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 Bc. JITKA ŠKOPOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2010

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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	**FCH-DIP0423/2009**	Akademický rok:	**2009/2010**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Bc. Jitka Škopová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)		
Vedoucí práce	**Ing. Eva Vítová, Ph.D.**		
Konzultanti:	Ing. Radka Mokáňová		

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 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: 14.5.2010

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

- -	- -	- -
Bc. Jitka Škopová	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Student(ka)	Vedoucí práce	Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

- -
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se věnuje problematice potenciálně alergenních aromaticky aktivních látek v potravinách. Aromata přidávána do potravin jsou především rostlinného původu. Na lidský ogranismus mají tyto vonné látky a jejich směsi řadu pozitivních i negativních účinků. Přestože aromata nepatří mezi hlavních skupiny alergenů, některé studie upozorňují na potenciální nebezpečí alergenních účinků některých vonných látek.

Teoretická část této práce obecně charakterizuje vonné látky rostlinného původu a podává přehled 26 nejdůležitějších alergenních vonných látek dle Evropské kosmetické legislativy.

Cílem experimentální části bylo ověřit selektivnost a vhodnost již zavedené metodiky headspace mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME-GC-FID) ve spojení s plynovou chromatografií pro stanovení vybraných alergenních aromaticky aktivních látek. Poté ověřenou metodu použít na široké spektrum reálných vzorků potravinářských výrobků.

ABSTRACT

The thesis deals with the issue of potentially allergenic aroma compounds in food. Aroma compounds suitable for food flavouring are mainly of plant origin. These aroma compounds and their mixtures have a lot of positive and negative effects on human organism. Although the aroma compounds are not among main groups of allergens, several studies indicate a potential risk of allergenic effects of some aroma compounds.

The theoretic part of this thesis focuses on aroma compounds of plant origin and gives an overview of 26 the most important fragrance allergens according to the European cosmetic legislation.

The aim of the experimental part was to verify the selectivity and appropriateness of the currently used methodology of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection (HS-SPME-GC-FID) for determination of selected allergenic aromatic active compounds. Secondly, it is to use a proven method for a wide spectrum of real food products.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vonné látky, potraviny, SPME, GC

KEYWORDS

Aroma compounds, food, SPME, GC

ŠKOPOVÁ, J. *Stanovení vybraných vonných látek v potravinách.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 82 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 studentky

Poděkování:
Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Evě Vítové, Ph.D. a konzultantce Ing. Radce Mokáňové za účinnou pomoc, cenné rady a připomínky při řešení této práce.

OBSAH

1 ÚVOD ... 7

2 TEORETICKÁ ČÁST ... 8

2.1 Vonné látky ... 8
2.1.1 Obecné informace ... 8
2.1.2 Vonné látky v potravinách ... 8
2.1.3 Pojmy používané v potravinách ... 9

2.2 Přírodní vonné látky ... 10
2.2.1 Rostlinné vonné látky ... 10
2.2.1.1 Suroviny pro výrobu aromat ... 11
2.2.2 Složení aromat ... 14
2.2.2.1 Chemické skupiny látek určené k aromatizaci ... 15
2.2.3 Formy aromat ... 16

2.3 Potenciálně alergenní vonné látky ... 17
2.3.1 Vlastnosti vybraných potenciálně alergenních vonných látek ... 19
2.3.1.1 4-metoxybenzylalkohol (INCI: Anise alcohol) ... 19
2.3.1.2 2-benzylidenheptanal (INCI: Amyl cinnamal) ... 20
2.3.1.3 (E)-3-fenylpropenal (INCI: Cinnamal) ... 20
2.3.1.4 3-fenyl-2-hexylpropenal (INCI: Hexyl cinnamal) ... 21
2.3.1.5 7-hydroxycitronellal (INCI: Hydroxycitronellal) ... 22
2.3.1.6 Methyl-okt-2-inoát (INCI: Methyl 2-octynoate) ... 22
2.3.1.7 Citral (INCI: Citral) ... 23
2.3.1.8 Citronelol (INCI: Citronellol) ... 23
2.3.1.9 Eugenol (INCI: Eugenol) ... 24
2.3.1.10 Geraniol (INCI: Geraniol) ... 25
2.3.1.11 Izoeugenol (INCI: Isoeugenol) ... 25
2.3.1.12 D-limonen (INCI: Limonene) ... 26
2.3.1.13 Linalol (INCI: Linalool) ... 27

2.4 Biologické účinky aromat ... 28
2.4.1 Pozitivní účinky aromat ... 28
2.4.2 Negativní účinky aromat ... 30

2.5 Přehled platné legislativy ... 32

2.6 Možnosti stanovení aromatických látek v potravinách ... 33

2.7 Stanovení potenciálně alergenních aromatických aktivních látek ... 36
2.7.1 Mikroextrakce tuhou fází ... 36
2.7.2 Plynová chromatografie ... 37
2.7.2.1 Plamenově ionizační detektor ... 39

2.8 Vybrané statistické metody zpracování dat ... 40
2.8.1 Opakovatelnost metody ... 40
2.8.1.1 Aritmetický průměr ... 40
2.8.1.2 Směrodatná odchylka ... 40

2.8.1.3 Relativní směrodatná odchylka ... 40
2.8.2 Linearita metody ... 41
2.8.3 Mez detekce ... 41
2.8.4 Mez stanovitelnosti ... 41

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 43

3.1 Laboratorní vybavení ... 43
3.1.1 Chemikálie ... 43
3.1.1.1 Standardy vonných alergenních látek I ... 43
3.1.1.2 Standardy vonných alergenních látek II ... 43
3.1.1.3 Rozpouštědla ... 43
3.1.2 Plyny ... 43
3.1.3 Přístroje a pracovní pomůcky ... 44

3.2 Podmínky SPME-GC-FID ... 44

3.3 Reálné vzorky potravin ... 45

3.4 Pracovní postupy ... 46
3.4.1 Příprava standardu ... 46
3.4.2 Příprava reálného vzorku ... 46
3.4.3 Sorpce a desorpce aromaticky aktivních látek ... 46

4 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 47

4.1 Identifikace jednotlivých standardů ... 47
4.1.1 Standardy vonných alergenních látek I ... 47
4.1.2 Standardy vonných alergenních látek II ... 48
4.1.3 Směsi standardů vonných alergenních látek ... 48

4.2 Opakovatelnost metody ... 51

4.3 Linearita ... 52

4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti ... 57
4.4.1 Příklad výpočtu meze detekce a meze stanovitelnosti ... 60

4.5 Reálné vzorky ... 62

5 ZÁVĚR ... 65

6 SEZNAM POUŽITÉ LITRATURY ... 66

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ... 73

8 SEZNAM PŘÍLOH ... 75

9 PŘÍLOHY ... 76

1 ÚVOD

Většina vonných látek je dnes používána k výrobě aromat, kde spolu s látkami působícími na chuťové buňky vytváří jednotný senzorický vjem (*flavour*).

Průmysl produkující pro lidstvo potraviny patří zajisté mezi nejdůležitější. Na jeho rozvoji se podílejí četné vědecké obory, jako jsou chemie, fyzika, biologie aj. Rozvoj poznatků a metodik těchto vědních oborů umožňuje stále dokonalejší analyzování potravin a vonných přírodních surovin.

Aromata se přidávají do potravin z důvodu ovlivnění senzorických a organoleptických vlastností, zejména chuti a vůně. Dále umožňují maskovat možný zápach ostatních materiálů nebo v některých případech i ovlivnit náladu člověka. Proto jsou dnes aromatizované potravinářské výrobky součástí běžného života. Průmyslově vyráběné potraviny v posledních letech však obsahují podstatně větší množství aromatických látek než v minulosti. Důvodem je zajistit standardní chuť a vůni potravin, přizpůsobit chuť požadavkům spotřebitele a nahradit omezené zdroje přírodních ochucovacích surovin v podstatě surovinami levnějšími a tak snížit náklady na výrobu potravin. Některá aromata prakticky nahradila ve výrobní praxi koření, jehož použití v průmyslové výrobě má oproti aromatům řadu nevýhod (například proměnlivý obsah senzoricky aktivních látek a mikrobiologická kontaminace).

Před aplikací aromat do potravin je třeba vždy brát v úvahu jak výsledky fyzikálně chemických stanovení, tak i senzorických posudků a charakter produktů, v nichž má být posuzovaná látka aplikována. Dávkování těchto aromat do potravin je velmi důležité a konkrétní přídavek do určité potraviny je zapotřebí prodiskutovat s výrobcem aromat a experimentálně ověřit. Předávkování aroma téměř vždy vede k poškození kvality výrobku.

Sortiment aromatizovaných potravinářských výrobků se stále rozšiřuje, od čajů, bonbónů, žvýkaček až po likéry, a o vonných látkách v nich obsažených, je jen málo dostupných informací. Na lidský organismus mají vonné látky a jejich směsi řadu pozitivních i negativních účinků. Právě jednou skupinou látek, které aromata přidávaná do potravin mohou obsahovat, se zabývá tato diplomová práce: *potenciálně alergenními aromaticky aktivními látkami*. Přídavek těchto látek do potravin, na rozdíl od kosmetických výrobků, není nijak legislativně ošetřen (mimo kumarinu). Přitom jde o stejné látky. Potraviny obsahují mnoho významnějších alergenů, aromata nepatří do hlavních skupin, ale řada studií upozorňuje na potenciální nebezpečí i z této strany.

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na přehled vonných látek určených k aromatizaci potravin, seznam potenciálně alergenních aromat a možnosti analytického stanovení těchto látek. Dále ověřit selektivnost a vhodnost již zavedené metodiky headspace mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME-GC-FID) ve spojení s plynovou chromatografií pro stanovení vybraných alergenních aromaticky aktivních látek. Poté ověřenou metodu použít na široké spektrum reálných vzorků potravinářských výrobků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vonné látky

2.1.1 Obecné informace

Vonné látky jsou klasifikovány různými způsoby. Pro potřeby vědy se vonné látky dělí na:[1, 2]

- přírodní – pochází z přírodních produktů (získávání vůní z přírody)
  - ✓ rostlinné – nabízejí širokou paletu rozličných vůní
  - ✓ živočišné – také významným zdrojem vůní používaných člověkem
- syntetické – tvořeny syntetickými látkami
  - ✓ přírodně identické
  - ✓ umělé

Dalším z možných dělení vonných látek, které používají především parfuméři, je rozdělení podle charakteristické vůně a následné řazení do tříd.[2]

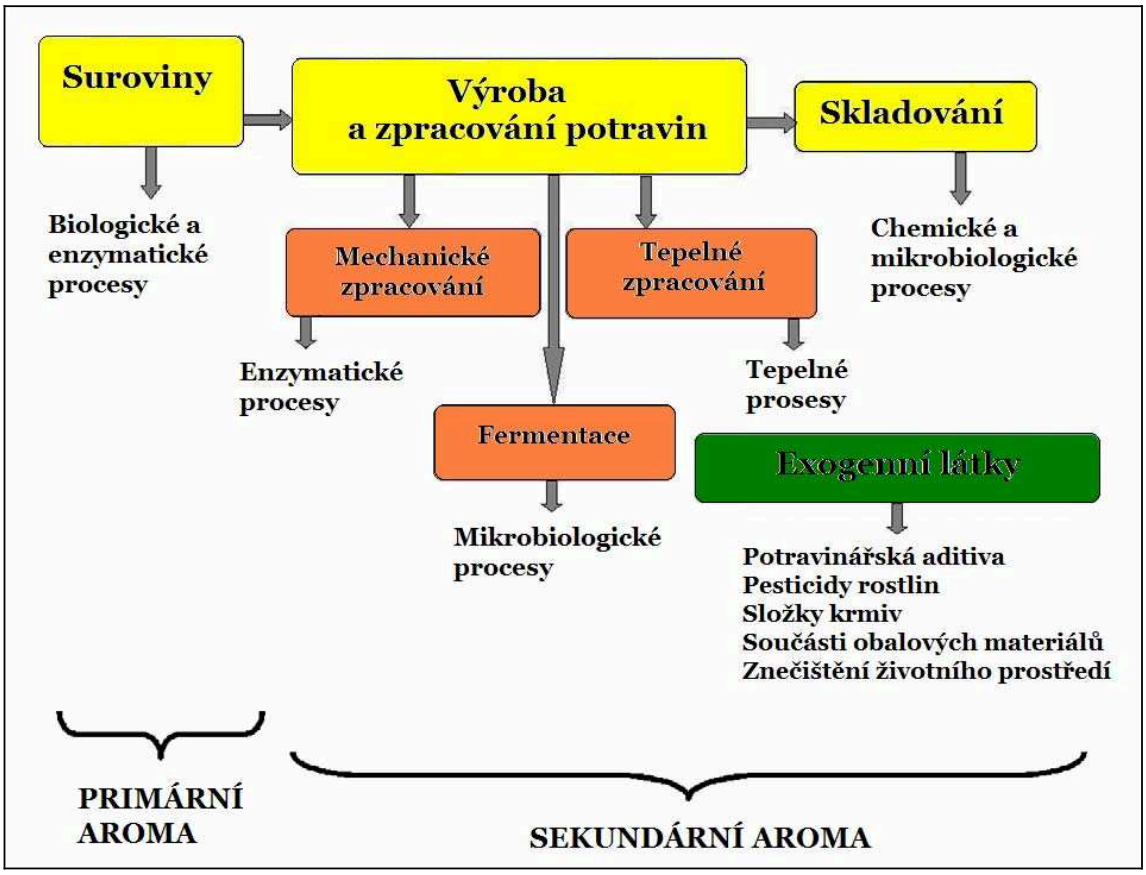
Mezi hlavní typy vůní patří například aldehydické, balzamické, bylinné, citrusové, dřevité, fialka, hyacint, jasmín, jehličnaté, konvalinka, kořenité, květinové, levandule, lilie a další. Dělení chuťových aromat je odvozeno od názvů různých poživatin, nápojů a koření. Například ananas, banán, borůvka, brandy, broskev, citrusy, hořká aromata, hruška, jablko, jahoda, kakao a čokoláda, koření (anýz, bazalka, kmín, majoránka apod.), malina, maso a masné výrobky, kouřová aromata, mléčné výrobky a další.[3]

