

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ VYBRANÝCH VONNÝCH LÁTEK V POTRAVINÁCH

ASSESSMENT OF CHOSEN AROMATIC COMPOUNDS IN FOODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ADRIANA ASCHEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0449/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Adriana Ascherová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Radka Divišová	

Název diplomové práce:

Stanovení vybraných vonných látek v potravinách

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled o:
 - použití vonných látek rostlinného původu pro aromatizaci potravin
 - jejich možných biologických účincích v lidském organismu
 - metodách vhodných pro jejich stanovení
2. Vypracujte a validujte metodu stanovení vonných látek s použitím plynové chromatografie
3. Aplikujte ji na vybrané vzorky potravin
4. Zhodnoťte výhody této metody a její použitelnost

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Adriana Ascherová
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na vonné látky vyskytující se v potravinách.

V teoretické části popisuje jejich vlastnosti, použití vonných látek rostlinného původu pro aromatizaci potravin a poukazuje na jejich možné negativní účinky na lidský organismus. Evropskou legislativou je takto vymezeno 26 potenciálně alergenních vonných látek a přehled jejich fyzikálních vlastností, výskyt a použití je v této práci také zpracován.

Cílem experimentální části bylo vypracovat a validovat metodu stanovení vonných látek s použitím headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií (HS-SPME-GC-FID). Byly validovány následující parametry: opakovatelnost, linearita, meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Metoda HS-SPME-GC-FID byla nakonec aplikována na vybrané vzorky potravin, běžně dostupných v obchodní síti.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on aromatic substances occurring in food.

The theoretical part describes their characteristics, the use of fragrances of plant origin for flavoring of food and points to their possible negative effects on the human organism. Twenty six potentially allergenic fragrances are thus identified in European legislation and an overview of their physical properties, occurrence and use is also processed in this work. The aim of the experimental part was to develop and validate a method for assessment of fragrances using headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). The following parameters have been validated : repeatability, linearity, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ). The HS-SPME-GC-FID method was finally applied to selected samples of foods commonly available on the market.

KLÍČOVÁ SLOVA

vonné látky, potraviny, SPME, GC

KEYWORDS

aroma compounds, food, SPME, GC

ASCHEHOVÁ, A. *Stanovení vybraných vonných látek v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 87 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce, paní Ing. Evě Vítové, Ph. D. a konzultantce Ing. Radce Divišové za ochotu, laskavost a cenné odborné rady, které mi usnadnily vypracování této diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Vonné látky	8
2.2. Vonné látky rostlinného původu	8
2.3. Vonné látky rostlinného původu určené k aromatizaci potravin.....	9
2.3.1. Materiály pro výrobu přírodních potravinářských aromat	9
2.3.1.1. Silice (etherické oleje).....	9
2.3.1.2. Olejoprskyřice (oleoresiny).....	10
2.3.1.3. Výluhy	10
2.3.1.4. Šťávy (mošty) a dřeně	10
2.3.1.5. Destiláty	11
2.3.2. Způsoby získávání přírodních aromatických látek z rostlinných materiálů.....	11
2.3.2.1. Extrakce nepolárními rozpouštědly.....	11
2.3.2.2. Destilace vodní parou	11
2.3.2.3. Lisování	12
2.4. Složení aromat.....	12
2.4.1. Chemické skupiny látek určené k aromatizaci	12
2.5. Biologický účinek aromat	14
2.5.1. Pozitivní účinky aromat	14
2.5.2. Negativní účinky aromat	15
2.6. Hodnocení bezpečnosti aromat	16
2.7. Legislativa týkající se alergenů	16
2.7.1. Vyhláška č.447/2004 Sb.....	16
2.7.2. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2232/96.....	19
2.7.3. Nařízení Komise (ES) č. 1565/2000	19
2.7.4. Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 2065/2003	19
2.7.5. Nařízení komise (ES) č. 622/2002	19
2.7.6. Rozhodnutí EC č. 217/1999EC	20
2.8. Potenciálně alergenní vonné látky.....	20
2.8.1. Vlastnosti potenciálně alergenních vonných látek	20
2.9. Možnosti stanovení aromatických látek v potravinách	40
2.9.1. GC-MS	40
2.9.2. HS-SPME/GC-MS	40
2.9.3. HS-SPME/GC-FID.....	41
2.9.4. HS-SPME/GC/GC-MS.....	41
2.9.5. HPLC.....	42
2.9.6. LC-MS/MS.....	42
2.9.7. DHS/GC-MS	42
2.9.8. SDE/GC-MS.....	42
2.9.9. DI/GC-FID(GC-MS).....	43
2.9.10. HSSE-GC-MS	43
2.10. Vybrané validační parametry analytické metody.....	43
2.10.1. Opakovatelnost metody.....	43
2.10.2. Linearita metody	43
2.10.3. Mez detekce.....	44
2.10.4. Mez stanovitelnosti	44
2.11. Statistické vyhodnocení naměřených dat	45
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46

3.1.	Laboratorní vybavení	46
3.1.1.	Chemikálie	46
3.1.2.	Přístroje a pracovní pomůcky	46
3.2.	Podmínky SPME-GC-FID	47
3.3.	Reálné vzorky potravin	47
3.4.	Pracovní postupy	48
3.4.1.	Příprava alergenního standardu	48
3.4.2.	Příprava reálného vzorku	48
3.4.3.	Sorpce a desorpce aromaticky aktivních látek	48
3.4.4.	Statistické vyhodnocení výsledků	49
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
4.1.	Identifikace standardů alergenních vonných látek	50
4.2.	Validace metody	50
4.2.1.	Stanovení opakovatelnosti	51
4.2.2.	Stanovení linearity	52
4.2.3.	Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti	59
4.2.3.1.	Výpočty meze detekce a meze stanovitelnosti	63
4.3.	Analýza reálných vzorků	64
5.	ZÁVĚR	68
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	70
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	75
8.	SEZNAM PŘÍLOH	77
9.	PŘÍLOHY	78
10.	SEZNAM TABULEK	86

1. ÚVOD

Vonné a chuťové látky jsou poměrně silně vonící organické sloučeniny s charakteristickou, většinou příjemnou vůní. Proto se využívají v parfémoch a parfémovaných výrobcích, stejně jako látky určené k aromatizaci potravin a nápojů [1].

Aromata se přidávají do potravin z důvodu ovlivnění organoleptických vlastností potraviny, zej. chuti a vůně. Průmyslově vyráběné potraviny v posledních letech obsahují podstatně větší množství aromatických látek než v minulosti. Důvodem je zajistit standardní chuť a vůni potravin, přizpůsobit chuť potraviny požadavkům spotřebitele, nahradit omezené zdroje přírodních surovin, a tím snížit náklady na výrobu potravin. Některá aromata prakticky nahradila ve výrobní praxi koření, jejichž použití má oproti aromatům řadu nevýhod (proměnlivý obsah sensoricky účinných látek, mikrobiologická kontaminace, atd.) [2].

Všechny aromatické látky v přírodě produkují živé organismy, především rostliny. I když nejsou pro člověka nezbytně nutné, jsou mu prospěšné, a to zejména svým příznivým působením na jeho psychiku, stimulují jeho výkonnost a mají také vliv na estetické cítění. [2].

Závažnou okolností je skutečnost, že k projevení žádaného účinku aromatické látky je nutné, aby na příslušný smyslový orgán působila v optimální koncentraci. Ta nemůže být nižší a neměla by být vyšší než taková, jaká vyvolá v čichovém nebo chuťovém ústrojí odezvu žádané intenzity, kterou registrujeme jako příjemnou [2].

Oblast biologických účinků vonných látek je však velmi rozsáhlá. Mohou být také silně alergenní, baktericidní a protizánětlivé, spasmolytické, analepické, anestetické a antiseptické. Některé terpeny a další vonné látky vykazují rovněž různé toxické účinky. Obsah těchto toxických látek v potravinách je proto v mnoha zemích legislativně omezen [4,5].

Cílem této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na vonné látky určené k aromatizaci potravin (zejména rostlinného původu), s důrazem na seznam a popis potenciálně alergenních aromat. Experimentální část se zabývá metodikou stanovení vybraných zástupců alergenních vonných látek, a to mikroextrakcí tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií (SPME-GC). Daná metoda byla optimalizována, validována a nakonec aplikována na několik reálných vzorků potravin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vonné látky

Původně byly vonné látky používány pouze pro potěšení nebo pro své léčivé účinky. Lidé používali vonné oleje a masti na svá těla po tisíce let, např. Egypťané používali parfémované balzámy při různých náboženských obřadech a později jako součást afrodisiak. Např. myrta a kadidlo dodávaly atmosféru při rituálech. Během raného křesťanství však skončilo používání parfému, k návratu došlo až během středověku [6].

Vonné látky jsou látky, které působí na čichové receptory a vyvolávají dojem vůně. Jsou to převážně málo polární nebo nepolární (ve vodě málo rozpustné až nerozpustné) těkavé látky vyvolávající širokou škálu nejrůznějších sensorických vjemů [5].

Vůně potravin je velmi často komplexním vjemem vyvolaným velkým počtem vonných látek. Celkový počet vonných látek identifikovaných v potravinách se odhaduje na téměř 10 000, běžně bývá v každé potravíně několik set různých vonných sloučenin.

Intenzita a kvalita vůně i chuti však závisí nejen na přítomných vonných látkách, ale také na dalších složkách potravin, především bílkovinách, sacharidech a lipidech, se kterými vonné látky interagují [5].

Vonné látky mohou být klasifikovány podle zdrojů, ze kterých jsou získávány, na:

- **Přírodní** (získávány přímo z přirozených zdrojů fyzikálními postupy)
 - rostlinné (z odlišných částí rostlin jako např. květy, kořeny, listy, semena, ovoce, kůra stromů, pryskyřice; nebo z celých rostlin)
 - živočišné (ze zvířecích žláz a orgánů)
- **Syntetické** (snahou je napodobit přírodní vonné složky)
 - přírodně identické (získávány syntézami, ale jsou identické s látkami přítomnými v přirozených materiálech)
 - umělé (získávány syntézami, ale nejsou identické s látkami přítomnými v přirozených materiálech, dosud nebyly identifikovány v rostlinných ani živočišných zdrojích) [1,7,8]

Nejčastěji jsou v přírodních a umělých vůních obsaženy tyto třídy látek: alkoholy, aldehydy, ketony, estery a laktony [1].

2.2. Vonné látky rostlinného původu

Rostliny mají schopnost syntetizovat, akumulovat a uvolňovat vonné látky, které mohou interakcemi s lidskými receptory vytvářet aroma i chuť molekul. Vzhledem k malému množství vonných látek v rostlinných zdrojích byly mnohé z přírodních produktů nahrazeny syntetickými analogy [9].

Vonné látky vznikají v rostlinných organismech dvěma různými způsoby:

- **Terpenické látky**

- vznikají biogenetickým procesem, který se nazývá mevalonový
- zjednodušeně se dá tento postup popsat jako kondenzace isoprenových jednotek za přítomnosti specifického enzymu, kdy jedním z meziproductů je mevalonová kyselina (odtud také název procesu)
- po několika stupních pak vznikají všechny terpenické látky vyskytující se v silicích jako např. uhlovodíky (limonen, pinen), aldehydy (citral), alkoholy (geraniol, linalool), estery (linalylacetát) a stovky dalších sloučenin [3]

- **Aromatické látky**

- vonné látky mající ve své molekule aromatické jádro vznikají procesem, který byl nazván šikimátový (nebo také fenylypropanový)
- výchozím produktem tohoto procesu je glukóza, přes řadu meziproductů včetně šikimové kyseliny vznikne nakonec kyselina skořicová
- z kyseliny skořicové pak postupně dalšími biosyntetickými procesy vznikají aromatické sloučeniny jako např. kumariny a jejich deriváty, látky fenolické povahy (eugenol) [3]

2.3. Vonné látky rostlinného původu určené k aromatizaci potravin

Látky určené k aromatizaci tvoří hlavní skupinu složek záměrně přidávaných do potravin a krmiv. Jedná se o koncentrované látky, jejichž hlavním účelem je udělit aroma, s výjimkou látek, které mají výhradně sladkou, kyselou nebo slanou chuť. Tyto látky jsou přidávány v malém množství do jídla nebo do krmiva pro dobytek, nejsou ale určeny ke spotřebě jako takové [6].

Aromatické látky jsou získány vhodnými fyzikálními, mikrobiologickými nebo enzymatickými procesy z potravin nebo jiného materiálu rostlinného nebo živočišného původu, a to buď v surovém stavu nebo po zpracování tradičními postupy přípravy potravin (včetně sušení, pražení a fermentace) [6].

K nejdůležitějším materiálům pro výrobu přírodních potravinářských aromat patří silice, olejoprskyřice, výluhy, šťávy, dřeně a destiláty. Získávají se prakticky výhradně z rostlinných materiálů, z čerstvých rostlin nebo sušených či jinak upravených částí rostlin, které se nazývají drogy [5].

Odhaduje se, že ve vyspělých státech se pro aromatizaci potravin zhruba ze 75 % používají přírodní aromatické látky, zbytky jsou látky syntetické [5].

2.3.1. Materiály pro výrobu přírodních potravinářských aromat

2.3.1.1. Silice (etherické oleje)

Z přibližně 100 000 druhů rostlin, které jsou v současnosti popsány, asi 1700 druhů obsahuje silice. Pro praktické využití má význam asi jenom 200 druhů [3].

Silice jsou nositeli aromatických látek. Rostliny obsahující větší množství silice se často používají jako koření, které má charakteristickou vůni a chuť. Hlavními složkami jsou fenolické sloučeniny, těkavé mono- a seskviterpeny, fenoly a jejich estery. Obsah silic v rostlinách se pohybuje v rozmezí desetin až jednotek procent [12]. V čerstvém stavu jsou bezbarvé, olejovité, ve vodě nerozpustné, ale dobře rozpustné v ethanolu a dalších polárních organických rozpouštědlech [10].

Jsou to různorodé směsi terpenů, uhlovodíků, kyselin, esterů, aldehydů, ketonů, alkoholů atd. Složení těchto látek a jejich vzájemný poměr závisí na druhu rostliny a na okolních podmínkách v době jejího růstu [12].

2.3.1.2. *Olejoprskyřice (oleoresiny)*

Olejoprskyřice jsou extrakty získané z koření nebo zeleniny organickými polárními (methanol, ethanol, isopropylalkohol) i nepolárními rozpouštědly (hexan, petrolether, benzín).

Většina olejoprskyřic obsahuje jako hlavní složky silice podobné jako extrakty z koření, ale přítomny jsou i další složky. Některé olejoprskyřice obsahují barviva příslušného koření nebo zeleniny (např. olejoprskyřice kurkumy a papriky) nebo pálivé látky (např. olejoprskyřice pálivé papriky, pepře a zázvoru).

Samotné olejoprskyřice nanášené na vhodných nosičích (např. škrobu nebo mouce) se používají jako suroviny pro výrobu potravinářských aromat nebo místo přírodního koření k ochucování potravin [5].

2.3.1.3. *Výluhy*

Materiálem pro výluhy bývají drogy (sušené nebo jinak k extrakci připravené přírodní suroviny), ovoce, zelenina, výlisky a další. Vznikají extrakcí výchozího materiálu jemným rafinovaným lihem nebo jinými těkavými organickými rozpouštědly [11].

- **maceráty** – vznikají provádí-li se extrakce (nejčastěji ethanol) za normální teploty stáním s rozpouštědlem (macerace)
- **perkoláty** – vznikají při extrakci za průtoku rozpouštědla (perkolace)
- extrakce za vyšších teplot (**digesce**)
- **tinktura** – lihový (popř. vodný) extrakt nebo extrakt jiným rozpouštědlem z jednoho druhu drogy [5]

Výrobky získané za studena macerací nebo perkolací mají zpravidla lepší organoleptické vlastnosti.

2.3.1.4. *Šťávy (mošty) a dřeně*

Mošty a dřeně jsou vynikajícími surovinami na přírodní bázi pro výrobu aromat. Šťávy se kombinují s vhodným destilátem a lihovým roztokem silic nebo roztokem aromatického komplexu [11].

Jako základní sortiment se běžně používají ovocné šťávy citrusové, jablečné, hroznové, rybízové, višňové aj. Ze zeleninových šťáv se používají např. mrkvové, zelné, rajčatové, cibulové a česnekové [5].

Ovocné a zeleninové dřeně jsou také nosným médiem pro výrobu pastovitých aromat [5].

2.3.1.5. Destiláty

Destiláty se používají buď jako hlavní aromatické složky dodávající základní charakter vůně nebo jako bonifikátory, které zjemňují chuť a vůni aromatického komplexu.

Uplatňují se především na výrobu alkoholických a nealkoholických nápojů, cukrářských krémů, náplní apod.

Například destiláty ananasové, jahodové, kakaové, malinové, rumové a višňové [11].

2.3.2. Způsoby získávání přírodních aromatických látek z rostlinných materiálů

2.3.2.1. Extrakce nepolárními rozpouštědly

K nejstarším způsobům získávání vonných látek z rostlinného materiálu patří extrakce. Vonné látky se adsorbovaly nejprve na tuk nebo do oleje, tento způsob izolace se v průběhu staletí zdokonaloval a až donedávna se používal zejména k získávání silic z květů [3].

Pro extrakci vonných látek nepolárními rozpouštědly se používají uhlovodíková rozpouštědla, nejčastěji petrolether, dále také isohexan, methanol, ethanol nebo méně často benzen [8,37,38]. Například silice se získávají extrakcí odparku ethanolem. Jedná se o ekonomicky nákladnou izolační techniku a vyplatí se tam, kde je obsah silice nízký nebo tam, kde je důležité získat vonné látky v nezměněném složení [37].

Extrakce probíhá v uzavřené nádobě, na roštu jsou nasypány květy, přes ně protéká rozpouštědlo, které se tak sytí vonnými substancemi květů. Vzniká miscela a odpařuje se rozpouštědlo. Produkt získaný extrakcí a následujícím oddestilováním rozpouštědla je zpravidla voskovitá, polotuhá hmota nazývaná silice konkrétní neboli konkrét. Konkrét obsahuje navíc vosky, jež jsou pro nás nežádoucí. Proto se tato silice rozmíchá v lihu, směs se vymrazí a přefiltruje. Filtrát se pak zpracuje na silici absolutní [3,8].

2.3.2.2. Destilace vodní parou

Destilace vodní parou je nejběžnějším způsobem izolace vonných látek s největší výtěžností a s vysokou kapacitou [37].

Touto metodou se zpracovává téměř 80 % rostlinného materiálu a vyrábějí se např. silice z plodů (kmínová, koprová, badyánová, pepřová aj.), z celé natě nebo jen z listů (silice mátová, gerániová, citronellová, levandulová, aj.), dále také z jiných částí rostlin jako například z oddenků, kořenů a květů [3,8].

Vodní pára za vysokého tlaku prochází rostlinným materiálem a aromatické komponenty jsou z něj extrahovány. Vonné látky jsou parou unášeny do horní části kolony a chladiče, kde spolu s vodou kondenzují, esenciální oleje jsou poté z vodní hladiny odděleny a vysušeny. Destilace může probíhat při 100 °C, regulací tlaku také při teplotách vyšších i nižších [3,38].

2.3.2.3. Lisování

Lisováním se získávají silice, které nelze bez rozkladu destilovat. Zvláště výhodná izolace, pokud jsou siličné buňky nebo kanálky umístěny v povrchových vrstvách jako například v oplodí pomeranče nebo citronu [37].

Tato extrakční metoda je používána zejména pro získání esenciálních olejů z čerstvé ovocné kůry, jež je za studena stlačována. Kůra se nejprve oddělí od plodu a poté se na dřevěných lisech lisuje za studena pod proudem vody. Vzniká emulze, z níž se odstředěním získává silice. Takto se vyrábí především silice pomerančová, citrónová a grapefruitová [3,38].

2.4. Složení aromat

Aromata obvykle obsahují směsi jen těžko definovatelných látek, které jsou součástí aromatických přípravků, reakčních nebo kouřových aromatických přípravků, anebo silic či oleoresinů získaných destilací či extrakcí různých přírodních materiálů [2].

Příkladem použití silic či oleoresinů jsou kořenitá aromata, kde výchozí surovinou jsou různá koření používaná při běžné kulinární úpravě pokrmů. Směs silic a oleoresinů lze navzájem kombinovat s klasickými aromaty (aroma sýrové, masové, atp.). Taková aromata se používají do masných výrobků, polévek, pomazánek, kečupů, dressingů, tavených sýrů a do řady dalších potravinářských výrobků [2].

Aromata s reakčními aromatickými přípravky, kde výchozí surovinou jsou různé druhy bílkovin, obsahují ještě další látky, např. látky zvýrazňující chuť (glutamát sodný, inosinát sodný, guanylát sodný), dále tuk, byliny, koření. Takto jsou připravena aromata typu slanina, uzená šunka, hovězí vývar [2].

2.4.1. Chemické skupiny látek určené k aromatizaci

Rozdělení aromatických látek do 34 skupin podle chemické příbuznosti [2]:

1. Nerozvětvené primární alifatické alkoholy/aldehydy/kyseliny, acetaly a estery, přičemž jde o estery nasycených alkoholů a acetaly nasycených aldehydů. Estery ani acetaly nesmí obsahovat aromatické nebo heteroaromatické části.
2. Rozvětvené primární alifatické alkoholy/aldehydy/kyseliny, acetaly a estery, přičemž jde o estery rozvětvených alkoholů a acetaly rozvětvených aldehydů. Estery ani acetaly nesmí obsahovat aromatické nebo heteroaromatické části.
3. Nenasycené (s dvojnými nebo trojnými vazbami v poloze α a β) nerozvětvené a rozvětvené primární alifatické alkoholy/aldehydy/kyseliny, acetaly a estery, přičemž

jde o estery nenasycených alkoholů (s násobnou vazbou v poloze α a β) a acetaly nenasycených alkoholů nebo aldehydů (s násobnou vazbou v poloze α a β). Estery ani acetaly nesmí obsahovat aromatické nebo heteroaromatické části.

4. Nekonjugované a akumulované nerozvětvené a rozvětvené primární alifatické alkoholy/aldehydy/kyseliny, acetaly a estery, přičemž jde o estery nenasycených alkoholů a acetaly nenasycených alkoholů nebo aldehydů (s násobnou vazbou v poloze α a β). Estery ani acetaly nesmí obsahovat aromatické nebo heteroaromatické části.
5. Nasycené a nenasycené sekundární alifatické alkoholy/ketony/ketaly/estery, přičemž jde o estery sekundárních alkoholů. Estery ani ketaly nesmí obsahovat aromatické nebo heteroaromatické části.
6. Alifatické, alicyklické a aromatické nasycené a nenasycené terciální alkoholy a estery, přičemž estery obsahují terciální alkoholy. Estery mohou obsahovat jakýkoliv zbytek kyseliny.
7. Primární alicyklické nasycené a nenasycené alkoholy / aldehydy / kyseliny / acetaly / estery, přičemž jde o estery alicyklických alkoholů. Estery / acetaly mohou obsahovat alifatické acyklické nebo alicyklické zbytky kyselin nebo alkoholů.
8. Sekundární alicyklické nasycené a nenasycené alkoholy/ketony/ketaly/estery, přičemž jde o ketaly alicyklických alkoholů nebo ketonů a estery sekundárních alicyklických alkoholů. Estery mohou obsahovat alifatické acyklické nebo alicyklické zbytky kyselin.
9. Primární alifatické nasycené nebo nenasycené alkoholy / aldehydy / kyseliny / acetaly / estery s druhou primární, sekundární nebo terciální kyslíkatou funkční skupinou, včetně alifatických laktonů.
10. Sekundární alifatické nasycené nebo nenasycené alkoholy / ketony / kyseliny / ketaly / estery s druhou sekundární nebo terciální kyslíkatou funkční skupinou.
11. Alicyklické a aromatické laktony.
12. Deriváty maltolu a ketodioxanu.
13. Furanony a tetrahydrofurfurylové deriváty.
14. Furfurylové deriváty a deriváty furanu s dalšími substituenty a heteroatomy v postranním řetězci a bez nich.
15. Fenyl-ethylalkoholy, fenylacetové kyseliny, příbuzné estery, fenylacetové kyseliny a příbuzné estery.
16. Alifatické a alicyklické ethery.
17. Propenylhydroxybenzeny.
18. Allylhydroxybenzeny.
19. Látky příbuzné kapsaicinu a příbuzné amidy.
20. Alifatické a aromatické monothioly a dithioly a monosulfidy, disulfidy, trisulfidy a polysulfidy s další kyslíkatou funkční skupinou nebo bez ní.

21. Aromatické ketony, sekundární alkoholy a příbuzné estery.
22. Arylem substituované deriváty primárních alkoholů/aldehydů/kyselin/esterů/acetalů, včetně nenasycených. U těchto skupin látek sestavených z chemického hlediska se předpokládá, že vykazují určité společné metabolické a biologické chování.
23. Benzylalkoholy/-aldehydy/-kyseliny/-estery/-acetal. Včetně benzylesterů a benzoátů. Mohou také obsahovat alifatické acyklické nebo alicyklické zbytky esterů nebo acetalů.
24. Deriváty pyrazinu.
25. Deriváty fenolu s alkylsubstituentem v kruhu a alkoxy-substituentem v kruhu a s postranním řetězcem s kyslíkatou funkční skupinou.
26. Aromatické ethery včetně derivátů anisolu.
27. Deriváty anthranilátů.
28. Deriváty pyridinu, pyrolu a chinolinu.
29. Deriváty thiazolů, thiofenu, thiazolinu a thienylu.
30. Různé látky.
31. Alifatické a aromatické uhlovodíky.
32. Epoxidy.
33. Alifatické a aromatické aminy.
34. Aminokyseliny.

2.5. Biologický účinek aromat

Mezi odhadovanými 60 000 – 100 000 různých sekundárních metabolitů lze nalézt takové, které mají značný vliv na lidský organismus, tzn. že jsou biologicky aktivní [6].

Pozitivní vlastnosti aromatických látek však nejsou zdaleka jedinými biologickými aktivitami. Některé rostlinné materiály povolené jako zdroje vonných látek obsahují jako přirozené složky zdravotně závadné látky (tabulka 1) [7].

2.5.1. Pozitivní účinky aromat

Vonné látky a jejich směsi, např. silice, vykazují řadu blahodárných účinků pro něž našly použití jako léčiva, složky farmaceutických výrobků nebo potravinářská aditiva [5].

Některé pozitivní účinky vonných látek:

Baktericidní a protizánětlivé – např. borneol, eugenol, pineny, kafr, thymol a menthol, také většina silic ničí choroboplodné mikroorganismy, používají se nejčastěji silice cedrové, hřebíčkové, eukalyptové, lemongrasové, levandulové, atd.

