

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Lucie Martínková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stabilita kyseliny karminové v modelovém syceném nápoji

Diplomová práce

2024

Bc. Lucie Martínková



Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Martínková**  
Osobní číslo: **C22337**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Stabilita kyseliny karmínové v modelovém syceném nápoji**  
Téma práce anglicky: **Stability of carminic acid in model carbonised beverage**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

- Vypracujte úvodní teoretickou část diplomové práce. Charakterizujte kyselinu karmínovou (vlastnosti chemické, fyzikální), původ, výrobu, bezpečnost a její využití v potravinářství. Zpracujte principy použitých analytických metod v diplomové práci. Vypracujte rešerši o její stabilitě (teplota, UV záření, obsah kyslíku aj.). Uveďte přehled metod její kvantifikace v potravinářských vzorcích s vysvětlením principů fungování. Pro rešerši využijte databáze zahraničních odborných periodik.
- Experimentálně ověřte stabilitu kyseliny karmínové v modelovém nápoji (soft-drink) v závislosti na délce a síle slunečního záření a přítomnosti cukrů. Zjistěte, zda může být ovlivněna i antioxidační aktivita nápoje.
- Výsledky zpracujte s využitím adekvátních statistických metod, diskutujte s již publikovanými daty.



Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024



Prohlašuji:

Práci s názvem „Stabilita kyseliny karmínové v modelovém syceném nápoji“ 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2024

Bc. Lucie Martínková v.r.





## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Liboru Červenkovvi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a veškerou pomoc v průběhu vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří také doc. Ing. Žanetě Dohnalové, Ph.D., za vstřícný přístup a pomoc v průběhu experimentu. Děkuji také celé mé rodině a přátelům, kteří mě v průběhu studia vždy podporovali.



## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá červeným barvivem kyselinou karmínovou a jejími vlastnostmi v modelovém nápoji. V teoretické části práce je popsána historie používání tohoto barviva, jeho výroba a využití nejen v potravinách. V další části je uveden vliv kyseliny karmínové na zdraví, legislativa spojená s barvivy a metody, jimiž lze kyselinu karmínovou stanovit. V experimentální části byl zkoumán obsah kyseliny karmínové v modelovém nápoji po ozáření slunečním zářením o výkonech 0,36 a 0,68 W/m<sup>2</sup> v závislosti na přítomnosti cukrů, CO<sub>2</sub> a době ozáření (7 a 14 h). Bylo zjištěno, že přítomnost cukrů a CO<sub>2</sub> (3,5 mg/l) měl pozitivní vliv na stabilitu kyseliny karmínové po slunečním ozáření. Vyšší dávka záření a delší čas měly významný vliv na obsah kyseliny karmínové ve vzorcích. Současně s tím byla sledována také antioxidační aktivita.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kyselina karmínová, modelový nápoj, antioxidační aktivita

## **TITLE**

Stability of carminic acid in model carbonised beverage

## **ANNOTATION**

This thesis investigates carminic acid, a red dye, and its properties when used in a model drink. The theoretical section provides an overview of the historical use of this dye, its production, and its applications beyond the food industry. Additionally, the thesis explores the impact of carminic acid on health, relevant legislation related to dyes, and methods for its determination. In the experimental section, the content of carmine acid was investigated in a model beverage after exposure to solar radiation at intensities of 0.36 and 0.68 W/m<sup>2</sup>, depending on the presence of sugars, CO<sub>2</sub>, and the duration of exposure (7 and 14 hours). It was found that the presence of sugar and CO<sub>2</sub> (at a concentration of 3.5 mg/l) had a positive impact on the stability of carmine acid after solar irradiation. Higher radiation doses and longer exposure times significantly affected the carmine acid content in the samples. Additionally, antioxidant activity was also monitored.

## **KEYWORDS**

Carminic acid, model beverage, antioxidant activity



# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	19
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	25
ÚVOD .....	29
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	30
1.1 Barviva v potravinách.....	30
1.1.1. Košenila/kyselina karmínová/karmín .....	31
1.2 Historie používání košenily .....	33
1.3 Popis <i>Dactylopius coccus</i> L. Costa.....	35
1.4 Výroba kyseliny karmínové a karmínu.....	37
1.4.1 Alternativní výroba kyseliny karmínové .....	38
1.5 Využití karmínového barviva .....	38
1.6 Vliv kyseliny karmínové na zdraví.....	40
1.6.1 Toxicita kyseliny karmínové .....	40
1.7 Stabilita barviv .....	41
1.8 Legislativa.....	42
1.9 Metody stanovení kyseliny karmínové v potravinách .....	43
1.10 Spektrometrie a spektrometrická měření .....	48
1.10.1 Měření barevnosti .....	49
1.10.2 Metody měření antioxidační aktivity.....	50
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	52
2.1 Přístroje a chemikálie.....	52
2.1.1 Přístrojové vybavení .....	52
2.1.2 Použité chemikálie.....	52



2.2 Příprava modelového vzorku limonády .....	53
2.2.1 Měření pH .....	54
2.2.2 Sycení limonád .....	54
2.2.3 Odběr vzorků do plastových 100ml lahvíček .....	55
2.3 Sluneční komora .....	55
2.4 Příprava vzorku .....	56
2.5 Měření barevnosti .....	56
2.6 Spektrofotometrické měření .....	57
2.7 Měření antioxidační aktivity .....	57
2.7.1 Metoda s DPPH radikálem .....	57
2.7.2 Antioxidační aktivita s využitím radikálu ABTS .....	58
2.7.3 Antioxidační aktivita s využitím metody FRAP .....	58
2.7.4 Příprava kalibračních řad s Troloxem .....	59
2.8 Titrační stanovení CO <sub>2</sub> .....	59
3. VÝSLEDKY .....	61
3.1 Obsah CO <sub>2</sub> a pH vzorků .....	61
3.1.1 Obsah CO <sub>2</sub> .....	61
3.1.2 pH vzorků .....	61
3.2 Spektrální charakteristiky .....	63
3.2.1 Transakce UV/VIS záření PET lahví .....	63
3.2.2 Spektrální charakteristika pracovních roztoků .....	64
3.3 Obsah kyseliny karmínové v modelových roztocích .....	65
3.3.1 Ověření normality dat obsahu kyseliny karmínové v modelových roztocích .....	66
3.3.2 Vliv experimentálních faktorů na obsah kyseliny karmínové .....	68





3.4 Antioxidační aktivita vzorků limonád .....	72
3.4.1. Metoda s DPPH radikálem .....	72
3.4.2 Antioxidační aktivita vzorků s využitím radikálu ABTS .....	73
3.4.3 Antioxidační aktivita vzorků s využitím metody FRAP .....	74
3.5 Ověření normality dat antioxidačních aktivit .....	76
3.5.1 Ověření normality dat antioxidační aktivity stanovené pomocí DPPH radikálu.....	76
3.5.2 Ověření normality dat antioxidační aktivity stanovené pomocí ABTS radikálu.....	77
3.5.3 Ověření normality dat antioxidační aktivity stanovené pomocí metody FRAP .....	79
3.6 Vliv experimentálních faktorů na antioxidační aktivitu vzorků .....	80
3.7 Barevnost limonád .....	91
4. DISKUSE.....	92
5. ZÁVĚR .....	93
POUŽITÁ LITERATURA .....	94
SEZNAM PŘÍLOH.....	98



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Struktura kyseliny karmínové .....	32
Obrázek 2 – Struktura karmínu.....	33
Obrázek 3 – Kaktus rodu <i>Opuntia</i> napadený nopálovcem karmínovým .....	34
Obrázek 4 – Kladoda kaktusu s nopálovcem karmínovým .....	34
Obrázek 5 – Samičky nopálovce karmínového ( <i>D. coccus</i> ).....	36
Obrázek 6 – Struktura kyseliny karmínové (R=OH) a kyseliny 4-aminokarmínové (R=NH <sub>2</sub> ).....	40
Obrázek 7 – Instrumentace dvoupraskové UV/Vis spektrofotometrie.....	49
Obrázek 8 – Souřadnicový systém CIELAB .....	50
Obrázek 9 – Plastová lahvička s víčkem (100 ml).....	55
Obrázek 10 – Porovnání barevnosti.....	91
Tabulka 1 – Seznam metod nalezený v literatuře pro stanovení kyseliny karmínové.....	45
Tabulka 2 – Navážky pro přípravu modelových roztoků limonády/ 500 ml.....	54
Tabulka 3 – Popisné statistiky pro hodnoty pH jednotlivých limonád.....	61
Tabulka 4 – Test na ověření shody rozptylů – variační koeficient.....	62
Tabulka 5 – Rovnice kalibrační přímky pro limonádu .....	65
Tabulka 6 – Rovnice kalibrační přímky pro limonádu bez cukrů .....	66
Tabulka 7 – Rovnice kalibrační přímky pro inhibici Troloxu v DPPH.....	73
Tabulka 8 – Rovnice kalibrační přímky pro inhibici Troloxu v ABTS.....	74
Tabulka 9 – Rovnice kalibrační přímky pro inhibici Troloxu v ABTS.....	75
Tabulka 10 – Korelační matice pro závislost dat – ekvivalent Troloxu DPPH/ABTS/FRAP ..	76
Tabulka 11 – Základní popisné statistiky barevnosti.....	91



Graf 1 – Krabicový graf pH roztoků limonád.....	62
Graf 2 – Propustnost záření pro jednotlivé materiály .....	63
Graf 3 – Porovnání spekter kyseliny karmínové a benzoátu sodného .....	64
Graf 4 – A = kalibrační závislost kyseliny karmínové v limonádě; B = kalibrační závislost kyseliny karmínové v limonádě bez cukrů .....	65
Graf 5 – A = N-P graf obsahu kyseliny karmínové ve vzorcích limonád; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat; C = N-P graf reziduí obsahu kyseliny karmínové ve vzorcích limonád .....	67
Graf 6 – Vliv jednoho faktoru na obsah kyseliny karmínové v nápojích.....	69
Graf 7 – Vliv dvou faktorů na obsah kyseliny karmínové v nápojích.....	71
Graf 8 – A = Závislost absorbance vzorku limonády na čase pro optimalizaci reakčního času metody DPPH; B = kalibrační závislost inhibice Troloxu v DPPH .....	72
Graf 9 – A = Závislost absorbance vzorku limonády na čase pro optimalizaci reakčního času metody ABTS; B = kalibrační závislost inhibice Troloxu v ABTS .....	74
Graf 10 – A = Závislost absorbance vzorku limonády na čase pro optimalizaci reakčního času metody FRAP; B = kalibrační závislost FRAP a Troloxu.....	75
Graf 11 – A = N-P graf DPPH ekvivalent Troloxu; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat.....	77
Graf 12 – A = N-P graf ekvivalentu Troloxu ABTS; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat; C = N-P graf rezidujících ekvivalentu Troloxu ABTS.....	78
Graf 13 – A = N-P graf ekvivalentu Troloxu; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat; C = krabicový graf reziduí FRAP indikující odlehlé body; D = N-P graf transformovaných dat rezidujících ekvivalentu Troloxu FRAP .....	79
Graf 14 – Vliv faktoru čas na antioxidační aktivitu vzorku .....	81
Graf 15 – Vliv faktoru síly slunečního záření na antioxidační aktivitu vzorku.....	82
Graf 16 – Vliv faktoru přítomnosti cukrů na antioxidační aktivitu vzorku .....	83
Graf 17 – Vliv faktoru přítomnosti CO <sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku .....	84
Graf 18 – Vliv faktorů čas a síla slunečního záření na antioxidační aktivitu vzorku .....	85
Graf 19 – Vliv faktorů čas a přítomnost cukrů na antioxidační aktivitu vzorku .....	86



Graf 20 – Vliv faktorů síla slunečního záření a přítomnost cukrů na antioxidační aktivitu vzorku .....	87
Graf 21 – Vliv faktorů čas a přítomnost CO <sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku .....	88
Graf 22 – Vliv faktorů síla slunečního záření a přítomnost CO <sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku .....	89
Graf 23 – Vliv faktorů přítomnosti cukru a přítomnosti CO <sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku	90





## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABTS = 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina

ADI = adekvátní denní příjem

ANOVA = vícefaktorová analýza rozptylu

b = číselná hodnota pro úsek/směrnici

CIE = Commission Internationale de l'Éclairage

CUPRAC = cupric reduction antioxidant power (antioxidační síla redukce mědi)

DPP = diferenční pulzní polarografie

DPPH = 2,2-di(4-terc-oktylfenyl)-1-pirilhydrazyl

EFSA = Evropský úřad pro bezpečnost potravin

ES = Evropská komise

EU = Evropská unie

F = výsledek F-testu pro platnost modelu

FAO = Organizace pro výživu a zemědělství

FRAP = ferric reduction antioxidant power (antioxidační síla redukce železa)

HORAC = test antioxidační kapacity hydroxylových radikálů

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICP-MS = hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem

IČ = infračervené záření

LOD = limit detekce

LOQ = limit stanovitelnosti

max. = maximum

MEEKC = mikroemulzní elektrokinetická chromatografie

MEKC = micelární elektrokinetická chromatografie



min. = minimum

NMR = nukleární magnetická rezonance

N-P graf = normální pravděpodobnostní graf

OSN = Organizace spojených národů

ORAC = test absorpční kapacity kyslíkových radikálů

PET = polyethylentereftalát

PLE = tlaková extrakce kapalinou

RP-HPLC-DAD = hmotnostní spektrometrie s reverzními fázemi a detektorem diodového pole

SFE = superkritická fluidní extrakce

Sm. odch. = směrodatná odchylka

SW-AdSV = pravoúhlá adsorptivní rozpouštěcí voltametrie

SW-W test = Shapiro-Wilkův test

t = výsledek t-testu pro platnost parametru

TAC = celková antioxidační kapacita

TCL = tenkovrstvá chromatografie

TOF-MS/MS = hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu

TOSC = test celkové kapacity vychytávání oxyradikálů

TPTZ = 2,4,6-tri(2-pyridil)-1,3,5-triazin

TRAP = test celkového parametru zachycování radikálů

Trolox = 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

UHPLC = ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie

UV = ultrafialové záření

Vis = viditelné světlo

WHO = světová zdravotnická organizace



## ÚVOD

V dnešní době se hodně dbá na kvalitu potravin. Jedním z jejích ukazatelů je bezpochyby jejich barva. Výrobci potravin se snaží různými přídatnými barvivy vylepšit vlastnosti svých výrobků, aby co nejlépe vyhovovaly spotřebitelům. Barviva mohou být přírodní, nebo syntetická. Kyselina karmínová je přírodní červenooranžové barvivo získávané ze sušených těl samic *Dactylopius coccus L. Costa* (česky nopálovec karmínový). Toto karmínové barvivo se používá jako přídatná látka do různých potravin, nápojů a kosmetických produktů. Přírodní látky nemají takové vlastnosti jako syntetická barviva, která si i při náročných podmínkách pořád zachovávají stejné vlastnosti. Přírodní barviva se mění s vlivem prostředí, nejsou tak stabilní a mají tendenci se rozkládat a tím měnit svoji barvu. Kyselina karmínová je poměrně stabilní, co se týče vlivu teploty. Ke změnám barvy však dochází, pokud je kyselina karmínová vystavena slunečnímu záření. Kyselina karmínová s sebou nese jak pozitivní účinky na zdraví, tak naopak u citlivých jedinců může vyvolávat alergickou reakci. Pozitivní vliv na zdraví má kyselina karmínová díky své antioxidační a protinádorové aktivitě.

Dosud není jasné, zda může být stabilita kyseliny karmínové při ozáření slunečním záření ovlivněna dalšími parametry, které připadají v úvahu u nealkoholických nápojů. Proto je cílem této práce zjistit vliv přítomnosti oxidu uhličitého (sycení) a cukrů na stabilitu kyseliny karmínové v modelovém nápoji vystavením různým dávkám slunečního záření v prodejních lahvích z polyethylentereftalátu (PET).

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Barviva v potravinách

Jedním z důležitých faktorů při výběru potravinářských výrobků je vizuální přitažlivost, takže barva a stabilita barviv jsou důležitým prvkem potravinářské vědy.<sup>1</sup> Odborníci již dlouho vědí, že barva hraje klíčovou roli ve vnímání jídla. Spolu s chutí a texturou považují potravinářští vědci barvu za hlavní faktor kvality potravin.<sup>2</sup> Barva je také důležitým ukazatelem pro přesné hodnocení kvality potravin a testy barevnosti mají velký vliv na míru přijetí potravin spotřebiteli a tím i úspěšnost výrobku na trhu.<sup>3,4</sup> Většina z nás je citlivá na barvu potravin. Chut' k jídlu je stimulována nebo utlumena téměř v přímé souvislosti s reakcí pozorovatele na barvu. Výrobci barev si kladou za cíl uspokojit potřeby výrobců potravin a nápojů tím, že poskytují celou škálu barev, které vyhovují všem aplikacím v rámci současných legislativních omezení.<sup>5</sup>

Různá přírodní a syntetická barviva se přidávají do potravin a farmaceutických výrobků, aby: i) kompenzovala ztrátu přirozené barvy různými faktory prostředí (slunce, vzduch, vlhkost nebo teplota); ii) zvýraznila přirozenou barvu; nebo iii) zvýšila atraktivitu produktu pro spotřebitele.<sup>4</sup> V dnešní době se k barvení potravin používá barvivo, jež může být přírodní nebo umělé.<sup>3</sup>

Rostoucím trendem v potravinářském průmyslu je nyní posun od umělých ingrediencí k přírodním.<sup>1</sup> Přírodní barviva pocházejí z přírodních zdrojů, jako jsou rostliny, živočichové a minerály, z nichž se získávají především extrakcí rozpouštědlem, mikrovlnnou extrakcí, extrakcí ultrazvukem a superkritickou extrakcí.<sup>3,6</sup> Mezi příklady přírodních barev patří například karamel, kurkuma, annatto a kyselina karmínová.<sup>6</sup> V potravinách jsou úspěšně používána přírodní červená barviva betanin, košenila, karotenoidy a zejména antokyany.<sup>7</sup> Organická barviva získaná z přírodních zdrojů jsou široce používána v technologii barvení a lakování již od starověku. Barviva jako alizarin, purpurin, kyselina karmínová, košenilová červeň, madder a pigmentové laky z nich připravené byly jedny z nejpoužívanějších, i když drahých barviv.<sup>8</sup> Přírodní barviva jsou ve srovnání s umělými bezpečnější a mají prokázané nutriční a farmakologické účinky.<sup>3</sup> Mají ale tendenci být méně stabilní než jejich syntetické protějšky, když jsou vystaveny světlu, vzduchu, změnám pH a teplotě.<sup>1</sup>

Výrobci se neustále snaží zlepšit stabilitu a manipulační vlastnosti barev pomocí technologie receptur, nových metod zpracování a v mnohem menší míře (zejména omezeno legislativními kontrolami) vývoje zcela nových pigmentů.<sup>5</sup> Syntetická barviva byla upřednostňována před

přírodními, protože jsou stabilnější, dodávají potravinám a nápojům očekávanou barvu, zaručují lepší jednotnost a jsou levnější. A zatímco dlouho byla považována také za bezpečnější, protože jsou inertnější, v dnešní době mnoho výzkumů odsuzuje jejich potenciální negativní vliv na zdraví. Syntetická barviva mohou obsahovat meziprodukty nebo vedlejší produkty syntézy, které jsou často mnohem nebezpečnější než hlavní produkt a mohou podléhat degradačním reakcím s tvorbou potenciálně toxických produktů. Zejména azobarviva mohou být rozložena přirozenou střevní flórou na aromatické aminy, jež mohou způsobit bolesti hlavy, astma a alergické reakce.<sup>6</sup>

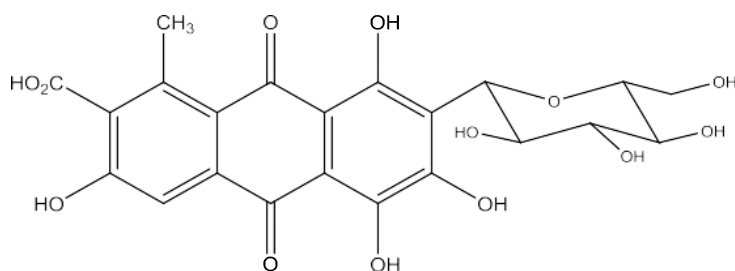
#### 1.1.1. Košenila/kyselina karmínová/karmín

Košenila je surový materiál získaný ze sušených těl samic *Dactylopius coccus L. Costa* (česky nopálovec karmínový), jehož aktivní barevnou složkou je kyselina karmínová a karmín je kovový koordinační komplex zahrnující hliník a kyselinu karmínovou.<sup>3,6</sup>

Košenila je tedy přírodní barvivo získané z hmyzu *Dactylopius coccus*, který se běžně vyskytuje jako parazitický hmyz na kaktusech opuncie v Severní a Jižní Americe.<sup>1,9</sup> Hmyz rodu *D. coccus* se používá především kvůli jeho výjimečně vysokému obsahu pigmentu, kde 16–24 % sušiny tvoří kyselina karmínová, dále nízkému obsahu tuku a snadnému chovu a sběru.<sup>10,11</sup> Kyselina karmínová se z košenily získává extrakcí vodným alkoholem.<sup>12</sup> Tímto způsobem mohou z ní být izolovány i izomery kyseliny karmínové, a to 2-C- $\alpha$ -glukofuranosid a 2-C- $\beta$ -glukofuranosid kyseliny kermesové.<sup>13</sup> Košenila se prodává v různých formách, přičemž primárním typem je prášková forma. Tento typ je také známý jako stříbrná košenila kvůli stříbrnému zbarvení a přítomnosti zbytků kokcerinu. Cena košenily se pohybuje okolo 19–40 USD za kilogram.<sup>9</sup>

Kyselina karmínová je molekula zodpovědná za odstín barviva běžně označovaného jako košenila a je biosyntetizována u všech druhů rodu *Dactylopius*.<sup>1,14</sup> Kyselina karmínová je barvivo používané v potravinářských přídatných látkách, kosmetice a farmaceutických výrobcích.<sup>13</sup> Její chemická struktura se skládá z antrachinonové struktury spojené s glukózovou cukernou jednotkou (obrázek 1).<sup>6</sup>

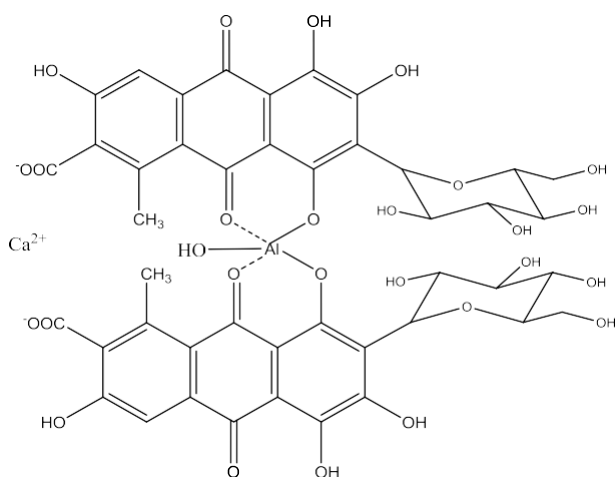




Obrázek 1 – Struktura kyseliny karmínové<sup>15</sup>

Kyselina karmínová je rozpustná ve vodě, alkoholu, esteru, kyselých a zásaditých roztocích, ale je nerozpustná v petroletheru, benzenu a chloroformu. Její bod tání je 135 °C, vykazuje fluorescenci a její molekulová hmotnost je 492.<sup>9,16-17</sup> Jako karboxylová kyselina je kyselina karmínová slabá kyselina, takže její disociační rovnováha zásadně závisí na pH roztoku. Rozdíly v elektronových strukturách disociované a nedisociované kyseliny karmínové se odrážejí v jejich absorpčních spektrech měřených při různých hodnotách pH mezi 2 a 12, ve kterých kyselina karmínová existuje ve čtyřech formách, a to  $H_4CA$ ,  $H_3CA^-$ ,  $H_2CA^{2-}$  a  $HCA^{3-}$ .<sup>10</sup> Je známo, že barva roztoků kyseliny karmínové je silně závislá na pH. Například její barva se může změnit ze žluté až oranžové na fialovou se zvýšením pH ze 2 na 12; může zhnědnout, když jsou v roztoku přítomny ionty  $Fe^{3+}$  nebo  $Ca^{2+}$ , a může zfialovět, když je vystavena působením proteinu. Kyselina karmínová vykazuje různé barvy v různých prostředích, což ovlivňuje její aplikaci v různých potravinových systémech.<sup>3,4</sup> Je to drahé přírodní červené barvivo – cena 100% přírodního barviva karmínové kyseliny v potravinářské kvalitě je asi 120–240 USD za kilogram.<sup>18</sup>

V současné době představuje barvivo, které se běžně používá k barvení potravin, karmín neboli hlinitý lak nebo také hlinito-vápenatý lak.<sup>12,19</sup> Karmín (obrázek 2) je z košenily získáván vodnou extrakcí a srážením hliníkem, vápníkem nebo jinými kovovými ionty.<sup>6,12</sup> Je to komplex se šestičlennou chelátovou kruhovou strukturou, který je tvořen atomem hliníku chelátovaným se dvěma molekulami kyseliny karmínové přes 5-hydroxylovou skupinu a ortho-karbonylový kyslík.<sup>3</sup> Přestože je karmín nerozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech, může být rozpustný v silně alkalických nebo kyselých roztocích, jako jsou hydroxid sodný nebo kyselina chlorovodíková. Při použití kyseliny chlorovodíkové se z karmínu uvolňuje kyselina karmínová.<sup>6,19</sup> Ve srovnání s ní je barva karmínového hlinitého laku stabilnější. Vzhledem k přítomnosti hliníku v molekule se však stále diskutuje o jeho bezpečnosti a aplikaci v potravinách.<sup>3</sup> Cena karmínu používaného v průmyslu je asi 185 USD za litr.<sup>9</sup>



Obrázek 2 – Struktura karmínu<sup>15</sup>

## 1.2 Historie používání košenily

Předpokládá se, že Egypťané barvili cukrovinky a víno již 1500–400 let před našim letopočtem.<sup>5</sup> Kyselina karmínová se používala jako barvivo i ve starověkých civilizacích Mayů nebo Inků.<sup>10</sup> Karmín a kyselina karmínová jsou jedny z nejstarších přírodních barviv.<sup>20</sup> Nejstarší známé textilie barvené košenilou byly objeveny v Paracasu v Peru okolo 10. až 12. století n. l.<sup>21</sup> První důkazy o domestikaci nopálovce karmínového pochází z 10. století n. l., ale některé zdroje uvádějí původ v Peru, jiné v mexických lokalitách Toltéků.<sup>21-22</sup> První použití červeného barviva v umění pocházelo z aztéckých, inckých a hispánských koloniálních kultur a používalo se především k barvení textilu a k malbě.<sup>23,24,25</sup> Barvivo známé jako „krev opuncí“ používali malíři a spisovatelé k malování soch, dřeva, kodexů, nástěnných maleb, barvení potravin, ale zejména k obarvování bavlny a peří používaného ke zdobení oděvů, stejně jako kosmetických materiálů používaných vojenskými, náboženskými a vládními představiteli.<sup>22</sup>

Nopálovec se živí převážně kaktusy rodu *Opuntia* (obrázek 3). Historie používání opuncie v Mexiku začala v předzemědělských dobách s nejstarším osídlením mexického území lidmi, a to před 12 000–14 000 lety, kdy sběr zahrnoval produkty rostlinných druhů, jako jsou opuncie, prosopis a agáve. Druhy opuncí patřily mezi hlavní složky lidské stravy v předzemědělských dobách. Mladé kladody byly konzumovány jako potrava, zatímco zralé byly používány k množení nopálovce (obrázek 4).<sup>22</sup>