2.1.2 Vonné látky v potravinách

Těkavé vonné látky mohou vznikat ve všech výrobních etapách z jakýchkoli součástí potravin. Jsou přítomny v surovinách, vznikají úmyslně nebo neúmyslně během technologického procesu, a také během skladování potravin a potravinářských výrobků (schematické znázornění na ***Obr. 2.1.1***). Již tisíce vonných sloučenin bylo detekováno a stále se objevují látky nové. V potravinách se vyskytují vonné profily, které jsou výsledkem obrovského množství reakcí probíhajících mezi složkami potravinářských výrobků. Aby bylo dosaženo plnější vůně, charakteristické pro danou potravinu a vyvolat příjemný vjem, vyžaduje většina výrobků směsi 10 – 30 přídatných vonných látek.[3,4,5,6,7]

Vonné látky interagují s bílkovinami, sacharidy, lipidy i s jinými složkami potravin, a těmito nevazebnými interakcemi je ovlivněna koncentrace vonných látek v plynné fázi. Charakter výsledného aroma závisí na:[5,7]

- ✓ struktuře reagentů a jejich dostupnosti
- ✓ množství tuku
- ✓ přítomnosti aminokyselin a sacharidů
- ✓ reakčních podmínkách (např. teplotě, času, vodní aktivitě, pH, přítomnosti kyslíku)



Obr. 2.1.1: *Hlavní zdroje těkavých složek potravin*[5]

2.1.3 Pojmy používané v potravinách

Přítomnost aromatu v potravině se obecně označuje pouze slovem *„aroma“* ve výčtu složek. Aroma lze dále specifikovat jako *„přírodní“*, *„přírodně identické“* nebo *„umělé“*, případně konkrétním názvem popisujícím druh aromatu.[8]

Níže uvedené definice vycházejí z vyhlášky č. 447/2004 Sb., o požadavcích na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin:[9]

- **Aroma** *(flavouring)* – je definováno jako směs aromatických látek, aromatických přípravků, reakčních aromatických přípravků, kouřových aromatických přípravků obsažených jednotlivě nebo v kombinaci
- **Aromatická látka** *(flavouring substance)* – je chemicky definovaná látka, která působí na čichové a chuťové receptory člověka a vyvolává vjem vůně a chuti a to jednotlivě nebo v kombinaci
- **Přírodní aromatická látka** *(natural flavouring substance)* – je 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

- **Přírodně identická aromatická látka** *(flavouring substance identical to natural substance)* – je látka získaná chemickými postupy (syntézou či izolačními kroky chemické povahy), která je chemicky identická s látkou přirozeně přítomnou ve zdrojích rostlinného či živočišného původu
- **Umělá aromatická látka** *(artifical flavouring substance)* – je látka získaná chemickými postupy, která není chemicky identická s látkami přítomnými ve zdrojích rostlinného nebo živočišného původu
- **Aromatický přípravek** *(flavouring preparation*) – je přípravek získaný fyzikálními, enzymovými nebo mikrobiálními pochody ze surovin rostlinného nebo živočišného původu, který není chemicky definovanou látkou a který působí na čichové, nebo čichové a chuťové receptory člověka a vyvolává vjem vůně, nebo vůně a chuti
- **Reakční aromatický přípravek** *(process flavouring preparation)* – je 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 látka redukující cukr. Většina těchto přípravků vychází z Maillardovy rekce a je zaměřená na masové aromata nejrůznějších typů (například hovězí a kuřecí)
- **Kouřový aromatický přípravek** *(smoke flavouring preparation)* – je přípravek získaný extrakcí zplodin pyrolýzy (tepelného rozkladu) výchozích surovin užívaných při tradičním procesu uzení potravin

2.2 Přírodní vonné látky

Přírodní vonné látky jsou získávány z různých částí rostlin, ze zvířecích žláz a také orgánů. V přírodě, při degradaci dostatečného množství vysokomolekulárních produktů primárního metabolismu, však produkují aromatické látky především rostliny. Vonné látky vznikají v rostlinách dvěma způsoby**:**[1,10]

- ✓ Terpenické látky – vznikají složitým biogenetickým procesem nazývaným mevalonátový; např. uhlovodíky, jako limonen, pinen, z aldehydů např. citral a z alkoholů geraniol, linalool a stovky dalších sloučenin
- ✓ Aromatické látky – vznikají procesem nazývaným šikimátový (fenylpropanový); např. aromatické sloučeniny, jako kumariny a jejich deriváty, a dále fenolické látky, např. eugenol

2.2.1 Rostlinné vonné látky

Rostliny mají schopnost syntetizovat, shromažďovat a uvolňovat vonné látky, které mohou interakcemi s lidskými receptory vytvářet aroma i chuť molekul. Nabízejí širokou paletu rozličných vůní, které se lidé snaží již odpradávna získávat a hlavně uchovávat. Nejprve byly všechny vůně přírodní, později se začaly izolovat jednotlivé chemické látky, odpovědné za charakteristické aroma, z přírodních produktů (např. cinnamaldehyd ze skořicového oleje nebo benzaldehyd z hořkého mandlového oleje). Syntetické vonné látky mají stejné složení jako jejich přírodní protějšky a jejich výroba je méně nákladná, přesto se používají méně, než látky přírodní.[2,11,12]

Při výběru metody získání přírodních vonných látek se zohledňují chemikálie zodpovědné za vůni a také samotný produkt. Většina izolačních technik využívá některou z forem extrakce

nebo destilace, popřípadě jejich kombinaci. Obě tyto metody jsou založeny na rozdílné rozpustnosti látek v různých rozpouštědlech (extrakce, chromatografie) a na rozdílech v tlacích par (destilace).[1,13]

Vzniklá aromata slouží ke zlepšení vůně, případně chuti potraviny. Obsahují účinné látky, které jsou chemicky jednotné a vůně i chuť je velice intenzivní, například u čokolády a cukrovinek dostačuje přibližně 10 g na ochucení 100 kg hmoty. Některé z takových látek mají však vydatnost ještě mnohokrát vyšší.[11]

Základní aromatické látky, ze kterých se aromata sestavují, mohou být silice, šťávy, destiláty a jednotlivé, z těchto materiálů izolované látky – např. citral vydestilovaný z lemongrassové silice, menthol ze silice peprnomátové, nebo syntetické látky, chemicky jednotné, vyrobené různými postupy (např. citral vyrobený z pinenu a menthol z m-kresolu). Získávají se ve většině případů z rostlinných materiálů, z čerstvých nebo sušených rostlin, označovaných jako drogy. Přírodní aromata se získávají pouze lisováním za studena, pouze tak je dosaženo věrné vůně přírodního materiálu, ze kterého byla získána. Teplem dochází k chemickým změnám a vznikají nové aromatické látky.[7,11]

2.2.1.1 Suroviny pro výrobu aromat

Aromatické rostliny jsou zdrojem vonných látek, převážně silic (dříve éterické oleje) a kumarinů.[14]

Materiály pro výrobu přírodních potravinářských aromat:

- *Silice* – neboli éterické oleje, patří k nejdůležitějším z těchto surovin. Tyto komplikované směsi látek, vyskytující se v přírodních materiálech mnoha čeledí rostlin (např. z čeledi Hluchavkovité, ***Tab. 2.2.1***), obsahují vždy uhlovodíky a kyslíkaté látky. Většina z nich má skelet složený z izoprenových molekul řazených za sebou podle izoprenového pravidla – patří tedy mezi terpeny. Terpenické uhlovodíky většinou nemají rozhodující význam z hlediska aroma. Pár výjimek ale existuje, například limonen jako monoterpenický uhlovodík propůjčuje citrusovým silicím v produktu příjemnou lahodnou svěžest. Kromě monoterpenů a seskviterpenů jsou silice složeny i z alifatických, cyklických a aromatických sloučenin. Ty obsahují nejen atomy uhlíku, ale mají v molekule atom nebo atomy kyslíku, dusíku či síry. Kvalitu silic tedy neudává obsah terpenických uhlovodíků, ale obsah komponentů, které obsahují v molekule kyslík, říká se jim „*vonné principy silic*“.[11,12,15]

  Hlavní složkou například citrónových silic jsou terpenické látky: limonen (přes 90 %), citral (5 %), linalool, citronellol, nerol, α-terpineol, hexanol, citronelal a mnoho dalších sloučenin. Některé odrůdy citronů poskytují silice s poměrně hrubou vůní. Ta se zjemňuje přídavkem silice pomerančové. Naopak citrónové silice s příliš jemnou vůní se dají upravit přidáním lisované limetové silice nebo čistým citralem.[11]

  Silice se získávají z různých částí rostlin (***Obr. 2.2.1***) např. z květů (jasmín, růže), stonků (máta, levandule), oplodí plodů (citrusy), semen (pepř, kmín), listů (bobkový list), cibulí (česnek), kořenů (hořec) nebo z pryskyřic produkovaných některými rostlinami (myrhová silice).[1,16,17]

Obr. 2.2.1: *Běžně používané části rostlin na výrobu silic*[18]

Silice se vyrábí:[7,16]

- ✓ destilací vodní parou – ze semen, stonků, listů, dřeva, kořenů a pryskyřic
- ✓ extrakcí rozpouštědlem – z květů, mezi silice patří produkty extrahované z přírodního materiálu petroletherem nebo benzínem (silice konkrétní) a dále rafinované extrakcí lihem (silice absolutní)
- ✓ lisováním a následným oddělením vrstvy silice – z kůry citrusových plodů, získávají se velmi kvalitní silice hlavně při výrobě citrusových šťáv

Tab. 2.2.1: *Hlavní složky silic vybraných rostlin čeledi Hluchavkovité*[7,19]

Koření	**Latinský název**	**Hlavní složky silic**
Bazalka	*Ocimum basilicum*	estragol; linalool; 1,8-cineol; eugenol; izoeugenol; methyl-cinnamát; nerol; nerolidol; linalyl-acetát
Majoránka	*Origanum majorana*	terpinen-1-en-4-ol; thujenhydrát; 1,8-cineol; estragol; α-terpineol; eugenol
Máta	*Mentha piperita*	mentol; menton; menthyl-acetát; menthofuran; α-pinen; α-fellandren; β-kryofyllen
	Mentha spicata	karvon; limonen; dihydrokarvon; thujenhydrát; menton
Oregáno (dobromysl)	*Origanum vulgare*	karvakrol; thymol; *p*-cymen; karvakryl(metyl)ether; linalool; α-pinen; bornyl-acetát; kafr
Rozmarýna	*Rosmarinus officinalis*	1,8-cineol; α-pinen; kafr; kamfen; borneol; bornyl-acetát
Šalvěj	*Salvia officinalis*	kafr; 1,8-cineol; thujon; α-, β-pinen; bornyl-acetát; myrcen; borneol; linalyl-acetát; ocimen
Tymián	*Thymus vulgaris*	thymol; karvakrol; *p*-cymen; linalool; limonen; α-pinen; kamfen; terpinen; β-kryofyllen; geraniol; borneol
Levandule	*Levandula officialis*	linalyacetát; linalool; borneol; isoborneol; geraniol; cineol; kafr

- *Deterpenované silice (koncentráty)* – pro zvláště jemnou vůni i chuť, a také lepší rozpustnost silic ve zředěném ethanolu, se používají silice, které jsou z části nebo úplně zbaveny terpenických a seskviterpenických uhlovodíků. Vzniklé koncentráty jsou mnohonásobně vydatnější než výchozí produkty, stabilnější vůči oxidačním procesům a je v nich zachován původní senzorický charakter výchozí suroviny.[16]
  Deterpenované silice se vyrábí:[16]
  - ✓ destilací
  - ✓ extrakcí
  - ✓ adsorpcí
  - ✓ kombinacemi destilace a extrakce

- *Olejopryskyřice* – neboli oleoresiny, jsou extrakty z čerstvého koření nebo zeleniny získávané extrakcemi za pomoci:[7,16]
  - ✓ organických polárních rozpouštědel (methanol, ethanol, isopropylalkohol)
  - ✓ organických nepolárních rozpouštědel (hexan, petrolether, benzin)
  - ✓ oxidu uhličitého

  Olejopryskyřice nebo olejopryskyřice nanesené na vhodném nosiči (škrob, mouka), se používají jako suroviny pro výrobu potravinářských aromat nebo místo přírodního koření k ochucování potravin.[7,16]
  Příkladem olejopryskyřic jsou kakaová aromata, která jsou většinou přírodní a vznikají extrakcí kakaa ethylalkoholem nebo jiným povoleným rozpouštědlem.[11]

- *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.[16]
  - ✓ maceráty (nálevy) – vznikají extrakcí za normální teploty stáním s rozpouštědlem (macerace)
  - ✓ perkoláty – vznikají extrakcí za průtoku rozpouštědla (perkolace)
  - ✓ extrakce za vyšší teploty (digesce)
  - ✓ tinktura – lihový popřípadě vodný ektrakt (i jiná rozpouštědla) z jednoho druhu drogy

  Látky vyráběné za studena macerací nebo perkolací mají lepší organoleptické vlastnosti než extrakce za vyšších teplot.[7,16]

- *Ovocné a zeleninové šťávy 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. Příkladem zeleninových šťáv, které se u nás používají k aromatizaci nealkoholických nápojů, je šťáva celerová, šťáva z mrkve, zelí a rajských jablíček. Ovocné a zeleninové dřeně jsou základem pro výrobu ovocných, zeleninových a kořenitých pastovitých aromat.[16]

