislost absorbance na koncentraci standardního přídatku tartrazinu o koncentraci 204 mg/l	40
Graf 11: Absorpční spektrum vzorku léčivého přípravku a standardních roztoků žluti SY o koncentraci 207 mg/l a azorubinu o koncentraci 207 mg/l.....	42
Graf 12: Závislost absorbance na koncentraci standardního přídatku azorubinu o koncentraci 207 mg/l	43

Seznam literatury

- [1] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách
- [2] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. (2009). *Dictionary of Food Science and Technology (2nd Edition)*. International Food Information Service (IFIS Publishing). ISBN 978-1-4051-8740-4.
- [3] Food-Info.net : Azo dyes . *Food-Info* [online]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/colour/azo.htm> [cit. 18.4.2019]
- [4] *Essential Guide to Food Additives*. 4th ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN 978-1-84973-560-5.
- [5] KLESCHT, V., HRNČÍŘÍKOVÁ, I., MANDELOVÁ, L. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006. Zdraví pro každého (Computer Press). ISBN 80-251-1292-6.
- [6] BEYER, H., WALTER, W. *Organic Chemistry - A Comprehensive Degree Text and Source Book - 7.3.1.6 Pyrazole Azo-Dyestuffs*. Woodhead Publishing. 1997, ISBN: 978-1-898563-37-2
- [7] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *Food Chemicals Codex (11th Edition)*, The United States Pharmacopeial Convention, 2018, ISBN: 978-1-936424-77-1
- [8] SMITH, J., HONG-SHUM, L. *Food Additives Data Book (2nd Edition) – III. Colourings*. John Wiley & Sons, 2011, ISBN: 978-1-4051-9543-0
- [9] MOTARJEMI, Y., MOY, G., TODD, E. *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, 2014, ISBN: 978-0-12-378612-8
- [10] Seznam éček. *FÉR potravina* [online]. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek> [cit. 10.5.2019]
- [11] ASH, M., ASH, I. *Specialty Chemicals - Source Book (4th Edition) - Linoleamide MEA to Liquid Crystal Polymer*. Synapse Information Resources, Inc., 2009, str. 2755, ISBN: 978-1-934764-37-4
- [12] ROVINA, K., SIDDIQUEE, S., SHAARANI, S., A Review of Extraction and Analytical Methods for the Determination of Tartrazine (E 102) in Foodstuffs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2016, 47(4), 309-324. ISSN 1040-8347.

[13] Kolektiv autorů. Návodů úloh z předmětu Laboratoř z instrumentálních metod analytických – HPLC

[14] Chromatografie na tenké vrstvě – Wikipedie. [online]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie_na_tenké_vrstvě [cit. 16.5.2019]

[15] Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). *Technické plyny, průmyslové plyny - airproducts.cz* [online]. Copyright © 1996 [cit. 16.05.2019]. Dostupné z: <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories-liquid-chromatography-with-mass-spectrometer-lc-ms>

[16] Pufry – WikiSkripta. [online]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Pufry> [cit. 7.6.2019]

[17] FOODS SYSTEM. [online]. Copyright © DG SANTE 2019 Dostupné z: https://webgate.ec.europa.eu/foods_system/main/?event=category.view&identifier=150 [cit. 10.06.2019]

[18] KOGAN, J. M. *Chemie barviv*. 1. Praha: SNTL-Státní nakladatelství technické literatury, n. p., 1960. 103-144 s.

[19] GAŠ, B. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír*. Praha, 2001, 2001(7).

[20] Spektrofotometrie (2. LF UK) – WikiSkripta. [online]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_\(2._LF_UK\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_(2._LF_UK)) [cit. 14.6.2019]

[21] Kopulace (chemie) – Wikipedie. [online]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kopulace_\(chemie\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kopulace_(chemie)) [cit. 14.6.2019]

[22] How Does High Performance Liquid Chromatography Work: Waters. [online]. Copyright © 2019 Waters. All rights reserved. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work [cit. 14.06.2019]

[23] Biochemie.sweb.cz [online]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm> [cit. 14.6.2019]

[24] Spektrofotometrie – Wikipedie. [online]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie> [cit. 14.6.2019]