Podpora trávení – aromatické a hořké látky obsažené v rostlinách (zej. hluchavkovitých) povzbuzují chuť k jídlu, stimulují činnost gastrointestinálního traktu a vylučování trávicích šťáv. Proto se často přidávají do žaludečních likérů, aperitivů a likérových

kořeněných vín, např. bazalka, oregáno, máta, listy rozmarýny, saturejka, šalvěj, tymián a majoránka.

Spasmolytické (cholinolytické) – brání poklesu krevního tlaku a potlačují sekreční činnost různých orgánů, např. amylsalicylát, benzylalkohol, benzylbenzoát, kafr, kamfen a pineny.

Antiseptické – především aldehydy jako citral, anýzaldehyd, vanilin, dále fenoly např. eugenol, thymol a alkoholy jako linalool, geraniol, terpineol a 4-terpineol.

Vzpružující a povzbuzující (analeptické) – stimulují činnost oběhového a dýchacího ústrojí, např. kafr, methylvalerát, kamfen a další terpeny.

Analgetické – potlačují bolest, např. amylsalicylát, kafr, heřmánková silice.

Antioxidační – vykazují silice mnoha druhů koření např. majoránková, šalvějová, tymiánová, používají se jako přírodní antioxidanty tuků [3,5,12].

2.5.2. Negativní účinky aromat

Zmiňujeme-li se o biologických účincích aromatických látek, musíme upozornit také na ty, které člověku škodí [3]. Toxické látky obsahuje řada bylin, které se mohou používat výhradně k aromatizaci lihovin, kořeněných vín a jiných alkoholických nápojů s obsahem ethanolu > 10 % obj. Obsah těchto toxických látek v potravinách je v mnoha zemích legislativně omezen (kap. 2.7) [7].

Tyto látky se projevují dráždivě, dále zvyšují citlivost (senzibilizační), podporují rakovinné bujení (kancerogenní), poškozují plod (teratogenní) [3].

Zhoubné bujení vyvolává např. safrol, který byl dříve hojně používán k parfemaci levnějších mýdel a do některých mastí jako komponenta podporující prokrvení pokožky. Škodlivé účinky má také thujon, vyvolává potrat a při dlouhodobém používání poškozuje mozkovou kůru. Dále je toxický např. asaron, myristin, bergapten, benzaldehyd, skořicový aldehyd [3].

Tabulka 1: Přírodní toxické látky rostlinných materiálů používaných k aromatizaci [7]

rostlina	toxická látka	rostlina	toxická látka
aromatizace potravin		aromatizace alkoholických nápojů	
bez černý	kyanovodík	aloe (různé druhy)	aloin
chinovník (různé druhy)	chinin	hořkoň obecná	kvassin
mařinka vonná	kumarin	puškvorec obecný	β-asaron
máta kadeřavá (m. peprná, m. polej)	pulegon	komonice lékařská	kumarin
		silovoň obecný	kumarin
muškátovník pravý	safrol a isosafrol	tomka severní	kumarin
šalvěj lékařská	α- a β- thujon	tomka vonná	kumarin
řebříček obecný	α- a β- thujon	pelyněk cicvárový	α- a β- thujon
řebříček muškátový	α- a β- thujon	pelyněk černobýl	α- a β- thujon

2.6. Hodnocení bezpečnosti aromat

Hodnocením bezpečnosti aromatických látek se zabývá Evropský úřad pro bezpečnost potravin EFSA (= European Food Safety Authority) a má odpovědnost za všechny oblasti v bezpečnosti potravin [2,13].

Součástí hodnocení bezpečnosti aromatických látek je také odhad jejich expozice. Ten vychází ze dvou nepřímých metod, a to MSDI a TAMDI. Za výchozí metodu je považován MSDI (Maximized Survey-Derived Daily Intake), ta ale ignoruje skutečné užití aromat v praxi, protože vychází ze sumy vyrobeného množství látek. Proto se používá metoda TAMDI (Theoretical Added Maximum Daily Intake), která vychází z hodnot nejvyšších použitých hladin aromatických látek v potravinách vynásobených množstvím spotřebované potraviny určité kategorie za den člověkem o průměrné tělesné hmotnosti 60 kg [2,13].

Model TAMDI byl vyzkoušen na různých látkách. Získané hodnoty však byly nereálně vysoké, proto byla metoda modifikována tak, že nejvyšší hladiny aromatických látek použitých pro jednotlivé kategorie potravin byly nahrazeny hodnotami reálně užívanými v praxi (střední hodnoty). Tato metoda se nazývá m-TAMDI (modified Theoretical Added Maximum Daily Intake) a je v současné době používána pro odhad expozice aromatickým látkám EFSA [2].

2.7. Legislativa týkající se alergenů

Rozhodující je zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích, v platném znění [14,15].

V současné době platí tyto předpisy týkající se používání a hodnocení aromatických látek [2]:

2.7.1. Vyhláška č.447/2004 Sb.

Vyhláška č.447/2004 Sb. o požadavcích na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu (zpracovává směrnice EU 88/388/EHS a 91/71/EHS).

Pro účely této vyhlášky a v souladu s právem Evropských společenství¹ se rozumí pod pojmem [16]:

¹ Směrnice Rady 88/388/EHS ze dne 22. června 1988 o sblížení zákonů členských států týkajících se aromat pro použití do potravin a surovin pro jejich výrobu.

Směrnice Komise 91/71/EHS ze dne 16. ledna 1991, kterou se doplňuje směrnice Rady 88/388/EHS o sblížení zákonů členských států týkajících se aromat pro použití do potravin a surovin pro jejich výrobu.

Rozhodnutí Rady 88/389/EHS ze dne 22. června 1988 o seznamu surovin a látek používaných při přípravě látek určených k aromatizaci, který vytvoří Komise.

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady 2232/96/ES ze dne 28. října 1996, kterým se stanoví postup Společenství pro látky určené k aromatizaci používané nebo určené k použití v potravinách nebo na nich.

Nařízení Komise 1565/2000/ES ze dne 18. července 2000 stanovující opatření nezbytná pro přijetí hodnotícího programu při uplatňování nařízení Evropského Parlamentu a Rady 2232/96/ES.

Doporučení Komise 98/282/ES ze dne 21. dubna 1998 o způsobech, jakými by členské státy a signatářské státy Dohody o Evropském hospodářském prostoru měly chránit duševní vlastnictví ve spojitosti s vývojem a výrobou ochucovacích látek uvedených v nařízení Evropského Parlamentu a Rady 2232/96/ES.

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady 2065/2003 ze dne 10. listopadu 2003 týkající se uzenech příchutí používaných nebo plánovaných k použití uvnitř potravin nebo na jejich povrchu.

Rozhodnutí Komise 1999/217/ES ze dne 23. února 1999, kterým se přijímá rejstřík aromatických látek používaných v potravinách nebo na nich.

- a) **Aroma** - látka určená k aromatizaci potravin, která obsahuje aromatické látky, aromatické přípravky, reakční aromatické přípravky, kouřové aromatické přípravky, a to jednotlivě nebo v kombinaci.
- b) **Aromatická látka** - chemicky definovaná látka, která působí na čichové nebo čichové a chuťové receptory člověka a vyvolává vjem vůně a chuti, a to jednotlivě nebo v kombinaci.
- c) **Přírodní aromatická látka** - látka získaná fyzikálními procesy (například destilací a extrakcí rozpouštědly), enzymovými nebo mikrobiálními postupy ze surovin rostlinného nebo živočišného původu jako takových nebo upravených pro lidskou spotřebu postupy určenými k přípravě potravin.
- d) **Přírodně identická aromatická látka** - látka získaná chemickými postupy (syntézou či izolačními kroky chemické povahy), která je chemicky identická s látkou přirozeně přítomnou ve zdrojích rostlinného či živočišného původu.
- e) **Umělá aromatická látka** - látka získaná chemickými postupy (syntézou), která není chemicky identická s látkami přítomnými ve zdrojích rostlinného či živočišného původu.
- f) **Aromatický přípravek** - přípravek získaný fyzikálními, enzymovými nebo mikrobiálními pochody ze surovin uvedených v písmenu c), který není chemicky definovanou látkou a který působí na čichové nebo čichové a chuťové receptory člověka a vyvolává vjem vůně, nebo vůně a chuti.
- g) **Reakční aromatický přípravek** - přípravek získaný záhřevem směsi výchozích surovin, které nemusí být samy o sobě aromatické, při teplotě nepřekračující 180 °C po dobu nepřekračující 15 minut. Alespoň jedna z výchozích surovin musí být dusíkatou látkou s funkční aminoskupinou a další látkou je redukující cukr, příp. cukry.
- h) **Kouřový aromatický přípravek** - přípravek získaný extrakcí zplodin pyrolýzy (tepelného rozkladu) výchozích surovin, užívaných při tradičním procesu uzení potravin.
- i) **Nejvyšší přípustné množství zdravotně nezávadných látek² určených k aromatizaci** - množství stanovené číselnou hodnotou.
- j) **Nezbytné množství** - množství nezbytně nutné pro dosažení zamýšleného technologického účinku a při zachování zásad správné výrobní praxe.
- k) **číslo "FL"** - číslo přidělené aromatické látce z databázového systému s názvem "FLAVIS".

K aromatizaci potravin lze používat pouze rostliny uvedené v příloze č. 1 vyhlášky č. 447/2004 Sb., látky jsou definované číslem Asociace výrobců aromat – FEMA. Použití těchto látek je u rostlin omezeno přítomností látek, které mohou být pro člověka ve vyšších

Rozhodnutí Komise 2000/489/ES ze dne 18. července 2000, kterým se doplňuje rozhodnutí Komise 1999/217/ES, kterým se přijímá rejstřík aromatických látek používaných v potravinách nebo na nich.

Rozhodnutí Komise 2002/113/ES ze dne 23. ledna 2002, kterým se doplňuje rozhodnutí Komise 1999/217/ES, kterým se přijímá rejstřík aromatických látek používaných v potravinách nebo na nich.

² § 10 odst. 1 písm. a) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů.

koncentracích toxické, jsou uvedeny v příloze č. 4 vyhlášky č. 447/2004 Sb. (např. aloin, β -asaron, kumarin, kyanovodík, pulegon, α - a β -thujon – tabulka č. 2) [16].

Látky povolené k aromatizaci potravin určených pro kojeneckou a dětskou výživu jsou uvedené v příloze č. 3 vyhlášky č. 447/2004 Sb. K ochucování pokračovací mléčné výživy, určené pro kojence od ukončeného čtvrtého měsíce věku, se smějí používat látky uvedené v tabulce č. 3. K ochucování příkrmů pro výživu určenou pro kojence a malé děti se smějí používat látky uvedené v tabulce č. 4 [16].

Tabulka 2: Nejvyšší přípustná množství látek, které mohou být ve vyšších koncentracích pro člověka toxické, v různých druzích potravin [16]

látká	potravina	NPM [mg.kg⁻¹, resp. mg.l⁻¹]
aloin	nápoje	0,1
	alkoholické nápoje	50
	ostatní potraviny	0,1
β -asaron	nápoje	0,1
	alkoholické nápoje	1
	kořenící přípravky pro ochucení snacků a podobných výrobků	1
	ostatní potraviny	0,1
kumarin	nápoje	2
	karamelové cukrovinky	10
	alkoholické nápoje	10
	žvýkačka	50
	ostatní potraviny	2
kyanovodík	nápoje	1
	alkoholické nápoje	1 na každé procento objem. alkoholu v nápoji
	kompoty z neodpeckovaného peckového ovoce	5
	cukrovinky (nugát, marcipán, náhrady nebo v podobných výrobcích)	50
	ostatní potraviny	1
pulegon	nápoje	100
	nápoje aromatizované mátou pepnou a dalšími druhy rodu Mentha	250
	cukrovinky aromatizované aromaty odvozenými z rostlin rodu Mentha	350
	ostatní potraviny	25

Tabulka 3: Nejvyšší přípustné množství látek používaných k ochucování mléčné výživy pro kojence od ukončeného čtvrtého měsíce věku [16]

látka	NPM [mg.kg ⁻¹ , resp. mg.l ⁻¹]
extrakt z vanilky	nezbytné množství (NM)
vanilin	50
ethylvanilin	50

Tabulka 4: Nejvyšší přípustné množství látek používaných k ochucování příkrmů pro výživu určenou pro kojence a malé děti [16]

látka	NPM [mg.kg ⁻¹ , resp. mg.l ⁻¹]
extrakt z vanilky	NM
extrakt z ovoce	NM
vanilin	70
ethylvanilin	70

2.7.2. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2232/96

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2232/96 stanoví postup pro vytváření pravidel týkajících se látek určených k aromatizaci, které jsou používány nebo určeny k použití v potravinách. Uvedeným nařízením se přijímá seznam látek určených k aromatizaci (dále jen „seznam“) [17].

2.7.3. Nařízení Komise (ES) č. 1565/2000

Nařízení Komise (ES) č. 1565/2000 stanoví opatření nezbytná pro přijetí programu hodnocení podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2232/96, stanoví, že osoba odpovědná za uvedení určitých látek určených k aromatizaci zařazených do „seznamu“ na trh musí poskytnout určité informace, aby bylo možné provést hodnocení příslušné látky [18].

2.7.4. Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 2065/2003

Nařízení ES č.2065/2003 o kouřových aromatických přípravcích používaných nebo určených k použití v potravinách nebo na jejich povrchu [2].

2.7.5. Nařízení komise (ES) č. 622/2002

Nařízení komise (ES) č. 622/2002 stanoví lhůty pro předložení informací pro hodnocení chemicky definovaných látek určených k aromatizaci používaných nebo určených k použití v potravinách nebo na jejich povrchu [19].

2.7.6. Rozhodnutí EC č. 217/1999EC

Rozhodnutí EC č. 217/1999EC, kterým se přijímá seznam látek určených k aromatizaci používaných v potravinách nebo na jejich povrchu vypracovaný podle nařízení evropského parlamentu a Rady č.2232/96 (ES) ve znění pozdějších předpisů [2].

2.8. Potenciálně alergenní vonné látky

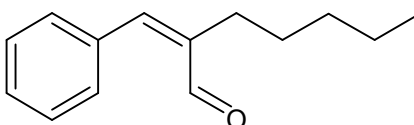
V Evropě aktivně monitoruje vonné látky Evropská komise (European Commission, EC). V USA spadají vonné látky pod dohled amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv. Pokud jde o kontaminace ovzduší a vod, spadají pod Agenturu pro ochranu životního prostředí (U. S. Environmental Protection Agency, EPA). Zajímá se o používání vonných látek, které mohou ovlivnit kvalitu ovzduší a tím zhoršit astma [20].

Zprávu o potenciálních alergenních substancích (Potentially Allergenic Substance, PASs) vydal vědecký útvar pro spotřební zboží (Scientific Committee on Consumer Products, SCCP). Poté byly stanoveny podmínky použití pro 26 vonných látek souvisejících se substancemi, které pravděpodobně způsobují alergické reakce. Kromě 2 přírodních mechových extraktů jsou všechny potenciálně alergenní vonné látky těkavé [21,22,23].

2.8.1. Vlastnosti potenciálně alergenních vonných látek

V následujících tabulkách č. 5 - 28 je uveden podrobný popis, vlastnosti a použití vybraných vonných látek s alergenními účinky. Jejich stanovení bude hlavní náplní experimentální části této diplomové práce.

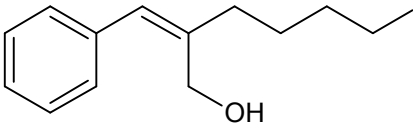
Tabulka 5: Vlastnosti amylocinnamalu [22,23,24,25,27,28]

Identifikace látky	
AMYLCINNAMAL	
chemická třída	aldehyd
CAS	122-40-7
molekulový vzorec	C ₁₄ H ₁₈ O
molekulová hmotnost	202,29 g.mol ⁻¹
synonyma	2-benzylidenheptanal, jasmínový aldehyd, mahonia
Fyzikální a chemické vlastnosti	

Tabulka 5: Vlastnosti amyl cinnamalu [22,23,24,25,27,28] - pokračování

vzhled, skupenství	žlutá kapalina
aroma	vůně připomínající jasmín
rozpuštnost	rozpuštný v olejích a ethanolu, nerozpuštný v glycerinu a propylenglykolu
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan) 3730 mg.kg ⁻¹ toxický při požití, mírně dráždí kůži, vydává štiplavý kouř a výpary	
Výskyt a použití	
vyskytuje se v některých rostlinách (oilbanum-pryskyřice), v černém čaji používá se jako ochucovadlo, přidává se do cukroví, žvýkaček a do pečiva	

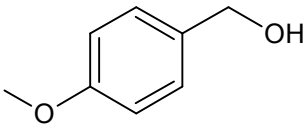
Tabulka 6: Vlastnosti amylcinnamyl alkoholu [23,26,27,28,39]

Identifikace látky	
α-AMYLCINNAMYL ALKOHOL	
chemická třída	alkohol
CAS	101-85-9
molekulový vzorec	C ₁₄ H ₂₀ O
molekulová hmotnost	204,31 g.mol ⁻¹
synonyma	2-benzylidenheptan-1-ol, buxinol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	141-143 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá až slabě žlutá kapalina
aroma	lehká květinová vůně
rozpuštnost	rozpuštný v ethanolu, nerozpuštný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 4000 mg.kg ⁻¹	

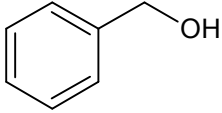
Tabulka 6: Vlastnosti amylcinnamyl alkoholu [23,26,27,28,39] - pokračování

Výskyt a použití
syntetická sloučenina, vyskytuje se spíše v kosmetických výrobcích používán jako ochucovadlo pro přímé přidávání do potravin

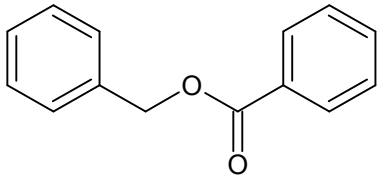
Tabulka 7: Vlastnosti anýzalkoholu [23,27,28]

Identifikace látky	
ANÝZ ALKOHOL	
chemická třída	alkohol
CAS	105-13-5
molekulový vzorec	C ₈ H ₁₀ O ₂
molekulová hmotnost	138,16 g.mol ⁻¹
synonyma	p-anýz alkohol, p-methoxybenzyl alkohol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	259,1 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá až mírně nažloutlá kapalina nebo neprůhledná krystalická látka
aroma	mírně sladká květinová vůně
rozpuštěnost	rozpuštěný v organických rozpouštědlech, nerozpuštěný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan): 1200 mg.kg ⁻¹ , mírně toxický při požití, dráždí kůži a oči	
Výskyt a použití	
přirozeně se vyskytuje se v rostlině <i>Pimpinella anisum</i> , v rajčatech, medu, také se připravuje synteticky používá se jako ochucovadlo, používá se při výrobě želatiny a pudingů, pečiva, mražených mléčných dezertů, nápojů a měkkých bonbónů	

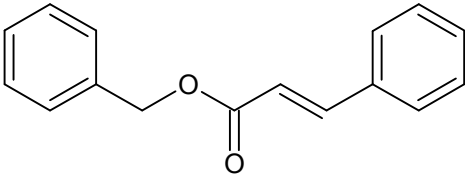
Tabulka 8: Vlastnosti benzylalkoholu [23,24,28,29]

Identifikace látky	
BENZYLALKOHOL	
chemická třída	alkohol
CAS	100-51-6
molekulový vzorec	C ₇ H ₈ O
molekulová hmotnost	108,14 g.mol ⁻¹
synonyma	hydroxytoluen, bentanol, fenylcarbinol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	205 °C
vzhled, skupenství	čirá bezbarvá kapalina
aroma	příjemná mandlově ovocná vůně
rozpustnost	lehce rozpustný ve vodě, organických rozpouštědlech a olejích
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan) 1230 mg.kg ⁻¹ může dráždit oči, kůži a sliznici, při požití mírně toxický	
Výskyt a použití	
přirozeně se vyskytuje v meruňkách, kuřecím a hovězím masu, sýru Cheddar, pivu, mandlích, jablcích, banánech, černém rybízu a chřestu používá se jako aditivum v ovocných nápojích, bonbónech, žvýkačkách nebo sirupech proti kašli a při výrobě dalších chemikálií	

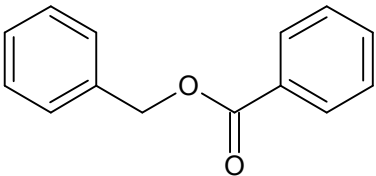
Tabulka 9: Vlastnosti benzylbenzoátu [24,28,29,31,32]

Identifikace látky	
BENZYLBenzoát	
chemická třída	ester
CAS	120-51-4
molekulový vzorec	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
molekulová hmotnost	212,24 g.mol ⁻¹
synonyma	benzylester kyseliny benzoové, ascabiol, novoscabin
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	323-324 °C
vzhled, skupenství	bezbarvé krystaly nebo bezbarvá téměř olejovitá kapalina
aroma	příjemná mandlová vůně
rozpustnost	rozpustný v ethanolu, etheru, mastných olejích, nerozpustný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan) 1700 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
součást insekticidů (akaricid = pesticid používán na hubení roztočů), v přípravcích k léčbě svrabu používá se jako stabilizátor syntetických příchutí, v průmyslu jako plastifikátor	

Tabulka 10: Vlastnosti benzylcinnamátu [27,28,31]

Identifikace látky	
BENZYLCINNAMÁT	
chemická třída	ester
CAS	103-41-3
molekulový vzorec	C ₁₆ H ₁₄ O ₂
molekulová hmotnost	238,28 g.mol ⁻¹
synonyma	cinnamein, benzyl ester kyseliny skořicové
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	195-200 °C
vzhled, skupenství	čirá bezbarvá až nažloutlá krystalická látka
aroma	sladká vůně květů a plodů třešní
rozpustnost	rozpustný v ethanolu, dipropylglykolu a v olejích, ve vodě pouze 9 mg/l, nerozpustný v glycerinu a propylenglykolu
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan) 5530 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
pro svou příjemnou aromatickou vůni široce používán v kosmetice, je součástí mnoha složených vůní používaných při výrobě např. vody po holení, pěny do koupele, čistících a tonizačních přípravků na pleť, deodorantech, vlasových kondicionérech, šamponech aj.	

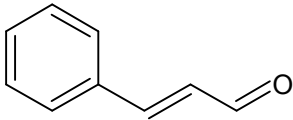
Tabulka 11: Vlastnosti benzylsalicylátu [24,27,28,31]

Identifikace látky	
BENZYLSALICYLÁT	

Tabulka 11: Vlastnosti benzylsalicylátu [24,27,28,31] - pokračování

chemická třída	ester
CAS	118-58-1
molekulový vzorec	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
molekulová hmotnost	228,26 g.mol ⁻¹
synonyma	benzylester kyseliny salicylové, benzyl-2-hydroxybenzoát
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	320°C
vzhled, skupenství	lehce narůžovělá kapalina
aroma	příjemná sladká vůně
rozpustnost	rozpustný v ethanolu, etheru, málo rozpustný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan), 3000 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
<p>v aromatizovaných kosmetických přípravcích různých typů, hlavně však v samoopalovacích krémech a mlécích</p> <p>používá se jako fixativum vonných látek zejména v parfémeh, hlavní rozpouštědlo pro vonné látky a silice</p>	

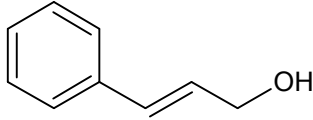
Tabulka 12: Vlastnosti cinnamalu [23,24,28,29,31,32]

Identifikace látky	
CINNAMAL	
chemická třída	aldehyd
CAS	104-55-2
molekulový vzorec	C ₉ H ₈ O
molekulová hmotnost	132,16 g.mol ⁻¹

Tabulka 12: Vlastnosti cinnamalu [23,24,28,29,31,32] - pokračování

Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	246 °C
vzhled, skupenství	čirá žlutá kapalina
aroma	sladká a skořicová vůně
rozpustnost	nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v ethanolu a olejích
Toxikologie	
LD50 (orální, potkan) 2220 mg.kg ⁻¹ toxický při požití, dráždí kůži a oči	
Výskyt a použití	
v přírodě se vyskytuje jako přirozená složka skořicových silic a étherických olejů, dále také v borůvkách, brusinkách, melounu, višních, guave, hřebíčku, skořici, pivu a brandy v potravinářském průmyslu do aromat a kořenících směsí, ochucovadlo šťáv, bonbónů, masa, nápojů a pečiva	

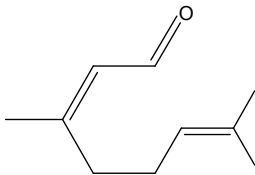
Tabulka 13: Vlastnosti cinnamyl alkoholu [27,28,29,30,31]

Identifikace látky	
CINNAMYL ALKOHOL	
chemická třída	alkohol
CAS	104-54-1
molekulový vzorec	C ₉ H ₁₀ O
molekulová hmotnost	134,18 g.mol ⁻¹
synonyma	skořicový alkohol, styron, styryl carbinol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	250 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá pevná látka
aroma	hyacintová, květinová až skořicová

Tabulka 13: Vlastnosti cinnamyl alkoholu [27,28,29,30,31] - pokračování

rozpustnost	rozpustný ve vodě a glycerolu, snadno rozpustný v alkoholu a éteru
Toxikologie	
LD50 (pokožka, králík), > 5000 mg.kg ⁻¹ , LD50 (orální, krysa) 2000 mg.kg ⁻¹ , zdraví škodlivý při požití, může zapříčinit vznik pigmentací na tváři	
Výskyt a použití	
v mnoha rostlinách, v oleji z hyacintových květů narcisových rostlin, v oleji ze skořicových listů a v peruánském balzámu	

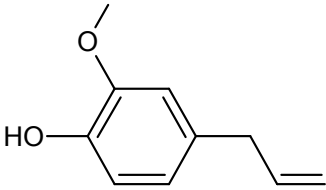
Tabulka 14: Vlastnosti citralu [24,27,28,31,32]

Identifikace látky	
CITRAL	
chemická třída	aldehyd
CAS	5392-40-5
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₆ O
molekulová hmotnost	152,24 g.mol ⁻¹
synonyma	geranialdehyd, lemonal, geranial, neral
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	229 °C
vzhled, skupenství	světle žlutá olejovitá kapalina
aroma	příjemná citrónová vůně
rozpustnost	nerozpustný ve vodě, dobře mísitelný s ethanolem a éterem
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 4960 mg.kg ⁻¹ , toxický při požití, dráždí kůži	

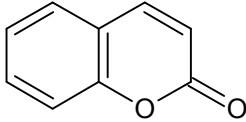
Tabulka 14: Vlastnosti citralu [24,27,28,31,32] - pokračování

Výskyt a použití
v citrusových plodech (citrón, pomeranč), v citrusových silicích tvoří až 80 %, v citrusových olejích (většina rostlin rodu <i>Cymbopogon</i>), v čajových směsích (značka Dichi)

