

STANOVENÍ SYNTETICKÝCH BARVIV V POTRAVINÁCH SEPARAČNÍMI METODAMI

ANDREA ŠLAMPOVÁ, DANA SMĚLÁ,
ALENA VONDRÁČKOVÁ, IRENA JANČÁŘOVÁ
a VLASTIMIL KUBÁŇ

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo dne 26.I.2000

Klíčová slova: potravinářská barviva, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, HPLC, CE

Obsah

1. Úvod
2. Barviva
 - 2.1. Syntetická barviva
3. Stanovení syntetických barviv v potravinách
 - 3.1. Metody důkazu a izolace syntetických barviv
 - 3.2. Stanovení syntetických barviv metodou HPLC
 - 3.3. Stanovení syntetických barviv metodou CE
4. Závěr

1. Úvod

Přibarvování poživatin má své opodstatnění nejen z hlediska estetického, ale i fyziologického, avšak důvodů pro přidávání barviv je více (znovu získat barevný vzhled potraviny, který se změnil během výrobního procesu, zajistit uniformitu výrobku ve všech výrobních šaržích, zlepšit vzhled potravinového výrobku aj.). Pro přibarvování se používají přírodní i syntetická barviva.

Povolení použití aditiva autorizované státem (a tedy i syntetických barviv) musí zajistit spotřebiteli zdravotní nezávadnost. To lze uskutečnit na základě znalostí o toxických vlastnostech každé aditivní látky (ze zdrojů Světové zdravotnické organizace WHO a Potravinářské a zemědělské organizace FAO jsou relativně dobře známy) a znalostí o skutečném konzumu každého typu potraviny v konkrétní komunitě. Tyto údaje hodljají zjišťovat země EU povinným monitorováním v každém členském státě. Druhy a počty povolených barviv se v jednotlivých zemích liší. Ve většině zemí je povoleno okolo deseti druhů syntetických barviv jakožto potravinářských aditiv. Nejvyšší povolené množství (NPM) těchto barviv v potravinách je stanoveno tak, aby ochraňovalo zájmy spotřebitele.

Daleko závažnější důsledky pro zdraví člověka mají nesprávná a nedostatečná výživa, přírodní toxické látky, mikrobiální kontaminace a kontaminanty. Dlouhodobý vliv některých aditiv na zdraví člověka není ještě zcela prozkoumán

a dodatečné výzkumy pak mnohdy odhalují chronické poškození zdraví. Skryté nebezpečí používání potravinářských aditiv (a tedy i syntetických barviv) by se tedy nemělo podceňovat. Výrobci musí dodržovat limity – NPM, jak jim ukládá zákon č. 110/1997 Sb. – o potravinách a tabákových výrobcích a prováděcí vyhlášky. Stálá kontrola orgány státního dozoru je zde zcela opodstatněná.

2. Barviva

Barviva jsou organické sloučeniny s takovou molekulární strukturou, která umožňuje absorpci světla ve viditelné části spektra a zároveň umožňuje fyzikální nebo chemickou vazbu s vybarvovaným substrátem. Barevnost je podmíněna rozsáhlým konjugovaným systémem dvojných vazeb v molekule barviva¹. Nositel barevnosti jsou skupiny obsahující dvojnou vazbu, tzv. chromofory (skupina azo-, nitro-, nitroso-, karbonylová). Vlastní sloučenina nesoucí chromofory se nazývá chromogen. Intenzitu zbarvení a afinitu k substrátu zvyšují auxochromy (skupina hydroxy-, amino-, alkylamino-). Nejdůležitějšími skupinami rostlinných barviv (pigmentů) jsou karotenoidy, flavonoidy, anthrachinony, betalainy a pyrrolová barviva²⁻⁹. Rostlinné pigmenty se používají jako zdravotně nezávadná barviva v potravinářském průmyslu, farmacii, kosmetice a jejich využití se neustále rozšiřuje.

2.1. Syntetická barviva

Syntetických barviv je vyráběn velký počet. Jde o průmyslově vyráběné barevné sloučeniny, které se syntetizují z velkého množství polotovarů, založených na produktech zpracování ropy a dehtu, proto se často nazývají dehtová barviva. U řady syntetických barviv, zejména u barviv rozpustných v tucích, byly zjištěny kancerogenní účinky (např. u máslové žlutí, která byla používána k barvení ztužených tuků – margarínů). U mnohých syntetických barviv je také prokázáno hemolytické působení, inhibice některých enzymů a negativní působení na žaludeční sekreci. Mohou škodit také obsahem reziduí z výroby (různých uhlovdíků, těžkých kovů aj.). Některá syntetická barviva (tartrazin, amarant, erythrosin) jsou podstatně méně akceptovatelná než ostatní. Je třeba na to pamatovat zejména při náchylnosti k alergiím.

