

HODNOCENÍ ROBUSTNOSTI MARKERŮ AUTENTICITY POTRAVIN: KRITICKÝ PŘEHLED SE ZAMĚŘENÍM NA ISOTOPOVÝ POMĚR $^2\text{H}/^1\text{H}$ KYSELINY OCTOVÉ

ADÉLA GRÉGROVÁ^a, JIŘÍ MAZÁČ^b
a HELENA ČÍŽKOVÁ^a

^a Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6,

^b Celně technická laboratoř Praha, Budějovická 7, 140 96 Praha 4

Adela.Gregrova@vscht.cz; Helena.Cizkova@vscht.cz
mazac@cs.mfcr.cz

Došlo 17.9.15, přijato 12.11.15.

Klíčová slova: spolehlivost metody, autenticita potravin, syntetická kyselina octová, kvasný lihový ocet, isotopová analýza

Obsah

1. Úvod
2. Falšování kvasného lihového octa nedeklarovaným přídavkem syntetické kyseliny octové
3. Metody k posouzení autenticity kvasného lihového octa
4. Metodika hodnocení robustnosti markerů autenticity
5. Faktory ovlivňující robustnost $^2\text{H}/^1\text{H}$ poměru jako markeru autenticity
6. Závěr

1. Úvod

Vývoj, ověření a aplikace metod hodnocení autenticity potravin a detekce falšování představuje v současnosti jeden z aktuálních směrů jištění kvality. Jedním cílem je rozvíjení nových, zejména instrumentálních analytických postupů a rozšiřování možností posouzení autenticity rychleji, přesněji a levněji. Zároveň se jedná o trvalý souboj s velmi kompetentní protistranou těch nepoctivých výrobců, kteří jsou schopni velmi rychle postup falšování zdokonalit nebo nahradit tak, aby nebyl stávající metodou zjištěitelný¹.

Termín robustnost je nejčastěji využíván v různých inženýrských činnostech, v evoluční biologii a analytické chemii. Navzdory tomu, že je v odborné literatuře tento pojem často zmiňován, jen zřídka je definován a téměř nikdy kvantifikován².

Robustnost analytické metody (anglický ekvivalent je „ruggedness“ nebo „robustness“) je schopnost zachovat si svoji funkčnost navzdory mírnému (a nevyhnutelnému)

narušení/odchylkám a změnám parametrů metody (obecně obvyklé rutinní činnosti); poskytuje informaci o její spolehlivosti během běžného používání. Robustnost metody je tedy taková vlastnost metody, kdy malou změnou jejich parametrů poskytuje metoda stále správné a přesné výsledky^{3,4}.

Robustnost je možné definovat také jako míru vlivu mírného kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení či míru kapacity metody při jejím reprodukování za nepatrně změněných podmínek. Změna podmínek může nastat pro případ mezilaboratorních zkoušek (jiná laboratoř, analytik, instrument; ruggedness) nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (teplota, koncentrace, doba extrakce; robustness)^{3,4}.

Výsledkem posouzení robustnosti je pak informace o tom, jaké parametry (vlivy, faktory) mohou být kritické a vyžadují případnou (pečlivou) kontrolu. Výsledkem robustnosti může být také interval kritických parametrů metody, ve kterém metoda poskytuje nejmenší chyby měření^{3,4}.

Spolehlivost markerů autenticity a popsání a zhodnocení faktorů, které je v konkrétních případech ovlivňují, je významná pro vyvození správných závěrů o autenticitě nebo falšování konkrétního výrobku. Pod robustností markeru se, oproti definici podle matematické statistiky, skrývá především představa velmi stabilního chemického nebo fyzikálního parametru (látky, složky) charakteristického pro autentický výrobek nebo naopak indikujícího konkrétní způsob falšování. Zvolený marker je robustní, pokud při jeho použití pro zhodnocení autenticity výrobku bude, i v případě odchylky od běžného stavu (netradiční surovina, receptura apod.), závěr správný.

Následující vlastnosti (tj. základní požadavky na konkrétní marker autenticity) nejvíce ovlivňují robustnost zvoleného markeru autenticity potravin:

- přirozená variabilita jeho obsahu v surovinách;
- jedinečnost (přítomnost pouze ve sledované složce potraviny);
- stabilita během výroby a skladování finálního výrobku;
- dostupnost vhodné analytické metody a její spolehlivost pro kvantifikaci markeru.

