

ADITIVNÍ LÁTKY

KONZERVAČNÍ PROSTŘEDKY

Oxid siřičitý a siřičitany

volná (SO_3 , HSO_3^- , SO_3^{2-}) a vázaná forma (karbonyly apod.)

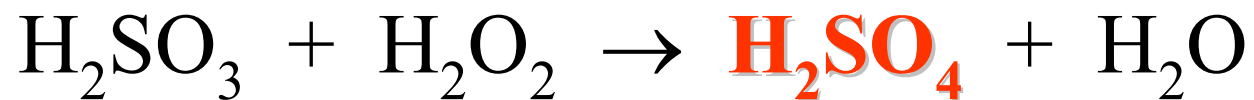
- **Metody titrační**

- (i) jodometrická titrace - přímo nebo po izolaci SO_2 destilací

- oxidace jodem v kyselém prostředí



(ii) alkalimetrická titrace (po oxidaci)



- **Metoda spektrofotometrická**

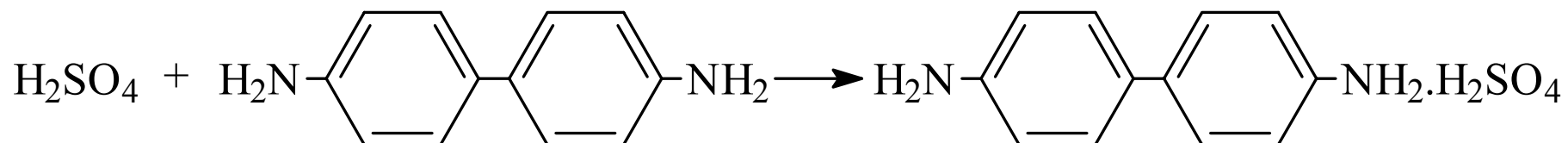
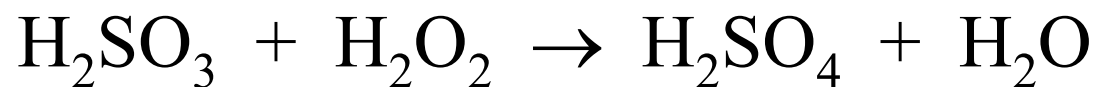
extrakce SO_2 roztokem hydroxidu →
přídavek **fuchsinového činidla**

*viz stanovení acetaldehydu po reakci
s fuschinsířčitou kyselinou*

další barevné reakce

- **Metoda vážková**

oxidace H_2O_2 , sraženina po reakci H_2SO_4
s **benzidinem**



Další metody

- **Chromatografická metoda - GC**
analýza "head-space"

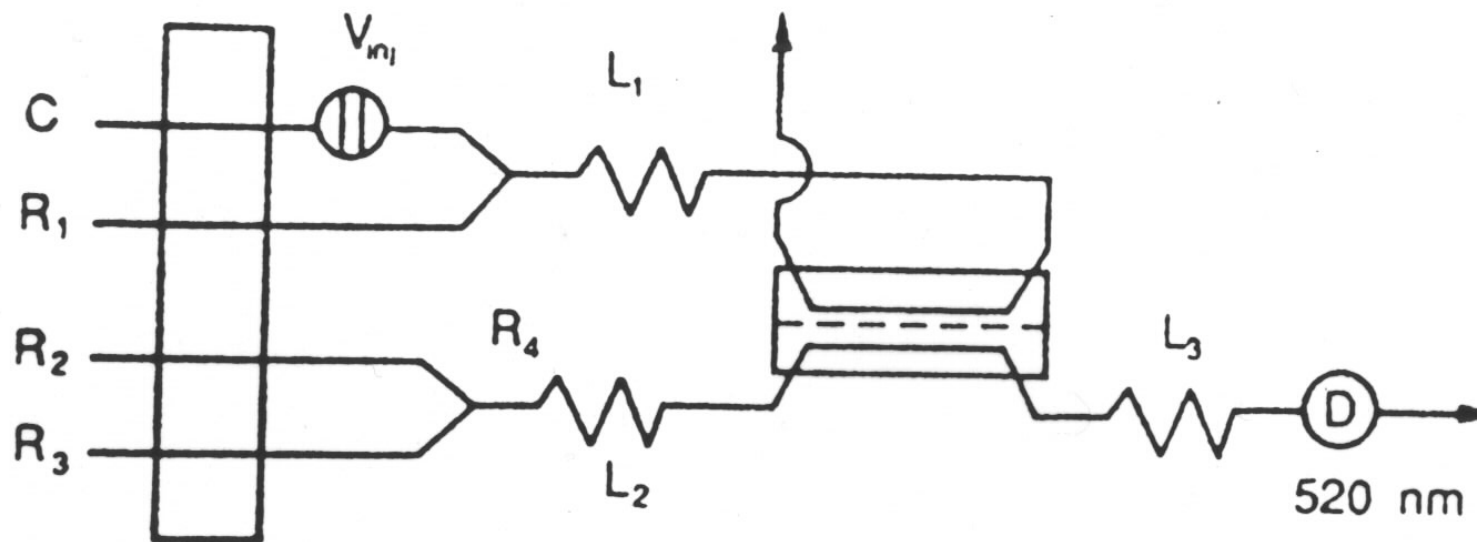


Fig. 1 Scheme of the FIA configuration used for the determination of free SO_2 . Conditions: Flow rate of C, R_1 , R_2 , and R_3 , 0.58 ml/min; $V_{inj} = 300 \mu\text{l}$; $L_1 = 30 \text{ cm} \times 0.5 \text{ mm i.d.}$; $L_2 = 200 \text{ cm} \times 0.7 \text{ mm i.d.}$; $L_3 = 250 \text{ cm} \times 0.5 \text{ mm i.d.}$; C and $R_1 = 0.6 \text{ M HCl}$; $R_2 = 1\% \text{ HCHO in } 0.2 \text{ M HCl}$; $R_3 = 0.004\% \text{ } p\text{-aminoazobenzene}$. (From Ref. 11.)

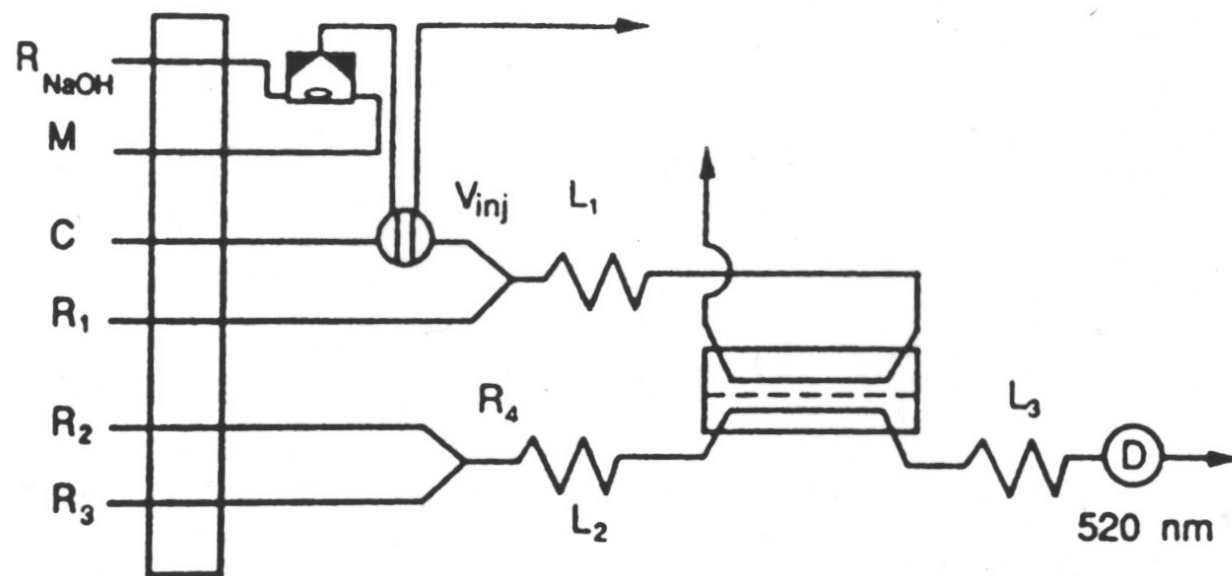


Fig. 2 Scheme of the FIA configuration used for the determination of total SO_2 . Conditions: Flow rate of C, R_1 , R_2 , and R_3 0.83 ml/min; flow rate of R_{NaOH} 0.6 ml/min; $V_{\text{inj}} = 50 \mu\text{l}$; volume of the mixing chamber 1 ml; $L_1 = 30 \text{ cm} \times 0.5 \text{ mm i.d.}$; $L_2 = 200 \text{ cm} \times 0.7 \text{ mm i.d.}$; $L_3 = 200 \text{ cm} \times 0.8 \text{ mm i.d.}$; M sample; $R_{\text{NaOH}} = 4 \text{ M NaOH}$; C = 2 M HCl; $R_1 = 6 \text{ M HCl}$; $R_2 = 1\% \text{ HCHO in } 0.2 \text{ M HCl}$; $R_3 = 0.004\% \text{ } p\text{-aminoazobenzene}$. (From Ref. 11.)

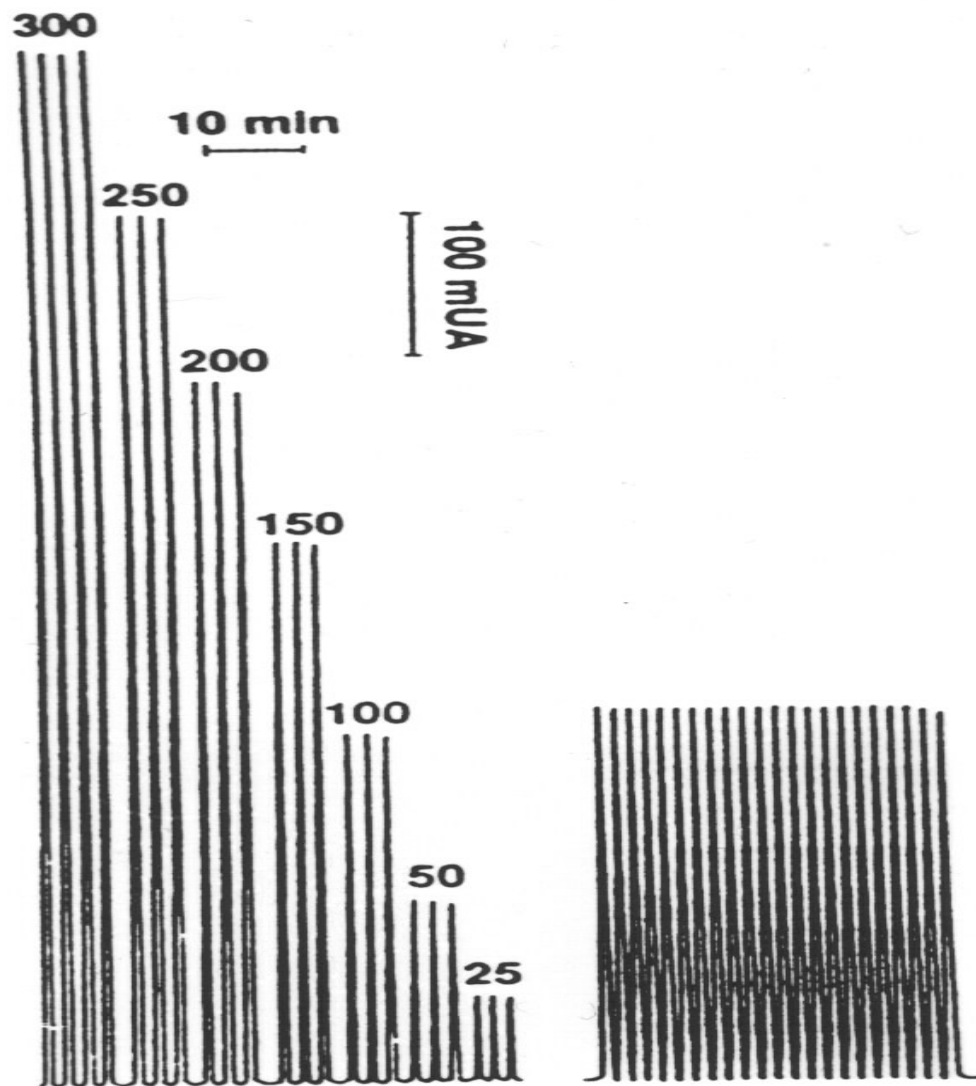


Fig. 3 FIA recording showing the response of the system for the determination of total SO₂ obtained by calibration with aqueous standards and the evaluation of repeatability with 20 injections of a 100 ppm standard. The numbers on the peaks are SO₂ concentrations in ppm. (From Ref. 11.)