Podle chemické povahy lze řadit syntetická potravinářská barviva do několika skupin. Jsou to azobarviva mono- i polyfunkční, di- a trifenylmethanová barviva, nitrobarviva, pyrazonová, xanthenová, antrachinonová, chinolinová a indigoidní barviva. Většina ve vodě rozpustných barviv je kyselá povahy. Obsahují ve své molekule jednu nebo několik sulfoskupin a jsou používána ve formě sodných solí, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě. Z hlediska legislativy jsou velmi důležité i důkazy přibarvování potravin syntetickými barvivami, především se zřetelem k dodržování příslušných zdravotnických norem¹⁰.

Povolení k používání veškerých aditiv je podmíněno celou řadou zdravotních zkoušek. Patří mezi ně například zjištění

akutní toxicity (LD-50) u pokusných zvířat, tj. dávka látky, která usmrtí 50 % jedinců, subchronické a chronické toxicity, kancerogenity, mutagenity, teratogenity, kumulace v organismu, bioenergetické účinky, vliv na imunitu a některé další účinky. Bývá určen povolený denní příjem (ADI – acceptable daily intake), který vychází z pokusů na zvířatech. Podle doporučení WHO se zjistí koncentrace látky, která ještě nemá pro pokusné zvíře žádné toxické působení, tato hodnota se sníží 100× a vyjadřuje ADI pro člověka (v mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti)¹¹.

Potravinářská barviva musí splňovat i další požadavky. Nesmí nepříznivě ovlivnit ostatní organoleptické vlastnosti přibarvené potraviny, zejména pak chuť a vůni. Musí mít vysokou barevnou mohutnost a být dobře rozpustná ve vodě. Nesmí docházet k interakcím s jinými složkami potravin. Barvivo musí být stálé vůči změnám pH, oxidačně redukcí vlivům, vůči světlu, teplu a u pevných potravin i vůči vlhkosti. Musí být ekonomicky dostupné a přijatelné a musí splňovat požadavky na obsah hlavní složky a přítomnost vedlejších složek¹². Ve smyslu zákona č. 110/1997 Sb. a vyhlášky MZ ČR č. 298/1997 Sb. jsou za barviva považovány látky získané z potravin a dalších složek přírodního původu extrakcí fyzikální a chemické povahy, která má za následek selektivní oddělení barevné látky.

Potraviny, chuťové a aromatické látky a jejich složky, které se přidávají během výroby do potravin pro své aromatické, chuťové nebo výživové vlastnosti a přitom mají sekundární barvicí účinek, jako např. mletá paprika, šafrán a kurkuma a dále barviva, určená k barvení nejedlých vnějších částí potravin, jakými jsou např. povrchové povlaky sýrů a salámová střeva, se za barviva ve smyslu této vyhlášky nepovažují. Seznam barviv povolených k barvení potravin je uveden v tabulce I. K přibarvování se obvykle nepoužívají všechna povolená barviva společně, ale maximálně kombinace dvou až tří barviv. Mezi nejčastěji používaná barviva na přibarvování potravin patří: chinolinová žluť, žluť SY, tartrazin, ponceau 4R, indigotin, azorubin, brilantní modř, zeleň S, brilantní čerň a amarant.

Nejvyšší povolená množství¹² jsou vztažena na potravinu připravenou k používání podle návodu výrobce (pokud příprava před spotřebou vyžaduje). Při použití v kombinaci se hodnota týká celkového množství použitých barviv. U skupiny vyjmenovaných potravin (např. odrůdová vína) nesmí být použita žádná syntetická barviva.

3. Stanovení syntetických barviv v potravinách

Zájem hygieniků o potravinářská syntetická barviva vzrostl, když u řady běžně používaných syntetických barviv byly vystopovány pravděpodobné kancerogenní účinky. Výsledkem je i zákaz používání některých lipofilních syntetických barviv pro potravinářské účely ve většině států. To se týká rovněž úplného zákazu používání barviva ponceau 4R (E 124) na celém území USA a Velké Británie. Podobný osud potkal v USA i amarant (E 123) a erythrosin (E 127). V České republice upravuje barvení potravin zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích, který používání barviva ponceau 4R (E 124), amarant (E 123) i erythrosin (E 127) povoluje i přes dosud nepotvrzené podezření na pravděpodobné kancerogenní účinky.

Tabulka I

Barviva, která smějí být používána k výrobě potravin jednotlivě či v kombinaci až do nejvyššího povoleného množství (NPM)

Číslo	Barvivo
E 100	kurkumin
E 104	chinolinová žluť
E 120	košenila, kyselina karmínová, karmín
E 124	ponceau 4R
E 131	patentní modř V
E 133	brilantní modř
E 151	čerň BN
E 160 d	lykopen
E 160 f	ethylester kyseliny beta-apo-8'-karotenové
E 102	tartrazin
E 110	žluť SY
E 122	Azorubin
E 129	červeň Allura AC
E 132	indigotin
E 142	zeleň S
E 155	hněd HT
E 160 e	beta-apo-8'-karotenol
E 161 b	lutein

Z uvedeného vyplývá nutnost neustálého zkoumání rizik používaných syntetických barviv na lidské zdraví, s čímž souvisí i rozvoj metod zabývajících se měřením hodnot koncentrací syntetických barviv v potravinářských výrobcích.

