

# **Stanovení a charakterizace vybraných antimykotických přípravků pro ošetření potravin**

Bc. Lukáš Navrátil

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lukáš NAVRÁTIL**

Osobní číslo: **T10739**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení a charakterizace vybraných antimykotických přípravků pro ošetření potravin**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Přehled používaných aditiv
2. Obecná charakterizace konzervantů
3. Charakterizace vybraných druhů plísní a kvasinek
4. Metody stanovení konzervantů

### II. Praktická část

1. Metodický postup stanovení vybraných konzervantů
2. Analýza vybraných vzorků

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 2, OSSIS, Tábor 2002*
2. INGR, I., *Základy konzervace potravin, Brno 2007*
3. KOONTZ, J.L., MARCY, J.E., BARBEAU, W.E., DUNCAN, S.E., *Stability of Natamycin and Its Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003*
4. KAMENÍK, J., *Technologie trvanlivých fermentovaných salámů z pohledu prevence vad finálních produktů, Maso, 2007*
5. <http://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je06.htm>

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

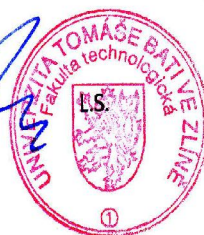
**6. ledna 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

**21. května 2012**

Ve Zlíně dne 15. února 2012

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

1) zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

- (1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.
- (2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.
- (3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

2) zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

- (3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

3) zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

- (1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.
- (2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.
- (3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení a charakterizaci antimykotických přípravků, které se používají k ošetření potravin. Teoretická část se zabývá popisem přídatných látek a charakterizací jednotlivých druhů antimykotických přípravků. Praktická část je zaměřena na stanovení natamycinu ve vybraných druzích trvanlivých salámů (Lovecký salám, Poličan, Paprikáš, Selský salám, Vysočina). Pro stanovení natamycinu byla použita metoda HPLC s UV/VIS detekcí.

**Klíčová slova:** antimykotické přípravky, natamycin, trvanlivý salám, HPLC, UV/VIS

## **ABSTRACT**

The thesis was focused on the determination and characterization of antimykotic products, which are used for the treatment of food. The theoretical part deals with the description of the additives and the characterisation of each species of antimykotic products. The practical part is focused on determination of natamycinu in selected types of durable salami (Lovecky salam, Polican, Paprikas, Selsky salam, Vysocina). For the determination of natamycinu has been used HPLC method with UV/VIS detection.

**Keywords:** antimycotic products, natamycin, durable salami, HPLC, UV/VIS

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Miroslavu Fišerovi CSc. a také Ing. Lence Fojtíkové za poskytnuté materiály, cenné připomínky, ochotu a trpělivost při odborném vedení.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a odevzdaná verze Diplomové práce a verze elektronicky nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....  
Podpis diplomanta

# OBSAH

<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
<b>1 PŘEHLED POUŽÍVANÝCH ADITIV.....</b>	<b>13</b>
1.1 E-ČÍSLO (KÓD).....	15
1.2 ROZDĚLENÍ ADITIV DO SKUPIN.....	16
1.3 ADITIVA ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU A Z GMO.....	17
1.3.1 Aditiva živočišného původu .....	17
1.3.2 Aditiva z GMO.....	18
1.4 OMEZENÍ POUŽITÍ ADITIV .....	18
<b>2 OBECNÁ CHARAKTERIZACE KONZERVANTŮ.....</b>	<b>20</b>
2.1 KONZERVANTY S ANTIMYKOTICKÝMI ÚČINKY.....	21
2.1.1 Natamycin.....	21
2.1.2 Kyselina octová.....	22
2.1.3 Soli kyseliny octové.....	23
2.1.3.1 Octan draselný.....	23
2.1.3.2 Octan sodný.....	24
2.1.3.3 Octan vápenatý.....	24
2.1.4 Kyselina sorbová.....	25
2.1.5 Soli kyseliny sorbové.....	26
2.1.5.1 Sorban sodný.....	26
2.1.5.2 Sorban draselný.....	26
2.1.5.3 Sorban vápenatý.....	27
2.1.6 Kyselina benzoová.....	27
2.1.7 Soli kyseliny benzoové.....	29
2.1.7.1 Benzoan sodný.....	29
2.1.7.2 Benzoan draselný.....	30
2.1.7.3 Benzoan vápenatý.....	30
2.1.8 Siřičitany.....	31
2.1.8.1 Oxid siřičitý.....	31
2.1.8.2 Siřičitan sodný.....	32
2.1.8.3 Siřičitan vápenatý.....	32
<b>3 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH DRUHŮ PLÍSNÍ A KVASINEK.....</b>	<b>33</b>
3.1 PLÍSNĚ.....	33
3.1.1 ROD: Aspergillus.....	34
3.1.2 ROD: Penicillium.....	34
3.2 KVASINKY.....	35
3.2.1 ROD: Candida.....	35
3.2.2 ROD: Saccharomyces.....	36
<b>4 METODY STANOVENÍ KONZERVANTŮ.....</b>	<b>37</b>
4.1 CHROMATOGRAFIE .....	37
4.1.1 Kapalinová chromatografie.....	38
4.1.1.1 Princip kapalinové chromatografie.....	42



4.1.1.2 Chromatogram.....	42
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>46</b>
<b>5 METODICKÝ POSTUP STANOVENÍ VYBRANÝCH KONZERVANTŮ.....</b>	<b>47</b>
5.1 CHEMIKÁLIE.....	47
5.2 LABORATORNÍ POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	47
5.2.1 Standartní laboratorní pomůcky a přístroje.....	47
5.2.2 Speciální laboratorní pomůcky a přístroje.....	47
5.3 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ TRVANLIVÝCH SALÁMŮ.....	48
5.3.1 Lovecký salám .....	48
5.3.2 Poličan.....	49
5.3.3 Paprikáš.....	50
5.3.4 Selský salám.....	51
5.3.5 Vysočina.....	52
5.4 EXTRAKCE NATAMYCINU Z VYBRANÝCH DRUHŮ TRVANLIVÝCH SALÁMŮ.....	53
5.5 KALIBRAČNÍ KŘIVKY.....	53
5.6 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ NATAMYCINU.....	53
<b>6 ANALÝZA VYBRANÝCH VZORKŮ.....</b>	<b>54</b>
6.1 SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO STANOVENÍ NATAMYCINU.....	54
6.2 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	55
6.3 VÝSLEDKY STANOVENÍ NATAMYCINU VE VZORKU LOVECKÉHO SALÁMU.....	55
6.4 VÝSLEDKY STANOVENÍ NATAMYCINU VE VZORKU POLIČANU.....	56
6.5 VÝSLEDKY STANOVENÍ NATAMYCINU VE VZORKU PAPRIKÁŠE.....	56
6.6 VÝSLEDKY STANOVENÍ NATAMYCINU VE VZORKU SELSKÉHO SALÁMU.....	56
6.7 VÝSLEDKY STANOVENÍ NATAMYCINU VE VZORKU VYSOČINY.....	57
6.8 VÝSLEDKY UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIE.....	57

## ÚVOD

Aditiva (potravinářské přídatné látky) jsou neustálým tématem společnosti, kdy jsou spojovány se škodlivými chemickými látkami v potravinách. I přes tyto pochybnosti se tyto látky staly pro lidstvo nedílnou součástí společnosti. Hlavním důvodem jsou požadavky spotřebitelů na široký výběr potravin, ale hlavně pak na jejich bezpečnost a nezávadnost. Z těchto důvodů se jeví potravinářské přídatné látky jako nepostradatelné.

K stanovení obsahu antimykotických je možné použít metodu kapalinové chromatografie (HPLC). Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejím základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze.

Cílem této práce bylo seznámit se s nejpoužívanějšími antimykotickými přípravky k ošetření potravin a stanovit obsah natamycinu v trvanlivých salámech.

# **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 PŘEHLED POUŽÍVANÝCH ADITIV

Přidatné potravinářské látky (aditiva) jsou chemické látky, které se přidávají do potravin kvůli vylepšení nebo zachování jejich trvanlivosti nebo vzhledu, konzistence, chutě, vůně, atd. Tyto látky se bez ohledu na výživovou hodnotu nepoužívají samostatně ani jako potravina, ani jako charakteristická potravní přísada. Přidávají se do potravin při výrobě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se stávají nebo mohou stát součástí potraviny [1;2]

Přidatné potravinářské látky (aditiva) hrají velkou roli v potravinářském průmyslu, bez těchto látek by dnešní potraviny, které jíme, vypadaly a chutnaly velmi odlišně. Potravinářská přidatná látka není určena ke spotřebě jako potravina, ale většinou není brána ani jako charakteristická složka potraviny. Tyto látky můžeme nalézt v mnoha potravinářských produktech (i ekologických), některé se vyskytují i přirozeně v potravinech, ale většina se vyrábí chemickou cestou. Přidatné látky (aditiva) se do potravin přidávají z důvodů udržení čerstvosti produktu a zlepšení barvy, textury a chuti. [1;2;3;4]

Přidatné potravinářské látky nejsou ničím novým, ale jsou používány několik století. Konzervace potravin je prastarou nutností – při nakládání masa byly užívány sůl a sanytr, kyselina octová při konzervaci zeleniny . [5]

Potravinářská aditiva se získávají z různých zdrojů. Podle původu se rozlišují:

## ***a) aditiva přírodního původu:***

- zahušťovadla ze semen (karubin), ovoce (pektin) a mořských řas (agar)
- barviva ze semen (bixin), ovoce (anthokyany) a zeleniny (karoteny)
- okyselovadla z ovoce (kyselina vinná)

## ***b) aditiva identická s přírodními (vyráběná synteticky nebo pomocí mikroorganismů):***

- antioxidanty (kyselina askorbová, tokoferoly)
- barviva (karoteny)
- okyselovadla (kyselina citrónová)

## ***c) aditiva získávaná modifikací přírodních látek:***

- emulgátory (z jedlých olejů a organických kyselin)
- zahušťovadla (modifikované škroby, modifikovaná celulóza)
- sladidla (sorbitol a maltitol)

**d) aditiva vyráběná synteticky:**

- antioxidanty (BHA, BHT)
- barviva (tartrazin, indigotin, chinolinová žlut')
- sladidla (sacharin)

Původ přídatné látky nelze z etikety výrobku, do kterého byla příslušná přídatná látka přidána, zjistit.[6]

Negativní názor na aditivní látky byl vyvolán změnou v označování složení potravinářských výrobků, které bylo zavedeno v osmdesátých letech. Každá aditivní látka, kterou hotová potravina obsahuje, musí být uvedena na etiketě obalu. Do té doby byly všechny přísady uváděny v obecných skupinách. Které označovaly jejich funkci, jako např. konzervační činidla, antioxidanty nebo barviva. Nová pravidla o etiketování zavedla obsáhlé seznamy aditivních látek, s jejich chemickými názvy a nový číselný systém jejich označování s čísly E, který měl spotřebitelům ulehčit orientaci v použití aditivních látek v jednotlivých výrobcích. Označení „E“ znamená, že použití těchto bezpečných látek v potravinách bylo schváleno v rámci EU. [7]

Obecně platí, že potraviny uváděné na trh podle platných předpisů jsou bezpečné, tj. zdravotně nezávadné. Přesto se může stát, že některá potravinářská aditiva mohou u zvláště citlivých jedinců vyvolat některé nepříznivé reakce. V naprosté většině případů nejsou tyto reakce takového charakteru, aby ohrožovaly život. Nežádoucí reakce na aditiva jsou většinou neimunologické povahy, a proto se jedná o *intoleranci* (tj. Nesnášenlivost) příslušné sloučeniny, ne o skutečnou alergii. Někdy se tyto reakce na aditiva označují jako *pseudoalergie*. [6]

Mezi hlavní reakce vyvolané těmito potravinami jsou poruchy trávení (projevují se průjmami a křečemi), dýchací potíže (rýma až astma), nervové potíže (nespavost), kožní reakce (ekzémy, svědivost, dermatitidy, otoky). Z přídatných látek, které mohou tyto reakce vyvolat patří např. Glutamát sodný (E 621), Aspartam (E 951) nebo některé siřičitany.[8;9]

V současné době je používání aditivních látek v potravinách redukováno a jejich bezpečnost je pravidelně kontrolována. [9]

V rámci EU byl zaveden systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (Rapid Alert System for Food and Feed, **RASFF**), který slouží pro ohlašování rizikových potravin a krmiv za účelem zamezení jejich uvádění do oběhu nebo za účelem jejich stažení ze

společného evropského trhu. Systém RASFF je zřízen ve formě sítě, která zahrnuje Evropskou komisi, členské státy Evropské unie a Evropský úřad pro bezpečnost potravin. Hlášení do tohoto systému za Českou republiku zajišťuje Státní zemědělská a potravinářská inspekce. [6]