- *Destiláty* – patří mezi přírodní suroviny a uplatňují se především v méně vydatných aromatech na výrobu nealkoholických i alkoholických nápojů, cukrářských krémů, náplní apod. Příkladem jsou destiláty ananasové, jahodové, kakaové, malinové, rumové a višňové.[16]

2.2.2 Složení aromat

Vonné látky jsou poměrně silně vonící organické sloučeniny s charakteristickými, obvykle příjemnými vůněmi. Obsahují směsi jen těžko definovatelných látek. Jsou součástí aromatických přípravků, reakčních nebo kouřových aromatických přípravků, silic a oleoresinů získaných destilací či extrakcí různých přírodních materiálů. 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 (například aroma sýrové a masové). Taková aromata se používají do masných výrobků, polévek, pomazánek, kečupů, dressingů, tavených sýrů a do řady dalších potravinářských výrobků. Aromata s reakčními aromatickými přípravky (***kap. 2.1.3***), 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.[20,21]

Jako výchozí látky pro přípravu aromat se používají materiály, které lze rozdělit do tří skupin:[22]

- potraviny rostlinného či živočišného původu určené pro lidskou konzumaci
- suroviny rostlinného či živočišného původu, které se běžně jako potraviny nekonzumují
- látky syntetizované chemickými postupy

V současné době se aromatizace potravin, neboli přidávání aromatických látek či přípravků obsahujících aromatické látky, provádí v souladu s legislativními požadavky uvedenými v ***kap. 2.5***.[22]

V případě použití chemicky definovatelné látky, lze používat pouze látky uvedené v registru, respektive v Rozhodnutí komise 1999/217/EC, ve znění pozdějších předpisů. Registr obsahuje seznam chemicky definovaných látek, který je rozdělen do čtyř částí:[22]

I. část obsahuje látky definované registračním číslem CAS (*Chemical Abstracts Servise*)
II. část obsahuje látky definované pouze číslem CoE (*Council of Europe*)
III. část obsahuje abecední seznam látek, které nemají CAS ani CoE
IV. část obsahuje látky uvedené pouze pod číslem, bez uvedení názvu látky z důvodu ochrany duševního vlastnictví výrobce aromatické látky

Tento seznam obsahuje 2628 aromatických substancí. Pro účely hodnocení byly látky rozděleny do 34 skupin podle chemické příbuznosti (***kap. 2.2.2.1***).[22]

V případě použití částí rostlin nebo jejich extraktů (silic), lze používat kromě látek získaných z rostlinných materiálů považovaných za potraviny, pouze rostliny uvedené v příloze č.1 vyhlášky č.447/2004 Sb. Použití některých těchto rostlin je omezeno přítomností látek, jejichž množství v potravinách je limitováno vzhledem k tomu, že tyto látky mohou být ve vyšších koncentracích pro člověka toxické. Nejvyšší přípustná množství (NPM) těchto látek v jednotlivých druzích potravin uvádí příloha č.4 vyhlášky č.447/2004 Sb. Z potenciálně alergenních vonných látek mezi ně patří kumarin (***kap. 2.5, Tab. 2.5.1***).[9,22]

- *Kumarin* (CAS: 91-64-5) – patří mezi kumariny, kterých se v přírodě vyskytuje více než 600 druhů. Jsou obsaženy v řadě rostlin – skořicovník, mrkev obecná, vanilovník, koriandr, tabák, fíkovník smokvoň, citrusové ovoce a další.

Pro přípravu aromat se používají: mařinka vonná (synonymum svízel vonný), komonice lékařská, slivoň obecná, tomka vonná a tomka severní.[23,24]

2.2.2.1 Chemické skupiny látek určené k aromatizaci

Rozdělení aromatických látek do 34 skupin podle chemické příbuznosti:[22]

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-ethylakoholy, fenyloctové kyseliny, příbuzné estery, fenoxyoctové 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) Benzylakoholy/-aldehydy/-kyseliny/-estery/-acetaly. 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 alkoxysubstituentem 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.

2.2.3 Formy aromat

Aromata se vyrábějí v mnoha formách, přizpůsobují se tak technologii výroby potravin, které se aromatizují. Aroma se do produktu musí stejnoměrně rozptýlit a je ideální je přidávat až nakonec výroby. Čisté vonné látky, silice nebo olejopryskyřice se ředí na požadovanou koncentraci pomocí zdravotně nezávadných, inertních tekutých, práškovitých, gelovitých a dalších materiálů podle toho, v jaké formě má být aroma vyrobeno. Naopak některá přírodní aromata (šťávy, destiláty) mají málo vlastních aromatických látek, proto jsou k nim přidávány příslušné koncentráty a tak vznikají přírodní aromata uměle zesílená.[11]

Do potravin se nejčastěji přidávají aromata v těchto fyzikálních formách:[11,22]

- *kapalná aromata* – obsahují aromatickou složku a rozpouštědla, dále se kapalná aromata dělí na:
  - ✓ rozpustná v tucích
  - ✓ rozpustná ve vodě
- *emulzní aromata* – obsahují směsi aromatických složek, zapracovaných v emulzích typu olej ve vodě (O/V). Používají se nejčastěji při výrobě nealkoholických nápojů se zákalem nebo jako kořenité emulze k ochucení masných výrobků.

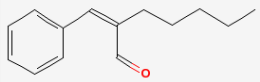
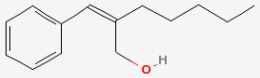
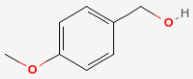
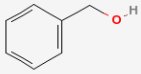
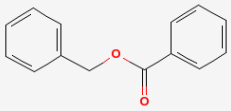
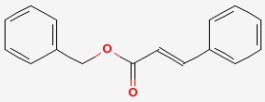
- *prášková* – koncentrované aroma je naneseno na povrchu suchého nosiče (sůl, škrob, sacharóza)
- *prášková zapouzdřená neboli enkapsulovaná (sprejově sušená)* – z vodné emulze polymeru (např. arabská guma), v níž je dispergováno kapalné aroma se ve sprejové sušárně rychle odpaří voda. Vzniknou drobné kapky aroma, které jsou zapouzdřené v mikrokapslích polymeru. Tato aromata jsou velmi stabilní a uplatňují se hlavně při výrobě dehydratovaných a instantních produktů (práškové nápoje, pudinky, polévky, omáčky). Aroma se uvolní až po přídavku vody a rozpuštění polymerního pouzdra.

2.3 Potenciálně alergenní vonné látky

V Evropě na vůně aktivně dohlíží Evropská komise (EC – *European Commission*).[25]

Vědecký výbor pro kosmetické produkty a nepotravinové produkty určené spotřebitelům EU (SCCPNFP – *Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products*), v současné době znám jako Vědecký výbor pro spotřební zboží (SCCP – *Scientific Committee on Consumer Products*), vydal zprávu o potenciálních alergenních substancích (PASs – *Potentially Allergenic Substance*) související s vůněmi (SCCPNFP, 1999). Příloha III Evropské kosmetické direktivy (direktiva 2003/15/EC) poté stanovila podmínky použití kosmetických produktů pro 26 vonných látek (***Tab. 2.3.1***) souvisejících se substancemi, které pravděpodobně způsobují alergické reakce. Kromě dvou výjimek, jsou všechny chemicky stanovené těkavé sloučeniny. Dvě látky jsou přírodní mechové extrakty, které nekorespondují se stanovenými chemikáliemi.[26]

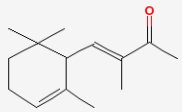
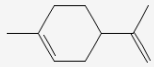
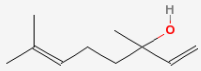
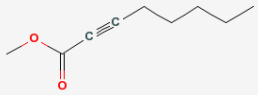
Tab. 2.3.1: *Seznam 26 potenciálních alergenních aromaticky aktivních látek*[20,26,27,28,29]

Název podle INCI	Číslo podle CAS	Struktura
Amyl cinnamal	[122-40-7]	
Amylcinnamyl alcohol	[101-85-9]	
Anise alcohol	[105-13-5]	
Benzyl alcohol	[100-51-6]	
Benzyl benzoate	[120-51-4]	
Benzyl cinnamate	[103-41-3]	

Tab. 2.3.1: *Seznam 26 potenciálních alergenních aromaticky aktivních látek*[20,26,27,28,29] *– pokračování*

Benzyl salicylate	[118-58-1]	
Butylphenyl methylpropional	[80-54-6]	
Cinnamal	[104-55-2]	
Cinnamyl alcohol	[104-54-1]	
Citral	[5392-40-5]	
Citronellol	[106-22-9]	
Coumarin	[91-64-5]	
Eugenol	[97-53-0]	
Farnesol	[106-28-5]	
Geraniol	[106-24-1]	
Hexyl cinnamal	[101-86-0]	
Hydroxycitronellal	[107-75-5]	
Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde	[31906-04-4]	
Isoeugenol	[97-54-1]	

Tab. 2.3.1: *Seznam 26 potenciálních alergenních aromaticky aktivních látek*[20,26,27,28,29] *– pokračování*

Alpha-isomethyl ionone	[127-51-5]	
Limonene	[5989-27-5]	
Linalool	[78-70-6]	
Methyl 2-octynoate	[111-12-6]	
Evernia prunastri extract	[90028-68-5]	Výtažek z větvičníku slívového, *Evernia prunastri* (Oakmoss extract)
Evernia furfuracea extract	[90028-67-4]	Výtažek z terčovky otrubičnaté, *Evernia furfuracea* (Treemoss extract)

2.3.1 Vlastnosti vybraných potenciálně alergenních vonných látek

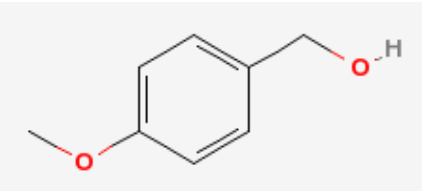
V této práci byly použity následující standardy alergenních vonných látek. Jejich důležité vlastnosti jsou popsány v následujících kapitolách.[7,16,29,30,31,32,33]

2.3.1.1 4-metoxybenzylalkohol (INCI: Anise alcohol)

- Alkohol (***Obr. 2.3.1***)
- Synonyma: anisyl alkohol; anýzalkohol; methoxybenzyl alkohol; benzenemethanol; 4-methoxybenzene methanol; p-anisol alkohol; p-methoxybenzyl; 4-methoxy(4-methoxyphenyl)methanol
- Sumární vzorec: $C_8H_{10}O_2$
- Výroba
  - ✓ redukcí anýzaldehydu
- Vlastnosti, aroma: bílá až nažloutlá kapalina nebo tuhá látka, květinová vůně; rozpustný v benzylalkoholu; nerozpustný v parafínových olejích a ve vodě
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; v přírodě jej obsahují anýzová semínka, med i vanilkové lusky; používá se do broskvových, fíkových, kakaových, vanilkových a jiných aromat

Tab. 2.3.2: *Fyzikální a chemické vlastnosti 4-metoxybenzylalkoholu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
138,16 $g \cdot mol^{-1}$	1,113 $g.cm^{-3}$	259 °C



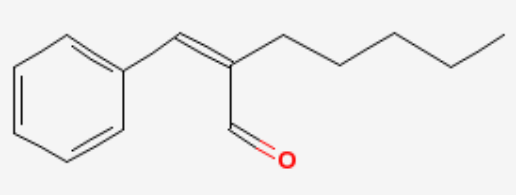
Obr. 2.3.1: *4-metoxybenzylalkohol*[29]

2.3.1.2 2-benzylidenheptanal (INCI: Amyl cinnamal)

- Aldehyd (***Obr. 2.3.2***)
- Synonyma: α-amylcinnamal; α-amylcinnamaldehyd; α-amylskořicový aldehyd; flomine; jasminaldehyde; 2-(phenylmethylene); jasminal; jasmínový aldehyd; 2-benzylidenheptanal; amylcinnamaldehyde; heptanal; mahonia; 2-pentylcinnam-aldehyde; α-pentyl skořicový aldehyd
- Sumární vzorec: $C_{14}H_{18}O$
- Výroba
  - ✓ kondenzací benzaldehydu s heptanalem
- Vlastnosti, aroma: viskózní žlutá, čirá kapalina, jasmínová až liliová vůně; rozpustný v ethanolu a v olejích
- Výskyt, použití: nelze nalézt v přírodě, je součástí řady syntetických esenciálních olejů, například syntetického jasmínového oleje; používá se do některých potravinářských aromat ke zlepšení nebo zvýraznění chuti

Tab. 2.3.3: *Fyzikální a chemické vlastnosti 2-benzylidenheptanalu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
202,29 $g \cdot mol^{-1}$	0,970 $g.cm^{-3}$	287 – 290 °C



Obr. 2.3.2: *2-benzylidenheptanal*[29]

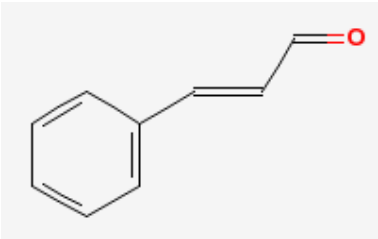
2.3.1.3 (E)-3-fenylpropenal (INCI: Cinnamal)

- Aldehyd (***Obr. 2.3.3***)
- Synonyma: cinnamaldehyde; cinnamic aldehyde; skořicový aldehyd; phenylacrolein; cassia aldehyde; 3-phenylpropenal; 3-phenylacrolein; zimtaldehyde; benzylideneacetaldehyde
- Sumární vzorec: C_9H_8O
- Výroba
  - ✓ syntetizován z benzaldehydu a acetaldehydu

- Vlastnosti, aroma: žlutá až nazelenalá kapalina, skořicová vůně i chuť; rozpustný v ethanolu a ve vodě, mísitelný s etherem a chloroformem
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; v přírodě je složkou skořicových silic i jiných silic např. pačulové a myrhové, a také mnoha etherických olejů, např. levandulového, hyacintového a dalších, obsahují jej i oleje z listů čajovníku a vinné révy; používá se především v potravinářském průmyslu do aromat a kořenících směsí