Obrázek 3 – Kaktus rodu *Opuntia* napadený nopálovcem karmínovým (upraveno)<sup>26</sup>



Obrázek 4 – Kladoda kaktusu s nopálovcem karmínovým (foto autora)

Později po dobytí Ameriky Španěly v roce 1523 byl pigment poprvé exportován do Evropy, kde byl široce využíván.<sup>22-27</sup> Košenila byla poté jedním z hlavních vývozních artiklů z Nového Španělska (po zlatě a stříbře) a hrála významnou roli v mexické vysočině, kde byla soustředěna komerční produkce. Cena košenilového barviva byla tak vysoká, že jeho výroba byla španělským státním tajemstvím a předkolumbovské kodexy popisující jeho použití byly zničeny, aby se zabránilo pirátství.<sup>21</sup> Košenila vyvážená z Mexika do Španělska v období 1760 až 1850 činila v průměru 700 tun ročně.<sup>22</sup>

Ačkoli se tento hmyz nyní vyskytuje v několika zemích Evropy a Asie, mexická košenila z *Dactylopius coccus* L. Costa dosáhla vysokého významu, protože pigment vykazuje zlepšené fyzikálně-chemické vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou výsledkem selektivního šlechtění kaktusů a hmyzu během předhispánského věku. Mexická košenila má také > 95 % obsah kyseliny karmínové s malým množstvím dalších extrahovaných složek.<sup>28</sup> Plodiny opuncie byly záměrně zničeny během mexické války o nezávislost. Průmysl se nikdy nevzpamatoval kvůli konkurenci

zahraniční výroby a vývoji syntetických barviv. Po zničení mexického košenilového průmyslu se centrum výroby přesunulo do Peru. Populace *D. coccus* byla také vyvezena z Mexika na Kanárské ostrovy kolem roku 1825.<sup>21</sup>

V roce 1856 vyvinul Sir William Henry Perkin první syntetickou barvu mauvine (fialová) a na přelomu století se barevné přísady rozšířily po USA a Evropě ve všech druzích oblíbených jídel. Na začátku 20. století byla většina chemicky syntetizovaných barev odvozena z anilinu, ropného produktu, který je toxický. Chemicky syntetizované barvy se jednoduše vyráběly, byly levnější, měly vynikající barvicí vlastnosti a stačilo jich jen nepatrné množství. Snadno se mísily a nedodávaly potravinám nežádoucí příchutě. Prodejci v té době nabízeli více než 80 umělých barviv, z nichž některá byla určena k barvení textilií, nikoliv potravin. Mnoho barevných přísad ale nebylo nikdy testováno na toxicitu nebo jiné nepříznivé účinky. Po průmyslové revoluci se rychle rozvíjel jak potravinářský průmysl, tak „zpracované potraviny“. Přidávání barviv se používalo k zamaskování nekvalitních a falšovaných potravin.<sup>5</sup> Od 70. let 20. století se produkce košenily v Mexiku začala znovu rozvíjet v důsledku objevu karcinogenních a nebezpečných vlastností mnoha syntetických barviv.<sup>21</sup> Neexistovala žádná kontrola nad používáním syntetických barev, a tak nevyhnutelně musela přijít na řadu legislativa. Zavedený seznam povolených syntetických barviv nakonec vstoupil v platnost ve většině zemí na počátku tohoto století.<sup>5</sup> Od roku 2002 do roku 2009 byli hlavními producenty zeměmi košenily Peru (produkující košenilu na ploše 70 000 ha), Chile (5 000 ha), Bolívie (1 000 ha), Španělsko (300 ha), Jihoafrická republika (100 ha) a Mexiko (10 ha), zatímco Německo, Spojené státy, Francie, Anglie, Itálie a Japonsko představovaly hlavní trh.<sup>22</sup>

### 1.3 Popis *Dactylopius coccus* L. Costa

Košnilový hmyz je endemický fytofágní šupinatý hmyz z jednodruhové rodiny *Hemiptera: Dactylopiidae*.<sup>21</sup> Rod *Dactylopiidae* zahrnuje homologní skupinu hmyzu o délce 1–6 mm, přičemž dospělí samci jsou menší než dospělé samice. Tento hmyz je charakteristický svým bílým voskovitým krycím sekrem a barevným tělem a běžně se nazývá „košenilový hmyz“ nebo „košenilový šupinatý hmyz“. Čeleď *Dactylopiidae* je charakteristická tím, že se živí výhradně kaktusy.<sup>22</sup> Je to obligátní parazit kaktusů (především *Opuntia spp.*), přičemž jednotlivé druhy/biotypy rodu *Dactylopiidae* preferují různé druhy hostitelských kaktusů.<sup>21</sup> Přisedlý stav samic a omezená pohyblivost dospělých samců je činí zcela závislými na svých

hostitelských rostlinách.<sup>22</sup> Jako antimikrobiální a antipredativní obranný mechanismus syntetizuje všechen košenilový hmyz (volně žijící i domestikované druhy) antrachinonovou kyselinu karmínovou.<sup>21,23</sup> Čeleď *Dactylopiidae* zahrnuje devět druhů: *Dactylopius ceylonicus*, *D. coccus*, *D. confusus*, *D. opuntiae*, *D. tomentosus*, *D. austrinus*, *D. confertus*, *D. salmianus* a *D. zimmermanni*. Někteří autoři také uznávají desátý druh *D. bassi*. Prvních pět výše uvedených druhů bylo identifikováno v Mexiku, přičemž *D. coccus* (obrázek 5) je jediný domestikovaný druh, který se používá pro komerční účely. Tento druh je domestikován kvůli vyššímu množství a kvalitě barviva, které obsahuje. Kromě toho *D. coccus* postrádá ochranný voskovitý povlak, který mají divoké formy.<sup>21,22</sup>



Obrázek 5 – Samičky nopálovce karmínového (*D. coccus*)<sup>29</sup>

Stejně jako mnoho šupinatého hmyzu vykazuje i nopálovec karmínový pohlavní dimorfismus.<sup>23</sup> Samičky tohoto hmyzu tráví celý svůj život na povrchu hostitelské rostliny, zatímco samci jsou okřídlení a mají šest vývojových stadií.<sup>30</sup> Samice mají čtyři vývojová stadia: vajíčka, nymfu I, nymfu II a dospělého jedince.<sup>9,23</sup> Dospělé samice mají délku kolem 4–6 mm.<sup>23</sup> V dospělé fázi se páří a nabírají na objemu. Po oplození se uvnitř těla samice vyvíjejí a dozrávají vajíčka, která samice kladou v průběhu 10–15 dní. Nymfy I se líhnou několik minut po naklazení vajíček. Samci se vyvíjejí ze stadia nymfy II a tvoří kokon, aby prošli metamorfózou (fáze předkukel a kukel). Poté se samci vykuklí jako okřídlený hmyz připravený ke kopulaci. Vzhledem k tomu, že je sosák u samců atrofovaný, nepřijímají potravu a po několika dnech zemřou. Celý cyklus trvá v průměru 90 dní a závisí na podmínkách prostředí, zejména na teplotě.<sup>9,23</sup>

Bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny karmínové se mění v závislosti na velikosti a stadiu životního cyklu košenily. Nejmenší sterilní dospělé samice a oplodněné samice mají největší procento kyseliny karmínové, naopak nymfa II je fáze, která má její nejmenší procento.<sup>9</sup>

## 1.4 Výroba kyseliny karmínové a karmínu

Košenilová barviva se používají k barvení již nejméně 2800 let a výrobní metody se v průběhu historie výrazně nezměnily. *D. coccus* se chovají buď na velkých plantážích, nebo ve svém přirozeném prostředí.<sup>31</sup> Získávání a čištění kyseliny karmínové ze surové košenily je považováno za obtížný a komplikovaný proces. Konvenční průmyslové zpracování košenily dodržuje vícestupňový postup sestávající z ošetření organickými rozpouštědly, alkalické extrakce, separace pevné látky od kapaliny (flokulace/vločkování a filtrace), tvorby nerozpustného laku, izolace sraženiny (odstředění) a koncentrace.<sup>16</sup> Nejdůležitější podmínkou je počet extrakcí, i když vysoké teploty a vysoké procento methanolu v roztoku extrakčního činidla také významně přispívají k účinnosti extrakce.<sup>32</sup> Hliníkové laky (karmíny) se připravují vysrážením roztoku kyseliny karmínové na substrátu hydratovaného oxidu hlinitého za použití kationtů hliníku a vápníku jako srážedel, což vede ke vzniku hliníkových nebo vápenato-hliníkových laků. Hašený oxid hlinitý se obvykle čerstvě připravuje reakcí síranu hlinitého nebo chloridu hlinitého s uhličitanem sodným, hydrogenuhličitanem sodným nebo vodným amoniakem. Po vytvoření laku se produkt filtruje, promyje vodou a suší.<sup>15</sup>

Tradiční extrakční metody používané k získání tohoto barviva mají několik nevýhod, např. dlouhou dobu extrakce, nízkou selektivitu a nízkou účinnost extrakce. Výroba je proto nákladná a těžkopádná, navíc tyto konvenční techniky používají velké množství toxických rozpouštědel.<sup>16,31</sup> Kromě toho je známo, že se tyto procesy vyznačují nízkými výtěžky a obvykle poskytují produkty nízké kvality. Odhaduje se, že k získání jedné libry (454 g) kyseliny karmínové je zapotřebí 70 000 samic košenily.<sup>2,16,33</sup> Ačkoli komerční produkce závisí výhradně na extrakci z košenily, zvýšení rozsahu produkce je omezeno kvůli jejímu pomalému růstu a jejich omezené pěstitelné oblasti. Vzhledem k jejich omezené nabídce vzrostla navzdory rychle rostoucí poptávce cena za tunu od roku 2013 do roku 2018 o 73 %.<sup>33</sup> V poslední době se místo extrakce začaly používat nové techniky jako tlaková extrakce kapalinou (PLE), superkritická fluidní extrakce (SFE) a vodné dvoufázové systémy. Tyto metody jsou ekologičtější ve srovnání se současným použitím organických rozpouštědel při klasické extrakci. Vodné dvoufázové systémy jsou tvořeny směsí polymeru, vody a soli nebo dvou ve vodě rozpustných polymerů lišících se chemickou strukturou. Vodné dvoufázové systémy se ukázaly jako výkonná a atraktivní alternativa k čištění karmínu.<sup>12,16</sup>

#### 1.4.1 Alternativní výroba kyseliny karmínové

Produkcí kyseliny karmínové z hmyzu brání obtížný chov následovaný vícestupňovými procesy čištění, významné rozdíly v kvalitě a potenciální problémy s alergeny.<sup>18,33</sup> Žádoucí jsou proto levnější a stabilnější dodávky.<sup>31</sup> Produkce kyseliny karmínové mikroorganismy by mohla těmto nevýhodám zabránit a mohla by být potenciální alternativní cestou pro její udržitelné zásobování.<sup>18</sup>

Košenila může akumulovat kyselinu karmínovou až do 16–22 % suché hmotnosti, což naznačuje, že systém biosyntézy kyseliny karmínové je u tohoto hmyzu vysoce účinný. V nalezené literatuře je popsána biosyntéza kyseliny karmínové u *Aspergillus nidulans* a *Saccharomyces cerevisiae*. U *S. cerevisiae* mohla být rekonstruována kompletní metabolická dráha kyseliny karmínové. V této práci u *S. cerevisiae* bylo dosaženo titru 7,6 mg/l, což je stále nedostatečné pro ekonomickou výrobu kyseliny karmínové v průmyslovém měřítku.<sup>18</sup> V jiné nalezené literatuře byl prezentován důkaz konceptu heterologní mikrobiální produkce kyseliny karmínové u *Aspergillus nidulans* vývojem modifikované biosyntetické dráhy.<sup>31</sup> V další nalezené literatuře byla zkonstruována nová biosyntetická dráha pro produkci kyseliny karmínové pomocí *Escherichia coli* a glukózy. Slibný výsledek produkce kyseliny karmínové pomocí strategií metabolického inženýrství popsaných v této studii naznačuje, že další zlepšení výkonu kmene by umožnilo přechod od tradičního výrobního procesu založeného na hmyzu k procesu založenému na mikrobiální fermentaci.<sup>33</sup>

#### 1.5 Využití karmínového barviva

Kyselina karmínová je běžný přírodní pigment, který se používá k barvení farmaceutických, kosmetických nebo potravinářských přípravků v široké škále červených odstínů.<sup>24,34</sup> Mezi další odvětví, kde je kyselina karmínová používána jako barvivo, patří výroba textilu, plastů nebo umělecká činnost, a to jak ve formě barviv, tak jako lakový pigment.<sup>1,28,35</sup> Kyselina karmínová se pravidelně používá v potravinářském průmyslu jako barvivo v nápojích, džusech a mléčných výrobcích, jako jsou jogurty a zmrzliny, dále pak ke zvýraznění barvy masných a cukrářských výrobků.<sup>1,35,36</sup> Karmín lze nalézt v nanucích, nápojích z jahodového mléka, sýrech, krabích tyčinkách a dalších potravinách.<sup>2</sup> V současné době se karmín také používá při výrobě umělých květin, barev, rtěnek, potravinářských přísad a karmínového inkoustu.<sup>36</sup> Kromě toho se kyselina karmínová používá jako analytický nástroj pro stanovení kovů, v laditelných laserech a léčbě rakoviny.<sup>28</sup>

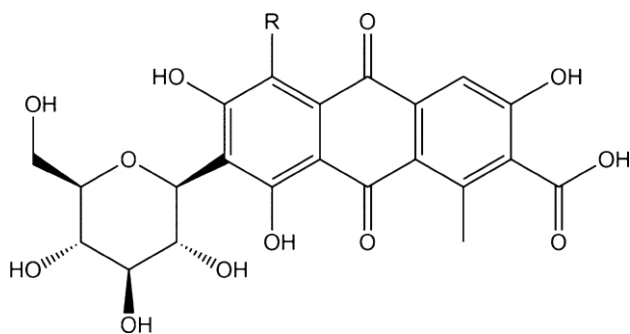
Kyselina karmínová má řadu biologických aktivit.<sup>37</sup> Několik studií uvádí, že působí jako antioxidant proti volným radikálům a reaktivním formám kyslíku, jako je singletový kyslík.<sup>34</sup> Jedna molekula kyseliny karmínové je schopna zachytit až tři volné radikály kyslíku.<sup>38</sup> Kyselina karmínová také chrání erytrocyty a DNA, a proto je považována za přírodní antioxidant.<sup>28,37,39</sup> Tuto pozoruhodnou aktivitu má kyselina karmínová v homogenním prostředí a ve vodných i metanolových roztocích. Její aktivity vychytávající volné radikály naznačují, že tato sloučenina je stejně silná jako kyselina askorbová, a dokonce silnější než Trolox.<sup>40</sup>

Kyselina karmínová je také známá jako látka patřící mezi typy protinádorových a antibiotických antracyklinových derivátů.<sup>20</sup> Bylo dobře zdokumentováno, že podporuje protirakovinnou aktivitu z několika důvodů: i) její struktura je velmi podobná protinádorovým lékům, ii) kyselina karmínová indukuje štěpení DNA s inhibiční aktivitou na nádory ascitu a iii) kyselina karmínová poskytuje účinný inhibitor DNA topoizomerázy, který pomáhá zachovat normální replikaci a transkripci DNA.<sup>28</sup> Kyselina karmínová by také mohla být schopna potlačit ascitové nádory, protože její struktura je velmi podobná shikoninu a antracyklinům, dvěma protinádorovým lékům, ale není tak toxická.<sup>37,39</sup>

Jedna studie dokonce potvrdila ochranné účinky kyseliny karmínové na zvířatech proti metabolickým poruchám poškození ledvin a dysfunkci především potlačením zánětu a oxidačního stresu u myši krmených fruktózou. Studie tedy zjistila, že suplementace kyseliny karmínové může být potenciální možností léčby chronického onemocnění ledvin vyvolaného fruktózou.<sup>41</sup>

Barva roztoků kyseliny karmínové se při nízkých hodnotách pH mění z červené na oranžovou, což omezuje její použití jako červeného barviva pro kyselé potraviny. „Kyselinově stabilní karmín“ se vyrábí reakcí kyseliny karmínové s hydroxidem amonným a kyselinou citronovou. Výsledné barvivo si udržuje červenou barvu i při nízkém pH, takže je vhodné pro barvení kyselých potravin. Chemická struktura „kyselého stabilního karmínu“ byla stanovena jako 7-a-D-glukopyranosyl-9,10-dihydro-5-amino-3,6,8-trihydroxy-1-methyl-9,10-dioxo-2-anthracenkarboxylová kyselina, tj. hydroxyskupina v antrachinonové struktuře kyseliny karmínové je nahrazena aminoskupinou (obrázek 6).<sup>42</sup> Tato látka je také označována jako kyselina 4-aminokarmínová.<sup>42</sup>





Obrázek 6 – Struktura kyseliny karmínové ( $R=OH$ ) a kyseliny 4-aminokarmínové ( $R=NH_2$ )<sup>42</sup>

## 1.6 Vliv kyseliny karmínové na zdraví

Potravinářská barviva jsou organické látky, které mají významné účinky na lidské zdraví a bezpečnost potravin. Nepředstavují problém, pokud jsou použity v množství denního příjmu (ADI). Košenilové barvivo je obecně vysoce bezpečný materiál, ale příležitostně vyvolává škodlivé alergické reakce.<sup>13,20,33</sup> Je považováno za alergen I. typu a souvisí s proteiny pocházejícími z hmyzu. Hlavním kandidátem uváděným jako alergen je interferenční protein – fosfolipáza.<sup>15,43</sup> Tento protein je spojován s kopřivkou, anafylaxí a astmatem z povolání při práci v továrně na koření.<sup>13,20</sup> Bylo by tedy vhodné, aby se obsah hmyzích bílkovin v potravinářské přídatné látce co nejvíce snížil.<sup>15</sup> Bylo také hlášeno, že v několika případech má kyselina karmínová zvýšený účinek na hyperaktivitu.<sup>20</sup> Kromě toho je mnoha lidem konzumace produktů pocházejících z hmyzu nepřijemná.<sup>33</sup>

### 1.6.1 Toxicita kyseliny karmínové

Na základě výsledků dostupných studií, které zahrnují řádně provedené studie in vitro doporučené v pokynech Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) k potravinářským přídatným látkám, bylo zjištěno, že kyselina karmínová není genotoxická ani není známo, že by byla karcinogenní.<sup>37,15</sup> Jelikož má karmín podobnou strukturu jako kyselina karmínová, předpokládá se, že ani karmín nemá genotoxické účinky. Negativní výsledky byly hlášeny při perorálním in vivo mikronukleárním testu u myši kostní dřeně s prokázanou expozicí cílové tkáně. Negativní výsledky byly hlášeny také v nedávných testech bakteriální reverze a in vitro mikronukleárních testech s kyselinou karmínovou.<sup>15</sup>

Krátkodobé a subchronické studie byly provedeny na potkanech a myších s výtažky z košenily a karmínu. Košenila nevyvolala histopatologické změny u potkanů při dávce 1500 mg/kg

tělesné hmotnosti/den, i když u samců potkanů bylo hlášeno mírné snížení hmotnosti některých orgánů a u samic potkanů byly hlášeny snížené hladiny fosfolipidů, triglyceridů a cholesterolu. Hematologické a mikroskopické účinky nebyly hlášeny u potkanů, kteří byli žaludeční sondou vystaveni působení amonného karmínu až 10 g/kg živé hmotnosti.<sup>15</sup>

## 1.7 Stabilita barviv

Stabilita přírodních barviv vůči ozáření, pH a teplotě je ve srovnání se syntetickými barvivy poměrně špatná, a proto mohou tato barviva podléhat rozkladu v potravinách a nápojích.<sup>6</sup> Některé z těchto faktorů mohou být částečně ovlivněny obaly produktů nebo nesprávným skladováním.<sup>1</sup> Obecně platí, že většina barevných přísad je v kombinaci s oxidačními a redukčními činidly v potravinách nestabilní. Vzhledem k tomu, že barva závisí na existenci konjugovaného nenasyceného systému v molekule barviva, jakákoli látka, která tento systém modifikuje (např. oxidační nebo redukční činidla, cukry, kyseliny nebo soli), ovlivní barvu. Kyselina karmínová a její deriváty jsou ceněny pro svou odolnost vůči teplu, světlu a kyslíku a pro jejich antioxidační vlastnosti a absenci mutagenní aktivity.<sup>14-16,34,35</sup>

Kyselina karmínová může být degradována vystavením světlu. Studie stability košenilového extraktu ukázala, že získané roztoky kyseliny karmínové byly stabilní ve tmě, obsah kyseliny karmínové byl však citlivý na světlo a po 84 dnech klesl na 6–12 %. V další studii byl zkoumán vliv simulovaného slunečního záření v 16 různých nápojích a ve vodném roztoku obsahujícím kyselinu karmínovou. Bylo zjištěno, že vlivem fotozáření došlo k degradační reakci, která způsobila pokles intenzity červené barvy v závislosti na době ozařování a nakonec vedla k úplnému vymizení červené barvy.<sup>15</sup> Výsledky potvrzují, že kyselina karmínová je obecně fotostabilnější v nápojích než ve vodném roztoku. Její chování se liší od chování pozorovaného u jiných barviv, která byla stabilní vůči fotozáření, pokud byla přítomna ve vodném roztoku, a odbouratelná v nápojích.<sup>6</sup> Rychlost odbarvení kyseliny karmínové je pomalejší, když je ve složitějších matricích, jako jsou nápoje, protože ostatní složky mají možnou ochrannou roli.<sup>15</sup> Klíčovou roli ve složení nápoje hraje kyselina askorbová, která pomáhá předcházet blednutí přírodních barviv, jako jsou kyselina karmínová nebo beta-karoten.<sup>6</sup>

Barva kyseliny karmínové se může změnit, když je vystavena vysokým teplotám po delší dobu.<sup>15</sup> V jiné studii však bylo karmínové barvivo nejvíce termorezistentním extraktem se zbytkovou absorbcí 95 % po 6 hodinách při 90 °C.<sup>7</sup> Pokud jde o tepelnou stabilitu karmínového laku, bylo prokázáno, že je odolný vůči vysokým teplotám v přítomnosti

kyslíku.<sup>24</sup> Bylo zjištěno, že toto přírodní barvivo je srovnatelně stabilní s jinými přírodními červenými barvivy, ale ne tak stabilní jako moderní syntetické alternativy.<sup>25</sup>

Předchozí studie ukázaly, že ionty kovů, jako jsou železo (Fe), vápník (Ca) a měď (Cu), mohou být chelatovány s kyselinou karmínovou za vzniku komplexů kovů, které mohou ovlivnit barvu kyseliny karmínové a její použití v potravinách. Ukazuje se, že  $\text{Fe}^{3+}$  může chelatovat s kyselinou karmínovou, která mění chromofor kyseliny karmínové, a její chelatace může být silnější než hliníku ( $\text{Al}^{3+}$ ).<sup>3</sup> Studie ukázaly, že  $\text{Cu}^{2+}$  může tvořit ligand s karboxylovými skupinami a ortho-hydroxylovými skupinami kyseliny karmínové a jeho stabilita je silnější než u komplexů tvořených zinkem ( $\text{Zn}^{2+}$ ), niklem ( $\text{Ni}^{2+}$ ), kobaltem ( $\text{Co}^{2+}$ ) a rtutí ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Proto je možné, že chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  je silnější než u  $\text{Al}^{3+}$ , což vede ke změně barvy karmínového hliníkového laku. Nízká koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  nemá na kyselinu karmínovou žádný vliv, ale po přidání vysoké koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  se barva výrazně změní. To naznačuje, že tato dvě barviva lze použít v potravinách s nízkým obsahem vápníku, ale jejich použití je naopak omezeno u potravin s vysokým obsahem vápníku. Toto barvivo také není vhodné ani pro potraviny obsahující železo a měď.<sup>3</sup>

## 1.8 Legislativa

V současné době se značení potravin liší podle typu potraviny nebo nápoje, podle země a podle toho, zda je barvivo syntetické nebo přirozeně odvozené.<sup>1</sup> Kromě zdravotních problémů by měla být přítomnost kyseliny karmínové v potravinách sledována např. kvůli náboženskému přesvědčení, stravovacím trendům nebo environmentálním aspektům.<sup>4</sup> Legislativa z roku 2008 uvádí seznam barviv povolených v potravinách a nápojích a uvádí maximální povolená množství, ale neobsahuje informace o inertnosti barviva vůči slunečnímu záření, tepelnému ošetření a možným zkříženým reakcím s jinými sloučeninami, které jsou v potravinách a nápojích rovněž přítomny.<sup>6</sup>

Kyselina karmínová se používá se k barvení kosmetiky a textilu a získala povolení k použití jako potravinářské barvivo od Organizace spojených národů (OSN) pro výživu a zemědělství (FAO), Světové zdravotnické organizace (WHO) a amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv.<sup>3</sup> Karmíny a kyselina karmínová jsou podle nařízení komise (EU) č. 231/2012<sup>44</sup> definovány jako „získané z vodného nebo alkoholového extraktu z košenily, které se skládají ze sušených těl samic hmyzu *Dactylopius coccus L. Costa*“. Karmíny a kyselina karmínová jsou popisovány jako červená až tmavě červená drobná pevná látka nebo prášek,

zatímco košenilový lak je obecně tmavě červená kapalina, ale lze jej také sušit jako prášek (nařízení komise (EU) č. 231/2012).<sup>44</sup> Karmín může být přítomen ve spojení s kationty amoniaku, vápníku, draslíku nebo sodíku jednotlivě, nebo v kombinaci (nařízení komise (EU) č. 231/2012).<sup>15,44</sup>

Košenila, kyselina karmínová a karmíny (obecně označovány pod kódem E 120) jsou červená antrachinonová barviva povolena jako potravinářské přídatné látky v Evropské unii (EU) v souladu s přílohou II nařízení Evropské komise (ES) č. 1333/2008.<sup>45</sup> Na základě směrnice 2009/35/ES<sup>46</sup> lze barviva schválená pro použití v potravinách používat také v léčivých přípravcích.<sup>4,15</sup> FAO a WHO stanovily přijatelný denní příjem (ADI) ve výši 5 mg/kg tělesné hmotnosti/den.<sup>19,15</sup> Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil pro kyselinu karmínovou přijatelný denní příjem 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti/den.<sup>4</sup>

Ve specifikacích ES jsou košenilová barviva definována jako barviva obsahující nejméně 2 % kyseliny karmínové v extraktech a nejméně 50 % kyseliny karmínové v chelátech. Zbývající materiál (50 až 80 %) není přesně specifikován, je popsán pouze jako kationty, které mohou být přítomny v přebytku barvy a také mohou obsahovat bílkovinný materiál získaný z hmyzu. Důležité je také stanovení maximálních limitů pro toxické prvky (arsen, olovo, rtuť a kadmium) přítomné jako možné nečistoty v E 120. Skutečné specifikace ES pro E 120 nezahrnují ani limity pro obsah hmyzích bílkovin, celkový popel, zbytková rozpouštědla nebo nerozpustné látky, ani mikrobiologická kritéria.<sup>15</sup>

## 1.9 Metody stanovení kyseliny karmínové v potravinách

Oficiální metoda stanovení kyseliny karmínové, navržená Společným výborem odborníků FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky, je založena na spektrofotometrickém měření vzorku ve zředěné kyselině chlorovodíkové při 494 nm.<sup>4,15</sup> Spektrofotometrie, rozpouštěcí voltametrie a diferenční pulzní polarografie byly úspěšně aplikovány na stanovení kyseliny karmínové nebo karmínů v různých potravinách. Tyto metody však nejsou vhodné pro stanovení strukturně podobných barviv, a proto je třeba přísně kontrolovat případné interference přítomné v potravinářských výrobcích. Tyto nevýhody lze vyřešit zařazením separačního kroku do analytického postupu.<sup>4</sup>