Na konkrétním případě, tj. poměru přirozených isotopů $^2\text{H}/^1\text{H}$ kvasného octa falšovaného nedeklarovaným přídavkem syntetické kyseliny octové, je rozpracována metodika posouzení robustnosti tohoto markeru s ohledem na výše uvedené základní požadavky. Je diskutována jeho vhodnost, případné omezení pro hodnocení autenticity a dostupnost dalších nástrojů pro spolehlivé hodnocení uvedeného typu falšování.

2. Falšování kvasného lihového octa nedeklarovaným přídatkem syntetické kyseliny octové

Z pohledu autenticity octa je významným problémem 1) obtížné rozlišení mezi vysoce ceněným a kvalitním vinným nebo balzamikovým octem a jejich levnějšími alternativami ze sladu a lihu; 2) průkaz odhalení znehodnocení různých druhů octa přídatkem kyseliny octové nebiologického (syntetického) původu⁵.

Podezření z falšování kvasného lihového octa, tradičního českého výrobku, syntetickou kyselinou octovou se zakládá zejména na těchto znacích: nízká cena výrobku, vyšší koncentrace kyseliny octové v octu, nestandardní senzorické vlastnosti (intenzivní palčivost). Důvodem, proč se poměrně levný kvasný ocet nahrazuje ještě levnější syntetickou kyselinou, bývá vedle přímého zisku i výkyv v dostupnosti kvasného octa či lihu anebo výkyvy v ceně lihu.

Falšování octa syntetickou kyselinou octovou má negativní ekonomický dopad a může znamenat i zdravotní riziko. Pro ověření pravosti kvasného octa je nezbytné stanovit řadu nezávislých parametrů indikujících nedodržení technologického postupu, snížení obsahu přirozených složek suroviny nebo složek vznikajících při octovém kvašení.

3. Metody k posouzení autenticity kvasného lihového octa

V současnosti vyráběná kyselina octová je velmi čistá, a proto je přístup identifikace nežádoucích znečišťujících látek v syntetické kyselině octové stále obtížnější; naopak charakteristika specifických sloučenin pocházejících z kvasného procesu roste na významu. K prokázání syntetické kyseliny octové v octech lze využít např. stanovení makro- a mikroelementů, jejichž složení a obsah je v syntetické octové kyselině odlišný (např. vyšší obsah těžkých kovů)⁶ či analýzu aminokyselin – L-aminokyseliny mohou být využity jako markery kvasného procesu, minoritní D-aminokyseliny jako znaky zrání octa⁷.

Avšak jako stěžejní a nejčastější postupy jsou pro výše zmíněný účel využívány zejména následující postupy:

- senzorní analýza: senzorní analýza této matrice je obtížná zejména díky přítomnosti majoritní složky octů, kyseliny octové, která významně ovlivňuje celkové senzorní hodnocení. Doprovodné kvasné metabolity v nízkých koncentracích také ovlivňují chuť kvasných octů; lze předpokládat, že rezidua prekurzorů z výroby syntetické octové kyseliny zvyšují „ostrot“ chuti a vůně. Senzorické hodnocení octů je časově náročné a nákladné a z tohoto důvodu roste na významu propojení senzorní analýzy s instrumentací⁸.
- analýza těkavých látek: kvasný ocet obsahuje těkavé látky, které jsou charakteristické pro suroviny používané pro výrobu octa a proběhlý kvasný proces (např.

alifatické alkoholy, acetaldehyd, ethylacetát aj.). Těkavé látky v octech mohou být analyzovány např. pomocí destilace s vodní parou, headspace vzorkováním či SPME (mikroextrakce tuhou fází) ve spojení s plynovou chromatografií (např. GC-MS)^{8,9}; analýzou těkavých látek je např. možné rozlišit octy dle botanického a geografického původu, rozlišit vinné octy dle jejich kvality a druhu, posoudit proces octového kvašení a způsobů zpracování octů.