Tab. 2.3.4: *Fyzikální a chemické vlastnosti (E)-3-fenylpropenalu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
132,16 $g \cdot mol^{-1}$	1,048 $g.cm^{-3}$	248 °C



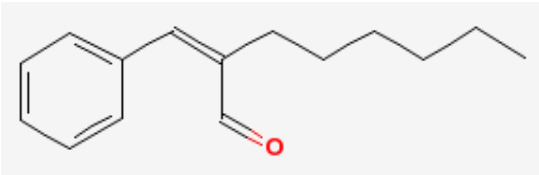
Obr. 2.3.3: *(E)-3-fenylpropenal*[29]

2.3.1.4 3-fenyl-2-hexylpropenal (INCI: Hexyl cinnamal)

- Aromatický nenasycený aldehyd (***Obr. 2.3.4***)
- Synonyma: α-hexylcinnamaldehyde; 2-benzylideneoktanal; hexyl cinnamic aldehyde; 2-hexylcinnamaldehyde; α-hexylskořicový aldehyd; 2-(phenyl-methylene); 2-hexyl-3-phenyl-2-propenal; octanal
- Sumární vzorec: $C_{15}H_{20}O$
- Výroba
  - ✓ kondenzací benzaldehydu s oktanalem; syntetický
- Vlastnosti, aroma: bezbarvá, čirá až nažloutlá kapalina, květinová, jasmínová vůně; rozpustný v ethanolu a ve vodě, mísitelný s etherem a chloroformem
- Výskyt, použití: přírodní aromatická látka, získávaná z rychle rostoucí liány (Čína, Indie); používaná převážně v kosmetice, ale také do aromat

Tab. 2.3.5: *Fyzikální a chemické vlastnosti 3-fenyl-2-hexylpropenalu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
216,33 $g \cdot mol^{-1}$	0,953 $g.cm^{-3}$	174 – 176 °C



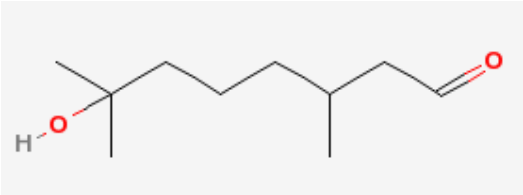
Obr. 2.3.4: *3-fenyl-2-hexylpropenal*[29]

2.3.1.5 7-hydroxycitronellal (INCI: Hydroxycitronellal)

- Aldehyd (***Obr. 2.3.5***)
- Synonyma: 7-hydroxydihydrocitronellal; citronellalhydrát; fixol; cyclosia; 3,7-dimethyl-7-hydroxyoktanal; majal; laurine; hydronal; phixia
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{20}O_2$
- Výroba
  - ✓ hydratací citronellalu
- Vlastnosti, aroma: bezbarvá viskózní kapalina; jemná, sladká konvalinková až liliová vůně
- Výskyt, použití: nelze nalézt v přírodě, syntetická vůně; do některých aromat například lípa, med

Tab. 2.3.6: *Fyzikální a chemické vlastnosti 7-hydroxycitronellalu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
172,26 $g \cdot mol^{-1}$	0,920 $g.cm^{-3}$	257 °C



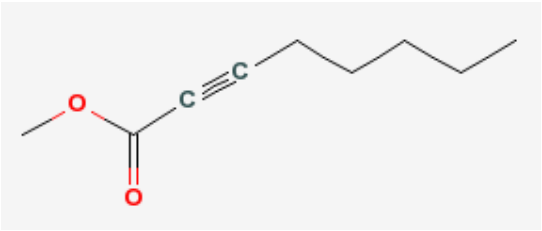
Obr. 2.3.5: *7-hydroxycitronellal*[29]

2.3.1.6 Methyl-okt-2-inoát (INCI: Methyl 2-octynoate)

- Ester (***Obr. 2.3.6***)
- Synonyma: methyl heptin karbonát; methyl heptine carbonate; methyl 2-oktynoát; methyl ester 2-octynoic acid; methyl 2-octinate; folione; 2-octynoic acid; methyl hept-1-yne-1-carboylate
- Sumární vzorec: $C_9H_{14}O_2$
- Vlastnosti, aroma: bezbarvá až nažloutlá kapalina, fialková vůně; rozpustný v alkoholu a v olejích; nerozpustný ve vodě a v glycerinu
- Výskyt, použití: v přírodě se nevyskytuje, jde tedy o synteticky vyrobenou látku; do některých aromat například víno, jahoda a jiné

Tab. 2.3.7: *Fyzikální a chemické vlastnosti methyl-okt-2-inoátu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
154,21 $g \cdot mol^{-1}$	0,924 $g.cm^{-3}$	217 – 220 °C



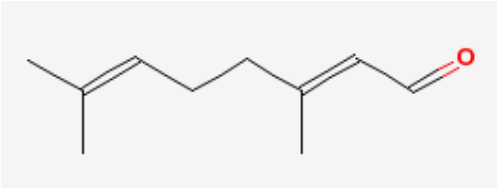
Obr. 2.3.6: *Methyl-okt-2-inoát*[29]

2.3.1.7 Citral (INCI: Citral)

- Alifatický nenasycený aldehyd (***Obr. 2.3.7***), vyskytuje se ve dvou izomerech (citral A – geranial; citral B – neral)
- Synonyma: citronal; citralone; 3,7-dimethylokta-2,6-dienal; geranial; geranal; geranialdehyde; neral; lemonal; lemarome
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{16}O$
- Výroba
  - ✓ izolací ze silic (např. z lemongrassové a litera cubeba)
  - ✓ synteticky – oxidací geraniolu nebo linaloolu, popřípadě z geranylchloridu přesmykem dehydrolinaloolu
- Vlastnosti, aroma: nažloutlá olejovitá kapalina, citrónová vůně, nahořklá chuť; dobře mísitelný s ethanolem a etherem; nerozpustný ve studené vodě
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; je vonnou složkou mnoha silic (např. silic citrusových plodů, zázvoru a pepře); používá se do potravinářských aromat, citrusových olejů, čajových směsí a do různých výrobků ke korekci zápachu

Tab. 2.3.8: *Fyzikální a chemické vlastnosti citralu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
152,24 $g \cdot mol^{-1}$	0,885 – 0,895 $g.cm^{-3}$	104 – 107 °C



Obr. 2.3.7: *Citral*[29]

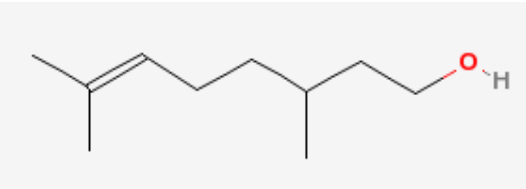
2.3.1.8 Citronelol (INCI: Citronellol)

- Alifatický nenasycený monoterpenický alkohol (***Obr. 2.3.8***)
- Synonyma: 3,7-dimethylokt-6-en-1-ol; rodinol; cefrol; 3,7-dimethyl-6-octen-1-ol; cephrol; dihydrogeraniol
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{20}O$

- Výroba
  - ✓ destilace listů rostlin
  - ✓ redukcí geraniolu, citralu nebo citronellalu
  - ✓ opticky aktivní se syntetizují z pinenu
- Vlastnosti, aroma: nažloutlá olejovitá kapalina, nasládlá výrazná vůně květů, růže; dobře mísitelný s ethanolem; nerozpustný ve vodě
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; je obsažen v mnoha přírodních rostlinných olejích (geraniový, růžový), v černém čaji a mnoha druzích ovoce (citrusy); potravinářská aromata, čajové směsi, ochucování nápojů

Tab. 2.3.9: *Fyzikální a chemické vlastnosti citronelolu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
156,27 $g \cdot mol^{-1}$	0,850 – 0,860 $g.cm^{-3}$	106 – 108 °C



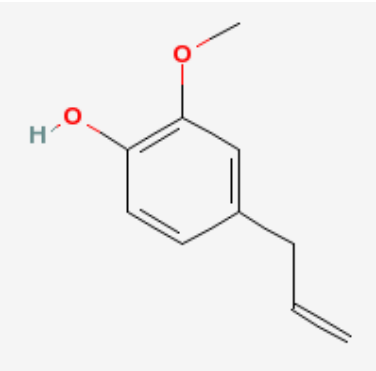
Obr. 2.3.8: *Citronelol*[29]

2.3.1.9 Eugenol (INCI: Eugenol)

- Alkylfenol (***Obr. 2.3.9***)
- Synonyma: 4-allyl-2-methoxyphenol; 1-hydroxy-2-methoxy-4-prop-2-enylbenzene; 4-allylguajacol; 2-methoxy-4-allylphenol
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{12}O_2$
- Výroba
  - ✓ alkalická extrakce nebo destilace hřebíčkové silice
  - ✓ synteticky – z guajakolu a allylchloridu nebo allylalkoholu
- Vlastnosti, aroma: bezbarvá kapalina hnědnoucí na vzduchu a na světle, hřebíčková a karafiátová vůně; má antiseptické a antibakteriální vlastnosti; rozpustný v ethanolu, chloroformu, etheru a v oleji; nerozpustný ve vodě
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; obsažen v muškátovém oříšku a hřebíčkové silici; používá se do kořenitých aromat

Tab. 2.3.10: *Fyzikální a chemické vlastnosti eugenolu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
164,21 $g \cdot mol^{-1}$	1,071 – 1,074 $g.cm^{-3}$	121 °C



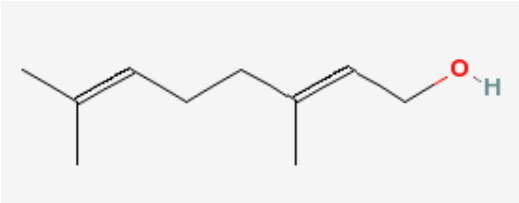
Obr. 2.3.9: *Eugenol*[29]

2.3.1.10 Geraniol (INCI: Geraniol)

- Alifatický nenasycený monoterpenový alkohol (***Obr. 2.3.10***)
- Synonyma: (E)-3,7-dimethylokta-2,6-dien-1-ol; 2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol; nerol; meranol; gerallol; lemonol
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{18}O$
- Výroba
  - ✓ izolací ze silic, například citronelové nebo palmorůžové
  - ✓ hydrogenací citralu
  - ✓ přesmykem linaloolu
  - ✓ synteticky z β-pinenu přes myrcen
- Vlastnosti, aroma: nažloutlá kapalina, vůně růží; rozpustný v alkoholu, etheru a ve většině organických rozpouštědel; nerozpustný ve vodě
- Výskyt, použití: obsažen v rostlinách (růže, jasmín, levandule); syntetický nebo přírodní; potravinářská aromata – jablko, broskev, meruňka

Tab. 2.3.11: *Fyzikální a chemické vlastnosti geraniolu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
154,25 $g \cdot mol^{-1}$	0,871 – 0,886 $g.cm^{-3}$	110 – 111 °C



Obr. 2.3.10: *Geraniol*[29]

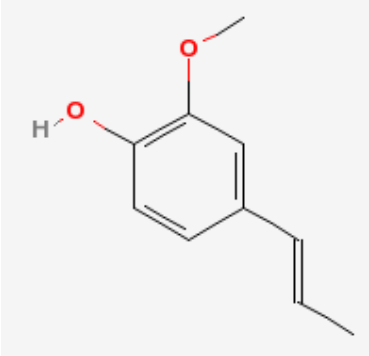
2.3.1.11 Izoeugenol (INCI: Isoeugenol)

- Alkylfenol (***Obr. 2.3.11***)
- Synonyma: 2-methoxy-4-propenylfenol; 4-hydroxy-3-methoxy-propenylbenzene; 4-propenylguajacol
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{12}O_2$

- Výroba
  - ✓ z guajakolu přes 4-hydroxy-3-methoxypropiofenon přímo na isoeugenol
  - ✓ přesmykem eugenolu, popřípadě safrolu
- Vlastnosti, aroma: žlutá olejovitá kapalina, karafiátová vůně; rozpustný v organických rozpouštědlech; slabě rozpustný ve vodě
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní, v přírodě se vyskytuje v cis-formě v karafiátové silici a trans-formě v bazalkové silici, je obsažen v mnoha rostlinách a esenciálních olejích (např. hřebíčkový olej); používá se do různých výrobků ke korekci vůně, aromatizovaných čajů, kořenících směsí

Tab. 2.3.12: *Fyzikální a chemické vlastnosti izoeugenolu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
164,21 $g \cdot mol^{-1}$	1,087 – 1,091 $g.cm^{-3}$	130 – 132 °C



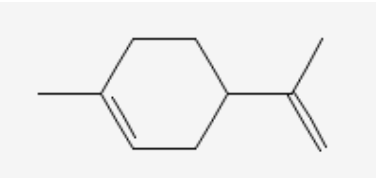
Obr. 2.3.11: *Izoeugenol*[29]

2.3.1.12 D-limonen (INCI: Limonene)

- Terpenický uhlovodík (***Obr. 2.3.12***)
- Synonyma: (R)-1-metyl-4-(1-metyletenyl)cyklohexen; dipentene; carvene; cajeputen
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{16}$
- Výroba
  - ✓ izolací z citrusových terpenů
- Vlastnosti, aroma: bezbarvá kapalina, citrusové vůně; na vzduchu se snadno oxiduje a získává nepříjemnou až kmínovou vůni; rozpustný v diethyletheru a v ethanolu; nerozpustný ve studené i horké vodě a v propylen glykolu
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; v přírodě se vyskytuje především opticky aktivní, racemická směs se nazývá dipenten; obsahují jej citróny, limetky, pomeranče a další citrusové plody; používá se do aromat a k výrobě syntetických vonných látek