Sorbová kyselina, benzoová kyselina, estery 4-hydroxybenzoové kyseliny

Izolace:

- extrakce rozpouštědlem
- extrakce na tuhou fázi (SPE)
- destilace s vodní parou

CHROMATOGRAFICKÉ METODY STANOVENÍ VŠECH LÁTEK SOUČASNĚ

- **Metoda GC**
přímo nebo jako estery
- **Metoda HPLC**
přímo

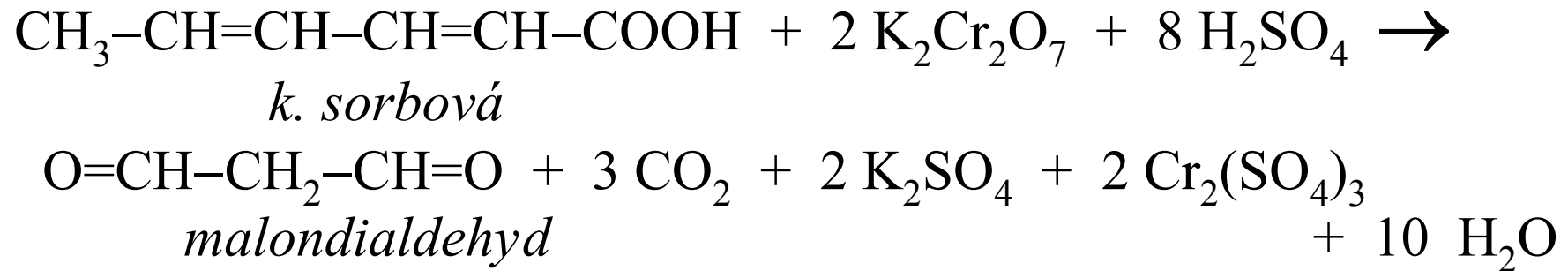


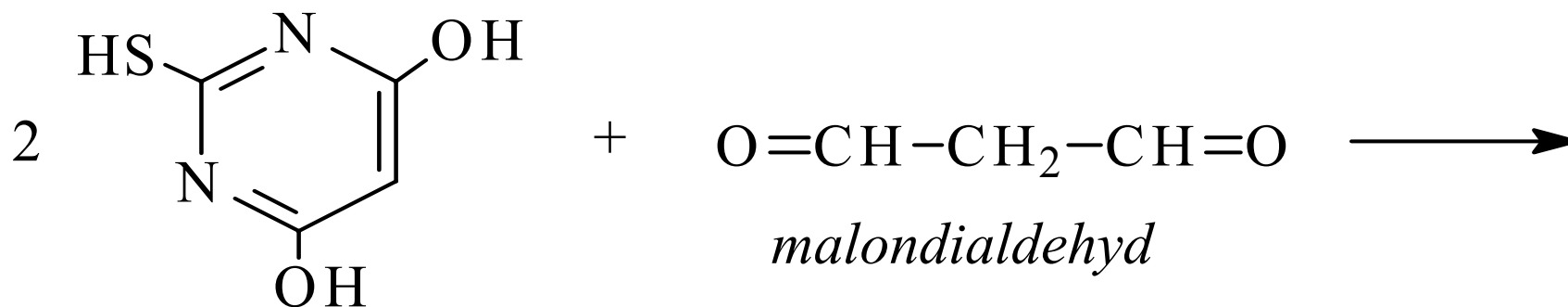
Stanovení jednotlivých látek

Sorbová kyselina

- **Metoda spektrofotometrická**

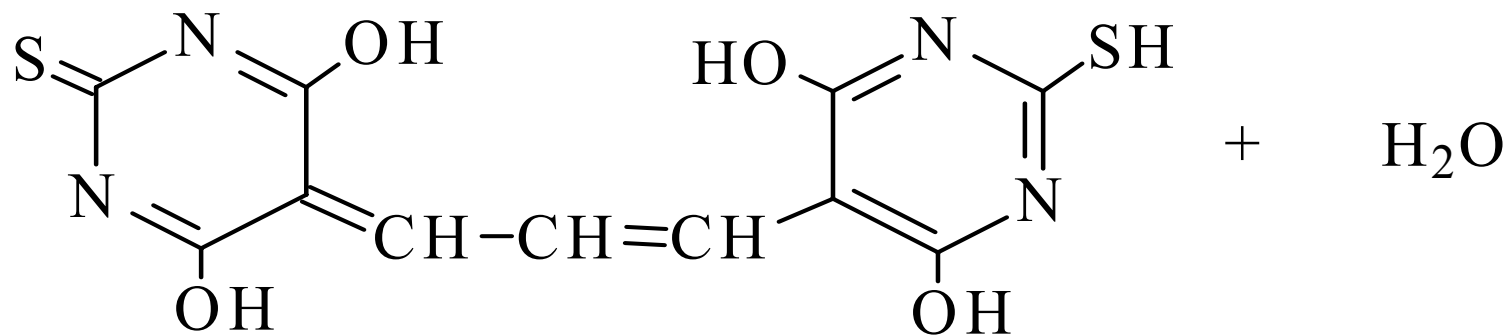
➤ oxidace dichromanem na malondialdehyd →
barevný produkt s 2-thiobarbiturovou kyselinou





2-thiobarbiturová kyselina

malondialdehyd



Benzoová kyselina

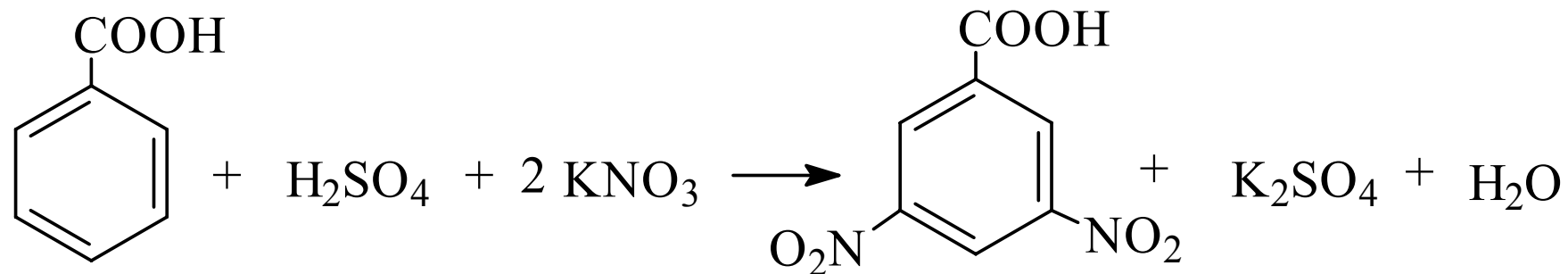
- **Metoda titrační**

- izolace z vodného výluhu extrakcí chloroformem → alkalimetrická titrace

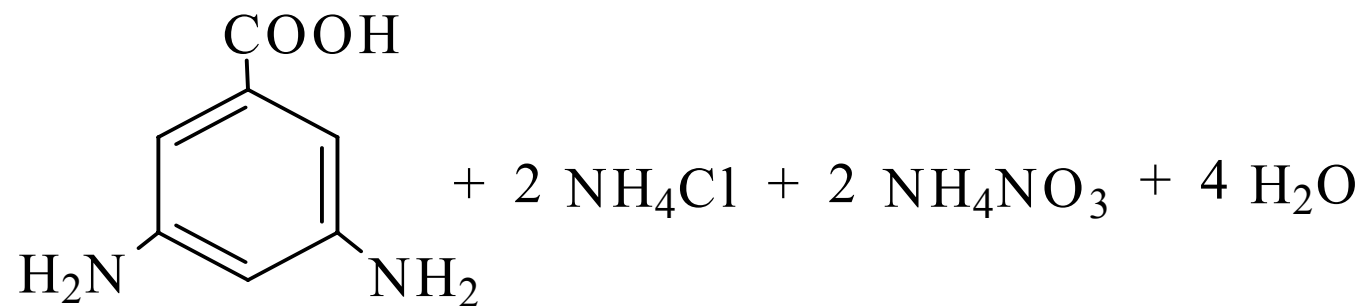
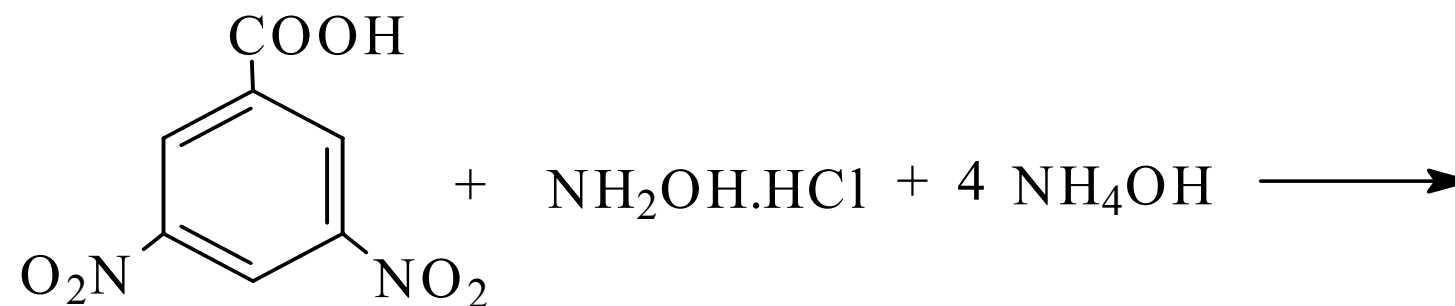
- HPLC

- **Metoda spektrofotometrická**

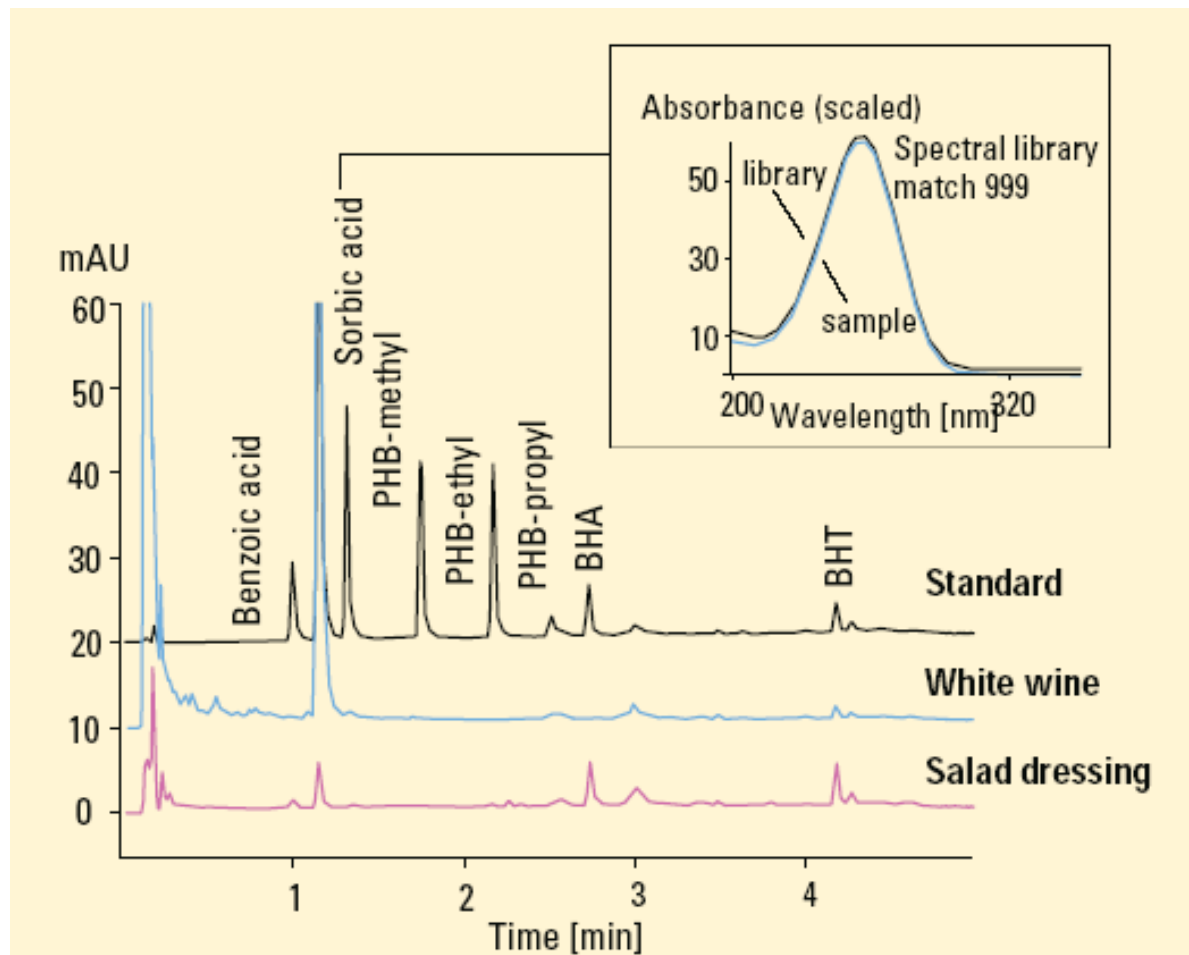
- izolace extrakcí diethyletherem → barevný produkt po nitraci a reakci s hydroxylaminem



3,5-dinitrobenzoová kyselina



3,5-diaminobenzoová kyselina



Příklad: Stanovení k. benzoové a sorbové pomocí HPLC

Kolona: HyperSil BDS (125 x 4 mm), Mobilní fáze: A – voda + 0.2ml H₂SO₄ (pH = 2.54), B – acetonitril, Gradient: 10% B, 3 min 60% B, 6 min 90% B, Detektor: DAD (260 nm)

Gratzfeld-Huesgen et al., Application Note AN14992, Agilent Technologies

Estery 4-hydroxybenzoové kyseliny

- Metoda spektrofotometrická
 - barevný produkt s Millonovým činidlem = směs $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ v HNO_3

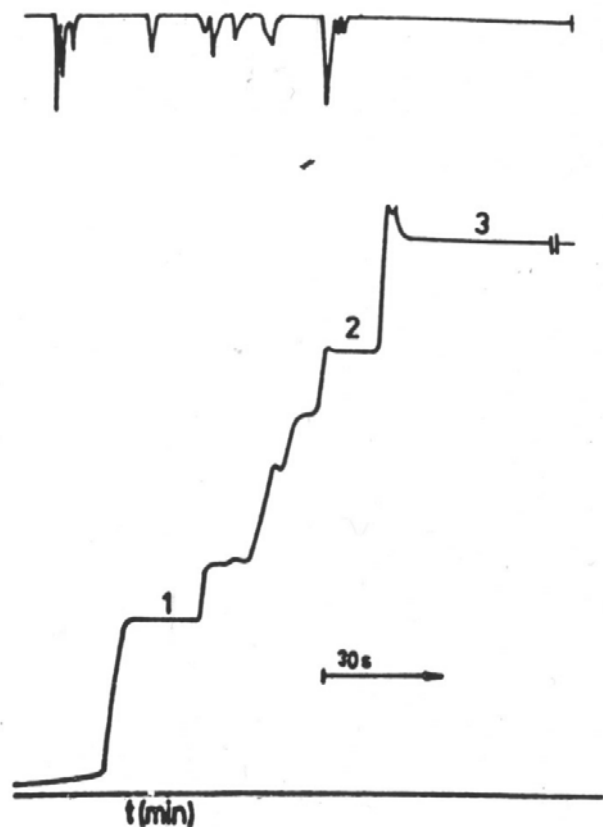


Fig. 6 Isotachopherogram of preservatives in mustard. Conditions: Driving current 250 μA in the preparation column, 50 μA in the analytical column. The composition of the applied electrolytic system: leading electrolyte 0.01 M HCl; 0.1% methylhydroxyethylcellulose (MHEC). pH of the leading electrolyte adjusted by the counter ion β -alanine to 3.5. Terminating electrolyte 0.005 M caproic acid. Instrument: ZKI 01 Labeco, S. N. Ves, Slovak Republic, equipped with a conductivity detector. 1, Formic acid; 2, benzoic acid; 3, acetic acid. (From Ref. 114.)