- analýza stabilních izotopů: k analýze jsou využívány zejména následující techniky: SNIF-NMR (²H-NMR; stanovení poměru stabilních izotopů vodíku ²H/¹H nukleární magnetickou rezonancí) a různé varianty IRMS (např. EA-IRMS; hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů; stanovení poměru ¹³C/¹²C)¹⁰. Poměry obsahu izotopů v dané molekule závisí na frakcionaci související s různými fyzikálními procesy, chemickými reakcemi anebo biochemickými cestami v rámci procesu tvorby molekuly¹¹. Isotopové techniky je možné využít zejména k určení botanického původu octa a k rozlišení přírodní a syntetické kyseliny octové. Poměry ²H/¹H pro autentický ocet se dle literárních zdrojů pohybují přibližně v rozmezí od 90 ppm do 110 ppm v závislosti na botanickém původu (C3 rostliny: 90–100 ppm; C4 rostliny: okolo 110 ppm) a pro syntetickou kyselinu octovou přibližně v rozmezí od 120 ppm do 140 ppm; jelikož přídatkem syntetické kyseliny octové ke kyselině octové z C3 rostlin nelze rozpoznat od kvasných octů z C4 rostlin, je doporučeno propojit stanovení ²H/¹H poměrů metodou SNIF-NMR také s analýzou poměrů ¹³C/¹²C; hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ se pro ocet kvasného původu pohybují od –30 ‰ do –10 ‰, pro syntetickou kyselinu octovou od –40 ‰ do –30 ‰ (cit.^{12–14}).

4. Metodika hodnocení robustnosti markerů autenticity

Při testování robustnosti vyvstává jako základní problém definování míry (velikosti) odchylky (parametru), resp. mírného kolísání úrovně. Při ověřování robustnosti existují dva zásadní přístupy:

- univariační (jednorozměrná) analýza dat⁴: měněn je jeden parametr (faktor) v čase a ostatní parametry (faktory) zůstávají fixní a je sledováno, jak ovlivní konečný výsledek;
- multivariační (vícerozměrná) analýza dat^{2,4,15}: robustnost metody vůči malým změnám je testována na základě plánovaných experimentů (DOE – design of experiments); ty mohou být buď úplné, nebo zkrácené (tzv. neúplné faktorové plány s různými algoritmy, které vyžadují nižší počet experimentů); cílem plánování experimentů je nalezení těch faktorů, které nejvíce ovlivňují hodnocený znak systému, případně je současně hledána optimální hodnota těchto faktorů.

Při každém plánování experimentů musí být předem definována účelová funkce Y (závislá proměnná, např. odezva, směrodatná odchylka apod.), která nabývá za optimálních podmínek určitého extrému a lze ji kvantitativně vyčíslit. Dále musí být určeny faktory X (nezávisle proměnné i vzájemně nezávislé), které významně ovlivňují hodnotu Y . Pokud je cílem práce zjistit, jaký má faktor vliv, je třeba provést experimenty se 2 (minimum a maximum) nebo více úrovnemi faktorů. V případě většího počtu sledovaných faktorů není možné z finančních i časových důvodů provádět úplné faktoriální experimenty (požadovaný počet kombinací roste exponenciálně s každým faktorem). Z tohoto důvodu byly navrženy různé algoritmy pro neúplné faktorové plány (např. Plackett-Burman, Taguchi), podle kterých lze provádět minimálně možný počet experimentů s maximálním množstvím informací³.

Analýza výsledků experimentů spočívá především v nalezení kombinace faktorů, která dává nejlepší výsledek Y a dále v určení relativního podílu jednotlivých faktorů na jakosti výstupu. K vlastní analýze je aplikována statistická technika ANOVA (analýza rozptylu).

Pro zhodnocení vlivu jednotlivých faktorů na celkovou robustnost isotopového poměru $^2\text{H}/^1\text{H}$ kvasného octa pro průkaz falšování octa nedeklarovaným přídavkem syntetické kyseliny octové byl v této studii použit úplný faktoriální experiment 2^k dále uvedené charakteristiky:

- počet faktorů v experimentu byl 4 ($k=4$, tzn. celkový počet experimentů 2^4 , z tohoto důvodu nebylo třeba provádět neúplné experimenty); posuzován byl vliv těchto faktorů na robustnost zvoleného markeru: přirozená variabilita, přítomnost v dalších surovinách, stabilita během výroby a skladování a spolehlivost analytické metody;
- faktory nabývaly dvou zvolených úrovní (minimum a maximum, označeny v návrhu experimentů čísly -1 a 1); jejich hodnoty, stejně tak jako optimální (střední) hodnota závislé proměnné Y , byly vybrány na základě údajů v literatuře i výsledků vlastních měření; kvůli možnosti srovnání výsledků robustnosti různých markerů byly do modelu dosazovány relativní poměry (např. $Y_1 = y_1/y_{\text{střední}} \times 100$);
- efektem faktoru byla rozemněna změna ukazatele Y (rozdíl průměrů odezev), kterou způsobí přechod tohoto faktoru z dolní úrovně (-1) na horní úroveň (1);
- interakce, což je kombinovaný účinek dvou faktorů, tzn. posouzení, zda účinek jednoho faktoru je závislý na hodnotě nastavení druhého faktoru, byly testovány, ale protože jejich efekt byl nevýznamný ($P > 0,05$), nebyly s ohledem na nezávislost faktorů do analýzy výsledků zahrnuty;
- postup hodnocení robustnosti byl založen na analýze rozptylu; před vlastní analýzou byla testována normalita a shodnost rozptylů.

5. Faktory ovlivňující robustnost $^2\text{H}/^1\text{H}$ poměru jako markeru autenticity

Jelikož jsou isotopové metody metodami relativními, je nezbytné získaná data porovnávat se známými databázovými či literárními hodnotami pro autentické vzorky.

Z tohoto důvodu je možné využít zjištěné hodnoty stabilních isotopů vybraných chemických prvků pro vyloučení hypotézy konkrétního původu, ale ne pro predikci charakteristiky vzorku neznámého (tj. v dostupné databázi neuvedeného) původu¹⁶.

Na základě literárních údajů je nutné v případě identifikace a kvantifikace nepovoleného přídavku syntetické kyseliny octové do kvasného octa zohlednit v souladu s výše uvedeným následující faktory, které mají na získané výsledky, tj. na zvolený marker autenticity – $^2\text{H}/^1\text{H}$ poměr, předpokládaný vliv:

- Zatímco jednotlivá chemická průmyslově vyráběná individua bývají ve složení i z pohledu isotopového rozptylu velmi homogenní, biologickou cestou vzniklé složky jsou značně proměnlivé, čemuž odpovídá i vysoká přirozená variabilita $^2\text{H}/^1\text{H}$ poměru v surovinách používaných obvykle pro výrobu kvasného lihového octa. Odchylka může být velká a správné určení původu vzorku závisí na dostupnosti, kvalitě a rozsahu existující databáze autentických vzorků¹⁶. Zatímco zhodnocení autenticity vinného nebo balzamikového octa vzhledem k rozsáhlé evropské a celosvětové databázi poměru přirozených isotopů vína a doporučeným postupům analýzy není problém, informace k ostatním druhům octa jsou v literatuře kusé (nedostatečná/omezená tabelovaná a literární data pro levnější druhy octů, např. kvasný lihový ocet).
- Poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$ je typický pro kvasný lihový ocet pocházející z C3 rostlin. Pro hodnocení směsí se však jeho jedinečnost snižuje, protože obdobný isotopový poměr mají i jiné zdroje kyseliny octové (C4 rostliny, syntetická výroba). V úvahu přichází jak ve světě nejběžnější výroba syntetické kyseliny octové postupem karbonylace methanolu, tak další postupy založené na přímé oxidaci uhlovodíků pocházejících z fosilních a rostlinných zdrojů a bakteriální oxidaci syntetického ethanolu¹⁷; tomu odpovídají i různé v literatuře uvedené hodnoty $^2\text{H}/^1\text{H}$ (od 124 do 137 ppm) a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$; od -42 do -27 ‰)¹².
- Při měření isotopových poměrů metodou SNIF-NMR má ztráta přesnosti oproti běžným analytickým metodám jedinečnou příčinu, hmotnostní diskriminaci, která vede k isotopické frakcionaci neodpovídající poměru přirozených isotopů původního vzorku. Z tohoto důvodu se jako zásadní jeví ověření a validace metody, při kterém musí být prokázáno, že buď k isotopové frakcionaci během přípravy vzorku nedochází, nebo je možno ji při interpretaci opakovatelně zohlednit¹⁶. V případě analýzy kyseliny octové je v dostupné literatuře uvedeno¹⁴, že na konečný výsle-