Tab. 2.3.13: *Fyzikální a chemické vlastnosti D-limonenu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
136,23 $g \cdot mol^{-1}$	0,840 – 0,850 $g.cm^{-3}$	71 °C



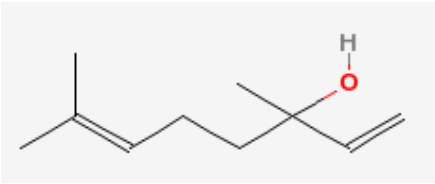
Obr. 2.3.12: *D-limonen*[29]

2.3.1.13 Linalol (INCI: Linalool)

- Alifatický nenasycený monoterpenický alkohol (***Obr. 2.3.13***)
- Synonyma: 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol; likareol; 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol; linalyl alkohol; linalodor; phantol; koriandrol
- Sumární vzorec: $C_{10}H_{18}O$
- Výroba
  - ✓ izolací ze silic
  - ✓ parciální hydrogenací dihydrolinaloolu
  - ✓ popřípadě z myrcenu přes acetát
- Vlastnosti, aroma: bezbarvá až světle žlutá kapalina, květinové (konvalinkové) vůně; rozpustný v olejích, propylen glykolu a parafínovém oleji, nerozpustný ve vodě a glycerinu
- Výskyt, použití: syntetický nebo přírodní; v přírodě je obsažen v mnoha silicích např. v koriandrové silici; vyskytuje se v jablečné, mandarinkové a v pomerančové šťávě, v meruňkách, broskvích, jahodách, majoránce, tymiánu, levanduli a dalších surovinách; používá se do svěžích aromat

Tab. 2.3.14: *Fyzikální a chemické vlastnosti linalolu*

Mol. hmotnost	Hustota ρ	Teplota varu
154,25 $g \cdot mol^{-1}$	0,858 – 0,870 $g.cm^{-3}$	85 °C



Obr. 2.3.13: *Linalol*[29]

2.4 Biologické účinky aromat

Hodnocením bezpečnosti aromatických látek v potravinách se zabývá v současné době Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA – *European Food Safety Autority*).[22]

Součástí hodnocení bezpečnosti aromatických látek je odhad expozice. Pracovní skupina pro aromatické látky při Evropské komisi (EK) použila prvně metodu MSDI (*Maximized Survey-Derived Daily Intake*). Tato metoda však ignoruje skutečné užití aromat v praxi, protože vychází se sumy vyrobeného množství látek. Proto se začala používat metoda známá pod zkratkou TAMDI (*Theoretical Added Maximum Daily Intake*), která vychází z hodnot nejvyšších použitých hladin aromatických látek v potravinách, vynásobených množstvím spotřebované potraviny za den člověkem (průměrná tělesná hmotnost 60 kg). Po vyzkoušení tohoto modelu na různých látkách, byly získané hodnoty až nereálně vysoké. Metoda se tedy modifikovala tak, že nejvyšší hladiny aromatických látek použitých pro jednotlivé kategorie potravin byly nahrazeny hodnotami 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 aromatických látek EFSA.[22,34]

Prakticky všechny aromatické látky jsou biologicky aktivní a měly by působit na čichové a chuťové ústrojí v optimální koncentraci. Poté je žádaná odezva registrována jako příjemná. Pokud je koncentrace vysoká, například u látky furylmethanthiol (α-furfurylmerkaptan), vyvolá při čichnutí dojem silného zápachu. Po zředění na 1 : 200 000, připomíná tato látka čerstvě praženou kávu. Menthol vdechnutý ve vysoké koncentraci vyvolá dráždivý až palčivý pocit, zředěním je získána osvěžující vůně. Existují i látky, které mají v různých koncentracích různou vůni. Známými vlastnostmi vonných látek jsou také schopnosti působit i na další smysly. Příkladem je kafr, menthol nebo methylacetát působící na hmat. Po nanesení na pokožku vyvolávají pocit chladu a znecitlivění. Pocit tepla způsobuje například fenylethylalkohol či fenchon.[10,11,16]

2.4.1 Pozitivní účinky aromat

Aromatické rostliny patří do skupiny LAKR (Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny), která je velmi rozmanitá. Jeden druh může být zároveň aromatickou i léčivou rostlinou. LAKR se pěstuje celosvětově a nalézá uplatnění v odvětví farmaceutickém, kosmetickém, ale především v potravinářském a likérnickém průmyslu jako součást potravin, nápojů, likérů a vín. Také ve vědecké a lidové medicíně.[14, 35]

Aromaticky aktivní látky, které jsou používány v aromatech v dávkách přicházejících v úvahu, působí na člověka vesměs příznivě. Zvláště silice vykazují řadu blahodárných účinků, používají se i jako léčiva, složky farmaceutických výrobků nebo potravinářská aditiva.[7,11]

Příklady pozitivních účinků vonných látek:

- *Podpora trávení* – aromatické a hořké látky obsažené v rostlinách, podporují chuť k jídlu, stimulují činnost gastrointestinálního traktu a vylučování trávících šťáv. Proto jsou přidávány do žaludečních likérů, aperitivů a likérových kořeněných vín. Mezi běžně používané drogy patří bazalka, oregáno, máta, majoránka a další.[19]

- *Antimikrobiální a antifungální účinky* – těkavé látky mohou chránit sacharidy bohaté na nektar a inhibovat mikrobiální růst. Vykazují aktivitu nejen proti mikroorganismům, ale také proti býložravcům, chrání cenné reprodukční části rostlin. Například monoterpenol S-linalool a jeho deriváty významně odradily zemědělské škůdce (mšice *Myzus persicae*).[12]
  Většina silic ničí choroboplodné mikroorganismy. Biologická aktivita silic některých rostlin ukázala vlastnosti antimikrobiální, antimykotické a insekticidní. Ze základních aromaticky aktivních látek působí antisepticky především aldehydy, jako citral, vanilin a další, dále z fenolů především eugenol a thymol, a také alkoholy jako linalool, geraniol a terpinol. Například tymiánová silice působí proti *Escherichia coli* a česneková silice, pokud je čerstvá, obsahuje allicin, který se řadí mezi fytoncidy. Dalším příkladem je lemongrassová silice, která má mimořádné účinky proti mikroorganismům *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* . Hlavní složkou lemongrassové silice je monoterpen citral (65 – 85 %), u kterého byla zjištěna silná antifungální aktivita proti kvasinkám druhu *Candida* spp. Tato silice byla tedy prokázána jako potenciální antimykotikum.[10,16,33,36]

Tab. 2.4.1: *Inhibiční efekt vybraných rostlin na mikroorganismy*[36,37,38]

Název		**Obsahové látky**	**Inhibované mikroorganismy**
česky	**latinsky**		
Bazalka (nať)	*Ocimum basilicum*	linalool, methylchavikol, eugenol, methyl-cinnamát	*Bacillus: pumilus, anthraces; Microsporum gypsecum; Aspergillus: fumigatus, nigar; Enterbacter aerogenas; Proteus vulgaris; Staphylococcus aureus; Shigella: sonnei, flexneri*
Oregáno (nať)	*Origanum vulgare*	thymol, karvakrol	*Aspergillus (toxinogenní kmeny); Salmonella spp.; Vibrio parahaemolyticus; Shigella: sonnei, flexneri; Salmonella enterica; Listeria monocytogenes; Escherichia coli*
Rozmarýna (nať)	*Rosmarimus officinalis*	karnosol, silice, borneol, rosmanol, bornyl-acetát	*Bacillus cereus; Staphylococcus aureus; Vibrio parahaemolyticus; Shigella: sonnei, flexneri*
Šalvěj (nať)	*Salvia officinalis*	thymol, eugenol	*Bacillus cereus; Staphylococcus aureus; Vibrio parahaemolyticus*
Šišák (kořen)	*Scutellaria albida*	linalool	*Staphylococcus aureus; Bacillus subtilis; Escherichia coli; Pseudomonas aeruginosa*

- *Analgetické účinky* – mezi aromatické látky potlačující bolest patří např. amylsalicylát, kafr, fenchon, heřmánková či peprnomátová silice, terpinol a další.[10]

- *Antioxidační účinky* – silice z mnoha druhů koření vykazují antioxidační účinky, např. silice majoránková, šalvějová a tymiánová. Používají se jako přírodní antioxidanty tuků.[10]

- Jedním z mnoha příkladů je i příznivý účinek anetholu (součást anýzové a fenyklové silice) v tradičních bonbónech nazývaných „Hašlerky“.[11]

2.4.2 Negativní účinky aromat

Podle Evropské kosmetické direktivy existuje 26 potenciálně alergenních aromaticky aktivních látek (***Tab. 2.3.1***), jejíž používání v kosmetických přípravcích je dáno legislativou. Většina z nich je součástí i potravinářských aromat, přidávání do potravin však legislativně ošetřeno není (výjimkou je kumarin, ***Tab. 2.5.1***).[9,26]

- *Alergie a nesnášenlivost* – potravinová přecitlivělost se dělí na potravinovou alergii a nealergickou potravinovou nesnášenlivost (intolerance). Potravinové alergie zahrnují abnormální imunitní reakci na antigen (nejčastěji bílkovinná povaha), zatímco nesnášenlivost určitých typů potravin nezahrnují reakci imunitního systému. Potravinová alergie je však známa přibližně u 1 – 2 % dospělých jedinců.[39,40]
  Pojem alergie označuje nepřiměřenou reakci imunitního systému organismu na látky běžně se vyskytující v prostředí. Látky vyvolávající alergii se nazývají alergeny (např. prach, pyl, potraviny, léky a spousta dalších).[19,39]
  Vůně jsou vyráběny z četných přírodních i syntetických zdrojů, které mohou obsahovat alergenní komponenty. Proto je na výběr surovin kladen důraz, zvlášť pokud jsou vůně vyprodukované ze zdrojů potravin obsahujících alergeny (např. sója).
  Dále mohou vonné látky obsahovat proteiny, většinou jen malé těkavé organické molekuly, které představují potenciální nebezpečí pro vnímavé jedince. Při výrobních operacích, jako jsou destilace či extrakce, je přítomnost proteinů významně redukována. Nesnášenlivost potravin ovlivňuje limitovaný počet jedinců a většinou ji způsobují jiné látky než proteiny. Mnoho vonných substancí z potravin spontánně mizí, jiné tvoří jen okolo 1 % potravinářského výrobku.[40]
  Bezpečnostní opatření pro vonné látky, jako potenciální alergeny, se tedy zaměřují především na původ a chemické složení surovin, způsob výroby a stanovení nejvyššího přípustného množství látky (NPM) určené ke konzumaci.[40]

  - ✓ *Kontaktní alergická dermatitida (cheilitida)* – infekční zánět rtu může způsobovat geraniol obsažený ve zmrzlině, bonbonech či žvýkačkách.[41]

  - ✓ *Hematogenní kontaktní alergická dermatitida* – je vyvolávána u osob přecitlivělých na cinnamáty. Jedná se především o skořicový alkohol, skořicový aldehyd, isoeugenol, eugenol, hydroxycitronellal, geraniol a další. Obsaženy jsou v aromatizovaných čajích, zmrzlinách, žvýkačkách, bonbonech, cukrářských výrobcích a kořenících směsích.[42]
    Dalšími vonnými látkami způsobujícími hematogenní kontaktní alergickou dermatitidu jsou komponenty peruánského balzámu, jako benzylestery benzoových a skořicových kyselin a vanilin. Jsou získávány ze stromu *Myroxylon pereirae*, který roste ve střední a jižní Americe. Tyto komponenty jsou obsaženy také ve slupkách z citrusových plodů, aromatizovaném pečivu, cukrářských výrobcích, v koření (vanilka, skořice, hřebíček), žvýkačkách, bonbonech a ve spoustě dalších potravin.[42]

  - ✓ Požitím látek z peruánského balzámu může dojít i k jiným zdravotním problémům, jako je svědění kůže, prchavý erytém, kopřivka nebo oživení již odhojených ložisek kontaktní alergické dermatitidy.[42,43]

Příklady jiných negativních účinků vonných látek:

- *Toxické účinky* – některé rostlinné materiály mohou obsahovat toxické látky, používání těchto látek do aromat je limitováno (***kap. 2.5***). Je to například agaricinová kyselina, aloin, β-asaron, berberin, hypericin, kumarin, kyselina kyanovodíková, pulegon, safrol, santonin, thujon a další. Pulegon se nachází v silicích různých druhů máty. Tyto rostliny se používají například proti nadýmání, uvolňování křečí a k aromatizaci potravin.[7,9,22]
  Seskviterpenický hořký santonin se vyskytuje v kvetoucí nati pelyňků a dalších silicích. Intoxikace santoninem se projevuje bolestmi hlavy, poruchami sluchu, respiračním a kardiovaskulárním kolapsem a dalšími příznaky. Centrální nervový systém je santoninem stimulován křečemi, závratěmi a případně halucinacemi a blouzněním.[7,22]

- *Chronická neurotoxicita* – bicyklické monoterpeny α-thujon a β-thujon jsou složkami silic různých pelyňků, také silice šalvějové, thujové, řebříčkové a dalších. Používají se jako léčivé byliny, pro aromatizaci potravin a k hořčení alkoholických nápojů (pelyněk pro Absint). Kontakt pokožky se silicí obsahující thujon může způsobit její podráždění, svědění až ekzémy. Po požití mohou vznikat zdravotní problémy doprovázené zvracením, průjmem až degenerativními změnami na játrech a ledvinách. Vykazují chronickou toxicitu, která způsobuje halucinace, hyperexcitabilitu a může vést až k poškození mozkové kůry. Tyto projevy jsou nazývány absinthismem. Současní výrobci tvrdí, že tuto látku dokáží z absintu technologicky odstranit. Oba thujony jsou v alkoholických nápojích i potravinách regulovány příslušnými předpisy.[7,10,22,24]