Evropská komise se rovněž zabývá kontrolou spotřeby potravinářských aditiv. Na základě tzv. „*spotřebního koše*“ se vyhodnocuje, zda příjem určitého aditiva nepřekračuje povolené limity (hodnoty **ADI** - akceptovatelný denní příjem = množství potravinářského aditiva vyjádřeného v mg na kg tělesné hmotnosti, které lze konzumovat denně během života bez zřetelného zdravotního rizika, **TDI** – tolerovatelný denní příjem). Pokud se zjistí, že ano, Evropská komise iniciuje změnu legislativy tak, aby s limit denního příjmu nepřekračoval. Spotřebu aditiv v ČR sleduje Státní zdravotní ústav (SZÚ). Pozornost se zaměřuje především na sladidla, konzervační prostředky a barviva. Zjistilo se, že určité obavy může představovat příjem oxidu siřičitého, zvláště u dětí.[6]

Příklady hodnot ADI: [10]

aspartam (E 951): 40 mg/kg tělesné hmotnosti (v Evropě)

brilantní modř FCF (E 133): 10 mg/kg

endosulfan (insekticid): 0,006 mg / kg

## 1.1 E-číslo (kód)

E čísla (kódy, E = Evropa) jsou do potravinářství zavedené kódy pro potravinářské přídatné látky, které byly hodnoceny v rámci celé Evropské unie. E číslo pomáhá v rychlé orientaci mezi aditivy, jelikož některé z látek jsou si velmi podobné a současně lze zjistit zda dané aditivum prošlo hodnocením bezpečnosti. Tyto čísla se běžně vyskytují na etiketách potravin (je nutné uvádět aditiva v sestupném pořadí podle kategorie a použitého množství). Hlavním orgánem pro stanovení nezávadnosti, kontrolu a značení konzervantů na evropské úrovni je Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), dále pak Evropský parlament a Evropská komise. Na mezinárodní úrovni je to pak Společný výbor expertů pro potravinářská aditiva (JECFA), který je součástí systému FAO/WHO. Systém číslování vyplývá z mezinárodního číslovacího systému (INS), jak je stanoveno v Codex Alimentarius. S označováním potravin E číslem se můžeme setkat i v jiných částech Země, například u Rady pro spolupráci arabských států, na Novém Zélandě nebo v Austrálii. V

menší míře se pak označení E číslem nachází na potravinách dovážených do EU z USA a Kanady. [10]

## 1.2 Rozdělení aditiv do skupin

### ➤ **Antioxidanty**

Antioxidanty zabraňují oxidaci určitých částí potravin. Můžeme je rozdělit do dvou skupin a to na antioxidanty zabraňující změně barvy ovoce a masa a na antioxidanty působící proti oxidaci tuků a olejů.

### ➤ **Regulátory kyselosti**

Regulátory kyselosti slouží k úpravě kyselosti potravin (udržují nebo mění kyselost potravin).

### ➤ **Konzervanty (E 200 – E 297)**

Látky zabraňující činnosti mikroorganismů v potravinách.

### ➤ **Barviva (E 100 – E 182)**

Barviva se používají ke zlepšení vzhledu potraviny.

V potravinářství se používají tři druhy barviv:

- a) barviva přírodního původu
- b) přírodně identická barviva
- c) barviva syntetická

### ➤ **Emulgátory**

Emulgátory jsou látky, které umožňují tvorbu stejnorodé směsi dvou nebo více nemísitelných kapalných fází nebo které tuto směs udržují (např. Lecithin). [11;12]

### ➤ **Kypřící látky**

Látky nebo směsi látek, které vytváří plyny.

### ➤ **Želírující látky**

Vytváří gel a udělují tím potravině její strukturu.

### ➤ **Protispékavé látky**

Protispékavé látky snižují schopnost určitých částic potraviny ulpívat vzájemně na sobě.

➤ **Zahušť'ovadla**

Zahušť'ovadla zvyšují viskozitu potravin.

➤ **Siřičitany (E 220 – E 228)**

Jedná se o látky působící proti bakteriím, kvasinkám a plísním.

➤ **Sekvestranty**

Látky, které vytvářejí chemické komplexy s ionty kovů.

➤ **Propelanty**

Jedná se o plyny jiné než vzduch, které vytlačují potravinu z obalu.

- Další látky (**Stabilizátory, Látky zvýrazňující chuť a vůni, Pěnotvorné látky, Plnidla, Želirující látky, Tavicí soli, Náhradní sladidla, Modifikované škroby, Odpěnovače, Nosiče a rozpouštědla, Leštící látky, Zvlhčující látky, Látky zlepšující mouku, Balící plyny**) [11;12]

## **1.3 Aditiva živočišného původu a z GMO**

### **1.3.1 Aditiva živočišného původu**

Některé látky lze získat přímo ze zvířat nebo z jejich produktů. Mezi aditiva živočišného původu můžeme zařadit: L – cystein (E 921), Šelak (E 904), Lysin hydrochlorid (E 642), Glycin (E 640), Kyselinu inosinovou (E 630) a její soli (E 631, E 632, E 633), Rybonukleotidy (vápenatý E 634, disodný E 635), Stearin (E 570) a mnoho dalších (E 1100, E 1105, E 120, E 304, E 422, E 430, E 431, E 432, E 433, E 434, E 435, E 436, E 470, E 471, E 472, E 473, E 474, E 475, E 476, E 477, E 479b, E 481, E 488, E 491, E 492, E 493, E 494, E 495). [13]

Některé z těchto látek jsou v ČR zakázané.

### **1.3.2 Aditiva z GMO**

Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou organismy u kterých došlo k úmyslné změně genetického materiálu. Takto vyrobená aditiva mohou tak být mnohem odolnější vůči vnějším vlivům prostředí.

V dnešní době jsou aditiva z GMO předmětem mnoha diskuzí, jelikož nebylo s určitostí prokázáno, že jsou z hlediska dlouhodobého používání zdraví škodlivá.



Mezi aditiva z GMO můžeme zařadit: Kyselinu glutamovou a její soli (E 620 – E 625), Ryboflavin (E 101), Lecitin (E 322), Monoglyceridy a diglyceridy mastných kyselin (E 471), Ester mastných kyselin (E 472a), Estery sacharózy s mastnými kyselinami (E 473), Estery polyglycerolu s mastnými kyselinami (E 475) a další (E 476, E 477, E 491, E 150a, E 150b, E 150c, E 150d, E 153, E160d, E 160c, E 306 – E 309, E 415). [13]

Některé z těchto látek jsou v ČR zakázané.

#### **1.4 Omezení použití aditiv**

Použití některých přídatných látek je do pokrmů zakázáno používat. [13]

##### **Do potravin pro výživu dětí a kojenců je z aditiv zakázáno používat:**

- konzervanty
- sladidla
- barviva (ani přírodní)

##### **Do potravin, u kterých je používání přídatných látek zákonem zakázáno patří:**

- cukr
- med
- mléko (plnotučné, polotučné, odtučněné, pasterované, sterilované), máslo, neochucené podmásli, neochucené kysané mléčné výrobky s živou kulturou, smetany
- káva (kromě instantní kávy a extraktu)
- nearomatizovaný čaj
- neemulgované tuky a oleje
- přírodní minerální voda a balená pramenitá voda
- sušené těstoviny kromě bezlepkových těstovin
- nezpracované potraviny (ovoce, zelenina, maso, drůbež, ryby)

##### **Aditiva lze používat při výrobě potravin v případech, kdy:**

- při stanovených množstvích nepředstavují riziko pro spotřebitele
- je zachována výživová hodnota potraviny

- prodlužují trvanlivost potravin a zlepšují jejich organoleptické vlastnosti
- jsou prospěšné při výrobě, zpracování, přípravě, balení, dopravě nebo skladování za předpokladu, že nemaskují použití závadných surovin nebo nehygienických postupů při výrobě.
- je prokázána jejich technologická potřeba

## 2 OBECNÁ CHARAKTERIZACE KONZERVANTŮ

Konzervace je obvykle definována jako metoda pro zachování současného stavu potravin, nebo jako zabránění jejího poškození vlivy chemickými (oxidace), fyzikálními (teplota, světlo) nebo biologickými (mikroorganismy). Primárním důvodem pro užívání konzervačních prostředků je eliminace vlivu biologických faktorů a zvýšení bezpečnosti potravin. [3]

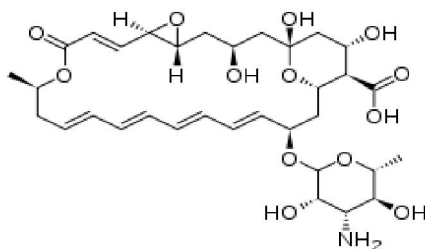
V důsledku působení mikroorganismů dochází při kontaktu s potravinou ke změnám barvy, vůně, chuti, vzhledu, tvaru a nutričních hodnot potravin. Některé mikroorganismy jsou schopny vytvářet nebezpečné toxiny (např. *Clostridium botulinum* – botulotoxin). K nejstarším a nejnámějším konzervantům patří mořská sůl, cukr a ocet. Mezi synteticky vyrobené konzervanty pak můžeme zařadit například oxid siřičitý, kyselinu benzoovou, kyselinu sorbovou, parabeny, siřičitany, dusitany a dusičnany. Použití konzervantů je velmi závislé na výrobních postupech, pH faktoru potravin, vodní aktivitě a dále na druhu mikroorganismů. [4]

Mezi nejčastěji používané konzervanty při výrobě sýrů a masných výrobků se používá kyselina sorbová (E 200) a její soli, které působí hlavně proti plísním a kvasinkám. Pro konzervaci masa a masných výrobků jsou využívány dusitany (E 249, E 250), které jsou velmi účinné proti působení *Clostridium botulinum*, dále pak natamycin (E 235), dusičnan sodný (E 251). Oxid siřičitý (E 220) se používá při konzervování hub, brambor, sušeného ovoce a zeleniny, vín, piva, ovocných šťáv. [13]

Potraviny pro kojence a dětskou výživu konzervační látky neobsahují. [4]

## 2.1 Konzervanty s antimykotickými účinky

### 2.1.1 Natamycin



Obr. 1: Natamycin

Natamycin (pimaricin) je polyenové makrolidové antibiotikum produkované aerobní fermentací *Streptomyces natalensis* a jeho příbuzných druhů. Kvašení probíhá několik dní a antibiotikum se izoluje extrakcí z podhoubí. Jako přídatná látka je označován kódem E 235. Natamycin se používá jako potravinářská přídatná látka k regulaci růstu kvasinek a plísní na povrchu sýrů (tvrdé, polotvré, poloměkké) a dalších výrobků, jako je maso a uzeniny (např. k ošetření povrchu trvanlivých salámů a trvanlivých masných výrobků uzených studeným kouřem). Účinku natamycinu proti kvasinkám a plísním, se využívá hlavně u potravin, které prochází obdobím zrání po zpracování. Nemá vliv na vzhled, chuť nebo barvu produktu. Jeho nízká rozpustnost ve vodě a většině organických rozpouštědel, je vhodná pro povrchovou úpravu potravin (nesmí se dostat do hloubky větší než půl centimetru). V některých zemích je natamycin také využíván u jiných výrobků, jako jsou jogurty, vína a džusy. Natamycin se používá v malé míře i ve veterinární medicíně k léčbě mykotické infekce (např. pásový opar u koní a skotu). V dřívějších dobách se používal k léčbě infekčních kožních onemocnění u člověka. V nynější době se používá ve zdravotnictví pouze k léčbě plísňových infekcí rohovky. [14; 15; 16; 17; 20]

Natamycin je velmi účinný i v poměrně malém množství a působí proti všem známým kvasinkám a plísním, které se mohou vyskytovat na potravinářských výrobcích. Je účinný pouze proti kvasinkám a plísním, proti bakteriím nepůsobí. Důvodem je vazba natamycinu na ergosterol, který se nachází v buněčné membráně kvasinek a plísní. Natamycin tak způsobuje zvýšenou propustnost buněčné membrány, což vede k usmrcení buňky. Bakterie, které neobsahují ergosterol tedy nejsou nijak ovlivněny a díky tomu nezasahuje do přirozených zracích procesů. V závislosti na aplikaci (kapalné spreje, dipy nebo ve formě prášku) se potřebné množství natamycinu liší. U dlouho zrajících sýrů je koncentrace vyšší

než u jiných potravin a závisí na mnoha faktorech. Na druhé straně množství použitého natamycinu nijak neovlivňuje střevní mikroflóru a nepředstavují vůbec žádnou hrozbu pro zdraví člověka (bezpečný i pro děti). Nemá žádné mutagenní vlastnosti. V ČR se používá pro ošetření povrchu potravin v množství 1 mg/dm<sup>2</sup>. [15; 17; 18; 19; 21]