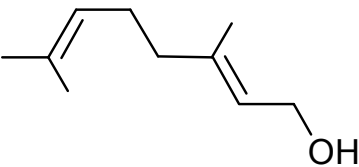
Tabulka 15: Vlastnosti citronellolu [28,31,32]

Identifikace látky	
CITRONELLOL	
chemická třída	alkohol
CAS	106-22-9
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₂₀ O
molekulová hmotnost	156,27 g.mol ⁻¹
synonyma	dihydrogeraniol, cefrol, rhodinol, cephol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	222 - 225 °C
vzhled, skupenství	světle žlutá olejovitá kapalina
aroma	nasládlá květinová vůně, růže, kůže a s jemnou nuancí citrusů
rozpustnost	nerozpustný ve vodě, mísitelný s ethanolem
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 3450 mg.kg ⁻¹ , dráždí oči, dýchací orgány a kůži	
Výskyt a použití	
přítomný ve více než 30 rostlinných olejích (geraniový, růžový, citronellový), v černém čaji a mnoha druzích ovoce (např. citrusy), v exotických nápojích, v přírodním citronella oleji (známý jako Ceylonský nebo Jávský olej) používá se k ochucování nápojů	

Tabulka 16: Vlastnosti kumarinu [28,31,32]

Identifikace látky	
KUMARIN	
chemická třída	lakton
CAS	91-64-5
molekulový vzorec	C ₉ H ₆ O ₂
molekulová hmotnost	146,15 g.mol ⁻¹
synonyma	anhydrid kyseliny o-kumarové, 1,2-benzpyron, <i>Tonka bean camphor</i>
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	298 °C
vzhled, skupenství	bílá krystalická látka
aroma	příjemná vůně lučního sena, podobná vanilce
rozpuštěnost	rozpuštěný ve většině organických rozpouštědel a ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 293 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
<p>přítomen v čerstvých rostlinných pletivech, v nati komonice, svízele vonného a některých druhů trav, v malém množství také v jahodách, meruňkách a skořici</p> <p>používá se k aromatizaci tabáku a alkoholických nápojů (např. polská Zubrovka)</p>	

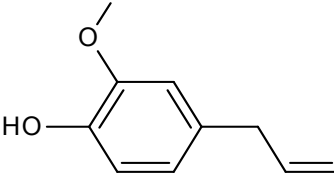
Tabulka 17: Vlastnosti geraniolu [5,23,28,31,32]

Identifikace látky	
GERANIOL	

Tabulka 16: Vlastnosti geraniolu [5,28,31,32] - pokračování

chemická třída	alkohol
CAS	106-24-1
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₈ O
molekulová hmotnost	154,25 g.mol ⁻¹
synonyma	geraniový olej, lemonol,
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	229 – 230 °C
vzhled, skupenství	světle žlutá olejovitá kapalina
aroma	sladká vůně růže
rozpustnost	mísitelný s ethanolem a étherem, nerozpustný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 3600 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
přítomen ve většině rostlin a silic (např. v růžích, levanduli, jasmínu, pelargoních, kakostu aj.), v množství asi 8 % je složkou geraniového oleje, nachází se také v bulharském růžovém oleji, v jablcích, meruňkách, borůvkách, černém rybízu, hroznovém vínu, skořici, kopru, zázvoru, kakau, medu, citronu, pomeranči a pivu	

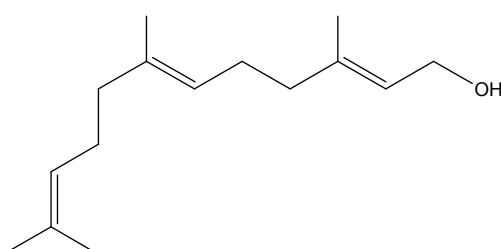
Tabulka 18: Vlastnosti eugenolu [27,28,31,32]

Identifikace látky	
EUGENOL	
chemická třída	alkohol
CAS	97-53-0
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
molekulová hmotnost	164,21 g.mol ⁻¹
synonyma	eugenolum, kyselina eugenolová, allylguajacol

Tabulka 18: Vlastnosti eugenolu [27,28,31,32] - pokračování

Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	254 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá až slabě žlutá kapalina
aroma	silná vůně hřebíčku
rozpustnost	rozpustný v ethanolu, chloroformu, étheru a oleji, prakticky nerozpustný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 2680 mg.kg ⁻¹ , zdraví škodlivý při požití, dráždí oči, dýchací orgány a kůži	
Výskyt a použití	
je významnou součástí karafiátového a skořicového oleje, přítomen v muškátovém oříšku, hlavní složka silic nového koření	

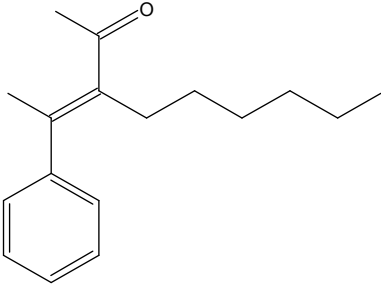
Tabulka 19: Vlastnosti farnesolu [24,27,28,31]

Identifikace látky	
FARNESOL	
chemická třída	alkohol
CAS	106-28-5
molekulový vzorec	C ₁₅ H ₂₆ O
molekulová hmotnost	222,37 g.mol ⁻¹
synonyma	3,7,11-trimethyl-2,6-10-dodekatrien-1-ol, Stirrup – H (HB, A/WF, CRW, TPW)
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	149 °C (4 mm Hg)
aroma	jemná květinová vůně
rozpustnost	dobře mísitelný s oleji, nerozpustný ve vodě
Toxikologie	

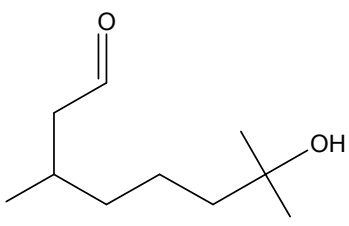
Tabulka 19: Vlastnosti farnesolu [24,27,28,31] - pokračování

LD50 (orální, krysa): 6000 mg.kg ⁻¹ , toxický při styku s kůží a požití
Výskyt a použití
přítomný v mnoha esenciálních olejích (růžový, citronella, neroli), také se vyskytuje v květech pomerančovníku, růže, jasmínu, konvalinky nebo lípy, přidává se do cigaretového tabáku

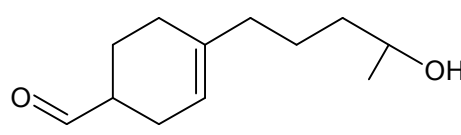
Tabulka 20: Vlastnosti hexylcinnamalu [24,27,31]

Identifikace látky	
HEXYLCINNAMAL	
chemická třída	aldehyd
CAS	101-86-0
molekulový vzorec	C ₁₅ H ₂₀ O ₂
molekulová hmotnost	216,32 g.mol ⁻¹
synonyma	caproaldehyd, 2-benzylidenoktanal, jasmonal H
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	174 - 176 °C
vzhled, skupenství	čirá žlutá kapalina
aroma	jemná květinová jasmínová vůně
rozpuštěnost	rozpuštěný ve vodě, ethanolu, mísitelný s étherem, chloroformem a olejem
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 3100 mg.kg ⁻¹ , dráždí oči, dýchací orgány a kůži	
Výskyt a použití	
získává se z rychle rostoucí líjány rostoucí v Číně, Indii a Srí Lance: Jasmín lékařský (pravý), používá se převážně v kosmetice	

Tabulka 21: Vlastnosti hydroxycitronellalu [22,27,28,31]

Identifikace látky	
HYDROXYCITRONELLAL	
chemická třída	aldehyd
CAS	107-75-5
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
molekulová hmotnost	172,26 g.mol ⁻¹
synonyma	liliový aldehyd, cyslalia, cyclosia, lavrine, phixia, fixol, majal
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	257 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá viskózní kapalina
aroma	liliové lipové aroma
rozpustnost	dobře rozpustný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 5000 mg.kg ⁻¹ , možná kožní senzibilizace ³	
Výskyt a použití	
nelze nalézt v přírodě, syntetická vůně, přidává se do některých aromat např. lípa a med	

Tabulka 22: Vlastnosti lyralu [22,24,27,31,33,34]

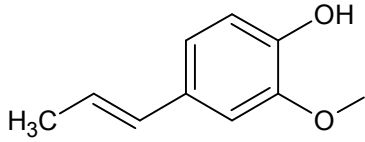
Identifikace látky	
LYRAL	
chemická třída	aldehyd

³ navození „přichypané“ přecitlivělosti při prvním kontaktu s alergenem [36]

Tabulka 22: Vlastnosti lyralu [22,24,27,31,33,34] - pokračování

CAS	31906-04-4
molekulový vzorec	C ₁₃ H ₂₂ O ₂
molekulová hmotnost	210,31 g.mol ⁻¹
synonyma	3-cyklohexen-1-karboxaldehyd, hydroxyisohehexyl 3-cyklohexene karboxaldehyd
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	318,7 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá olejovitě viskózní kapalina
aroma	sladká květinová vůně lilií, cyklámenů, bramboříku nebo šeríku
rozpustnost	dobře mísitelný se 70% až 96% ethanolem
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 5000 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
přítomen v alkoholických nápojích	

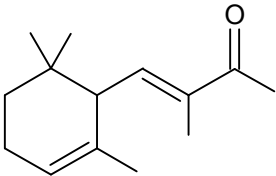
Tabulka 23: Vlastnosti isoeugenolu [24,27,28,29,31]

Identifikace látky	
ISOEUGENOL	
chemická třída	alkohol
CAS	97-54-1
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
molekulová hmotnost	164,21 g.mol ⁻¹
synonyma	isoeugenolum, 4-propylenguajacol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	266 °C
vzhled, skupenství	světle žlutá viskózní kapalina

Tabulka 23: Vlastnosti isoeugenolu [24,27,28,29,31] - pokračování

aroma	karafiátová vůně
rozpustnost	velmi málo rozpustný ve vodě, mísitelný s ethanolem a étherem
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 1560 mg.kg ⁻¹ , dráždí oči, dýchací orgány a kůži, zdraví škodlivý při požití	
Výskyt a použití	
vyskytuje se v mnoha rostlinách a v éterických olejích (např. v hřebíčkovém), používá se ke korekci vůně v aromatizovaných čajích a jiných výrobcích potravinářského průmyslu např. kořenících směsích aj.	

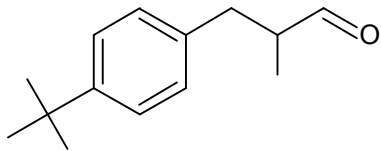
Tabulka 24: Vlastnosti α -isomethyliononu [24,28,31]

Identifikace látky	
α-ISOMETHYLIONON	
chemická třída	aldehyd
CAS	127-51-5
molekulový vzorec	C ₁₄ H ₂₂ O
molekulová hmotnost	206,32 g.mol ⁻¹
synonyma	(3E)-3-methyl-4-[(1S)-2,6,6-trimethylcyklohex-2-en-1-yl]but-3-en-2-on, α -cetone
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	110 °C (4 mm Hg)
vzhled, skupenství	čirá, bezbarvá nebo žlutá tekutina
aroma	borovicové jehličí, růže
rozpustnost	rozpustný v alkoholu, nerozpustný ve vodě
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): mg.kg ⁻¹	

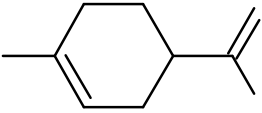
Tabulka 24: Vlastnosti α -isomethyliononu [24,28,31] - pokračování

Výskyt a použití	
nelze nalézt v přírodě, syntetická vůně, vyskytuje se převážně v kosmetických výrobcích	

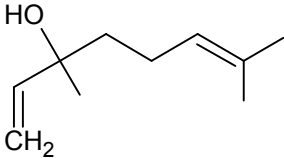
Tabulka 25: Vlastnosti lilialu [28,30,31]

Identifikace látky	
LILIAL	
chemická třída	aldehyd
CAS	80-54-6
molekulový vzorec	C ₁₄ H ₂₀ O
molekulová hmotnost	204,31 g.mol ⁻¹
synonyma	3-(4-terc-butylfenyl)-2-methylpropanal
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	258 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá nebo lehce nažloutlá, čirá, olejovitá tekutina
aroma	květinová vůně
rozpustnost	rozpustný v alkoholu, parafínovém oleji, ve vodě pouze 38 mg/l
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 1390 mg.kg ⁻¹ , dráždí oči a kůži	
Výskyt a použití	
nelze nalézt v přírodě, vyskytuje se převážně v kosmetických výrobcích	

Tabulka 26: Vlastnosti limonenu [23,27,28,31]

Identifikace látky	
LIMONEN	
chemická třída	terpen
CAS	5989-27-5
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₆
molekulová hmotnost	136,23 g.mol ⁻¹
synonyma	4-isopropenyl-1-methylcyklohexen
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	176-177 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá kapalina
aroma	citrusová vůně
rozpustnost	rozpustný v alkoholu, olejích, kerosinu, parafinovém oleji, ve vodě pouze 14 mg/l, nerozpustný v propylenglykolu
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 3600 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
vyskytuje se v grapefruitech, citrónech, limetkách, pomerančích, pepři, australském tea tree oleji a v muškátovém oříšku používá se výrobě pečiva, mražených mléčných dezertů, masových výrobcích, koření a nápojů	

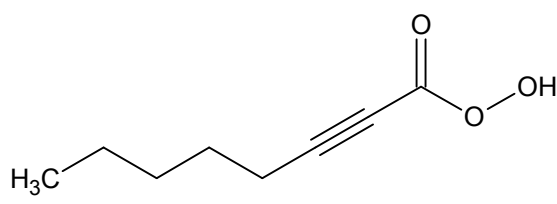
Tabulka 27: Vlastnosti linaloolu [24,27,28,31,34]

Identifikace látky	
LINALOOL	
chemická třída	alkohol

Tabulka 27: Vlastnosti linaloolu [24,27,28,31,34] - pokračování

CAS	78-70-6
molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₈ O
molekulová hmotnost	154,25 g.mol ⁻¹
synonyma	1,3,7-dimethylokta-1,6-dien-3-ol, linalylalkohol
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	197 - 199 °C
vzhled, skupenství	bezbarvá až světle žlutá kapalina
aroma	květinová vůně
rozpustnost	rozpustný v olejích, parafínovém oleji, ve vodě 1590 mg/l, nerozpustný v glycerinu
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa):	2790 mg.kg ⁻¹
Výskyt a použití	
vyskytuje se v jablečné, mandarinkové a pomerančové šťávě, meruňkách, broskvích, jahodách, švestkách, gardeniích, levandulích, mrkvi, bergamotovém oleji, majoránce, tymiánu, kardamonu, koriandru a brusinkách	

Tabulka 28: Vlastnosti methylheptin karbonátu [22,27,28,31]

Identifikace látky	
METHYLHEPTIN KARBONÁT	
chemická třída	ester karboxylové kyseliny
CAS	111-12-6
molekulový vzorec	C ₉ H ₁₄ O ₂
molekulová hmotnost	154,21 g.mol ⁻¹
synonyma	methylokt-2-yonát, folione
Fyzikální a chemické vlastnosti	
teplota varu	217 - 220 °C

Tabulka 28: Vlastnosti methylheptin karbonátu [22,27,28,31] - pokračování

vzhled, skupenství	bezbarvá nebo lehce nažloutlá, čirá tekutina
aroma	květinová vůně
rozpustnost	rozpustný v alkoholu, olejích a dipropylglykolu, nerozpustný ve vodě a glycerinu
Toxikologie	
LD50 (orální, krysa): 1530 mg.kg ⁻¹	
Výskyt a použití	
nelze nalézt v přírodě, synteticky vyrobený, vyskytuje se převážně v kosmetických výrobcích přidává se do některých aromat, například víno, jahoda aj.	

2.9. Možnosti stanovení aromatických látek v potravinách

Přehled metod využívaných pro stanovení aromatických látek v potravinách:

2.9.1. GC-MS

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí byla použita např. pro stanovení:

- v ovocných šťávách - Yu Qiao a kol. identifikovali tyto alergenní látky: benzaldehyd, limonen, linalool, geraniol a citral [40]
- v japonském zeleném čaji Sen-cha – Kumazawa a Masuda stanovili alergenní geraniol, eugenol, kumarin a linalool [41]

2.9.2. HS-SPME/GC-MS

Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, kterou byly stanovovány aromaticky aktivní látky v:

- meruňkách - Guillot a kol. identifikovali tyto alergenní látky: citral (cis + trans), benzylalkohol, limonen a linalool [42]
- malinách, jahodách, ostružinách, banánech a mangu - Ibáñez a kol. identifikovali linalool v mangu, linalool a citral v malinách [43]
- kávových zrnech kávy Arabica a Robusca - Mondello a kol. stanovili tyto alergenní látky: limonen, linalool a benzylalkohol [44]
- sicilském kozím sýru - Mondello a kol. stanovili limonen [45]
- panenském olivovém oleji - Vichi a kol. identifikovali limonen a benzylalkohol [46]
- citrusovém ovoci - Yoo a kol. v citrusu identifikovali limonen, linalool, v citronu citral, limonen, linalool, geraniol, v pomeranči limonen [47]

- šťávách mandarinky a mandarinky druhu Klementina – Barboni a kol. identifikovali 44 vonných látek, z nichž se v obou druzích vyskytoval alergenní citronellool, limonen a linalool [48]
- hroznech (odrůda Muscat) - Sánchez-Palomo a kol. stanovili benzylalkohol, citronellool, geraniol a linalool [49]
- lepkové rýži - Zeng a kol. identifikovali vonné látky ve třech kultivarech této rýže, z alergenních stanovili farnesol [50]
- žvýkačkách – Wong a kol. identifikovali benzylcinnamát, geraniol, limonen a linalool [51]
- čerstvém chilli - Mazida a kol. stanovili linalool [52]
- hermelínu – Perés a kol. identifikovali limonen [53]
- Dong Ding Oolong čaji - Wang a kol. identifikovali citral, benzylalkohol, geraniol a linalool a dále v pravém jasmínovém čaji benzylalkohol, geraniol a linalool [54]
- másle – Polovo a Contarini stanovili alergenní limonen [55]
- rajčatovém džusu – Servili a kol. identifikovali benzylalkohol, citral, geraniol a linalool [56]
- šumivém vínu – Bosch-Fusté a kol. stanovili tyto alergenní látky: benzylalkohol, limonen a linalool [57]
- vínech (Rulandské šedé a Chardonnay) – Howard a kol. identifikovali geraniol a linalool [58]
- cigaretovém tabáku – Stanfill a Ashley stanovili eugenol a kumarin [59]

2.9.3. HS-SPME/GC-FID

Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem, která byla použita pro stanovení aromaticky aktivních látek v:

- panenském olivovém oleji - Vichi a kol. identifikovali limonen a benzylalkohol [45].
- Limoncellu⁴ - Crupi a kol. identifikovali tyto alergenní látky: citral, geraniol, limonen a linalool [60]
- esenciálním oleji z růže *Rosa Damascena* – Jirovetz a kol. stanovili tyto alergenní látky: citral, citronellool, eugenol, farnesol, geraniol, limonen a linalool [61]

2.9.4. HS-SPME/GC/GC-MS

Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s dvourozměrnou plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, kterou Williams a kol. identifikovali v jahodách alergenní linalool [62].

⁴ citrónový likér, vyroben z citrónů, alkoholu, vody a cukru, původně vyráběn v jižní Itálii

2.9.5. HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kterou stanovili Sproll a kol. kumarin ve svařeném vínu, mléčných produktech (jogurt, jogurtový nápoj, rýžový pudink, quark sýr), skořicových sušenkách a vodce (Zubrowka) [63].

2.9.6. LC-MS/MS

Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí, kterou Raters a Matissek stanovili kumarin v různých druzích potravin, a to ve směsi koření, skořicových sušenkách, perníku a cukrovinkách [64].

2.9.7. DHS/GC-MS

Dynamická headspace ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:

- třech druzích evropských ovčích sýrů (s označením původu CHOP) – Larráyoza a kol. identifikovali limonen [65]

2.9.8. SDE/GC-MS

Simultánní destilační extrakce ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, která byla použita pro stanovení vybraných aromaticky aktivních látky v:

- černém čaji vyráběném v indické oblasti Kangra – Rawat a kol. stanovili alergenní geraniol a linalool [66]
- thajských čajích – Pripdeevech a Machau identifikovali vonné látky v různých typech thajských čajů:
 - Green Oolong tea, Green Assam tea – benzylalkohol, geraniol a linalool
 - Chin Shin Oolong tea – benzylbenzoát, benzylsalicylát, geraniol, kumarin a linalool
 - Chin Hsuan Oolong tea – benzylalkohol, geraniol a linalool
 - Four Season tea – benzylalkohol, benzylbenzoát, benzylsalicylát, geraniol, kumarin a linalool [67]
- maďarské červené paprice – Kocsis a kol. stanovili tyto alergenní látky: farnesol, geraniol, linalool a limonen [68]

2.9.9. DI/GC-FID(GC-MS)

Přímý nástřik/plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (hmotnostní detekcí), kterou použili Cortés a kol. a v destilátu Orujo⁵ identifikovali alergenní benzylalkohol [69].

2.9.10. HSSE-GC-MS

Headspace sorpční extrakce ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí identifikovali Callejón a kol. benzylalkohol a eugenol v Sherry vínu [70].

Z uvedeného přehledu je patrné, že sledované alergenní vonné látky se nacházejí v širokém spektru různých typů potravin a vzhledem k jejich možným nežádoucím účinkům je žádoucí mít k dispozici metodu pro jejich rutinní stanovení. Pro izolaci těžkých aromaticky aktivních látek z matrice vzorku se nejčastěji používá metoda SPME, která byla aplikována i v této práci, jako analytická koncovka pro identifikaci a kvantifikaci jednotlivých látek je ideální GC-MS.

2.10. Vybrané validační parametry analytické metody

Validace je proces, při němž se určuje vhodnost použití daného analytického systému pro získání relevantních dat.

Validace je daná vždy rovnováhou mezi náklady, riziky a technickými možnostmi (ČSN EN ISO/IEC 17025) [71].

2.10.1. Opakovatelnost metody

Opakovatelnost je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí) [72].

2.10.2. Linearita metody

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (R) [71].

⁵ Destilát, který obsahuje 50% obj. alkoholu a je velmi populární na severu Španělska.

2.10.3. Mez detekce

Limit of detection (LOD). Mez detekce daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale které nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota.

U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že jsou k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Pro koncentraci meze detekce platí:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} \quad (1)$$

Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max} \quad (2)$$

Je nutné uvést, že směrnice kalibrační přímky b_1 musí být z koncentrační závislosti $y = b_1 \cdot x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha, jak je obvyklé [71,72].

2.10.4. Mez stanovitelnosti

Limit of quantification (LOQ) Mez stanovitelnosti metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.

Často volíme jako nejnižší bod kalibrační křivky (y_l).

Pro koncentraci meze stanovitelnosti platí:

$$x_S = \frac{y_S}{b_1} \quad (3)$$

Pro odezvu meze stanovitelnosti platí:

$$y_S = 10 \cdot h_{\max} \quad (4)$$

Pro $y = b_1 \cdot x$ platí stejné podmínky jako u meze detekce [71,72].

2.11. Statistické vyhodnocení naměřených dat

Pro vyhodnocení naměřených dat byly použity následující statistické parametry [75,76]:

Aritmetický průměr

Aritmetický průměr se obvykle značí vodorovným pruhem nad názvem proměnné a je definován:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (5)$$

tzn. součet všech hodnot vydělený jejich počtem.

Směrodatná odchylka

Uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřena veličina x a charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i kolem aritmetického průměru. Směrodatná odchylka je mírou přesnosti série paralelních výsledků a je definována:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru, uvádí se v procentech a je definována:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100[\%] \quad (7)$$

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této diplomové práce je vypracovat a validovat metodu SPME-GC-FID pro stanovení vybraných alergenních vonných látek. Následně ji pak aplikovat na vybrané reálné vzorky potravin.

3.1. Laboratorní vybavení

3.1.1. Chemikálie

V experimentální části bylo zpracováno šest standardů alergenních vonných látek (tab. 29).

Tabulka 29: Seznam použitých chemikálií

název chemikálie	čistota	výrobce
α -amylcinnamyl alkohol	$\geq 85 \%$	Fluka Analytical
α -isomethylionon	$\geq 85 \%$	Fluka Analytical
benzylalkohol	99 %	Alfa Aesar
cinnamyl alkohol	98 %	Alfa Aesar
kumarin	98 %	Alfa Aesar
lyral	$\geq 97 \%$	Sigma-Aldrich

Jako rozpouštědlo pro všechny tyto chemikálie byl použit heptan (čistota $\geq 99 \%$, výrobce Sigma-Aldrich).

3.1.2. Přístroje a pracovní pomůcky

- Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie)
- Vodní lázeň Julabo TW12
- Analytické digitální váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Program Chrom-Card
- Chladnička Amica, model AD 250
- SPME vlákno se stacionární fází CARTM/PDMS o tloušťce 85 μ m, SUPELCO
- Automatické mikropipety:
 - Biohit Proline 0,5 – 10,0 μ l
 - Biohit Proline 10,0 – 100,0 μ l
 - Biohit Proline 100,0 – 1000,0 μ l
 - Biohit Proline Plus 0,1 – 3,0 μ l
 - Labsystems Finnpiquette 0,2 – 2 μ l
 - Gilson Pipetman 2,0 – 20 μ l

- Vialky o objemu 4 ml se šroubovacím uzávěrem a septem

3.2. Podmínky SPME-GC-FID

Teplotní program GC a extrakční podmínky pro metodu SPME byly převzaty z předešlých prací, které se touto problematikou také zabývaly [22,23,29,73,74].

- plynový chromatograf: TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, *split/splitless* injektor
- kapilární kolona: DB-WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5 μm)
- nosný plyn: dusík - průtok 0,9 ml·min⁻¹
- další plyny: vodík, vzduch
- injektor: 250 °C, mód CT splitless s konstantní teplotou v celém injektoru
- detektor: plamenově ionizační (FID), 220 °C, průtok vzduchu 35 ml·min⁻¹, průtok vodíku 35 ml·min⁻¹, make-up dusíku 30 ml·min⁻¹

Tabulka 30: Optimalizované extrakční podmínky metody SPME [22,23,29,73,74]

Extrakční postup	Headspace SPME (HS-SPME)
Extrakční teplota	35 °C
Doba dosažení rovnováhy	20 minut
Doba extrakce	15 minut

3.3. Reálné vzorky potravin

Metoda SPME-GC-FID byla aplikovaná na náhodně vybrané vzorky potravinových výrobků. Vzorky byly zakoupeny v běžné obchodní síti a uchovávány dle pokynů uvedených na obale.