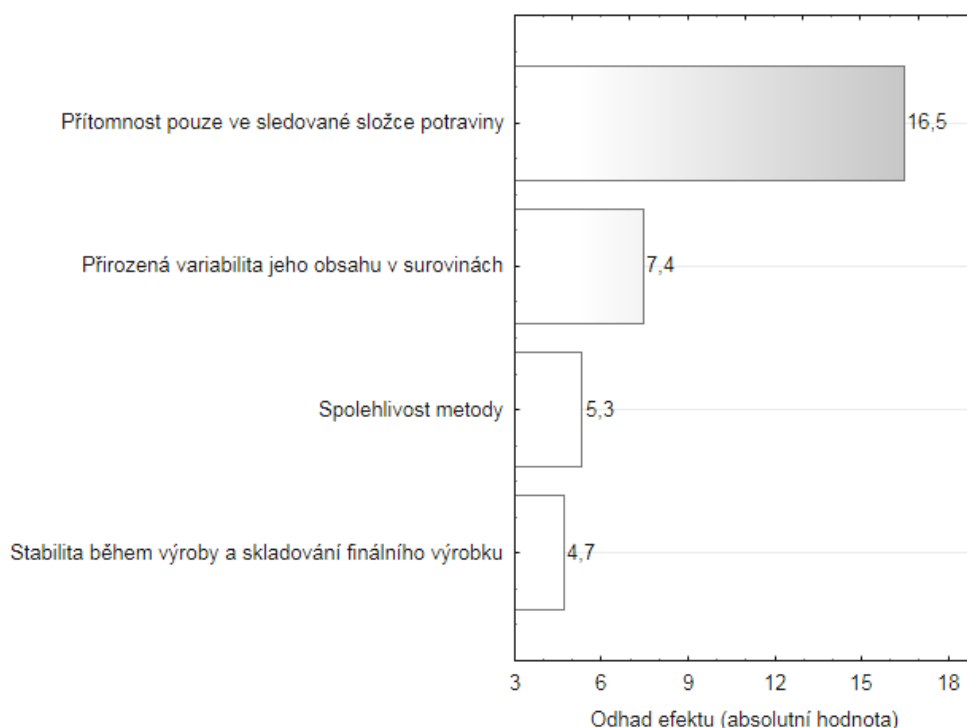
dek isotopové analýzy, v závislosti na použitém postupu, má vliv vstupní/původní koncentrace kyseliny octové (např. při ředění z 96% koncentrace na 5% a 1% vodný roztok dochází k posunu $^2\text{H}/^1\text{H}$ poměru methylové skupiny kyseliny octové z původní hodnoty 136,8 ppm na 135,6 ppm a 133,2 ppm). Dále byl studován a prokázán vliv správné přípravy vzorku, tj. provedení extrakce a rektifikace, a koncentrace použitého rozpouštědla či opakovatelnost dané instrumentální techniky^{14,16}. Během přípravy vzorků a v průběhu samotných analýz je kritické kontrolovat možný úbytek diethyletheru během extrakce kapalinou kapalinou (LLE) a nežádoucí smísení vodné a etherové vrstvy během extrakce¹⁸. Vzhledem k možnému riziku isotopové frakcionace při rektifikaci je nezbytné správné provedení destilace, což je možné ověřit bilancí kyseliny octové vzhledem k množství stanovenému v surovém vzorku, ve vodné vrstvě po extrakci a v destilátu po rektifikaci¹⁸. Kritickým bodem je také kontrola čistoty rektifikantu, tj. přečištěné a zakonzervované kyseliny octové¹⁸, a to s ohledem na množství zbytkové vody a přítomnost jiných organických (citronová, vinná, jablečná, jantarová, mléčná a propionová kyselina) a konzervačních (sorbová a benzoová kyselina) kyselin^{19–22}. Nezbytná je dále korektní příprava vzorku pro NMR měření a v případě IRMS je kritická těsnost a množství kyslíku a vlhkosti

v systému^{23,24}. Mezilaboratorní porovnání analýzy octa 11 evropských laboratoří poskytlo navzdory výše uvedenému velmi uspokojivé výsledky s průměrnou reprodukovatelností $^2\text{H}/^1\text{H}$ 1,62 ppm a $\delta^{13}\text{C}$ 0,91 ‰ (cit.²³).

- Změny v isotopovém poměru $^2\text{H}/^1\text{H}$ během výroby a skladování octa nejsou v literatuře popsány, lze však opět očekávat určitou míru isotopové frakcionace.