V případě Natamycinu nebyl nikdy pozorován rozvoje rezistence vůči tomuto přípravku ani po několika letech jeho používání. V ČR je využití natamycinu povoleno pouze k ošetření povrchu sýrů a trvanlivých masných výrobků. [16]

ADI natamyciunu: 0 – 0.3 mg/kg [7]

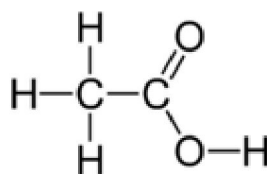
**Mezi potraviny, které obsahují natamycin patří:** [13]

- Leerdammer light (*Kaufland ČR v.o.s.*)
- Leerdammer original (*Bel Sýry Česko a.s.*)

**Do přípravků, které jako aktivní látku obsahují natamycin patří:** [13]

- Delvocid (prášek, který se používá povrchovému ošetření sýrů, aplikuje se nástřikem nebo ponořením sýru do připravené suspenze)
- Delvocoat L (speciální nátěr na sýry)

### 2.1.2 Kyselina octová



Obr. 2: Kyselina octová

Kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH), (lat. *acidum aceticum*) je přírodní konzervant a regulátor kyselosti, který je označován v potravinářství kódem E 260. Běžně se vyskytuje v rostlinách, a to jak ve formě volné kyseliny, tak ve formě solí (např. octan sodný, octan draselný). Ve větším množství je obsažena v kvasícím ovoci. Z chemického hlediska je kyselina octová bezbarvá kapalina ostrého zápachu, která je schopná se mísit s vodou i ethanolem. Je jednou z nejvýznamnější průmyslových organických surovin. Pro potravinářské účely se vyrábí z lihu, ovocných vín či moštů. Vodný roztok kyseliny octové o koncentraci 5 - 18 % se nazývá OCET. Ocet se používá jako okyselující činidlo, které působí proti růstu bakterií, kvasinek a upravuje pH. V potravinářství se využívá 5 % roztok

kyseliny octové, a to při výrobě salátových zálivek, majonéz, nakládané zeleniny, kečupů, omáček (majonézy) a sýrů. V malých dávkách a v malé koncentraci je kyselina octová neškodná. Při požití velkého množství může způsobit poškození sliznic, tvorbu vředů. V ČR používání kyseliny octové povoleno jen v nezbytném množství. [22;23]

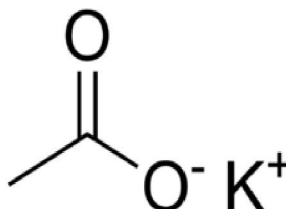
ADI kyseliny octové: není stanovena [7]

**Mezi potraviny, které tento konzervant obsahují patří:** [13]

- Light majonéza (*Unilever ČR s.r.o.*)
- Majonéza Brněnka (*Velkopavlovické drůbežářské závody a.s.*)
- Zahradnický salát (*Tesco Stores ČR a.s.*)
- Utopenci (*Kostelecké uzeniny a.s.*)

### 2.1.3 Soli kyseliny octové

#### 2.1.3.1 Octan draselný



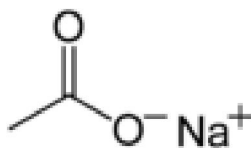
Obr. 3: Octan draselný

Octan draselný ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) je draselnou solí kyseliny octové, má i podobné vlastnosti a používá se jako její náhražka. V potravinářství je označován kódem E 261. Octan draselný se připravuje reakcí zásady, která obsahuje ve své struktuře draslík (např. KOH) a kyseliny octové. Jedná se o přírodní konzervant a regulátor kyselosti, používá se při výrobě salátových zálivek, majonéz a konzervaci nakládané zelenin. Octan draselný není zdraví nijak škodlivý, větší pozor by si měli dát jen lidé s onemocněním ledvin. V ČR je jeho používání povoleno. [13;22]

**Mezi potraviny obsahující octan draselný patří:**[13]

- Halibut

### 2.1.3.2 Octan sodný



Obr. 4: Octan sodný

Bezvodný octan sodný ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), někdy také nazývaný jako diacetát sodný (SDA), v potravinářství označovaný kódem E 262, je sodnou solí kyseliny octové. Připravuje se například reakcí kyseliny octové s hydroxidem sodným nebo působením kyseliny octové a solí slabších kyselin. Má podobné účinky jako kyselina octová a v potravinářství se používá jako regulátor kyselosti a ke konzervaci potravin, kde zabraňuje růstu a rozvoji plísní a bakterií. Jeho vlastností se využívá při výrobě marmelád, olejů, polévek, omáček, cukrovinek, pekařských a masných výrobků. Je zdravotně nezávadný. V ČR je jeho používání povoleno. [13;22]

**Mezi potraviny, které obsahují tento konzervant patří:** [13]

- Dušená šunka krájená (*Masokombinát Plzeň s.r.o.*)
- Matěj pikantní paštika (*Hamé s.r.o.*)
- Vídeňské párky se sýrem

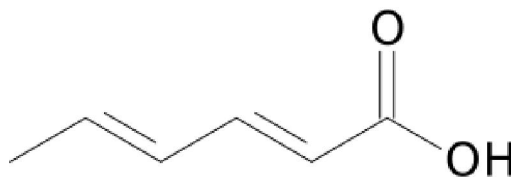
### 2.1.3.3 Octan vápenatý

Octan vápenatý ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ) je vápenatá sůl kyseliny octové a má i podobné vlastnosti. V potravinářství je označován kódem E 263. Octan vápenatý se v potravinářství využívá jako konzervant, kdy působí proti kvasinkám a bakteriím a také jako stabilizátor a regulátor kyselosti. Používá se při výrobě pekařských výrobků, pudinků, sirupů, sladkých omáček a náplní. U octanu vápenatého nebyly zaznamenány žádné negativní účinky na zdraví a jde tedy o bezpečné aditivum. V ČR je jeho používání povoleno. [13;22]

**Mezi potraviny obsahující octan vápenatý patří:** [13]

- Překládaný koláč s náplní makovou a švestkami (*Penam a.s.*)

#### 2.1.4 Kyselina sorbová



Obr. 5: Kyselina sorbová

Kyselina sorbová ( $C_6H_8O_2$ ) v potravinářství označována kódem E 200 se v přírodě běžně vyskytuje jako součást různých rostlin, ale pro použití v potravinářských provozech se musí vyrábět synteticky. Ve vodě je hůře rozpustná a proto se spíše jako konzervanty používají její soli, tzv. sorbany (sorban sodný E 201, sorban draselný E 202, sorban vápenatý E 203). Jedná se o poměrně účinnou látku vhodnou pro zabránění růstu hlavně řady plísní (např. *Aspergillus flavus*) i některých kvasinek a bakterií. V potravinářství se používá při konzervaci nápojů, kečupů, majonéz, margarínů, sýrů a dalších mléčných výrobků, pekařských polotovarů a cukrovinek, masných výrobků, salátových zálivek, dresingů, nakládané zeleniny a dalších potravin. [22; 24; 25]

Aktivní formou kyseliny sorbové je vlastní nedisociovaná kyselina ( $pK = 4,76$  při  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ), která je takto 10-600krát účinnější než volný anion. Její konzervační účinek tedy velmi záleží na pH potraviny (velmi účinná při pH 4-5, nízká účinnost při pH 7) . Maximální povolená dávka se pohybuje v rozmezí 200-1000 mg/kg. [22; 24]

Účinek kyseliny sorbové spočívá ve zpomalování enzymatických pochodů v buňce mikroorganismu. Jedině jako nedisociovaná forma proniká do buňky, kde v cytoplazmatické membráně způsobí disociaci buňky a zvýšení pH. Z tohoto důvodu dochází k přerušení transportu aminokyselin uvnitř buňky a tím pádem k jejímu usmrcení. Nejlepší prokázaná inhibiční koncentrace kyseliny sorbové pro plísňovou a kvasinkovou mikroflóru při  $pH \leq 4,5$  je 700 až 1000 mg/kg substrátu.[22; 24]

V roce 1998 Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) prokázala, že kyselina sorbová může být nepřímou příčinou velmi intenzivního nepříjemného zápachu (po petroleji či rozpouštědlech) a nepříjemné chuti potravin, z důvodu identifikace 1,3-pentadienu v jahodovém sirupu. Došlo k mikrobiologickému rozkladu kyseliny sorbové (dekarboxylaci) na 1,3-pentadien. Rozklad kyseliny sorbové na 1,3-pentadien může zapříčinit i ušlechtilá plíseň *Penicillium roqueforti* (např. v nivě). Z těchto důvodů bylo zjištěno, že použití kyseliny sorbové jako konzervační látky v případech, kdy některá ze složek obsahuje přirozenou mikroflóru nebo kdy nelze garantovat naprostou mikrobiologickou čistotu a zabránění průniku mikroorganismů do konečného výrobku jak



ve výrobě, tak v průběhu skladování v podmínkách s vyšším pH není vhodné.[22; 24]

Používání kyseliny sorbové jako konzervantu je zakázáno do salátů (Pařížský, Vlašský), kde by mohla maskovat přítomné bakterie, které způsobují otravy potravin.[22; 24]

Kyselina sorbová není zdraví škodlivá pouze u některých osob může způsobovat alergické reakce. V těle metabolizuje, přeměňuje se na energii a posiluje tělo před infekcemi. V ČR a USA je využívání kyseliny sorbové jako konzervantu povoleno. V USA je označována jako GRAS látka (Generally recognized as safe, tj. bezpečná látka nepodléhající regulaci). [22; 24]

**ADI kyseliny sorbové:** 25 mg/kg [7]

**Do potravin, které obsahují kyselinu sorbovou patří:** [13]

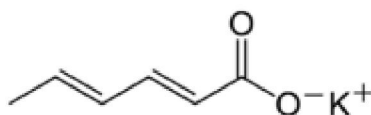
- Švestky sušené (*ENCINGER s.r.o.*)
- Hamé kečup sladký (*Hamé s.r.o.*)
- Studentská pečeť (*Nestlé Česko s.r.o.*)

## 2.1.5 Soli kyseliny sorbové

### 2.1.5.1 Sorban sodný

Sorban sodný ( $C_6H_7O_2Na$ ) je sodná sůl kyseliny sorbové, která je dobře rozpustná ve vodě. V potravinářství je značen kódem E 201. Používá se k zpomalení růstu plísní v sýrech, marmeládách, vínu nebo sušeném ovoci. Není zdraví škodlivý, pouze u citlivých osob může způsobovat kožní alergické reakce. **V ČR je používání sorbanu sodného v potravinách zakázáno.** [13]

### 2.1.5.2 Sorban draselný



Obr. 6: Sorban draselný

Sorban draselný ( $C_6H_7O_2K$ ) je draselná sůl kyseliny sorbové, která se vyrábí neutralizací kyseliny sorbové pomocí hydroxidu draselného. Jedná se o bezbarvou sůl, dobře rozpustnou ve vodě. V potravinářství je značen kódem E 202. Využívá se hlavně k zabránění růstu kvasinek, plísní a některých bakterií. Pro svoji dobrou rozpustnost ve vodě

se používá jako konzervant hlavně do potravin s vysokým obsahem vody (vína, nealkoholické nápoje, sýry, sirupy, majonézy), ale i do sušeného ovoce a pečiva. Některé kmeny plísní (*Trichoderma* a *Penicillium*) jsou schopny rozkládat sorbn draselný na 1,3-pentadien (zápach po petroleji či rozpouštědlech). [13; 22]

V běžně používaných koncentracích není zdraví škodlivý, u citlivých osob může způsobovat hlavně kožní alergické reakce. V ČR je používání sorbanu draselného povoleno v omezeném množství. [13]

**Mezi potraviny, do kterých se používá sorban draselný jako konzervant patří:** [13]

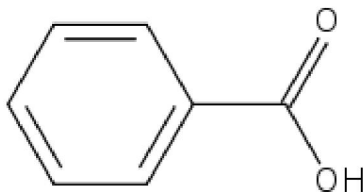
- Banány v čokoládě (*Nestlé Česko s.r.o.*)
- Hamé kečup ostrý (*Hamé s.r.o.*)
- Margot (*Nestlé Česko s.r.o.*)
- Bernard s čistou hlavou švestka (*Rodinný pivovar Bernard a.s.*)
- Bernard s čistou hlavou višň (*Rodinný pivovar Bernard a.s.*)

### 2.1.5.3 Sorban vápenatý

Sorban vápenatý ( $C_{12}H_{14}O_4Ca$ ) je vápenatá sůl kyseliny sorbové. V potravinářství je značen kódem E 203. Využívá se konzervaci potravin na povrchu, kvůli své špatné rozpustnosti ve vodě a tucích. Používá se jako součást obalových materiálů k zpomalení růstu plísní a kvasinek hlavně v sýrech, margarínech a vaječných výrobcích. [13; 22]