Tabulka 31: Reálné vzorky potravinových výrobků

Potravinový výrobek				
Název	Popis	Objem (hmotnost)	Výrobce	Na obale uvedeno obsahuje aroma
Aktivní žena	Ajurvédská směs bylinného čaje a koření.	70 g	OXALIS,s.r.o., Slušovice	ne
Bon Pari	Drops s ovocnými příchutěmi.	100 g	Nestlé Česko, s.r.o., Praha 4	přírodní
Energy drink	Bitter lemon.	0,25 l	X-Cite s.r.o., Králův Dvůr	ano
Frisco	Jemně perlivý alkoholický nápoj, obsah alkoholu 4,5%.	0,33 l	Plzeňský Prazdroj, a.s.	přírodní

Tabulka 31: Reálné vzorky potravinových výrobků - pokračování

Gumoví medvídci	Želatinoví medvídci s ovocnou příchutí. Bez chemické konzervace a umělých barviv.	100 g	WISSA, spol. s.r.o., Praha 4	ano
HIPP	Jablečno meduňkový nápoj v prášku s vitamínem C.	200 g	HIPP Czech s.r.o., Praha 5	přírodní
Johnnie Walker - Red Label	Skotská whisky s kořenitou vůní, obsah alkoholu 40 - 43 %.	0,7 l	Johnnie Walker, a.s.	ne
Jupík – Mayské dobrodružství	Nesycený nealkoholický nápoj. Jahoda, jablko.	0,33 l	Kofola a.s., Krnov	ano
Lavazza arabica	Mletá káva Lavazza Espresso 100% Arabica.	250 g	Luigi Lavazza S.p.A., Itálie	ne
Teekanne - chřípka a nachlazení	Bylinný čaj proti nachlazení.	10 x 2 g	Teekanne, s.r.o., Praha 5	ne
Teekanne - játra a žlučník	Bylinný čaj povzbuzující funkci jater a žlučníku.	10 x 2 g	Teekanne, s.r.o., Praha 5	ne
Teekanne - urologický čaj	Bylinný čaj pro vylučování. Má dezinfekční účinky.	10 x 2 g	Teekanne, s.r.o., Praha 5	ne
John Wesson	Americká blended whisky.	0,7 l	Kaufland, s.r.o.	ne

3.4. Pracovní postupy

3.4.1. Příprava alergenního standardu

Požadované množství standardu alergenní vonné látky bylo doplněno rozpouštědlem (heptanem) vždy do objemu 1 ml. Tento objem byl umístěn do vialky a uzavřen šroubovacím uzávěrem se septem. Standardy byly uchovávány v chladničce.

3.4.2. Příprava reálného vzorku

Vzorky pevného skupenství (čaje, bonbóny) byly nakrájeny na malé kousky nebo rozmělněny ve třecí misce s tloučkem. 1 gram takto upraveného vzorku byl umístěn do vialky a uzavřen šroubovacím uzávěrem s plynotěsným septem. Kapalné reálné vzorky (alkoholické nápoje, džusy) byly o objemu 1 ml umístěny přímo do vialky.

3.4.3. Sorpce a desorpce aromaticky aktivních látek

Roztok připraveného standardu (viz. 3.4.1) byl umístěn do vodní lázně, která byla vytemperována na teplotu 35 °C (extrakční teplota). Během 20 minut docházelo k ustavení rovnováhy mezi vzorkem a headspace prostorem. Po této době byla přes předpíchnuté septum pomocí pístu vpíchnuta ochranná jehla SPME extraktoru (uchycen v držáku na stojanu). Z jehly bylo vysunuto vlákno s extrakční vrstvou, na kterou se 15 minut adsorbovaly

aromaticky aktivní látky. Poté bylo vlákno vtaženo zpět do jehly a okamžitě přeneseno do injektoru plynového chromatografu, kde bylo opět pomocí pohyblivého pístu vysunuto z ochranné jehly a došlo vlivem vysoké teploty (250 °C) k tepelné desorpci aromaticky aktivních látek z extrakční vrstvy.

Extrakce a desorpce aromaticky aktivních látek ze vzorků potravin probíhala stejným způsobem.

3.4.4. Statistické vyhodnocení výsledků

Pro zpracování naměřených parametrů byl použit program MS Excel, byly použity vzorce z kapitoly 2.11.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce navazuje na předchozí práce zabývající se problematikou vonných látek [22,29,73,74].

4.1. Identifikace standardů alergenních vonných látek

V rámci této práce byla provedena identifikace α -amylcinnamylalkoholu, α -isomethyliononu a lyralu. Retenční časy zbylých alergenních standardů (tabulka 32) byly převzaty z předešlých prací zabývajících se touto problematikou [22,29,73,74].

Chromatogramy dosud identifikovaných standardů jsou uvedeny v příloze I a II.

Tabulka 32: Retenční časy jednotlivých standardů alergenních vonných látek

Alergenní standard	Retenční čas t_R [min]
Limonen	12,50
α -Amylcinnamyl alkohol	19,00
Amylcinnamal I	21,15
Linalool	21,34
Methylheptin karbonát	23,87
Citral I	24,78
Citral II	25,88
Citronellol	26,27
Geraniol	28,14
α -Isomethylionone	28,50
Benzylalkohol	29,05
Hydroxycitronellal	30,33
Cinnamal	32,42
Lyal	33,05
Eugenol	34,68
Isoeugenol I	36,88
Amylcinnamal II	37,00
Cinnamyl alkohol	37,80
Anýzalkohol	37,85
Isoeugenol II	39,72
Hexylcinnamal	40,16
Kumarin	44,58

4.2. Validace metody

Základní validační parametry (tj. opakovatelnost, linearita, meze detekce a meze stanovitelnosti), byly stanoveny celkem u pěti standardů alergenních vonných látek, a to u α -amylcinnamylalkoholu, α -isomethyliononu, benzylalkoholu, cinnamylalkoholu a kumarinu.

4.2.1. Stanovení opakovatelnosti

Opakovatelnost byla stanovena u pěti standardů alergenních vonných látek. Byla zvolena jedna koncentrace, pro kterou pak bylo provedeno pět měření za účelem porovnání ploch píků. Z naměřených dat byl nejprve vypočten průměr, směrodatná odchylka (SD) a nakonec nejdůležitější ukazatel relativní směrodatná odchylka (RSD [%]).

Pro výpočty byly použity vzorce 5 – 7 (kap. 2.11.). Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 33 a tab. 34

Tabulka 33: Opakovatelnost metody pro α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon a benzylalkohol

jednotlivé plochy píků [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Alergenní standard		
	α -amylcinnamylalkohol	α -isomethylionon	benzylalkohol
1	14446530	17414500	41301790
2	12527620	17564580	43747100
3	14706560	15669020	40194520
4	15922490	18678290	42563040
5	12388750	19017860	39872910
\bar{x} [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	13998390	17668850	41535872
SD [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	1353410,53	1175898,23	1453551,89
RSD [%]	9,67	6,66	3,50

Tabulka 34: Opakovatelnost metody pro cinnamylalkohol a kumarin

jednotlivé plochy píků [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Alergenní standard	
	cinnamylalkohol	kumarin
1	89072320	7676349
2	87113710	7707805
3	87423960	8444695
4	77293490	6838125
5	96908210	6818980
\bar{x} [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	87562338	7497190
SD [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	6249720,38	611319,53
RSD [%]	7,14	8,15

RSD by neměla přesáhnout 10 %, což bylo splněno, metoda SPME-GC-FID je tedy dostatečně přesná a lze ji použít pro opakovatelná stanovení vonných látek ve vybraných druzích potravin.

4.2.2. Stanovení linearity

Linearita použitého FID detektoru byla proměřena u pěti alergenních standardů (α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon, benzylalkohol, cinnamylalkohol a kumarin).

Pro každý standard bylo připraveno minimálně pět roztoků o různých koncentracích s ekvidistantní vzdáleností (tab. 35 – 37). Jednotlivé koncentrace bylo nutné proměřit vždy třikrát pro stanovení chybových úseček.

Po analýze standardů byly vyneseny závislosti ploch píků na koncentraci a proloženy spojnicí trendu (grafy 1,3,5,7,9). Tímto byly získány rovnice regrese a korelační koeficienty (tab. 38). Pro vynesení chybových úseček bylo nutné data nejprve statisticky zpracovat. Tři naměřené plochy píků pro každou koncentraci byly pomocí programu MS Excell zprůměrovány, byla vypočítána SD a RSD, která byla vynesena do grafu (grafy 2,4,6,8,10).

Tabulka 35: Stanovení linearity pro α -amylcinnamylalkohol a α -isomethylionon

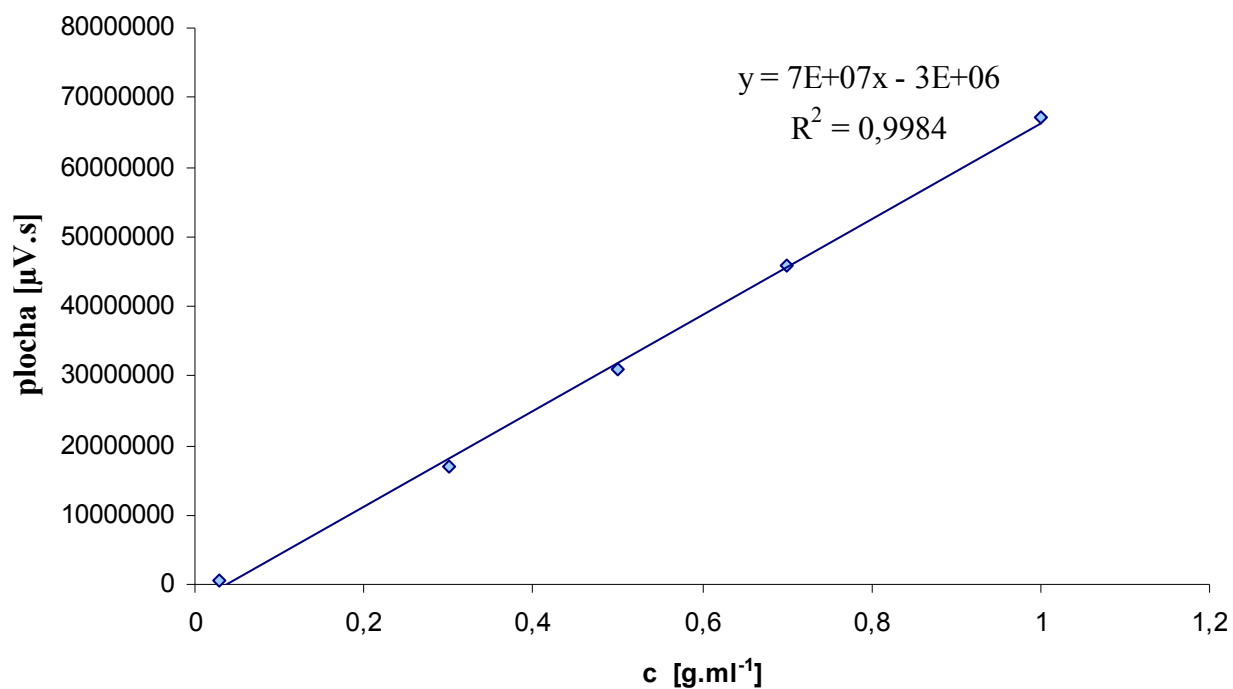
α -amylcinnamylalkohol			α -isomethylionon		
c [g.ml ⁻¹]	plocha píků [μV.s]	RSD [%]	c [g.ml ⁻¹]	plocha píků [μV.s]	RSD [%]
0,03	541118	2,33	0,01	727935	5,00
0,30	16925370	7,90	3,00	19017860	0,90
0,50	30844050	7,85	5,00	30235730	3,39
0,70	45736300	8,48	7,00	47087840	4,65
1,00	67118820	9,84	10,00	66006930	10,99

Tabulka 36: Stanovení linearity pro benzylalkohol a cinnamylalkohol

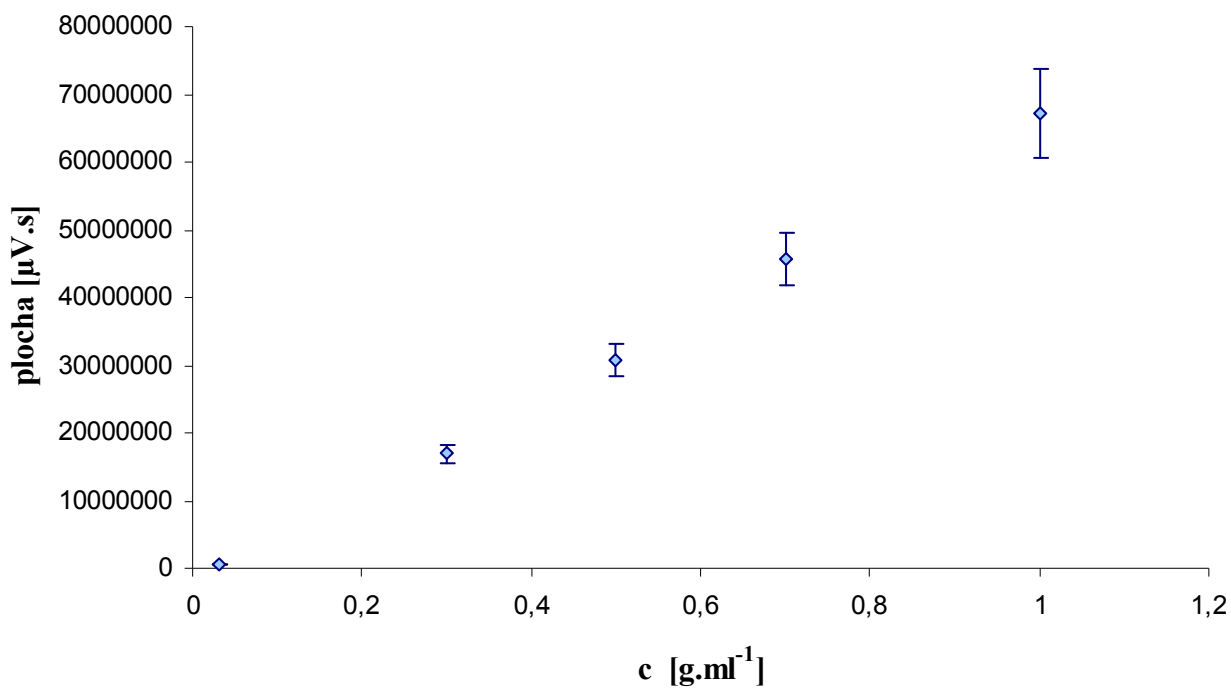
benzylalkohol			cinnamylalkohol		
c [g.ml ⁻¹]	plocha píků [μV.s]	RSD [%]	c [g.ml ⁻¹]	plocha píků [μV.s]	RSD [%]
0,00025	182742	3,61	0,010	6189435	6,36
0,00050	682416	4,37	0,015	27591470	8,49
0,00070	1112584	10,09	0,020	51033130	5,03
0,00090	1617552	7,75	0,025	77293490	5,60
0,00110	1857778	12,19	0,030	108921300	8,39

Tabulka 37: Stanovení linearity pro kumarin

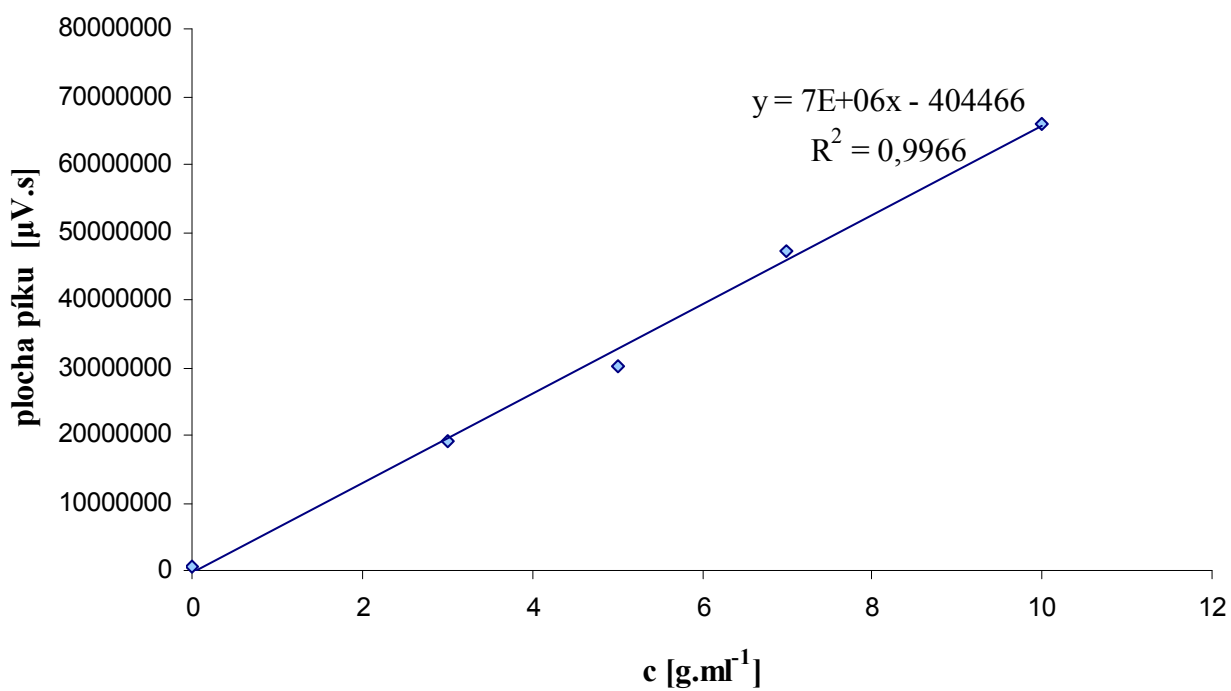
kumarin		
c [g.ml ⁻¹]	plocha píků [μV.s]	RSD [%]
0,00001	409451	7,07
0,00010	1213265	3,78
0,00100	1275812	6,89
0,01000	6818980	5,62
0,10000	63972870	11,54



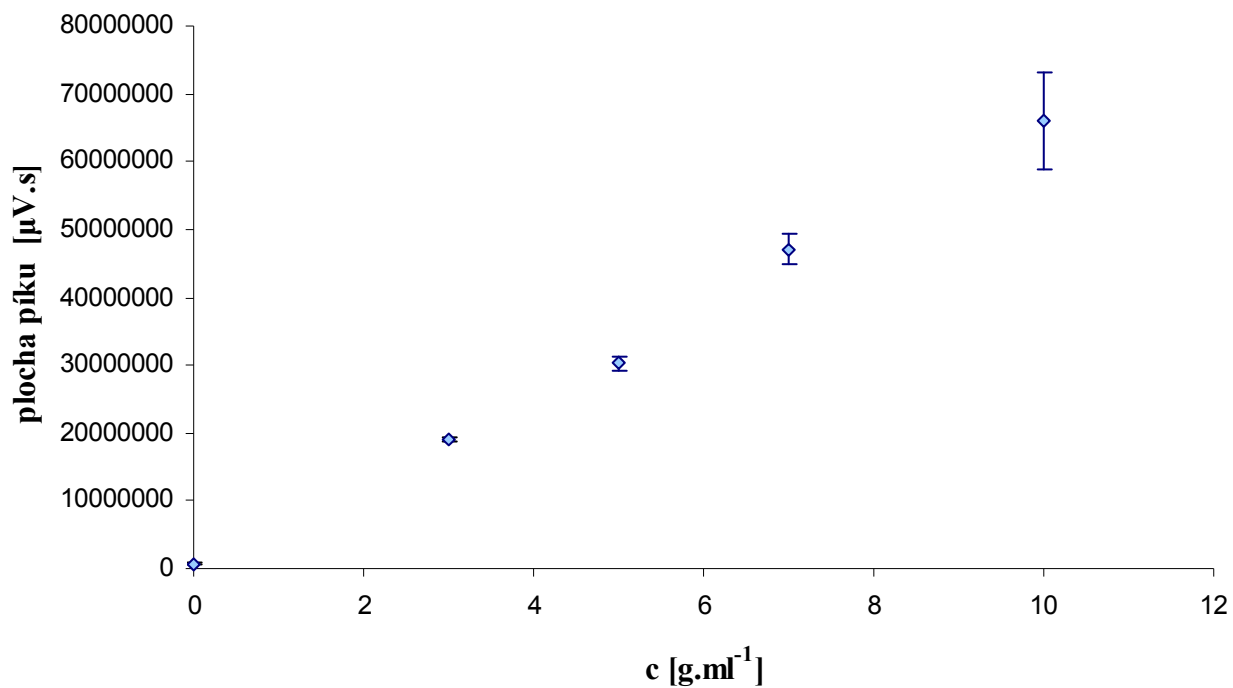
Graf 1: Lineární závislost plochy píku na koncentraci – α-amylcinnamylalkohol



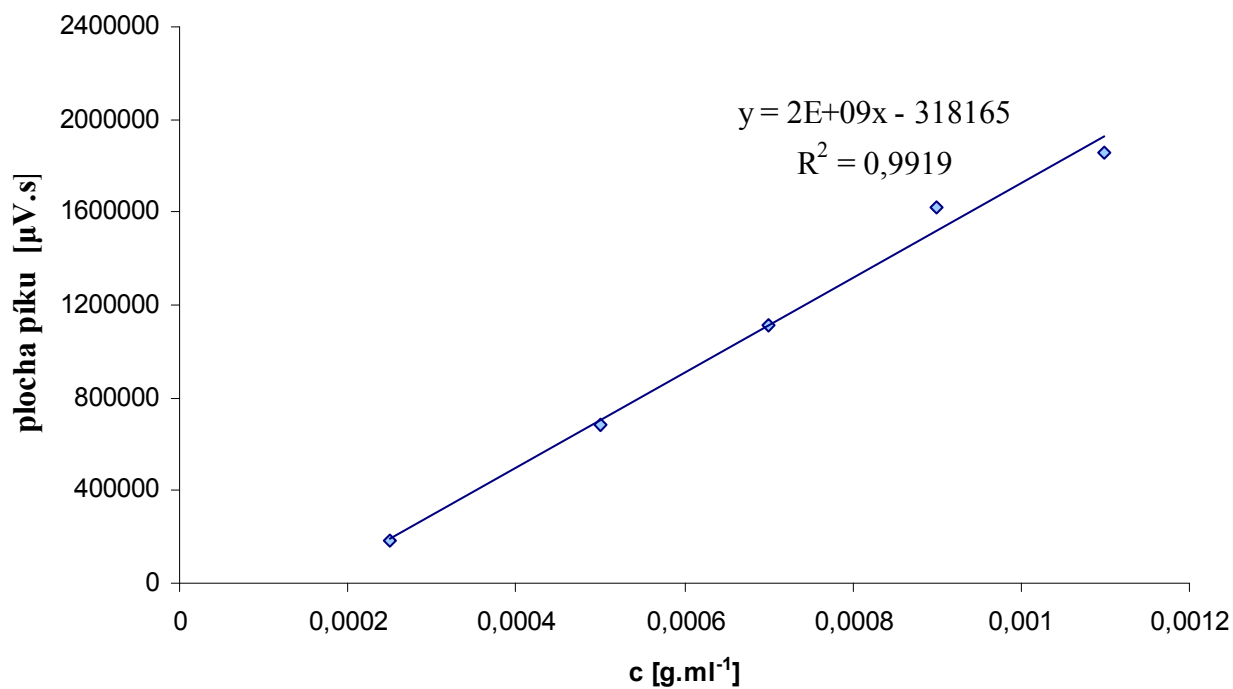
Graf 2: Chybové úsečky lineární závislosti – α -amylcinnamylalkohol



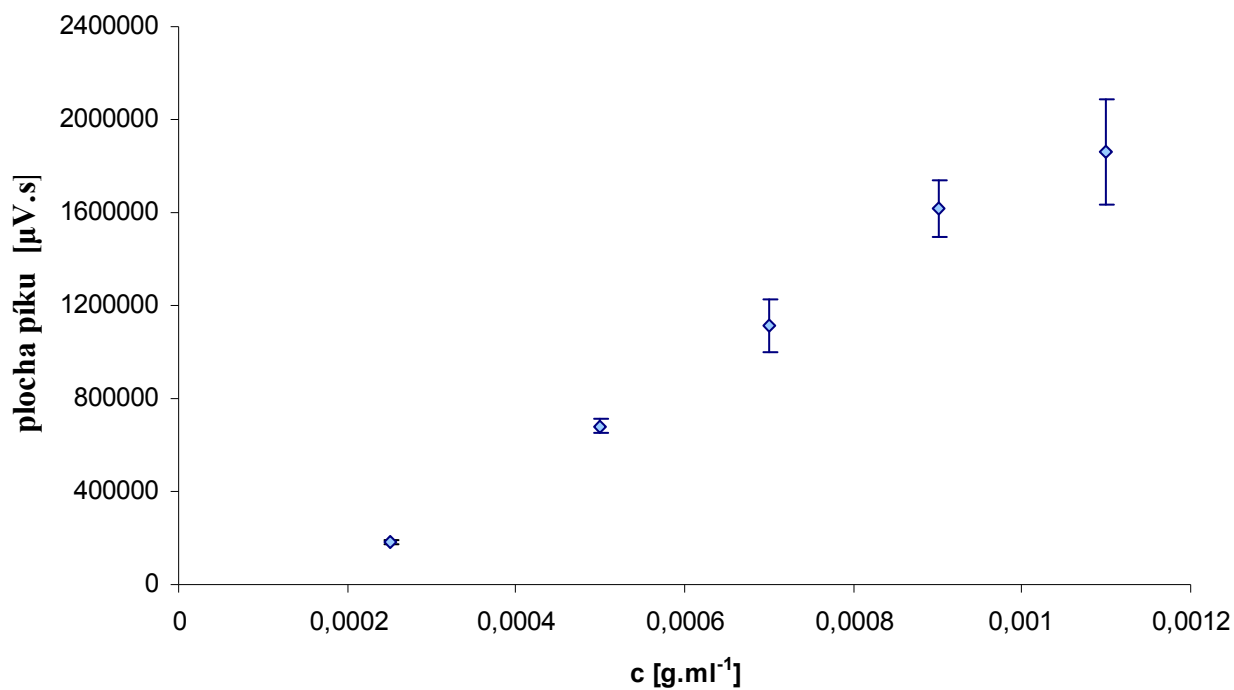
Graf 3: Lineární závislost plochy píku na koncentraci – α -isomethylionon