3.1. Metody důkazu a izolace syntetických barviv

Nejznámější postupy důkazu přítomnosti syntetických barviv v různých druzích potravinářských výrobků, jsou vybarvovací zkoušky na odtučněném vlněném vlákne a nebo se používají extrakční způsoby pomocí organických rozpouštědel. Kyselá barviva se dají izolovat extrakcí *n*-amylalkoholem a následnou vícenásobnou extrakcí do vody²³. U tuhých vzorků se používá k extrakci amoniakální roztok methanolu a ethanolu²⁴. Používaným způsobem izolace je také adsorpce na polyamid^{23,25}, kaolin, přírodní křemičitan hlinitý, aktivní uhlí²⁶. U kapalných vzorků se dokazuje přítomnost barviv přímo, z tuhých vzorků je po homogenizaci třeba barviva extrahovat vodou. Pokud vzorek obsahuje víc než 5 % tuku, je třeba ho nejprve extrahovat petroletherem.

Z bílého vlněného vlákna se nejprve odstraní tukové složky a nečistoty (extrahuje se petroletherem, po usušení se zahřívá v 5 % (m/m) NH₃ a nakonec se vypere vodou). Takto připravené vlákno se namočí do roztoku vzorku a při 70–100 °C se po dobu 10–30 minut nechá adsorbovat syntetické barvivo. Zároveň se však adsorbují také antokyaniny, pokud jsou přítomny. Ty se ale odstraní následným vypráním ve studené vodě. Pokud zůstane vlákno po vyprání zbarvené, je to důkaz přítomnosti syntetických barviv ve vzorku.

U metody vybarvování polyamidového prášku se při izolaci umělých barviv ze vzorku postupuje stejně jako v prvním

případě. Vodný roztok barviv se smísí s polyamidem, protřepe a přefiltruje. Polyamid zachycený na filtru se pak promývá 2 % (m/m) roztokem kyseliny octové v methanolu. Tím se odstraní přírodní barviva. Jestliže i po tomto promytí zůstane polyamid zabarvený, byla prokázána přítomnost syntetických barviv. Ve srovnání s vybarvováním vlněných vláken je tato metoda citlivější, méně časově náročná a poskytuje větší kvantitativnost adsorpce.

3.2. Stanovení syntetických barviv metodou HPLC

Při identifikaci jednotlivých barviv se využívají spektrální metody v UV a viditelné oblasti, charakteristika absorpčních spekter, fluorescence. Dříve se ke stanovení potravinářských barviv využívalo především chromatografických^{13–26}, spektrofotometrických^{27,28} a elektrochemických metod²⁹. V současnosti největší počet metod spadá do oblasti chromatografických a elektromigračních metod^{13–26,30–58}. Často se využívá i chemometrie⁵⁹.

V minulosti se jakožto metody analýzy potravinářských barviv používaly především chromatografické metody (papírová, tenkovrstvá a kolonová). V současnosti se nejvíce využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, iontově párová chromatografie a iontově výměnná chromatografie.

Syntetická barviva (tartrazin, chinolinová žluť, azorubin, košenila, erythrosin, patentní modř V, indigotin, zeleň S, brilantní černá BN) byla separována⁴² metodou HPLC na koloně LICHROSORB RP-18 gradientovou elucí mobilní fázi CH₃OH a fosfátový pufr (pH 7,8). Barviva byla v eluátu detegována spektrofotometricky s detekčním limitem v rozmezí 0,5–2,0 µg.ml⁻¹ (tab. II).

Pro rozdělení a stanovení syntetických barviv (amarant, chinolinová žluť, žluť SY, zeleň S) ve vzorcích nealkoholických nápojů na koloně⁴³ SPHERISORB byla použita směs acetonitril:methanol:tlumivý roztok 17,5:12,5:70 (v/v). Doba analýzy byla pouze 4 minuty. Detekce byla provedena spektrofotometricky.

K separaci 15 barviv⁴⁴ na koloně ULTRASPHERE ODS byla použita gradientová eluce mobilní fázi tvořenou směsí roztoku síranu sodného o $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (pH 2,5 upraveno přidávkem H₃PO₄) a roztoku Na₂SO₄ ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$):H₂O:CH₃OH v poměru 1,5:7:22 (v/v). Žlutá barviva byla detegována spektrofotometricky při 430 nm, červená při 520 nm a zelená a modrá při 640 nm.

Vhodnost metody HPLC pro stanovení syntetických barviv v potravinách⁴⁵ byla ověřena mezilaboratorním testem (12 veřejných a státních laboratoří (GB) a jedné dánské státní laboratoře) na 6 vzorcích limonád a 2 vzorcích piškotových buchet. Z nealkoholických nápojů byla barviva nejdříve zachycena na kolonu s polyamidem. K separaci bylo použito chromatografického systému s reverzní fází na koloně SPHERISORB C8 s mobilní fází methanol:KH₂PO₄ (5 mmol.l⁻¹) s poměrem obou složek 50:50 (v/v) až 60:40 (v/v). Vlnová délka pro detekci (v rozmezí 430–640 nm) byla volena podle druhu barviva.