V běžně používaných koncentracích není zdraví škodlivý, u citlivých osob může způsobovat hlavně kožní alergické reakce. V ČR je používání sorbanu vápenatého povoleno v omezeném množství. [13]

### 2.1.6 Kyselina benzoová



Obr. 7: Kyselina benzoová

Kyselina benzoová ( $C_7H_6O_2$ ) v potravinářství označována kódem E 210 je aromatická jednosytná karboxylová kyselina. Benzoová kyselina je látka vznikající úplnou oxidací alkylbenzenů. Její syntéza v tomto případě bude z toluenu za oxidace manganistanem draselným (hypermanganem). Jedná se o prášek nebo jemné krystaly, bílé až krémové barvy s nepatrným zápachem. Je velmi rozšířená a má široké spektrum využití například v potravinářském, farmaceutickém, tabákovém a kosmetickém průmyslu. V přírodě se běžně vyskytuje jako součást různých rostlin (švestky, čaj, anýz, brusinky), ale pro použití v potravinářských provozech se musí vyrábět synteticky. V potravinářství se kyselina benzoová a její soli (benzoan sodný E 211, benzoan draselný E 212, benzoan vápenatý E 213) využívá hlavně jako konzervant, jelikož zabraňuje růstu bakterií, kvasinek a částečně i plísní. Jako antimykotické činidlo se používá aktivní nedisociovaná forma kyseliny benzoové, která je až 100krát účinnější než anion a používá se v množství 150-2000 mg/kg. WHO stanovila maximální příjem na 5 mg/kg hmotnosti těla na den. Svou účinnost ztrácí v neutrálním nebo alkalickém prostředí, účinná je hlavně pod pH 5, proto se přidává do kyselých potravinách, především do nápojů, nakládané zeleniny a salátových zálivek. Přidává se ale také do ovocných výrobků jako jsou sirupy, marmelády, sušená ovoce, pekařské výrobky, chemicky vykynutá těsta, některé druhy koření, nakládané zeleniny, kečupy a omáčky. [13;22;23]

Po pozření dochází v těle k přeměně kyseliny benzoové na kyselinu hippurovou, která je z těla vyloučena močí. [13;22;23]

U většiny lidí není zdraví škodlivá, výjimkou jsou citlivé osoby, u kterých se mohou dostavit alergické reakce především kopřivka, astma v krajních případech anafylaktický šok. Tento konzervant je nevhodný pro děti (je dáván do souvislosti s dětskou hyperaktivitou). V ČR je používání povoleno v omezeném množství. [13;22;23]

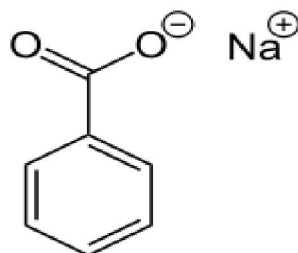
ADI kyseliny benzoové: 25 mg/kg [7]

**Mezi potraviny, které tento konzervant obsahují patří:** [13]

- Balsamico dressing (*Spak foods s.r.o.*)
- Hamé kečup sladký (*Hamé s.r.o.*)
- Hořčice polotučná (*PIKANT Ostrava s.r.o.*)
- Tatarská omáčka (*Spak foods s.r.o.*)
- Tuňák v rajčatové omáčce (*BALTAXIA a.s.*)

## 2.1.7 Soli kyseliny benzoové

### 2.1.7.1 Benzoan sodný



Obr. 8: Benzoan sodný

Benzoan sodný ( $C_7H_5O_2 Na$ ) je sodná sůl kyseliny benzoové. V potravinářství označován kódem E 211. Jedná se o bílý prášek, který se pro komerční účely vyrábí neutralizací kyseliny benzoové hydroxidem sodným. V přírodě se běžně nachází v některých plodech rostlin (brusinky, švestky, jablka, houby, skořice, hřebíček). Benzoan sodný se pro svou dobrou rozpustnost ve vodě a antimykotické účinky využívá jako konzervant do nealkoholických nápojů, hořčic, ovocných džusů, omáček, džemů. Svou účinnost ztrácí v neutrálním nebo alkalickém prostředí, nejúčinnější je hlavně pod pH 5. [13]

K nežádoucím účinkům benzoanu sodného může docházet při kombinaci s kyselinou askorbovou, kdy může docházet k tvorbě benzenu, který je karcinogenní. U většiny lidí není zdraví škodlivý, výjimkou jsou citlivé osoby (alergici) a osoby trpící astmatem, kopřivkou, u kterých se mohou příznaky zhoršit (reakce silnější při kombinaci s tartrazinem). Tento konzervant je nevhodný pro děti (je dáván do souvislosti s dětskou hyperaktivitou). V ČR je použití povoleno v nezbytně nutném množství. V USA označován jako GRAS látka (Generally recognized as safe, tj. bezpečná látka nepodléhající regulaci). [13]

**Mezi potraviny, které tento konzervant obsahují patří:** [13]

- Jupík – pomeranč (*Kofola a.s.*)
- Zavináče (*Delimax a.s.*)
- Slazená švestková povidla (*Hamé s.r.o.*)
- Hermelínový salát (*Globus ČR*)
- Minerální voda ochucená – citron (*Poděbradka a.s.*)

### 2.1.7.2 Benzoan draselný

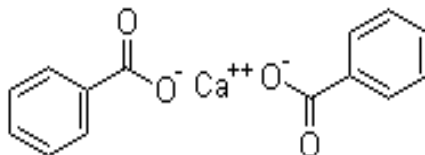
Benzoan draselný ( $C_7H_5O_2K$ ) je draselná sůl kyseliny benzoové. V potravinářství označován kódem E 212. V přírodě se běžně nachází v některých plodech rostlin (maliny, čaj). Benzoan sodný se pro svou dobrou rozpustnost ve vodě a antimykotické účinky využívá jako konzervant do nealkoholických nápojů, hořčic, ovocných džusů, omáček, džemů, nálevů, marinovaných ryb, salátových zálivek, piva a instantní kávy. Svou účinnost ztrácí v neutrálním nebo alkalickém prostředí, nejúčinnější je hlavně pod pH 5. [13; 26]

U většiny lidí není zdraví škodlivá, výjimkou jsou citlivé osoby, u kterých se mohou dostavit alergické reakce, kopřivka nebo astma. Není vhodný pro děti (je dáván do souvislosti s dětskou hyperaktivitou). V ČR je používání povoleno v omezeném množství. [13; 26]

**Mezi potraviny, které tento konzervant obsahují patří:**[13]

- Steak omáčka se zeleným pepřem (*Vitana a.s.*)

### 2.1.7.3 Benzoan vápenatý



Obr. 9: Benzoan vápenatý

Benzoan vápenatý ( $C_{14}H_{10}O_4Ca$ ) je vápenatá sůl kyseliny benzoové. V potravinářství označován kódem E 213. V přírodě se běžně nachází v některých plodech rostlin (brusinky, švestky, jablka, houby, skořice, hřebíček, maliny, čaj). Benzoan vápenatý se pro svou dobrou rozpustnost ve vodě a antimykotické účinky využívá jako konzervant hlavně do ananasových džusů nealkoholických nápojů, hořčic, ovocných džusů, omáček, džemů. Svou účinnost ztrácí v neutrálním nebo alkalickém prostředí, nejúčinnější je hlavně pod pH 5. [13]

U většiny lidí není zdraví škodlivý, výjimkou jsou citlivé osoby, u kterých vyvolává alergické reakce. Tento konzervant je nevhodný pro děti (je dáván do souvislosti s dětskou hyperaktivitou). V ČR je použití povoleno v omezeném množství. [13]

### 2.1.8 Siřičitany

Do této skupiny látek patří oxid siřičitý a anorganické soli (Siřičitan sodný, Siřičitan vápenatý, Hydrogensiřičitan sodný, Hydrogensiřičitan vápenatý, Hydrogensiřičitan draselný, Disiřičitan sodný, Disiřičitan draselný), které mohou za určitých okolností uvolňovat oxid siřičitý. Jedná se o látky s E kódem E 220 až E 228. Jako konzervační látky jsou účinné v kyselých potravinách proti bakteriím a částečně i kvasinkám a plísním. Při výrobě vína siřičitany vyhladí přirozeně se vyskytující mikroflóru před přidáním vhodných kvasinek. Siřičitany rovněž zabraňují růstu plísní během přepravy vinných hroznů. Také se používají ke zlepšení pekařské kvality těsta v pekařských výrobcích, zabraňují růstu mikroorganismů na povrchu masa a masných výrobků, dekontaminují výrobní zařízení a účinkují jako čisticí látky. Do potravin se tyto látky přidávají nejen pro své antimikrobiální vlastnosti, ale také pro svou schopnost účinkovat jako antioxidanty a tím zabraňovat postupným změnám barvy (ztráta barvy či hnědnutí) mnoha potravin (například ovoce a zeleniny). Siřičitany v potravinách mohou představovat závažný problém pro některé astmatiky. U citlivých jedinců hrozí reálné nebezpečí život ohrožujících reakcí, zejména trpí-li těžkým astmatem a jsou-li zároveň léčeni kortikosteroidy. Byly pozorovány následující reakce po požití potravin obsahujících siřičitany: nevolnost, průjem, vyrážka, přecitlivělost při styku s pokožkou, svědění. Siřičitany snižují hladinu thiaminu neboli vitamínu B1 v ošetřených potravinách. Není povoleno používat siřičitany na čerstvém ovoci a zelenině, kde zůstává v téměř nezměněné koncentraci a představuje tak mnohem větší riziko. [10; 13; 27]

ADI siřičitanů: 0 – 0,7 mg/kg. [7]

#### 2.1.8.1 Oxid siřičitý

Oxid siřičitý (SO<sub>2</sub>) je bezbarvý plyn, který je štiplavý a jedovatý. V potravinářství označován kódem E 220. Má antioxidační účinky (ovoce vypadá jako čerstvé, tzn. nehnědne) a působí i jako konzervant proti bakteriím, kvasinkám a plísním. Používá se při výrobě marmelád, džemů, zavařenin, ovocných nápojů, nakládané zeleniny, bramborových výrobků, sušených meruněk. Může vyvolávat alergické reakce u astmatiků, dále bolesti hlavy a průjem. Ničí vitamín B1. Není vhodná pro děti. V ČR je používání SO<sub>2</sub> povoleno omezeně. [13]

**Mezi potraviny, které tento konzervant obsahují patří:** [13]

- Bramborová kaše s mlékem (*Vitana a.s.*)
- Borůvkový džem (*Hamé s.r.o.*)
- Modrý Portugal (*Templářské sklepy Čejkovice, vinařské družstvo*)
- Svatovavřínecké víno (*Templářské sklepy Čejkovice, vinařské družstvo*)

**2.1.8.2 Siřičitan sodný**

Siřičitan sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) je rozpustná, bílá, sodná sůl kyseliny siřičité. V potravinářství označovaný kódem E 221. V kyselém prostředí tvoří kyselinu siřičitou, která se chová jako konzervační prostředek (účinný proti bakteriím, kvasinkám a plísním). Používá se také jako antioxidant (zabraňuje hnědnutí) a bělicí činidlo. Najdeme jej hlavně v potravinách vyrobených z ovoce a zeleniny, vaječných žloutcích a výrobcích žlutky obsahující a salátech. U masných výrobků je používání siřičitanu sodného zakázáno (může zamaskovat bakteriální nákazu projevující se ztrátou barvy). Může způsobovat dýchací problémy u pacientů trpících astma. Vysoké koncentrace mohou zapříčiňovat gastrointestinální poruchy. Ničí vitamín B1. V ČR je používání povoleno. [12; 13; 23]

**Mezi potraviny, které tento konzervant obsahují patří:** [13]

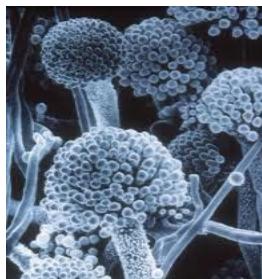
- Bramborové knedlíky s uzeným masem (*Euroice s.r.o.*)
- BeBe Rodinné cereální (*Opavia s.r.o.*)
- Tuc příchuť slanina (*Opavia s.r.o.*)

**2.1.8.3 Siřičitan vápenatý**

Siřičitan vápenatý ( $\text{CaSO}_3$ ) je bílá, vápenatá sůl kyseliny siřičité. V potravinářství označovaný kódem E 226. V kyselém prostředí tvoří kyselinu siřičitou, která se chová jako konzervační prostředek (účinný proti bakteriím, kvasinkám a plísním). Najdeme jej hlavně v jablečném moště, cukru, ovocných džusech, atd. Také ho lze využít jako bělicího činidla při výrobě cukru. Zvyšuje pevnost konzervované zeleniny (díky účinkům vápníku). Může způsobovat dýchací problémy u pacientů trpících astma. Ničí vitamín B1. V ČR je používání povoleno omezeně při výrobě některých potravin. [13; 28]