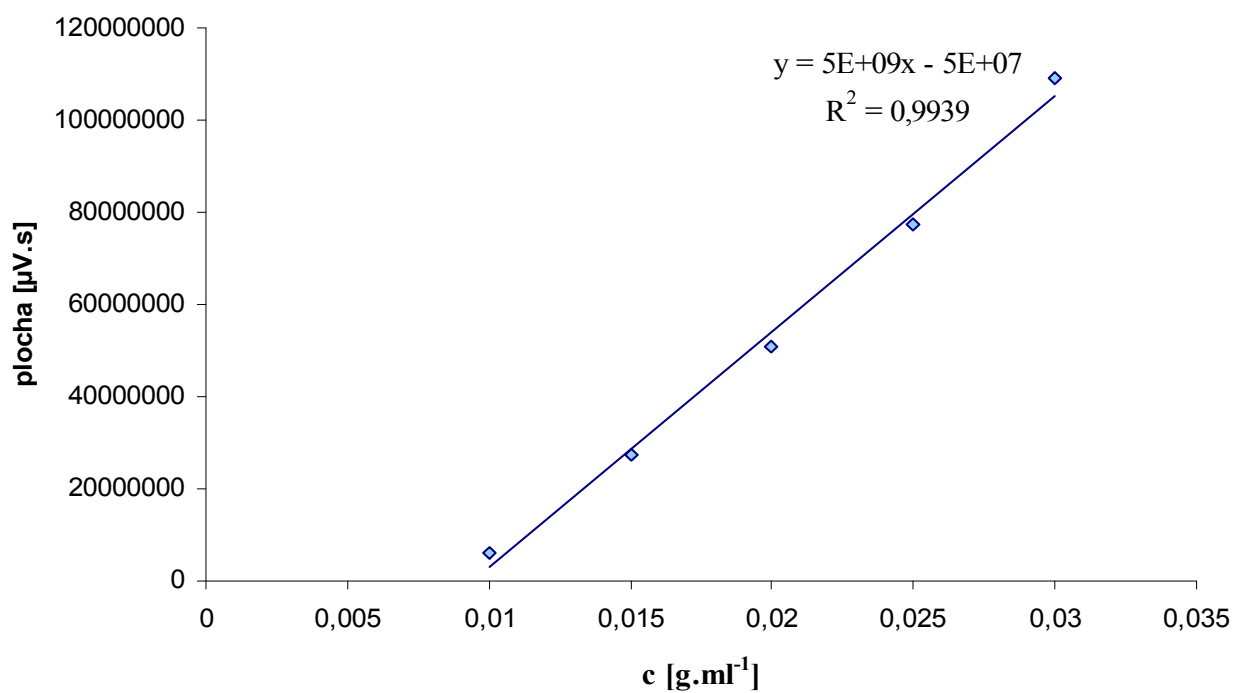
Graf 4: Chybové úsečky lineární závislosti – α -isomethylionon



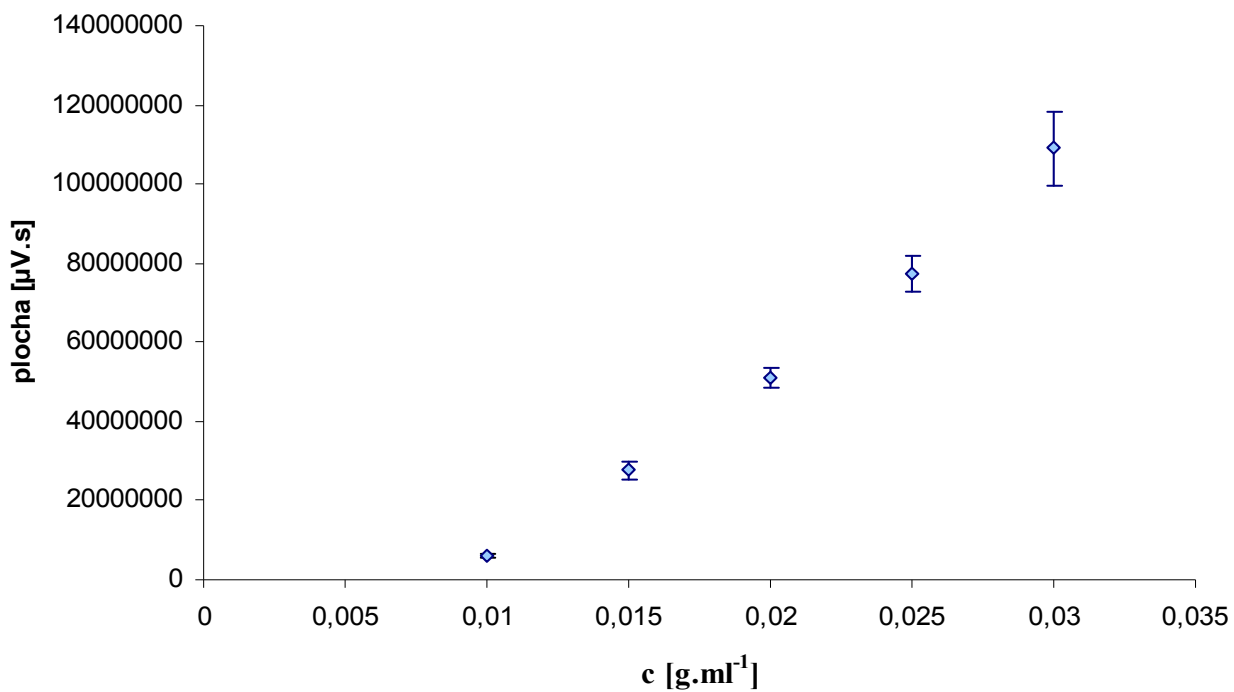
Graf 5: Lineární závislost plochy píku na koncentraci – benzylalcohol



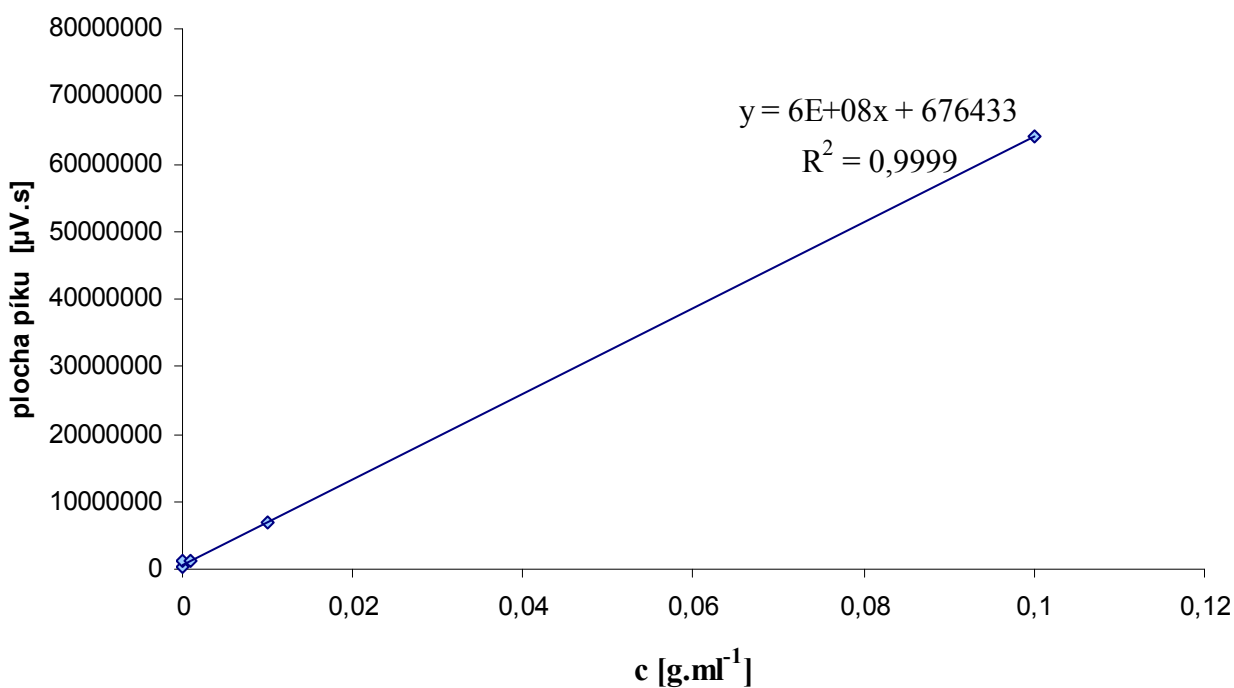
Graf 6: Chybové úsečky lineární závislosti – benzylalkohol



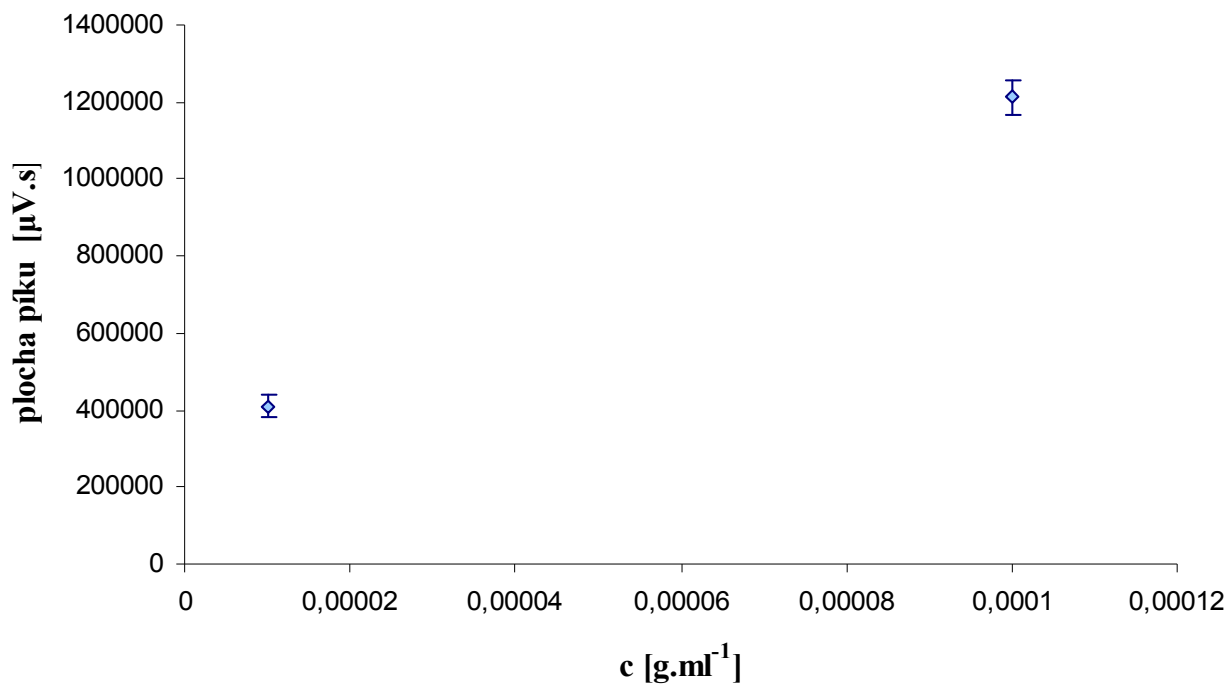
Graf 7: Lineární závislost plochy píku na koncentraci – cinnamylalkohol



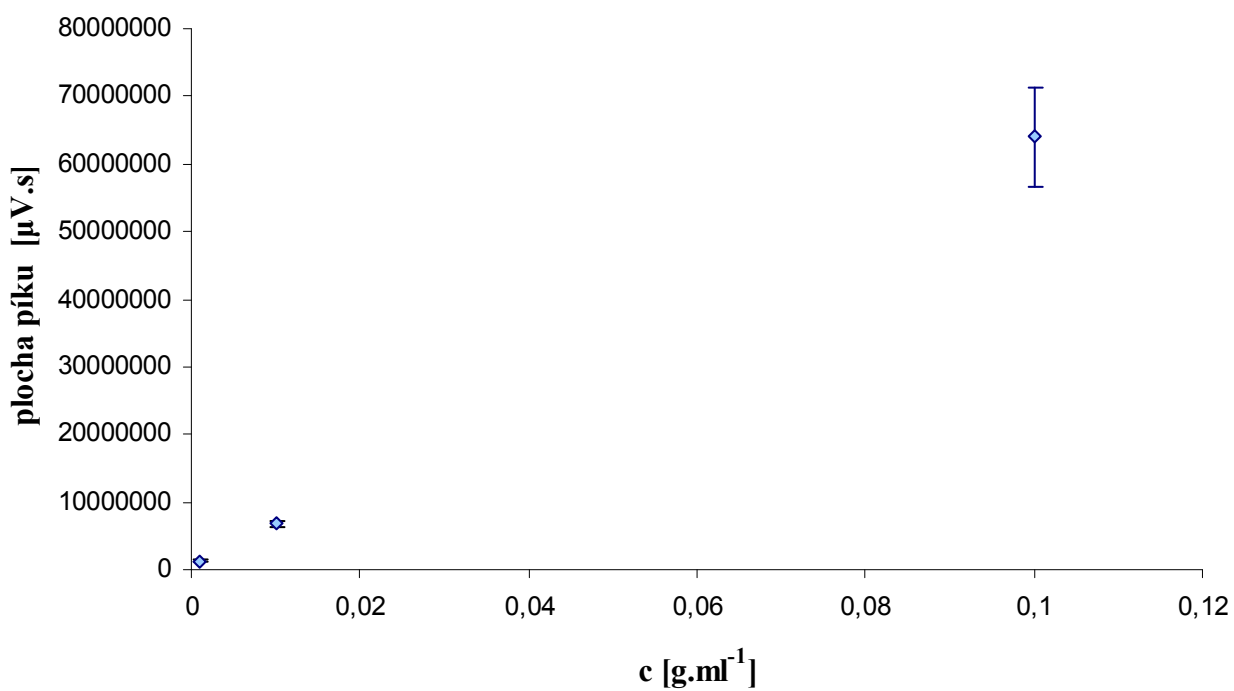
Graf 8: Chybové úsečky lineární závislosti – cinnamylalkohol



Graf 9: Lineární závislost plochy píku na koncentraci – kumarin



Graf 10: Chybové úsečky lineární závislosti (detail koncentrací 0,00001 – 0,0001 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) – kumarin



Graf 11: Chybové úsečky lineární závislosti (detail koncentrací 0,001 – 0,01 – 0,1 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) – kumarin

Tabulka 38: Korelační koeficienty jednotlivých standardů

Alergení standard	Korelační koeficient (R^2)
α -amylcinnamylalkohol	0,9984
α -isomethylionon	0,9966
benzylalkohol	0,9916
cinnamylalkohol	0,9939
kumarin	0,9999

Hodnoty korelačních koeficientů nesmí klesnout pod hodnotu 0,98. V tabulce č. 38 je jasně vidět, že naměřené hodnoty tuto podmínku splňují, a proto lze potvrdit linearitu metody, resp. linearitu FID detektoru, který je řazen mezi detektory lineární a koeficient linearit je roven jedné [74,77,78,79]. V koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-5}$ – 10 g.ml^{-1} (viz tab. 35, 36, 37) lze tedy metodu použít pro kvantifikaci.

4.2.3. Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

U testovaných standardů (α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon, benzylalkohol, cinnamylalkohol a kumarin) byla zároveň stanovena jejich mez detekce a mez stanovitelnosti s použitím stejných roztoků jako pro měření linearit.

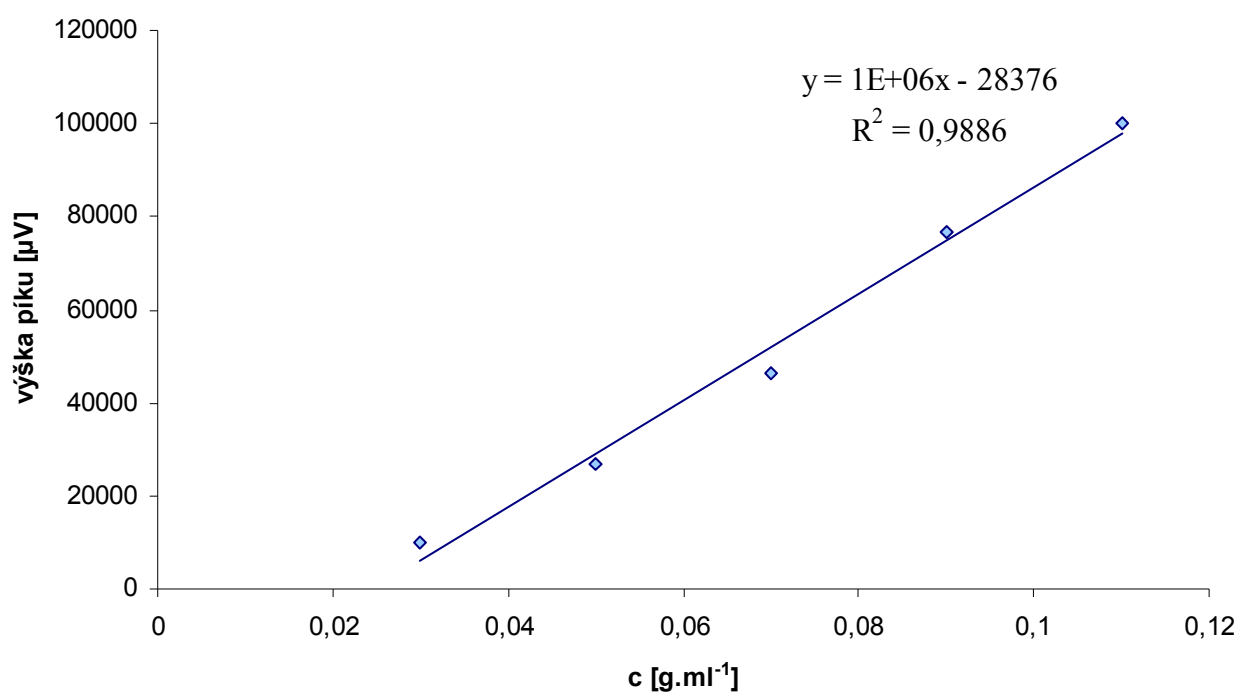
Výpočet LOD a LOQ vychází z výšky píku (viz kapitola 2.10) (tab. 39 a 40). Po analýze byly tedy sestrojeny grafy lineární závislosti výšky píků na koncentraci (kalibrační přímky) a proloženy spojnicí trendu. Ze zjištěných rovnic regrese byly odečteny směrnice kalibračních přímek b_1 a ze záznamu šumu detektoru bylo určeno maximální kolísání základní linie (h_{\max}) v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Tabulka 39: Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro α -amylcinnamylalkohol a α -isomethylionon

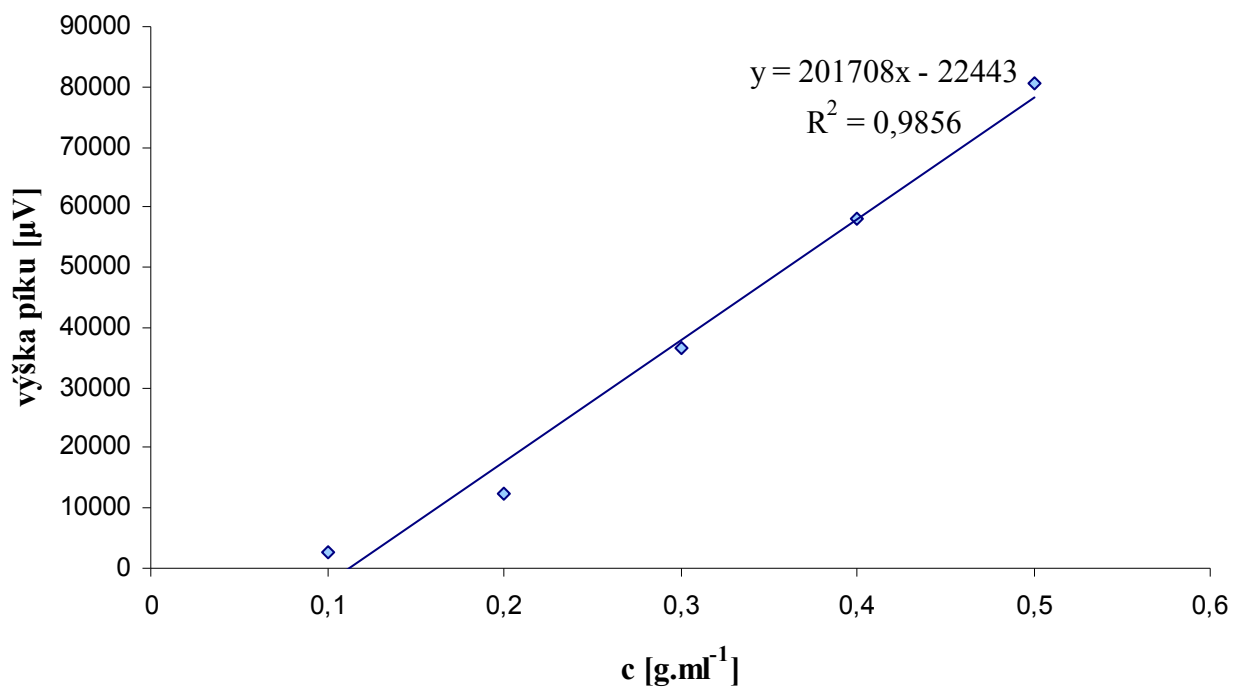
α -amylcinnamylalkohol		α -isomethylionon		benzylalkohol	
c [g.ml^{-1}]	výška píků [μV]	c [g.ml^{-1}]	výška píků [μV]	c [g.ml^{-1}]	výška píků [μV]
0,03	10056	0,1	2551	0,00025	5623
0,05	26915	0,2	12494	0,00050	21675
0,07	46198	0,3	36669	0,00070	34680
0,09	76464	0,4	57964	0,00090	52136
0,11	99999	0,5	80670	0,00110	58939

Tabulka 40: Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro cinnamylalkohol a kumarin

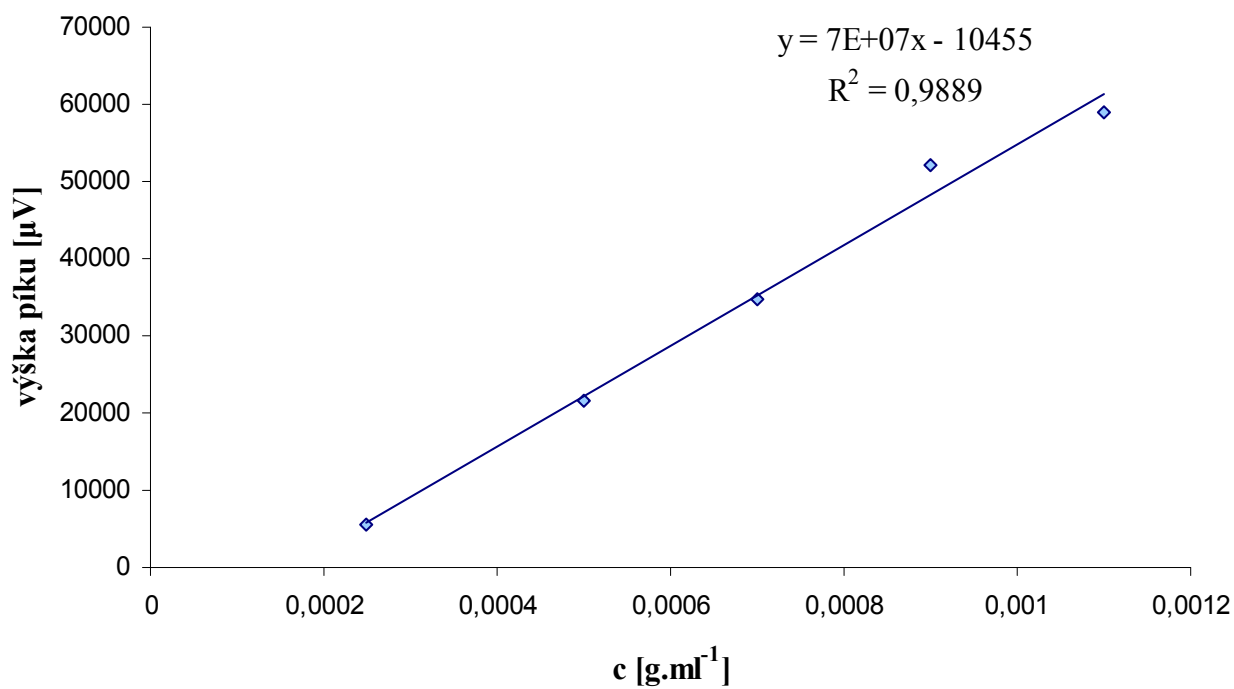
cinnamylalkohol		kumarin	
c [g.ml ⁻¹]	výška píků [μV]	c [g.ml ⁻¹]	výška píků [μV]
0,010	115053	0,001	9993
0,015	443362	0,003	18938
0,020	743032	0,005	24461
0,025	1164674	0,007	33249
0,030	1286754	0,009	37140



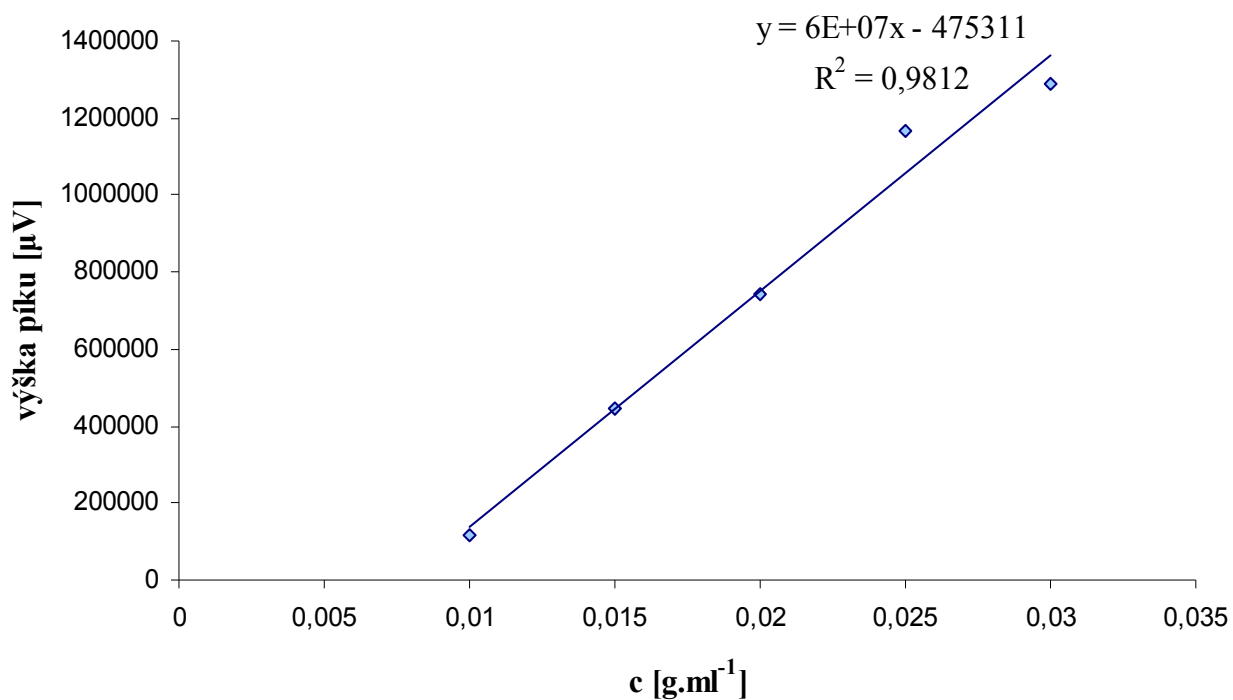
Graf 12: Lineární závislost výšky píku na koncentraci – α -amylcinnamylalkohol



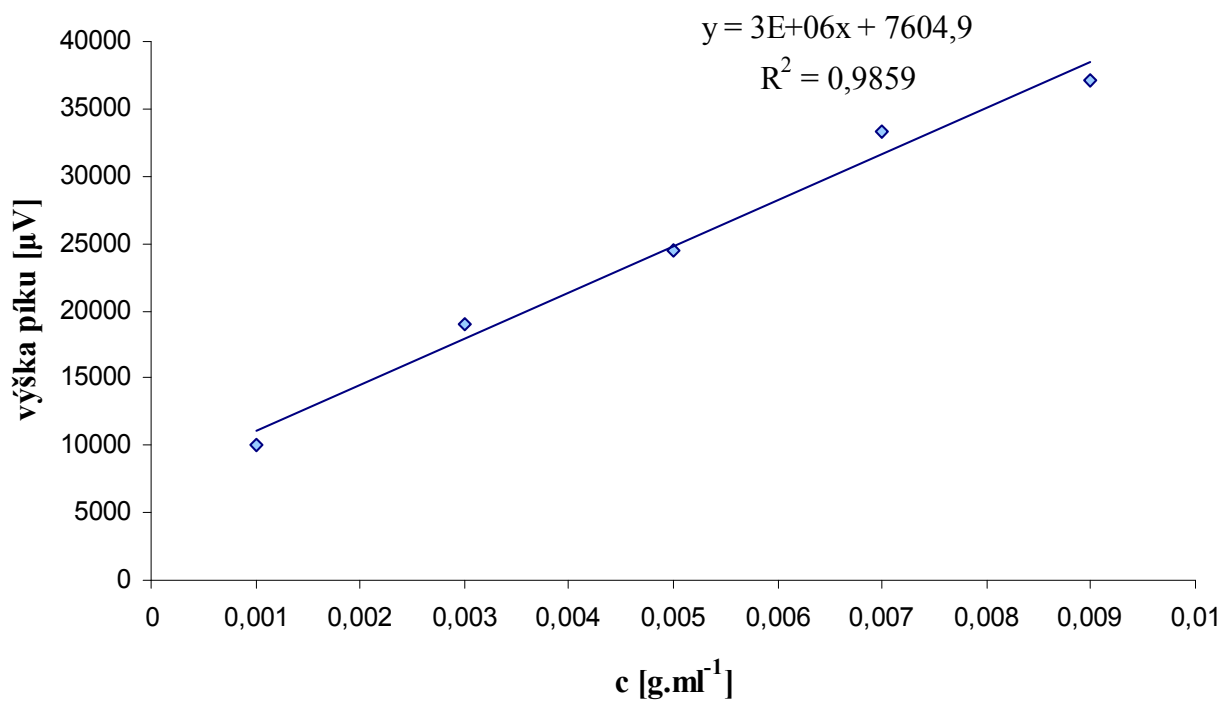
Graf 13: Lineární závislost výšky píku na koncentraci – α -isomethylionon



Graf 14: Lineární závislost výšky píku na koncentraci – benzylalkohol



Graf 15: Lineární závislost výšky píku na koncentraci – cinnamylalkohol



Graf 16: Lineární závislost výšky píku na koncentraci – kumarin

4.2.3.1. Výpočty meze detekce a meze stanovitelnosti

Pro výpočty LOD a LOQ byly použity vzorce 3 a 4 (kap. 2.10). Jako příklad pro výpočet je zde uveden standard α -amylcinnamylalkoholu.