- *Karcinogenní účinky* – vykazují některé substituované alkenylbenzeny, např. safrol, isosafrol, estragol, methyleugenol a myristicin. Podezřelý z karcinogenity je β-asaron, který je obsažen v puškvorci obecném.[7,10,24]

- *Hepatotoxické účinky (poškozující játra)* – způsobuje kumarin, má hemoragický efekt, který způsobuje hematurii (přítomnost červených krvinek v moči). Dochází k blokaci protrombinu a dalších hemokoagulačních faktorů v játrech, z důvodu antagonistického působení kumarinu k vitamínu K.[7,24]
  V poslední době se Evropská komise (EK) zabývá obsahem kumarinu v různých druzích potravin obsahujících skořici, v nichž byla zjištěna množství kumarinu několikanásobně vyšší, než povolená množství stanovená evropskými předpisy. Zástupci členských států EU se dohodli, že se stanoví nový limit, který bude zohledňovat riziko pro spotřebitele, vycházející z toxicity a podezření na karcinogenitu kumarinu. Zejména je nezbytné upravit limit u potravin konzumovaných dětmi (např. rýžová kaše s příchutí skořice).[22]

Škodlivý vliv některých vonných látek lze významně utlumit jinými vonnými látkami. Například takovými, které mají povzbuzující nebo bolesti tlumící účinky. Lze použít některé terpeny jako jsou čisté pineny.[10]

2.5 Přehled platné legislativy

V České republice je rozhodující Zákon č.110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích, v platném znění.[11,44]

V současné době platí tyto předpisy týkající se používání a hodnocení aromatických látek:[9,22]

- 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 (zapracovává směrnice EU 88/388/EHS a 91/71/EHS).
  - ✓ K aromatizaci potravin lze používat pouze rostliny uvedené v příloze č.1 vyhlášky č.447/2004 Sb., kromě látek získaných z rostlinných materiálů považovaných za potraviny.
  - ✓ Jak bylo uvedeno v ***kap. 2.2.2***, použití některých těchto rostlin je omezeno přítomností látek, které mohou být ve vyšších koncentracích pro člověka toxické, ty uvádí příloha č.4 vyhlášky č.447/2004 Sb. (např. kumarin, ***Tab. 2.5.1***).

Tab. 2.5.1: *Nejvyšší přípustné množství kumarinu v jednotlivých druzích potravin*[9]

Látka	**Potravina**	**NPM** $mg.kg^{-1}$, **resp.** $mg.l^{-1}$
Kumarin	nápoje	2
	karamelové cukrovinky	10
	alkoholické nápoje	10
	žvýkačka	50
	ostatní potraviny	2

  - ✓ Látky povolené k aromatizaci potravin určených pro kojeneckou a dětskou výživu jsou uvedené v příloze č.3 vyhlášky č.447/2004 Sb. K ochucování mléčné výživy, pro kojence od ukončeného čtvrtého měsíce věku, se smějí používat látky uvedené v ***Tab. 2.5.2***. K ochucování příkrmů pro výživu určenou pro kojence a malé děti se smějí používat látky uvedené v ***Tab. 2.5.3***. Nejvyšší povolená množství (NPM) jsou stanovena pro potraviny upravené k požívání podle návodu výrobce, pokud takovou úpravu vyžadují.

Tab. 2.5.2: *Nejvyšší přípustné množství látek, používaných k ochucování mléčné výživy, pro kojence od ukončeného čtvrtého měsíce věku*[9]

Látka	**NPM** $mg.kg^{-1}$, **resp.** $mg.l^{-1}$
Extrakt z plodů vanilky	nezbytné množství (NM)
Vanilin	50
Ethylvanilin	50

Tab. 2.5.3: *Nejvyšší přípustné množství látek, používaných k ochucování příkrmů pro výživu určenou pro kojence a malé děti*[9]

Látka	**NPM** **mg.kg^{-1}, resp. mg.l^{-1}**
Extrakt z plodů vanilky	nezbytné množství (NM)
Extrakt z ovoce	nezbytné množství (NM)
Vanilin	70
Ethylvanilin	70

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č.2065/2003 o kouřových aromatických přípravcích používaných nebo určených k použití v potravinách nebo na jejich povrchu.
- Nařízení Komise (Evropské společenství – ES) č.622/2002, kterým se stanoví lhůty pro předložení informací pro hodnocení chemicky definovaných látek určených k aromatizaci používaných nebo určených k použití v potravinách nebo na jejich povrchu.
- Nařízení Komise (ES) č.1565/2000 kterým se stanoví opatření nezbytná pro přijetí programu hodnocení podle nařízení Evropského parlamentu a Rady č.2232/96. Nařízení uvádí pravidla, postupy a lhůty při vyhodnocování aromatických látek, rozděluje všechny látky do skupin podle jejich chemické příbuznosti, stanoví požadavky na informace o každé aromatické látce, která má být vyhodnocena.
- Rozhodnutí Evropské komise (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.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č.2232/96 kterým se stanoví postup Společenství pro látky určené k aromatizaci, používané nebo určené k používání v potravinách nebo na jejich povrchu.

V nejbližší budoucnosti vejde v platnost nařízení Evropského parlamentu a Rady o látkách určených k aromatizaci a některých složkách potravin vyznačující se aromatem pro použití v potravinách nebo na jejich povrchu a o změně nařízení Rady (Evropské hospodářské společenství – EHS) č.1601/91, nařízení Evropského společenství (ES) č.2232/96 a směrnice EHS č.1576/89, nařízení Rady (EHS) č.1601/91, nařízení Evropského společenství (ES) č.2232/96 a směrnice 2000/13/ES.[22]

2.6 Možnosti stanovení aromatických látek v potravinách

Stanovení aromaticky aktivních látek je složeno ze dvou základních fází:[4,6,16]

- ✓ izolační – cílem této fáze je získat reprezentativní těkavé složky, záleží na těkavosti a rozpustnosti vonných složek
- ✓ detekční – vhodné instrumentální zařízení (separace a identifikace látek ze směsí)

Ke správnému výběru izolační techniky je třeba si přesně stanovit cíle studia, jako například získat „kompletní“ aromatický profil, identifikovat jen klíčové komponenty vůně, identifikovat přípachy potravinářského výrobku nebo charakterizovat změny vůně v čase atd. Každý z těchto cílů vyžaduje specifickou metodologii.[6]

Přehled metod využívaných pro stanovení aromatických látek v potravinách:

- **GC-MS** (*gas chromatography-mass spectrometry*) – plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem, používá se pro analýzu potravin, toxikologických přípravků a při objektivním hodnocení chutí a vůní, například stanovení:
  - ✓ změn aroma v brandy z hrušek, která byla ovlivněná slunečním zářením[45]
  - ✓ citralu a geraniolu v lemongrassové silici[33]

- **HS-SPME/GC-MS** (*headspace-solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry*) – headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ jablkách – estery, terpenoidy[46]
  - ✓ banánech[47]
  - ✓ ovoci (maliny, jahody, ostružiny, banány, mango) – alkoholy, estery a terpenoidy[48]
  - ✓ tropické ovoce (cupuassu, cajá, siriguela, graviola) – alkoholy, estery, terpenoidy[49]
  - ✓ čerstvém čili[50]
  - ✓ rajčatech[51]
  - ✓ olivovém oleji – alkoholy, aldehydy, estery, ketony[52,53]
  - ✓ rostlinný olej – kyseliny, alkoholy, aldehydy[54]
  - ✓ másle – kyseliny, alkoholy, aldehydy, estery a ketony[55]
  - ✓ rajčatovém džuse – alkoholy, aldehydy, ketony, fenoly, terpenoidy a další[56]
  - ✓ letitém šumivém víně Cava[57]
  - ✓ medech – alkoholy, aldehydy, furany, uhlovodíky, ketony, terpenoidy a další[58]
  - ✓ hořčičné pastě[59]

- **HS-SPME/GC-FID** (*headspace-solid-phase microextraction/gas chromatography-flame ionization detector*) – headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ banánech[47]
  - ✓ ovoci (maliny, jahody, ostružiny, banány, mango) – alkoholy, estery a terpenoidy[48]
  - ✓ olivovém oleji – alkoholy, aldehydy, estery, ketony[52,53]

- **HS-SPME/GC/GC-FID** (*headspace-solid-phase microextraction/two-dimensional gas chromatography-flame ionization detector*) headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s dvourozměrnou plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ jahodách – aldehydy a estery[60]

- **HS-SPME/GC-O** (*headspace-solid-phase microextraction/gas chromatography-olfactometric analysis detector*) – headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií-olfaktometrií, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ banánech[47]

- **DHS/GC-FID** (*dynamic headspace/gas chromatography-flame ionization detector*) – dynamická headspace ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky ve:
  - ✓ fíkách – alkoholy, aldehydy, estery, uhlovodíky a terpenoidy[61]
  - ✓ broskvích a nektarinkách – alkoholy, estery, laktony[62]
  - ✓ olivovém oleji – alkoholy, aldehydy, estery, ketony[52]

- **DHS/GC-MS** (*dynamic headspace/gas chromatography-mass spectrometry*) – dynamická headspace ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky ve:
  - ✓ fíkách – alkoholy, aldehydy, estery, uhlovodíky a terpenoidy[61]
  - ✓ broskvích a nektarinkách – alkoholy, estery, laktony[62]
  - ✓ másle – kyseliny, alkoholy, aldehydy, estery a ketony[55]

- **SDE/GC-MS** (*simultaneous distillation extraction/gas chromatography-mass spectrometry*) – simultánní destilační extrakce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ červené paprice – alkoholy, aldehydy, deriváty benzenu, estery, uhlovodíky, ketony, terpeny a další[63]
  - ✓ letitém šumivém víně Cava[57]
  - ✓ černém čaji – alkoholy, aldehydy, terpenoidy[64]
  - ✓ hořčičné pastě[59]
  - ✓ čajích – kyseliny, alkoholy, aldehydy, estery, terpenoidy[65]

- **SDE/GC-FID** (*simultaneous distillation extraction/gas chromatography-flame ionization detector*) – simultánní destilační extrakce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ čajích – kyseliny, alkoholy, aldehydy, estery, terpenoidy[65]

- **TD/GC-MS** (*thermal desorption/gas chromatography-mass spectrometry*) – tepelná desorpce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ olivovém oleji – alkoholy, aldehydy, estery, ketony[52]

- **DI/GC-FID** (*direct injection/gas chromatography-flame ionization detector*) – přímý nástřik/plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem, touto metodou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ hroznovém destilátu „Orujo“ – alkoholy, aldehydy, estery[66]

- **DI/GC-MS** (*direct injection/gas chromatography-mass spectrometry*) – přímý nástřik/plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem, touto metodou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ hroznovém destilátu „Orujo“ – alkoholy, aldehydy, estery[66]

- **CLSA/GC-MS** (*closed-loop stripping analysis/gas chromatography-mass spectrometry*) – „closed-loop stripping“ analýza ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ šumivém víně[57,67]

- **LLE/GC-MS** (*liquid-liquid extraction/gas chromatography-mass spectrometry*) – extrakce kapalina-kapalina ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ citrónových likérech (Limoncello) – terpenoidy a další[68,69]

- **LLE/GC-FID** (*liquid-liquid extraction/gas chromatography-flame ionization detector*) – extrakce kapalina-kapalina ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem, kterou byly stanovovány vybrané aromaticky aktivní látky v:
  - ✓ citrónových likérech (Limoncello) – terpenoidy[68]

- **Elektronický nos** (*electronic nose*), kterým byly stanovovány vonné látky v:
  - ✓ rajčatech[51]
  - ✓ rostlinný olej – kyseliny, alkoholy, aldehydy[54]

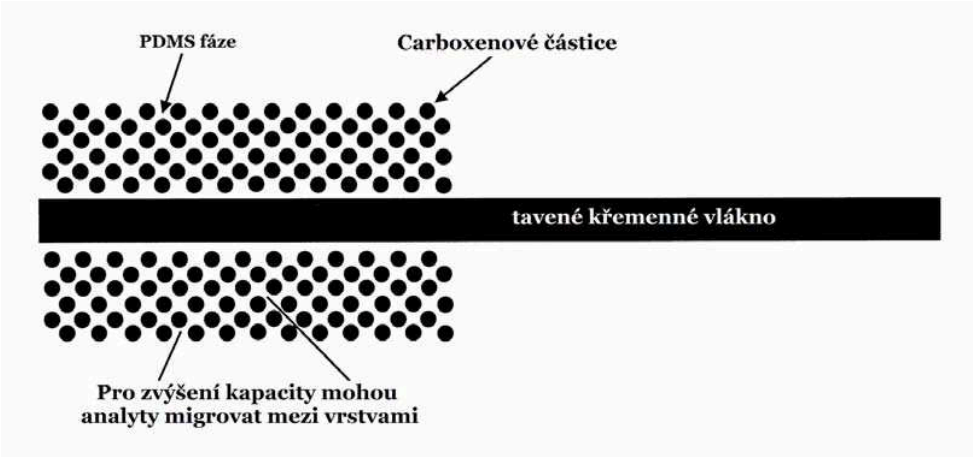
2.7 Stanovení potenciálně alergenních aromatických aktivních látek

2.7.1 Mikroextrakce tuhou fází

Ke stanovení aromaticky aktivních látek je především vhodná mikroextrakce tuhou fází (SPME – *Solid phase microextraction*), což je jednoduchá, relativně rychlá a účinná sorpčně/desorpční technika zakoncentrování a izolace analytu. Nevyžaduje rozpouštědlo ani komplikovanou aparaturu (***Příloha XII***).[5,70,71,72,73]

Úspěšné použití SPME je závislé na správné volbě a vhodnosti vlákna. V současné době existuje několik typů vláken, které se používají k extrakci analytů. Principem afinity vlákna k analytu je teorie: „podobné látky rozpouštějí podobné“, tzn., že polární sloučeniny se sorbují na polární vlákna a nepolární sloučeniny na nepolární vlákna. Povrchy vláken mají různé vlastnosti i tloušťku a vybírají se podle zkoumaného analytu. Obecně platí, že těkavé látky vyžadují silnější vrstvu polymeru a pro středně těkavé analyty je účinnější slabší vrstva.[71,72,74,75,76]

Na extrakci těkavých aromaticky aktivních látek se nejčastěji používá SPME vlákno Carboxen/Polydimethylsiloxan (CAR™/PDMS) o tloušťce 85 μm (***Obr. 2.7.1***). SPME jednotka je tvořena křemenným vláknem pokrytým sorpční vrstvou. Vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle, která chrání vlákno před mechanickým poškozením.[71,77,78,79,80]



Obr. 2.7.1: *Detailní pohled na Carboxen – PDMS vlákno*[70]

Samotná analýza je složena ze dvou fází:[70,71,72,,74]

1. Sorpční – vsunutí vlákna do vzorku (headspace prostoru), analyty se sorbují do vrstvy pokrývající vlákno dokud nedojde k distribuční rovnováze mezi matricí vzorku a adsorpční vrstvou vlákna.
2. Desorpční – vlákno s analyty je přeneseno do analytického zařízení, v kterém proběhne desorpce, separace a kvantifikace analytů.
   Je nezbytné kompletně desorbovat vlákno mezi jednotlivými analýzami, protože by mohlo docházet k přenosu analytů do další analýzy (*carry over effect*).