### 3 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH DRUHŮ PLÍSNÍ A KVASINEK

#### 3.1 Plísně



Obr. 10: *Aspergillus flavus*

Plísně patří mezi mikroorganismy zařazené do říše hub. Jsou to vláknité mikroskopické mnohobuněčné houby, které tvoří vlákna (hyfy), z nichž se tvoří podhoubí (mycelium). Z podhoubí vyrůstají rozmnožovací orgány, které uvolňují výtrusy (spory). Výživa hub je heterotrofního typu. Houby můžeme prokazovat mikroskopicky, pomocí nativních preparátů. [29]

Plísně rozkládají živiny v potravinách a zapříčiňují tak kažení potravin, některé navíc tvoří v potravině plísněvé jedy, tzv. mykotoxiny. Patří mezi významné toxiny v potravinách. V současné době je známo přes 200 mykotoxinů a přibližně 50 mykotoxinů je dáváno do přímé souvislosti s mykotoxikózami u lidí a zvířat. K nejznámějším toxinům produkovaných plísněmi patří aflatoxin, ochratoxin a patulin. Toxiny z plísní mohou u lidí způsobovat alergie a zažívací potíže (průjmy), ale i závažnější účinky jako je poškození jater, ledvin, imunitního systému a nervové soustavy, některé mají i rakovinotvorné účinky (např. aflatoxin B1).[29]

Plísně mohou napadnout téměř každou potravinu, která obsahuje dostatek vody a živin. Nejčastěji jsou napadány potraviny skladované za nevhodných podmínek (vlhké a teplé prostředí). Často se plísně nachází například v arašídech a jiných oříšcích, obilninách, sóji, koření, čaji a kávě, ale i v živočišných potravinách. Ne všechny plísně jsou však toxigenní. Některé z plísní, které neprodukují toxiny jsou označovány jako tzv. „kulturní plísně“ (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*) a jsou využívány k výrobě potravin (např. plísněových sýrů: Niva, Hermelín) a některých trvanlivých tvrdých salámů, které zrají pod plísněným povrchem. Plísně se využívají i ve farmaceutickém průmyslu (lék penicilin, produkovaný druhy *Penicillium notatum* a *Penicillium chrysogenum*). K nejznámějším plísním v potravinách patří rody *Penicillium* a *Aspergillus*. [29]



### 3.1.1 ROD: *Aspergillus*

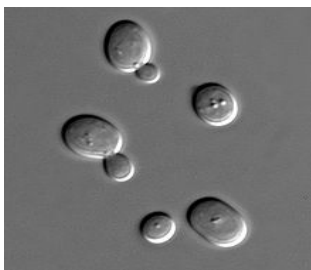
*Aspergillus* (česky označovaný jako kropidlák) je houba patřící do čeledi *Plesnivkovité* (*Trichocomaceae*). Na kultuře tvoří obvykle černé, hnědé, žluté až bílé kolonie. Běžně se vyskytuje v prostředí (např. v půdě, prachu, stavebním materiálu, v kořeni a na rostlinách). Existuje mnoho různých druhů: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*. [29]

Některé druhy rodu *Aspergillus* způsobují onemocnění, tzv. Aspergilózu. Jejich diagnóza je velmi obtížná, pro jejich lehce zaměnitelné příznaky s jiným onemocněním. Mezi nejrozšířenější formu patří bronchopulmonální aspergilóza (ABPA), která postihuje dýchací cesty (alergické reakce, kašel – vykašlávání krve, sípání, poškození tkáně dýchacích cest). K další formě patří tzv. invazivní aspergilóza, tato forma obvykle postihuje lidi s oslabeným imunitním systémem (např. lidé po transplantaci kostní dřeně nebo transplantaci orgánů) a projevuje se horečkou, bolestí na hrudi, kašlem a dušností. Vzhledem k tomu že se *Aspergillus* běžně vyskytuje v prostředí a většina lidí dýchá jeho spóry každý den, tak pro lidi se zdravým imunitním systémem není v běžném prostředí zdraví škodlivý. [29]

### 3.1.2 ROD: *Penicillium*

*Penicillium* (česky označovaný jako štětičkovec) je houba patřící do čeledi *Plesnivkovité* (*Trichocomaceae*). Na kultuře tvoří obvykle zelené nebo modré kolonie. Běžně se vyskytuje v prostředí (např. v půdě, prachu, kořeni a na rostlinách) a je velmi druhově bohatý (kolem 250 druhů). Mezi nejznámější druhy patří *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candida*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium marneffeii*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*. Rod *Penicillium* je jednou z nejčastějších příčin kažení ovoce (hlavně citrusové plody), zeleniny, hub a obilovin. K druhům, které mohou být zdraví škodlivé patří hlavně *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* (produkce ochratoxinu) a *Penicillium marneffeii* (patogenní – způsobuje infekce u lidí se sníženou imunitou). Rod *Penicillium* neobsahuje jen škodlivé druhy, ale také mnoho užitečných, které se využívají například v potravinářství. Tyto druhy se označují jako tzv. „kulturní plísně“ *Penicillium camemberti* (např. sýry Camembert a Brie), *Penicillium roqueforti* (např. sýr Roquefort), *Penicillium glaucum* (např. sýr Gorgonzola). [29]

## 3.2 Kvasinky



Obr. 11: *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy, které se řadí do říše *Houby*. Netvoří žádnou taxonomickou skupinu, protože jsou rozděleny do dvou tříd *Vřeckovýtrusné (Ascomycota)* a *Stopkovýtrusné (Basidiomycota)*. Kvasinkové organismy jsou v přírodě velmi rozšířeny. Své jméno dostaly podle schopnosti zkvašovat mono-, di-, nebo trisacharidy na ethanol a CO<sub>2</sub>. Jelikož mají ve většině případů pouze sacharolytické schopnosti, vyskytují se především na materiálech obsahujících cukry. Velikost buněk kvasinek se pohybuje v rozmezí 3-15 μm. Nejčastější tvar kvasinek je vejčitý, elipsoidní nebo kulovitý. Množí se zejména nepohlavně tzv. pučením (gemací), kdy dochází k tvorbě pupenů na mateřském jedinci, z něhož se vyvíjí nový organismus nebo i pohlavně za tvorby spor (při nedostatku živin). [10; 30; 31]

Kvasinky patří mezi významné mikroorganismy v potravinářství (schopnost fermentace - kvašení). Velký význam mají hlavně při alkoholovém kvašení (výroba lihu, vína, piva), mléčném kvašení (výroba mléčných nápojů) a v pekařství (pekařské droždí). Jsou využívány jako dobře stravitelný zdroj bílkovin, cukrů a komplexu vitamínu B. Mezi průmyslově významné kvasinky patří rody *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Kloeckera*, *Torulopsis*, *Yarrowia*. Vedle převažujícího pozitivního významu existuje i negativní vliv kvasinek (tzv. patogenní kvasinky), které se vyskytují jako škodlivé kontaminanty ve výrobních procesech. Mezi patogenní druhy kvasinek patří např. rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, které vyvolávají různá kožní, slizniční a jiné formy onemocnění. [10; 30; 31]

### 3.2.1 ROD: *Candida*

*Candida* je houba patřící do čeledi *Kvasinkovité (Saccharomycetaceae)*. Na kultuře tvoří obvykle kolonie bílé, smetanové barvy. Velikost se pohybuje mezi 4-6 μm. Je možné je nalézt téměř všude, hlavně pak v teplém a vlhkém prostředí, kterému dávají přednost. Existuje mnoho různých druhů: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*,

*Candida dublinensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefir*, *Candida utilis* a další. Některé druhy rodu *Candida* způsobují onemocnění, tzv. Kandidózu. Její diagnóza je velmi obtížná, pro její lehce zaměnitelné příznaky s jiným onemocněním (svědění, pálení, zarudnutí kůže, tvorbě aftů, opakované záněty močového měchýře, záněty pochvy či dělohy, střídání průjmu a zácpy atd.). Jedná se o nadměrné pomnožení kvasinek ve střevech, krvi a jiných orgánech. Nejčastějším původcem je druh *Candida albicans*. *Candida albicans* je parazitická kvasinka, která osídluje střeva (10-15% střevní mikroflóry), pohlavní ústrojí, ústa, jícen a krk. Tato kvasinka žije za normálních okolností v rovnováze s ostatními bakteriemi a kvasinkami (komezál). Příčinou kandidózy je dlouhodobé nebo opakované užívání antibiotik (antibiotika jsou podávána proto, aby ničila choroboplodné bakterie, spolu s nimi však ničí i bakterie „dobré“). V důsledku toho dochází k nerovnováze v střevní mikroflóře. Léčba nemoci musí být zaměřena na fakt, že onemocnění kandidózou se netýká pouze příslušného postiženého místa, nýbrž že je to onemocnění celého organismu. [30]

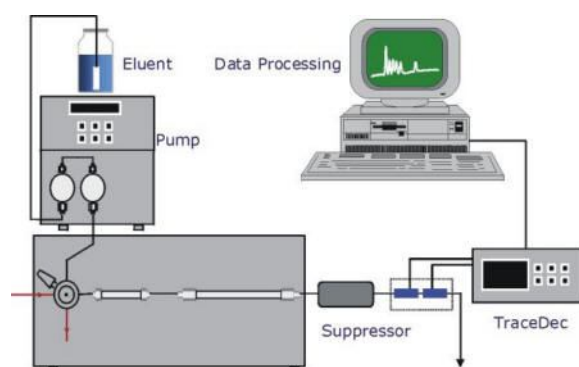
### 3.2.2 ROD: *Saccharomyces*

*Saccharomyces* je houba patřící do čeledi *Kvasinkovité (Saccharomycetaceae)*. Na kultuře tvoří obvykle rychle rostoucí kolonie elipsoidního nebo vejčitého tvaru a smetanové barvy. Velikost se pohybuje mezi 7-9  $\mu\text{m}$ . Produkuje 1-4 askospóry. Existuje mnoho různých druhů: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* atd. Mnohé druhy patří mezi velmi významné mikroorganismy v potravinářství (pivovarnictví, vinařství, pekařství), kdy dochází ke kvašení mono-, di-, nebo trisacharidů na ethanol a  $\text{CO}_2$ . Některé se využívají i ve farmaceutickém průmyslu (*Saccharomyces boulardii*). *Saccharomyces* mohou způsobovat kažení u potravin s vysokým obsahem cukru (sirupy, šťávy). Při dlouhodobém vystavení jejich účinkům může vést ke vzniku přecitlivělosti. [31; 32]

## 4 METODY STANOVENÍ KONZERVANTŮ

### 4.1 Chromatografie

Chromatografie je metoda sloužící k separaci a analýze složitých směsí. Chromatografie se velmi široce uplatňuje ve všech vědeckých odvětvích včetně lékařství. V rámci lékařských věd je velmi široká škála chemických (biochemických a dalších) problémů, které jsou řešeny za pomoci některého z mnoha různých typů chromatografických technik. Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. [32; 33; 34; 35]



Obr. 12: Chromatograf

#### Chromatografické metody

**Dle povahy fází:** [35]

➤ *Plynová chromatografie (GC - Gas Chromatography)*

– Adsorpční - ustavuje se rovnováha mezi mobilní plynnou fází a stacionární pevnou fází (GSC - Gas Solid Chromatography)

– Rozdělovací - ustavuje se rovnováha mezi mobilní plynnou fází a stacionární kapalnou fází (GLC - Gas Liquid Chromatography)

➤ *Kapalinová chromatografie (LC - Liquid Chromatography)*

– Adsorpční - ustavuje se rovnováha mezi mobilní kapalnou fází a stacionární pevnou fází (LSC - Liquid Solid Chromatography)

– Rozdělovací - ustavuje se rovnováha mezi mobilní kapalnou fází a stacionární kapalnou fází (LLC - Liquid Liquid Chromatography)

**Dle uspořádání fází:** [35]

➤ *Kolonová (sloupcová) chromatografie*

– stacionární fáze v koloně

➤ *Plošná chromatografie*

– Chromatografie na tenké vrstvě (TLC - Thin Layer Chromatography)

– Papírová chromatografie (PC - Paper Chromatography)

**Dle děje, který probíhá:** [35]

➤ *Adsorpční chromatografie* - využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry (LSC - Liquid Solid Chromatography)

➤ *Rozdělovací chromatografie* - využívá rozdílné rozpustnosti molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami (LLC - Liquid Liquid Chromatography)

➤ *Iontově výměnná chromatografie* - využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů na povrchu iontového měniče (IEC - Ion Exchange Chromatography)

➤ *Bioafinitní chromatografie* – je založena na specifické interakci mezi biologicky aktivními látkami a protilátkami

➤ *Gelová permeační chromatografie* - využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti (GPC – Gel Permeation Chromatography)

#### **4.1.1 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je fyzikálně - chemická separační metoda, která využívá dělení látek mezi dvěma fázemi. Jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá je stacionární (nepohyblivá). Za základ separace látek kapalinovou chromatografií lze považovat různou afinitu složek vzorku k mobilní a stacionární fázi. Čím větší afinita k stacionární fázi látka vykazuje, tím více je zbržděn její pohyb chromatografickým systémem. Postupováním vzorku kolonou se vytvářejí rovnovážné stavy na základě různých interakcí (hydrofobní, elektrostatické, interakce dipól-dipól, vodíková vazba...) mezi vzorkem a mobilní fází,

vzorkem a stacionární fází a rovněž mezi mobilní a stacionární fází. [32; 33; 34; 36]

Základní části kapalinové chromatografie: zásobníky mobilní fáze, zřízení pro tvorbu gradientu, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor, registrační zařízení (zapisovač, integrátor, PC)

Další součásti: odplyňovače mobilní fáze, termostaty, spojovací kapiláry a součásti, on-line filtry, saturační a ochranné kolonky, jímače frakcí ...