Rovnice regresní přímky: $y = 1 \cdot 10^6 - 28376$, tzn. $b_1 = 1 \cdot 10^6$; $h_{\max} = 3101 \mu\text{V}$

Odezva meze detekce a meze stanovitelnosti:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max} = 3 \cdot 3101 = 9303 \mu\text{V}, \quad y_S = 10 \cdot h_{\max} = 10 \cdot 3101 = 31010 \mu\text{V}$$

Koncentrace na mezi detekce (LOD) a mezi stanovitelnosti (LOQ):

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} = \frac{9303}{1 \cdot 10^6} = 0,0093 \text{ g.ml}^{-1}, \quad x_S = \frac{y_S}{b_1} = \frac{31010}{1 \cdot 10^6} = 0,0310 \text{ g.ml}^{-1}$$

Tabulka 41: Meze detekce jednotlivých standardů

Alergenní standard	h_{\max} [μV]	y_D [μV]	b_1	LOD [g.ml^{-1}]
α -amylcinnamylalkohol	3101	9303	$1 \cdot 10^6$	$0,93 \cdot 10^{-2}$
α -isomethylionon	1270	3810	$2 \cdot 10^5$	$1,89 \cdot 10^{-2}$
benzylalkohol	1780	5340	$7 \cdot 10^7$	$7,63 \cdot 10^{-5}$
cinnamylalkohol	63797	191391	$6 \cdot 10^7$	$0,32 \cdot 10^{-2}$
kumarin	4277	12831	$3 \cdot 10^6$	$0,43 \cdot 10^{-2}$

Tabulka 42: Meze stanovitelnosti jednotlivých standardů

Alergenní standard	h_{\max} [μV]	y_S [μV]	b_1	LOQ [g.ml^{-1}]
α -amylcinnamylalkohol	3101	31010	$1 \cdot 10^6$	$3,10 \cdot 10^{-2}$
α -isomethylionon	1270	12700	$2 \cdot 10^5$	$6,29 \cdot 10^{-2}$
benzylalkohol	1780	17800	$7 \cdot 10^7$	$2,54 \cdot 10^{-4}$
cinnamylalkohol	63797	637970	$6 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^{-2}$
kumarin	4277	42770	$3 \cdot 10^6$	$1,43 \cdot 10^{-2}$

h_{\max} - maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu

b_1 - směrnice kalibrační přímky (závislost výšky píku na koncentraci standardu)

Z uvedených výsledků vyplývá, že metoda je dostatečně citlivá pro měření i nízkých koncentrací sledovaných látek ve vzorcích potravin.

4.3. Analýza reálných vzorků

Validovanou metodou SPME-GC-FID byly stanoveny jednotlivé alergenní vonné látky ve vybraných druzích potravin. Vonné látky jsou součástí širokého spektra různých typů aromatizujících kompozic, které se přidávají do potravin a nápojů. Vzorky byly zvoleny náhodně na základě předpokladu, kde by se mohly sledované vonné látky nacházet, u některých výrobků bylo přímo uvedeno na obalu, zda obsahuje aroma.

Identifikace jednotlivých alergenů v potravinových výrobcích byla provedena pomocí retenčních časů (kapitola 4.1). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 43 – 46 a získané chromatogramy jsou uvedeny v přílohách III - XV.

Tabulka 43: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách

Reálný vzorek		Aktivní žena	Bon Pari	Energy drink	Frisco	Gumoví medvídci	HIPP	Johnnie Walker
Alergení standard	Limonen	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✓
	Amylcinnamyl alkohol	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓
	Amylcinnamal I	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✗
	Linalool	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
	Methylheptin karbonát	✓	✗	✓	✓	✗	✗	✓
	Citral I	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✓
	Citral II	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✓
	Citronellol	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Geraniol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Isomethylionone	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Benzylalkohol	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tabulka 44: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách

Reálný vzorek		Aktivní žena	Bon Pari	Energy drink	Frisco	Gumoví medvídci	HIPP	Johnnie Walker
Alergení standard	Hydroxycitronellal	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗
	Cinnamal	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✗
	Lylal	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
	Eugenol	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Isoeugenol I	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Amylcinnamal II	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Cinnamyl alkohol	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Anýzalkohol	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Isoeugenol II	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Hexylcinnamal	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	Kumarin	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗

- ✓ v dané potravíně se alergenní vonná látka vyskytuje
- x - v dané potravíně se alergenní vonná látka nevyskytuje

Na obale čaje aktivní žena není uvedeno, že obsahuje aroma. Je zde ale uvedeno složení: kousky zázvoru a skořice, hřebíček, kousky pomerančové kůry, kardamon, jalovčinky, kořen lékořice, kořen pampelišky, černý pepř, fenykl a kořen anděliky. Celkově bylo v tomto výrobku identifikováno 14 alergenních vonných látek. Cinnamal vyskytující se ve skořici a hřebíčku, geraniol v zázvoru a skořici, eugenol v hřebíčku, linalool v pomerančové kůře, limonen v pepři, dále amylcinnamylalkohol, amylcinnamal, isomethylionon a hexylcinnamal (**příloha III**).

Bonbóny Bon Pari s ovocnou příchutí mají na obale uvedeno, že obsahují přírodní aroma. Ve vzorku bylo ale identifikováno 8 alergenních látek: α -amylcinnamyl alkohol, amylcinnamal I, citral, geraniol, isomethylionon, limonen, linalool a lyral (**příloha IV**).

Energy drink (bitter lemon) má na obale uvedeno, že obsahuje aroma. V největší koncentraci se zde vyskytuje citral, který dodává nápoji citrónové aroma. V menších koncentracích se vyskytuje α -amylcinnamylalkohol, geraniol, α -isomethylionon, linalool a methylheptin karbonát (**příloha V**).

Alkoholický nápoj Frisco (jablko a citrón) má na obale uvedeno, že obsahuje přírodní aroma. Největší koncentraci má hydroxycitronellal, který spolu s citralem a linaloolem dodávají citrónové aroma a geraniol, který se vyskytuje v jablcích. V menších koncentracích se vyskytuje methylheptin karbonát, α -isomethylionon, cinnamal a kumarin, který se používá k aromatizaci alkoholických nápojů (**příloha VI**).

Gumoví medvídci mají na obale uvedeno aroma: malina, ananas, lesní ovoce, citron, pomeranč a tropické ovoce. Složkou pomerančových aromat bývá geraniol a linalool, které se v tomto výrobku vyskytují v nejvyšších koncentracích (**příloha VII**). Aroma citronu pak obsahuje citral I a citral II. Cinnamal, který zde byl také identifikován, se používá v potravinářském průmyslu do aromat bonbónů. Dále se vyskytují ještě tyto alergenní vonné látky: amylcinnamal, hydroxycitronellal a isomethylionon.

HIPP (jablečno-meduňkový) instantní čaj pro děti a novorozence od ukončeného 1. týdne má na obale uvedeno, že neobsahuje umělá aromata. Z chromatogramu (**příloha VIII**) je ale patrné, že se zde ve vysoké koncentraci vyskytuje geraniol, který dodává jablečné aroma a dále α -amylcinnamylalkohol, amylcinnamal, cinnamal, citral I a citral II, hydroxycitronellal, limonen, linalool a α -isomethylionon.

Z chromatogramu skotské whisky Johnnie Walker (**příloha IX**) je patrná vysoká koncentrace limonenu, domnívám se, že je to proto, že se limonen používá při výrobě koření a tato whisky je charakterizována jako skotská whisky s kořenitou vůní.

Tabulka 45: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách

Reálný vzorek		Jupík	Lavazza arabica	Teekane I ⁶	Teekane II ⁷	Teekane III ⁸	John Wesson
Alergenní standard	Limonen	×	✓	✓	✓	✓	×
	Amylcinnamyl alkohol	×	✓	✓	✓	✓	×
	Amylcinnamal I	×	×	✓	✓	✓	✓
	Linalool	✓	✓	✓	✓	✓	×
	Methylheptin karbonát	✓	×	✓	✓	✓	✓
	Citral I	✓	×	✓	×	✓	×
	Citral II	×	✓	✓	×	✓	×
	Citronellol	×	×	×	×	×	×
	Geraniol	✓	✓	×	×	✓	×
	Isomethylionone	✓	✓	×	×	✓	×
	Benzylalkohol	×	×	✓	×	✓	×

Tabulka 46: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách

Reálný vzorek		Jupík	Lavazza arabica	Teekane I ⁶	Teekane II ⁷	Teekane III ⁸	John Wesson
Alergenní standard	Hydroxycitronellal	×	×	×	×	×	×
	Cinnamal	×	✓	×	×	✓	✓
	Lyrál	✓	×	×	×	×	×
	Eugenol	×	✓	✓	×	×	×
	Isoeugenol I	×	✓	×	✓	×	×
	Amylcinnamal II	×	×	×	×	×	✓
	Cinnamyl alkohol	×	×	×	×	×	×
	Anýzalkohol	×	×	×	×	×	×
	Isoeugenol II	×	✓	×	✓	×	✓
	Hexylcinnamal	×	×	×	×	×	×
	Kumarin	×	×	×	×	×	✓

Jupík má na obale uvedeno, že obsahuje aroma. Z chromatogramu (**příloha X**) je jasné, že se v nejvyšší koncentraci vyskytuje citral, který dodává citrónové aroma. Další alergenní látky nalezené v tomto nápoji jsou: linalool, který je součástí jablečných šťáv; geraniol, obsažen v jablečích; methylheptin karbonát, který se přidává do aroma jahoda; α -isomethylionon a lyrál.

Lavazza arabica (**příloha XI**) nemá na obale uvedený obsah aroma. Identifikovány byly tyto alergenní vonné látky: α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon, cinnamal, citral II, eugenol, geraniol, isoeugenol I a II, limonen a linalool.

⁶ chřipka a nachlazení

⁷ játra a žlučník

⁸ urologický

Bylinný čaj Teekane (chřipka a nachlazení) je podle výrobce nearomatizovaný. Jak ale vyplývá z chromatogramu (**příloha XII**) obsahuje tyto alergenní vonné látky: amylcinnamal, α -amylcinnamylalkohol, benzylalkohol, citral I, citral II, eugenol, limonen, linalool a methylheptin karbonát.

Bylinný čaj Teekane (játra a žlučník) obsahuje : amylcinnamal, α -amylcinnamylalkohol, isoeugenol I, isoeugenol II, limonen, linalool a methylheptin karbonát (**příloha XIII**).

Bylinný čaj Teekane (urologický) obsahuje: amylcinnamal, α -amylcinnamylalkohol, benzylalkohol, cinnamal, citral I, citral II, geraniol, limonen, linalool, α -isomethylionon a methylheptin karbonát (**příloha XIV**).

Whisky John Wesson nemá na obale uvedeno, že obsahuje aroma. Jak ale vyplývá z chromatogramu (**příloha XV**) obsahuje vysokou koncentraci kumarinu a isoeugenolu II, dále pak amylcinnamal I a II, cinnamal, geraniol a methylheptin karbonát.

5. ZÁVĚR

Vonné látky byly původně používány pro potěšení nebo pro své léčivé účinky. Dnes jsou ale velmi důležitou součástí života, působí na čichové receptory a vyvolávají širokou škálu nejrůznějších sensorických vjemů, především vůni. Mohou ale působit i negativně. Evropskou legislativou jsou proto stanoveny podmínky pro použití 26 vonných látek, které pravděpodobně způsobují alergické reakce.

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na vonné látky určené k aromatizaci potravin. Důraz byl kladen zejména na 26 potenciálně alergenních vonných látek, jejich popis, vlastnosti, použití a výskyt v potravinách.

Pro stanovení těchto látek byla zvolena metoda SPME-GC-FID. Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci a validaci této metody, a její aplikaci na vybrané druhy potravin. Optimalizované podmínky analýzy byly převzaty z předešlých prací zabývajících se touto problematikou a jsou uvedeny v kapitole 3.2.

Z 26 legislativou stanovených potenciálně alergenních vonných látek bylo pracováno celkově se šesti standardy, a to: α -amylcinnamyl alkohol, α -isomethylionon, benzylalkohol, cinnamyl alkohol, kumarin a lyral. Jako rozpouštědlo byl použit heptan. Identifikovány byly tyto standardy: α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon a lyral. Základní validační parametry (opakovatelnost, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti) byly stanoveny u těchto standardů: α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon, benzylalkohol, cinnamylalkohol a kumarin. Z časových důvodů nebylo možné určit validační parametry u lyralu. Měření dalších sloučenin bude naplní následujících diplomových a bakalářských prací.

Opakovatelnost pro jednotlivé standardy byla dobrá, relativní směrodatná odchylka vypočítaná z naměřených dat nebyla vyšší než 10 %, proto bylo možné metodu SPME-GC-FID použít pro stanovení těchto alergenů ve vybraných druzích potravin.

U linearity byly taktéž získány uspokojivé výsledky. Z grafů pro jednotlivé standardy byly zjištěny hodnoty korelačních koeficientů, které nesmí klesnout pod 0,98. Tato podmínka byla také splněna. Hodnoty korelačních koeficientů se pohybovaly v rozsahu 0,9916 – 0,9999. Tímto byla ověřena linearita použitého plamenově ionizačního detektoru v koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-5}$ – 10 g.ml^{-1} .

Meze detekce se pohybovaly v rozmezí $7,63 \cdot 10^{-5}$ – $1,89 \cdot 10^{-2} \text{ g.ml}^{-1}$, meze stanovitelnosti v rozmezí $2,54 \cdot 10^{-4}$ – $6,29 \cdot 10^{-2} \text{ g.ml}^{-1}$. Pouze benzylalkohol vykazoval oproti ostatním standardům nízkou mez detekce a stanovitelnosti, tj. $\text{LOD} = 7,63 \cdot 10^{-5} \text{ g.ml}^{-1}$, $\text{LOQ} = 2,54 \cdot 10^{-4} \text{ g.ml}^{-1}$.

Na závěr byly pomocí validované metody SPME-GC-FID proměřeny alergenní vonné látky v různých druzích potravin. Výrobky byly zvoleny náhodně, u některých bylo přímo na obale uvedeno, že obsahují aroma. Byly proměřeny alkoholické a nealkoholické nápoje, nápoje pro děti, cukrovinky a různé druhy čajů.

Zajímavé je, že například v sypaném nápoji HIPP, který je určen výhradně pro děti a neměl by tyto látky obsahovat, byla stanovena vysoká koncentrace linaloolu, α -amylcinnamyl alkoholu a citralu II. Také gumoví medvídci, Bon Pari a nápoj Jupík, které konzumují ve většině dětí, obsahují velké množství alergenních vonných látek.

Z alkoholických nápojů byl naměřen ve vyšších koncentracích limonen u skotské whisky Johnnie Walker, kumarin u whisky John Wesson a hydroxycitronellal u nápoje Frisco.

U Teekane bylinných čajů různých druhů se ve všech vyskytovaly tyto alergeny: α -amylcinnamyl alkohol, amylcinnamal I, limonen, linalool a methylheptin karbonát.

Narozdíl od kosmetických výrobků není obsah potenciálně alergenních vonných látek v potravinách legislativně ošetřen, přestože jejich obsah v některých potravinách je pravděpodobně poměrně vysoký. Je tedy možné, že do budoucna budou i zde stanoveny povolené koncentrace pro jednotlivé látky, zvláště pokud se jedná o potraviny určené pro kojence a malé děti.

Jako možnost navázání na tuto práci doporučuji identifikovat a validovat zbývající vonné látky, které dosud nebyly analyzovány. Dále upravit teplotní program tak, aby bylo možné přesně určit i látky, u kterých se překrývají jejich retenční časy a v neposlední řadě bych pro přesnější identifikaci doporučila spojení metody GC s hmotnostní detekcí (GC-MS), která je ale mnohem nákladnější a v současné době není na Ústavu chemie potravin a biotechnologií k dispozici.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Bauer, K. Garbe, D. Surburg, H. *Common fragrance and flavor material : Preparation and uses*. 4. zcela přepracované. Wiley-WCH, 2001. 299 s. Dostupné z WWW: <<http://www.librarhy.ru/MISC/209.pdf>>. ISBN 3-527-60020-5.
- [2] Winklerová, D., Ruprich, J., Ostrý, V. Aromatické látky v potravinách. [online]. Vědecký výbor pro potraviny. 27.12.2007. [cit. 2010-10-11]. Dostupné z WWW: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/info_2007_25_deklas_AROM_A.pdf>.
- [3] Trepková, E., Vonášek, F. *Vůně a parfémy : Tajemství přitažlivosti*. Praha : Maxdorf, 1997. 173 s. ISBN 80-85800-48-9.
- [4] Krs, V. *Materiály I. : pro 1. a 2. ročník oboru Kosmetička*. Praha : Informatorium, 2001. 135 s. ISBN 80-86073-73-4.
- [5] Velíšek, J. Hajšlová, J. *Chemie potravin II.*: 3. rozšířené a přepracované. Havlíčkův Brod : OSSIS, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-19.
- [6] Berger, R. G. *Flavours and fragrances : Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin : Springer-verlang, 2007. 649 . ISBN 978-3-540-49338-9.
- [7] Velíšek, J. *Chemie potravin 3*. 2. upravené. Havlíčkův Brod : OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [8] Koláčková, A. *Vonné látky rostlinného původu*. Brno, 2008. 49 s. Bakalářská práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [9] Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The plant journal*. 2008, vol. 54, issue 4, pp. 712-732.
- [10] Plačková, L. *Možnosti identifikace silic v environmentálních matricích*. Brno, 2009. 91 s. Bakalářská práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [11] Vonášek, V., Trepková, F., Novotný, E.: *Látky vonné a chuťové*. Vyd. Praha: SNTL, 1987. 440 s. ISBN 04-810-87.
- [12] Duchová, I. *Využití rostlin z čeledi Hluchavkovité (Lamiaceae) ve výživě*. Brno, 2008. 84 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita Brno, lékařská fakulta. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/176729/lf_b/Vyuziti_rostlin_z_celedi_Hluchavkovite__Lamiaceae__ve_vyzive.txt>.
- [13] Schrankel, K. R. Safety evaluation of food flavoring. *Toxicology*. 2004, 198, s. 203-211. ISSN 0300-483X.
- [14] Zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích, v platném znění
- [15] Čopíková, J. *Technologie čokolády a cukrovinek*. 1.vyd. Praha : VŠCHT, 1999. 168 s. ISBN 80-7080-365-7.
- [16] Vyhláška č. 447/2004 Sb. o požadavcích na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu.
- [17] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2232/96.

- [18] Nařízení Komise (ES) č. 1565/2000.
- [19] Nařízení komise (ES) č. 622/2002.
- [20] Bridges, B. Fragrance : emerging health and environmental concerns. *Flavour and fragrance journal*. 2002, vol. 17, no. 5, s. 361-371. ISSN 0882-5734.
- [21] Salvador, A.; Chisvert, A. *Analysis of cosmetic products : Analytical methods to determine potentially allergenic fragrance-related substances in cosmetic*. 1rd ed. Oxford : Elsevier, 2007. 487 s. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [22] Škopová, J. *Stanovení vybraných vonných látek v potravinách*. Brno, 2010. 82 s. Diplomová práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [23] Fidirichová, I. *Obsah alergenních vonných látek ve vybraných typech potravin*. Brno, 2010. 67 s. Bakalářská práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [24] *PubChem*. [databáze online]. 2004. [cit. 2010-11-09]. Dostupný z WWW: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>
- [25] *Tobaccodocuments.org* [online]. 1999 [cit. 2010-11-09]. Additives. Dostupné z WWW: <<http://tobaccodocuments.org/profiles/additives/>>.
- [26] Bhatia, S.P., et al. Fragrance material review on alpha-amylcinnamyl alcohol. *Food and chemical toxicology*. 2007, vol. 45, no. 1, s. 32-39.
- [27] ChemIDplus Advanced [databáze online]. 1993. [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>>
- [28] Chemical Book [databáze online]. 2008. [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <http://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx>
- [29] Mokáňová, R.: *Analýza vonných látek v kosmetických prostředcích metodou plynové chromatografie*. Brno, 2009. 92 s. Diplomová práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [30] EuroChem [databáze online]. 2002. [cit. 09.11.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.toxi.cz/index.php?MN=Datab%E1ze+EUROCHEM&ProdID=00024A06D80C5A860002EC05>
- [31] Kratochvíl, F. *Epikutánní testy* [online]. 2007 [cit. 09.11.2010]. Dostupné z WWW: <<http://www.epitesty.cz/default.asp?inc=fset>>
- [32] Chemicalland21 [databáze online]. 2000 [cit. 09.11.2010]. Dostupné z WWW: <<http://www.chemicalland21.com>>
- [33] Gabriel, J. *The green beauty guide* [online]. 2010 [cit. 2010-11-22]. Lyrál: Itchy, Scratchy Fragrance Ingredient. Dostupné z WWW: <<http://thegreenbeautyguide.com/?p=252>>.
- [34] The John D. Walsh Company, Inc [online]. [cit. 09.11.2010]. Dostupné z WWW: <<http://johndwalsh.com/>>
- [35] HERA Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products [databáze online]. 2003 [cit. 09.11.2010]. Dostupné z WWW: <<http://www.heraproject.com/RiskAssessment.cfm>>

- [36] *Medicabaze.cz* [online]. 2007 [cit. 09.11.2010]. *Medicabaze.cz*. Dostupné z WWW: <<http://medicabaze.cz/>>.
- [37] Moravcová, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha: Ústav chemie přírodních látek VŠCHT, 2006. Interní studijní pomůcka. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>
- [38] Guryčová, H. *Syntetické vonné látky ve vodním ekosystému*. Brno, 2009. 89 s. Diplomová práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [39] *Cosmeticsinfo*. [online]. [cit. 09.11.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.cosmeticsinfo.org/HBI/23/>
- [40] Qiao, Y., et al. Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jincheng Sweet Orange Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules*. 2008, 13, s. 1333-1344. ISSN 1420-3049.
- [41] Kumazawa, K. Masuda, H. Identification of Potent Odorants in Japanese Green Tea (Sen-cha). *Agriculture food chemistry*. 1999, 47, s. 5169-5172.
- [42] Guillot, S., et al. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace–solid phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–olfactometry. *Food Chemistry*. 2006, 96, s. 147–155.
- [43] Ibanez, E., et al. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*. 1998, 63, 2, s. 281-286.
- [44] Mondello, L., et al. Reliable characterization of coffee bean aroma profiles by automated headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry with the support of a dual-filter mass spectra library. *Journal of Separation Science*. 2005, 28, s. 1101–1109.
- [45] Mondello, L., et al. Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HS-SPME-GC. *Flavour and fragrance journal*. 2005, 20, s. 659–665.
- [46] Vichi, S., et al. A nalysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection a b a a. *Journal of Chromatography A*. 2003, s. 19–33.
- [47] Yoo, Z. W.; Kim, N. S.; Lee, D. S. Comparative Analyses of the Flavors from Hallabong (*Citrus sphaerocarpa*) with Lemon, Orange and Grapefruit by SPTE and HS-SPME Combined with GC-MS. *Bull. Korean Chem. Soc.*. 2004, 25, 2, s. 271-279.
- [48] Barboni, T., et al. Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2009, 116, s. 382–390.
- [49] Sánchez-Palomo, E.; Díaz-Maroto, M. C.; Pérez-Coello, M. S. Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC–MS. *Talanta*. 2005, 66, s. 1152–1157.
- [50] Zeng, Z., et al. Analysis of flavor volatiles of glutinous rice during cooking by combined gas chromatography–mass spectrometry with modified headspace solid-phase microextraction method. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009, 22, s. 347–353.