Seznam povolených konzervačních látek (Vyhláška č. 304/2004 Sb.)

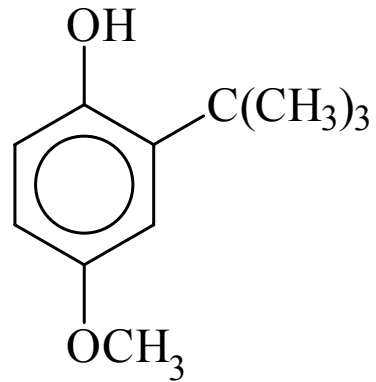
Číslo E	Látka
E 200	kyselina sorbová
E 202	sorbát draselný
E 203	sorbát vápenatý
E 210	kyselina benzoová
E 211	benzoát sodný
E 212	benzoát draselný
E 213	benzoát vápenatý
E 214	ethylparahydroxybenzoát
E 215	ethylparahydroxybenzoát sodná sůl
E 216	propylparahydroxybenzoát
E 217	propylparahydroxybenzoát sodná sůl
E 218	methylparahydroxybenzoát
E 219	methylparahydroxybenzoát sodná sůl

Číslo E	Látka
E 220	oxid siřičitý
E 221	siřičitan sodný
E 222	hydrogensiřičitan sodný
E 223	disiřičitan sodný
E 224	disiřičitan draselný
E 226	siřičitan vápenatý
E 227	hydrogensiřičitan vápenatý
E 228	hydrogensiřičitan draselný

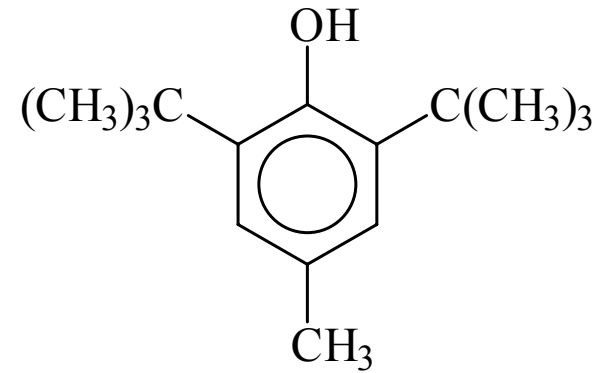
ANTIOXIDANTY

➤ stabilizace lipidické složky, aroma, pigmentů apod.

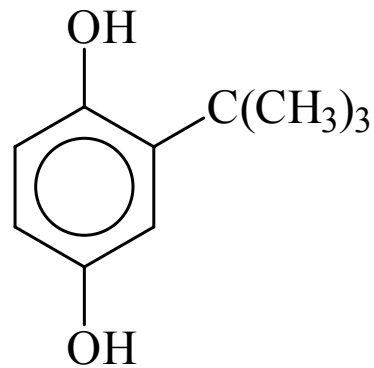
- primární - donory elektronů
(*syntetické fenoly, přírodní tokoferoly*)
- sekundární - látky vážící kyslík
(*askorbová kyselina, askorbylpalmitát, erythorbová k.*)
- sekundární - rozkládají hydroperoxydy
- chelatační činidla - maskují kovové ionty prooxidantů
synergisty fenolických antioxidantů
(*polyhydroxykyseliny jako citronová, aminokyseliny, EDTA*)



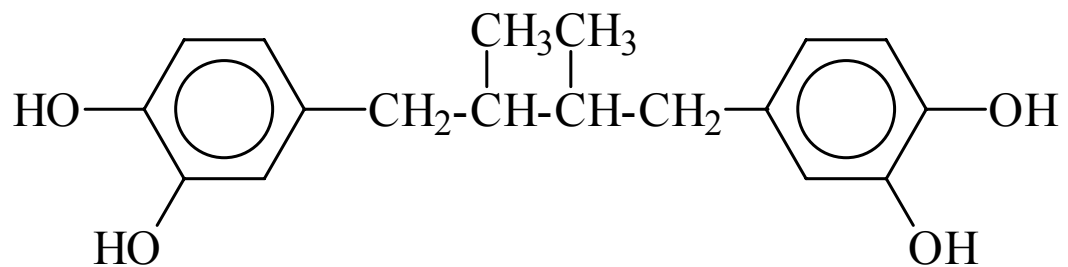
butylhydroxyanisol (BHA)



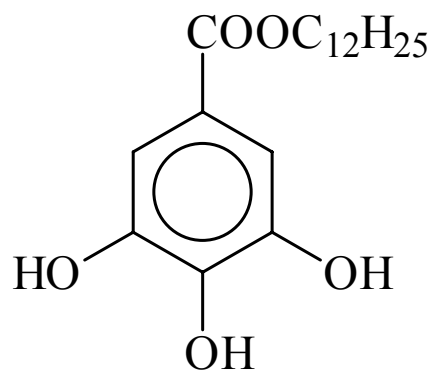
butylhydroxytoluen (BHT)



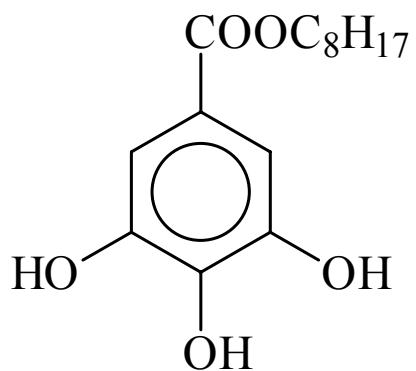
tert-butylhydrochinon



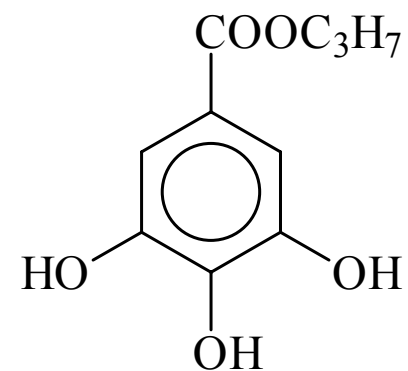
nordihydroguajarová kyselina



dodecylgallát



oktylgallát



propylgallát

- **Izolace**

extrakce z roztoku tuku v nepolárním rozpouštědle
vodným ethanolem, methanolem

nepolární antioxidanty → destilací s vodní párou

- **Kvalitativní analýza**

chromatografie na papíře, na tenké vrstvě
(polyamidu, silikagelu)

- **Kvantifikace**

Chromatografické metody stanovení všech látek:

- * Metoda GC - jako trimethylsilylderiváty
- * Metoda HPLC - přímé stanovení

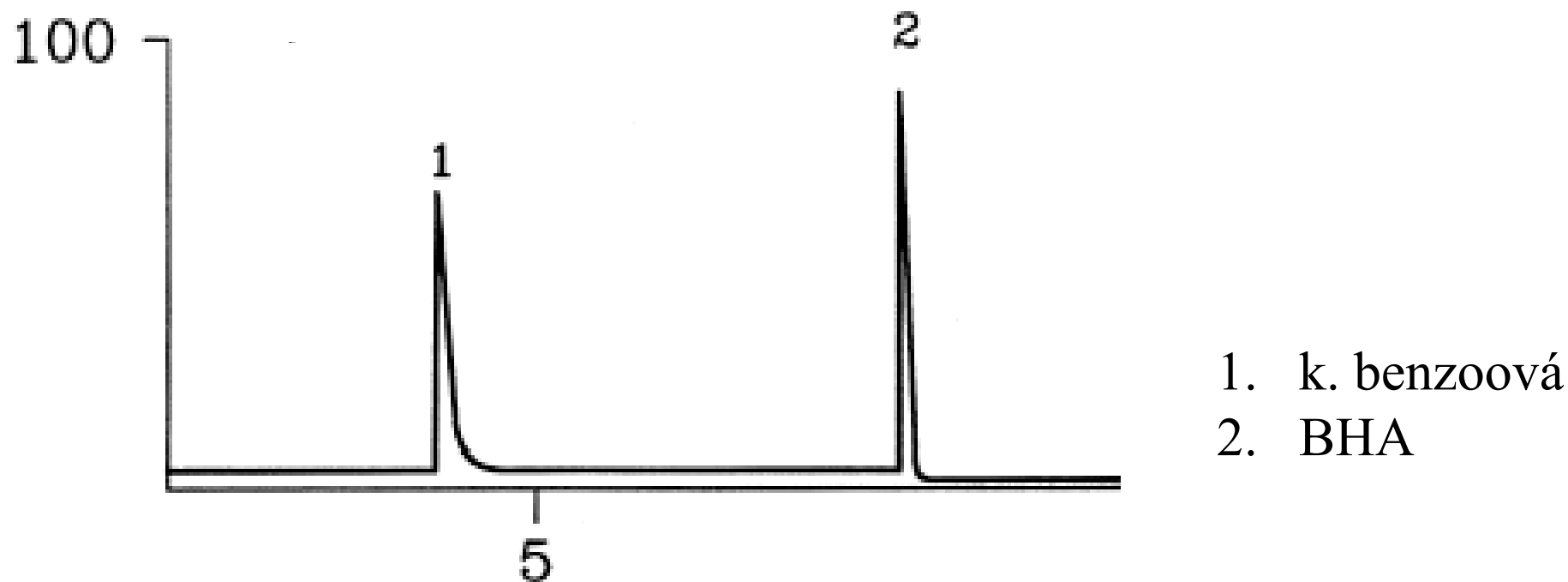
Stanovení jednotlivých látek

Butylhydroxytoluen a butylhydroxyanisol

- Metoda spektrofotometrická
barevný produkt BHA s dichlorchinonchlorimidem,
barevný produkt BHA i BHT s FeCl_3 a 2,2'-
dipyridylem, obsah BHT z rozdílu stanovení

Propylgallát

- Komplexometrická titrační metoda
vysrážení ve formě rtuťnaté soli

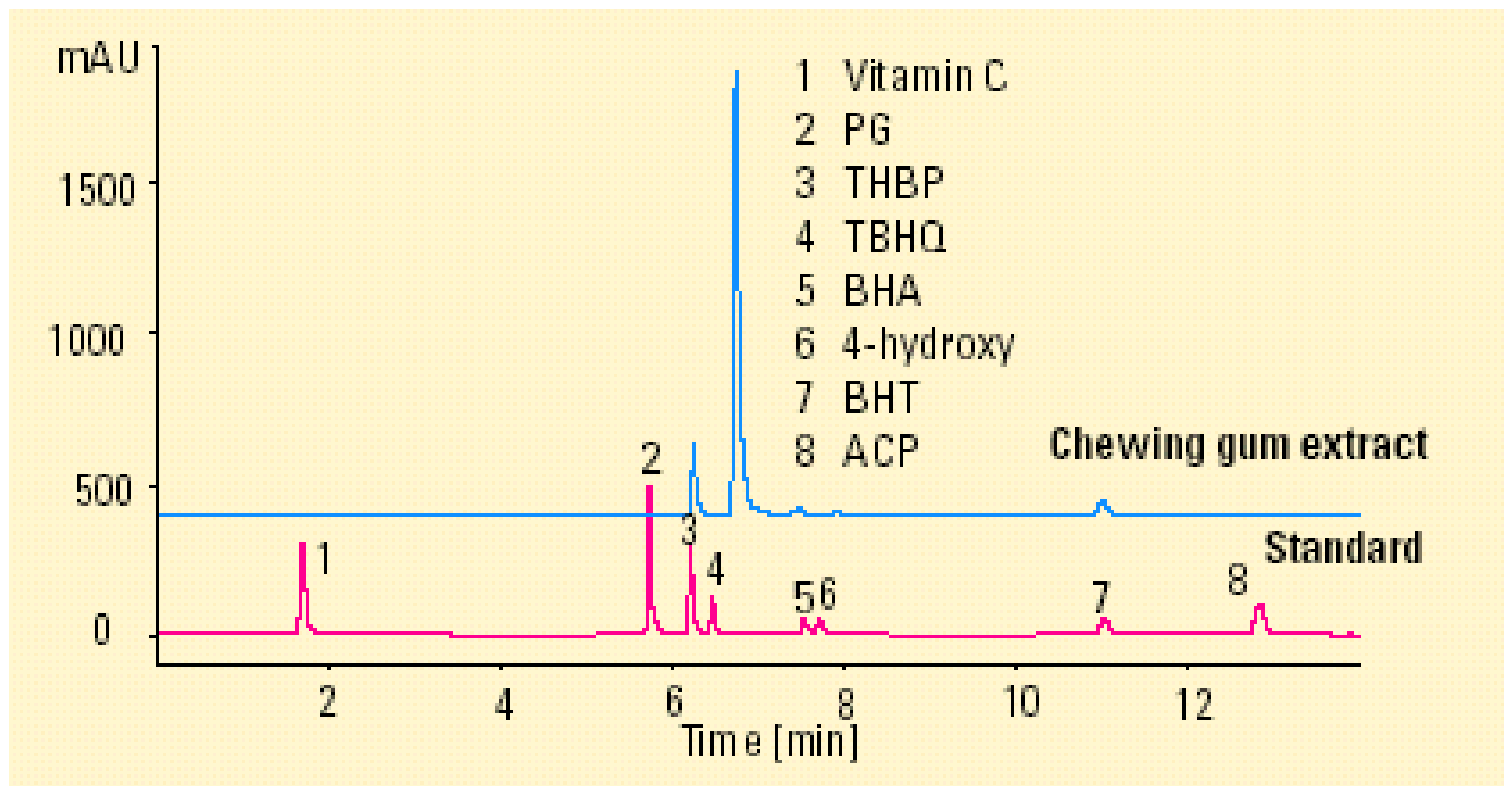


Příklad: GC stanovení butylhydroxyanisolu (BHA) v majonéze

Kolona: HP-5 (30 m x 0.32 mm), Nosný plyn: helium (1 ml/min)

Detektor: MS (kvadrupol), ionizační technika: EI

González et al., J. Chromatogr. A 848 (1999) 529-536



Příklad: Stanovení antioxidantů pomocí HPLC

PG – propylgallát, THBQ – terc-butyhydrochinon, BHA – butylhydroxyanisol, BHT – butylhydroxytoluen, ACP - askorbylpalmitát

Kolona: BDS (100 x 4 mm), Mobilní fáze: A – voda + 0.2ml H_2SO_4 (pH = 2.54), B – acetonitril, Gradient: 10% B, 3 min 60% B, 11 min 90% B, Detektor: DAD (260 nm)