Pro separaci a stanovení 11 syntetických barviv v 21 vzorcích nealkoholických nápojů⁴⁶ metodou iontově párové HPLC izokratickou elucí na chromatografické koloně DEVE-

Tabulka II

Přehled podmínek chromatografické separace (HPLC) syntetických barviv

Sorbent	Eluce	LOD [µg.ml ⁻¹]	Lit.
LICHROSORB RP-18 ^a	gradientová	0,5–2,0	42
SPHERISORB ^b	gradientová		43
ULTRASPHERE ODS ^c	gradientová		44
SPHERISORB C8 ^d			45
DEVELOFIL ODS 5 ^e	izokratická	0,05–0,2	46
COSMOSIL 5 C18-R ^f	gradientová	0,1–0,5	47
DIONEX ION PAC AS11 ^g			48
SEPHARON SGX C18 ^h	gradientová i izokratická		49
HYPERSIL BDS ⁱ	gradientová	<ng	50
SEPHARON SGX C18 ^j	izokratická	0,2–0,4	57,58

^a CH₃OH + fosfátový pufr (pH 7,8), ^b acetonitril:methanol:tlumivý roztok 17,5:12,5:70 (v/v), ^c Na₂SO₄ ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 2,5 upraveno přidávkem H₃PO₄) + Na₂SO₄ ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$):H₂O:CH₃OH v poměru 1,5:7:22 (v/v), ^d methanol:KH₂PO₄ (5 mmol.l⁻¹) 50:50 (v/v) až 60:40 (v/v), ^e acetonitril:50 mmol.l⁻¹ NaH₂PO₄, obsahující 2 mmol.l⁻¹ cetyltrimethylamoniumchloridu a 3 mmol.l⁻¹ tetra-*n*-hexylamoniumbromidu (pH 3,0) = 3:2 (v/v), ^f acetonitril + 0,015 mol.l⁻¹ tetrabutylamonium-hydroxidu, ^g HCl:acetonitril, ^h methanolickejší a vodný roztok TBAB o $c = 5 \text{ mmol.l}^{-1}$, ⁱ NaH₂PO₄ ($c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$) a tetrabutylamonium-dihydrogenfosfát ($c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$) o pH 4,2 a acetonitrilu, ^j 50 mmol.l⁻¹ fosfátový pufr a 5 mmol.l⁻¹ tetrabutylamonium-hydroxid (TBAOH) o pH 4,2 v 30 % resp. 38 % (v/v) acetonitrilu

LOSIL ODS 5 byla použita směs acetonitril:50 mmol.l⁻¹ NaH₂PO₄, obsahující 2 mmol.l⁻¹ cetyltrimethylamoniumchlorid a 3 mmol.l⁻¹ tetra-*n*-hexylamoniumbromid (pH 3,0) = 3:2 (v/v). Před nadávkováním na HPLC kolonu byla barviva z nealkoholických nápojů nejdříve zachycena na kolonu s polyamidem. Barviva byla detegována spektrofotometricky s detekčními limity v rozmezí 0,05–0,2 µg.ml⁻¹.

Ke stanovení syntetických barviv v nealkoholických nápojích a bonbonech⁴⁷ metodou iontově párové HPLC byl vzorek rozpuštěn ve vodě a přidávkem kyseliny octové upraven na pH 3–4. Přečištění roztoku bylo provedeno přes Sep-Pak NH₂ kolonu. Barviva byla eluována 50 % (v/v) roztokem ethanolu obsahujícím 1 % NH₃. Po neutralizaci eluátu kyselinou octovou byla vlastní separace barviv provedena na koloně COSMOSIL 5 C18 – AR gradientovou elucí směsí acetonitril a 0,015 mol.l⁻¹ roztok tetrabutylamonium-hydroxidu. K detekci barviv byl použit UV/VIS spektrofotometr, přičemž červená a modrá barviva byla detegována při vlnové délce 550 nm, žlutá barviva při 450 nm. Detekční limity barviv byly 0,1–0,5 µg.g⁻¹ resp. µg.ml⁻¹ vzorku.

Separace a stanovení 8 syntetických barviv (amarant, brilantní modř, new red, indigotin, ponceau 4R žluť SY, tartrazin, červeně allura) v nealkoholických a instantních nápojích metodou HPIC (high – performance ion chromatography) byla provedena s využitím gradientové eluce na aniontové – vý-

měnné koloně DIONEX ION PAC AS11 s velmi nízkou hydrofobicitou⁴⁸. Mobilní fázi tvořila směs HCl:acetonitril. Barviva byla detegována spektrofotometriky. Pro amarant, ponceau 4R a new red byla jako kompromis zvolena detekční vlnová délka 525 nm, pro žluť SY a červeně allura 480 nm, pro tartrazin 430 nm a pro brilantní modř a indigotin 625 nm. Metoda nevyžadovala časově náročné přečištění, které se používá u běžné kapalinové chromatografie.