- **Mobilní fáze**

Mobilní fáze (zpravidla směsi organických rozpouštědel nebo vodné roztoky pufrů) se před použitím filtrují (odstranění nečistot) a odplyňují (např. s použitím ultrazvukové lázně). Do systému HPLC jsou čerpány nejčastěji ze skleněných lahví. Do lahve zasahuje čerpací hadička opatřená často skleněnou fritou, zároveň mobilní fází z důvodu dokonalého a soustavného odplyňování trvale probublává hélium (jinou alternativou odplyňování je použití membránového degasseru). Zásobník mobilních fází má maximálně čtyři pozice pro současné čerpání a směšování mobilních fází. [32; 33; 34; 37]

- **Vysokotlaká pumpa (čerpadlo)**

Moderní instrumentace umožňuje pracovat s tlaky až 60 MPa. Důležitá je vysoká přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová nebo pístově membránová, konstrukční řešení v kombinaci s automatickým ovládním zpravidla uspokojivě řeší minimalizaci pulzů, materiálem pro výrobu čerpadel v HPLC je nejčastěji nerezová ocel, safír, titan, keramika. [32; 33; 34; 37]

V kapalinové chromatografii se využívá dvou modů čerpání mobilních fází:

a) **isokratický mod**, kdy je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková předem smíchaná), alternativně lze čerpat zároveň ze dvou až čtyř rezervoárů při konstantním poměru složek a konstantním průtokem,

b) **gradientový mod**, kdy v průběhu jedné analýzy lze programovaně měnit složení i průtok mobilní fáze. Kvalitní chromatografické zařízení synchronizuje činnost ventilů a čerpadel tak, aby gradientový profil byl reprodukovatelný.

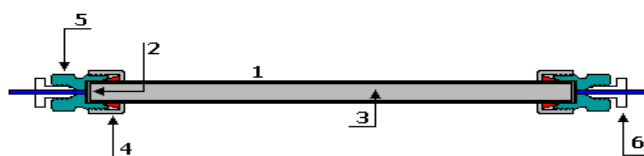
- **Dávkovací zařízení**

Přímý nástřik vzorku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastavení toku mobilní fáze (stop-flow) přímo na vrstvu sorbentu v koloně je metodou se špatnou reprodukovatelností,

tedy nevhodnou pro kvantitativní analýzu. Nástřiková zařízení se musí vyrovnat s vysokými tlaky na koloně, používají se především dávkovací vysokotlaké ventily se smyčkou. Dobře vybavená chromatografická zařízení mají k dispozici autosamplery se zásobníkem vzorků (nejlépe s temperací) a s programovatelnou derivatizací vzorku před analýzou. [32; 33; 34; 37]

- **Kolona**

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3 - 10  $\mu\text{m}$  o délce 5 - 30 cm a vnitřním průměrem 3 - 4 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na níž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze, méně často se používá organických gelů různé struktury, které mohou být rovněž chemicky modifikovány. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se často vyskytují pojmy "normální fáze" a "obrácená fáze". U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, mobilní fáze bývá nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (RP, reversed-phase, asi v 80 % všech aplikací HPLC) používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi. Nejpoužívanější je typ C18, kde jsou molekuly octadecylsilanu vázány na částicích silikagelu. Mobilní fáze v systému RP je polární. [32; 33; 34; 37]



Obr. 13: Klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6).

## ● Detektory

K detekci separovaných látek se zpravidla užívá obecných nebo specifických vlastností, kterými se tyto látky liší od mobilní fáze, na tomto základě se také rozlišují univerzální a selektivní detektory. Na detektory v HPLC jsou kladeny zejména tyto požadavky: vysoká citlivost, linearita a reprodukovatelnost odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost. Nejčastěji jsou používány: [32; 33; 34]

### ***Fotometrický detektor (UV, VIS)***

Většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek (filtrové), nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190 - 400 nm. Světlo zdroje prochází průtokovou celou, intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem, kontinuálně se snímá signál eluovaných složek.

### ***Detektor diodového pole (DAD)***

Detektor diodového pole (DAD) umožňuje získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo, transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod umístěných na destičce o délce cca 1 cm dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru. Použití DAD je podmíněno softwarovým zázemím, které umožňuje např. průběžné hodnocení tzv. "čistoty píků", identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi v jedné analýze apod.



### ***Fluorimetrický detektor***

Fluorimetrický detektor je selektivní detektor s vysokou citlivostí. Při měření fluorescence se budící UV záření ze zdroje vede do průtokové cely, kde se absorbuje a vyzářené světelné kvantum o větší vlnové délce se měří fotonásobičem.

### ***Elektrochemický detektor***

Elektrochemický detektor umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu. Obecně se tento detektor nehodí pro detekci gradientové eluce.

### ***Vodivostní detektor***

Vodivostní detektor měří elektrickou vodivost eluátu vytékajícího z kolony dvěma elektrodami (nerez, zlato, platina) umístěnými v průtokové cele. Tento detektor je vhodný pouze pro detekci iontů.

### ***Hmotnostní detekce (LC-MS)***

Snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikrokolon a kapilárních kolon.

#### **4.1.1.1 Princip kapalinové chromatografie**

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo ul). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě ***chromatogramu***. [32; 33; 34; 37]

#### **4.1.1.2 Chromatogram**

Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram, který je tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky. Poloha píku na ose x uváděná pomocí retenčního

času (určeno podle polohy vrcholu) určuje o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza). Plocha píku (nebo jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza). Identifikace píků (látek) se provede tak, že se na stejné separační koloně za stejných experimentálních podmínek provede analýza předem připravené směsi o známém kvalitativním složení, tzv. *standardní směs*. Pokud se retenční časy píků na chromatogramu neznámé směsi shodují s retenčními časy píků směsi o známém složení, pak se jedná o stejné látky. Koncentrace látek ve směsi se určuje z ploch nebo výšek píků metodou kalibrace, pro kterou existuje více způsobů provedení. [32; 33; 34; 37]

## LEGISLATIVA

- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1131/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o steviol-glykosidy [38]
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1130/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách zavedením seznamu potravinářských přídatných látek Unie schválených pro použití v potravinářských přídatných látkách, potravinářských enzymech, potravinářských aromatech a živinách[38]
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie [38]
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004 [38]
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1334/2008 ze dne 16. prosince 2008 o látkách určených k aromatizaci a některých složkách potravin vyznačujících se aromatem pro použití v potravinách nebo na jejich povrchu a o změně nařízení Rady (EHS) č. 1601/91, nařízení (ES) č. 2232/96 a č. 110/2008 a směrnice 2000/13/ES [38]
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách [38]
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1332/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských enzymech a o změně směrnice Rady 83/417/EHS, nařízení Rady (ES) č. 1493/1999, směrnice 2000/13/ES, směrnice Rady 2001/112/ES a nařízení (ES) č. 258/97[38]
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1331/2008 ze dne 16. prosince 2008, kterým se stanoví jednotné povolovací řízení pro potravinářské

přidatné látky, potravinářské enzymy a látky určené k aromatizaci potravin [38]

- 127/2008 Sb. - Vyhláška ze dne 1. dubna 2008, kterou se mění vyhláška č. 113/2005 Sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, ve znění pozdějších předpisů [38]
- 4/2008 Sb. - Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin [38]
- 312/2007 Sb. - ze dne 30. listopadu 2007, kterou se mění vyhláška č. 54/2002 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek [36]
- 113/2005 Sb. - Vyhláška ze dne 4. března 2005 o způsobu označování potravin a tabákových výrobků [38]
- 52/2002 Sb. - Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ze dne 29. ledna 2002, kterou se stanoví požadavky na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu [38]
- 53/2002 Sb. - Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ze dne 29. ledna 2002, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků [38]
- 54/2002 Sb. - Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ze dne 29. ledna 2002, kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek [38]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## **5 METODICKÝ POSTUP STANOVENÍ VYBRANÝCH KONZERVANTŮ**

### **5.1 Chemikálie**

- Natamycin
- Metanol pro HPLC
- Kyselina octová
- Metanol
- Redestilovaná voda
- Destilovaná voda

### **5.2 Laboratorní pomůcky a přístroje**

#### **5.2.1 Standartní laboratorní pomůcky a přístroje**

- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Mikropipeta
- Injekční stříkačka
- Nůž
- Pravítko

#### **5.2.2 Speciální laboratorní pomůcky a přístroje**

- Aparatura pro HPLC (Dionex UltiMate 3000 RS)
- Kolona Waters Spherisorb C8 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m)
- Dávkovací smyčka (objem 20  $\mu$ l)
- PC s vyhodnocovacím programem Compass Hystar Post Processing
- UV/VIS spektrofotometr Lambda 25
- Mikrofiltry (porozita 20  $\mu$ m)
- Vialky (objem 1,5 ml)

## 5.3 Charakteristika vzorků trvanlivých salámů

### 5.3.1 Lovecký salám

- **Výrobce:** Kmotr – Masna Kroměříž, a. s.
- masný výrobek trvanlivý – *fermentovaný*
- nemusí být skladováno při chladírenských teplotách
- výrobek je přirozeně bezlepkový
- nebalený
- **Složení:** vepřové maso, vepřové sadlo, hovězí maso, jedlá sůl (max. Obsah 4,2%), voda vepřové kůže dextróza koření a extrakty koření, startovací kultura mikroorganismů, konzervant E 250, červená řepa, antioxidant E 316, barvivo E 120. 100g výrobku obsahuje průměrně: bílkoviny: 17,3g, sacharidy: 0,1g, tuky: 49,8g.
- **Energetická hodnota:** 2137 kJ/518kcal
- **Minimální trvanlivost:** 45 dnů
- **Hmotnost:** cca 450g [39]



Obr. 14: Lovecký salám

### 5.3.2 Poličan

- **Výrobce:** Kmotr – Masna Kromeříž, a. s.
- masný výrobek trvanlivý – *fermentovaný*
- vyrobeno z vepřového, hovězího masa a směsi koření
- nemusí být skladováno při chladírenských teplotách
- výrobek je přirozeně bezlepkový
- nebalený
- **Složení:** vepřové maso, vepřové sadlo, hovězí maso, jedlá sůl (max. Obsah 4,2%), voda, vepřové kůže, dextróza, maltodextróza, koření a extrakty koření, startovací kultura mikroorganismů, konzervant E 250, antioxidant E 316, barvivo E 120, E 162. 100g výrobku obsahuje průměrně: bílkoviny: 18,0g, sacharidy: 0,1g, tuky: 46,8g.
- **Energetická hodnota:** 2038kJ/493kcal
- **Minimální trvanlivost:** 45 dnů
- **Hmotnost:** cca 750g [39]



Obr. 15: Poličan



### 5.3.3 Paprikáš

- **Výrobce:** Kmotr – Masna Kroměříž, a. s.
- masný výrobek trvanlivý – *fermentovaný*
- vyrobeno z vepřového, hovězího masa, směsi koření a papriky
- nemusí být skladováno při chladírenských teplotách
- výrobek je přirozeně bezlepkový
- nebalený
- **Složení:** vepřové maso, vepřové sadlo, hovězí maso, jedlá sůl (max. Obsah 4,2%), voda, vepřové kůže, dextróza, koření a extrakty koření, startovací kultura mikroorganismů, konzervant E 250, antioxidant E 316, barvivo E 120, látky zvýrazňující chuť a vůni E 621, E 635. 100g výrobku obsahuje průměrně: bílkoviny: 17,0g, sacharidy: 0,1g, tuky: 47,8g.
- **Energetická hodnota:** 2058kJ/498kcal
- **Minimální trvanlivost:** 45 dnů
- **Hmotnost:** cca 750g [39]