V dosud provedené rešerši literatury byly pro stanovení kyseliny karmínové použity tyto analytické metody: spektrofotometrie, spektrofluorometrie, chemiluminiscence, fluorimetrie,

chromatografie na tenké vrstvě (TCL), mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV-Vis nebo fluorescenční detekcí, kapilární elektroforéza, spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), diferenciální pulzní polarografie, stripovací voltametrie, enzymová imunoanalýza a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).<sup>20,32,35,47</sup> Přehled využitých metod pro stanovení obsahu kyseliny karmínové je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 – Seznam metod nalezený v literatuře pro stanovení kyseliny karmínové

Metoda	Parametry metody	Standard/ potravina	Příprava vzorku	LOD/LOQ	Lineární rozsah
HPLC <sup>32</sup>	Gradientová eluce, UV/Vis detekce	Sušená těla samic košenily	Smíchání s methanolem a vodou – homogenizace – extrakce na vodní lázni – ochlazení a odstředění – ředění vodou	LOD 2 µg/ml	5–250 µg/ml
HPLC <sup>19</sup>	Detektor fotodiodového pole, kolona NovaPak C18, izokratická eluce – mobilní fáze methanol a fosfátový pufr	124 vzorků různých potravin	Smísení s NaOH – homogenizace a odstředění	LOD 1 µg/ml	1–100 µg/ml
HPLC <sup>48</sup>	Gradientová eluce, detektor diodového pole	Vína – 17 červených, 4 bílá	SPE extrakce	LOD 0,1 mg/l LOQ 0,4 mg/l	nenalezeno
RP-HPLC-DAD <sup>35</sup>	Kolona Luna, detektor diodového pole, gradientová eluce, mobilní fáze – voda, kyselina octová, acetonitril	Šafrán	Smísení s KBr, homogenizace	LOD 0,03–0,1 ng/ml	0,1–1 ng/ml

Tabulka 1 – pokračování

UHPLC <sup>6</sup>	Kolona Acquity BEH, gradientová eluce, mobilní fáze voda, kyselina octová, methanol, isopropan, TOF – MS/MS	10 nápojů obsahujících kyselinu karmínovou, 6 nápojů obsahující E120	Odplynění, filtrace	nenalezeno	nenalezeno
spektrofotometrie <sup>10</sup>	Metoda standardního přídatku, 190–700 nm, pH 2–12	Lidské plazma, pomerančový nealkoholický nápoj	Plazma – odstranění proteinů, ultrafiltrace, centrifugace; pomerančový nápoj – filtrace	LOD 0,3 μM	0,5–14 μM
chemiluminescence <sup>37</sup>	Křemenná cela, optická dráha 0,5 cm	Lidská plazma, džusy, mangová šťáva, višňový sirup, želé prášek	Plazma – odstranění proteinů acetonitrem Nápoje – ředění vodou, filtrace	LOD 0,17 μg/ml	0,2–100 μg/ml
Mikročipová elektroforéza <sup>4</sup>	Fotometrická detekce 490 nm	Pastilky, měkké a tvrdé bonbóny, léčivá lízátka, šafrán, nealkoholický nápoj	Rozpouštění ve vodě, filtrace, úprava pH	LOD 69 nmol/l LOQ 207 nmol/l	200–1 mmol/l

Tabulka 1 – pokračování

Pravoúhlá adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (SW-AdSV) <sup>36</sup>	3elektrodový systém – visící kapková rtuťová elektroda, elektroda Ag/AgCl, platinová elektroda	Nealkoholický nápoj, zmrzlina – obě potraviny obsahovaly tatrazin a do obou byl přidán karmín	Smísení s acetátovým pufrem	LOD 1,43.10 <sup>-9</sup> mol/l	5.10 <sup>-8</sup> – 1,25.10 <sup>-7</sup> mol/l
Diferenční pulzní polarografie (DPP) <sup>47</sup>	3elektrodový systém – kapající rtuťová elektroda, elektroda Ag/AgCl, platinová elektroda, dvouprásková UV/Vis spektrometrie, metoda standardního přídatku	Vzorky cukrovinek a mléka s jahodovou příchutí	Bonbóny smísení s pufrovacím roztokem – homogenizace, filtrace Jahodové mléko smísení s acetonitrilem – odstranění mléčných bílkovin, homogenizace, centrifugace	LOD 0,16 mM	1–90 μM

Použité zkratky: LOD = limit detekce, LOQ = limit stanovitelnosti, TOF-MS/MS = hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu



## 1.10 Spektrometrie a spektrometrická měření

Sluneční světlo se dělí na ultrafialové záření (UV 9 %), viditelné světlo (Vis 41 %) a infračervené záření (IČ 50 %). Když je vlnová délka kratší, obsah energie v záření je větší.<sup>49</sup> Vlnové délky viditelného světla se pohybují mezi  $4 \times 10^{-5}$  cm (400 nm) pro fialovou a  $7,2 \times 10^{-5}$  cm (720 nm) pro tmavě červenou.<sup>50</sup> UV záření má nejkratší vlnové délky 100–400 nm a ty jsou dále klasifikovány jako UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) nebo UVC (200–280 nm) a vakuové UV pásmo (100–200 nm). UVB a UVC záření je absorbováno atmosférou. UVC složka světla v rozmezí 240–265 nm se používá pro mikrobiální inaktivaci.<sup>49,51</sup>

Spektrometrie je měření vzájemného působení chemické sloučeniny s elektromagnetickým zářením v dané oblasti vlnové délky. Sběr měřených signálů (absorbance) sloučeniny jako funkce elektromagnetického záření se nazývá spektrum. Mechanismus absorpční energie je odlišný v ultrafialové, viditelné, infračervené a nukleární magnetické rezonanci. Základním procesem je však absorpce určitého množství energie.<sup>50</sup> Absorpce je definována jako proces, při kterém se intenzita světla z měřicího paprsku snižuje z důvodu přechodu molekul ze vzorku ze základního stavu (obvykle singletový stav  $S_0$  pro molekuly při pokojové teplotě) do excitovaného stavu  $S_1$ ,  $S_2$  nebo vyššího. Číselná hodnota získaná v experimentu UV–Vis spektroskopie je aplikací Lambert-Beerova zákona (rovnice 1):<sup>52</sup>

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

A = absorbance

T = transmittance

$I/I_0$  = intenzita měřicího paprsku před průchodem/po průchodu vzorkem

$\varepsilon$  = molární absorpční koeficient

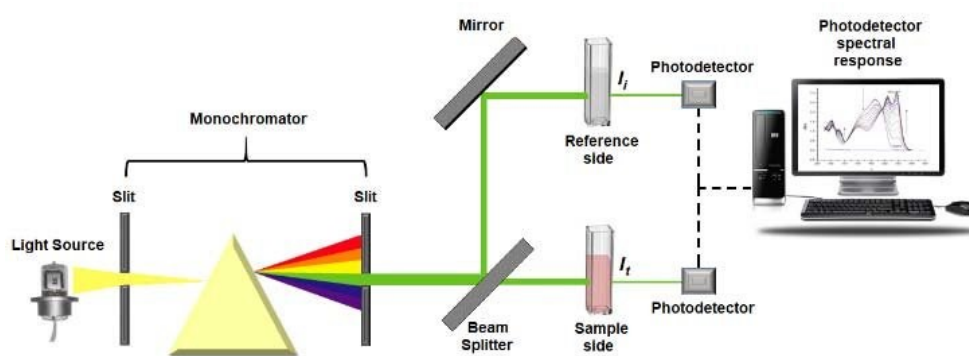
c = koncentrace

d = délka dráhy měřicího paprsku ve vzorku

Jak transmittance, tak absorbance jsou definovány na základě poměru dvou intenzit před a za vzorkem. Bez ohledu na to, jaká jednotka se používá pro I a  $I_0$ , absorpce a transmittance jsou bezrozměrné. Pro transmittanci se získaná hodnota obvykle vynásobí číslem 100 a označí se jako %T.<sup>52</sup>

Existují dvě třídy spektrofotometrů v závislosti na počtu světelných zdrojů: jednopaprskové pro postupné měření a dvoupaprskové pro simultánní měření (obrázek 7). U dvoupaprskového typu je světelný zdroj rozdělen na dva samostatné paprsky. Jeden paprsek se používá pro standard a druhý prochází vzorkem. Dvoupaprskové přístroje mohou mít dva detektory, nebo jeden. Další součásti spektrofotometru jsou: světelný zdroj, optické filtry, děliče paprsků a zrcadla, monochromátory a fotonové detektory.<sup>50</sup>

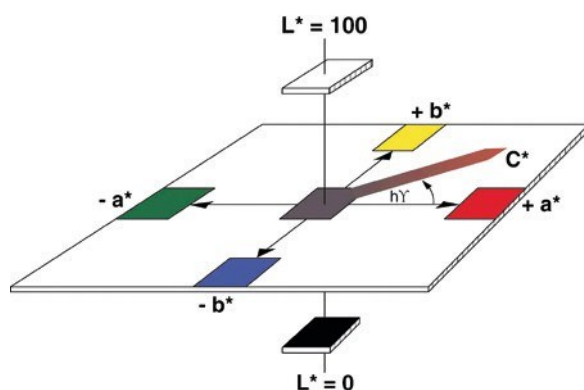
Kyselina karminová má silnou absorpenci při 491 nm, která je přiřazena přechodu  $\pi$  na  $\pi^*$  lokalizovaný na antrachinonovém jádru a pásy UV absorpance přiřazené elektronovým přechodům soustředěným na karbonylové a glukózové části.<sup>1</sup>



Obrázek 7 – Instrumentace dvoupaprskové UV/Vis spektrofotometrie<sup>53</sup>

### 1.10.1 Měření barevnosti

Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) stanovila určité standardní hodnoty, které se používají po celém světě pro měření barev. Systém CIELAB (obrázek 8), který je dnes široce používán, se skládá z kartézských souřadnic  $a^*$ ,  $b^*$  (odstín) a  $L^*$  (světlost). Každá barva může být reprezentována různými hodnotami  $L^*$ ,  $a^*$  a  $b^*$ . V některých případech se používají také polární souřadnice  $C^*$  (chromatičnost) a  $h^\circ$  (úhel odstínu).<sup>54</sup>



Obrázek 8 – Souřadnicový systém CIELAB<sup>54</sup>

Barevnost byla v našem experimentu měřena na spektrofotometru UltraScan VIS od firmy HunterLab. Jedná se o přístroj využívající geometrii  $d/8^\circ$  s automatickým začleněním/vyloučením zrcadlové složky. Optický systém má efektivní šířku pásma 10 nm a spektrální data jsou uváděna každých 10 nm. Výpočty jsou dle doporučení CIE prováděny od 380 nm do 780 nm. Zdrojem osvětlení je pulsní xenonová lampa – D65 včetně UV. Toto zařízení zahrnuje software EasyMatch QC.<sup>55</sup>

#### 1.10.2 Metody měření antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita je definovaná jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Metody měření antioxidační aktivity lze rozlišit na metody chemické a metody fyzikální. Chemické metody spočívají v použití činidel, která poskytují s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky. Fyzikální metody nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek. Namísto toho sledují změny fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovázejí. Příkladem takových fyzikálních metod je např. elektronová spinová rezonance, stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence.<sup>56</sup>

Z chemických testů založených na přenosu atomu vodíku byly prezentovány následující: test absorpční kapacity kyslíkových radikálů (ORAC), test antioxidační kapacity hydroxylových radikálů (HORAC), test celkového parametru zachycování radikálů (TRAP) a test celkové kapacity vychytávání oxyradikálů (TOSC). Mezi testy založené na přenosu jednoho elektronu patří test Cupric Reduction Antioxidant Power (CUPRAC), test Ferric Reduction Antioxidant

Power (FRAP), Folinův–Ciocalteuův test. Smíšené zkoušky, obsahující přenos atomu vodíku i elektronu zahrnují zkoušku 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovou kyselinou (ABTS) a zkoušku 2,2-di(4-terc-oktylfenyl)-1-pikrylhydrazyl (DPPH). Všechny tyto testy jsou založeny na chemických reakcích a hodnocení kinetiky nebo dosažení rovnovážného stavu se opírá o spektrofotometrii, která předpokládá výskyt charakteristických barev nebo změnu barvy analyzovaných roztoků, což jsou procesy sledované adsorpcí specifické vlnové délky.<sup>57</sup>

FRAP test je metoda založená na redukci sloučeniny železitých iontů ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na intenzivně modrý železnatý komplex ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pomocí antioxidantů v kyselém prostředí. Antioxidační aktivita je stanovena jako zvýšení absorbance při 593 nm a výsledky jsou vyjádřeny jako mikromolární ekvivalenty  $\text{Fe}^{2+}$  nebo ve vztahu ke standardnímu antioxidantu. Test FRAP se provádí za kyselých podmínek pH (pH = 3,6), aby se udržela rozpustnost železa. Test FRAP je jednoduchý, rychlý a efektivní a nevyžaduje speciální vybavení.<sup>57</sup>

Test ABTS byl vyvinut jako jednoduchá a pohodlná metoda používaná k měření celkové antioxidační kapacity (TAC). ABTS test měří schopnost antioxidantů neutralizovat 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonovou kyselinu) ( $\text{ABTS}^{*+}$ ) stabilní radikálový kationt, modrozelený chromofor maximální absorpce při 734 nm, jehož intenzita klesá s přítomností antioxidantů.  $\text{ABTS}^{*+}$  může být generován z ABTS v přítomnosti silných antioxidačních látek. Stupeň zabarvení modrozelené barvy, kvantifikovaný jako náhlý pokles absorbance na 734 nm, závisí na délce reakce, vnitřní antioxidační aktivitě a koncentraci vzorku. Výhody testu ABTS: i) testy ABTS umožňují stanovení široké škály antioxidačních látek, protože radikál  $\text{ABTS}^{*+}$  rychle reaguje se syntetickými i přírodními antioxidačními látkami (tj. fenoly, aminokyselinami, peptidy, vitamínem E a vitamínem C) v potravinách ii) antioxidační test ABTS lze použít v širokém rozsahu pH.<sup>57</sup>

Neutralizační DPPH test je založen na darování elektronů z antioxidantů za účelem neutralizace radikálu DPPH. Reakce je doprovázena změnou barvy DPPH měřené při 517 nm a změna barvy působí jako indikátor antioxidační aktivity. Antioxidační aktivita neutralizační metodou DPPH je definována jako účinná koncentrace antioxidantu nezbytná ke snížení počáteční koncentrace DPPH o 50 %.<sup>57</sup>

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a chemikálie

#### 2.1.1 Přístrojové vybavení

analytické váhy	ABT 220-4M; Kern; Německo
spektrofotometr	UV-2600; Shimadzu; Japonsko
přístroj pro měření barevnosti	UltraScan UV/Vis; HunterLab; USA
sluneční komora	Q-Sun XE-1; Q-panel Lab Products; USA
pH metr	CG842; Schott Glass; Německo
skleněná elektroda	Polilyte lab; Hemilton; USA
výrobník sody	AquaDream; Orion; Česká republika
ultrazvuková lázeň	Sonorex TK52; Bandelin; Německo
plastové lahvičky (100 ml), parafinový film, plastové zkumavky, mrazák, běžné vybavení laboratoře	

#### 2.1.2 Použité chemikálie

##### Limonáda:

Sacharóza, fruktóza, D-glukóza, benzoát sodný, kyselina citronová, citrát sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, monofosforečnan draselný (vše p.a., Penta, Česká republika)

kyselina karmínová > 98 %; Sigma-Aldrich; Německo

##### DPPH:

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) > 98 %, Tokyo chemical industry, Japonsko

Methanol – Honeywell, Chromasolv™, USA

### ABTS:

ABTS tableta > 98 %, Tokyo chemical industry, Japonsko

peroxodisíran draselný ( $K_2S_2O_8$ ) > 98 %, Penta, Česká republika

### FRAP:

TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) > 99 %, Sigma-Aldrich, Německo

kyselina chlorovodíková (HCl), chlorid železitý hexahydrát ( $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ ), kyselina octová ( $CH_3COOH$ ), hydroxid sodný (NaOH), (vše > 98 %, Penta, Česká republika)

### Stanovení $CO_2$

hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl), fenolftalein (vše > 98 %, Penta, Česká republika)

## 2.2 Příprava modelového vzorku limonády

Modelový roztok sladkého nealkoholického nápoje byl připraven podle literatury.<sup>1</sup> Roztok o objemu 500 ml byl vyroben rozpuštěním 27,5 g sacharózy, 2,76 g fruktózy, 2,75 g glukózy, 0,0757 g benzoátu sodného, 1,50 g kyseliny citronové, 0,071 g citrátu sodného, 0,255 g chloridu sodného, 0,255 g chloridu draselného a 0,205 g monofosforečnanu draselného v demineralizované vodě (tabulka 2). Pro kontrolní měření nebo případná ředění byly připraveny také roztoky (limonády) obsahující kyselinu karmínovou bez cukrů, bez kyseliny karmínové s obsahem cukrů a roztok bez cukrů i kyseliny karmínové (tabulka 2). Vzorky obsahující kyselinu karmínovou byly vždy uchovávány v temnu při laboratorní teplotě.

Tabulka 2 – Navážky pro přípravu modelových roztoků limonády/ 500 ml

Látka	Limonáda hmotnost (g)	Limonáda bez cukrů hmotnost (g)	Limonáda bez kyseliny karmínové hmotnost (g)	Limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové hmotnost (g)
Sacharóza	27,5	-	27,5	-
Fruktóza	2,76	-	2,76	-
Glukóza	2,75	-	2,75	-
Benzoát sodný	0,0757	0,0757	0,0757	0,0757
Kyselina citronová	1,5	1,5	1,5	1,5
Citronan sodný	0,071	0,071	0,071	0,071
Chlorid sodný	0,255	0,255	0,255	0,255
Chlorid draselný	0,255	0,255	0,255	0,255
Monofosforečnan draselný	0,205	0,205	0,205	0,205
Kyselina karmínová	0,05	0,05	-	-

### 2.2.1 Měření pH

Po rozpuštění a promíchání byl roztok doplněn redestilovanou vodou po rysku odměrné baňky. Následně bylo změřeno pH limonády na přístroji CG842 od firmy Schott Glass. Nejprve se přístroj zkalibroval podle návodu na pufrů s hodnotou pH 7,01 a 4,01. Následně byly proměřeny vzorky připravených limonád a výsledné pH bylo zaznamenáno.

### 2.2.2 Sycení limonád

Limonády byly syceny pomocí výrobníku sody. Část limonády (1000 ml) byla odebrána do speciální nádoby na sycení. Limonády byly vždy syceny stejným množstvím plynu. Po nasazení lahve do přístroje bylo tlačítko na sycení stlačeno čtyřikrát po dobu vždy jedné sekundy. Před vyndáním lahve bylo nutné opatrně odpustit přebytečný tlak v lahvi. Ihned po vyndání z přístroje byla lahev uzavřena víčkem.

### 2.2.3 Odběr vzorků do plastových 100ml lahviček

Ze syceného i nesyceného nápoje bylo vždy odebráno 100 ml do šesti předem popsanych plastových lahviček – dohromady tedy 12 kusů (obrázek 9). Objem byl odměřen pomocí odměrného válce. Se sycenou limonádou se zacházelo velmi opatrně, aby došlo k co nejmenší ztrátě CO<sub>2</sub> během přelévání. V případě sycené limonády bylo hrdlo lahve s víčkem navíc utěsněno parafínovým filmem. Takto připravené vzorky byly transportovány do Doubravic, kde byly vystaveny simulovanému slunečnímu záření.

Plastové lahvičky byly také vystaveny testu propustnosti záření. Ze dvou plastových lahviček byl vždy třikrát vystřižen pomocí nůžek malý čtvereček, který byl vložen do kyvetového prostoru spektrofotometru a byla měřena transmitance záření v rozsahu od 180–650 nm (UV-2600, Shimadzu, Japonsko). Referenční paprsek procházel prázdným kyvetovým prostorem (vzduch). Pro srovnání byla změřena také propustnost skleněné a křemenné kyvety (optická dráha 10 mm) proti vzduchu.



Obrázek 9 – Plastová lahvička s víčkem (100 ml), (foto autora)

## 2.3 Sluneční komora

12 kusů lahviček s nápojem bylo vystaveno simulovanému slunečnímu záření v testovací komoře Q-Sun XE-1 (Q-panel Lab Products) s xenonovou výbojkou umístěnou nad plochou se vzorky. Světlo z výbojky prochází přes filtr (Daylight), který simuluje denní světlo. Testovací cyklus měření zahrnoval nastavení intenzity světla v kontrolním bodě 340 nm a nastavením teploty černého tělesa, což je nejteplejší místo v testovací komoře, ale nereprezentuje teplotu v pracovním prostoru komory. Vzorky byly podrobeny testování



při dvou různých podmínkách intenzity světla a teploty černého panelu. První podmínky zahrnovaly nastavení intenzity na  $0,36 \text{ W/m}^2$  v kontrolním bodě 340 nm a teplotu černého tělesa na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . V druhých podmínkách bylo nastaveno intenzivnější záření, které by mělo odpovídat slunečnímu světlu dopadajícímu na zemský povrch v létě během poledne. Na přístroji bylo nastaveno  $0,68 \text{ W/m}^2$  v kontrolním bodě 340 nm a teplotu černého tělesa na  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorky byly vystaveny záření po dobu 7 nebo 14 hodin. Po 7 hodinách byl přístroj pozastaven a náhodně bylo odebráno 6 lahvíček limonády – 3 sycené a 3 nesycené. Zbylé limonády se v přístroji ponechaly dalších 7 hodin. Z Doubravic byly limonády transportovány zpět do kampusu univerzity.

## 2.4 Příprava vzorku

Před další analýzou byly sycené limonády zbaveny plynu v ultrazvukové lázni Sonorex TK52 (Bandelin; Německo) po dobu 5 minut. Pro měření barevnosti nebyla nutná žádná úprava vzorku. Pro měření UV-Vis spekter byly vzorky ředěny (3 ml limonády do 10 ml odměrné baňky). Měření barevnosti a spektrofotometrická měření probíhala ihned po ozáření. Pro účely dalších chemických analýz (antioxidační aktivita) byly vzorky uchovány při  $-25 \text{ }^\circ\text{C}$  v alikvótních podílech (ca 5 ml) v plastových zkumavkách.

## 2.5 Měření barevnosti

Barevnost limonád se sledovala na přístroji UltraScan VIS (HunterLab, USA). Přístroj byl po zapnutí standardizován na bílou a černou barvu. Byla použita křemenná kyveta s optickou délkou 50 mm. Barevnost u jednotlivých vzorků limonád byla měřena v módu celkové transmitance. Zaznamenaná barevnost byla zobrazována v hodnotách  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  a  $h^\circ$  s využitím programu EasyMatch QC (v. 4.70, HunterLab, USA).

## 2.6 Spektrofotometrické měření

Spektrofotometrické měření bylo prováděno na přístroji UV-2600 (Shimadzu, Japonsko). Byla použita křemenná kyveta s optickou délkou 10 mm. Byl použit program UVProbe (v. 2.70, Shimadzu, Japonsko), rychlost skenu byla nastavena na 480 nm/min a byla sledována absorbance v intervalu 220–650 nm (krok po 0,1 nm). Kyselina karmínová má své maximum v 492 nm. Jako srovnávací roztoky byly použity limonády bez kyseliny karmínové.

## 2.7 Měření antioxidační aktivity

Na tyto experimenty byly použity zamrazené vzorky limonád. Vzorky byly vždy před analýzou důkladně rozmrazeny v temnu při laboratorní teplotě. Tyto vzorky byly následně použity na všechny metody měření antioxidační aktivity.

### 2.7.1 Metoda s DPPH radikálem

Byl připraven metanolvý roztok radikálu DPPH navážením 12,5 mg činidla do 500 ml odměrné baňky. Jako srovnávací roztok byl vždy použit methanol. Nejprve byl optimalizován čas reakce (závislost absorbance na čase) mezi stabilním radikálem DPPH a kyselinou karmínovou. Vzorky limonád byly naředěny 3 ml limonády do 10 ml odměrné baňky. Bylo smícháno 5 ml roztoku DPPH s 0,5 ml ředěného roztoku limonády. Ihned po smíchání byla naplněna kyveta a umístěna do spektrofotometru a byla zaznamenána hodnota A (517 nm) každých 30 s po dobu 30 min.

Rozmrazené vzorky limonád byly ředěny 3 ml do 10 ml odměrné baňky. Následně bylo 0,5 ml ředěné limonády smícháno s 5 ml DPPH a roztoky byly následně uchovány v temnu po optimální dobu. Po této době byla sledována absorbance při 517 nm. Jako slepý vzorek byla použita limonáda bez kyseliny karmínové a limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové. Výsledky byly vyjádřeny jako % inhibice (I) podle rovnice 2:

$$I\% = \frac{A_{sl} - A_{vz}}{A_{sl}} \cdot 100 \quad (2)$$

$A_{sl}$  = absorbance slepého pokusu

$A_{vz}$  = absorbance vzorku

### 2.7.2 Antioxidační aktivita s využitím radikálu ABTS

Byl připraven roztok kationtu ABTS. Jako srovnávací roztok byla vždy použita redestilovaná voda. Roztok byl připraven rozpuštěním ABTS tablety (20 mg) v 10 ml destilované vody a následně bylo přidáno 0,2 ml 0,064 M peroxidisíranu draselného. Takto připravený roztok byl ponechán v klidu přes noc při laboratorní teplotě. Další den byla odměrná baňka doplněna redestilovanou vodou po rysku na objem 400 ml. Tento roztok byl zředěn odpipetováním 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou. Nejprve byl optimalizován čas reakce (závislost absorbance na čase) mezi roztokem kationtu ABTS a kyselinou karmínovou. 3 ml ABTS byly smíchány s 0,5 ml neředěné limonády. Ihned po smíchání byla naplněna kyveta a umístěna do spektrofotometru a byla zaznamenána hodnota A (734 nm) každých 30 s po dobu 30 min.

Rozmrazené vzorky limonád nebyly dále upravovány. 0,5 ml neředěné limonády bylo smícháno s 3 ml ABTS a vzorky byly následně uchovány v temnu po optimální dobu. Po této době byla sledována absorbance při 734 nm. Jako slepý vzorek byla použita limonáda bez kyseliny karmínové a limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové. Výsledky byly vyjádřeny jako % inhibice (I) podle rovnice 2.

### 2.7.3 Antioxidační aktivita s využitím metody FRAP

Byl připraven roztok FRAP. Jako srovnávací roztok byla vždy použita redestilovaná voda. Připraveny byly reakční roztoky: 20 mM chloridu železitého, 10 mM TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) rozpuštěný ve 40 mM kyselině chlorovodíkové a octanový pufr o pH 3,6. Všechny tři roztoky byly smíchány 1 : 1 : 10. Nejprve byl optimalizován čas reakce (závislost absorbance na čase) mezi roztokem FRAP a kyselinou karmínovou. 3 ml FRAP činidla byly smíchány s 0,3 ml neředěné limonády. Ihned po smíchání byla naplněna kyveta a umístěna do spektrofotometru a byla zaznamenána hodnota A (593 nm) každých 30 s po dobu 30 min.