Paretův graf (obr. 1) efektů jednotlivých faktorů na robustnost poměrů přirozených isotopů pro průkaz přidavku syntetické kyseliny octové do kvasného lihového octa vychází z výše uvedených skutečností; umožňuje oddělit podstatné faktory od méně podstatných. Na ose x jsou znázorněny absolutní hodnoty efektů. Pro poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$ jsou statisticky významné ($P < 0,05$) následující 2 faktory: přítomnost pouze v kvasném lihovém octu (16,5; $P < 0,001$) a přirozená variabilita jeho obsahu v surovinách (7,4; $P = 0,02$). Relativní celková nejistota stanovení, bez koeficientu rozšíření, v tomto případě odpovídá absolutní hodnotě součtu statisticky významných efektů, tj. 23,9 %.

S ohledem na zjištěnou nejistotu je praktické využití postupu založeném na stanovení isotopového poměru $^2\text{H}/^1\text{H}$ pro hodnocení průkazu přidavku syntetické kyseliny octové do kvasného lihového octa samo o sobě nedostatečné. Pro interpretaci je proto nezbytné stanovit také poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a oba parametry současně vyjádřit např. grafickou metodou¹⁹, což nám poskytne komplementární informace



Obr. 1. Paretův graf efektů; vliv jednotlivých faktorů na robustnost poměrů přirozených isotopů $^2\text{H}/^1\text{H}$ jako indikátoru přidavku syntetické kyseliny octové do octa

k charakterizování botanického původu octové kyseliny a k detekci falšování octa syntetickou octovou kyselinou²⁴. V rámci studie Grégrová a spol.¹⁸ byla na základě analýzy modelových vzorků vytvořena grafická kritická linie pro autentické kvasné lihové octy, tj. $\delta^{13}\text{C} = 0,957 \times {}^2\text{H}/{}^1\text{H} - 124$. Vzorky nacházející se nad kritickou linií jsou prokázány jako nefalšované, tj. autentické, kdežto vzorky pod přímkou jsou podezřelé z přídavku více než 20 % syntetické kyseliny octové, popř. se jedná o vzorky syntetické kyseliny octové.

6. Závěr

Isotopový poměr ${}^2\text{H}/{}^1\text{H}$ je dostatečně robustní marker pro průkaz rozdílu mezi kvasným lihovým octem a syntetickou octovou kyselinou. Nicméně směsné vzorky, tj. směsi kvasného octa a syntetické kyseliny octové, není možné posuzovat pouze na základě analýzy poměru ${}^2\text{H}/{}^1\text{H}$ a je nutné stanovit taktéž isotopový poměr ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$. Isotopový poměr ${}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$ stanovený metodou IRMS může být využit jako marker potvrzující geografický původ vody, ze které byl ocet vyroben. Pro účel průkazu syntetické kyseliny octové by bylo možné aplikovat také scintilační metody založené na měření rozpadu uhlíku ${}^{14}\text{C}$ (cit.²⁵); perspektivní by mohla být také kombinace analýz isotopových poměrů ${}^2\text{H}/{}^1\text{H}$ a ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ společně s analýzou ${}^{14}\text{C}$. Rozšíření počtu stanovených parametrů by mohlo vést ke zpřesnění kritické koncentrace nedeklarované syntetické kyseliny octové v kvasných lihových octech.

Posouzení robustnosti zvolených markerů autenticity a tím i spolehlivosti celého postupu hodnocení, zda je výrobek autentický nebo falšovaný, není bohužel v řadě laboratoří samozřejmé a ani oficiální metody nebo postupy v odborné literatuře někdy všechny možné vlivy na interpretaci výsledků nezohledňují. Přitom poznání jednotlivých faktorů a tedy i základní znalost surovin a technologie vedle znalosti kritických míst vlastní laboratorní metody může významně zvýšit odborné kompetence komerčních, kontrolních a výzkumných laboratoří, které vybrané postupy pro hodnocení autenticity potravin používají. Ty pak ve spolupráci s poctivými výrobci, dovozci a prodejci mohou napomoci k dalšímu zlepšování autenticity potravin na tuzemském trhu.