Zkušební metoda⁴⁹ ČZPI pro stanovení syntetických potravinářských barviv v nápojích, sirupech, cukrovinkách apod., používá metodou HPLC na koloně Sepharon SGX C18 (3×150 mm) s velikostí částic 7 μm a gradientové eluce, popřípadě izokratické eluce (pro barviva s vyššími retenčními časy). Mobilní fázi je směs methanolického a vodného roztoku TBAB o $c = 5 \text{ mmol.l}^{-1}$. Žlutá a červená barviva lze spektrofotometriky detegovat při 480 nm (chinolinová žluť při 420 nm), modrá při 590 nm. Syntetická barviva jsou nejdříve vyextrahována z poživatiny ve vodném prostředí. Po jejich adsorpci na polymerní sorbent jsou odstraněny látky, které mohou rušit stanovení (sacharidy, přírodní barviva aj.), syntetická barviva jsou eluována směsí $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_3 = 90:10$ (v/v) a eluát je zahuštěn na vakuové odparce.

Pro stanovení syntetických barviv (tartrazinu, amarantu, ponceau 4R, žluť SY, erytrosinu a šarlatové červeně) v potravinách⁵⁰ gradientovou eluci na koloně HYPERSIL BDS (125×3 mm, 3 μm) byly zhodnoceny 4 různé mobilní fáze a jako nejlepší byla doporučena směs roztoku NaH_2PO_4 ($c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$) a tetrabutylamonium-dihydrogenfosfát ($c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$) o pH 4,2 a acetonitrilu (dále ACN). Při použití dvou posledně uvedených fází (NaH_2PO_4 , $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$) + tetrabutylamonium-hydrogensulfát ($c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ o pH 4,8) a ACN; octan amonný ($c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$ o pH 4,9) a ACN a NaH_2PO_4 ($c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$ o pH 4,3 a ACN) docházelo k mírné deformaci píků barviv obsahujících sulfoskupiny (tartrazin, amarant, azorubin, žluť SY).

3.3. Stanovení syntetických barviv metodou CE

Ke stanovení syntetických přídavných barviv v potravinách se stále častěji využívá elektromigračních metod, a to především kapilární elektroforézy. Jedná se o kyselá (azo- a triarylmethanová) aniontová barviva obsahující karboxy-, sulfo- nebo hydroxyskupiny, které v zásaditém prostředí tvoří negativně nabitě barevné ionty. Kapilární elektroforéza je tedy ideální metodou ke stanovení těchto látek, neboť je schopna separovat všechna barviva s rozdílnými funkčními skupinami během jedné analýzy a v krátkém čase. Další nezanedbatelnou výhodou je velmi malá spotřeba vzorku (tab. III).

Ke stanovení syntetických barviv v potravinových vzorcích⁵¹ metodou kapilární izotachoforézy byl použit izotachoforetický analyzátor ZKI 01 s vodivostním detektorem. Jako vedoucí elektrolyt byl zvolen 10 mmol.l^{-1} roztok HCl s β -alaninem o výsledném pH 3,5 a přídavkem 0,1 % roztoku methylhydroxyethylceluosu. Koncový elektrolyt byl tvořen 5 mmol.l^{-1} kyselinou octovou. Vzorky byly analyzovány při proudu $300 \mu\text{A}$ v předseparační koloně a $50 \mu\text{A}$ v analytické koloně. Doba analýzy byla 30 minut. V některých případech, kdy vzorek obsahoval kombinaci syntetických barviv s indigotinem byl rozdíl pohyblivosti jednotlivých barviv velmi malý a detektor je nezaznamenal. V takovém případě byl

použit selektivní fotometrický detektor ve viditelné oblasti spektra.

K identifikaci 11 potravinářských barviv metodou⁵² CZE pomocí izotachoforetického analyzátoru EA 100 s úpravou pro metodu CZE v hydrodynamicky uzavřeném systému byl aplikován elektrolytový systém (ES) nosný anion: 30 mmol.l^{-1} TES (kyselina *N*-tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethan sulfonová), protiion: 8 mmol.l^{-1} imidazol, 2 % PEG (polyethylenglykol) a 6 mmol.l^{-1} β -cyklodextrin. Výsledné pH ES bylo 6,84. Doba analýzy byla 600 s při hnacím proudu $140 \mu\text{A}$. Díky jednoduchému uspořádání přístroje, krátké době analýzy a malé spotřebě nosného elektrolytu a vzorku byla tato metoda zhodnocena jako nejméně finančně náročná k identifikaci syntetických barviv v poživatinách.

V případě použití metody kapilární zónové elektroforézy⁵³, kdy byl jako základní elektrolyt použit 20 mmol.l^{-1} borátový pufr adjustovaný na pH 7–9 bylo možné stanovit šest základních syntetických potravinářských barviv s detekčním limitem $3 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pro jednotlivá barviva. Reprodukovatelnost migračních časů %RSD byla pod 1 % a pro plochy píků pod 5 %. K separaci bylo použito elektrokinetické dávkování vzorku při 4 kV po dobu 14 s, analytické napětí 25 kV, teplota 18°C a vlnová délka pro detekci 220 nm. Měření bylo provedeno na CE systému s CV⁴ CE absorpčním detektorem s křemennou kapilárou 60 cm dlouhou s $75 \mu\text{m}$ i.d.