Rozmrazené vzorky limonád byly ředěny 3 ml do 10 ml odměrné baňky. Následně bylo 0,3 ml ředěné limonády smícháno s 3 ml FRAP a roztoky byly následně uchovány v temnu po optimální dobu. Po této době byla sledována absorbance při 593 nm. Jako slepý vzorek byla použita limonáda bez kyseliny karmínové a limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové. Výsledky byly vyjádřeny jako absorbance vzorku minus absorbance pozadí, rovnice 3:

$$A = A_{vz} - A_{sl} \quad (3)$$

A = výsledná absorbance

$A_{sl}$  = absorbance slepého pokusu

$A_{vz}$  = absorbance vzorku

#### 2.7.4 Příprava kalibračních řad s Troloxem

Roztok Troloxu byl použit na kalibrační řady pro metody DPPH, ABTS a FRAP. Roztok Troloxu byl připraven navážením 0,05 g do 50 ml odměrné baňky a doplněn methanolem. Pro jednotlivé metody byly připraveny různé kalibrační řady. Pro metodu DPPH byla připravena kalibrační řada v rozsahu 50–150 mg Troloxu/l roztoku, pro metodu ABTS 50–250 mg Troloxu/l roztoku a pro metodu FRAP 20–520 mg Troloxu/l roztoku. Zásobní roztok Troloxu byl vždy ředěn do 10 ml odměrných baněk a doplňován methanolem. U metody DPPH bylo z připravených kalibračních roztoků odebráno 0,5 ml do 5 ml DPPH. U metody ABTS bylo odebráno 0,5 ml kalibračního roztoku do 3 ml ABTS a u metody FRAP bylo odebráno 0,3 ml roztoku do 3 ml FRAP. Připravené vzorky byly následně uchovány v temnu po optimální dobu jednotlivých metod. Poté byla sledována absorbance při 517 nm = DPPH, 734 nm = ABTS, 593 nm = FRAP.

#### 2.8 Titrační stanovení CO<sub>2</sub>

Metoda byla převzata z článku J. Šrogl, 1975.<sup>58</sup> Předem vychlazená redestilovaná voda byla pomocí přístroje na sycení nápojů karbonizována stejně jako v případě limonády. Ze sytící lahve bylo odměřeno 100 ml do lahviček s těsnícím uzávěrem a průpichovým septem. Pomocí injekční stříkačky bylo z lahviček odebráno vždy 5 ml do předem připravené titrační baňky s 10 ml vychlazeného 0,2 M NaOH. Do roztoku byly přidány 3 kapky fenolftaleinu a roztok byl titrován vychlazeným 0,2 M HCl do odbarvení růžové barvy. Titrace probíhala v ledové tříšti. Byla zaznamenána spotřeba HCl. Jako slepý pokus byla použita nekarbonizovaná redestilovaná voda. Pro analýzu byly připraveny nezávisle tři vzorky, každý z nich byl titrován celkem třikrát (N = 9). Množství CO<sub>2</sub> bylo vypočítáno podle rovnice 4:<sup>58</sup>

$$mg CO_2/100 ml = (V_1 - V_2) \cdot \frac{100}{V_3} \cdot 0,0088 \quad (4)$$

$V_1$  = spotřeba při slepém stanovení (ml)

$V_2$  = spotřeba při vlastním stanovení (ml)

$V_3$  = objem piva (ml)

## 2.9 Statistická analýza dat

Pro výsledky analytických stanovení byly odhadnuty střední hodnoty (aritmetický průměr) se standardní odchylkou. Kalibrační řady byly měřeny vždy duplicitně ( $N = 2$ ) a linearita závislosti parametrů byla ověřena pomocí lineární regresní analýzy metodou nejmenších čtverců. Dále byl zkoumán vliv čtyř faktorů na obsah kyseliny karmínové a antioxidační aktivitu měřenou třemi různými metodami (DPPH radikál, ABTS radikál a FRAP). Jako faktory vystupovaly čas ozařování (0, 7 a 14 h), dávka záření (0,36 a 0,68 W/m<sup>2</sup>), přítomnost cukrů (ANO vs. NE) a karbonizace nápoje (ANO vs. NE). Byla zvolena vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s interakcemi 2. řádu. Před vlastní ANOVOU byly ověřeny základní předpoklady o normalitě dat. Pro tento účel byl využit normální-pravděpodobnostní (N-P) graf a Shapiro-Wilkův (SW-W) test jak na originální data, tak na rezidua. V případě porušení základních předpokladů o normalitě dat byla provedena Box-Coxova transformace, a pokud byla nalezena optimální hodnota  $\lambda \neq 1$ , byla pro analýzu rozptylu použita transformovaná data. V případě porušení podmínky  $\lambda \neq 1$  byly hledány odlehlé body analýzou rozdělení reziduí s využitím krabicového grafu. Po vyloučení odlehlých hodnot byla opět provedena Box-Coxova transformace a pro další zpracování byla použita tato transformovaná data. Statistická analýza byla provedena na hladině pravděpodobnosti  $p = 0,05$  (Statistica, v. 14.0.0.15, Tibco Software, USA).

### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1 Obsah CO<sub>2</sub> a pH vzorků

##### 3.1.1 Obsah CO<sub>2</sub>

Touto titrační metodou bylo pokusně zjištěno, jaké množství plynu vzorky obsahovaly. Při tomto pokusu nebyla použita limonáda, ale dostatečně vychlazená redestilovaná voda, která byla karbonizována stejným způsobem jako vzorky limonád během experimentu. Důvodem byla barevnost roztoku, která bránila v použití acidobazického indikátoru fenolftalein. Sycená redestilovaná voda byla přelita do lahvičky s průpichovým septem, ze které bylo injekční stříkačkou odebráno 5 ml do titrační baňky s NaOH a fenolftaleinem. Takto připravený roztok byl titrován pomocí 0,2 M HCl. Bylo zjištěno, že obsah CO<sub>2</sub> v syceném nápoji byl  $3,5 \pm 0,3$  mg/L (rovnice 4). Relativní směrodatná odchylka pro opakovaná měření byla menší než 10 %. Výsledek experimentu potvrdil, že příprava sycených vzorků limonád probíhala za stálých podmínek.

##### 3.1.2 pH vzorků

Byly připraveny vzorky limonád podle tabulky 2. Po dokonalém smísení a rozpuštění bylo proměřeno jejich pH. Pomocí statistiky jsme vyhodnotili, v jakých hodnotách se pH pohybovalo. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.

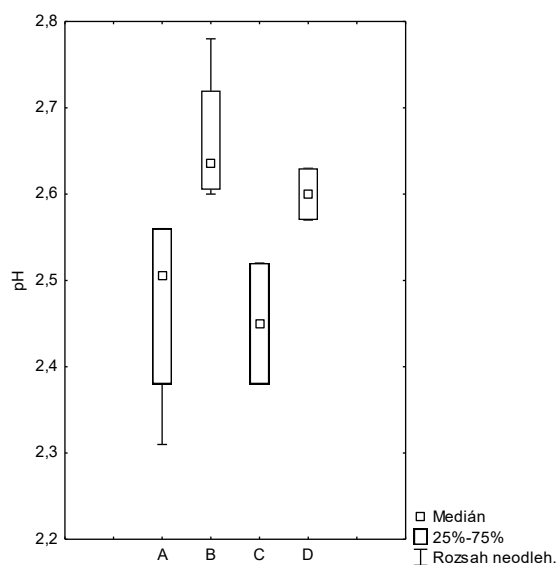
*Tabulka 3 – Popisné statistiky pro hodnoty pH jednotlivých limonád*

Proměnná	Platných N	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch
Limonáda	4	2,50	2,51	2,31	2,56	0,10
Limonáda bez cukrů	4	2,66	2,64	2,6	2,78	0,08
Limonáda bez kyseliny karmínové	2	2,50	2,45	2,38	2,52	0,10
Limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové	2	2,60	2,60	2,57	2,63	0,04

Sm. odch. = směrodatná odchylka

Hodnoty všech 12 naměřených pH se pohybovaly od minimální hodnoty 2,31 pro limonádu až po nejvyšší hodnotu 2,78 naměřenou pro limonádu bez cukrů. Z tabulky 3 je také patrné, že limonáda a limonáda bez kyseliny karmínové mají podobné hodnoty pH stejně jako limonáda bez cukrů a limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové.

Graf 1 – Krabicový graf pH roztoků limonád



A = limonáda, B = limonáda bez cukrů, C = limonáda bez kyseliny karmínové, D = limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové

Z krabicového grafu (graf 1) je patrný rozdíl mezi limonádami (A, C) a limonádami bez cukrů (B, D). Ukázalo se, že přidavek kyseliny karmínové do limonády měl na hodnotu pH menší vliv než přidavek cukrů.

Tabulka 4 – Test na ověření shody rozptylů – variační koeficient

Proměnná	Popisné statistiky
	Variační koeficient
Limonáda	4,80
Limonáda bez cukrů	3,10
Limonáda bez kyseliny karmínové	4,04
Limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové	1,63

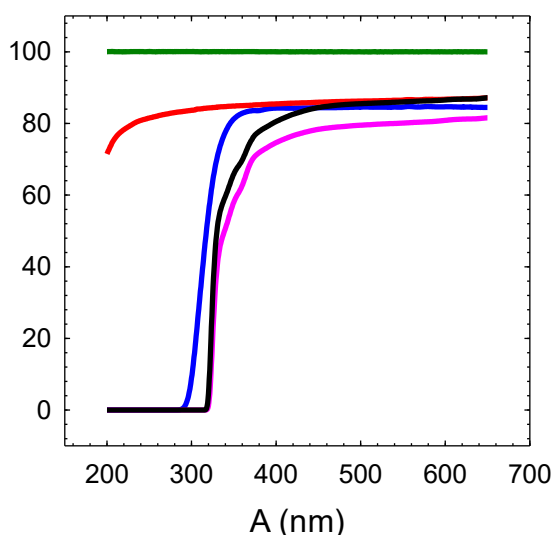
V tabulce 4 je vidět, že limonáda a limonáda bez kyseliny karmínové mají nejpodobnější rozptyl pH, zatímco limonáda bez cukrů a bez kyseliny karmínové má nejvíce odlišný rozptyl pH od zbývajících tří limonád. I když krabicový graf detekuje významný rozdíl mezi pH limonády s cukry (medián 2,51) a bez cukrů (medián 2,64), jedná se o rozdíl v desetínách pH. Obecně cukry nepodléhají disociaci ve vodných roztocích (nepatří mezi elektrolyty), pouze v bazickém prostředí se chovají jako vícesytné kyseliny.<sup>59</sup>

## 3.2 Spektrální charakteristiky

### 3.2.1 Transakce UV/VIS záření PET lahví

Pro zjištění propustnosti světelného záření PET materiálu lahvičky byl vystřižen čtverec o velikosti  $10 \times 5$  mm a vložen do kyvetového prostoru. Ze dvou náhodně vybraných lahviček byly vystřiženy 3 čtverečky tak, aby se daly zasunout do prostoru pro kyvety ve spektrofotometru. Nejprve byla spektrofotometrem změřena 100% transmittance, při které zůstal prostor pro obě kyvety (srovnávací a měrná) prázdný. Následně se do měřeného prostoru umístila kyveta z křemene nebo optického skla. Poté přišly na řadu kousky plastových lahviček. Ve všech případech probíhala měření proti vzduchu ve srovnávacím prostoru. Naměřené hodnoty byly zpracovány do grafu 2.

*Graf 2 – Propustnost záření pro jednotlivé materiály*



Transmittance vzorků PET lahví ( $N = 6$ , černá max., fialová min.), křemenné kyvety (červená křivka), kyvety z optického skla (modrá křivka), vzduchu (zelená křivka)

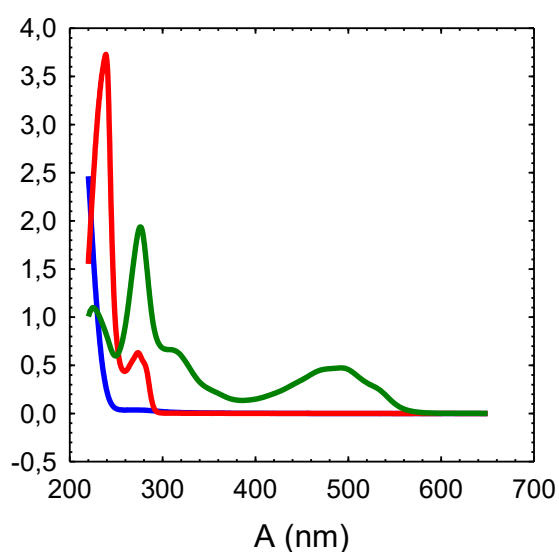
Z grafu 2 je patrné, že transmittance PET materiálu se pohybuje kolem 80 % v oblasti 400–650 nm. S dalším poklesem vlnových délek, tedy v oblasti UVA záření (315–400 nm) se propustnost PET materiálu dramaticky snižuje. Od 350 nm do 300 nm klesá transmittance o 1,5 % s každým nanometrem. Pro UVB a UVC (200–315 nm) je PET materiál zcela nepropustný.



### 3.2.2 Spektrální charakteristika pracovních roztoků

Než jsme se pustili do experimentu, bylo nutné ověřit, zda při vlnové délce 492 nm absorbují pouze kyselina karmínová. Bylo nutné připravit několik limonád s různým složením a ověřit, že nedochází k překryvu absorbancí v dané vlnové délce. Byly tedy připraveny následující limonády: limonáda bez benzoátu sodného a bez kyseliny karmínové, limonáda s benzoátem sodným a bez kyseliny karmínové, limonáda bez benzoátu sodného a s kyselinou karmínovou. U těchto limonád bylo následně proměřeno celé spektrum, abychom zjistili, kde která látka absorbuje. Absorpční spektra jsou vyznačena v grafu 3.

Graf 3 – Porovnání spekter kyseliny karmínové a benzoátu sodného



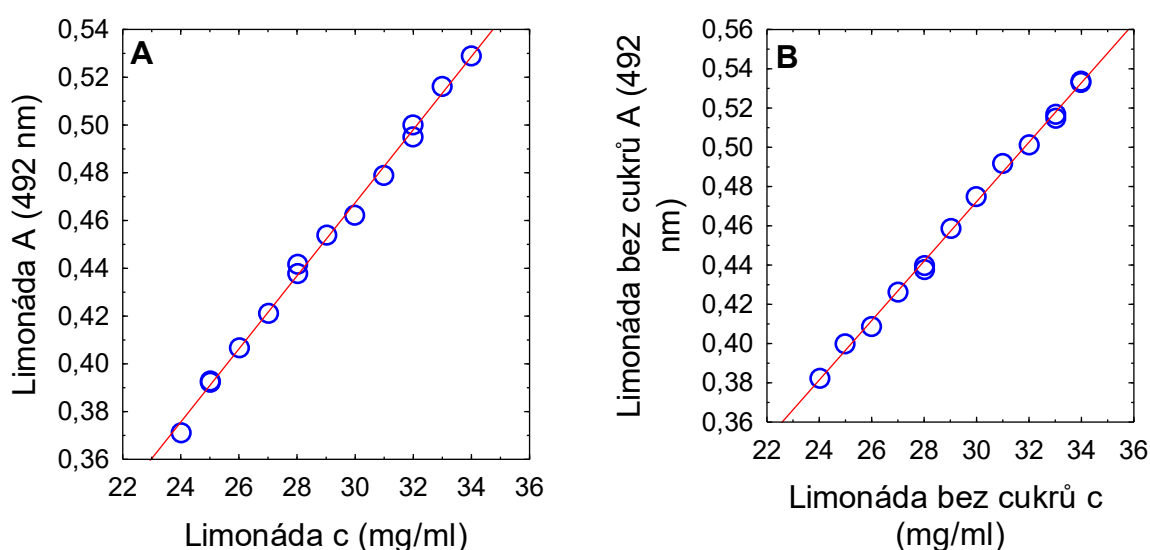
Absorpční spektrum limonády bez benzoátu sodného a bez kyseliny karmínové proti redestilované vodě (modrá křivka), absorpční spektrum benzoátu sodného (0,15 g/l, červená křivka), absorpční spektrum kyseliny karmínové (0,1 g/l, zelená křivka).

Modrá absorpční křivka ukazuje na spektrum látek jako například monofosforečnan draselný, kyselinu citronovou a citran sodný. V této limonádě nebyly obsaženy cukry, benzoát sodný ani kyselina karmínová. Červená absorpční křivka ukazuje na spektrum benzoátu sodného, který absorbuje v oblastech od 220 do 300 nm. V oblastech okolo 492 nm není vidět žádné absorpční maximum, které by mohlo rušit stanovení kyseliny karmínové. Zelená absorpční křivka patří absorpčnímu spektru kyseliny karmínové, která výrazně absorbuje okolo 275 nm. Kdyby byla zvolena tato vlnová délka, bylo by měření zkreslené, jelikož by svou absorpční přispíval i benzoát sodný. Proto byla zvolena vlnová délka 492 nm, ve které stanovení kyseliny karmínové nic neruší.

### 3.3 Obsah kyseliny karmínové v modelových roztocích

Pro potřeby kvantifikace byly připraveny kalibrační roztoky. Vzhledem k tomu, že jeden z faktorů je přítomnost cukrů v roztoku, byly připraveny zvlášť kalibrační řady roztoků limonády a limonády bez cukrů. Roztoky byly připraveny v koncentračním rozmezí 24–34 mg kyseliny karmínové na 1 ml nápoje. Absorbance jednotlivých roztoků byla sledována při 492 nm. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny karmínové je lineární až do rozsahu 100 mg/l, tento graf je uveden v seznamu příloh (příloha 1).

Graf 4 – A = kalibrační závislost kyseliny karmínové v limonádě; B = kalibrační závislost kyseliny karmínové v limonádě bez cukrů



Na experimentálně získaná data byla aplikována lineární regrese a byly vyhodnoceny parametry, jako jsou úsek a směrnice pro jednotlivé limonády. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Tabulka 5 – Rovnice kalibrační přímky pro limonádu

Shrnutí regrese pro závislou proměnnou: Limonáda A (492 nm) $R^2 = 0,996$ ; $F(1,12) = 3096,4$				
N = 14	b	Směrodatná chyba z b	t (12)	p-hodnot
Průsečík	0,0085	0,00798	1,07	0,31
Limonáda c (mg/ml)	15,3	0,27	55,65	< 0,001

b = číselná hodnota pro úsek/ směrnici; F = výsledek F-testu pro platnost modelu; t = výsledek t-testu pro platnost parametru

Závislost absorbance na koncentraci pro limonádu může být popsána rovnicí:  $A = 0,0085 + 15,3 \cdot c$  ( $R^2 = 0,996$ ); přičemž průsečík rovnice je statisticky nevýznamný ( $p > 0,05$ ), a proto se dá rovnice zkrátit na tvar  $A = 15,3 \cdot c$ .

Tabulka 6 – Rovnice kalibrační přímky pro limonádu bez cukrů

Shrnutí regrese pro závislou proměnnou: Limonáda bez cukrů A (492 nm) $R^2 = 0,998$ F (1,12) = 4851,2				
N = 14	b	Směrodatná chyba z b	t (12)	p-hodnot
Průsečík	0,018	0,006	2,81	0,016
Limonáda bez cukrů c (mg/ml)	15,1	0,22	69,65	< 0,001

b = číselná hodnota pro úsek/ směrnici; F = výsledek F-testu pro platnost modelu; t = výsledek t-testu pro platnost parametru

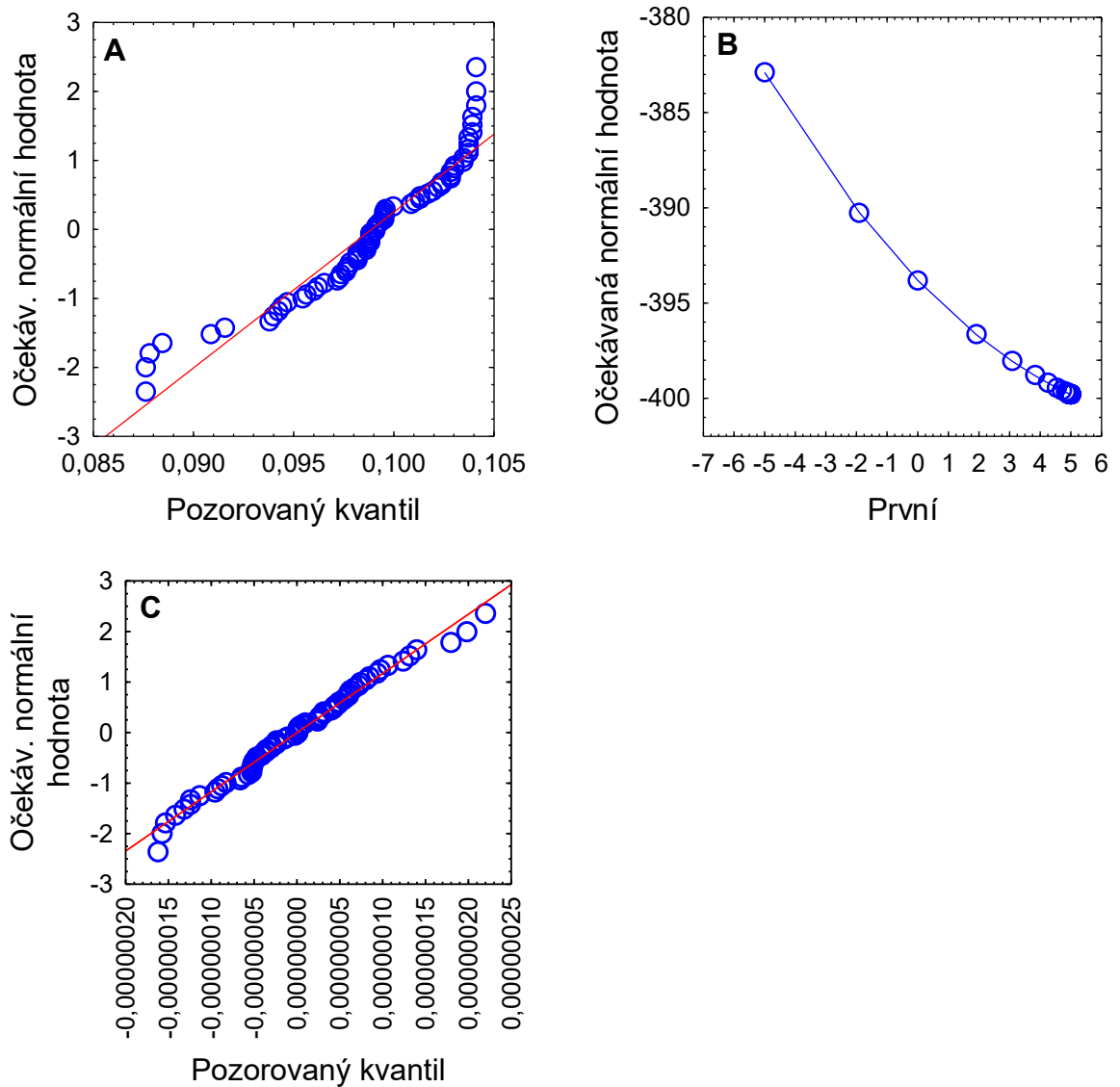
Závislost absorbance na koncentraci pro limonádu bez cukrů lze popsat rovnicí:  $A = 0,018 + 15,1 \cdot c$  ( $R^2 = 0,998$ ); přičemž oba parametry jsou statisticky významné, a rovnici tedy nelze dále upravovat.

V seznamu příloh (příloha 2) jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu kyseliny karmínové ve vzorcích. Obsah barviva se pohyboval v koncentračním rozmezí 89,0–103,9 mg/l. Vzhledem k vlivu čtyř různých faktorů budou výsledky komentovány v další kapitole.

### 3.3.1 Ověření normality dat obsahu kyseliny karmínové v modelových roztocích

Pro správnou volbu metody analýzy rozptylu bylo potřeba ověřit základní předpoklady o normalitě dat, jež byla ověřena pomocí normálního-pravděpodobnostního (N-P) grafu a Shapiro-Wilkova (SW-W) testu. Na grafu 5A lze vidět, že data nepocházejí z normálního rozdělení z důvodu výrazně odlehlých měření v případě nízkých a vysokých koncentrací. Tuto skutečnost potvrdil také výsledek SW-W testu 0,9064;  $p < 0,001$ .

Graf 5 – A = N-P graf obsahu kyseliny karminové ve vzorcích limonád; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat; C = N-P graf reziduí obsahu kyseliny karminové ve vzorcích limonád



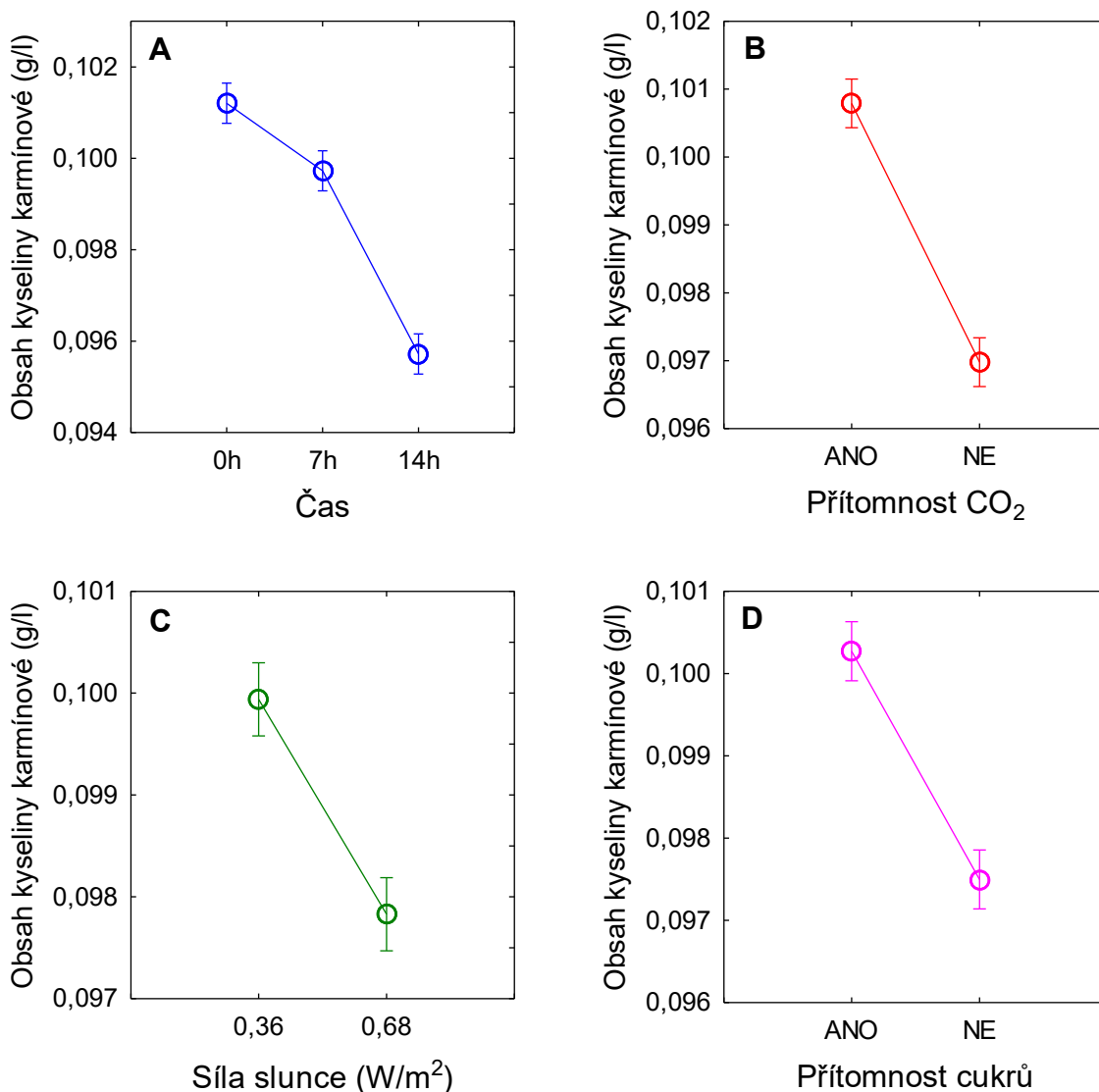
Odlehle hodnoty nelze vyloučit, proto jsme se rozhodli použít Box-Coxovu transformaci dat. Z grafu 5B lze vidět, že Box-Coxova transformace nebyla úspěšná, odchylka transformovaného rozdělení od normálního rozdělení klesá s hodnotou  $\lambda$ . Průběh funkce však nevykazuje žádné minimum, a proto nelze Box-Coxovu transformaci na tyto hodnoty použít. Pro analýzu rozptylu budou použita všechna netransformovaná data. Základní předpoklady rozdělení byly tedy ověřeny pomocí reziduální analýzy (graf 5C). Z tohoto grafu lze vyčíst, že rezidua vykazují normalitu, SW-W = 0,986; p = 0,577.