Účinná extrakce a následná desorpce z SPME vlákna závisí na:[71]

- ✓ molekulové hmotnosti a tvaru molekuly
- ✓ bodu varu a tenzi par
- ✓ polaritě analytu a vlákna
- ✓ funkčních skupinách v molekule analytu

Typy extrakcí při analýze pomocí SPME:[70,81]

- ✓ přímá extrakce (*direct extraction*) – vlákno je umístěno do vzorku
- ✓ extrakce v headspace (*headspace mode*) – vlákno je umístěno do prostoru nad vzorkem
- ✓ extrakce membránově chráněná (*membrane protected mode*) – vzorek je od extrakční fáze oddělen membránou, pro velmi znečištěné vzorky

2.7.2 Plynová chromatografie

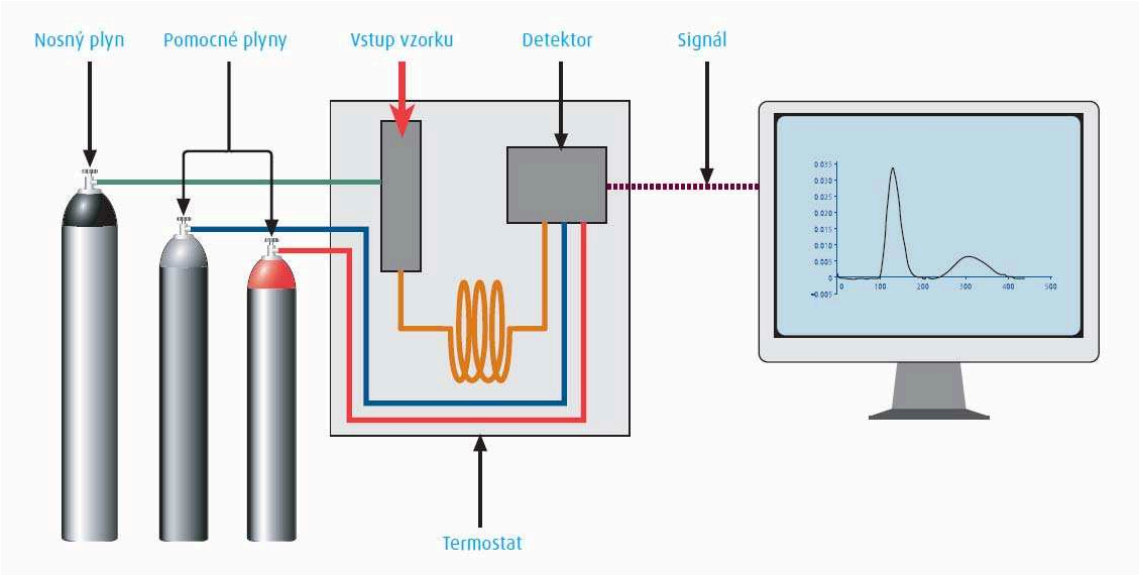
Plynová chromatografie (GC – *Gas chromatography*) je separační metoda, při níž dochází k distribuci plynů a par separovaných látek mezi mobilní a stacionární fázi (***Obr. 2.7.2***). Cílem chromatografického procesu je rozdělit vzorek na jednotlivé složky. Je vhodná pro analýzu těkavých látek, které je možné převést do plynného stavu. Inertní nosný plyn protéká kolonou a unáší vzorek. Dochází k interakci mezi vzorkem a stacionární fází, při čemž jsou jednotlivé složky různě pevně zadržovány. Podle stupně zadržení pak vystupují dříve či později. Složky opouštějící kolonu vstupují do detektoru. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení

složek. Doba, která uplyne od okamžiku vnesení vzorku do výstupu inertní, nesorbované složky, se nazývá mrtvý čas (t_M) a doba průchodu sorbované látky se označuje jako retenční čas (t_R).[82,83]

Metodu plynové chromatografie lze použít k dělení látek, které se při zplyňování nerozkládají ani nepodléhají jiné nežádoucí změně složení. Používá se k separaci, identifikaci a analýze složitějších směsí plynů, těkavých látek a organických sloučenin s bodem varu menším než cca 400 °C.[82,83]

Hlavní části plynového chromatografu:[82,83,84]

- zásobník plynné (mobilní) fáze
- čistící zařízení
- zařízení na regulaci tlaku, resp. průtoku plynné fáze
- dávkovací zařízení
- chromatografická kolona
- termostat se zařízením pro izotermickou analýzu a pro analýzu s programovanou změnou teploty
- detektor
- zařízení na zpracování a záznam signálu detektoru a vyhodnocení analýzy



Obr. 2.7.2: *Schéma plynového chromtorgafu*[85]

Mnoho detektorů je založeno na tvorbě iontů, nejpopulárnějším z nich se stal FID (*Flame Ionization Detector*, plamenově ionizační detektor). Dalšími používanými detektory jsou TCD (*Thermal Conductivity Detector*, tepelně vodivostní detektor), ECD (*Electron Capture Detector*, detektor elektronového záchytu), MS (*Mass Spectrometry*, hmotnostní spektrometr) a další.[82,83]

2.7.2.1 Plamenově ionizační detektor

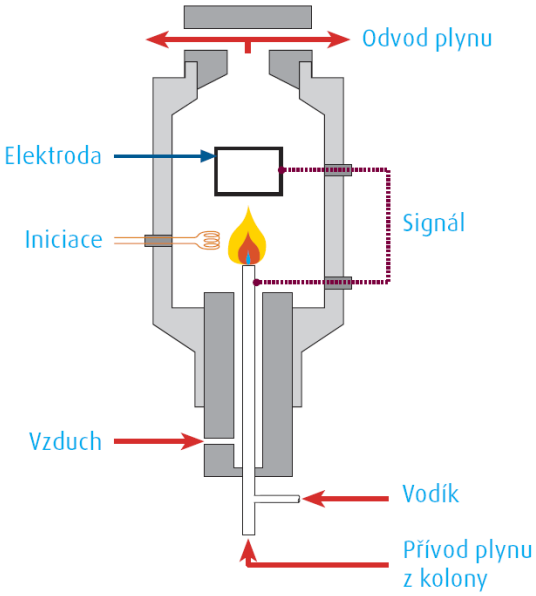
Plamenově ionizační detektor (FID – *Flame Ionization Detector)*, je nejpoužívanější detektor v plynové chromatografii a je příkladem ionizačního detektoru, který byl vynalezen přímo pro plynovou chromatografii (***Obr. 2.7.3***).

Vzorek je nejdříve spalován plamenem vzniklým hořením vodíku v syntetickém vzduchu. V plameni se tvoří ionty a volné elektrony. Nabité částice v nosném plynu vytvářejí měřitelný tok proudu v prostoru mezi dvěma elektrodami detektoru. Výsledný tok proudu má větší intenzitu než tok proudu vzniklého při průtoku pouze čistého nosného plynu a vodíku. Rozdíl změřeného signálu podává přesnou informaci o vzorku, protože proud je přímo úměrný ionizaci, která závisí na složení vzorku.

Plamenoionizační detektory jsou extrémně citlivé a koeficient linearity rovný jedné, mají široký rozsah linearity. Jejich nevýhodou je pouze destrukce vzorku.

Důležitým aspektem je výběr nosného plynu k převedení vzorku z injektoru přes kolonu do detektoru. Nosný plyn musí být inertní a nesmí se adsorbovat na materiál kolony. Jako nosné plyny pro FID se obvykle používají helium nebo dusík, výjimečně také vodík.

Pomocné plyny – vodík a syntetický vzduch, naopak slouží jako palivo a oxidační plyn pro proces spalování. Nečistoty, zvláště uhlovodíky, vlhkost a kyslík působí rušivě, snižují citlivost a mohou zhoršit mez detekce. Jejich obsah v pomocných plynech je proto stanoven limitem.[13,84,86,87,88]



Obr. 2.7.3: *Plamenově ionizační detektor*[86]

2.8 Vybrané statistické metody zpracování dat

Validace je zkoumání různých parametrů analytického systému z hlediska metodologického. Zahrnuje analytickou techniku, charakterizaci metody i analytické postupy.

Cílem validace je demonstrovat vhodnost metody k zamýšlenému použití vyhodnocením všech požadovaných validačních parametrů. Zjišťování jednotlivých parametrů se děje podle pevného a předem dohodnutého protokolu.[89,90,91]

2.8.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi jednotlivými, navzájem nezávislými výsledky měření získanými za podmínek opakovatelnosti, a ty jsou:[90,91]

- ✓ identický analyt
- ✓ totožná zkušební metoda a stejné přístrojové vybavení
- ✓ tatáž laboratoř (stejné podmínky), v krátkém časovém úseku
- ✓ stejný experimentátor

2.8.1.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech hodnot při opakování analýzy x_i, vydělených jejich celkovým počtem n. Obvykle se značí symbolem x s vodorovným pruhem:[89,92,93,94]

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

2.8.1.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je mírou přesnosti výsledků stanovení. Charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i kolem aritmetického průměru $\bar{x}$. Je definována vztahem:[89,92, 93,94]

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

x_i ……....příslušná jednotlivá hodnota
$\bar{x}$ ……aritmetický průměr
n …….počet nezávislých měření

2.8.1.3 Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální míru rozptýlenosti dat od střední hodnoty:[92,93,94]

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3)$$

s……....směrodatná odchylka
$\bar{x}$ ……aritmetický průměr

2.8.2 Linearita metody

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace neboli analytickým signálem (v našem případě plocha píku) a koncentrací stanovované látky. Těsnost vzájemné závislosti těchto dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient. Lineární závislost je vyjádřena obecným vztahem:[90,93]

$$y = a + bx \quad (4)$$

x, y……náhodné proměnné
b……....směrnice kalibrační přímky
a……úsek posunutí

2.8.3 Mez detekce

Mez detekce individuálního analytického postupu *(LOD – Limit Of Detection)* je definována jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, které může být detekováno. To znamená, že poskytuje analytický signál, ale nemusí být nezbytně kvantifikovaná jako exaktní hodnota.

U separačních metod je mez detekce obvykle stanovována pomocí hodnoty signálu slepého pokusu. Z chromatogramu slepého pokusu je zjištěno maximální kolísání základní linie (h_{max}) v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Pro odezvu meze detekce y_D a pro koncentraci meze detekce x_D platí:[89,90,91]

$$y_D = 3 \cdot h_{\max} \quad (5)$$

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} \quad (6)$$

b_1……směrnice kalibrační přímky; vychází z koncentrační závislosti $y = b_1.x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha jak je obvyklé.[90]

2.8.4 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti individuálního analytického postupu *(LOQ – Limit Of Quantification)* je definována jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být stanovena jako exaktní hodnota se stanovenou přesností.

Obecně je však mez stanovitelnosti rovna hodnotě y_1, což je první bod kalibračního modelu, a její odpovídající hodnotě x_1. Pro odezvu meze stanovitelnosti y_S a koncentraci meze stanovitelnosti x_S platí:[89,90,91]

$$y_S = 10 \cdot h_{\max} \tag{7}$$

$$x_S = \frac{y_S}{b_1} \tag{8}$$

b_1……směrnice kalibrační přímky; vychází z koncentrační závislosti $y = b_1.x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha jak je obvyklé.[90]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části je vypracovat a validovat SPME-GC-FID metodu pro stanovení vybraných alergenních aromaticky aktivních látek. Následně metodu aplikovat na reálné vzorky potravin.

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

K této práci bylo použito celkem třináct standardů alergenních vonných látek. Pro standardy označené I, byly stanoveny základní validační parametry metody, u standardů označených II, byly pouze zjištěny retenční časy jednotlivých látek (identifikace).