Další tým autorů⁵⁴ stanovoval potravinářská barviva na elektroforetickém systému HCZE-30 PNO.25-LSD s on-column detekcí (875-CE UV-VIS detektor). K separaci jednotlivých barviv byl použit jako elektroforetický pufr 20 mmol.l^{-1} tetraborátový pufr pH 7,5 a kapilára o celkové délce 77 cm a $50 \mu\text{m}$ i.d., analytické napětí 25 kV a hydrostatické dávkování vzorku.

Stanovení potravinářských aditiv na CAPI-3000 systému s křemennou kapilárou $75 \mu\text{m}$ i.d. o celkové délce 50 cm MEKC popisuje práce⁵⁵. K detekci byl použit diode-array detektor s rozsahem absorbancí 190–600 nm. Elektroforetický pufr byl tvořen směsí 25 mmol.l^{-1} fosfátového a 25 mmol.l^{-1} borátového pufru 1:1 o pH 8,0 obsahující 10 mmol.l^{-1} SDS. Separace probíhala při 25°C a 10 kV. Při použití hydrostatického dávkování bylo během 20 minut separováno sedm syntetických barviv s RSD migračních časů 0,7 % a ploch píků 5,1 % a detekčním limitem ca. $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

HP^{3D}CE systém s vestavěným diode-array detektorem a HP^{3D}CE ChemStation softwarem⁵⁶ byl použit pro separaci v křemenné kapiláře $50 \mu\text{m}$ i.d. a 64,5 cm celkové délky při 30°C a 30 kV. Z celé řady použitých elektroforetických pufrů (borát, CAPS, fosfát) byl jako optimální vybrán 10 mmol.l^{-1} fosfátový pufr s 5 mmol.l^{-1} hydrogenuhlíčanovým pufrem o celkovém pH 10,5. Vzorek byl vpraven do separační kapiláry hydrodynamicky $100\text{--}200 \text{ mbar.s}^{-1}$. Bylo dosaženo separace s RSD migračních časů pod 0,5 % a ploch píků mezi 2–4 %. Mez stanovitelnosti LOQ (10.S/N) byl $0,5\text{--}1 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Syntetická barviva v bonbonech, pudincích, vínech, sirupech, limonádách, instantních a nealkoholických nápojích byla souběžně stanovena kapilární elektroforézou (CE) a kapalinovou chromatografií (HPLC) s diode-array detekcí^{57,58}. Výsledky obou metod byly ve velmi dobré shodě s výsledky UV-VIS spektrofotometrie. Jako základní elektrolyt pro CE byl zvolen borát/fosfátový pufr pH 9,0 ($12,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ borátový pufr a $12,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ fosfátový pufr 1:1) obsahující 40 mmol.l^{-1} dodecylsulfát sodný (SDS). Pro HPLC separaci

Tabulka III
Přehled podmínek separace syntetických barviv elektromigračními metodami

Mód CE	Elektrolyt	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Lit.
ITP	ved. – 10 mM-HCl + β -alanin (pH 3,5) + 0,1 % methylhydroxycelulosa konc. – 5 mM kys. octová	–	51
CZE na ITP analyzátoru	30 mM TES (nosný ion) + 8 mM imidazol, 2 % PEG + 6 mM β -C (protiion) pH 6,8	–	52
CZE	20 mM borátový pufr pH 7–9	3	53
CZE	20 mM tetraboritanový pufr pH 7,5	1–3	54
MEKC 2	5 mM fosfátový + 25 mM borátový pufr 1:1 + 10 mM SDS	1	55
CZE	5 mM hydrogenuhličitanový pufr pH 10,5	0,5–1	56
MEKC	12,5 mM borát. + 12,5 mM fosfátový pufr 1:1 + 40 mM SDS	0,5– 1	57,58

na koloně Sepharon SGX C18 (3 \times 150 mm, 5 μm) byla jako mobilní fáze zvolena směs (30:70 v/v) acetonitrilu s vodným roztokem 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru a 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tetrabutylamonium-hydroxidu (TBAOH) o pH 4,2. Relativní směrodatná odchylka pro jednotlivá stanovení byla menší než 0,5 % pro migrační časy a menší než 3 % pro plochy elektroforetických píků, menší než 0,9 % pro retenční časy a menší než 2,4 % pro plochy píků. Mez stanovitelnosti LOQ (10.S/N) pro jednotlivá přídatná barviva byl 0,5–1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při použití separační kapiláry o celkové délce 50 cm a 50 μm i.d., separačním potenciálem 30 kV, teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ a hydrodynamickém dávkování vzorku při tlaku 50 mbar po dobu 10 s, a/nebo 0,2–0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro HPLC.