### 3.3.2 Vliv experimentálních faktorů na obsah kyseliny karmínové

Vliv faktorů na obsah kyseliny karmínové byl sledován s využitím vícefaktorové ANOVY s interakcemi druhého řádu. Jako faktory byly použity čas (0. h, 7. h a 14. h), síla slunečního záření ( $0,36 \text{ W/m}^2$  nebo  $0,68 \text{ W/m}^2$ ), přítomnost cukrů a/nebo přítomnost oxidu uhličitého v roztocích limonád. Jako proměnné byly použity hodnoty obsahu kyseliny karmínové v nápojích (g kyseliny karmínové/l). Jako vstupní data pro vícefaktorovou analýzu byla použita originální data, kde základní předpoklady pro normální rozdělení byly ověřeny pomocí reziduální analýzy v předchozí kapitole.

Následující čtyři grafy popisují vždy jen vliv jednoho faktoru na obsah kyseliny karmínové v nápojích. Všechny grafy byly vyhodnoceny jako statisticky významné ( $p < 0,001$ ), to znamená, že každý z faktorů měl zásadní podíl na obsahu kyseliny karmínové v nápojích. Ač jsou všechny faktory vyhodnoceny jako významné, obsah kyseliny karmínové se měnil v rámci setin a tisícín gramů na litr (jednotky-desítky mg/l). Vliv času na obsah kyseliny karmínové lze vidět v grafu 6A. Na tomto grafu lze vidět, jak obsah kyseliny karmínové s časem klesá. Mezi 0. a 7. h je menší rozdíl než mezi 7. a 14. h. Přítomnost  $\text{CO}_2$  v nápojích má ochranný efekt na obsah kyseliny karmínové v nápojích, jak lze vidět v grafu 6B. Průměrný obsah kyseliny karmínové se lišil o čtyři setiny mezi sycenými a nesycenými nápoji. Na grafu 6C lze vidět, jaký vliv mělo simulované sluneční záření na obsah kyseliny karmínové. Pokud byly nápoje vystaveny vyšším dávkám slunečního záření, byl následně naměřen menší obsah kyseliny karmínové v těchto nápojích. Posledním testovaným parametrem je přítomnost cukrů v nápojích a jaký mají vliv na obsah kyseliny karmínové. Z grafu 6D je jasně patrné, že cukry mají podobnou ochrannou funkci na kyselinu karmínovou, jako má  $\text{CO}_2$  v nápojích. Rozdíl mezi slazenými a neslazenými nápoji v obsahu kyseliny karmínové jsou pouze necelé tři setiny.

Graf 6 – Vliv jednoho faktoru na obsah kyseliny karmínové v nápojích



A = faktor čas (0. h, 7. h, 14. h); ( $p < 0,001$ )

B = faktor přítomnosti CO<sub>2</sub> (ANO/ NE); ( $p < 0,001$ )

C = faktor síly slunce (0,36 W/m<sup>2</sup>/ 0,68 W/m<sup>2</sup>); ( $p < 0,001$ )

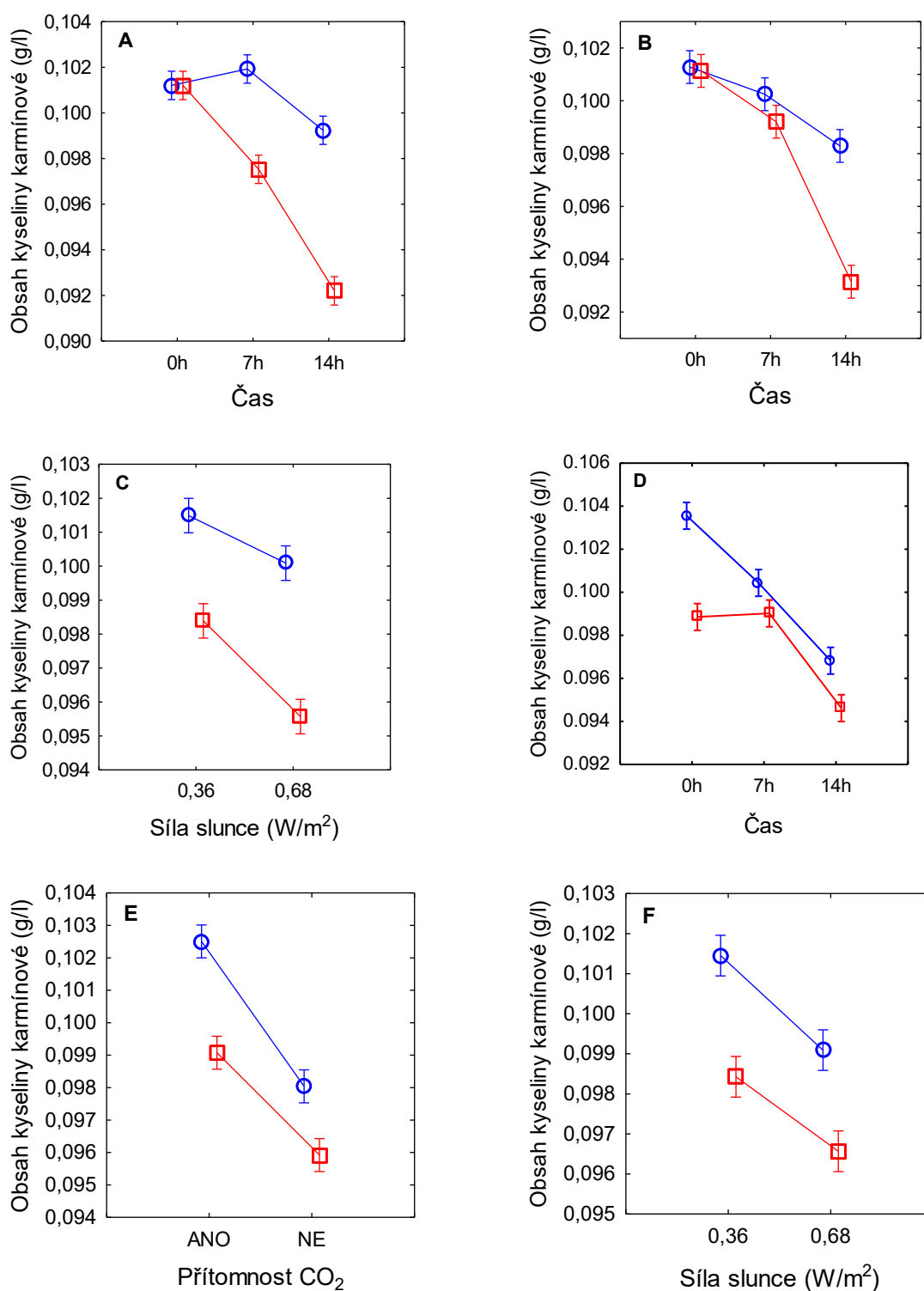
D = faktor přítomnosti cukrů (ANO/ NE); ( $p < 0,001$ )

Průměrné hodnoty s 95% intervalem spolehlivosti (chybové úsečky)

Na níže uvedených grafech je již zkoumán vliv dvou parametrů na obsah kyseliny karmínové v nápojích. Interakce faktorů je (až na poslední případ) významná ( $p < 0,001$ ). Zde je nutné si uvědomit, že významná interakce dvou faktorů je způsobena stejnými hodnotami v čase 0 h (na začátku experimentu) pro všechna měření. V posledním případě, kdy interakce vychází nevýznamná, je to nejspíše z důvodu rovnoběžnosti obou přímk.

Faktory jako čas a přítomnost CO<sub>2</sub> lze porovnat na grafu 7A. Modrá křivka, která značí limonády sycené, v čase pomaleji klesá na rozdíl od červené křivky, která značí limonády nesyčené. Je tu tedy patrný ochranný vliv CO<sub>2</sub> na obsah kyseliny karmínové. Na grafu 7B lze vidět, jaký je vliv slunečního záření a času na obsah kyseliny karmínové. Obsah barviva v limonádách vystavených dávce záření 0,36 W/m<sup>2</sup> klesl po 7. h stejně jako po dávce vyšší (0,68 W/m<sup>2</sup>). Čtrnáct hodin ozařování se významně projevilo poklesem obsahu kyseliny karmínové u vyšší dávky záření. Vliv síly slunečního záření a přítomnosti CO<sub>2</sub> je vidět na grafu 7C. Je vidět, že v obou případech má vliv silnější dávky sluneční energie za následek pokles obsahu kyseliny karmínové. V limonádách s CO<sub>2</sub> byl naměřen vyšší obsah kyseliny karmínové a pokles nebyl tak strmý. Obsah kyseliny karmínové ve slazené limonádě (graf 7D – modrá křivka) klesá s časem téměř lineárně. Zatímco obsah kyseliny karmínové v neslazené limonádě (graf 7D – červená křivka) je po 7. h téměř stejný, po 14. h už jasně klesá. Na grafu 7E lze vidět, že největší obsah kyseliny karmínové je v nápojích, které jsou zároveň slazené a obsahují i CO<sub>2</sub>. V neslazených nápojích a bez CO<sub>2</sub> je obsah kyseliny karmínové nejmenší. Poslední graf 7F, na kterém jsou zkoumány faktory síly slunečního záření a přítomnost cukrů, byl vyhodnocen jako nevýznamný, jelikož jsou přímky téměř rovnoběžné. Nejvyšší obsah kyseliny karmínové byl zde naměřen ve slazených nápojích, které byly vystaveny pouze nižší energii slunečního záření. Nejnižší obsah kyseliny karmínové byl naměřen v neslazených nápojích vystavených vyšší dávce slunečního záření.

Graf 7 – Vliv dvou faktorů na obsah kyseliny karmínové v nápojích



A = faktor čas a přítomnost CO<sub>2</sub> (ANO = modře, NE = červeně); ( $p < 0,001$ ); B = čas a síla slunečního záření (0,36 W/m<sup>2</sup> = modře, 0,68 W/m<sup>2</sup> = červeně); ( $p < 0,001$ ); C = síla slunečního záření a přítomnost CO<sub>2</sub> (ANO = modře, NE = červeně); ( $p < 0,001$ ); D = čas a přítomnost cukrů (ANO = modře, NE = červeně); ( $p < 0,001$ ); E = přítomnost CO<sub>2</sub> a cukrů (ANO = modrá, NE = červeně); ( $p < 0,001$ ); F = síla slunečního záření a přítomnost cukrů (ANO = modrá, NE = červená); ( $p > 0,05$ ); Průměrné hodnoty s 95% intervalem spolehlivosti (chybové úsečky)



### 3.4 Antioxidační aktivita vzorků limonád

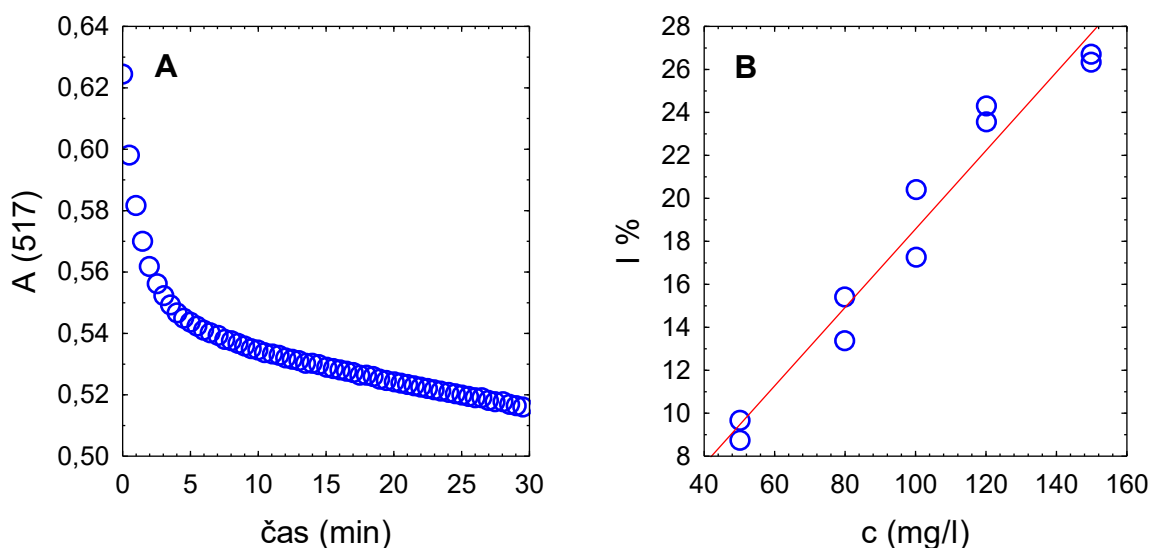
#### 3.4.1. Metoda s DPPH radikálem

Metoda DPPH byla použita pro stanovení antioxidační aktivity kyseliny karmínové v nápojích. Jelikož je metoda DPPH prováděna v metanolovém prostředí, antioxidační aktivita je spíše zaměřená na méně hydrofilní antioxidační látky.<sup>60</sup> Poté co byl připraven roztok DPPH a zásobní roztok Troloxu, byla proměřena závislost absorbance na čase reakce při 517 nm, abychom mohli stanovit reakční čas reakce. Záznam z průběhu této reakce lze vidět na grafu 8A. Absorbance klesala z 0,63 (v čase  $t = 0$ ) na 0,53 po 15 min reakce. Mezi 15. a 30. min reakce došlo k pozvolné změně absorbance z 0,53 na ca 0,52. Pro experimenty byl použit reakční čas 15 min.

Vzorky limonád byly odplyněny a naředěny 3 ml limonády do 10ml odměrných baněk. Z těchto odměrných baněk bylo odebráno 0,5 ml roztoku limonády do 5 ml roztoku DPPH radikálu. Po smíchání byl roztok umístěn na 15 min do temna. Po této době byla změřena absorbance při 517 nm.

Následně byla připravena kalibrační řada Troloxu, která se pohybovala od 50–150 mg Troloxu/l roztoku (graf 8B). Procento inhibice bylo vypočítáno podle rovnice 2 uvedené v kapitole 2.7.1 Metoda DPPH. V tabulce 7 jsou zaznamenány výsledky lineární regrese analýzy.

*Graf 8 – A = Závislost absorbance vzorku limonády na čase pro optimalizaci reakčního času metody DPPH; B = kalibrační závislost inhibice Troloxu v DPPH*



Tabulka 7 – Rovnice kalibrační přímky pro inhibici Troloxu v DPPH

Shrnutí regrese pro závislou proměnnou: I % $R^2 = 0,957$ F (1,8) = 178,9				
N = 10	b	Směrodatná chyba z b	t (8)	p-hodnot
Průsečík	0,322	1,441	0,22	0,83
c (mg/l)	0,18	0,013	13,38	< 0,001

b = číselná hodnota pro úsek/ směrnici; F = výsledek F-testu pro platnost modelu; t = výsledek t-testu pro platnost parametru

Závislost inhibice na koncentraci může být popsána rovnicí:  $I\% = 0,322 + 0,18 \cdot c$  ( $R^2 = 0,957$ ); přitom průsečík rovnice je statisticky nevýznamný ( $p > 0,05$ ). Rovnice lze tedy zkrátit do tvaru  $I\% = 0,18 \cdot c$ . Antioxidační aktivita ve vzorcích se pohybovala od 243 do 360 mg Troloxu/l (Seznam příloh, příloha 3). Vliv jednotlivých faktorů bude dále popsán pomocí výsledků analýzy rozptylu.

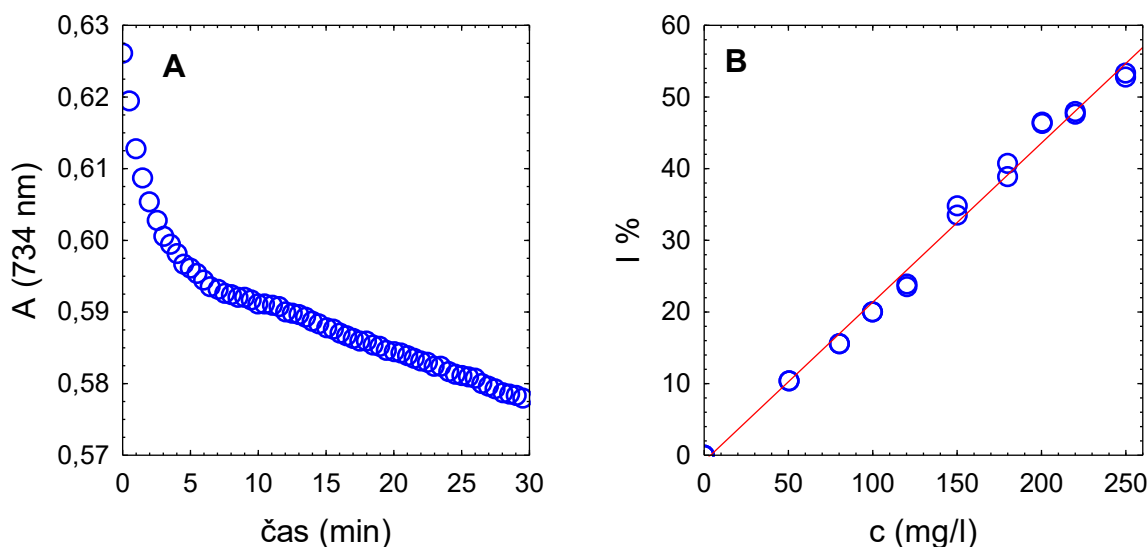
#### 3.4.2 Antioxidační aktivita vzorků s využitím radikálu ABTS

Metoda ABTS byla použita pro stanovení antioxidační aktivity nápojů s obsahem kyseliny karmínové. Když byl připraven roztok ABTS a zásobní roztok Troloxu, byla proměřena závislost absorbance na čase reakce při 734 nm. Záznam z průběhu této reakce můžete vidět na grafu 9A. Absorbance klesala z 0,63 (v čase  $t = 0$ ) na 0,59 po 10 min reakce. Mezi 10. a 30. min reakce došlo k pozvolné změně absorbance z 0,59 na 0,58. Reakční čas reakce jsme stanovili na 10 min.

Vzorky limonád byly pouze odplyněny, ředění v tomto pokusu nebylo potřeba. Bylo odebíráno 0,5 ml roztoku limonády do 3 ml roztoku ABTS. Po smíchání byl roztok umístěn na 10 min do temna. Po této době byla změřena absorbance při 734 nm.

Následně byla připravena kalibrační řada Troloxu, která se pohybovala od 50–250 mg Troloxu/l roztoku (graf 9B). Procento inhibice bylo vypočítáno podle rovnice 2 uvedené v kapitole 2.7.1 Metoda DPPH. V tabulce 8 jsou zaznamenané výsledky lineární regresní analýzy.

Graf 9 – A = Závislost absorpance vzorku limonády na čase pro optimalizaci reakčního času metody ABTS; B = kalibrační závislost inhibice Troloxu v ABTS



Tabulka 8 – Rovnice kalibrační přímky pro inhibici Troloxu v ABTS

Shrnutí regrese pro závislou proměnnou: I % $R^2 = 0,989$ $F(1,16) = 1373,1$				
N = 18	b	Směrodatná chyba z b	t (16)	p-hodnot
Průsečík	-1,8	1,0	-1,75	0,099
c (mg/l)	<b>0,227</b>	<b>0,006</b>	<b>37,06</b>	<b>&lt; 0,001</b>

b = číselná hodnota pro úsek/ směrnici; F = výsledek F-testu pro platnost modelu; t = výsledek t-testu pro platnost parametru

Jak je vidět, v celém testovaném koncentračním rozmezí je závislost mezi proměnnými lineární. Závislost inhibice na koncentraci může být popsána rovnicí:  $I\% = -1,752 + 0,227 \cdot c$  ( $R^2 = 0,989$ ); přičemž průsečík rovnice je statisticky nevýznamný ( $p > 0,05$ ). Rovnice lze tedy zkrátit do tvaru  $I\% = 0,227 \cdot c$ . Antioxidační aktivita ve vzorcích limonád se pohybovala od 148 do 180 mg Troloxu/l (Seznam příloh, příloha 4). Vliv jednotlivých faktorů bude dále popsán pomocí výsledků analýzy rozptylu.

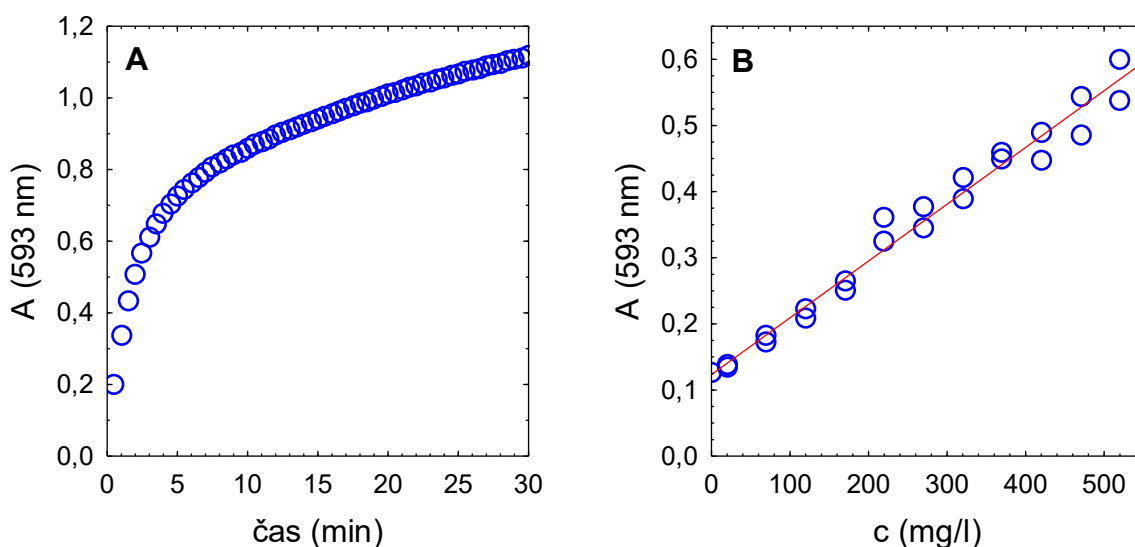
### 3.4.3 Antioxidační aktivita vzorků s využitím metody FRAP

Metoda FRAP byla použita pro stanovení antioxidační aktivity kyseliny karmínové. Pro stanovení optimálního reakčního času byl sledován nárůst absorpance reakční směsi (FRAP roztok se vzorkem) na čase při 593 nm. Záznam z průběhu této reakce lze vidět na grafu 10A. Absorpce stoupala z 0,20 (v čase  $t = 0$ ) na 1,12 po 30 min reakce. Mezi 0. a 30. min reakce nedošlo k pozvolné změně a reakční čas reakce byl stanoven na 30 min.

Vzorky limonád byly odplyněny a naředěny 3 ml limonády do 10ml odměrných baněk. Z těchto odměrných baněk bylo odebíráno 0,3 ml roztoku limonády do 3 ml roztoku FRAP. Po smíchání se roztok umístil na 30 min do temna. Po této době byla změřena absorbance při 593 nm.

Následně byla připravena kalibrační řada Troloxu, která se pohybovala od 20–520 mg Troloxu/l roztoku (graf 10B). Výsledná absorbance byla vypočítána podle rovnice 3 uvedené v kapitole 2.7.3 Metoda FRAP. V tabulce 9 jsou zaznamenány výsledky lineární regrese analýzy.

*Graf 10 – A = Závislost absorbance vzorku limonády na čase pro optimalizaci reakčního času metody FRAP; B = kalibrační závislost FRAP a Troloxu*



*Tabulka 9 – Rovnice kalibrační přímky pro inhibici Troloxu v ABTS*

Shrnutí regrese pro závislou proměnnou: A(593nm) $R^2 = 0,978$ $F(1,21) = 924,0$				
N = 23	b	Směrodatná chyba z b	t (21)	p-hodnot
Průsečík	0,123	0,009	14,27	< 0,001
c (mg/l)	0,0009	0,00003	30,40	< 0,001

b = číselná hodnota pro úsek/ směrnici; F = výsledek F-testu pro platnost modelu; t = výsledek t-testu pro platnost parametru

Z této tabulky lze vyčíst lineární rovnici grafu:  $A = 0,123 + 0,0009 \cdot c$  ( $R^2 = 0,978$ ); přičemž oba parametry rovnice jsou statisticky významné. Antioxidační aktivita kyseliny karmínové ve vzorcích se pohybovala od 230 do 1240 mg Troloxu/l (Seznam příloh, příloha 5). Vliv jednotlivých faktorů bude dále popsán pomocí výsledků analýzy rozptylu v následující kapitole.

### 3.5 Ověření normality dat antioxidačních aktivit

Výsledky analýz antioxidačních aktivit budou dále využity při určení vlivu jednotlivých parametrů (přítomnost cukrů, přítomnost CO<sub>2</sub>, síla slunečního záření, doba ozařování) na proměnné. Pro správnou volbu metody analýzy rozptylu je potřeba ověřit základní předpoklady o normalitě dat. Nejprve byla pomocí metody korelační matice sledována závislost dat antioxidačních aktivit (tabulka 10). Z této tabulky je jasně patrné, že data z metod DPPH a ABTS jsou závislá.

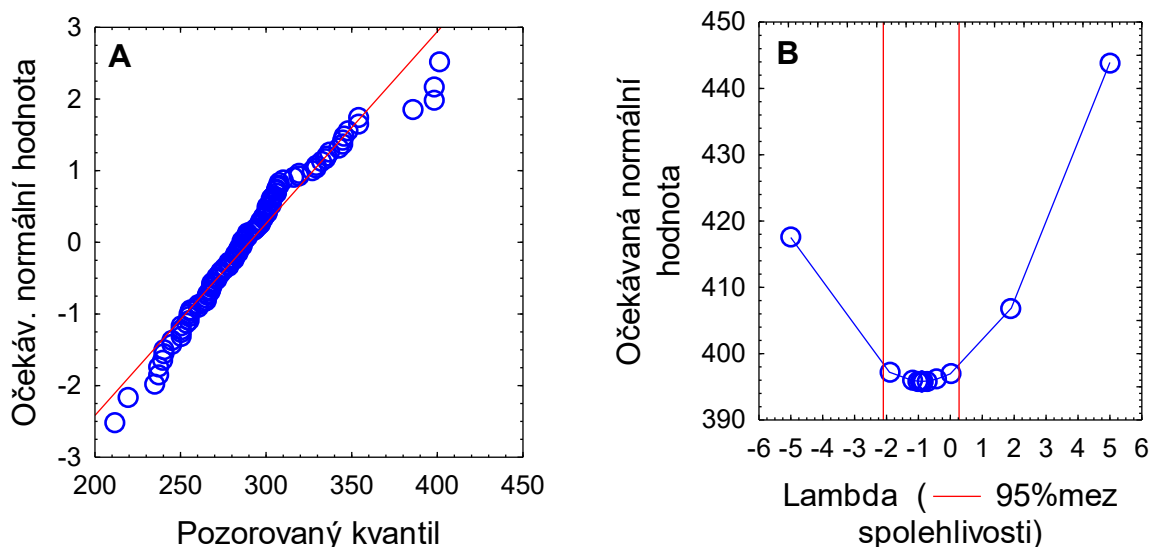
Tabulka 10 – Korelační matice pro závislost dat – ekvivalent Troloxu DPPH/ABTS/FRAP

Korelace: Označené korelace jsou významné na hladině $p < 0,05$ $N = 112$ (Celé případy vynechány u ChD)					
Proměnná	Průměry	Směrodatná odchylka	DPPH ekvivalent Troloxu	ABTS ekvivalent Troloxu	FRAP ekvivalent Troloxu
DPPH ekvivalent Troloxu	290,214	36,0	1,000	0,394	-0,0365
ABTS ekvivalent Troloxu	168,125	8,4	0,394	1,000	-0,0885
FRAP ekvivalent Troloxu	735,223	303,6	-0,0365	-0,0885	1,000

#### 3.5.1 Ověření normality dat antioxidační aktivity stanovené pomocí DPPH radikálu

Normalita dat byla ověřena pomocí N-P grafu a pomocí SW-W testu. Na grafu 11A můžete vidět, že data nepochází z normálního rozdělení zejména díky odchylkám u nízkých a vysokých hodnot. To potvrdila také hodnota SW-W testu (0,9549;  $p < 0,001$ ).