- [51] Wonga, S. W., et al. Characterising the release of flavour compounds from chewing gum through HS-SPME analysis and mathematical modelling. *Food Chemistry*. 2009, 114, s. 852–858.
- [52] Mazidaa, M.M., Sallehb, M.M., Osman, H. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annuum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005, 18, s. 427–437.
- [53] Perés Ch. , Viallon Ch. , Berdagné J. L. Solid-Phase Microextraction-Mass Spectrometry: A New Approach to the Rapid Characterization of Cheeses. *Analytical chemistry*. 2001, 73, s. 1030–1036.
- [54] Wang L. F., et al. Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME–GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds
- [55] Polovo, M., Contarini, G. Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter. *Journal of Chromatography A*. 2003, 985, s. 117-125.
- [56] Servili M. , et al. Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters. *Food Chemistry*. 2000, 71, s. 407-415.
- [57] Bosch-Fusté, J., et al. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. *Food Chemistry*. 2007, 105, s. 428-435.
- [58] Howard, K. L., Mike, S. H., Riesen, R. Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for Headspace Analysis of Wine Aroma Components. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2005, 56:1, s. 37-45.
- [59] Stanfill, S. B., Ashley, D. L. Solid phase microextraction of alkenylbenzenes and other flavorrelated compounds from tobacco for analysis by selected ion monitoring gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1999, 858, s. 79-89.
- [60] Crupi, M.L. , et al. A comprehensive study on the chemical composition and aromatic characteristics of lemon liquor. *Food Chemistry*. 2007, 105, s. 771–783.
- [61] Jirovetz, L., et al. Solid phase microextraction/gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and fixative properties of the essential oil of *Rosa damascena* L. from China. *Flavour and fragrance journal*. 2005, 20, s. 7-12
- [62] Williams, A., et al. Analysis of strawberry volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography with headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography B*. 2005, 817, s. 97–107.
- [63] Sproll, C., et al. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food Chemistry*. 2008, 109, s. 462-469.
- [64] Raters, M., Matissek, R. Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Eur Food Res Technol*. 2008, 227, s. 637–642.

- [65] Larráyoz, P., et al. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*. 2001, 11, s. 911-926.
- [66] Rawat, R., et al. Characterization of volatile components of Kangra orthodox black tea by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2007, 105, s. 229–235.
- [67] Pripdeevech, P., Machau, T. Fingerprint of volatile flavour constituents and antioxidant activities of teas from Thailand. *Food Chemistry*. 2011, 125, s. 797-802.
- [68] Kocsis, N., et al. GC--MS Investigation of the Aroma Compounds of Hungarian Red Paprika (*Capsicum annuum*) Cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002, 15, s. 195-203.
- [69] Cortés, S., Luisa Gil, M., Fernández, E. Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits. *Food Control*. 2005, 16, s. 383-388.
- [70] Callejóu, R.M., et al. Targeting Key Aromatic Substances on the Typical Aroma of Sherry Vinegar. *Agriculture food chemistry*. 2008, 56, s. 6631-6639.
- [71] Vespalcová, M.: Přednášky z Jakosti v laboratorní a kontrolní praxi. Brno: Fakulta chemická VUT, 2010. Nepublikované.
- [72] *Validační program pro statistické zpracování analytických dat*. [online].[cit. 08.03.2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/Validace/index.htm>>.
- [73] Kolářková, A. *Analýza vybraných alergenů ve vonných kompozicích*. Brno, 2010. 104 s. Diplomová práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [74] Jelínková, M. *Stanovení vybraných vonných látek rostlinného původu v potravinách*. Brno, 2009. 79 s. Diplomová práce. VUT Brno, fakulta chemická.
- [75] Babák, L. *Biostatistika - přednášky*. [online]. VUT Brno, 2010. [cit. 12.4.2010]. Dostupné z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/course/view.php?id=95456>>.
- [76] Suchánek, M., Plzák, Z., Šubrt, P., Koruna, I.: *Kvalimetrie. 7. Validace analytických metod*. Vyd. Praha: EURACHEM-ČR, 1997. 137 s. ISBN 80-901868-2-3.
- [77] Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [78] Volka, K., a kol.: *Analytická chemie II*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [79] Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. 263 s. ISBN 80-246-0852-9.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DHS/GC-MS	Dynamická headspace ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí <i>Dynamic headspace/gas chromatography-mass spectrometry</i>
DI/GC-FID (GC-MS)	Přímý nástřik/plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (hmotnostní detekcí) <i>Direct injection/gas chromatography-flame ionization detector (mass-spectrometry)</i>
EC	Evropská komise
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin <i>European Food Safety Authority</i>
EPA	Agenturu pro ochranu životního prostředí <i>U. S. Environmental Protection Agency</i>
ES	Evropský parlament a Rada <i>European Commission</i>
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie <i>High-performance liquid chromatography</i>
HSSE-GC-MS	Headspace sorpční extrakce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí <i>Headspace sorptive extraction gas chromatography-mass spectrometry</i>
HS-SPME/GC/GC-MS	Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s dvourozměrnou plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí <i>Headspace-solid phase microextraction/two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry</i>
HS-SPME/GC-FID	Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem <i>Headspace-solid phase microextraction/gas chromatographyflame ionization detector</i>
HS-SPME/GC-MS	Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí <i>Headspace-solid phase microextraction/gas chromatographymass spectrometry</i>
CHOP	Chráněné označení původu PDO = <i>Protected Designation of Origin</i>
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií <i>Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection</i>
LOD	Mez detekce <i>Limit of detection</i>
LOQ	Mez stanovitelnosti <i>Limit of Quantitation</i>
MSDI	Modifikovaný teoretický maximální přidaný denní příjem <i>Theoretical Added Maximum Daily Intake</i>
m-TAMDI	Maximální denní příjem odvozený od průzkumu <i>Maximized Survey-Derived Daily Intake</i>
NPM	Nejvyšší přípustné množství

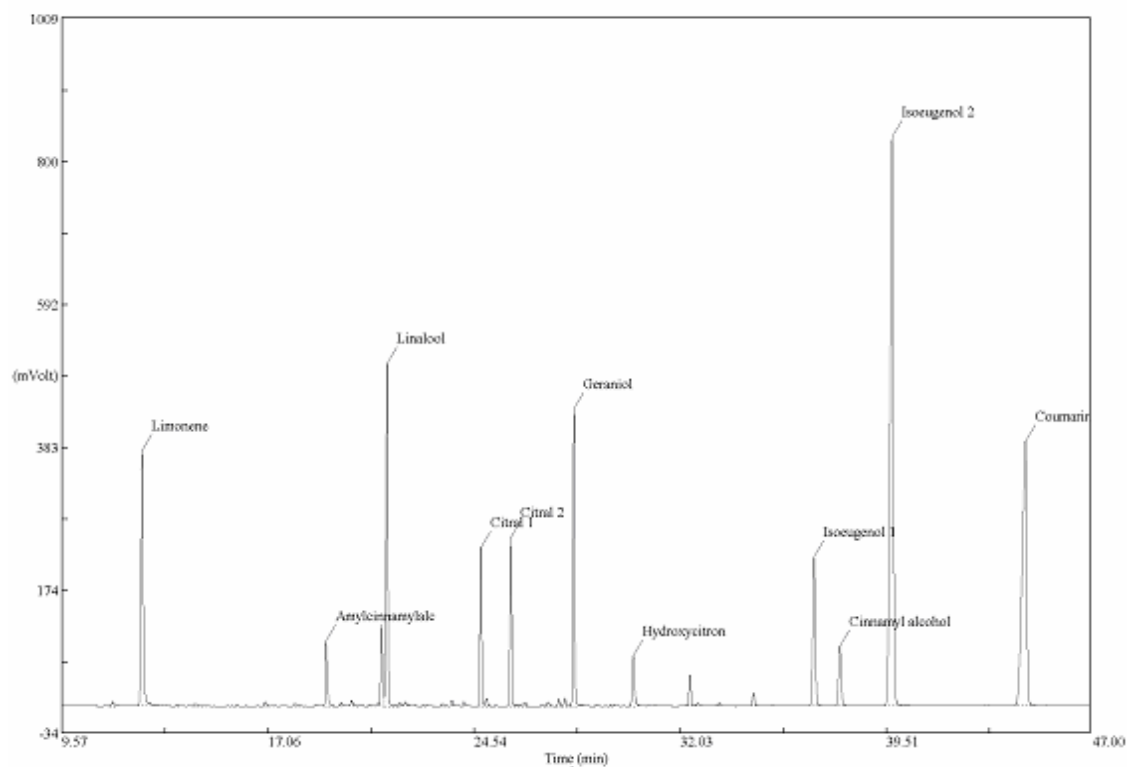
PASs	Potenčníálně alergenní substance <i>Potentially Allergenic Substance</i>
SCCP	Vědecký útvar pro spotřební zboží <i>Scientific Committee on Consumer Products</i>
SDE/GC-MS	Simultánní destilační extrakce ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí

8. SEZNAM PŘÍLOH

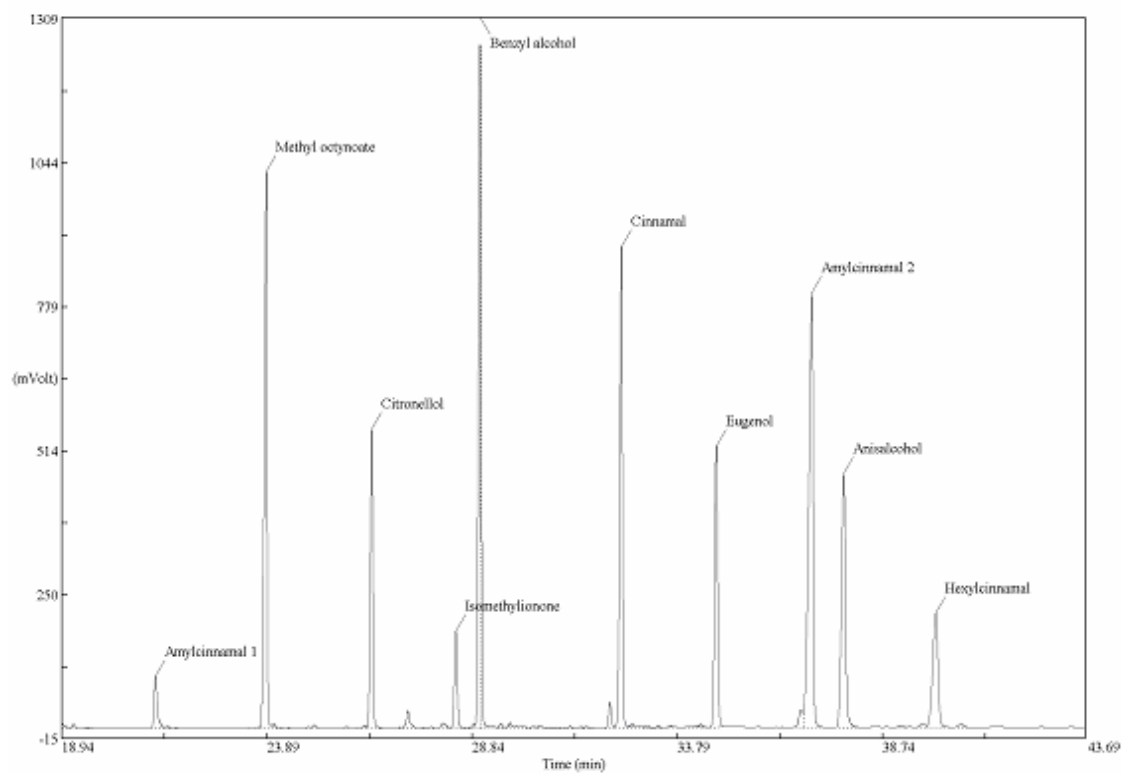
- Příloha I:** Chromatogram standardů identifikovaných vonných látek - směs A
- Příloha II:** Chromatogram standardů identifikovaných vonných látek - směs B
- Příloha III:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Čaj Aktivní žena.
- Příloha IV:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bon Pari.
- Příloha V:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Energy drink.
- Příloha VI:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Frisco.
- Příloha VII:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Gumoví medvídci.
- Příloha VIII:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. HIPP.
- Příloha IX:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Johnnie Walker.
- Příloha X:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Jupík.
- Příloha XI:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Lavazza Arabica.
- Příloha XII:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bylinný čaj Teekane (chřipka a nachlazení)
- Příloha XIII:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bylinný čaj Teekane (játra a žlučník)
- Příloha XIV:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bylinný čaj Teekane (urologický).
- Příloha XV:** Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Whisky John Wesson

9. PŘÍLOHY

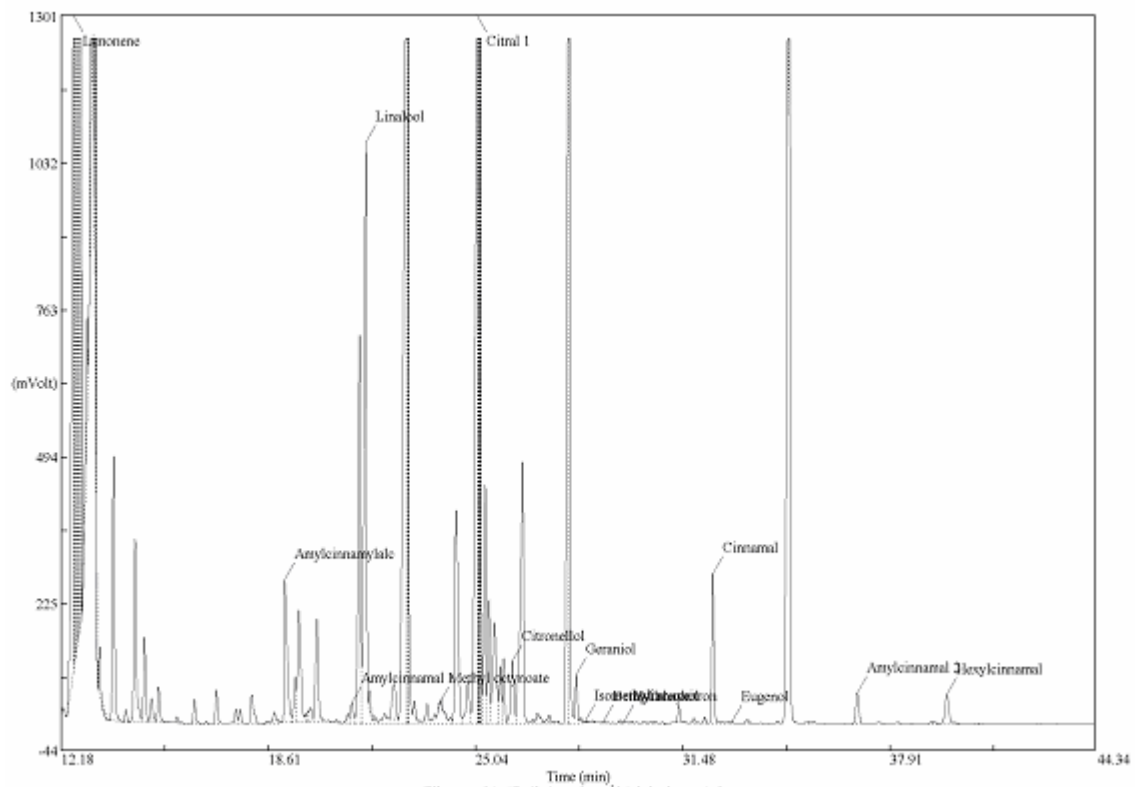
Příloha I: Chromatogram identifikovaných vonných látek směs A.



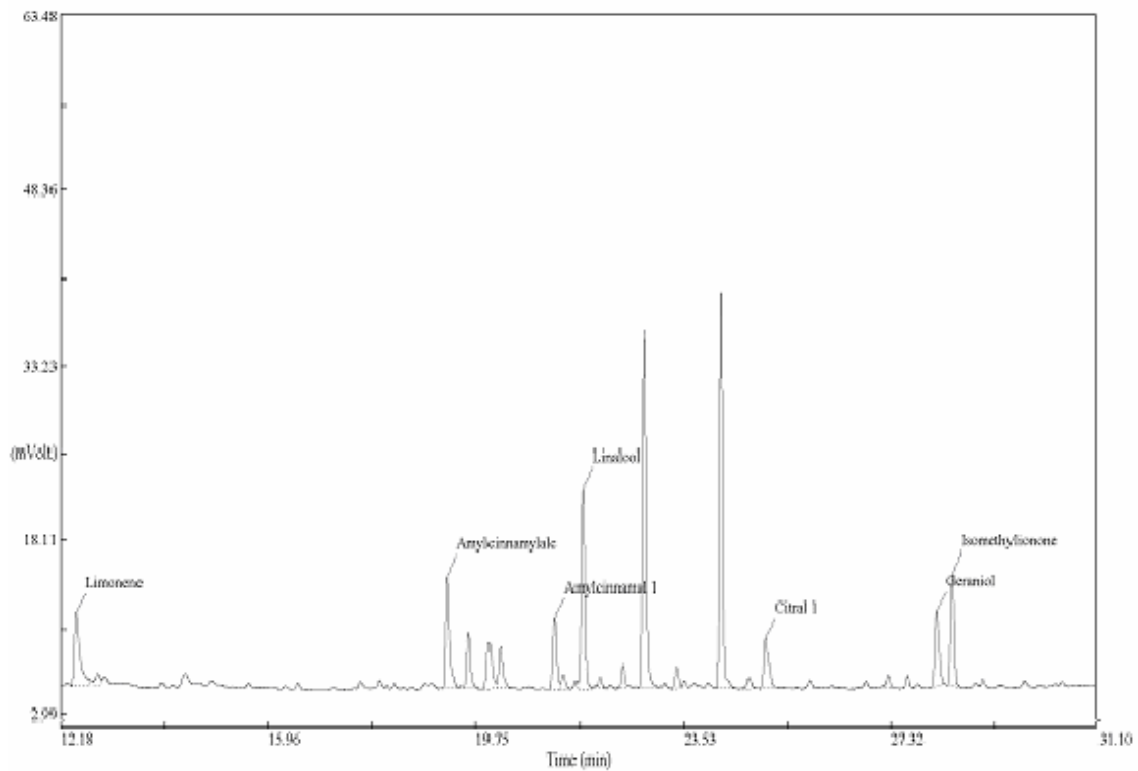
Příloha II: Chromatogram identifikovaných vonných látek směs B.



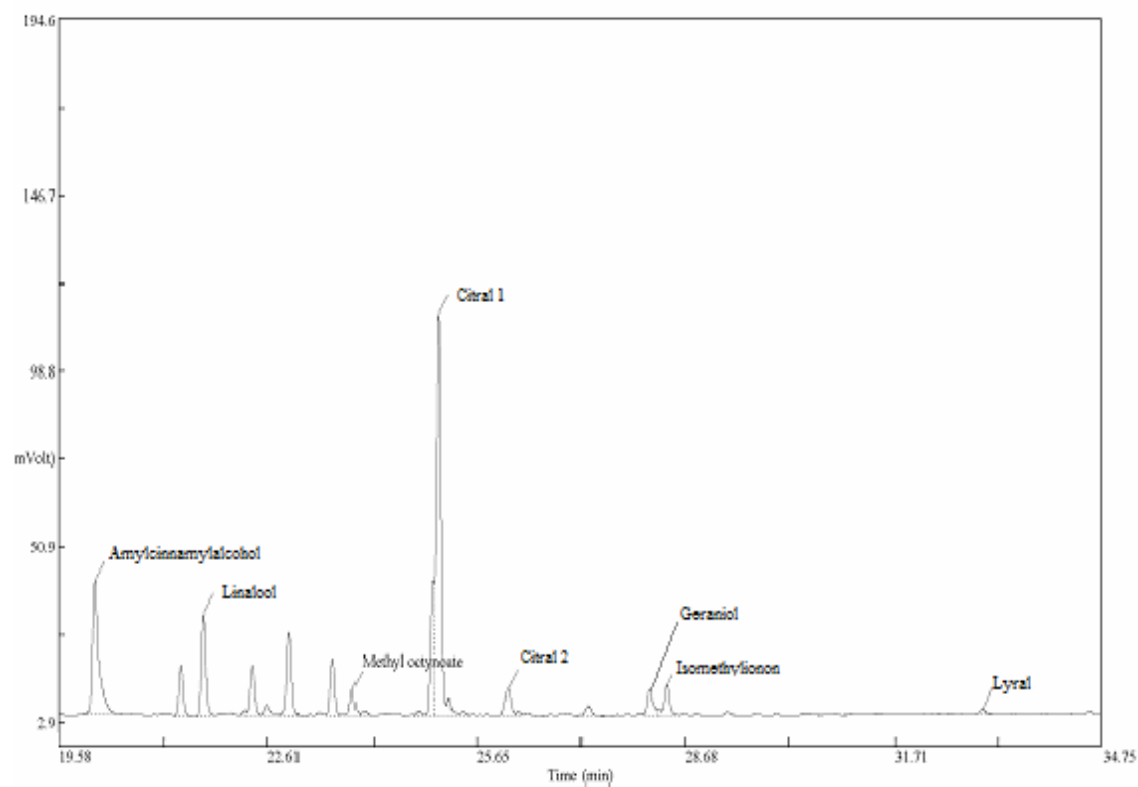
Příloha III: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Čaj Aktivní žena.



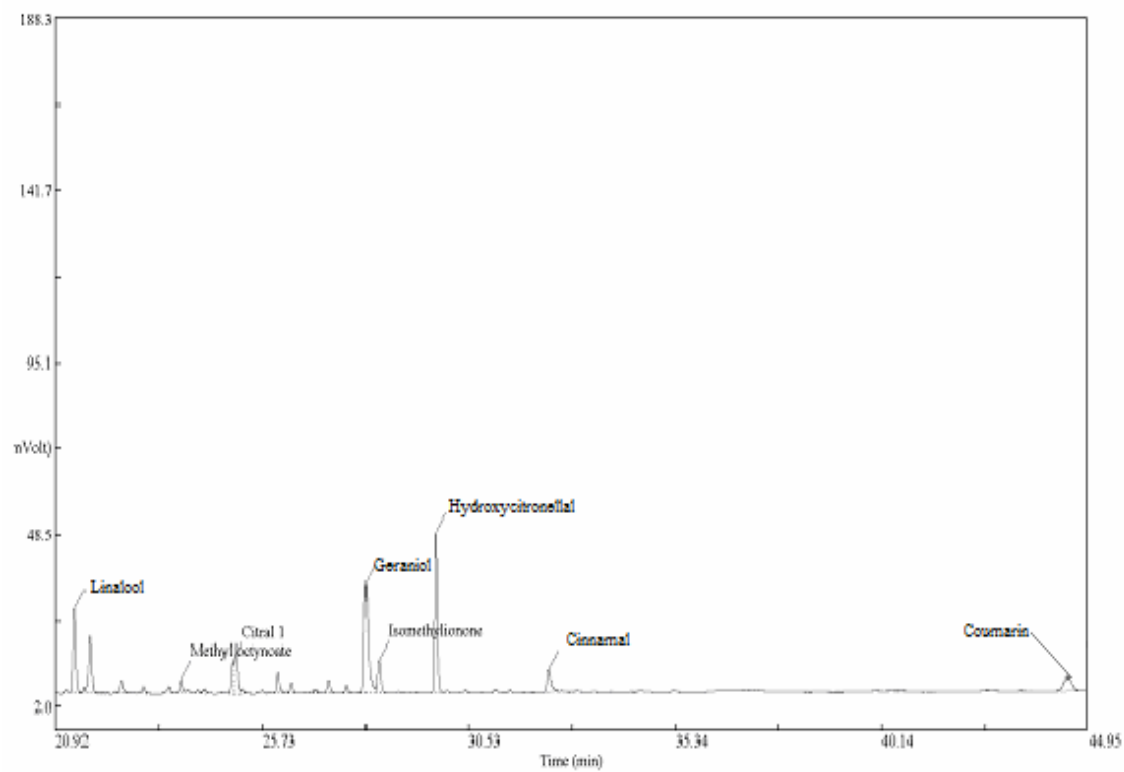
Příloha IV: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bon Pari.



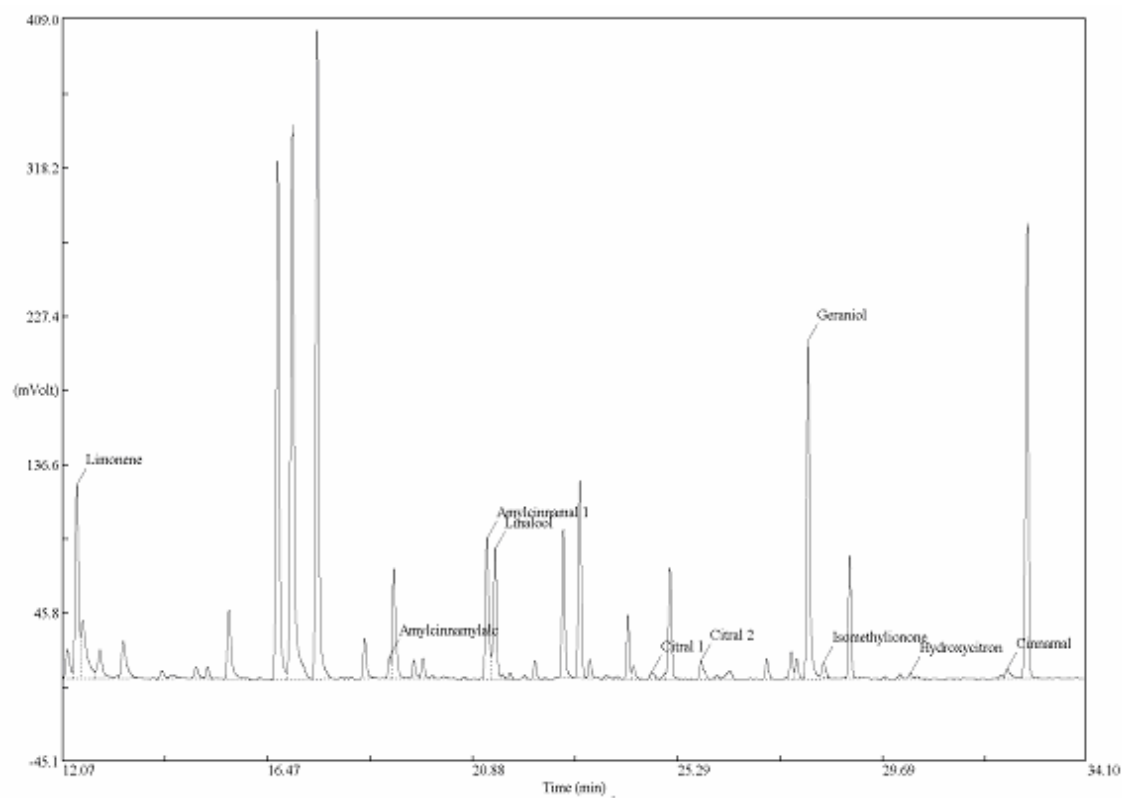
Příloha V: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Energy drink.