4. Závěr

Pro stanovení obsahu jednotlivých syntetických barviv ve vzorcích potravin, v nápojích a jejich koncentracích lze použít řadu separačních a optických metod (LC, CE, UV/VIS spektrofotometrie). Výsledky všech metod jsou obvykle ve velmi dobré shodě s výjimkou vzorků obsahujících směs barviv s podobnými absorpčními maximy. V tomto případě je jednoduchá metoda UV/VIS spektrofotometrie zatížena velkou chybou 10–15 %. Metoda je výhodná především u vzorků s jednoduchou maticí. V případech složitějších směsí barviv nebo barviv s podobnými optickými charakteristikami je vhodné použít více či méně komplikované postupy vícerozložkové analýzy (PLS, nelineární regrese atd.).

Kapilární elektroforéza poskytuje velmi dobré výsledky i postačující citlivost stanovení. Její hlavní výhodou je především malá spotřeba vzorku a základního elektroforetického pufru, a krátká doba analýzy. Určitou nevýhodou CE ve srovnání s HPLC je nutnost oddělení látek ze vzorku, které by mohly mít za následek ucpání separační kapiláry. Uvedená metoda dává velmi dobré výsledky nejen v oblasti syntetických barviv potravinářských, ale i dalších barviv obsahujících alespoň jednu sulfo-, karboxy-, nebo hydroxyskupinu. Tato barviva v neutrálním nebo zásaditém prostředí tvoří negativně nabitě ionty a to umožňuje jejich snadné a rychlé stanovení metodou kapilární elektroforézy. Naopak u přírodních barviv se tyto skupiny nevyskytují vůbec nebo jen velmi ojediněle a to spolu s velikostí molekul jednotlivých přírodních barviv

komplikuje jejich stanovení kapilární elektroforézou.

Ke stanovení těchto barviv je mnohem jednodušší využít metodu HPLC, která je dokonale propracovanou metodou. LC dovoluje separaci ionogenních i neionogenních barviv, vyznačuje se jednoduchostí kvantifikace a v neposlední řadě i snadností identifikace barviv na základě jejich spektrálních charakteristik (UV-VIS, IR, MS atd.). V řadě případů odpadá složitá úprava vzorků před vlastní separací, citlivost stanovení je často o více než jeden řád lepší a pro většinu případů se vyznačuje i dostatečnou separační účinností.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, grant. reg. č. VS 97014.

LITERATURA

1. Kvasil B.: *Malá československá encyklopedie*, 1. vyd., str. 365. Academia, Praha 1984.
2. Vodrážka Z.: *Biochemie* [3], 1. vyd., str. 70. Academia, Praha 1993.
3. Davíček J., Janíček G., Pokorný J.: *Chemie potravin*, str. 268. SNTL/ALFA, Praha 1983.
4. Hrazdina G., Borzell A. J., Robinson W. B.: *Am. J. Enol. Vitic.* 21, 201 (1970).
5. Jurd L.: *The Chemistry of Plant Pigments*. Academic Press, New York 1972.
6. Robinson W. B., Weirs L. D., Bertino J. J., Mattick L. R.: *Am. J. Enol. Vitic.* 17, 178 (1966).
7. Riberau-Gayon P.: *Plant Phenolics*. Oliver and Boyd, Edinburgh 1972.
8. Asen S., Stewart R. N., Norris K. H.: *Phytochemistry* 11, 1139 (1972).
9. Asen S.: *Acta Horticult.* 63, 217 (1976).
10. Davíček J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, str. 532. SNTL, Praha 1977.
11. Stratil P.: *ABC zdravé výživy*, díl 1., str. 332. Vlastním nákladem, Brno 1993.
12. Vyhláška MZ ČR č.2 98/1997 Sb, příloha č. 1, část 5 a příloha 9.
13. Drdák M., Daučík P., Kubaský J.: *J. Chromatogr.* 504, 207 (1990).
14. Bakker J.: *Int. Anal.* 2, 28 (1988).