Graf 11 – A = N-P graf DPPH ekvivalent Troloxu; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat

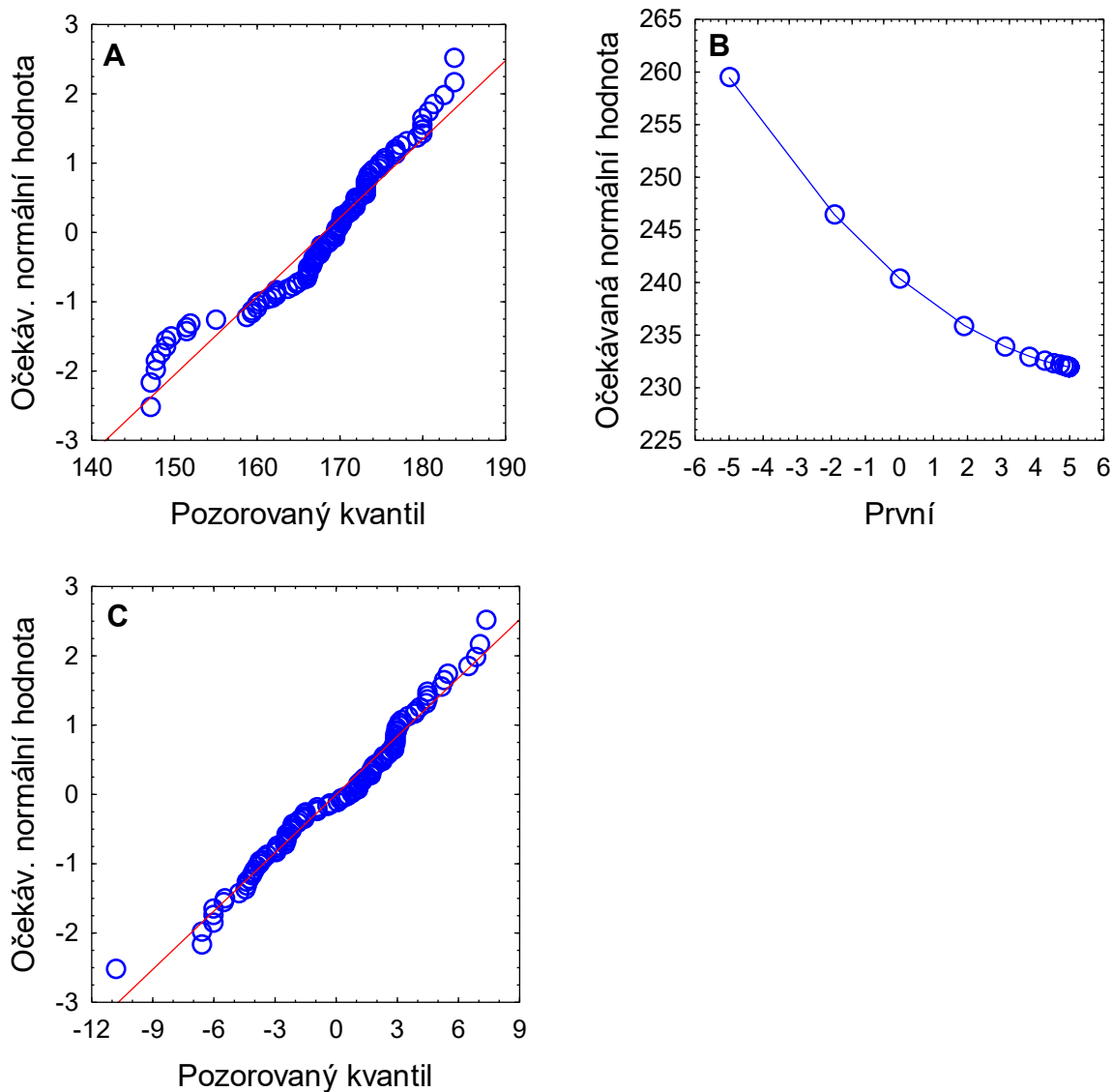


Jelikož data nepochází z normálního rozdělení, rozhodli jsme se použít Box-Coxovu transformaci dat. Z grafu 11B je patrné, že závislost odchylky transformovaného rozdělení od normálního rozdělení na hodnotě  $\lambda$  má specifický konvexní tvar. Minimum této funkce odpovídá optimální hodnotě  $\lambda$ , kdy je odchylka transformovaného rozdělení od normálního rozdělení minimální. Zde je  $\lambda = -0,904$ , a protože interval spolehlivosti  $(-2,099-0,276)$  neobsahuje  $\lambda = 1$ , lze transformaci považovat za přínosnou. N-P graf transformovaných dat (uveden v seznamu příloh, příloha 6) vykazuje normalitu (SW-W = 0,9887;  $p > 0,05$ ).

### 3.5.2 Ověření normality dat antioxidační aktivity stanovené pomocí ABTS radikálu

Normalita dat byla ověřena pomocí N-P grafu a pomocí SW-W testu. Na grafu 12A tedy můžete vidět, že data nepochází z normálního rozdělení, SW-W = 0,928;  $p < 0,001$ . Je to patrné díky nejnižším hodnotám antioxidační aktivity (ABTS jako ekvivalent Troloxu), které se výrazně odchylují od normality. Vzhledem ke struktuře dat nelze tyto body ze souboru vyloučit.

Graf 12 – A = N-P graf ekvivalentu Troloxu ABTS; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat; C = N-P graf reziduí ekvivalentu Troloxu ABTS

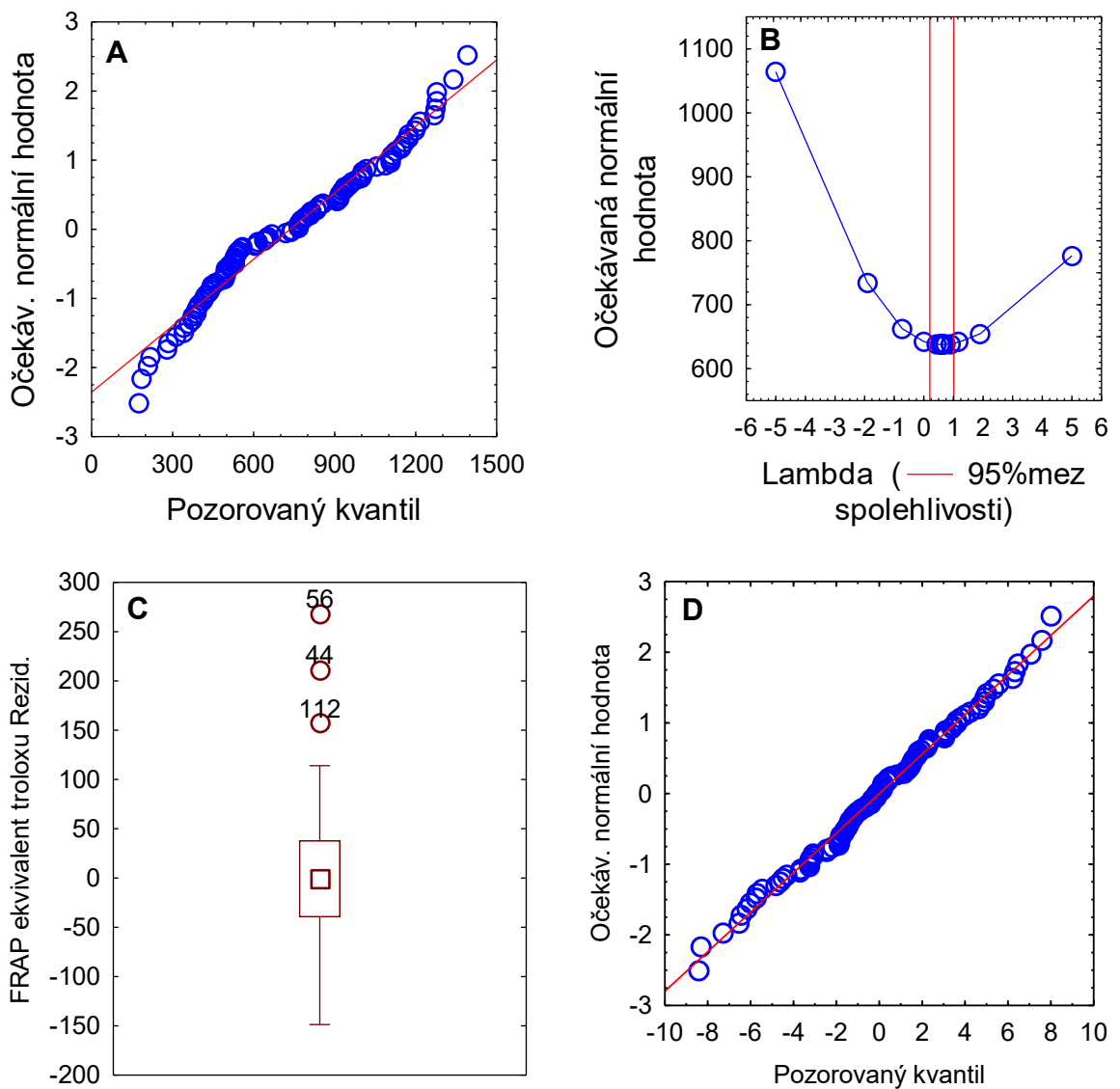


Box-Coxova transformace nebyla úspěšná (graf 12B), odchylka transformovaného rozdělení od normálního rozdělení klesá s hodnotou  $\lambda$ . Průběh funkce však nevykazuje žádné minimum, a proto nelze Box-Coxovu transformaci na všechny hodnoty použít. Proto budou pro analýzu rozptylu použita všechna data netransformovaná. Základní předpoklady rozdělení byly tedy ověřeny pomocí reziduální analýzy. Výsledky (graf 12C) potvrzují normalitu reziduí (SW-W = 0,980; p = 0,085).

### 3.5.3 Ověření normality dat antioxidační aktivity stanovené pomocí metody FRAP

Normalita dat byla ověřena pomocí N-P grafu a pomocí SW-W testu. Graf 13A ukazuje, že patrně díky odchýlkám u nižších hodnot antioxidační aktivity tato data nesplňují předpoklady pro normalitu, SW-W = 0,9662; p = 0,0061. Ani tyto body nemohly být odstraněny kvůli struktuře dat.

Graf 13 – A = N-P graf ekvivalentu Troloxu; B = záznam z Box-Cox transformovaných dat; C = krabicový graf reziduí FRAP indikující odlehlé body; D = N-P graf transformovaných dat reziduí ekvivalentu Troloxu FRAP



B = dolní  $\lambda = 0,205$ ; horní  $\lambda = 1,013$

C = střed krabicového grafu = medián, úsečka = rozsah neodlehlých hodnot, indikuje tři odlehlé body

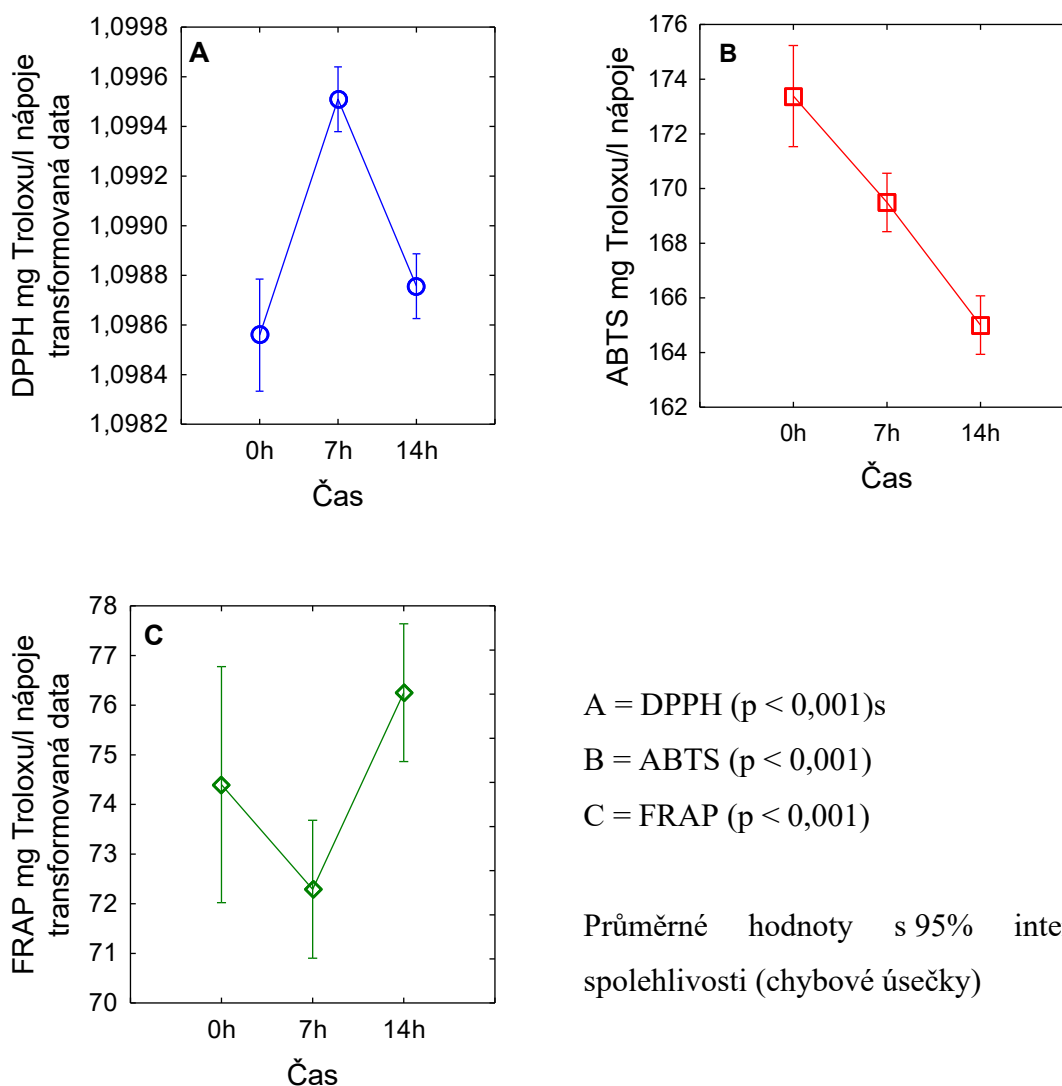


Jelikož data nepochází z normálního rozdělení, rozhodli jsme se použít Box-Coxovu transformaci dat. Odchylka transformovaného rozdělení od normálního rozdělení zobrazuje sice minimální hodnotu  $\lambda = 0,597$ , interval spolehlivosti ( $\lambda = 0,205-1,013$ ) však obsahuje hodnotu  $\lambda = 1$  (graf 13B). Z tohoto důvodu je transformace dat neoprávněná. Vzhledem k tomu, že také rezidua porušovala základní předpoklady o normálním rozdělení dat (výsledky neuvedeny), byla provedena analýza odlehlých bodů pomocí krabicového grafu (graf 13C). V první fázi byly odstraněny dva odlehlé body 56 a 44. Po jejich odstranění (56, 44) a transformaci dat (graf Box-Cox transformace uveden v Seznamu příloh, příloha 7) byl vytvořen N-P graf transformovaných reziduí (graf 13D), který již splňuje podmínky pro normální rozložení dat, SW-W = 0,9914; p = 0,7184.

### 3.6 Vliv experimentálních faktorů na antioxidační aktivitu vzorků

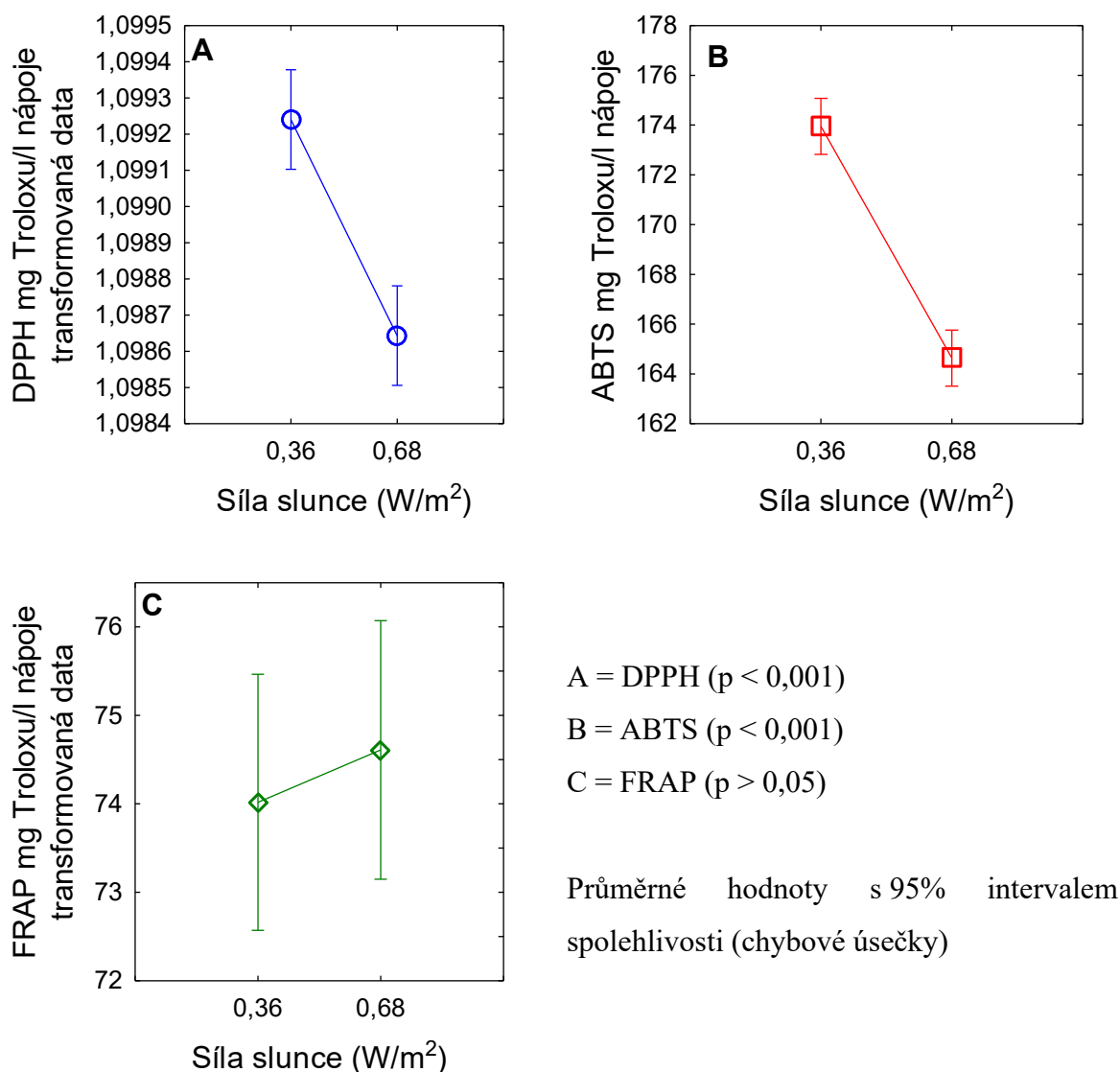
Vliv faktorů na proměnné byl sledován s využitím vícefaktorové ANOVY s interakcemi druhého řádu. Jako faktory byly použity čas (0. h, 7. h a 14. h), síla slunečního záření ( $0,36 \text{ W/m}^2$  nebo  $0,68 \text{ W/m}^2$ ), přítomnost cukrů a/nebo přítomnost oxidu uhličitého v roztocích limonád. Jako proměnné byly použity hodnoty antioxidační aktivity (mg Trolox/l) po jejich normalizaci. V případě metody DPPH po Box-Coxově transformaci byly u metody FRAP vyloučeny dva odlehlé body a byla úspěšně provedena Box-Coxova transformace (viz kapitola 3.5.3). V případě metody s ABTS radikálem sloužily jako vstupní hodnoty originální data, kde základní předpoklady pro normální rozdělení byly ověřeny pomocí reziduální analýzy.

Graf 14 – Vliv faktoru čas na antioxidační aktivitu vzorku



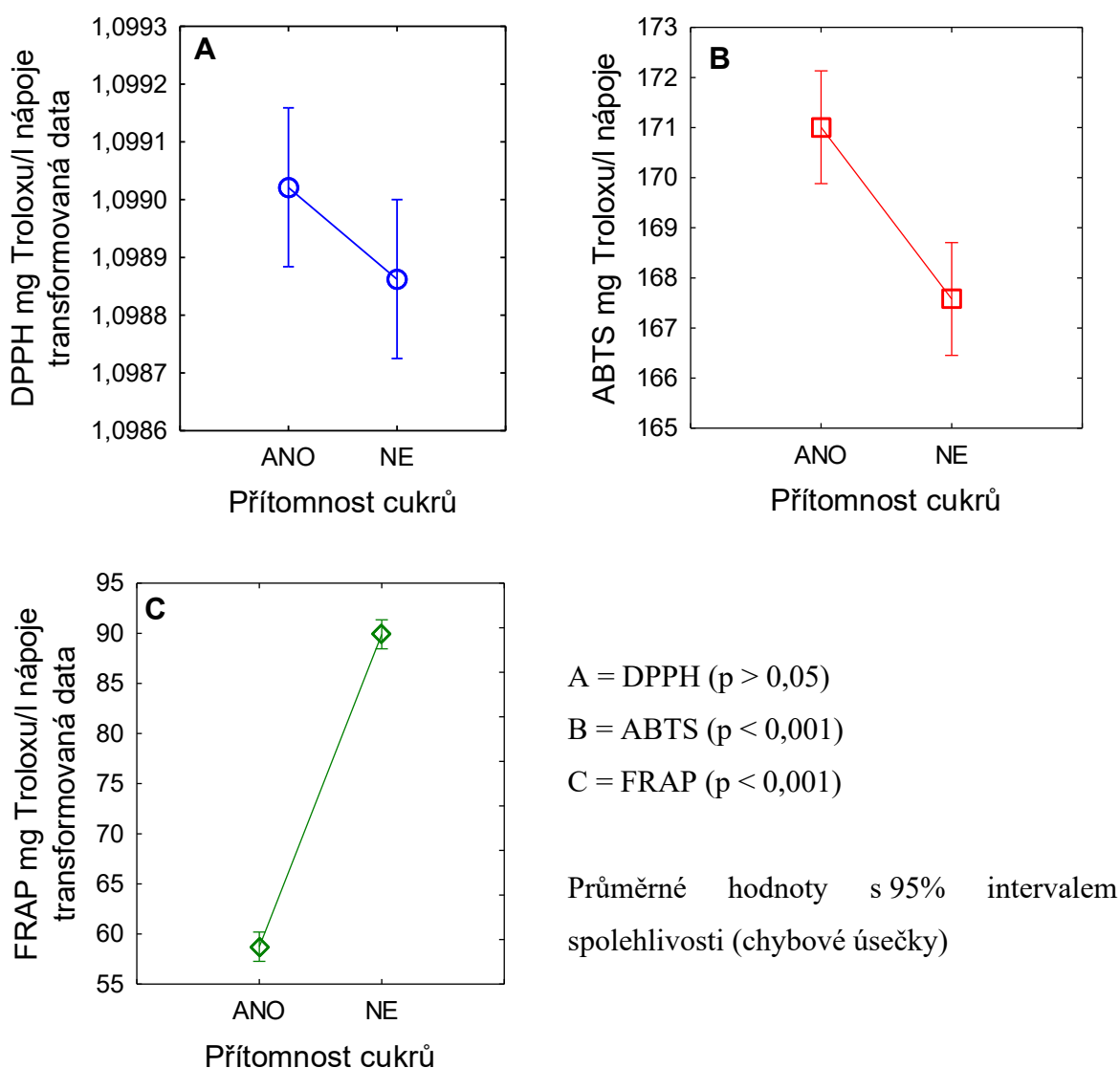
Na těchto třech grafech je vidět, jak se antioxidační aktivita kyseliny karmínové mění s časem. Všechny metody pro faktor čas byly vyhodnoceny jako statisticky významné. Pomocí metody s DPPH radikálem byla změřena antioxidační aktivita, která se v čase nejprve zvyšovala a poté snižovala (graf 14A). Při měření pomocí metody s ABTS radikálem docházelo k postupnému snižování antioxidační aktivity v čase (graf 14B). Metodou FRAP byla zaznamenána antioxidační aktivita, která se po 7. h snižovala a následně se zvedla nad původní počátek (graf 14C).