LITERATURA

- Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Voldřich M.: Chem. Listy 106, 903 (2012).
- Walsh M. M.: J. Appl. Res. Mem. Cogn. 2, 137 (2013).
- HPLC: Validace v HPLC: Robustnost metody. http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_3.5_Robustnost_metody, staženo 9. září 2015.
- HPLC: Validace metody - HPLC: Robustnost. <http://www.hplc.cz/Validace/robustnost.html>, staženo 9. září 2015.
- Sun D.-W.: *Modern Techniques for Food Authentication*. Academic Press/Elsevier, Burlington 2008.
- Crews C.: *Authenticity of vinegars - Final Report*. Food Standards Agency, London 2004. http://tna.europarchive.org/20141103165934/http://www.foodbase.org.uk//admintools/reportdocuments/272-1-493_Vinegar_authenticity_draft_final_report.pdf, staženo 9. září 2015.
- Erbe T., Brückner H.: Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. A 207, 400 (1998).
- Tesfaye W., Morales M. L., García-Parrilla M. C., Troncoso A. M.: Trends Food Sci. Technol. 13, 12 (2002).
- Caligiani A., Acquotti D., Palla G., Bocchi V.: Anal. Chim. Acta 585, 110 (2007).
- Grégrová A., Čížková H., Mazáč J., Voldřich M.: J. Food Nutr. Res. 51, 123 (2012).
- Guillou C., Reniero F.: *Isotope methods for the control of food products and beverages*. IAEA, Vienna 1999. http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/003/33003282.pdf, staženo 9. září 2015.
- Remaud G., Guillou C., Vallet C., Martin G. J.: Fresenius' J. Anal. Chem. 342, 457 (1992).
- Martin G., Remaud G., Martin G. J.: Flavour Fragrance J. 8, 97 (1993).
- Hermann A.: Eur. Food Res. Technol. 212, 683 (2001).
- Miller I.: *DOE - Návrh a analýza experimentu s pomocí MINITAB®*. Interquality, Praha 2010.
- Meier-Augenstein W., Kemp H. F., v knize: *Wiley's Encyclopedia of Forensic Science*, kap. Stable Isotope Analysis: General Principles and Limitations. Wiley-Blackwell, New York 2012.
- Cheung H., Tanke R. S., Torrence P.: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- Grégrová A., Neradová E., Kružík V., Mazáč J., Havellec P., Čížková H.: Eur. Food Res. Technol. 239, 169 (2014).
- McFeeters R. F., Fleming H. P., Thompson R. L.: J. Food Sci. 47, 1859 (1982).
- McFeeters R. F.: J. Agric. Food Chem. 41, 1439 (1993).
- Tsuchida H., Kozukue N., Han G. P., Choi S. H., Levin C. E., Friedman M.: Postharvest Biol. Technol. 58, 129 (2010).
- Johanningsmeier S. D., McFeeters R. F.: Food Microbiol. 35, 129 (2013).
- Thomas F., Jamin E.: Anal. Chim. Acta 649, 98 (2009).
- Carter J. F., Barwick V. J. (ed.): *Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry*. FIRMS, Bristol 2011. http://www.forensic-isotopes.org/assets/IRMS%20Guide%20Finalv3.1_Web.pdf, staženo 9. září 2015.
- Tudyka K., Pawlyta J.: Food Chem. 145, 614 (2014).

A. Grégrová^a, J. Mazáč^b, and H. Čížková^a (^a *Department of Food Preservation, University of Chemistry and Technology, Prague,* ^b *Customs Technical Laboratory Prague*): **Evaluation of Robustness of Food Authenticity Markers: A Critical Review Focusing on ²H/¹H Isotope Ratio of Acetic Acid**

Reliability of food authenticity markers, as well as the description and evaluation of factors which in specific cases affect them, are important to reach the right decision about a particular product authenticity or an adulteration. Undeclared addition of synthetic acetic acid into spirit vinegar is a specific example of food adulteration; in this

case it is possible to prove vinegar authenticity using isotopic methods. Robustness of a particular marker of spirit vinegar authenticity, i.e. the ²H/¹H natural isotopes ratio, was evaluated. Natural variability of the marker content in raw materials, the influence of the formulation used, the processing and storage conditions of final product and finally the availability and performance characteristics of the analytical method (its reliability for the quantification of the marker) were assessed. Suitability of the ²H/¹H natural isotopes ratio and its limits were discussed along with the availability of other tools for reliable evaluation of this type of adulteration.