15. Bridle P., Garcia-Viguera C.: *Food Chem.* 55, 111 (1996).
16. Cameira-Dos-Santos P. J.: *J. Sci. Food Agric.* 70, 204 (1996).
17. Bakker J., Timberlake C. F.: *J. Sci. Food Agric.* 36, 1315 (1985).
18. Bakker J., Preston N. W., Timberlake C. F.: *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 121 (1986).
19. Bakker J.: *Vitis* 25, 203 (1986).
20. Drdák M., Daučík P., Kubaský J.: *Mitt. Klosterneuburg* 39, 224 (1989).
21. Drdák M., Daučík P.: *Mitt. Klosterneuburg* 39, 180 (1989).
22. Koswig S., Hofsommer H. J.: *Fluessiges – Obst* 62, 125 (1995).
23. Pribela A.: *Analýza cudzorodých látok v poživatinách*, str. 290. Alfa, Bratislava 1974.
24. Takahashi M. Z., Yabiku H. Z., Marsiglia D. A.: *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 48, 7 (1988).
25. Príbela A.: *Analýza potravín*. STU, Bratislava 1991.
26. Park H. K.: *Han'guk Noghyva Hakhoechi* 30, 201 (1987).
27. Greenway G. M., Kometa N., Macrae R.: *Food Chem.* 43, 137 (1992).
28. Shi L., Liu A., Zhuo Z.: *Fenxi Huaxue* 20, 1365 (1992).
29. Barros A. A., Rodrigues J. A., Magalhaes J.: *Port. Electrochim. Acta* 5, 317 (1987).
30. Korany K., Gasztonyi K.: *Elemiszervizsgalati Kozl.* 33, 108 (1987).
31. Ye S., Han H., Chem Y.: *Shipin Kexue* 67, 48 (1985).
32. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Application*. Elsevier, Amsterdam 1992.
33. Jandík P., Bonn G.: *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*. VCH, New York 1993.
34. Hinks D., Croft S. N.: *J. Soc. Dyers Colour.* 108, 546 (1992).
35. Brumley W. C.: *J. Chromatogr.* 603, 267 (1992).
36. Brumley W. C., Brownrigg C. M.: *J. Chromatogr.* 646, 377 (1993).
37. Gasparic J., Sedmiková A.: *J. Chromatogr., A* 665, 197 (1994).
38. Kuo K. L., Huang H. Y., Hsieh Y. Z.: *Chromatographia* 47, 249 (1998).
39. Masár M., Kanianský D.: *J. Capillary Electrophor.* 3, 165 (1996).
40. Masár M., Kanianský D., Madajová V.: *J. Chromatogr., A* 724, 327 (1996).
41. Thompson C. O., Trenerry V. C.: *J. Chromatogr.* 704, 195 (1995).
42. Bocca A., Pierini N.: *Riv. Soc. Ital. Sci. Alimentazione* 9, 265 (1980).
43. Williams M. L.: *Food Chem.* 22, 235 (1986).
44. Chaytor J. P., Heal R. L.: *J. Chromatogr.* 368, 450 (1986).
45. Reynolds S. L., Scotter M. J., Wood R.: *J. Assoc. Public Anal.* 26, 7 (1986).
46. Ohto M., Mutanaga A., Yamamoto A., Saitou Y., Mizukami E.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 29, 192 (1988).
47. Ishikawa F., Saito K., Nakazato M., Fujinuma K.: *Annu. Rep. Tokyo Metropolit. Res. Lab. Public Health* 41, 101 (1990).
48. Chen Q. C., Mou S. F., Hou X. P., Riviello J. M., Ni Z. M.: *J. Chromatogr., A* 827, 73 (1998).
49. Zkušební metoda ČZPI, 1–9 (1993).
50. Gratzfeld-Hüsgen A., Schuster R.: *Application Note*. Hewlett-Packard 1995.
51. Karovičová J., Polonský J., Príbela A., Šimko P.: *J. Chromatogr.* 545, 413 (1991).
52. Lendacká M., Krčmová E.: *Identifikácia potravinárskych barviv metódou CZE*. ŠŠZÚ, Banská Bystrica 1997.
53. Liu H., Zhu T., Zhang Y., Qi S., Huang A., Sun Y.: *J. Chromatogr.* 718, 448 (1995).
54. Razee S.: *J. Chromatogr., A* 715, 179 (1995).
55. Suzuki S., Shirao M., Aizawa M.: *J. Chromatogr., A* 680, 545 (1994).
56. Gratzfeld-Hüsgen A., Schuster R.: *Application Note*, Hewlett-Packard 1995.
57. Šlampová A., Jančářová I., Smělá D., Kubáň V.: *Acta Univ. Agric. Silv. Mandel. Brunn.* 49, 3 (2001).
58. Jančářová I., Vondráčková A., Šlampová A., Kubáň V.: *Czech. J. Food Sci.* 18, 41 (2000).
59. Ni Y. N., Bai J. L., Jin L.: *Anal. Lett.* 30, 1761 (1997).

A. Šlampová, D. Smělá, A. Vondráčková, I. Jančářová, and V. Kubáň (*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Determination of Synthetic Colorants in Foodstuffs**

Synthetic dyes can be determined in solid food, in non-alcoholic drinks and their concentrates by several separation and spectrometric methods (LC, CE, UV/VIS). All the methods give similar results for most samples. Direct UV-VIS spectrophotometry gives very good results if a single colorant or a mixture of colorants of different absorption spectra is present or if the colorants can be completely separated by solid-phase extraction. If this is not the case, the simple multicomponent analysis leads to deviations up to 10–15 %. More complicated programs for multicomponent analysis (PLS, nonlinear regression) have to be used in such cases and also when other constituents (sugars, phenolics, etc.) are present at high concentrations.

Capillary electrophoresis (CE) is the method of choice for determination of anionic synthetic dyes in biological materials and foodstuffs since it can separate the dyes in a single analysis within a short run time, gives very precise and accurate results, reduces sample consumption and, under optimum conditions, is not time-consuming. The necessity of sample pretreatment is a certain disadvantage of CE in comparison with HPLC. CA also enables separation of synthetic colorants from hydrophobic natural pigments. For the identification and determination of the latter, LC methods are well established. Their sensitivity is usually by more than an order of magnitude higher, their separation efficiency is mostly sufficient, and sample pretreatment is simpler.