Graf 15 – Vliv faktoru síly slunečního záření na antioxidační aktivitu vzorku



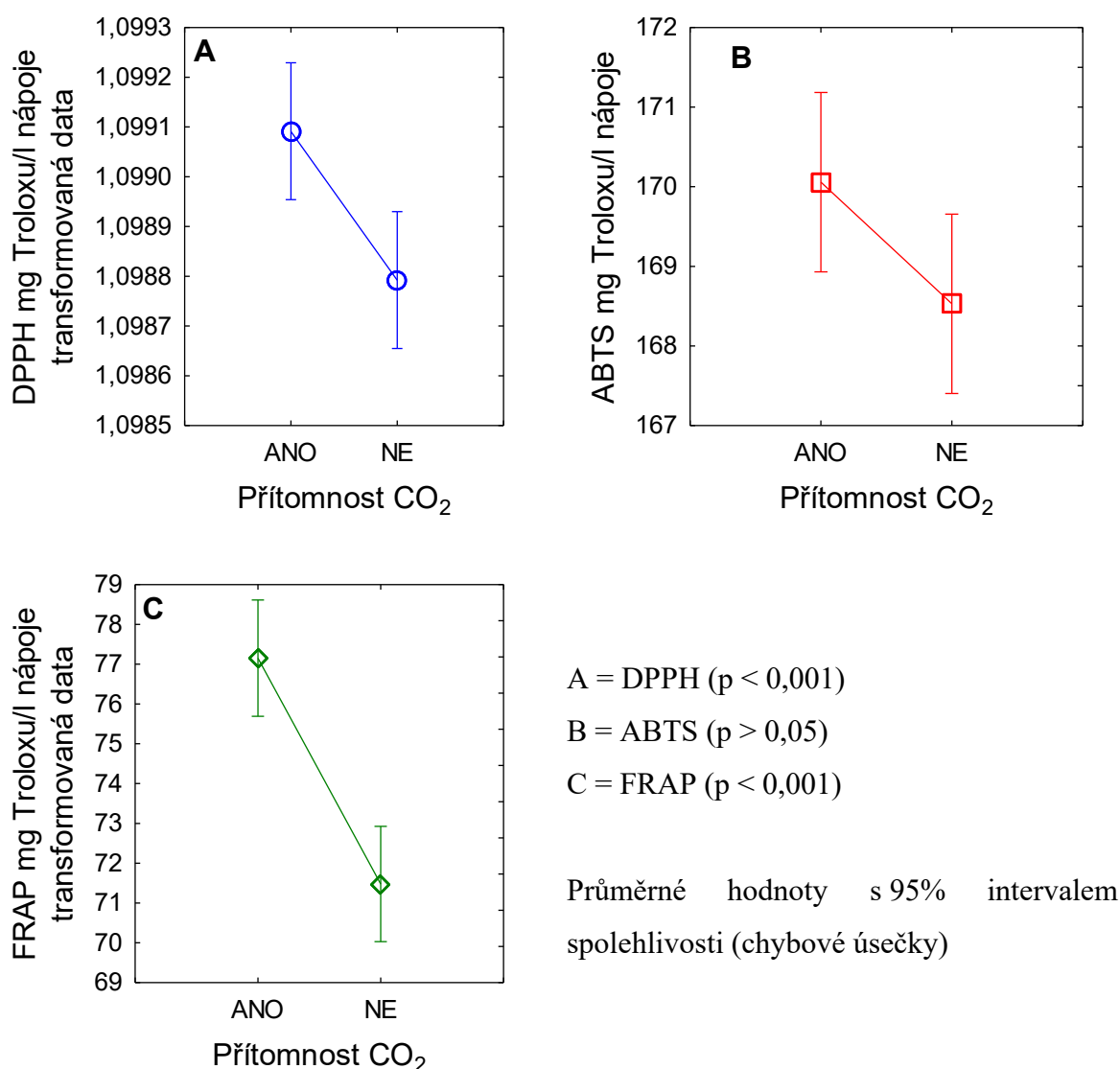
Na těchto grafech můžeme vidět vliv síly slunečního záření na antioxidační aktivitu kyseliny karmínové. V případě metody DPPH a ABTS jsou grafy vyhodnoceny jako statisticky významné, tj. antioxidační aktivita byla menší u vzorků vystavených vyšší dávce slunečního záření. Metoda FRAP byla vyhodnocena jako statisticky nevýznamná (graf 15C). Síla slunečního záření neměla významný vliv na schopnost redukovat železité ionty (metoda FRAP). U metody DPPH je patrnější pozvolnější pokles v rámci setin jednotek (graf 15A), zatímco u metody ABTS jsou to jednotky (graf 15B).

Graf 16 – Vliv faktoru přítomnosti cukrů na antioxidační aktivitu vzorku



Na těchto grafech je vidět, jaký vliv měl přídavek cukrů do limonády. V případě metod DPPH (graf 16A) a ABTS (graf 16B) je vidět, že pokud jsou v limonádě obsaženy cukry, antioxidační aktivita kyseliny karmínové je vyšší ve srovnání se vzorky bez cukrů. V případě metody s DPPH radikálem byl však vliv tohoto faktoru nevýznamný. Metody ABTS a FRAP jsou statisticky významné. U metody FRAP bylo zaznamenáno, že v přítomnosti cukrů v limonádě byla schopnost redukce železitých iontů (metoda FRAP) menší než u vzorků bez cukrů (graf 16C).

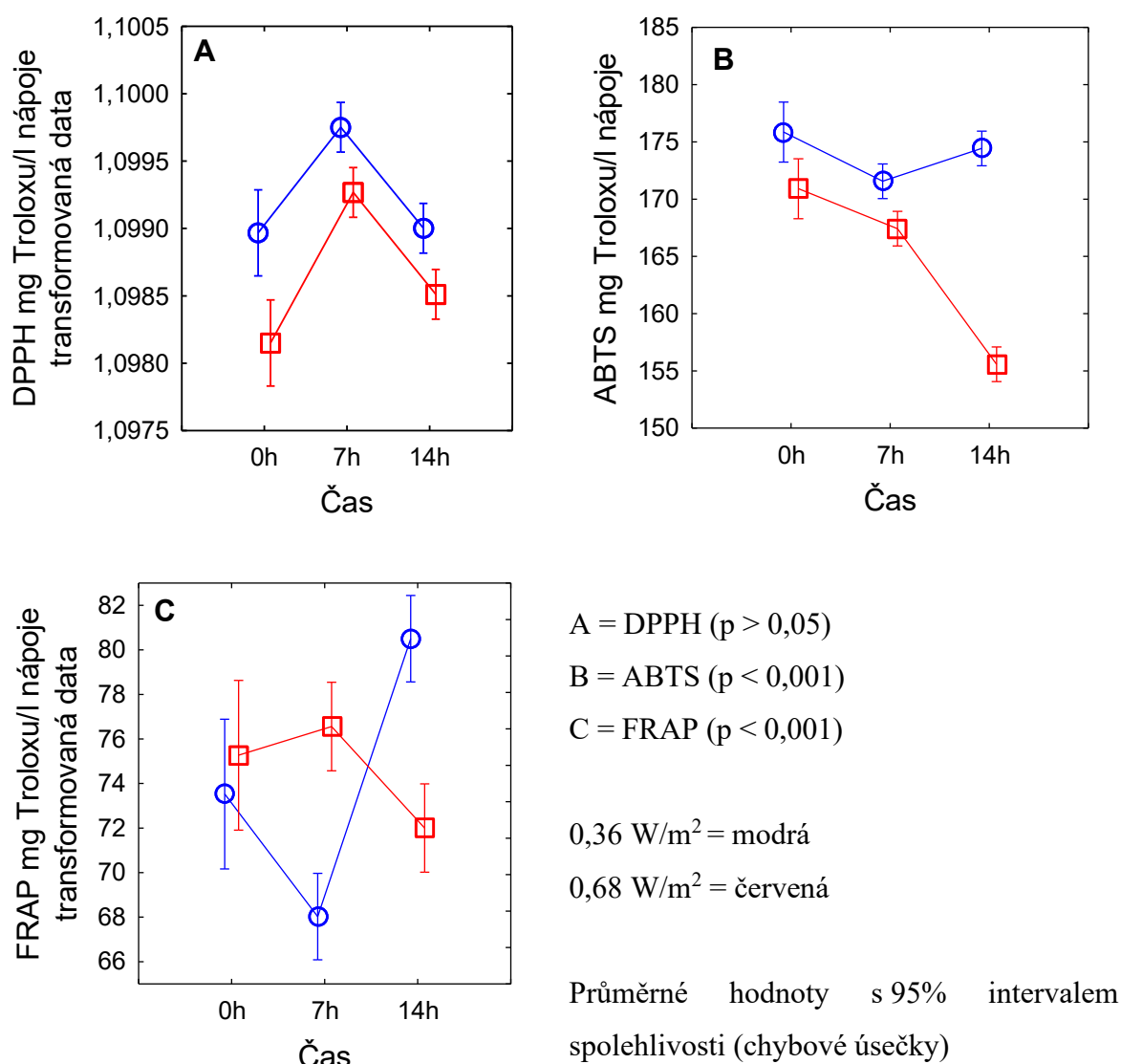
Graf 17 – Vliv faktoru přítomnosti CO<sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku



Pokud jde o vliv CO<sub>2</sub>, všechny metody ukazují jasný pokles antioxidační aktivity kyseliny karmínové, pokud v limonádě CO<sub>2</sub> přítomno není. Nejméně markantní rozdíl poklesu antioxidační aktivity je zaznamenán metodou s DPPH radikálem (graf 17A), zatímco metodou ABTS je pokles antioxidační aktivity nejméně patrný a je brán jako statisticky nevýznamný (graf 17B). Metoda FRAP se liší v řádech jednotek (graf 17C) a spolu s metodou DPPH je statisticky významná.

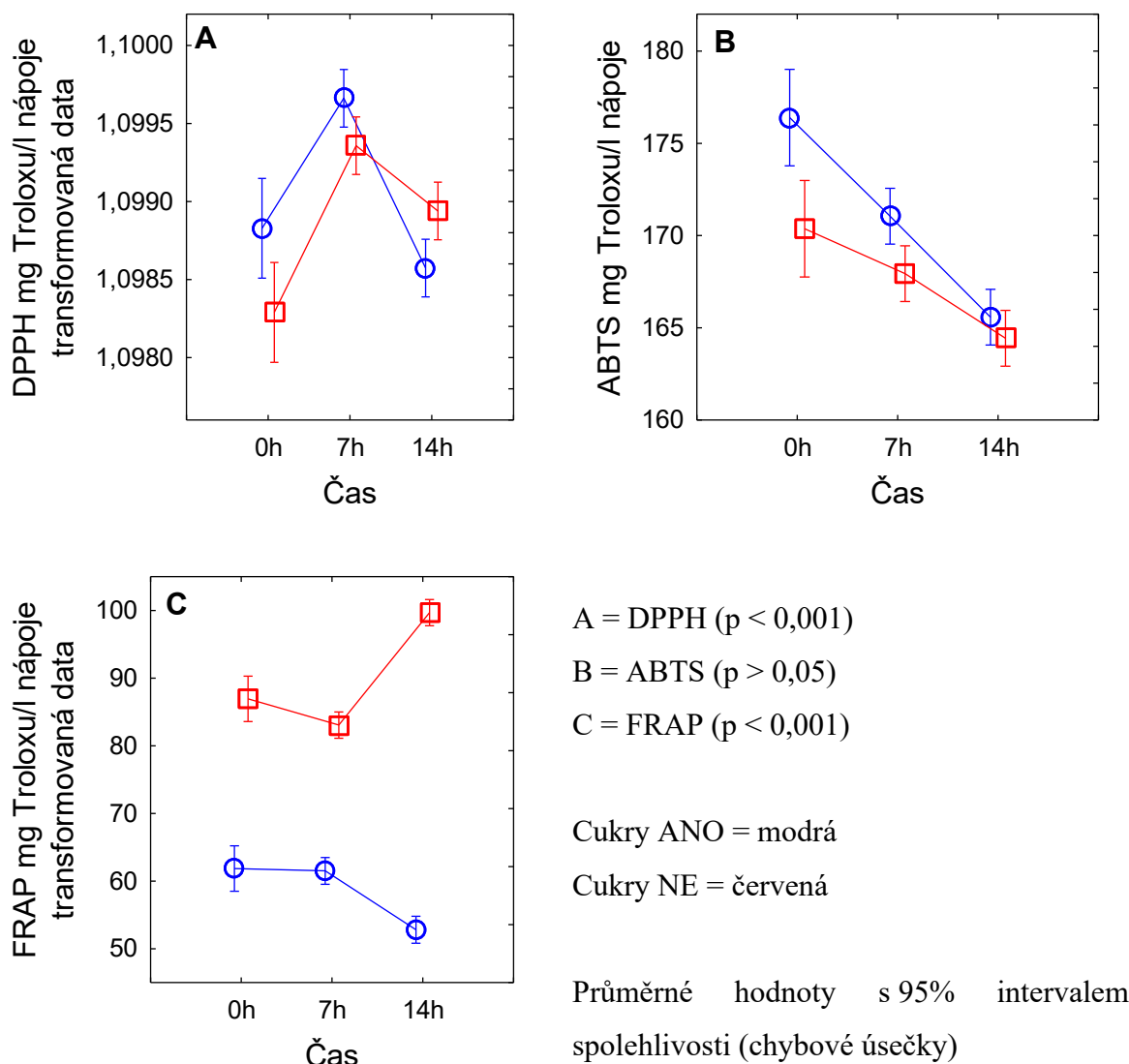
V následujících grafech (18–23) jsou již uvažovány dva faktory, které jsou porovnávány. Hodnoty p zde značí významnost interakcí faktorů. Vzhledem k tomu, že hodnoty pro počáteční bod (faktor čas, 0 h) byly vždy stejné, je nutné brát tyto výsledky hodnot p s rezervou.

Graf 18 – Vliv faktorů čas a síla slunečního záření na antioxidační aktivitu vzorku



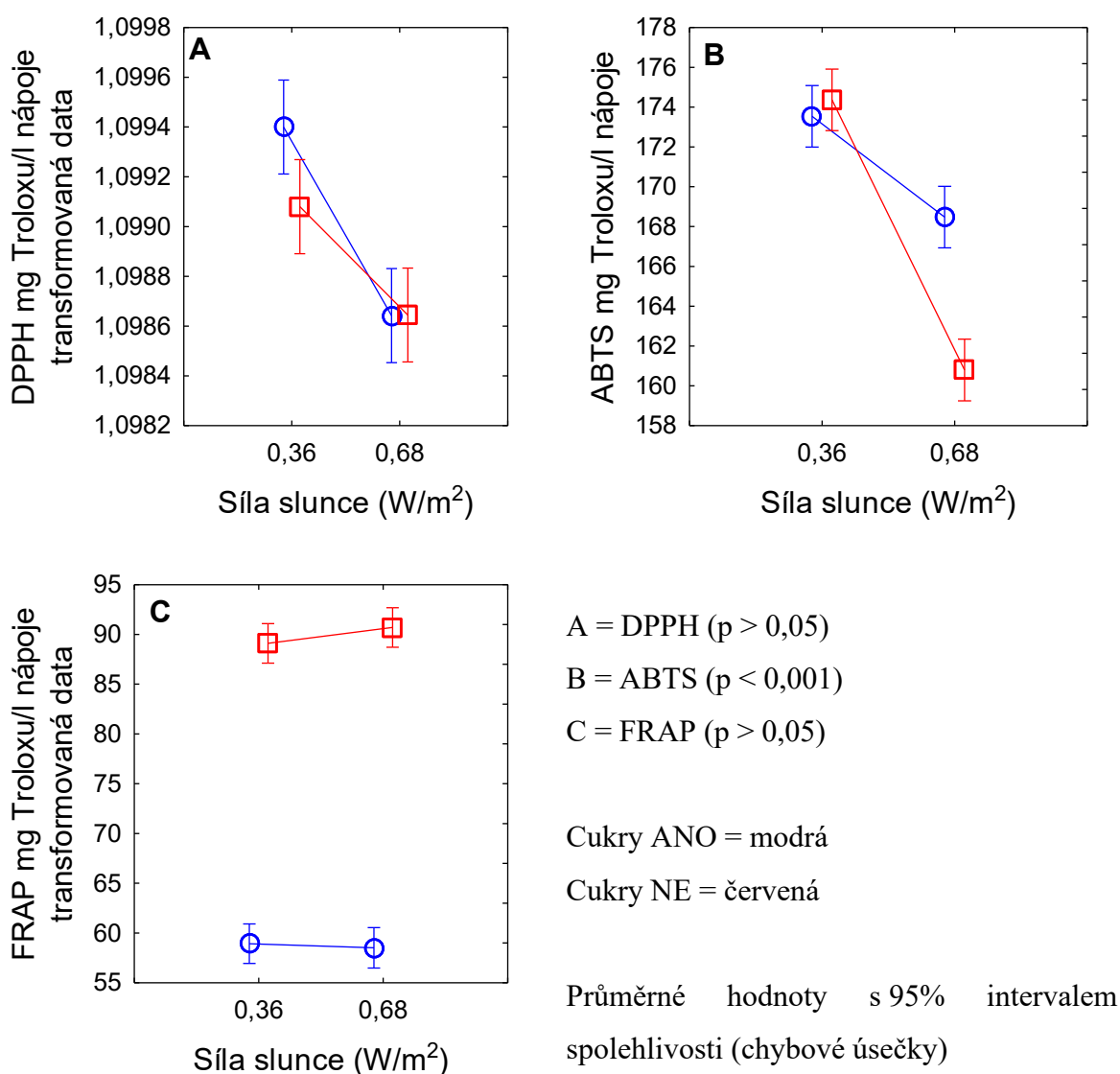
Na těchto grafech jsou sledovány dva faktory, konkrétně čas a síla slunečního záření. Pokud jde o metodu s DPPH radikálem, silnější dávka slunečního záření měla za následek nižší antioxidační aktivitu vzorků (graf 18A). Při měření antioxidační aktivity nápojů metodou s ABTS radikálem je patrné, že vyšší dávka slunečního záření měla za příčinu výraznější pokles antioxidační aktivity, a to zejména po 14. h ozařování. Při menší dávce slunečního záření byla antioxidační aktivita téměř shodná s počáteční hodnotou (graf 18B). Metodou FRAP bylo zaznamenáno, že schopnost redukce železitých iontů byla při nižší dávce slunečního záření po 7. h menší než antioxidační aktivita při vyšší dávce slunečního záření (graf 18C). Po 14. h je to však přesně naopak, vyšší sluneční dávce záření odpovídá nižší množství antioxidační aktivity a při nižší sluneční dávce zase vyšší množství antioxidační aktivity.

Graf 19 – Vliv faktorů čas a přítomnost cukrů na antioxidační aktivitu vzorku



V těchto grafech můžeme pozorovat, jaký vliv má přítomnost cukrů a čas na antioxidační aktivitu vzorků nápojů během ozařování. Metodou s DPPH radikálem byl po 7. h zaznamenán téměř identický nárůst antioxidační aktivity, naopak po 14. h je vidět, že přítomnost cukrů má za následek větší pokles antioxidační aktivity (graf 19A). Metodou ABTS byl zaznamenán pokles antioxidační aktivity jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti cukrů v limonádě, nicméně nepřítomnost cukrů má za následek méně strmý pokles antioxidační aktivity (graf 19B). Při měření schopnosti redukce železitých iontů metodou FRAP bylo zjištěno, že limonáda bez cukrů měla vyšší hodnoty antioxidační aktivity než limonáda s cukry (graf 19C).

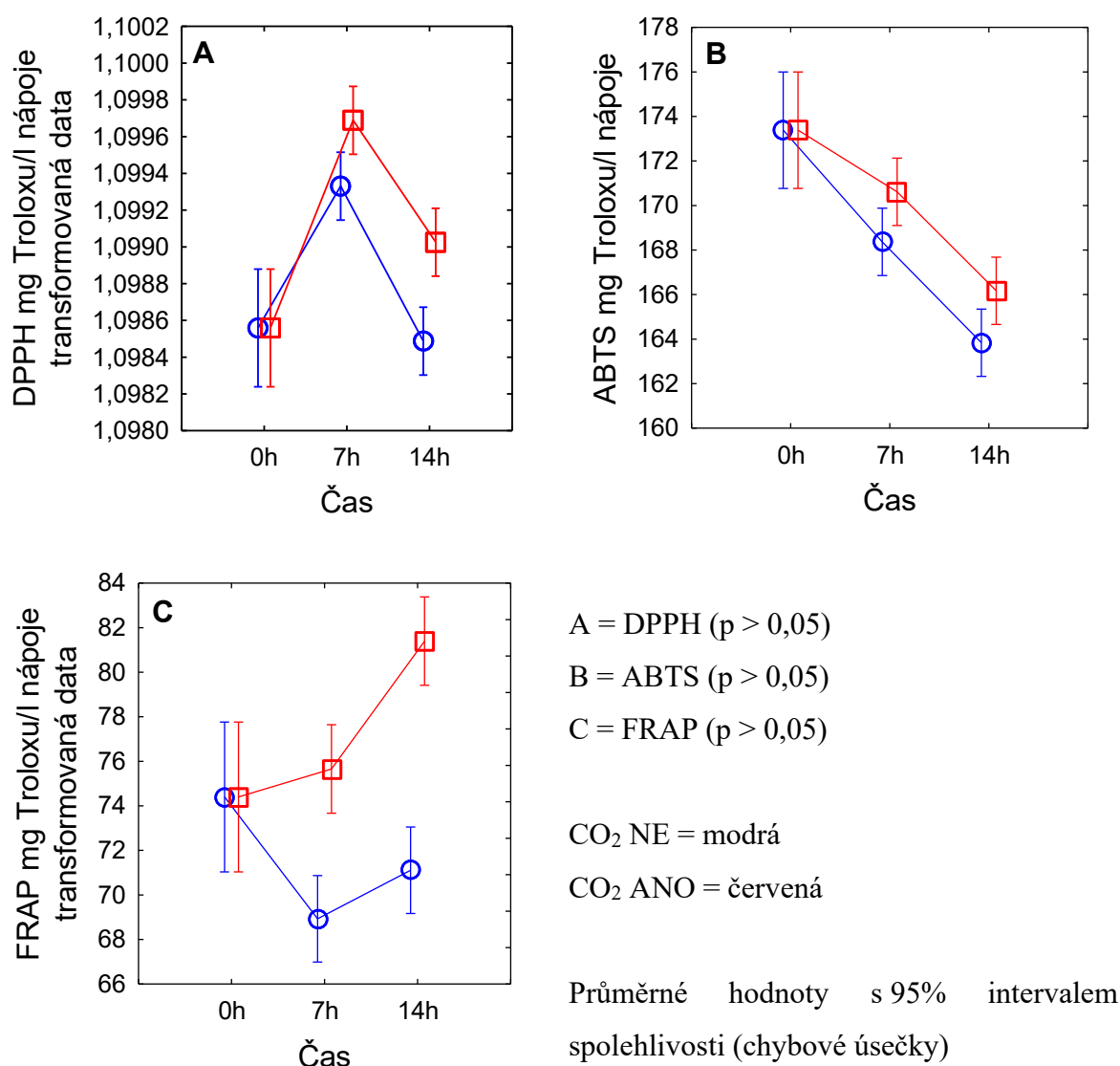
Graf 20 – Vliv faktorů síla slunečního záření a přítomnost cukrů na antioxidační aktivitu vzorku



Síla slunečního záření měla na antioxidační aktivitu výrazný vliv. Metodou DPPH i ABTS u obou limonád (s cukrem i bez cukrů) byl zaznamenán jasný pokles antioxidační aktivity během ozařování. Průměrná antioxidační aktivita měřená metodou DPPH byla nižší u vzorků vystavených vyšší dávce slunečního záření, efekt přítomnosti cukrů je nevýznamný (graf 20A). Na druhé straně u metody ABTS byla zaznamenána nižší průměrná antioxidační aktivita pro vzorky bez cukrů vystavené vyšší dávce slunečního záření (graf 20B). Metodou FRAP byly u limonád s cukrem naměřeny vyšší antioxidační aktivity než u limonád bez cukrů (graf 20C), velikost dávky slunečního záření zde nehrála významnou roli.

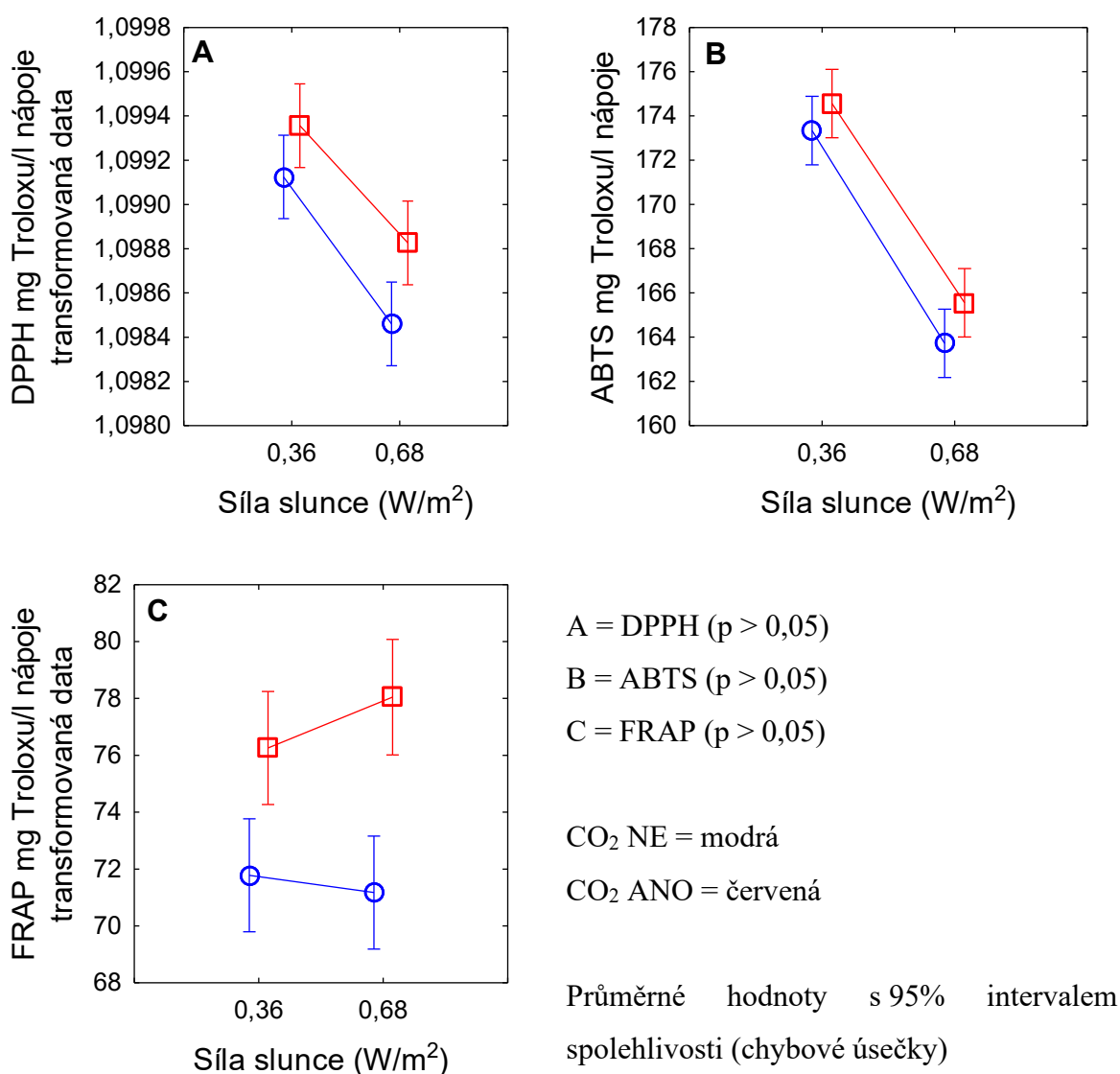


Graf 21 – Vliv faktorů čas a přítomnost CO<sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku



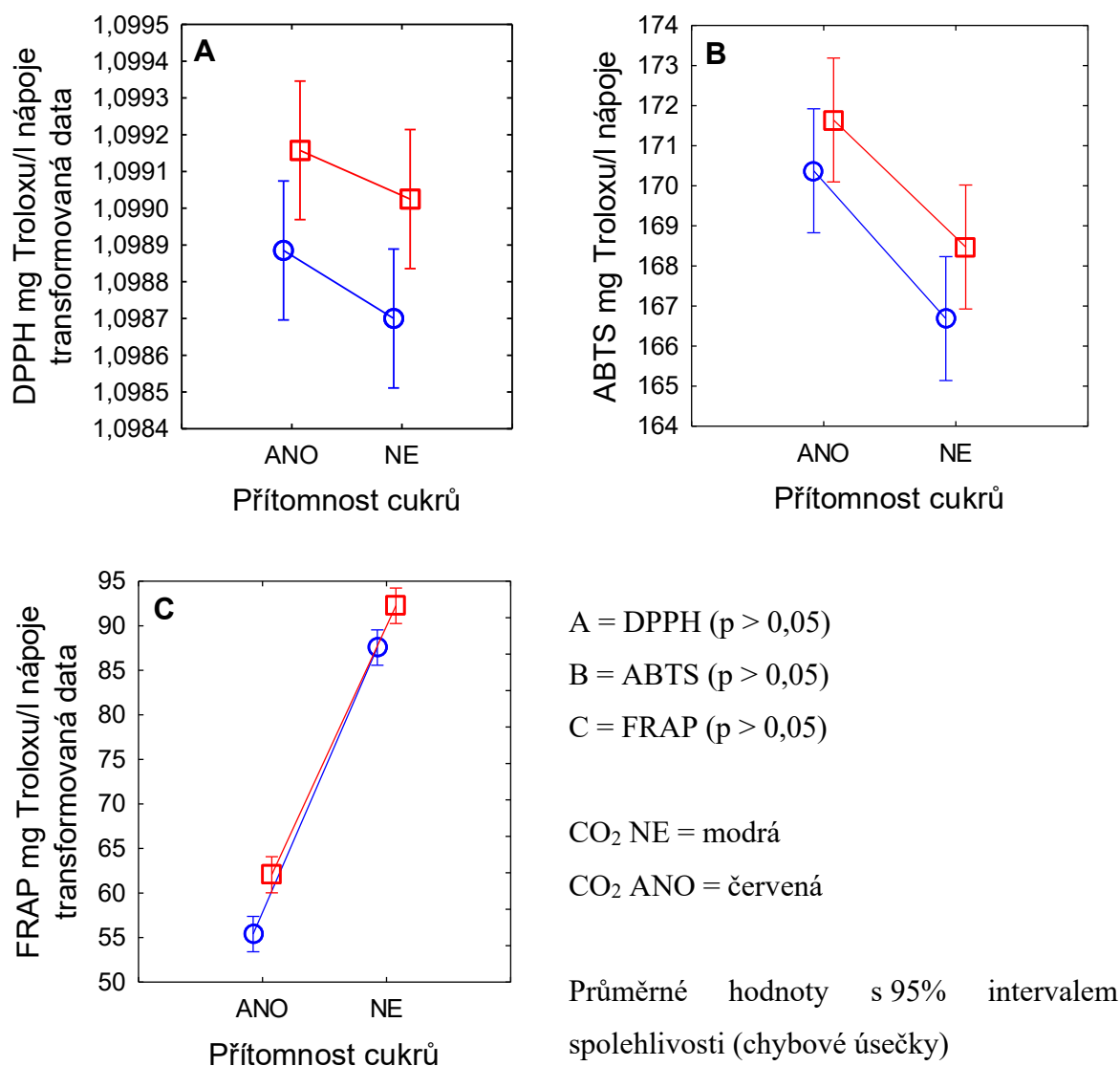
Na těchto grafech je zaznamenán vliv času a obsahu CO<sub>2</sub> v limonádách. Na počátku experimentu byla antioxidační aktivita pro všechny metody stejná, ať už jde o limonádu s CO<sub>2</sub>, nebo bez CO<sub>2</sub>. Metodou DPPH byla zaznamenána vyšší průměrná antioxidační aktivita po 7 h ozařování, ale stejná po 14 h ve srovnání s počátečním stavem (graf 21A). U metody ABTS v grafu 21B je jasně vidět, jak se antioxidační aktivita snižovala při každé dávce slunečního záření. Metodou FRAP byl zaznamenán nárůst antioxidační aktivity u karbonizovaných limonád po 7 h ozařování, zatímco nekarbonizované limonády vykazovaly nižší průměrnou antioxidační aktivitu. Po 14 h ozařování stoupla antioxidační aktivita v obou vzorcích, u limonády s cukry byl tento nárůst významný (graf 21C).