Obr. 16: Paprikáš

### 5.3.4 Selský salám

- **Výrobce:** Kmotr – Masna Kroměříž, a. s.
- masný výrobek trvanlivý – **tepelně opracovaný**
- vyrobeno z vepřového, hovězího masa a směsi koření
- skladovací teplota: 0 - 20°C
- výrobek je přirozeně bezlepkový
- nebalený
- **Složení:** vepřové maso, vepřové sadlo, hovězí maso, jedlá sůl (max. Obsah 4,2%), voda, vepřové kůže, hemoglobin, stabilizátor E 450, dextróza, koření a extrakty koření, startovací kultura mikroorganismů, konzervant E 250, antioxidant E 300, barvivo E 120, látky zvýrazňující chuť a vůni E 621. 100g výrobku obsahuje průměrně: bílkoviny: 16,1g, sacharidy: 0,1g, tuky: 48,1g.
- **Energetická hodnota:** 2054kJ/497kcal
- **Minimální trvanlivost:** 30 dnů
- **Hmotnost:** cca 900g [39]



Obr. 17: Selský salám

### 5.3.5 Vysočina

- **Výrobce:** Krahulík - MASOZÁVOD Krahulčí, a.s.
- masný výrobek trvanlivý – *tepelně opracovaný*
- vyrobeno z vepřového, hovězího masa a směsi koření
- skladovací teplota: 0 - 20°C
- výrobek je přirozeně bezlepkový
- nebalený
- **Složení:** vepřové maso, vepřové sadlo, hovězí maso, jedlá sůl (max. Obsah 4,2%), voda, vepřové kůže (stabilizátor E 466), hemoglobin, stabilizátor E 326, E 450, koření a extrakty koření, startovací kultura mikroorganismů, konzervant E 250, antioxidant E 301, regulátor kyselosti E 575, látky zvýrazňující chuť a vůni E 621, E 635. Na 100g výrobku bylo použito 123g masa.
- **Minimální trvanlivost:** 40 dnů
- **Hmotnost:** cca 450g [40]



Obr. 18: Vysočina

#### **5.4 Extrakce natamycinu z vybraných druhů trvanlivých salámů**

Pro extrakci natamycinu bylo z každého vzorku odebráno klišovkový obal o rozměrech 7 x 14 cm, které bylo naloženo do extrahovací směsi metanolu a destilované vody v poměru 1 : 1 po dobu 15 minut. Vyextrahovaná směs byla převedena do odměrných baněk a odtud pomocí pipety přemístěna do vialek.

#### **5.5 Kalibrační křivky**

K vytvoření kalibračních křivek pro chromatografickou analýzu byl použit standard natamycinu. Standard natamycinu byl rozpuštěn v metanolu, doplněn redestilovanou vodou a roztok byl naředěn na koncentraci 1,25 µg/ml, 6,25 µg/ml a 12,5 µg/ml. Roztok každé koncentrace byl měřen třikrát.

#### **5.6 Chromatografické stanovení natamycinu**

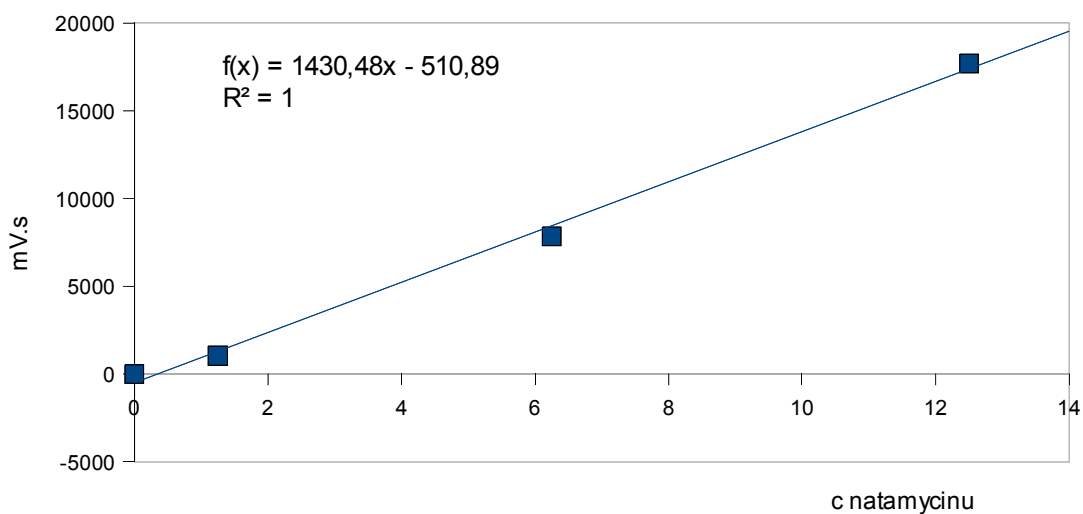
Vialky se získanou extrahovanou směsí byly vloženy do HPLC. Pro separaci byla použita kolona Waters Spherisorb C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Mobilní fáze byla tvořena směsí redestilovaná voda : kyselina octová v poměru 7 : 1. Eluce byla izokratická. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min. Stanovení probíhalo při teplotě 30 °C po dobu 16 minut a tlak kolísal v rozmezí 105 až 110 barů, čili 10,5 až 11,0 Mpa. Signál byl snímán detektorem UV/VIS při vlnových délkách 300 nm, 305 nm, 310 nm a 315 nm. Retenční čas natamycinu byl 8:35 min. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického programu Compass Hystar Post Processing. Tento program vyhodnotil plochy píků [mV.s] v závislosti na retenčním čase natamycinu.

## 6 ANALÝZA VYBRANÝCH VZORKŮ

### 6.1 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení natamycinu

Tab. 1: Hodnoty ploch píku pro stanovení natamycinu

koncentrace [µg/ml]	plocha píku [mV.s]	průměrná plocha píku [mV.s]
1,25	1040,10	1035,93
	1045,37	
	1022,32	
6,25	7784,86	7842,16
	7888,64	
	7852,16	
12,5	17664,56	17688,03
	17790,07	
	17609,46	



Graf. 1: Kalibrace natamycinu

## 6.2 Zpracování výsledků

Odečtená plocha píku byla dosazena do rovnice regrese kalibrační křivky a byl vypočten obsah natamycinu ve vzorcích.

- Aritmetický průměr všech výsledků se nejvíce blíží hodnotě, která se vypočte podle vztahu:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n - počet všech měření,  $x_i$  - hodnota jednotlivého měření

- Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky (S.D.), která byla zjištěna ze vztahu:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

n - počet všech měření,  $x_i - \bar{x}$  - míra odchylky jednotlivého měření

## 6.3 Výsledky stanovení natamycinu ve vzorku loveckého salámu

Tab. 2: Obsah natamycinu v loveckém salámu

plocha píku [mV.s]	koncentrace [µg/ml]	množství natamycinu [µg/dm <sup>2</sup> ]
356,02	0,6060	0,123
358,44	0,6077	0,124
375,56	0,6196	0,126
		X = 0,124

Obsah natamycinu v loveckém salámu:  $\mu = 0,124 \pm 1,2 * 10^{-3} \text{ µg/ dm}^2$

## 6.4 Výsledky stanovení natamycinu ve vzorku poličanu

Tab. 3: Obsah natamycinu v poličanu

plocha píku [mV.s]	koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	množství natamycinu [ $\mu\text{g/dm}^2$ ]
8,28	0,3629	0,0740
8,58	0,3631	0,0741
		X = 0,074

Obsah natamycinu v poličanu:  $\mu = 0,074 \pm 5 * 10^{-5} \mu\text{g/dm}^2$

## 6.5 Výsledky stanovení natamycinu ve vzorku paprikáše

Tab. 4: Obsah natamycinu v paprikáši

plocha píku [mV.s]	koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	množství natamycinu [ $\mu\text{g/dm}^2$ ]
0,11	0,3572	0,0728
0,16	0,3572	0,0728
0,09	0,3572	0,0728
		X = 0,0728

Obsah natamycinu v paprikáši:  $\mu = 0,0728 \mu\text{g/dm}^2$

## 6.6 Výsledky stanovení natamycinu ve vzorku selského salámu

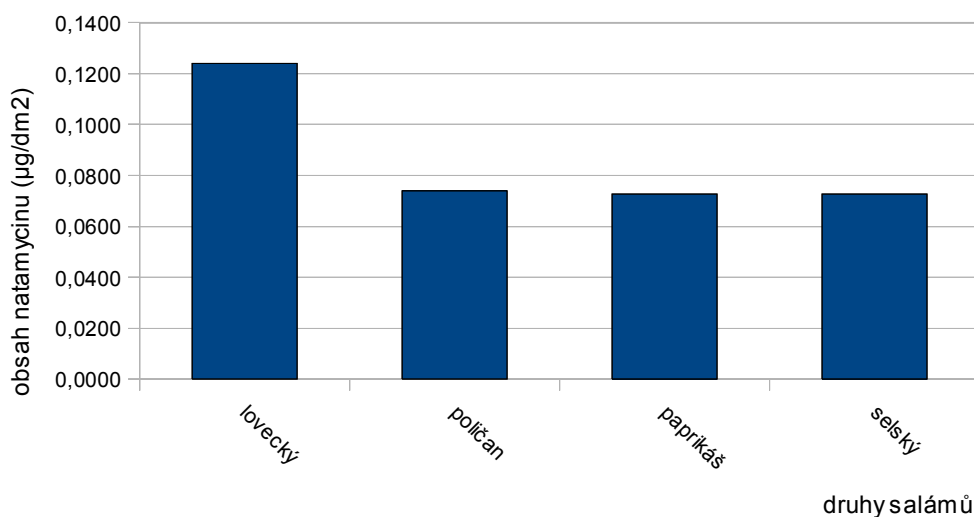
Tab. 5: Obsah natamycinu v selském salámu

plocha píku [mV.s]	koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	množství natamycinu [ $\mu\text{g/dm}^2$ ]
0,43	0,3574	0,0729
0,13	0,3572	0,0728
0,24	0,3573	0,0729
		X = 0,0728

Obsah natamycinu v selském salámu:  $\mu = 0,0728 \pm 4,7 * 10^{-5} \text{ } \mu\text{g}/\text{dm}^2$

Natamycin nebyl metodou HPLC v požadovaném retenčním čase ve vzorku vysočiny detekován.

## 6.7 Výsledky stanovení natamycinu ve vzorku vysočiny



Graf. 2: Obsah natamycinu v trvanlivých salámech

Ve vzorku loveckého salámu byl zjištěn průměrný obsah natamycinu  $0,124 \pm 1,2 * 10^{-3} \text{ } \mu\text{g}/\text{dm}^2$ . Poličan obsahovalo v průměru  $0,074 \pm 5 * 10^{-5} \text{ } \mu\text{g}/\text{dm}^2$  natamycinu. V paprikáši byla detekována průměrná koncentrace natamycinu  $0,0728 \text{ } \mu\text{g}/\text{dm}^2$ . Selský salám obsahoval  $0,0728 \pm 4,7 * 10^{-5} \text{ } \mu\text{g}/\text{dm}^2$  natamycinu. Natamycin ve vysočině nebyl detekován.