Gratzfeld-Huesgen et al., Application Note AN14986, Agilent Technologies

SYNTEICKÁ BARVIVA

- ❖ **Azobarviva**
- ❖ **Chinolinová barviva**
- ❖ **Indigoidní barviva**
- ❖ **Xanthenová barviva**

BARVIVA ROZPUSTNÁ VE VODĚ

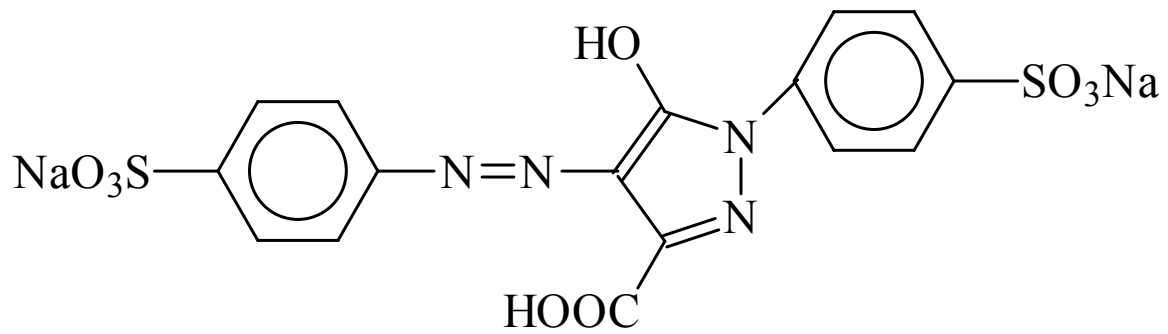
izolace a kvalitativní analýza

adsorpce na **vlněné vlákno** (případně polyamid) →
eluce zředěným amoniakem (případně methanolickým
NaOH) → chromatografie na tenké vrstvě →
spektrofotometrie

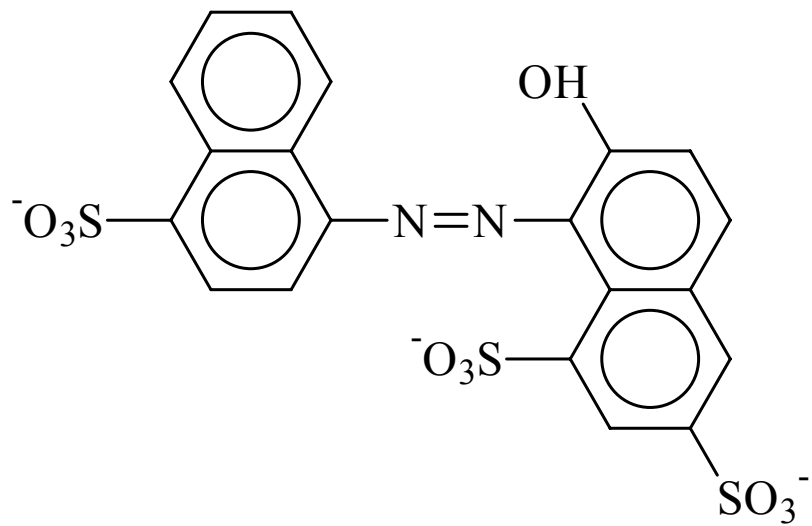
Exaktní identifikace/ kvantifikace - Metoda HPLC

BARVIVA ROZPUSTNÁ V TUKU

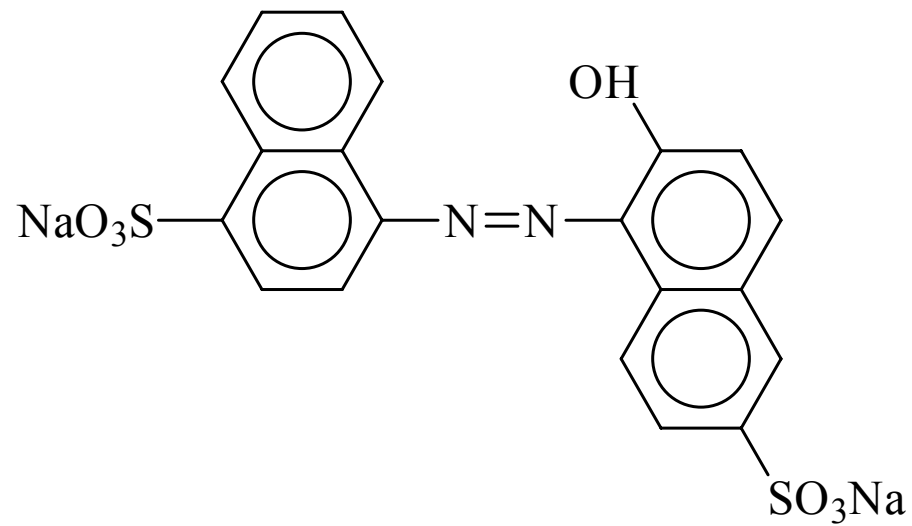
- izolace po zmýdelnění vzorku extrakcí nepolárním rozpouštědlem
- kvalitativní analýza: TLC



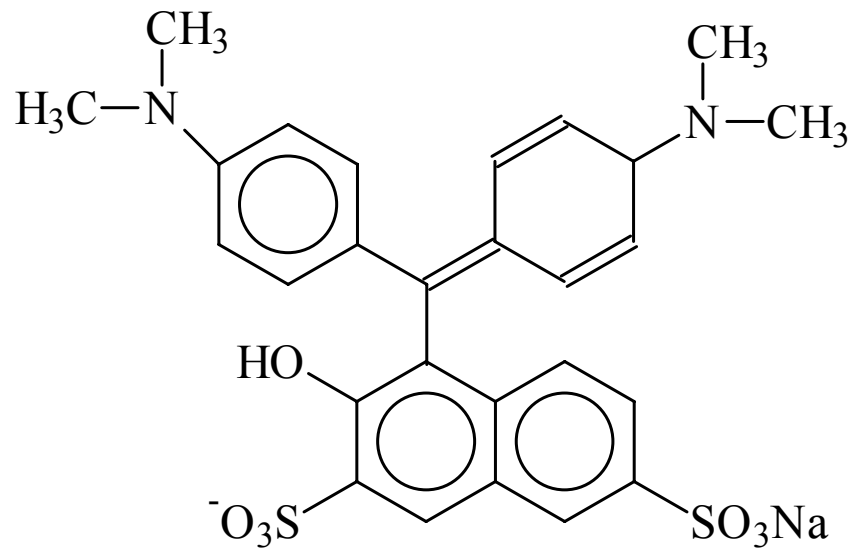
Tartrazin



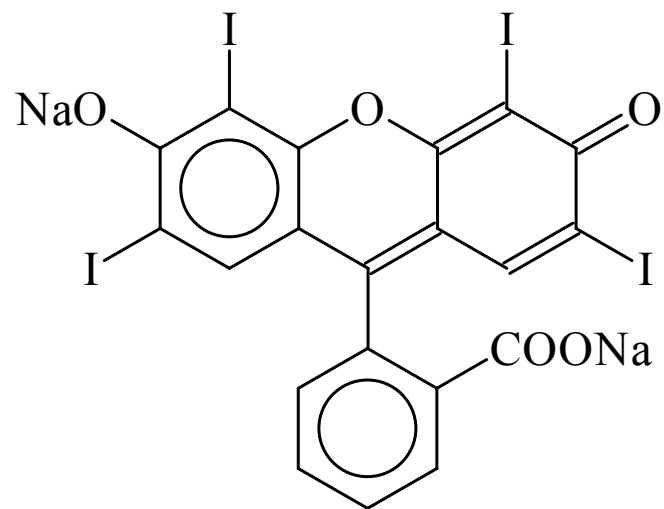
Ponceau



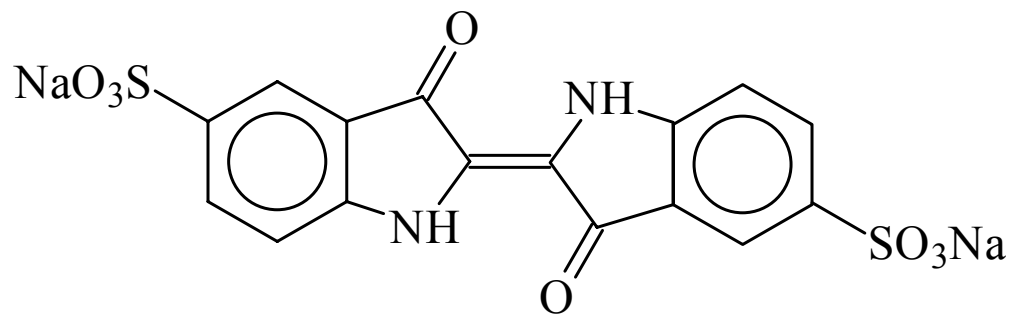
Žlutá SY



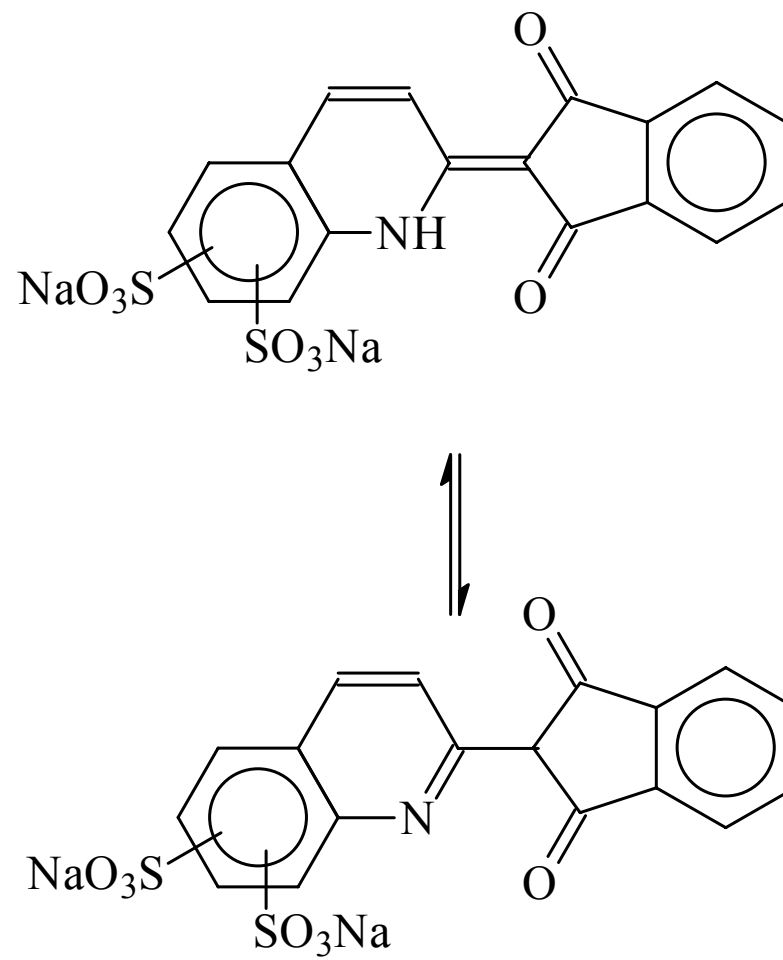
Zeleň



Erythrosin



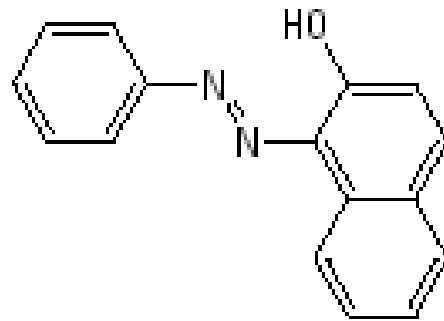
Indigotin



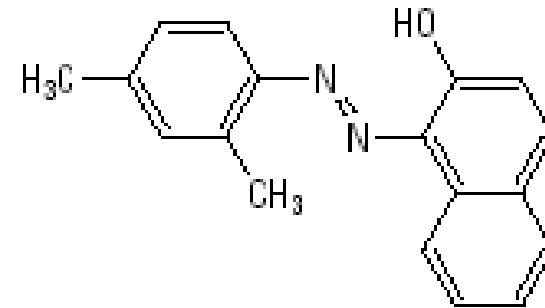
Chinolinová žluť

Zakázaná barviva:

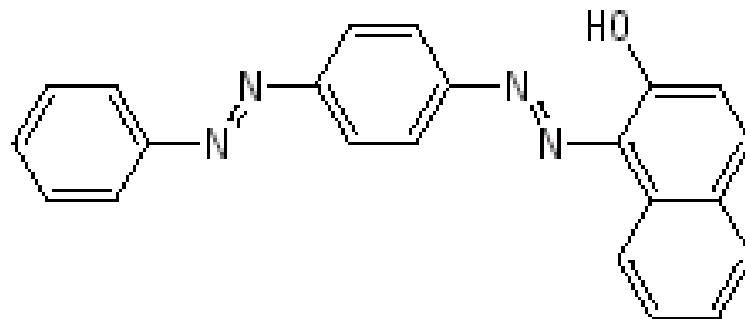
Sudan Red I



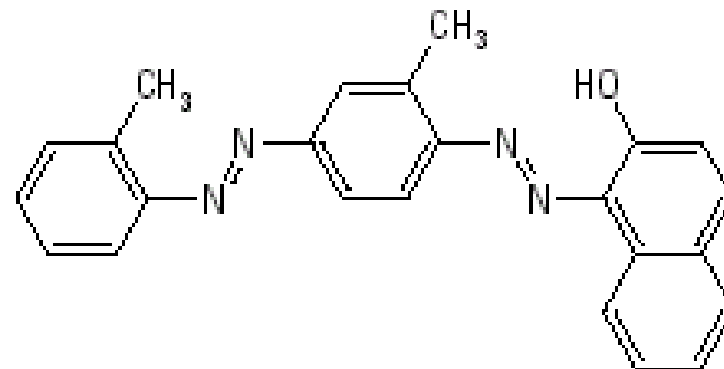
Sudan Red II



Sudan Red III



Sudan Red IV

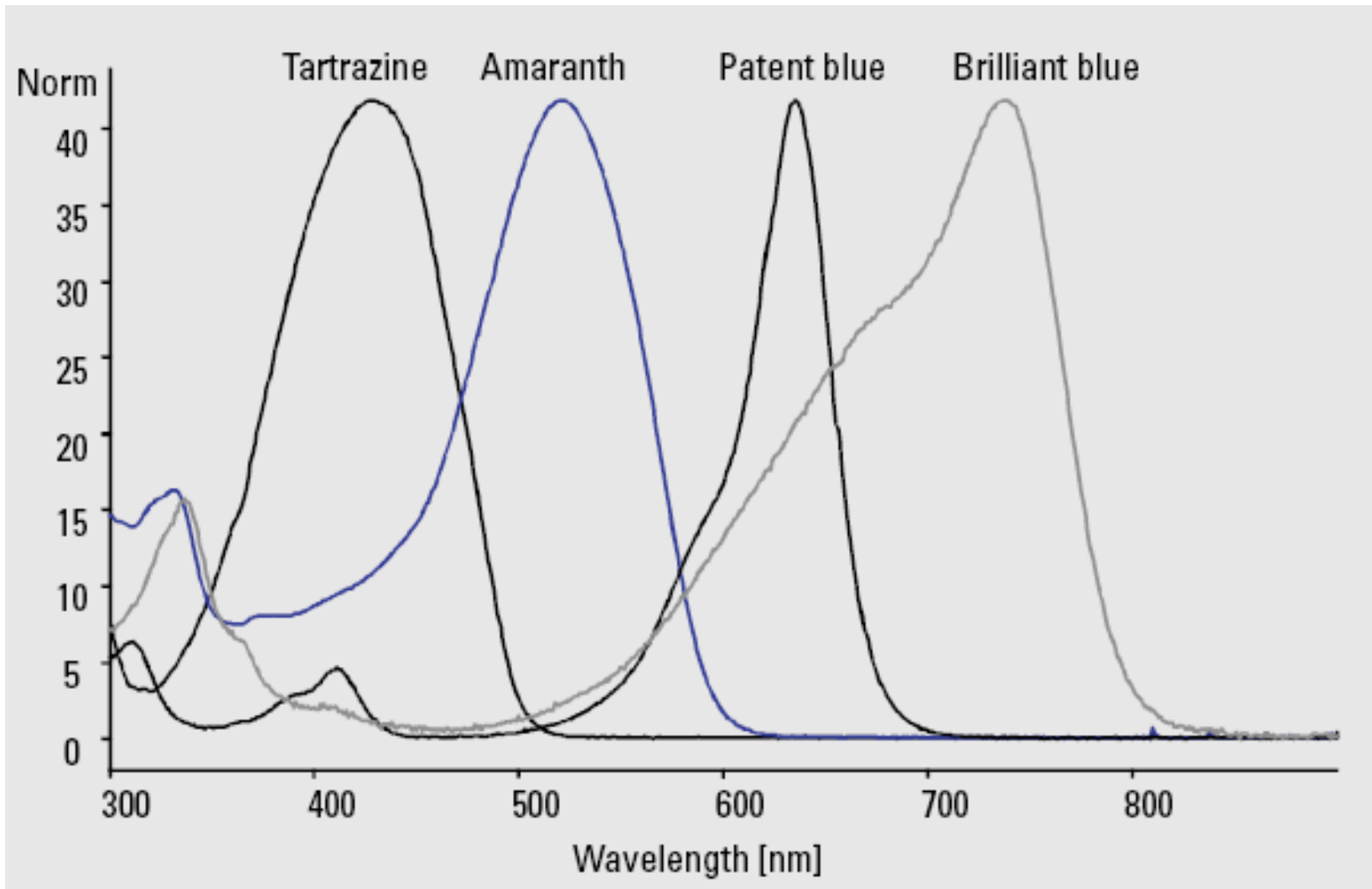


Seznam povolených barviv (Vyhláška č.304/2004 Sb.)

Číslo E	Barvivo
E 100	Kurkumin
E 101	(i) Riboflavin (ii) Riboflavin-5'-fosforečnan
E 102	Tartrazin
E 104	Chinolinová žlut'
E 110	Žlut' SY (synonymum Gelborange S)
E 120	Košenila, kys. karmínová, karmíny
E 122	Azorubin (synonymum Carmoisin)
E 123	Amarant (synonymum Viktoriarubín O)
E 124	Ponceau 4R (synonymum Košenilová červeň A)
E 127	Erythrosin
E 128	Červeň 2G
E 129	Červeň Allura AC
E 131	Patentní modř V
E 132	Indigotin (synonymum Indigocarmine)
E 133	Brilantní modř (synonymum Brilliant blue FCF)
E 140	Chlorofyly a chlorofyliny (i) Chlorofyly (ii) Chlorofyliny
E 141	Mědnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů (i) Cu komplexy chlorofylů (ii) Cu komplexy chlorofylinů
E 142	Zeleň S
E 150 a	Karamel *
E 150 b	Kaustický sulfitový karamel
E 150 c	Amoniakový karamel
E 150 d	Amoniak - sulfitový karamel
E 151	Čeř BN (synonymum Brilliant black BN)

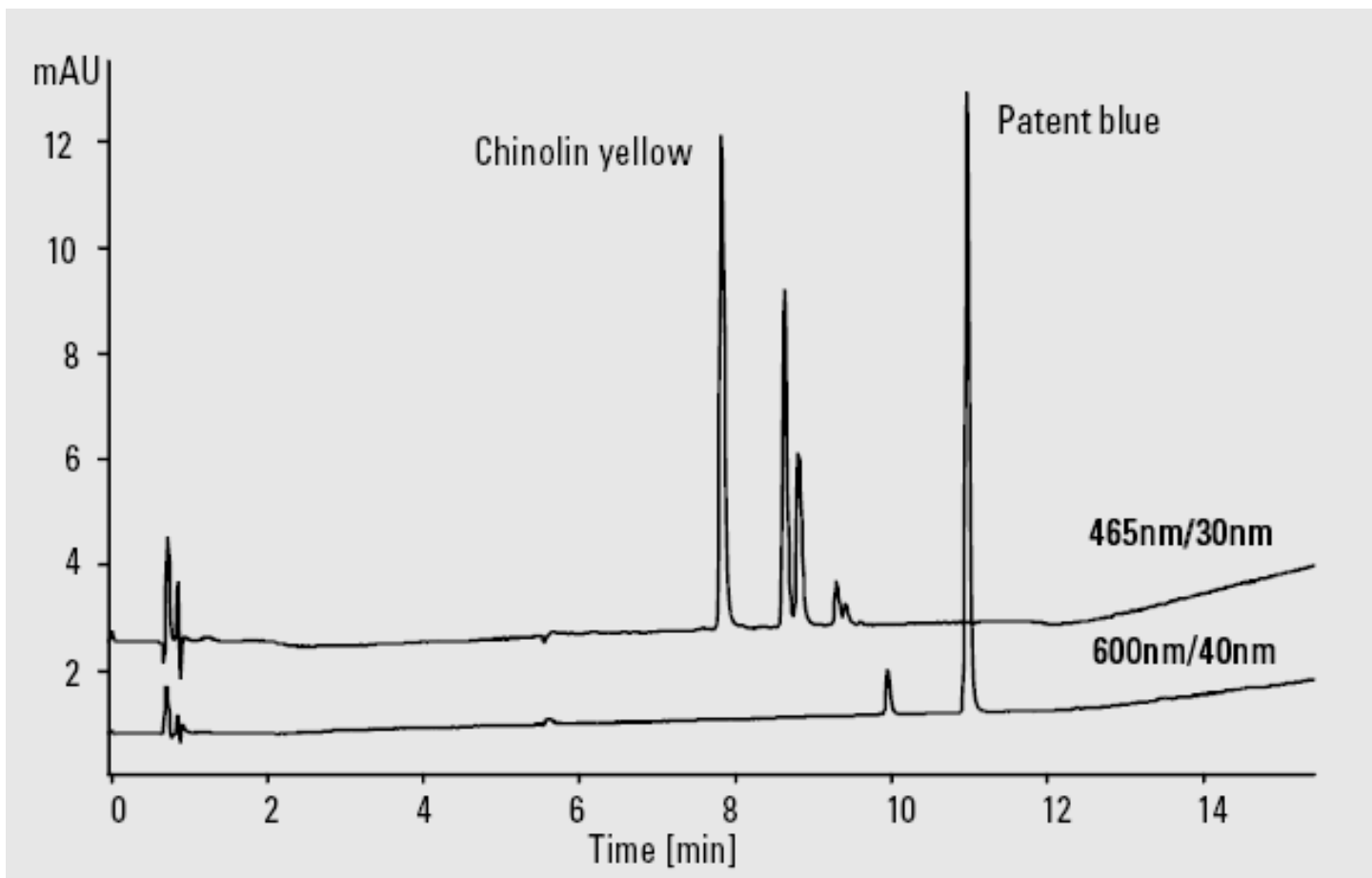
Seznam povolených barviv (Vyhláška č.304/2004 Sb.)

E 154	Hněď FK
E 155	Hněď HT
E 160 a	Karoteny
	(i) směs karotenů
	(ii) Beta-karoten
E 160 b	Annato, bixin, norbixin
E 160 c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin
E 160 d	Lykopen
E 160 e	Beta-apo-8'-karotenal
E 160 f	Ethylester kyseliny beta-apo-8'-karotenové
E 161 b	Lutein
E 161 g	Kanthaxanthin
E 162	Betalainová červeně, betanin (včetně extraktů z červené řepy)
E 163	Anthokyany (získané fyzikálními postupy z ovoce a zeleniny)
E 170	Uhličitan vápenatý
E 171	Oxid titaničitý (synonymum Titanová běloba)
E 172	Oxidy a hydroxidy železa
E 173	Hliník (v podobě pigmentu)
E 174	Stříbro (v podobě pigmentu)
E 175	Zlato (v podobě pigmentu)
E 180	Litholrubin BK



Absorpční spektra vybraných syntetických barviv

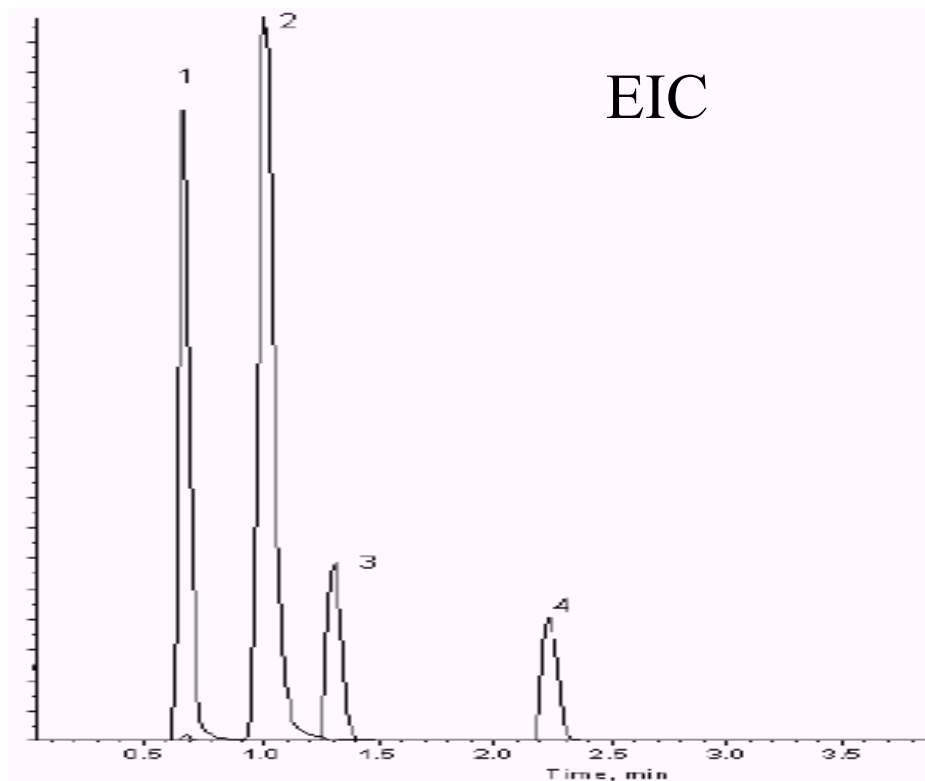
Gratzfeld-Huesgen et al., Application Note AN 15744, Agilent Technologies



Stanovení syntetických barviv v nealkoholickém nápoji pomocí HPLC

Kolona: HyperSil BDS (125 x 3 mm), Mobilní fáze: A-fosfátový pufr (pH 4.2), B-acetonitril, Gradient: 10 min (40 % A), 19 min (90 % A), Detektor: DAD