Graf 22 – Vliv faktorů síla slunečního záření a přítomnost CO<sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku



Efekt síly slunečního záření a přítomnosti CO<sub>2</sub> ve vzorcích byl podobný jak pro antioxidační aktivitu měřenou metodou s DPPH (graf 22A), tak s ABTS radikálem (graf 22B). U obou metod byla průměrná antioxidační aktivita nižší při ozařování 0,68 W/m<sup>2</sup>, zatímco u vzorků obsahujících CO<sub>2</sub> byla vždy vyšší. U poslední metody FRAP je vidět, že přítomnost CO<sub>2</sub> a různá dávka slunečního záření měly za následek zvýšení schopnosti redukce železitých iontů pouze u vzorků obsahujících CO<sub>2</sub>, i když i zde je tento efekt nevýznamný ( $p > 0,05$ ). U limonád bez CO<sub>2</sub> je schopnost redukovat železité ionty nezávislá na síle slunečního záření (graf 22C).

Graf 23 – Vliv faktorů přítomnosti cukru a přítomnosti CO<sub>2</sub> na antioxidační aktivitu vzorku



Zde se nachází poslední porovnání grafů pro faktor přítomnosti CO<sub>2</sub> a cukrů v limonádách. Jak metoda DPPH (graf 23A), tak ABTS (graf 23B) opět ukazují na pokles antioxidační aktivity vzorků, tj. nižší průměrnou antioxidační aktivitu pro vzorky bez obsahu cukrů a zároveň bez přítomnosti CO<sub>2</sub>. Nicméně velikost 95% intervalu spolehlivosti u průměrných hodnot naznačuje, že antioxidační aktivita nesouvisí s přítomností cukrů a CO<sub>2</sub> zároveň. Metoda FRAP je ale výrazně odlišná od ostatních dvou. Vyšší antioxidační aktivita byla zaznamenána u limonád bez cukrů a vliv CO<sub>2</sub> se zde zdá zanedbatelný (graf 23C).

### 3.7 Barevnost limonád

U všech vzorků limonád byla také měřena barevnost pomocí Ultrascan UV/Vis (HunterLab, USA). Přístroj byl vždy před měřením standardizován a karbonizované limonády byly odplyněny v ultrazvukové lázni. Barevnost byla vždy měřena první den a po 7 a 14 hodinách ozáření ve sluneční komoře. Pomocí programu CIE byly v tabulce 11 zaznamenány hodnoty popisující barevnost ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ). Bohužel kvůli plastovým lahvičkám, přes které pronikalo jen malé množství záření, a kvůli omezené době experimentu (0 h, 7 h, 14 h) jsou rozdíly barevnosti velmi malé.

Tabulka 11 – Základní popisné statistiky barevnosti

Proměnná	Popisné statistiky					
	platných N	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Směrodatná odchylka
$L^*$	60	59,9	59,9	58,1	60,9	0,72
$a^*$	60	68,5	68,5	68,0	69,5	0,39
$b^*$	60	103	102,6	100	105	1,0
$C^*$	60	123	123,4	121	125	0,9
$h^\circ$	60	56,3	56,3	55,1	57,0	0,47

Žádný parametr barevnosti nepochází z normálního rozdělení (data neuvedena). Důvodem jsou velmi málo rozdílné hodnoty dat. Minima a maxima se liší pouze v rádech jednotek.



0 h limonáda s cukry



14 h, 0,68 W/m<sup>2</sup>, bez CO<sub>2</sub>, bez cukrů

Obrázek 10 – Porovnání barevnosti (foto autora)

Na tomto obrázku 10 by měly být dvě nejodlišnější barvy nápoje, jak je však vidět, pouhým okem tyto barvy nelze rozlišit.

## 4. DISKUSE

V této práci byl prokázán vliv síly záření na koncentraci kyseliny karmínové v modelových roztocích, a to zejména po 14 h ozařování. Rozklad kyseliny karmínové při vystavení UV záření je závislý nejen na čase, ale také na vlnové délce emitovaného záření. V práci Zucchelli a kol. došlo k největším změnám při ozáření světlem o vlnové délce 300 nm.<sup>24</sup> Nutno podotknout, že jejich experimenty byly prováděny v křemenných kyvetách, zatímco naše vzorky byly v PET lahvích s omezenou propustností složek UV záření. Přítomnost cukrů ve vzorcích nápojů měla prokazatelný ochranný efekt na kyselinu karmínovou během ozařování. Tento fakt odpovídá také závěrům autorů Boyles a kol., v nichž byla kyselina karmínová v uměle připravených nápojích stabilnější při ozařování UV světlem ve srovnání s vodným roztokem barviva.<sup>1</sup> Obsah kyslíku v reakčním prostředí má pravděpodobně také vliv na fotochemickou degradaci kyseliny karmínové, jak popsali Zucchelli a kol., v nápojích, nebo Bowers a Sobeck v malířských pigmentech.<sup>24,25</sup> V naší práci byl jednoznačně prokázán vliv přítomnosti oxidu uhličitého na fotostabilitu kyseliny karmínové, tj. barvivo je stabilnější v karbonizovaných nápojích (3,5 mg/l) při ozařování slunečním světlem po dobu 14 h. Vliv sledovaných faktorů na antioxidační aktivitu nápojů nelze zobecňovat, výsledky analýzy rozptylu souvisí s použitou metodou stanovení. Vzájemná souvislost mezi antioxidační aktivitou a sledovanými faktory u limonád nebyla dosud nikde popsána.

## 5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv přítomnosti oxidu uhličitého a cukrů na stabilitu kyseliny karmínové v modelovém nápoji vystavením různým dávkám slunečního záření v prodejních lahvích z polyethylentereftalátu (PET). Byla také zkoumána antioxidační aktivita a barevnost modelového nápoje.

Modelové nápoje byly připravovány v různých variantách, s cukry nebo bez cukrů, sycené nebo nesycené. Tyto nápoje byly vystavovány různé síle slunečního záření po různé dlouhou dobu. Poté byly roztoky limonád proměřeny spektrofotometricky pro stanovení množství kyseliny karmínové, a byla také měřena barevnost nápojů. Následně byla také stanovena antioxidační aktivita limonád pomocí metody s DPPH radikálem, s ABTS radikálem a metodou FRAP. Naměřené hodnoty byly zpracovávány pomocí analýzy rozptylu a bylo vyhodnoceno, jaké faktory mají vliv na koncentraci kyseliny karmínové v nápojích a na její antioxidační aktivitu.

Koncentrace kyseliny karmínové v nápojích byla sledována pro faktory čas, přítomnost CO<sub>2</sub>, přítomnost cukrů a síla slunečního záření. Bylo zjištěno, že každý faktor sám o sobě je významný. ANOVA s interakcemi druhého řádu nám nabídla možnost porovnat, které interakce mezi faktory jsou významné. Všechny tyto interakce byly vyhodnoceny jako významné s výjimkou kombinace faktorů síly slunečního záření a přítomnosti cukrů. Ze získaných výsledků vyplývá, že kyselina karmínová byla stabilnější při vystavení slunečnímu záření v syceném nápoji obsahující cukry. Antioxidační aktivita nápojů byla také závislá na sledovaných faktorech, nicméně zde záleželo na použité metodě, a proto nelze výsledky zobecňovat.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. Boyles, C. & Sobeck, S. J. S. Photostability of organic red food dyes. *Food Chem.* **315**, (2020).
2. Burrows, A. Palette of our palates: A brief history of food coloring and its regulation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 394–408 (2009).
3. Liu, Q. *et al.* Effects of different food ingredients on the color and absorption spectrum of carminic acid and carminic aluminum lake. *Food Sci. Nutr.* **9**, 36 – 43 (2021).
4. Masár, M. *et al.* Determination of carminic acid in foodstuffs and pharmaceuticals by microchip electrophoresis with photometric detection. *Separations* **7**, 1 – 13 (2020).
5. Downham, A. & Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**, 5–22 (2000).
6. Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Mastroianni, R. & Marengo, E. Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis. *Food Chem.* **167**, 454 – 462 (2015).
7. Fernández-López, J. A., Angosto, J. M., Giménez, P. J. & León, G. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum. Nutr.* **68**, 11 – 17 (2013).
8. Haberová, K., Jančovičová, V., Veselá, D., Machatová, Z. & Oravec, M. Impact of organic binders on the carminic-colorants stability studied by: ATR-FTIR, VIS and colorimetry. *Dye. Pigment.* **186**, (2021).
9. Flores-Alatorre, H. L., Abrego-Reyes, V., Reyes-Esparza, J. A., Angeles, E. & Alba-Hurtado, F. Variation in the concentration of carminic acid produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae) at various maturation stages. *J. Econ. Entomol.* **107**, 1700–1705 (2014).
10. Samari, F., Hemmateenejad, B. & Shamsipur, M. Spectrophotometric determination of carminic acid in human plasma and fruit juices by second order calibration of the absorbance spectra-pH data matrices coupled with standard addition method. *Anal. Chim. Acta* **667**, 49 – 56 (2010).
11. Rasmussen, S. A. *et al.* On the biosynthetic origin of carminic acid. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **96**, 51–61 (2018).
12. Mageste, A. B. *et al.* Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7623–7629 (2009).
13. Zaima, K. *et al.* Kinetic study of the equilibration between carminic acid and its two isomers isolated from cochineal dye. *Chem. Pharm. Bull.* **65**, 306 – 310 (2017).
14. Bravo-Vinaja, A. & de Jesus Mendez-Gallegos, S. Emerging trends in scientific research on *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae), Carminic acid and its derivatives: A bibliometric analysis. *Agric. Soc. Y Desarro.* **20**, 139–165 (2023).

15. Aguilar, F. *et al.* Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *EFSA J.* **13**, (2015).
16. Borges, M. E., Tejera, R. L., Díaz, L., Esparza, P. & Ibáñez, E. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food Chem.* **132**, 1855 – 1860 (2012).
17. Kunkely, H. & Vogler, A. Absorption and luminescence spectra of cochineal. *Inorg. Chem. Commun.* **14**, 1153–1155 (2011).
18. Zhang, Q. *et al.* De novo biosynthesis of carminic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **76**, 50 – 62 (2023).
19. Lim, H.-S., Choi, J.-C., Song, S.-B. & Kim, M. Quantitative determination of carmine in foods by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* **158**, 521–526 (2014).
20. Alizadeh, M. *et al.* Recent advantages in electrochemical monitoring for the analysis of amaranth and carminic acid as food color. *Food Chem. Toxicol.* **163**, (2022).
21. Campana, M. G., Robles García, N. M. & Tuross, N. America's red gold: Multiple lineages of cultivated cochineal in Mexico. *Ecol. Evol.* **5**, 607 – 617 (2015).
22. Chávez-Moreno, C. K., Tecante, A. & Casas, A. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: A historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodivers. Conserv.* **18**, 3337 – 3355 (2009).
23. Bustamante-Brito, R., de León, A. V.-P., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J. C. & Martínez-Romero, E. Metatranscriptomic analysis of the bacterial symbiont *dactylopiibacterium carminicum* from the carmine cochineal *dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Life* **9**, (2019).
24. Zucchelli, M. *et al.* Photophysics and photochemistry of carminic acid and related natural pigments. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 9534 – 9542 (2020).
25. Rader Bowers, L. M. & Schmidtke Sobeck, S. J. Impact of medium and ambient environment on the photodegradation of carmine in solution and paints. *Dye. Pigment.* **127**, 18–24 (2016).
26. Bezerra, J. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae), cultivada em área de Caatinga do Município de Itaíba, Estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. *ResearchGate* [https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-Opuntia-ficus-indica-L-Mill-Cactaceae-A-sadia-e-B-infestada-por\\_fig1\\_277890966](https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-Opuntia-ficus-indica-L-Mill-Cactaceae-A-sadia-e-B-infestada-por_fig1_277890966) (1896).
27. Cañamares, M. V, Garcia-Ramos, J. V, Domingo, C. & Sanchez-Cortes, S. Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid. *Vib. Spectrosc.* **40**, 161–167 (2006).
28. Martínez, J. R. *et al.* Thermostructural behavior of red cochineal dye stabilized with sucrose and embedded in a silica xerogel matrix. *Phys. B Condens. Matter* **598**, (2020).
29. Felix, R. *Dactylopius coccus* on *Opuntia ficus-indica*. *iNaturalist* <https://www.inaturalist.org/observations/71893623> (2021).



30. Ramírez-Puebla, S. T. *et al.* Genomes of candidatus wolbachia bourtzisii wDacA and candidatus wolbachia pipientis wDacB from the cochineal insect dactylopius coccus (Hemiptera: Dactylopiidae). *G3 Genes, Genomes, Genet.* **6**, 3343 – 3394 (2016).
31. Frandsen, R. J. N. *et al.* Heterologous production of the widely used natural food colorant carminic acid in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
32. González, M., Méndez, J., Carnero, A., Lobo, M. G. & Afonso, A. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6968 – 6974 (2002).
33. Yang, D., Jang, W. D. & Lee, S. Y. Production of carminic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 5364 – 5377 (2021).
34. Arriagada, F. *et al.* Carminic acid linked to silica nanoparticles as pigment/antioxidant bifunctional excipient for pharmaceutical emulsions. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
35. Ordoudi, S. A., Staikidou, C., Kyriakoudi, A. & Tsimidou, M. Z. A stepwise approach for the detection of carminic acid in saffron with regard to religious food certification. *Food Chem.* **267**, 410 – 419 (2018).
36. Alghamdi, A. H., Alshammery, H. M., Abdalla, M. A. & Alghamdi, A. F. Determination of carmine food dye (E120) in foodstuffs by stripping voltammetry. *J. AOAC Int.* **92**, 1454–1459 (2009).
37. Mokhtari, A., Keyvanfard, M. & Emami, I. Chemiluminescence determination of carminic acid in foodstuffs and human plasma using Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-acidic Ce(IV) system. *Food Anal. Methods* **8**, 2457 – 2464 (2015).
38. Li, G.-X., Liu, Z.-Q. & Wu, D. Carminic acid: An antioxidant to protect erythrocytes and DNA against radical-induced oxidation. *J. Phys. Org. Chem.* **22**, 883 – 887 (2009).
39. Li, L. *et al.* Carminic acid mitigates fructose-triggered hepatic steatosis by inhibition of oxidative stress and inflammatory reaction. *Biomed. Pharmacother.* **145**, (2022).
40. González, E. A., García, E. M. & Nazareno, M. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. *Food Chem.* **119**, 358 – 362 (2010).
41. Li, Q. *et al.* Carminic acid supplementation protects against fructose-induced kidney injury mainly through suppressing inflammation and oxidative stress via improving Nrf-2 signaling. *Aging (Albany, NY)*. **13**, 10326 – 10353 (2021).
42. Miller, A., Müller, R., Scheiding, P., Schneider, H. & Oberloher, A. Studies on the formation of 4-aminocarminic acid. *J. fur Verbraucherschutz und Leb.* **12**, 329 – 334 (2017).
43. Osumi, M. *et al.* Allergy to carminic acid *in vitro* evidence of involvement of protein-binding hapten. *Asia Pac. Allergy* **9**, (2019).
44. Česká republika. *Narizení komise (EU) č. 213/2012 ze dne 9. března 2012, kterým se stanoví specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III narizení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008.* 1–295 (Úřední věstník Evropské unie, 2012).

45. Česká republika. *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách*. 1–18 (Úřední věstník Evropské unie, 2008).
46. Česká republika. *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/35/ES ze dne 23. dubna 2009 o barvivech, která mohou být přidávána do léčivých přípravků*. 1–4 (Úřední věstník Evropské unie, 2009).
47. Yilmaz, U. T., Ergun, F. & Yilmaz, H. Determination of the food dye carmine in milk and candy products by differential pulse polarography. *J. Food Drug Anal.* **22**, 329–335 (2014).
48. Virtanen, S., Ali-Mattila, E. & Pekka, L. Determination of synthetic colorants and natural carmine in wines; [Détermination des colorants synthétiques et du carmin naturel dans les vins]. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **33**, 145 – 147 (1999).
49. Brøndsted, P., Nijssen, R. & Goutianos, S. *Advances in wind turbine blade design and materials* (2nd edition). (2023).
50. Choudhury, A. K. R. *Principles of colour appearance and measurement, Volume 1 - Object appearance, colour perception and instrumental measurement*. (2014).
51. Fellows, P. J. *Food processing technology - Principles and practice* (4th edition). (2017).
52. Mäntele, W. & Deniz, E. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **173**, 965–968 (2017).
53. Braga, M. S. Schematic representation of the dual-beam UV-VIS spectrometer. *ResearchGate* [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-dual-beam-UV-VIS-spectrometer\\_fig2\\_336637497](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-dual-beam-UV-VIS-spectrometer_fig2_336637497) (2019).
54. Etzrodt, G. *Industrial coloration of plastics - Pigments, dyestuffs, fillers, and nanomaterials*. (2022).
55. Truhlářová, K. Využitelnost metod hodnocení bělosti pro osvětlení D50. *Univerzita Pardubice, Fak. Chem.* 1–88 (2019).
56. Kubištová, V. Spektrofotometrické studium antioxidační aktivity. *Univerzita Palackého v Olomouci, Fak. přírodovědecká* 1–47 (2010).
57. Munteanu, I. G. & Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
58. Šrogl, J., Augustin, S., Tetzeli, J. & Novotný, L. Zjednodušené titrační stanovení kyslíčnicku uhličitého v nápojích. *Kvasný průmysl* **21**, 36–38 (1975).
59. Urban, F. & Shaffer, P. A. The acid property of sugars. *From Lab. Biol. Chem. Washingt. Univ. Sch. Med. St. Louis* 697–715 (1931).
60. Gulcin, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch toxicol* **94**, 651–715 (2020).

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny karmínové

Příloha 2 – Obsah kyseliny karmínové (mg/l) ve vzorcích

Příloha 3 – Antioxidační aktivita vzorků (mg Trolox/l) měřená s DPPH radikálem

Příloha 4 – Antioxidační aktivita vzorků (mg Trolox/l) měřená s ABTS radikálem

Příloha 5 – Antioxidační aktivita vzorků (mg Trolox/l) měřená metodou FRAP

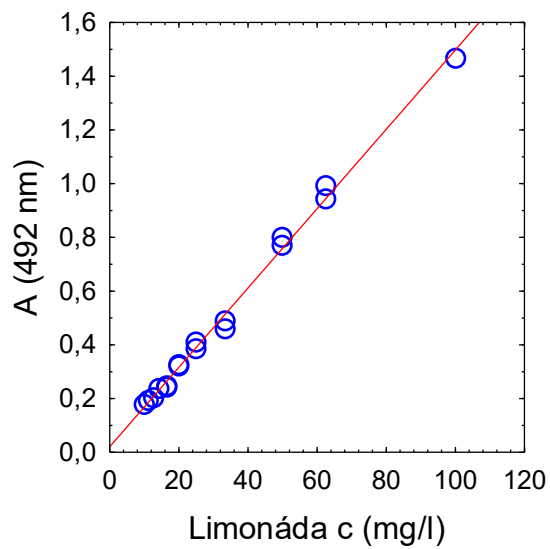
Příloha 6 – N-P graf DPPH transformovaných dat

Příloha 7 – Box-Cox graf FRAP ekvivalent Troloxu

Příloha 1 – Kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny karmínové

Tato kalibrační závislost je lineární až do rozsahu 100 mg/l.

$$A = 0,0209 + 0,0148 \cdot c, R^2 = 0,995$$



Příloha 2 – Obsah kyseliny karmínové (mg/l) ve vzorcích

Doba ozařování (h)	Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka (N = 3)	
	Intenzita slunečního záření = 0,36 W/m <sup>2</sup>	Intenzita slunečního záření = 0,68 W/m <sup>2</sup>
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO
0	103,9 ± 0,2	103,2 ± 0,7
7	102,8 ± 0,0	103,0 ± 1,1
14	103,1 ± 0,9	99,0 ± 1,4
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE
0	98,6 ± 0,4	99,1 ± 0,4
7	101,2 ± 0,1	101,0 ± 1,2
14	99,3 ± 0,4	96,0 ± 2,2
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO
0	103,9 ± 0,2	103,2 ± 0,7
7	98,8 ± 0,8	97,1 ± 0,5
14	96,0 ± 1,2	89,0 ± 1,6
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE
0	98,7 ± 0,4	99,1 ± 0,4
7	98,2 ± 0,4	96,0 ± 1,3
14	95,0 ± 1,2	89,0 ± 2,2

Příloha 3 – Antioxidační aktivita vzorků (mg Trolox/l) měřená s DPPH radikálem

Doba ozařování (h)	Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka (N = min. 2)	
	Intenzita slunečního záření = 0,36 W/m <sup>2</sup>	Intenzita slunečního záření = 0,68 W/m <sup>2</sup>
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO
0	300,4 ± 0,0	255 ± 7
7	360 ± 34	300 ± 24
14	290 ± 13	280 ± 20
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE
0	267 ± 2	243 ± 4
7	310 ± 14	327 ± 7
14	310 ± 24	280 ± 16
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO
0	300,4 ± 0,0	255,0 ± 7,3
7	360 ± 33	284 ± 15
14	255 ± 23	250 ± 20
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE
0	267 ± 2	243 ± 4
7	290 ± 10	290 ± 21
14	300 ± 11	250 ± 16

Příloha 4 – Antioxidační aktivita vzorků (mg Trolox/l) měřená s ABTS radikálem

Doba ozařování (h)	Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka (N = min. 2)	
	Intenzita slunečního záření = 0,36 W/m <sup>2</sup>	Intenzita slunečního záření = 0,68 W/m <sup>2</sup>
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO
0	180 ± 5	172,5 ± 0,8
7	174 ± 1	170 ± 1
14	170 ± 3	163 ± 2
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE
0	171 ± 3	169,3 ± 0,9
7	172 ± 2	166,2 ± 0,4
14	180 ± 2	151 ± 2
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO
0	180 ± 5	172,5 ± 0,8
7	172,6 ± 0,6	168 ± 1
14	170 ± 2	159,8 ± 0,8
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE
0	171,4 ± 3	169,3 ± 0,9
7	168 ± 4	166 ± 1
14	178 ± 2	147,9 ± 0,8

Příloha 5 – Antioxidační aktivita vzorků (mg Trolox/l) měřená metodou FRAP

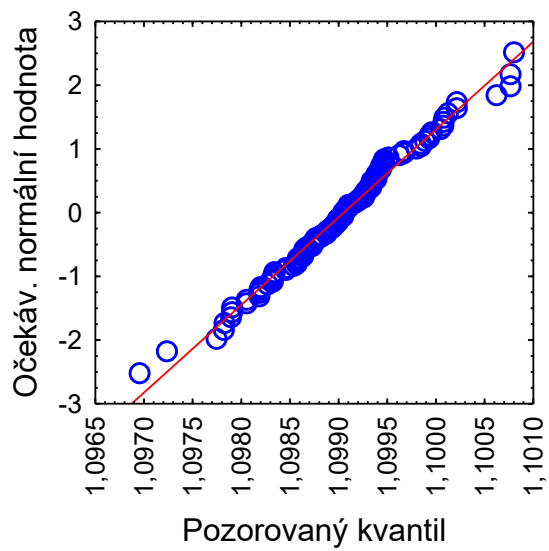
Doba ozařování (h)	Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka (N = min. 2)	
	Intenzita slunečního záření = 0,36 W/m <sup>2</sup>	Intenzita slunečního záření = 0,68 W/m <sup>2</sup>
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = ANO
0	533 ± 8	497 ± 3
7	460 ± 56	700 ± 100
14	560 ± 80	500 ± 140
	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = ANO, obsah cukrů = NE
0	860 ± 80	970 ± 47
7	880 ± 76	940 ± 90
14	1240 ± 64	1200 ± 100
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = ANO
0	533 ± 8	497 ± 3
7	380 ± 54	560 ± 30
14	420 ± 55	230 ± 60
	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE	Obsah CO <sub>2</sub> = NE, obsah cukrů = NE
0	860 ± 80	970 ± 47
7	760 ± 19	820 ± 36
14	1130 ± 61	1030 ± 80



Příloha 6 – N-P graf DPPH transformovaných dat

Důkaz o normalitě transformovaných dat.

SW-W = 0,9887; p = 0,4755



## Příloha 7 – Box-Cox graf FRAP ekvivalent Troloxu

Po vyloučení odlehlých bodů 44 a 56 a znovu provedení Box-Coxovy transformace dat už v intervalu  $\lambda$  není hodnota 1, a transformace je tedy oprávněná a lze na data použít.

$\lambda = 0,577$ ; dolní  $\lambda = 0,183$ ; horní  $\lambda = 0,995$