Mez stanovitelnosti natamycinu:  $0,15 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$  [41]

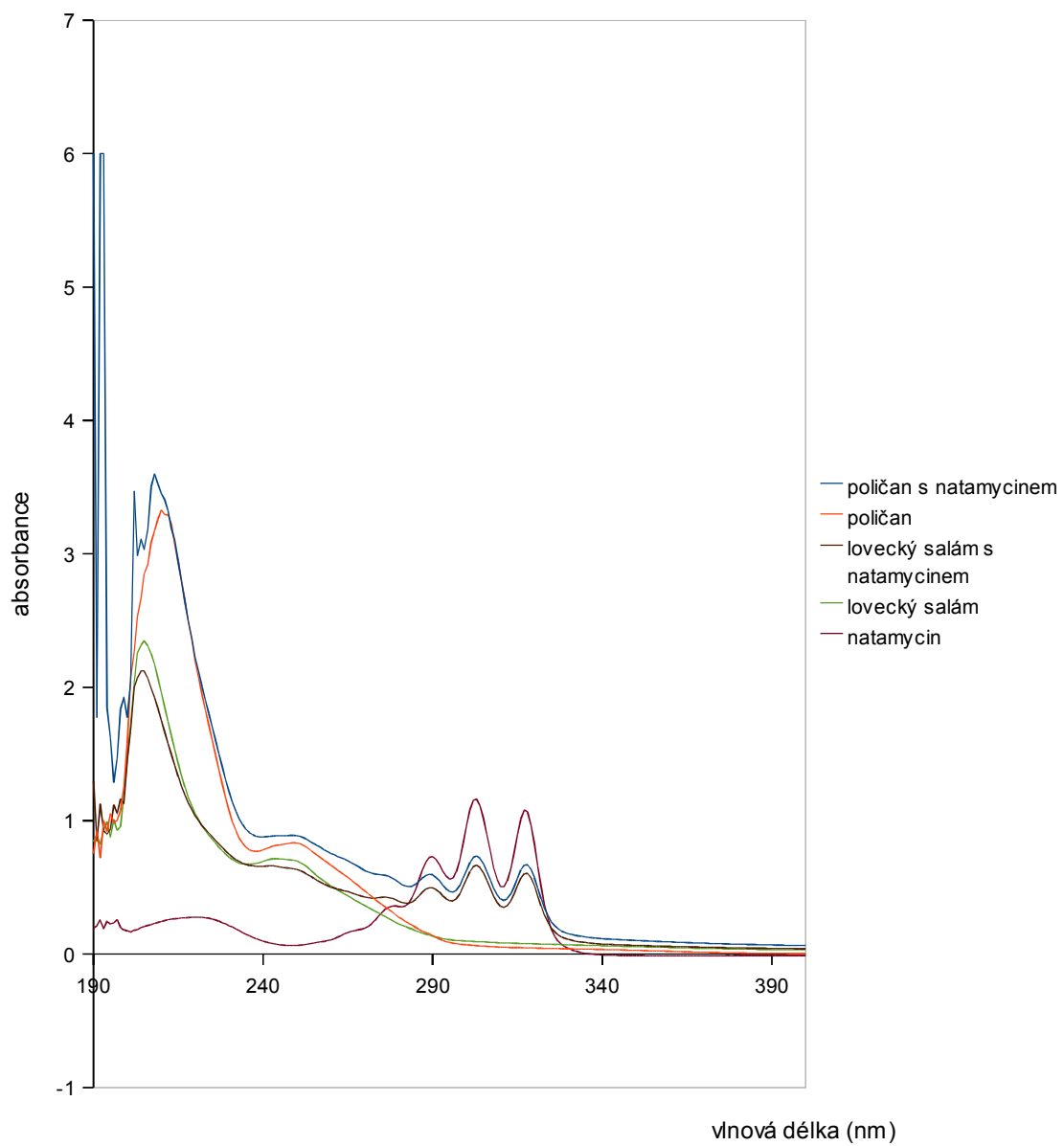
K ošetření povrchu trvanlivých salámů je podle Vyhlášky č. 4/2008 Sb. povoleno antibiotikum natamycin v množství  $1 \text{ mg}/\text{dm}^2$ .

## 6.8 Výsledky UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie byla použita u natamycinu a vyextrahovaných vzorků poličanu a loveckého salámu. Vzorky salámů byly, přefiltrovány přes mikrofiltr a ředěny v poměru 1 : 9 (vzorek : metanol) + natamycin ředěný 1 : 9. Takto naředěné vzorky byly vloženy do kyvety a vyhodnoceny v spektrofotometru Lambda 25.



## Spektra natamycinu + vzorky



Maximální absorbance natamycinu byla zjištěna při vlnové délce 220 nm, u analyzovaných vzorků došlo k posunu spektra k hodnotě vlnové délky 250 nm.

## ZÁVĚR

V teoretické části této práce bylo cílem seznámit se s běžně používanými aditivními látkami, hlavně antimykotickými konzervanty. V praktické části byl stanovován obsah natamycinu v obalech trvanlivých salámů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie.

Pro stanovení natamycinu v trvanlivých salámech byla použita vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). K analýze vzorků byl použit přístroj Dionex UltiMate 3000 RS s detektorem UV/VIS. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického programu Compass Hystar Post Processing. Pro separaci natamycinu byla použita kolona Waters Spherisorb C8 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m). Mobilní fáze byla tvořena směsí redestilovaná voda : kyselina octová v poměru 7 : 1. Analýza byla provedena v izokratickém režimu při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Celková doba analýzy byla 16 min. V průběhu stanovení byla udržována stabilní teplota termostatu kolony na 30 °C. Měření bylo provedeno při vlnových délkách 300, 305, 310 a 315 nm, přičemž nejlépe se jevila vlnová délka 310 nm. K sestrojení kalibrační křivky byl použit standard natamycinu. Pro analýzu natamycinu byly vybrány tyto vzorky trvanlivých salámů od dvou výrobců: lovecký salám, selský salám, poličan, paprikáš a vysočina. Ve vzorku loveckého salámu byl zjištěn průměrný obsah natamycinu  $0,124 \pm 1,2 * 10^{-3}$   $\mu$ g/dm<sup>2</sup>. Poličan obsahovalo v průměru  $0,074 \pm 5 * 10^{-5}$   $\mu$ g/dm<sup>2</sup> natamycinu. V paprikáši byla detekována průměrná koncentrace natamycinu 0,0728  $\mu$ g/dm<sup>2</sup>. Selský salám obsahoval  $0,0728 \pm 4,7 * 10^{-5}$   $\mu$ g/dm<sup>2</sup> natamycinu. Natamycin ve vysočině nebyl detekován. Mez stanovitelnosti natamycinu je 0,15  $\mu$ g/ml. Velmi nízké hodnoty byly způsobeny tím, že ne každý výrobce natamycin k ošetření trvanlivých salámů používá.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] EUROPEAN FOOD INFORMATION COUNCIL, Konzervační prostředky zajišťují vyšší trvanlivost a bezpečnost potravin, Dostupné z: <http://www.eufic.org/article/cs/artid/konzervacni-prostredly-zajistuji-trvanlivost-bezpecnost-potravin/>
- [2] NSW FOOD AUTHORITY, Additives and E numbers, Dostupné z: <http://foodauthority.nsw.gov.au/consumers/food-labels/label-facts/additives-and-e-numbers/>
- [3] VELÍŠEK, J., Chemie potravin 2, OSSIS, Tábor 2002
- [4] INGR, I., Základy konzervace potravin, Brno 2007
- [5] FAIA, Food additives and ingredients asociation, Dostupné z: [http://faia.org.uk/html/food\\_additives.php](http://faia.org.uk/html/food_additives.php)
- [6] INFORMAČNÍ CENTRUM BEZPEČNOSTI POTRAVIN, Potravinářská aditiva, Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/icbp-potravinarska-aditiva.aspx>
- [7] ZKOLA, Aditiva v potravinách, Dostupné z: <http://www.zkola.cz/zkedu/pedagogictipracovnici/kabinetprirodnichved/clanky/2854.aspx>
- [8] STÁTNI ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, Přídavné látky v potravinách, Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pridatne-latky-v-potravinach>
- [9] FOOD STANDRDS AGENCY, Additives or E numbers, Dostupné z: <http://food.gov.uk/safereating/chemsafe/additivesbranch/>
- [10] BEZPEČNOST POTRAVIN, Konzervanty, Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76496>
- [11] FOOD REACTIONS, Food Additives: Preservatives E200-E290 Dostupné z: <http://foodreactions.org/allergy/additives/200.html>
- [12] VITALIA.CZ, Chytře na život, Emulgátory, Dostupné z: <http://www.vitalia.cz/katalog/emulgatory/>
- [13] EMULGATORY.CZ, Éčka v potravinách, Dostupné z: <http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek>
- [14] KOONTZ, J.L., MARCY, J.E., BARBEAU, W.E., DUNCAN, S.E., Stability of Natamycin and Its Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution, Journal of

Agricultural and Food Chemistry, 2003

[15] GINSULTAN.COM, Natamycin, Dostupné z:

[http://technicalinfo.ginsultan.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=67&Itemid=98](http://technicalinfo.ginsultan.com/index.php?option=com_content&view=article&id=67&Itemid=98)

[16] KAMENÍK, J., Technologie trvanlivých fermentovaných salámů z pohledu prevence vad finálních produktů, Maso, 2007

[17] HOLLEY, R.A., Prevention of Surface Mold Growth on Italian Dry Sausage by Natamycin and Potassium Sorbatet, 198

[18] PIPEK, P., ROHLÍK, B.-A., LOJKOVÁ, A., STARUCH, L., Suppression of mould growth on dry sausages, 2010

[19] REPS, A., JÖDRICHOWSKI, L., TOMASIK, J., WINNIEWSKA, K., Natamycin In Ripening Cheeses, 2002

[20] DAVIDSON, P.M., SOFOS, J.N., BRANEN, A.L., Antimicrobials in food, Third edition, 2005

[21] SCHLOSSER, E., Fast Food Nation: The Dark Side of All-American Meal, New York 2002

[22] DOKTORKA.CZ, O zdraví a kráse, Dostupné z: <http://www.doktorka.cz/>

[23] BEZKONZERVANTŮ, Jsou éčka součástí zdravé výživy?, Dostupné z: [www.bezkonzervantu.cz](http://www.bezkonzervantu.cz)

[24] ČESKÁ TECHNOLOGICKÁ PLATFORMA PRO POTRAVINY, Kyselina sorbová, Dostupné z: <http://www.ctpp.cz/cze/article/99-kyselina-sorbov-pomocnk-nebo-potenciln-hrozba.html>

[25] ZDRAVÁ STRAVA JAKO ŽIVOTNÍ STYL, Konzervační látky používané v potravinářství, Dostupné z: <http://skramlikova.wordpress.com/2011/04/26/konzervacni-latky-pouzivane-v-potravinarstvi/>

[26] ZÁKAZNÍKŮM.CZ, Benzoan draselný – E 212, Dostupné z: <http://www.zakaznikum.cz/clanek/benzoan-draselny-e-212/114>

[27] ORDINACE.CZ, Siřičitany, Dostupné z: <http://www.ordinace.cz/clanek/siricitany/>

- [28] FOOD-INFO, Šiřičitan vápenatý, Dostupné z: <http://www.food-info.net/cz/e/e226.htm>
- [29] WIKIPEDIE OTEVŘENÁ ENCKLOPEDIIE, Plísně, Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Plísně>
- [30] YEAST, WHAT IS YEAST? Dostupné z: [http://www.dakotayeast.com/yeast\\_what.html](http://www.dakotayeast.com/yeast_what.html)
- [31] SACCHAROMYCES GENOM DATABASE, What are yeasts?, Dostupné z: [http://www.yeastgenome.org/community/VL-what\\_are\\_yeast.shtml](http://www.yeastgenome.org/community/VL-what_are_yeast.shtml)
- [32] BROACH, J., R., PRINGLE, J., R., AND JONES, E., W., The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, New York 1991
- [33] LIBRARY 4 SCIENCE, Liquid chromatography, HPLC Mobile Phases, Dostupné z: <http://www.chromatography-online.org/HPLC/HPLC-Mobile-Phases/rs68.html>
- [34] KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE, Chromatografie, Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200720/hypertext/AJALB.htm>
- [35] MATUŠŮ, M., Obsah kofeinu v kávovém nálevu připraveném za různých podmínek, Zlín 2011
- [36] CHROMATOGRAFIE, Chromatografie, Dostupné z: [old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc)
- [37] SOMMER, L., Teoretické základy analytické chemie III, Chemická fakulta, Vysoké učení technické v Brně, Brno 1995
- [38] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, Platná legislativa, Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/predpisy-eu>
- [39] KMOTR, Masna Kroměříž, Dostupné z: <http://www.kmotr.cz/cs>
- [40] KRAHULÍK, Masokombinát Krahulčí, Dostupné z: <http://www.krahulik.cz/>
- [41] FIŠERA, M., VALÁŠEK, P., FOJTÍKOVÁ, L., Stanovení antimykotických přípravků na bázi natamycinu, Zlín 2010

## **SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

WHO	Světová zdravotnická organizace
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
RASFF	Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
ADI	Akceptovatelný denní příjem
TDI	Tolerovatelný denní příjem
GMO	Geneticky modifikované organismy
SDA	Diacetát sodný
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Oblast ultrafialového spektra
VIS	Oblast viditelného spektra

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Natamycin.....	20
Obr. 2: Kyselina octová.....	21
Obr. 3: Octan draselný.....	22
Obr. 4: Octan sodný.....	23
Obr. 5: Kyselina sorbová.....	24
Obr. 6: Sorban draselný.....	25
Obr. 7: Kyselina benzoová.....	26
Obr. 8: Benzoan sodný.....	28
Obr. 9: Benzoan vápenatý.....	29
Obr. 10: Aspergillus flavus.....	32
Obr. 11: Saccharomyces cerevisiae.....	34
Obr. 12: Chromatograf.....	36
Obr. 13: Klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroučkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6). .....	40
Obr. 14: Lovecký salám.....	47
Obr. 15: Poličan.....	48
Obr. 16: Paprikáš.....	49
Obr. 17: Selský salám.....	50
Obr. 18: Vysočina .....	51

## **SEZNAM TABULEK**

Tab. 1: Hodnoty ploch píku pro stanovení natamycinu.....	53
Tab. 2: Obsah natamycinu v loveckém salámu.....	54
Tab. 3: Obsah natamycinu v poličanu.....	55
Tab. 4: Obsah natamycinu v paprikáši.....	55
Tab. 5: Obsah natamycinu v selském salámu.....	55