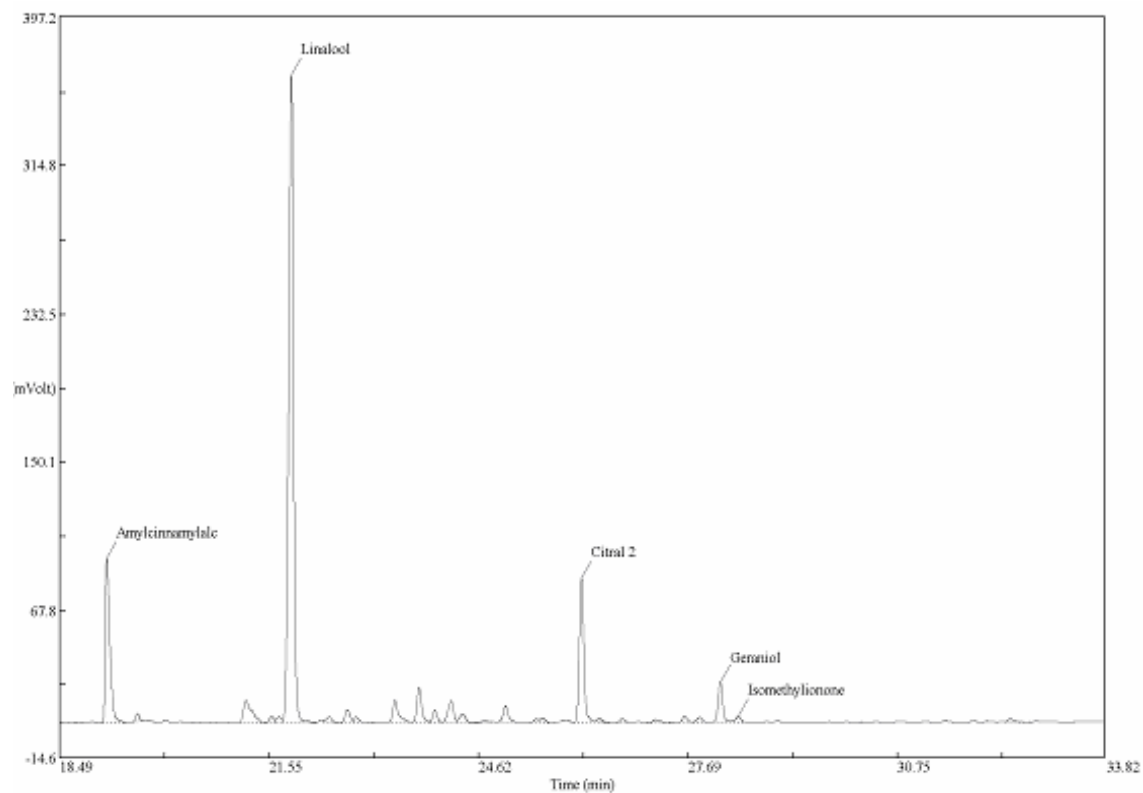
Příloha VI: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Frisco.



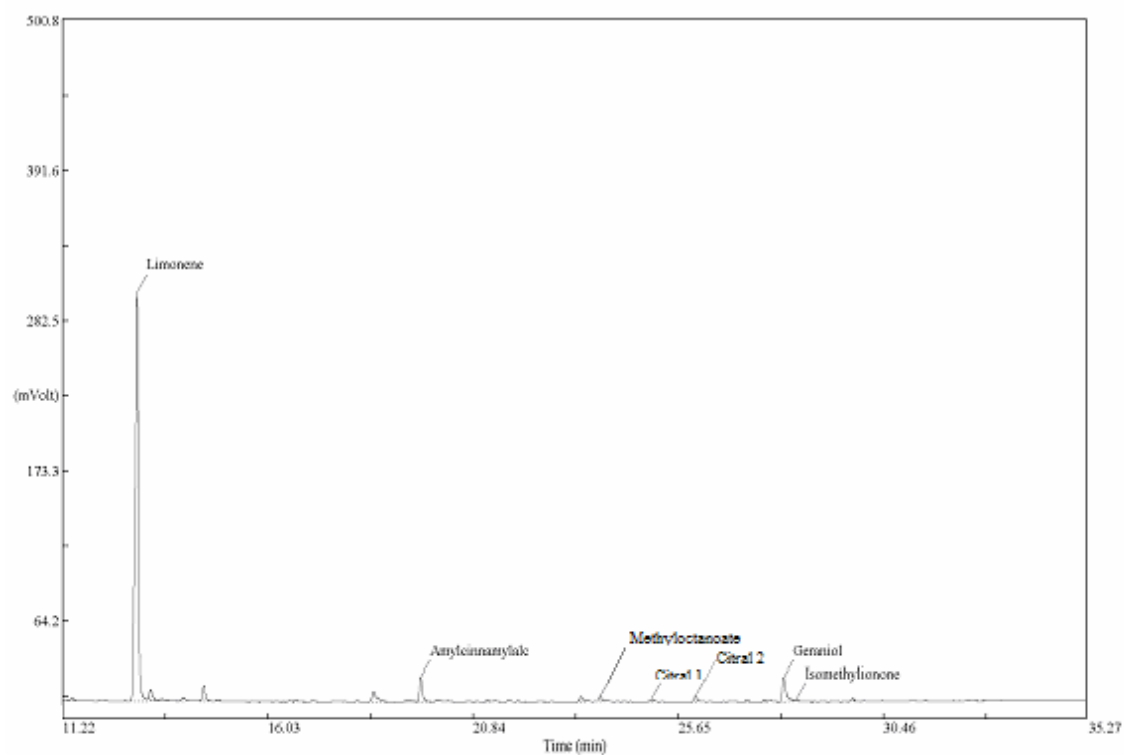
Příloha VII: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Gumovní medvídci.



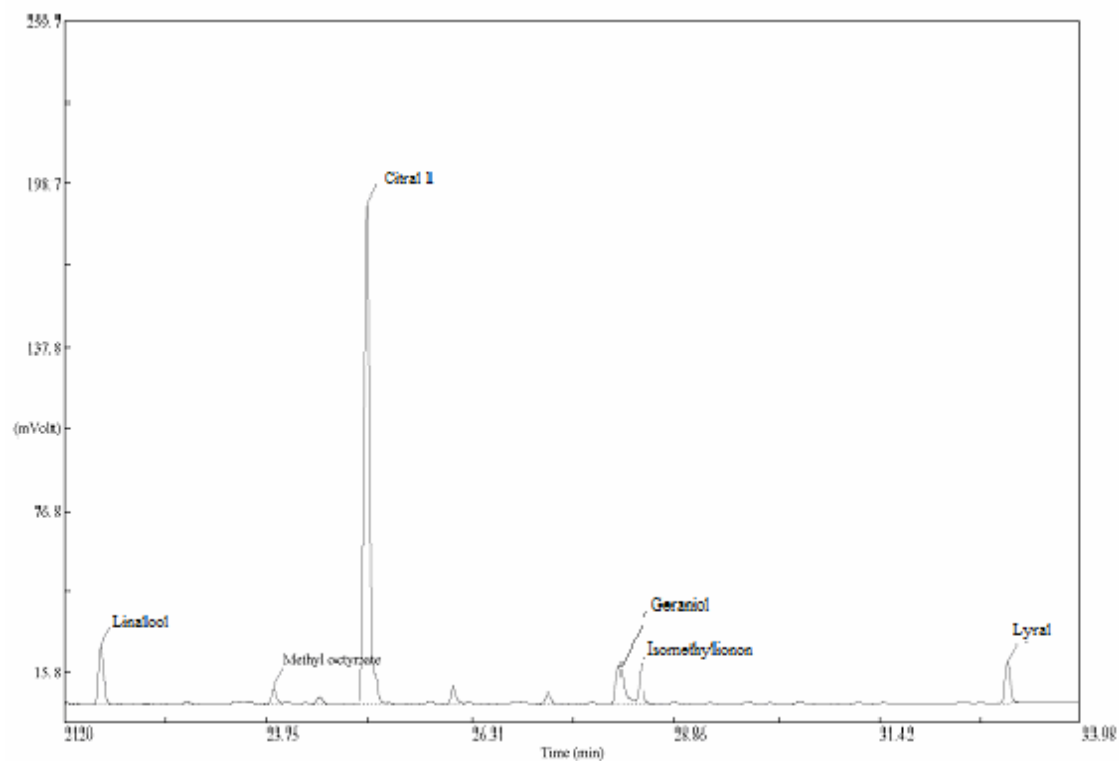
Příloha VIII: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. .HIPP.



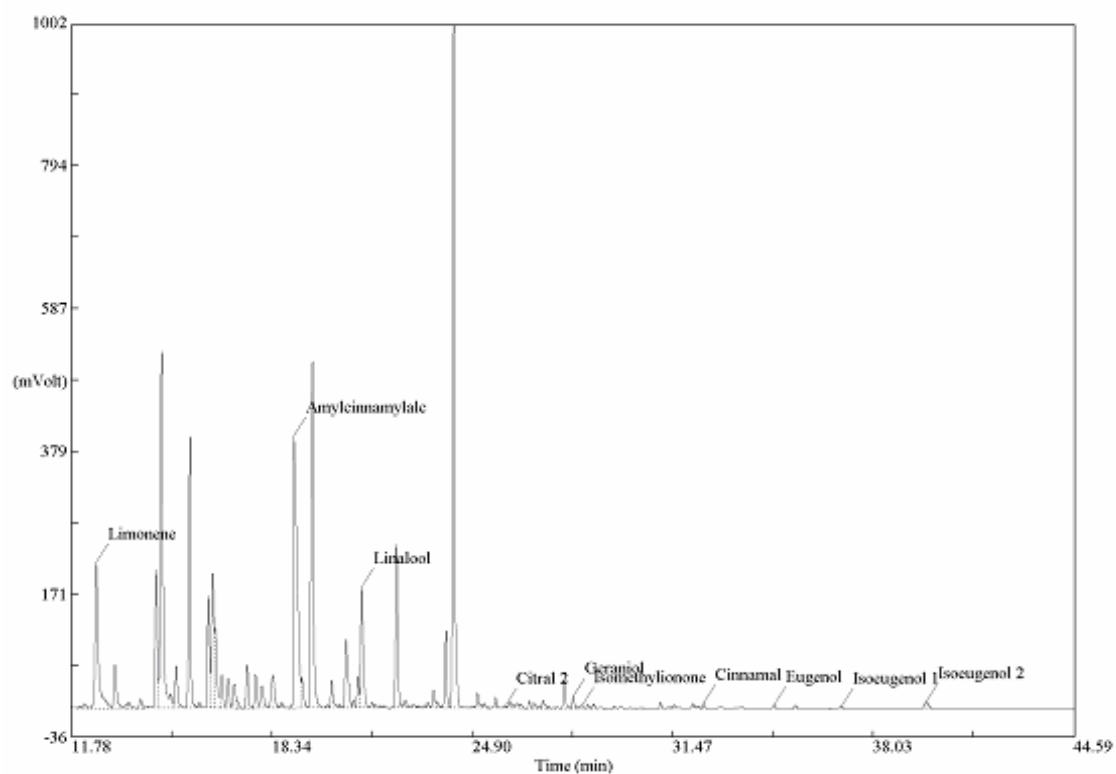
Příloha IX: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Johnnie Walker.



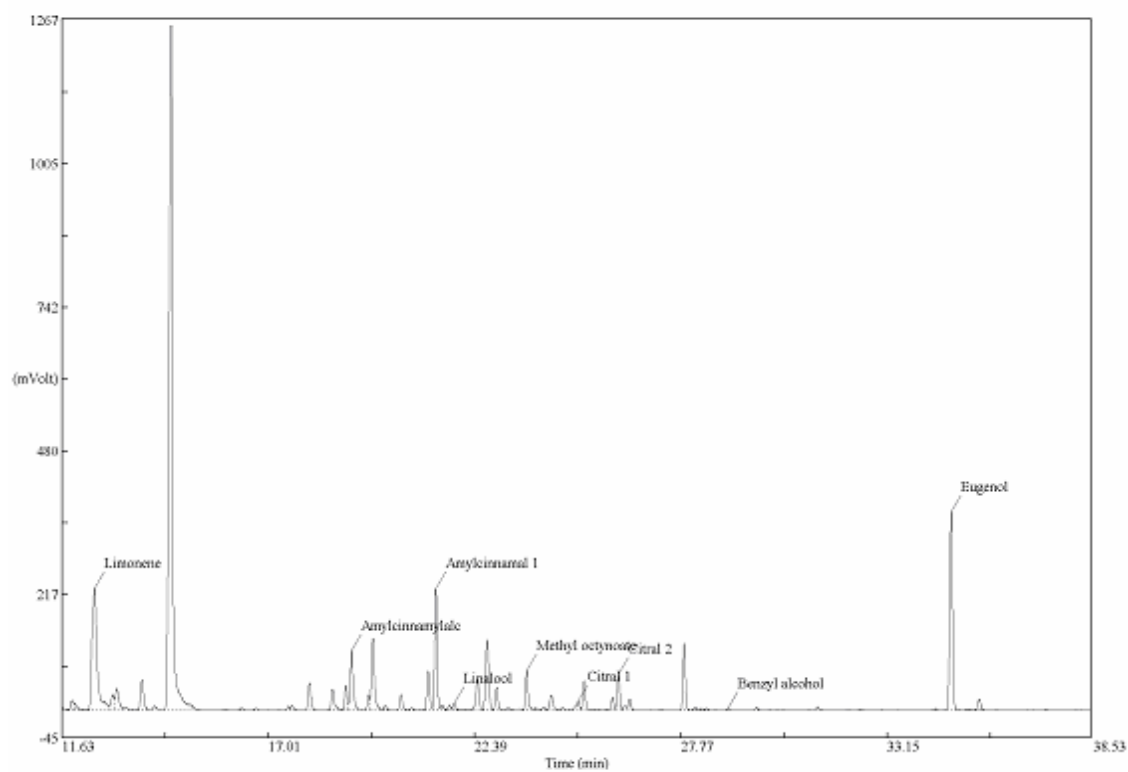
Příloha X: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Jupík.



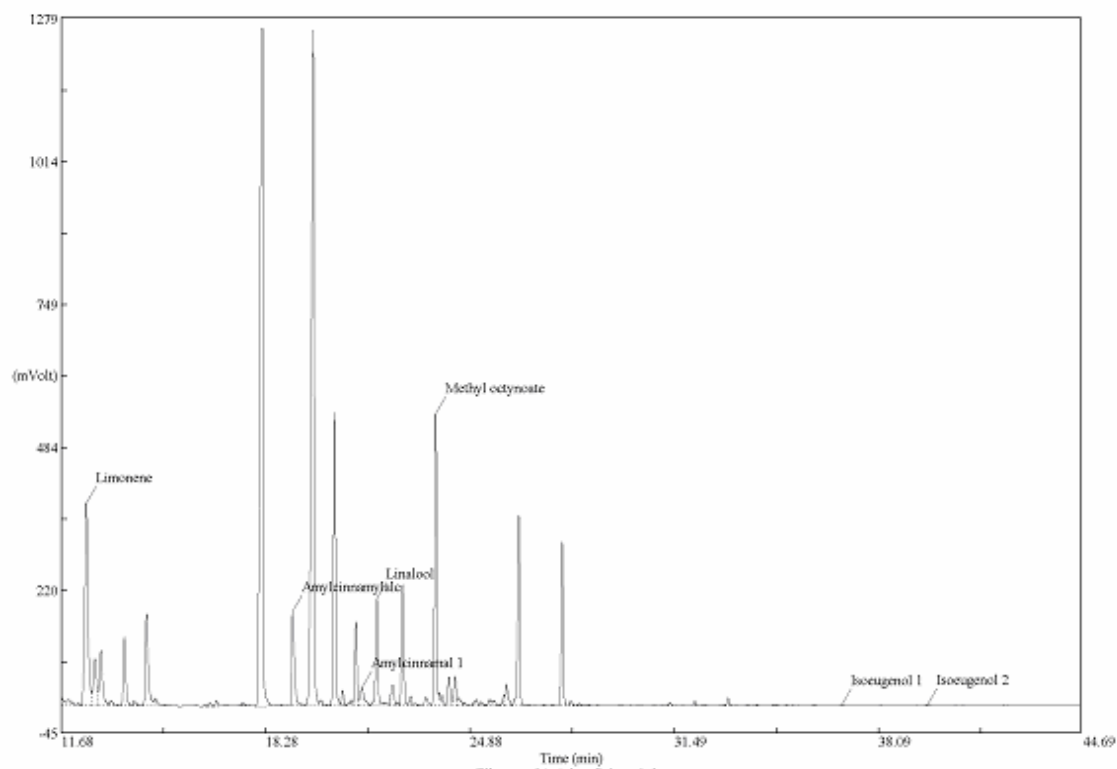
Příloha XI: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Lavazza Arabica.



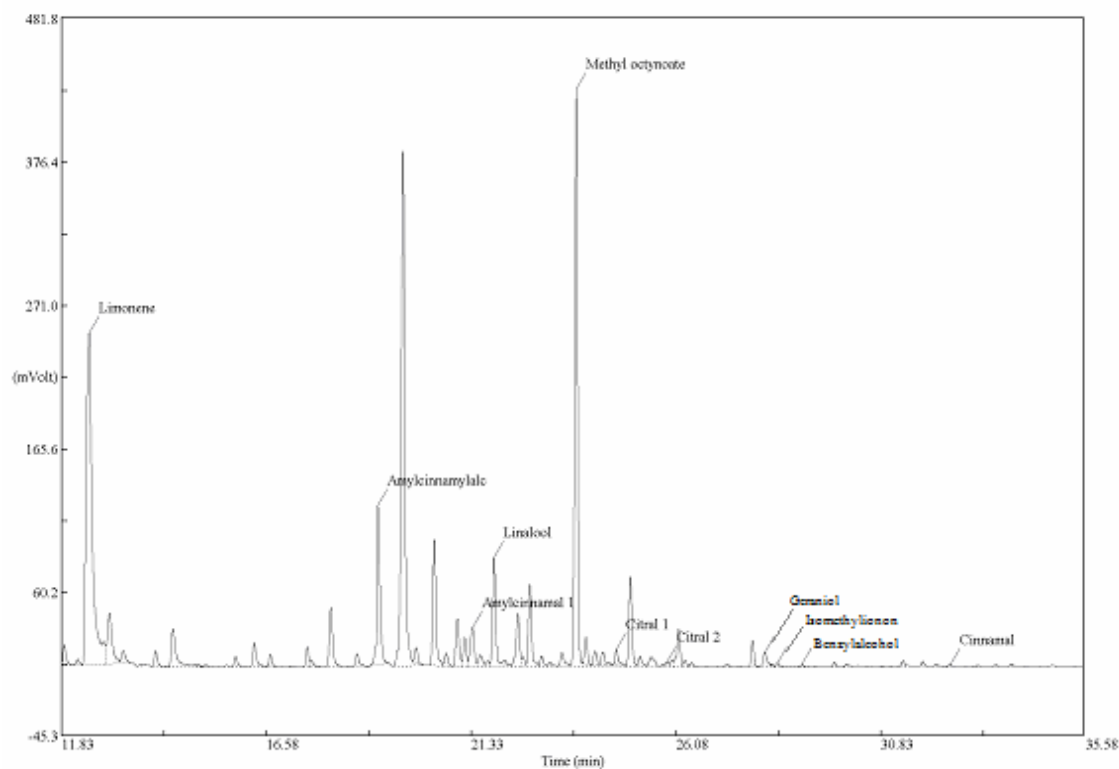
Příloha XII: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bylinný čaj Teekane (chřipka a nachlazení)



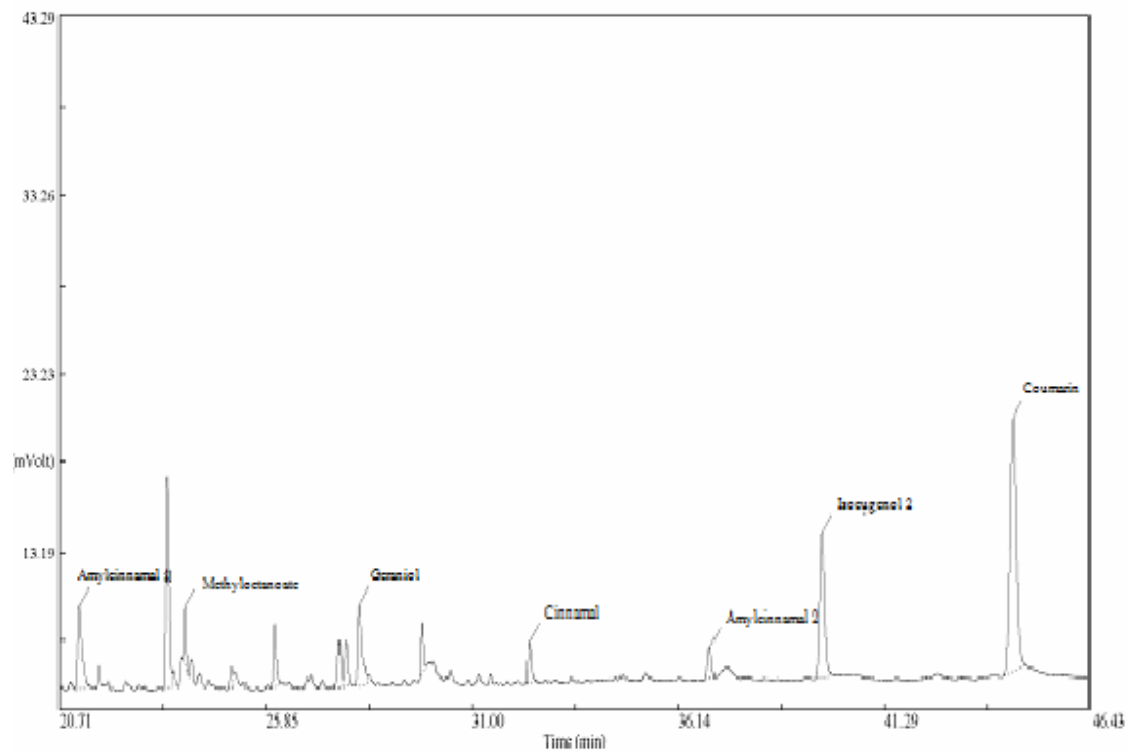
Příloha XIII: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bylinný čaj Teekane (játra a žlučník)



Příloha XIV: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bylinný čaj Teekane (urologický).



Příloha XV: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Whisky John Wesson



10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přirozené toxické látky rostlinných materiálů používaných k aromatizaci [7].....	15
Tabulka 2: Nejvyšší přípustná množství látek, které mohou být ve vyšších koncentracích pro člověka toxické, v různých druzích potravin [16]	18
Tabulka 3: Nejvyšší přípustné množství látek používaných k ochucování mléčné výživy pro kojence od ukončeného čtvrtého měsíce věku [16]	19
Tabulka 4: Nejvyšší přípustné množství látek používaných k ochucování příkrmů pro výživu určenou pro kojence a malé děti [16]	19
Tabulka 5: Vlastnosti amylcinnamalu [22,23,24,25,27,28]	20
Tabulka 6: Vlastnosti amylcinnamyl alkoholu [23,26,27,28,39]	21
Tabulka 7: Vlastnosti anýzalkoholu [23,27,28]	22
Tabulka 8: Vlastnosti benzylalkoholu [23,24,28,29]	23
Tabulka 9: Vlastnosti benzylbenzoátu [24,28,29,31,32]	24
Tabulka 10: Vlastnosti benzylcinnamátu [27,28,31]	25
Tabulka 11: Vlastnosti benzylsalicylátu [24,27,28,31]	25
Tabulka 12: Vlastnosti cinnamalu [23,24,28,29,31,32]	26
Tabulka 13: Vlastnosti cinnamyl alkoholu [27,28,29,30,31]	27
Tabulka 14: Vlastnosti citralu [24,27,28,31,32]	28
Tabulka 15: Vlastnosti citronellolu [28,31,32]	29
Tabulka 16: Vlastnosti kumarinu [28,31,32]	30
Tabulka 17: Vlastnosti geraniolu [5,23,28,31,32]	30
Tabulka 18: Vlastnosti eugenolu [27,28,31,32]	31
Tabulka 19: Vlastnosti farnesolu [24,27,28,31]	32
Tabulka 20: Vlastnosti hexylcinnamalu [24,27,31]	33
Tabulka 21: Vlastnosti hydroxycitronellalu [22,27,28,31]	34
Tabulka 22: Vlastnosti lyralu [22,24,27,31,33,34]	34
Tabulka 23: Vlastnosti isoeugenolu [24,27,28,29,31]	35
Tabulka 24: Vlastnosti α -isomethyliononu [24,28,31]	36
Tabulka 25: Vlastnosti lilialu [28,30,31]	37
Tabulka 26: Vlastnosti limonenu [23,27,28,31]	38
Tabulka 27: Vlastnosti linaloolu [24,27,28,31,34]	38
Tabulka 28: Vlastnosti methylheptin karbonátu [22,27,28,31]	39
Tabulka 29: Seznam použitých chemikálií	46
Tabulka 30: Optimalizované extrakční podmínky metody SPME [22,23,29,73,74]	47
Tabulka 31: Reálné vzorky potravinových výrobků	47
Tabulka 32: Retenční časy jednotlivých standardů alergenních vonných látek	50
Tabulka 33: Opakovatelnost metody pro α -amylcinnamylalkohol, α -isomethylionon a benzylalkohol	51
Tabulka 34: Opakovatelnost metody pro cinnamylalkohol a kumarin	51
Tabulka 35: Stanovení lineariry pro α -amylcinnamylalkohol a α -isomethylionon	52
Tabulka 36: Stanovení lineariry pro benzylalkohol a cinnamylalkohol	52
Tabulka 37: Stanovení lineariry pro kumarin	53
Tabulka 38: Korelační koeficienty jednotlivých standardů	59
Tabulka 39: Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro α -amylcinnamylalkohol a α -isomethylionon	59
Tabulka 40: Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro cinnamylalkohol a kumarin	60
Tabulka 41: Meze detekce jednotlivých standardů	63
Tabulka 42: Meze stanovitelnosti jednotlivých standardů	63
Tabulka 43: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách	64

Tabulka 44: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách	64
Tabulka 45: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách	66
Tabulka 46: Výskyt alergenních vonných látek ve vybraných potravinách	66