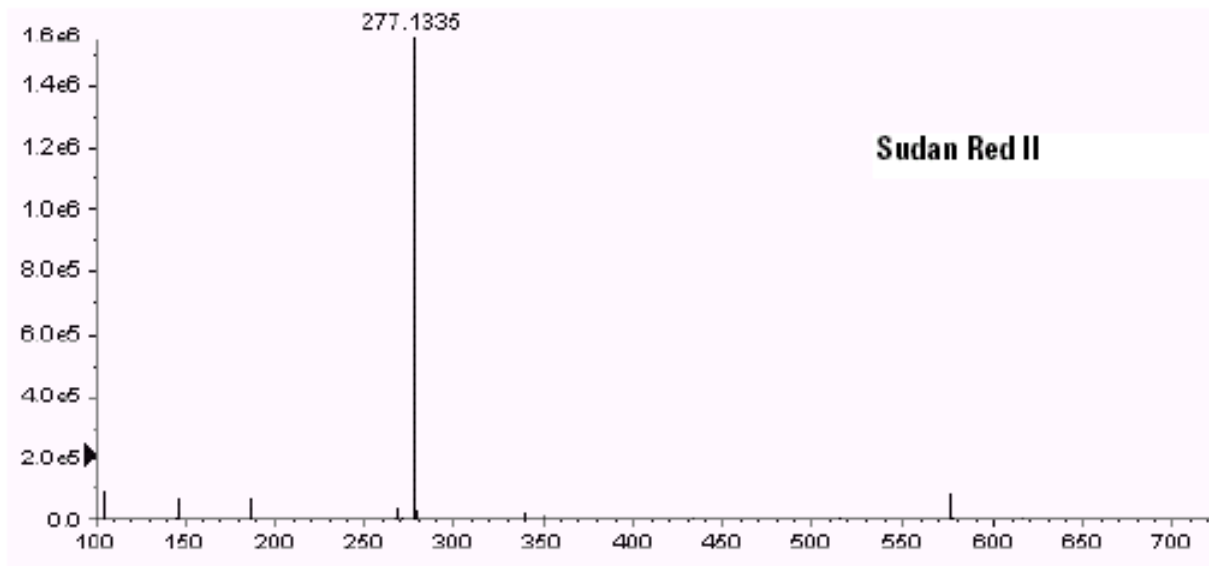
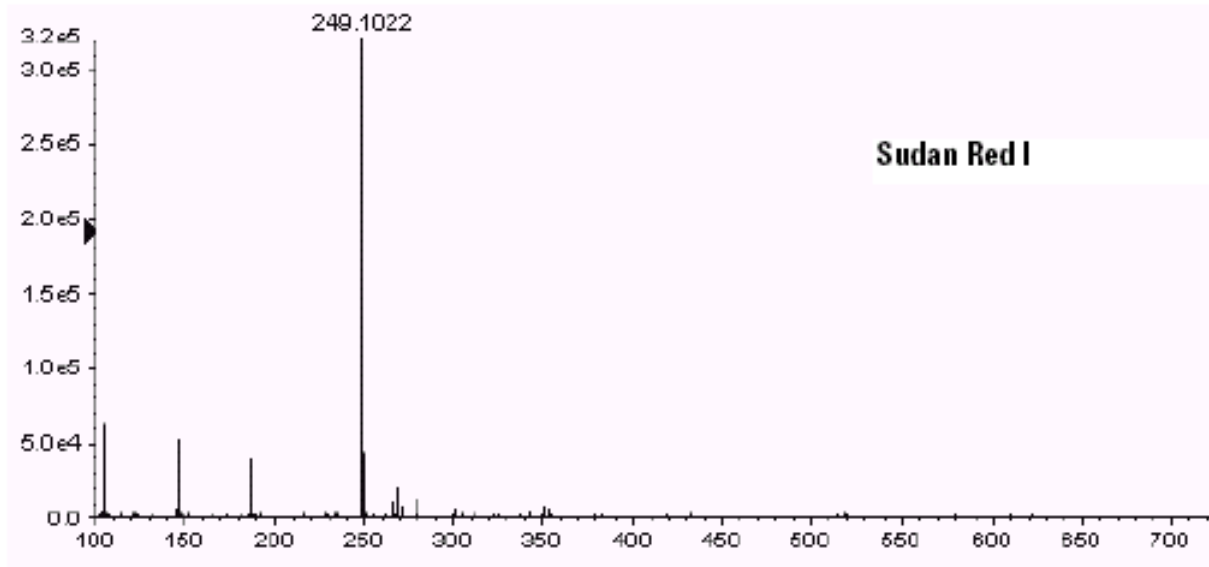
Gratzfeld-Huesgen et al., Application Note AN 15744, Agilent Technologies



Pozn.: EIC = Extracted Ion Chromatogram

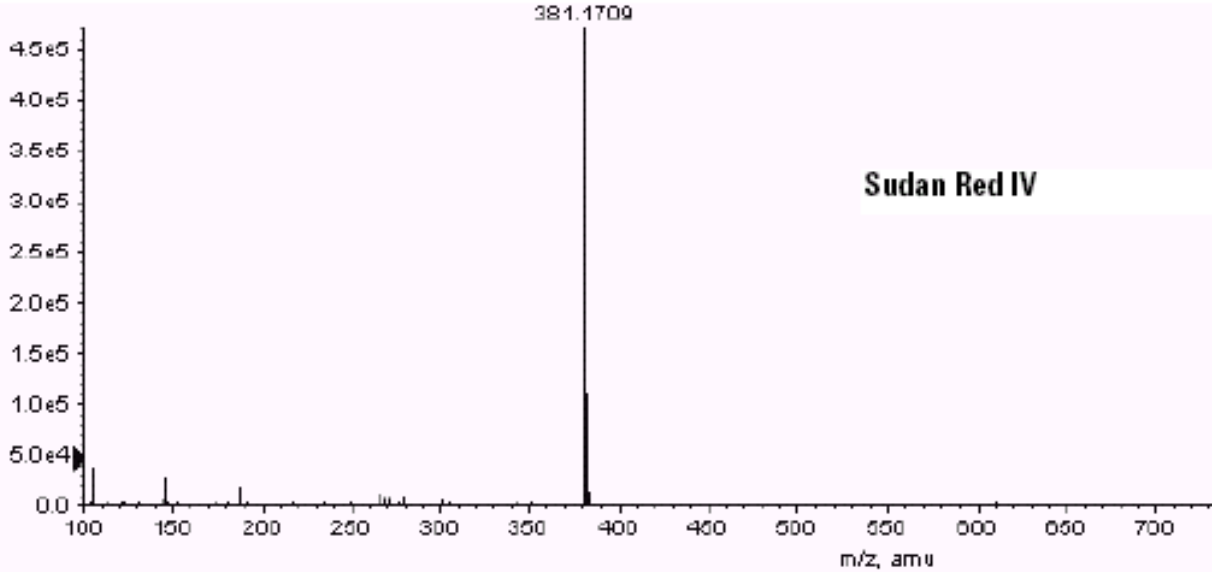
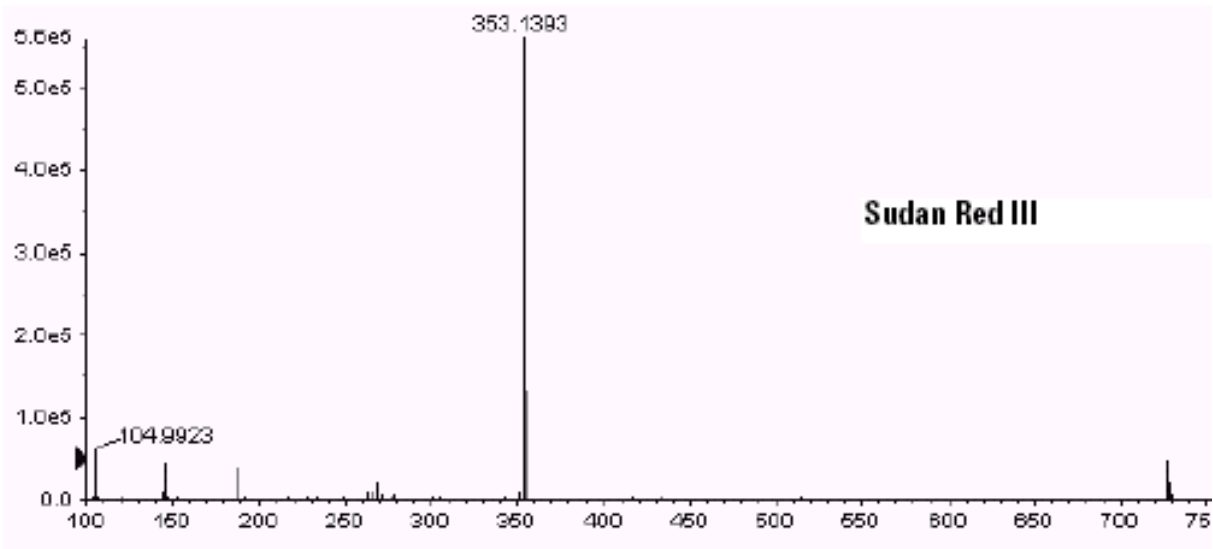
Stanovení Sudanu I-IV. v kari pomocí LC-TOF MS

Kolona: Zorbax XDB-C18 (50 x 2.1 mm), Mobilní fáze: A – voda + 5mM NH₄OAc, B - acetonitril, Gradient: 0-3 min 95% B, 3-5 min 98% B, Detektor: „time-of-flight“ MS, ionizační technika: **ESI**
Zumwalt et al., Application Note AN 57914, Agilent Technologies



Hmotnostní spektra sudanových barviv (LC-ESI-MS)

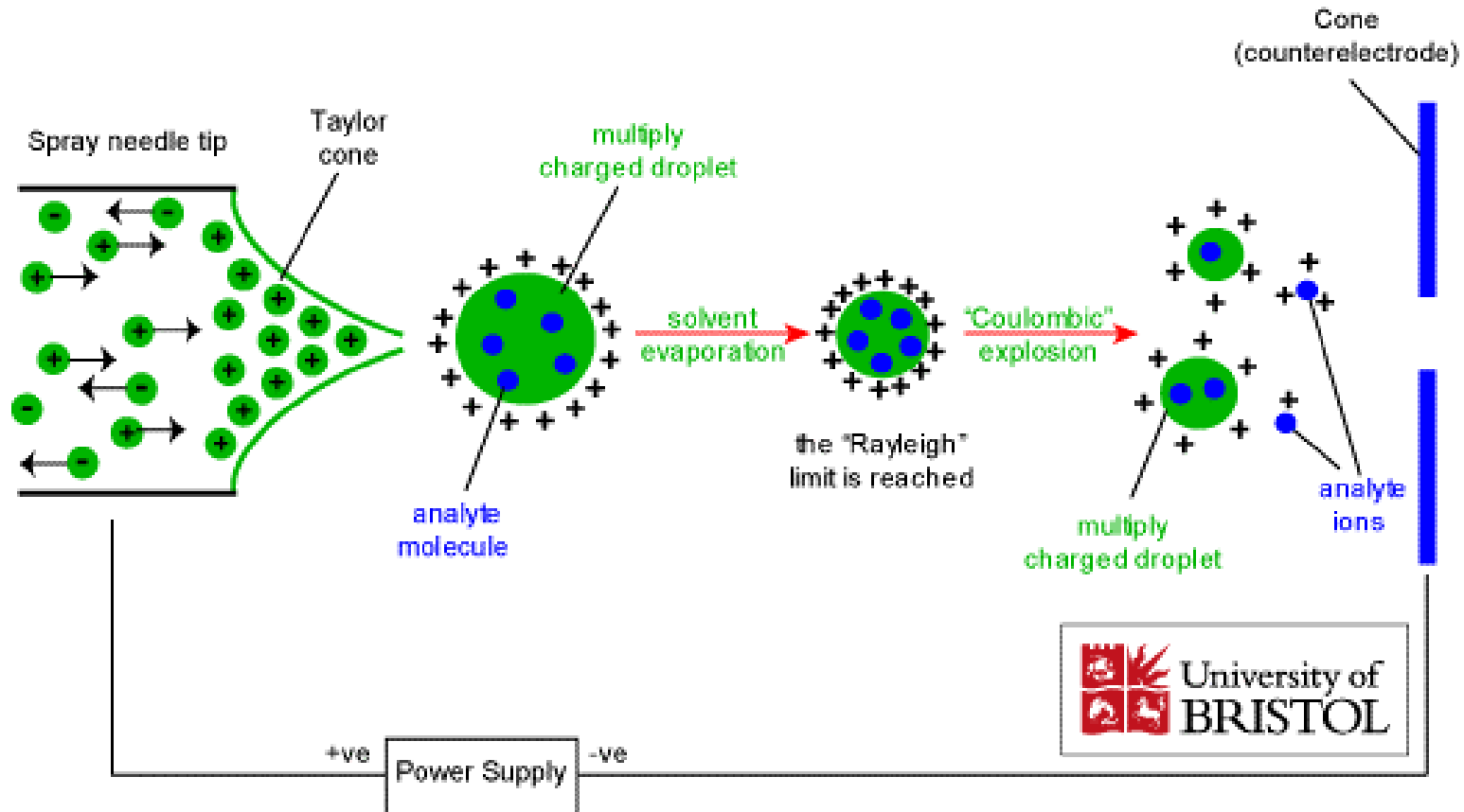
Zumwalt et al., Application Note AN 57914, Agilent Technologies



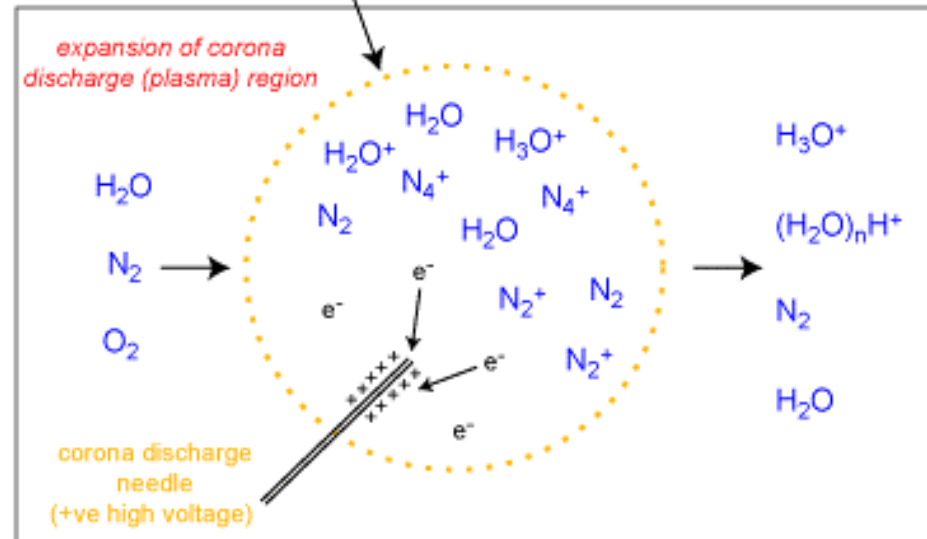
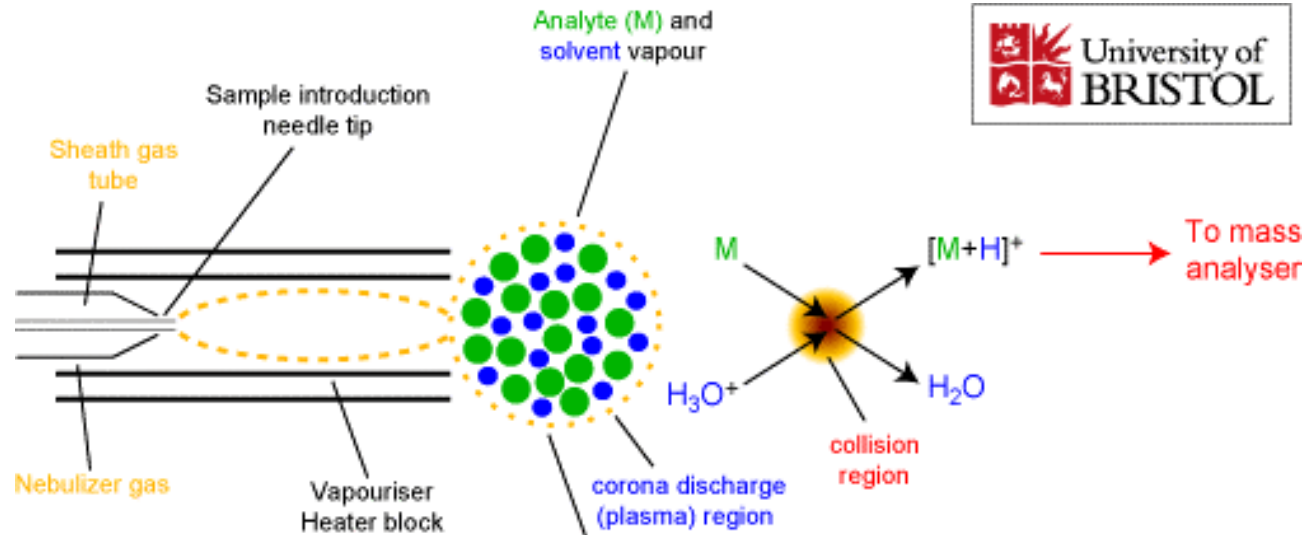
Hmotnostní spektra sudanových barviv (LC-ESI-MS)

Zumwalt et al., Application Note AN 57914, Agilent Technologies

Schema ESI



Schema APCI

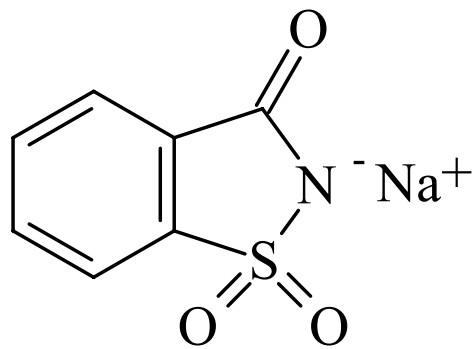


Náhradní sladidla

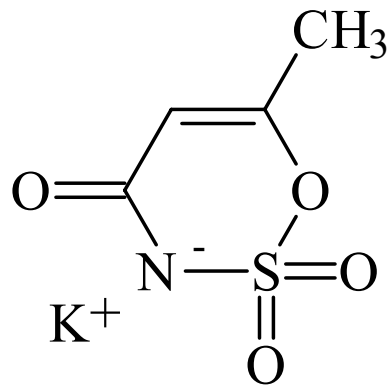
- izolace extrakcí diethyletherem
- kvalitativní analýza: chromatografie na papíře, na tenké vrstvě

Chromatografické metody stanovení všech látek

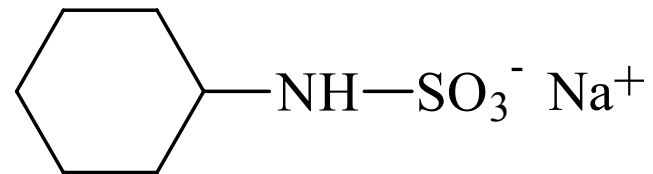
➤ Metoda GLC (sacharin, cyklamát po reakci s diazomethanem) a HPLC



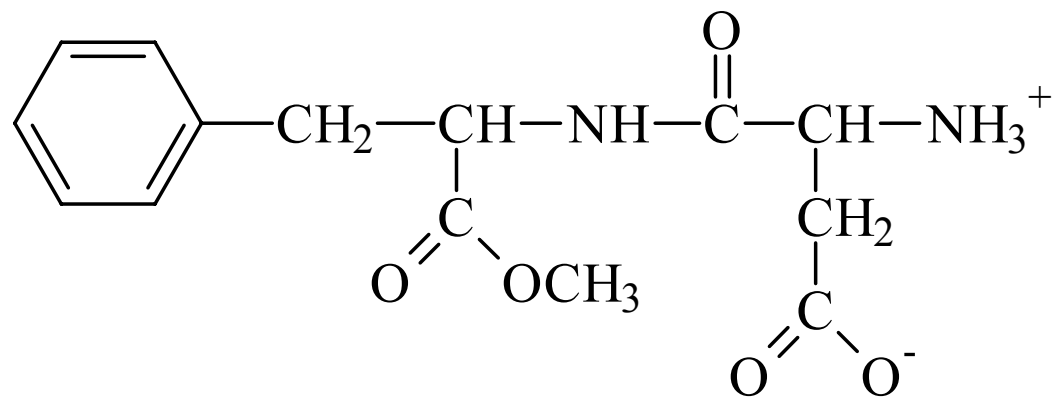
sacharin



acesulfam K



cyklamát

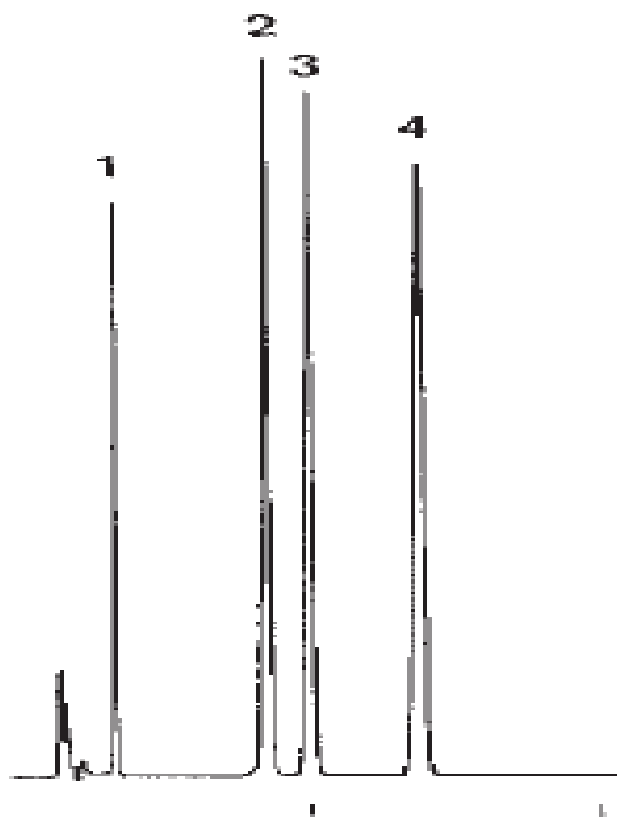


aspartam

Stanovení jednotlivých látek

Sacharin

- Vážková metoda
tavení s alkalickými uhličitany, vysrážení vzniklých síranů jako BaSO_4
- Metoda HPLC



1. sacharin
2. k. dehydrooctová
3. k. sorbová
4. k. benzoová

Stanovení sacharinu pomocí HPLC

Kolona: J'Sphere ODS-H80 (75 x 4.6 mm)

Mobilní fáze: tetrahydrofuran:voda:k.trifluoroctová (20:80:0.1,

v/v/v) Detektor: UV (230 nm)

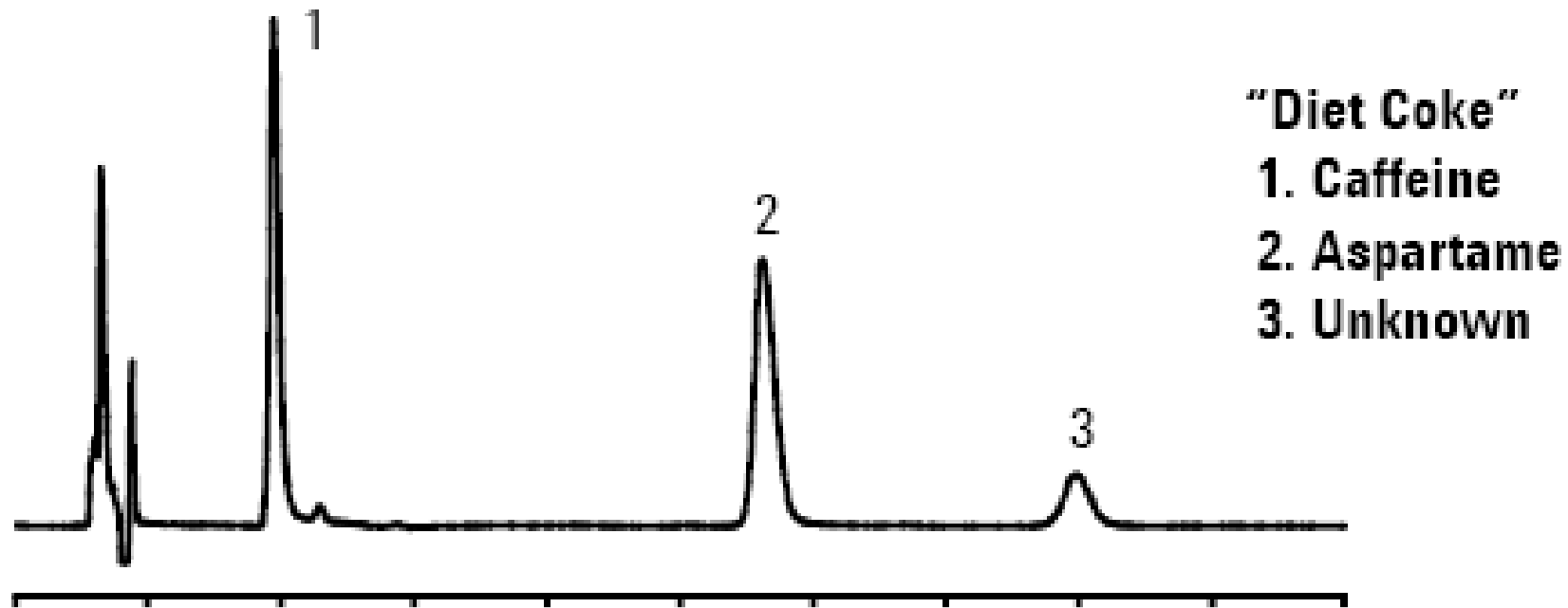
Application Note YMC 62, Waters Corp.

Acesulfam K

- Metoda HPLC (reverzní fáze, ČSN EN 12856)

Aspartam

- Metoda chromatografie na měničích iontů
- Metoda HPLC (reverzní fáze, ČSN EN 12856)



Stanovení aspartamu v nealkoholickém nápoji pomocí HPLC

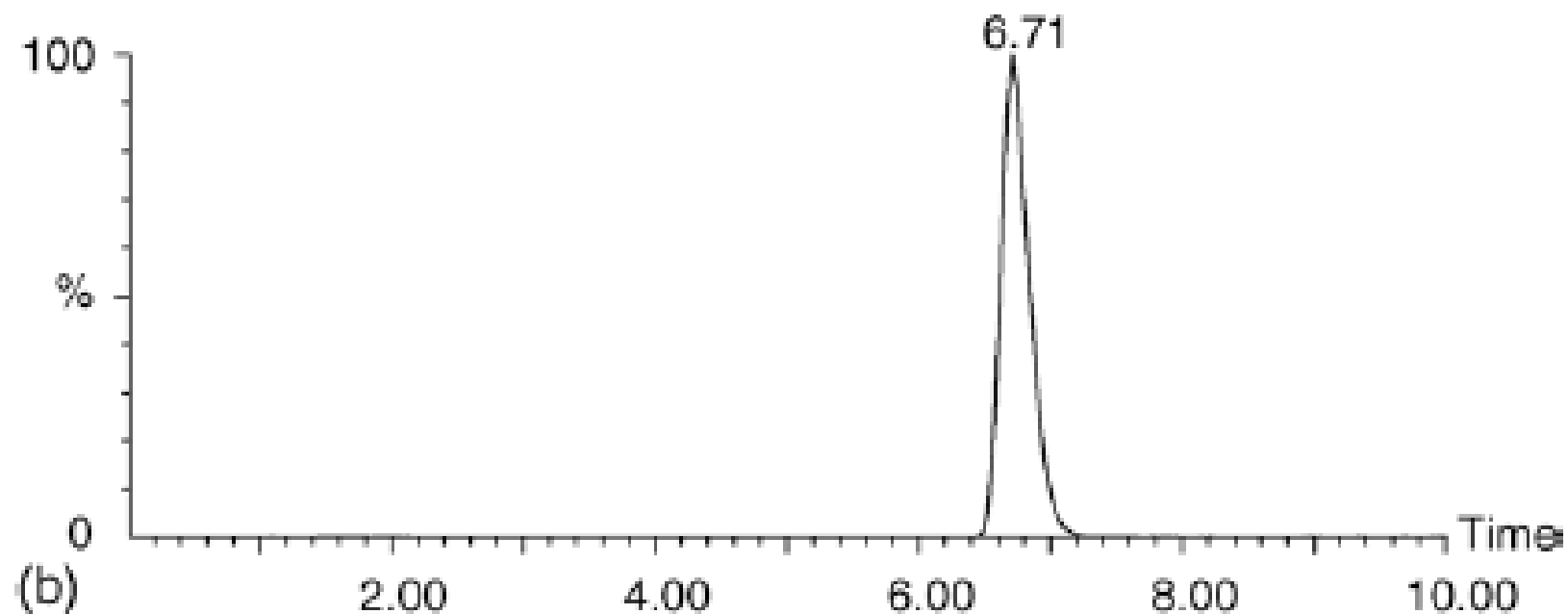
Kolona: Zorbax SB-C18 (75 x 4.6 mm)

Mobilní fáze: 0.1% trifluoroctová kyselina : acetonitril (85:15, v/v) Detektor: UV (210 nm)

Ricker et al., Application Note AN 36121, Agilent Technologies

Cyklamát

- Vážková metoda
rozklad kyselinou dusitou, dále stejný postup jako
v případě sacharinu
- Spektrofotometrická (fluorometrická) metoda
po TLC separaci izolace zóny, eluce ethanolem
- Metoda HPLC



Stanovení cyklamátu pomocí LC-MS

Kolona: Spherigel C8 (150 x 4 mm), Mobilní fáze: tri(hydroxymethyl)aminomethan (5mM, pH 4.5) Detektor: MS, ionizace: elektrosprej (ESI)

Huang et al., Anal. Chim. Acta, 555 (2006) 233-237

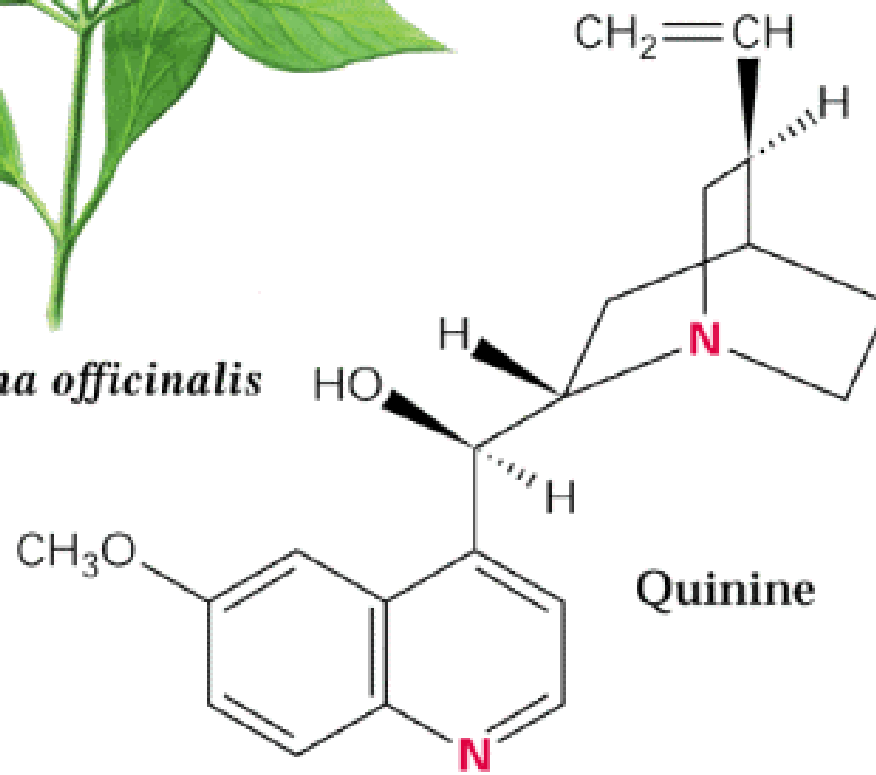
Hořké látky

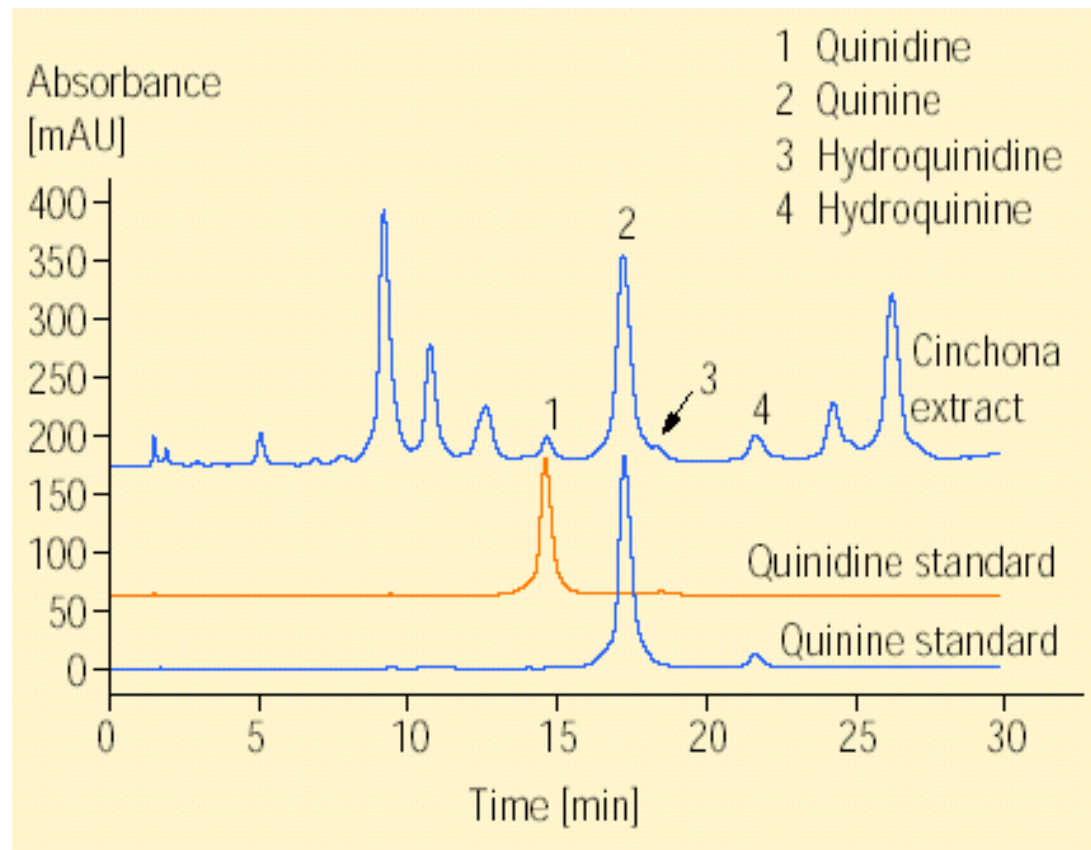
Chinin

- izolace extrakcí chloroformem, reextrakce zředěnou H_2SO_4
- Metoda spektrofotometrická
v ultrafialové oblasti spektra nebo fluorimetry
- Metoda HPLC



Cinchona officinalis





Stanovení chininu v chinové kůře pomocí HPLC

Kolona: Purospher RP-18 (125 x 4 mm), Mobilní fáze: A – 0.05 M KH_2PO_4 , B – acetonitril, Gradient: 4% B, 25 min 10% B, 45 min 30% B, Detektor: UV (210 nm)

Huber et al., Application Note AN 15223, Agilent Technologies

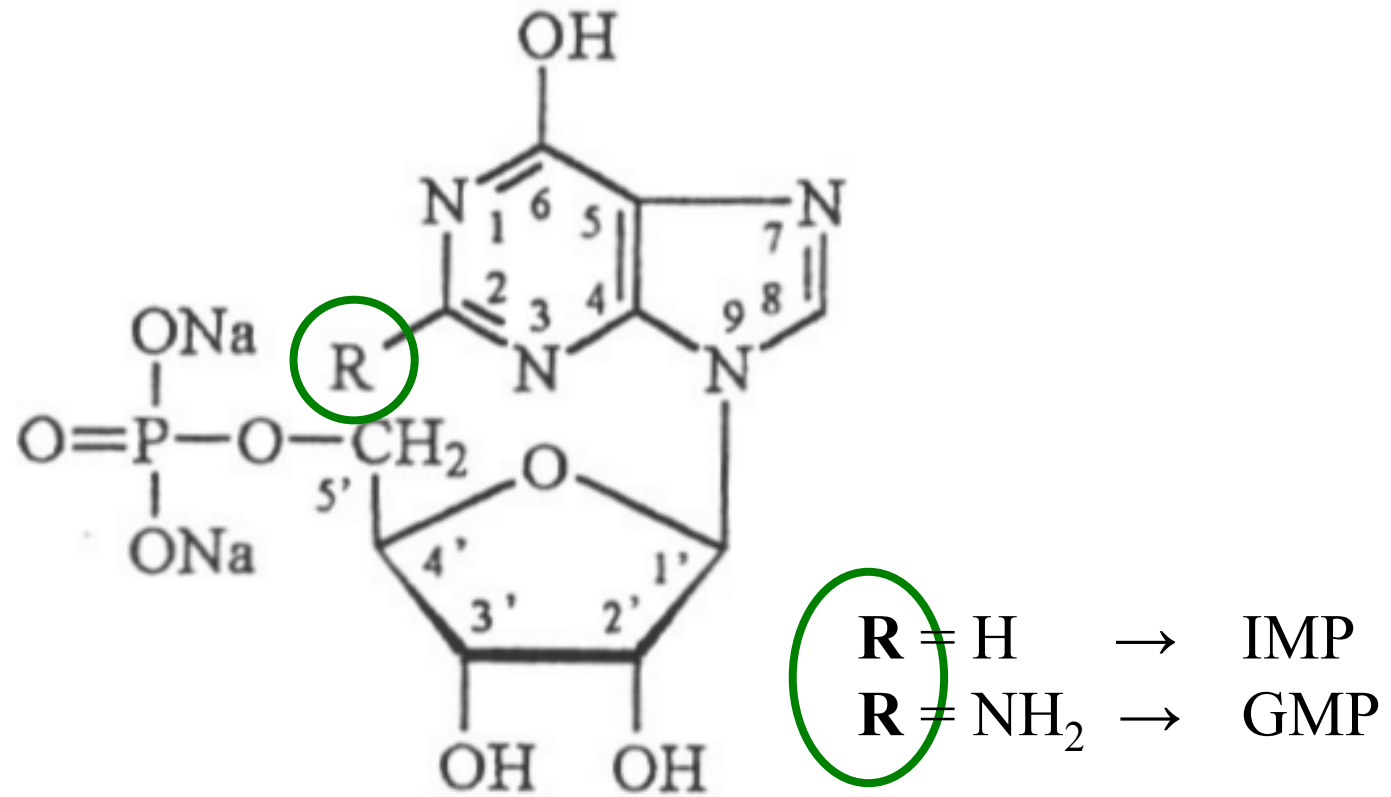
Potenciátory a intenzifikátory aroma

L-glutamová kyselina

Enzymové metody – viz stanovení aminokyselin

5'-ribonukleotidy (IMP, GMP)

→ **IMP (5'-inosinová kyselina),**
GMP (5'-guanylová kyselina)



Struktura 5'-ribonukleotidů

- izolace extrakcí zředěnou HClO_4

Metody stanovení celkového obsahu látek

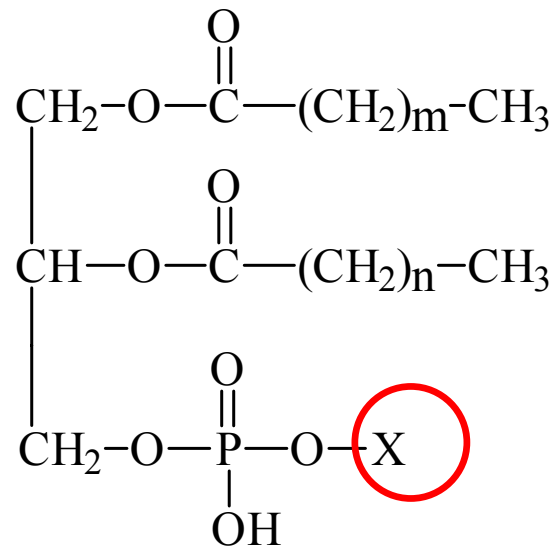
- Spektrofotometrická metoda
z obsahu fosforu

Stanovení jednotlivých látek

- Metoda chromatografie na měničích iontů

POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY - EMULGÁTORY

- ❖ lecitin
- ❖ estery glykolů
- ❖ estery glycerolu
- ❖ estery sorbitanů
- ❖ estery sacharosy



fosfolipidy – obecná struktura

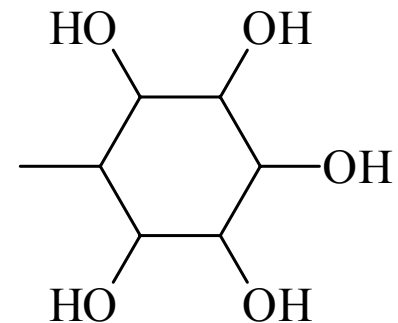
Hlavní složky sojového lecitinu:

X =

fosfatidylcholin —(CH₂)₂N⁺(CH₃)₃

fosfatidylserin —CH₂—CH—NH₃⁺
 |
 COO⁻

fosfatidylinositol



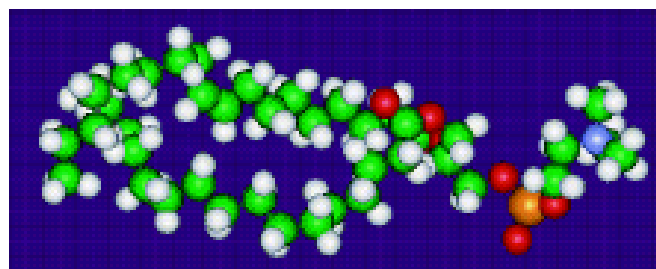
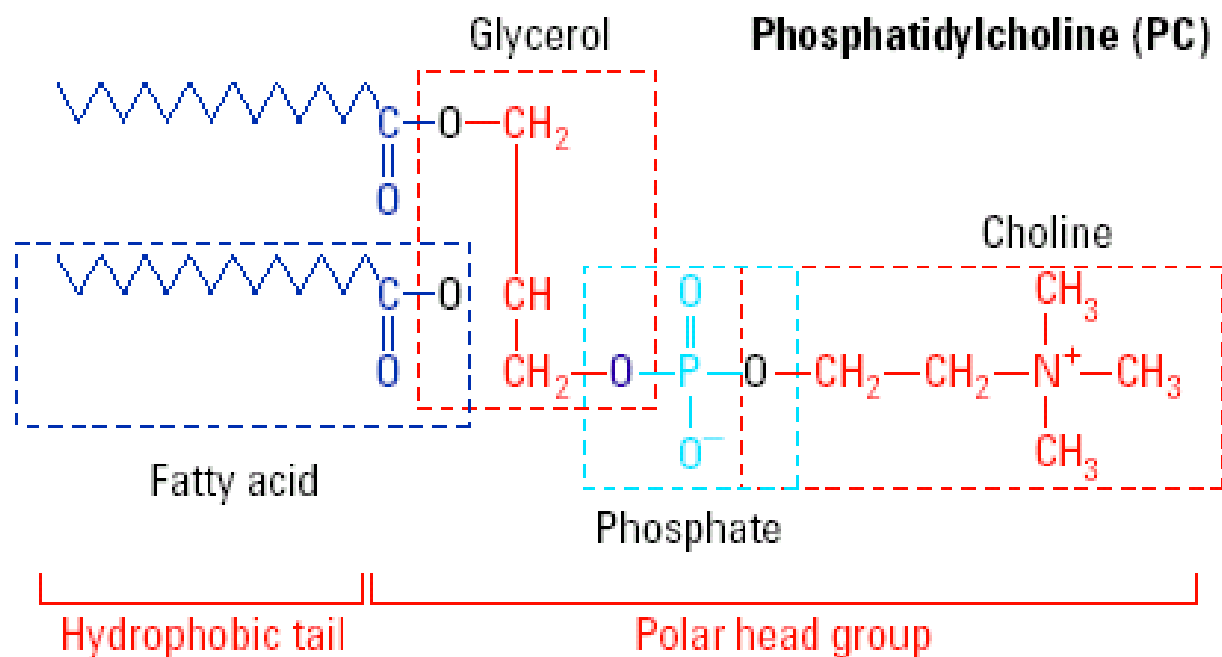


Figure 1. Structure of typical phospholipid.

METODY:

- Chromatografické
- Spektrofotometrické
- Titrační
- Elektrochemické