3.1.1.1 Standardy vonných alergenních látek I

- Anýzalkohol 98 % Sigma-Aldrich
- α-Amylcinnamaldehyd, *cis* + *trans* 97 % Sigma-Aldrich
- Cinnamaldehyd ≥ 93 % SAFC Supply Solution
- α-Hexylcinnamaldehyd ≥ 95 % SAFC Supply Solution
- 7-Hydroxycitronellal ≥ 95 % Fluka Analytical
- Methyl 2-oktynoát 99 % Sigma-Aldrich

3.1.1.2 Standardy vonných alergenních látek II

- Citral, *cis* + *trans* 95 % Alfa Aesar
- Citronellol 96 % Alfa Aesar
- Eugenol 99 % Alfa Aesar
- Geraniol 97 % Alfa Aesar
- Isoeugenol, *cis* + *trans* 98 % Alfa Aesar
- Limonen 97 % Alfa Aesar
- Linalool 97 % Alfa Aesar

3.1.1.3 Rozpouštědla

- Heptan ≥ 99 % Sigma-Aldrich
- Ethanol 96 % Lach-Ner

3.1.2 Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem a kovovou membránou
- Vodík 5.5 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem pro kyslík

3.1.3 Přístroje a pracovní pomůcky

- Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie)
- Vodní lázeň Julabo TW 12, LABORTECHNIK GMBH , Německo
- Analytické digitální váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Počítač PC Intel Celeron CPU, systém Microsoft Windows XP Profesional 2002, program Chrom-Card
- Chladnička s mrazničkou Amica, model AD 250
- SPME vlákno se stacionární fází Carboxen/Polydimethylsiloxan (CAR^{TM}/PDMS) o tloušťce 85 µm, SUPELCO
- Automatické mikropipety: BIOHIT Proline, 100,0 –1000,0 µl;
  BIOHIT Proline, 10,0 – 100,0 µl;
  GILSON Pipetman, 2,0 – 20,0 µl;
  BIOHIT Proline Plus, 0,1 – 3,0 µl;
  LABSYSTEMS Finnpipette, 0,2 – 2,0 µl
- Vialky o objemu 4 ml se šroubovacím uzávěrem a septem
- Třecí miska s tloučkem
- Držák, stojan
- Běžné laboratorní sklo
- Špičky, lžíce, špachtle, parafilm

3.2 Podmínky SPME-GC-FID

Teplotní program GC, SPME vlákno, extrakční podmínky pro metodu SPME a ostatní parametry analýzy (***Tab. 3.2.1, Tab. 3.2.2*** a ***Tab. 3.2.3***) byly převzaty z literatury a předchozích prací zabývajících se stejnou nebo podobnou problematikou.[95,96,97,98]

- Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem a split/splitless injektorem (***Příloha XIII***)
- Kapilární kolona DB–WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5µm), teplotní limit: 20 – 240°C
- Nosný plyn: dusík – průtok 0,9 ml.min-1
- Injektor: pravý injektor, 250 °C, dávkování ručně, CT splitless injection (konstantní teplota v celém injektoru)

Tab. 3.2.1*: Teplotní program GC*

Teplotní program GC		
Počáteční teplota	40 °C	1 min
Vzestupný gradient	4 °C.min^{-1}, do 200 °C	9 min
Celková doba analýzy	50 min	

Tab. 3.2.2*: Detektor*

Plamenově ionizační detektor (FID)	
Teplota	220 °C
Průtok vzduchu	350 ml.min^{-1}
Průtok vodíku	35 ml.min^{-1}
Make-up dusíku	30 ml.min^{-1}

***Tab. 3.2.3**: Optimalizované podmínky metody SPME*

Typ SPME vlákna	Carboxen/Polydimethylsiloxan (CAR™/PDMS), tloušťka 85 µm
Extrakční postup	headspace prostor (HS-SPME)
Extrakční teplota (teplota vodní lázně)	35 °C
Doba dosažení rovnováhy	20 min
Doba extrakce	30 min

3.3 Reálné vzorky potravin

Namátkově byla vybrána škála různých vzorků potravinářských výrobků (***Tab. 3.3.1***), které byly analyzovány testovanou metodou SPME-GC-FID. Vzorky byly zakoupeny v běžné obchodní síti a uchovávány dle pokynů výrobce vyznačených na obale.

***Tab. 3.3.1:** Analyzované potravinářské výrobky*

Výrobek			
Název	**Popis**	**Objem (hmotnost)**	**Výrobce (Prodávající)**
Avokádo - Špagety	Kořenící přípravek sypký	27 g	Pěkný – Unimex s.r.o., Praha 2
Becherovka Lemond	Likér, obsah alkoholu 20 % obj.; přírodní aroma	0,5 l	Jan Becher – Karlovarská Becherovka, a.s.
Bon Pari	Bonbóny: meloun s višňovou náplní; přírodní aroma	50 g	Nestlé Česko s.r.o, Praha 4
Dilmah Strawberry	Cejlonský čaj černý pravý aromatizovaný; přírodní aroma jahody	37,5 g	MJF Group, Srí Lanka
HALLS Blackcurrant	Dropsy s příchutí mentolu a černého rybízu; aroma	33,5 g	Cadbury Adams Colombia S.A.
Hamánek Borůvka	Kojenecká výživa s borůvkami od dokončeného 4. měsíce; neobsahuje umělá aromata	190 g	Hamé s.r.o., Kunovice, ČR
Lipo	Komprimát s příchutěmi; aroma: pomeranč, citron, hruška, meruňka, malina	60 g	The Candy Plus Sweet Factory, s.r.o., Rohatec, ČR
Millenium Vital, BIO Relax	Bylinný čaj s levandulí z ekologického zemědělství	40 g	LEROS, s.r.o.; Praha 5
Nestea Peach	Ledový čaj s příchutí broskve; aroma	0,5 l	Coca – Cola HBC Česká republika, s.r.o.
Orbit Watermelon	Žvýkačka bez cukru s příchutí melounu se sladidly; aroma	14 g	Wrigley Poland SP.Z.O.O., Poznaň
PICKWICK Cranberry & Raspberry	Ovocný čaj aromatizovaný, brusinky s malinami; aroma	40 g	Sara Lee Czech Republic, a.s., Praha 9

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Příprava standardu

Všechny standardy alergenních látek byly rozpuštěny v určitém poměru s heptanem popř. s ethanolem na požadovanou koncentraci. 1 ml tohoto vzorku byl vždy umístěn do vialky se šroubovacím uzávěrem a plynotěsným septem. Standardy alergenních látek byly uchovávány v lednici.

3.4.2 Příprava reálného vzorku

Z kapalných reálných vzorků (Becherovka Lemond) byl odebrán 1 ml a umístěn do vialky se šroubovacím uzávěrem a plynotěsným septem. Vzorky pevného skupenství (čaje, bonbóny) byly rozdrceny a rozmělněny v třecí misce s tloučkem. 1 g tohoto reálného vzorku byl umístěn do vialky se šroubovacím uzávěrem a plynotěsným septem.

3.4.3 Sorpce a desorpce aromaticky aktivních látek

Vialka s připraveným vzorkem (1 ml) byla umístěna do vodní lázně vytemperované na extrakční teplotu 35 °C. Zde byla vialka ponechána 20 minut. Po tuto dobu docházelo ve vialce k ustalování rovnováhy mezi vzorkem a headspace prostorem. Poté se SPME extraktor umístil do držáku na stojanu (***Příloha XII***). Do headspace prostoru nad vzorkem byla vsunuta přes septum dutá ocelová jehla s vláknem, což je 1 cm dlouhé křemenné sklo, na kterém je nanesen sorbent. Vlákno bylo pomocí pohyblivého pístu vysunuto a aromaticky aktivní látky se extrahovaly po dobu 30 minut. Pohyblivým pístem bylo vlákno opatrně zasunuto zpět do ochranné jehly a SPME extraktor byl ihned vyjmut ze stojanu a přenesen do nástřikové komory plynového chromatografu. Vlákno zde bylo opět vysunuto a vlivem vysoké teploty (250°C) byly analyty desorbovány po dobu 20 minut a dále proudem nosného plynu unášeny na kolonu (***Příloha XIII***).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce navazuje na diplomové práce[95,96], které se také zabývaly problematikou stanovení alergenních vonných látek. Bylo vybráno vhodné SPME vlákno, které se osvědčilo při extrakci těkavých aromaticky aktivních látek. Dále byly stanoveny optimální extrakční podmínky pro metodu SPME tak, aby bylo dosaženo co největšího extrakčního výtěžku. Zjištěné optimální podmínky metody SPME-GC byly převzaty a aplikovány v této práci.

Celkem bylo analyzováno třináct standardů alergenních vonných látek (***Tab. 4.1.1*** a ***Tab. 4.1.2***) z celkového počtu 26, které uvádí Evropská kosmetická legislativa (***Tab. 2.3.1***). Pro standardy vonných alergenních látek I byly stanoveny základní validační parametry, tj. opakovatelnost, linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti. U standardů vonných alergenních látek II byly pouze zjištěny retenční časy jednotlivých látek (identifikace), další parametry byly náplní předchozích diplomových prací.[95,96]

4.1 Identifikace jednotlivých standardů

Každý alergenní standard byl naředěn do jedné separátní vialky a proměřován pomocí metody SPME-GC-FID. Určilo se vhodné rozpouštědlo pro každou alergenní vonnou látku a z chromatogramů jednotlivých standardů byly zjištěny jejich retenční časy. Zásobními roztoky standardů vonných látek: *α-amylcinnamalu*, *citralu* a *isoeugenolu*, byly směsi *cis* a *trans* izomerů. V chromatogramech těchto látek byly tedy identifikovány dva píky. Nebylo možno stanovit, který z píků chromatogramu odpovídá kterému izomeru, proto jsou tyto píky zapsány jako: *α-amylcinnamal I* a *II*, *citral I* a *II* a *isoeugenol I* a *II*.

Poté se standardy stanovily i ve směsích (***Tab. 4.1.3***). Výjimkou byl pouze anýzalkohol, který v heptanu tvořil 2 fáze, bylo tedy nutné použít jiné rozpouštědlo (ethanol) a aplikace do směsi nebyla možná. Přehled analyzovaných standardů a jejich retenční časy uvádí ***Tab. 4.1.1 – Tab. 4.1.3*** a ***Graf 4.1.1 – Graf 4.1.4***.

4.1.1 Standardy vonných alergenních látek I

Tab. 4.1.1: *Retenční časy standardů a příslušná rozpouštědla*

Alergenní standard	Retenční čas t_R [min]	Rozpouštědlo
α-Amylcinnamal I	24,46	heptan
Methyl 2-oktynoát	27,76	heptan
7-Hydroxycitronellal	36,02	heptan
Cinnamal	38,39	heptan
α-Amylcinnamal II	43,53	heptan
Anýzalkohol	44,41	ethanol
α-Hexylcinnamal	46,67	heptan

4.1.2 Standardy vonných alergenních látek II

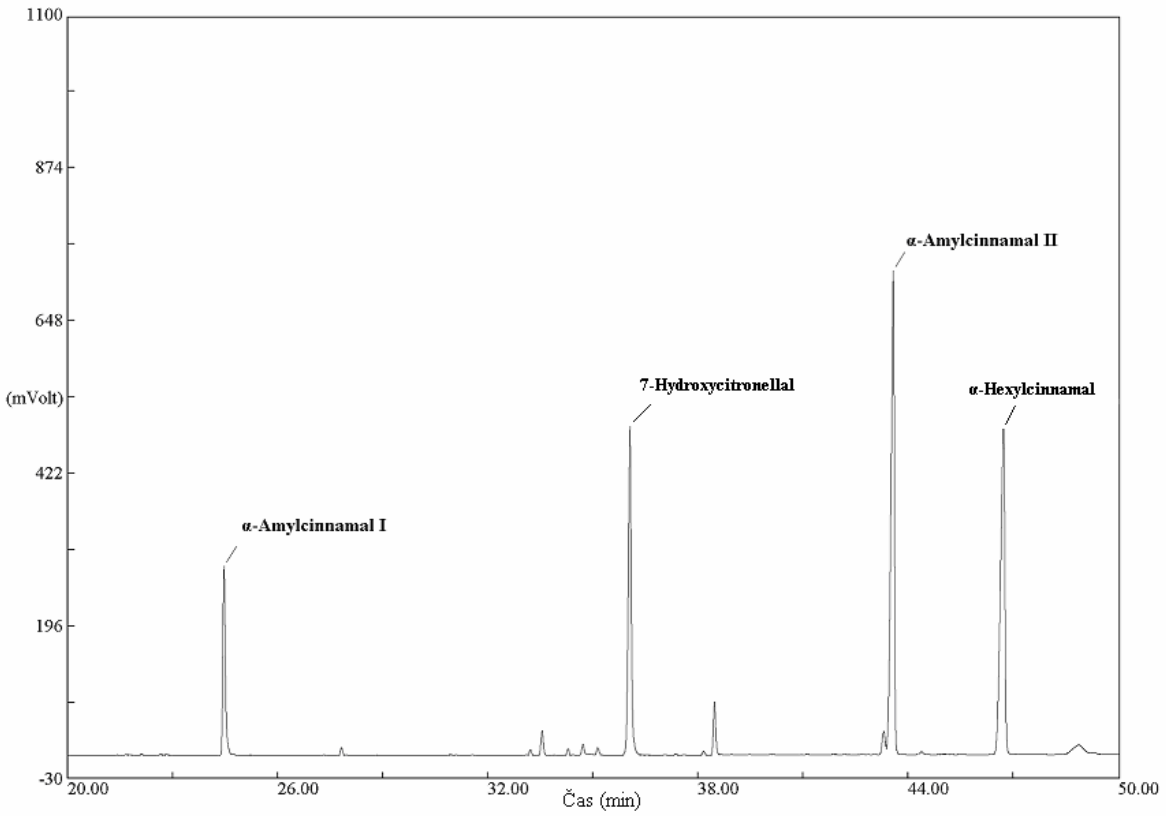
Tab. 4.1.2: *Retenční časy standardů a příslušné rozpouštědlo*

Alergenní standard	Retenční čas t_R [min]	Rozpouštědlo
Limonen	13,70	heptan
Linalool	24,82	
Citral I	29,02	
Citral II	30,39	
Citronellol	31,10	
Geraniol	33,28	
Eugenol	41,14	
Isoeugenol I	43,37	
Isoeugenol II	46,23	

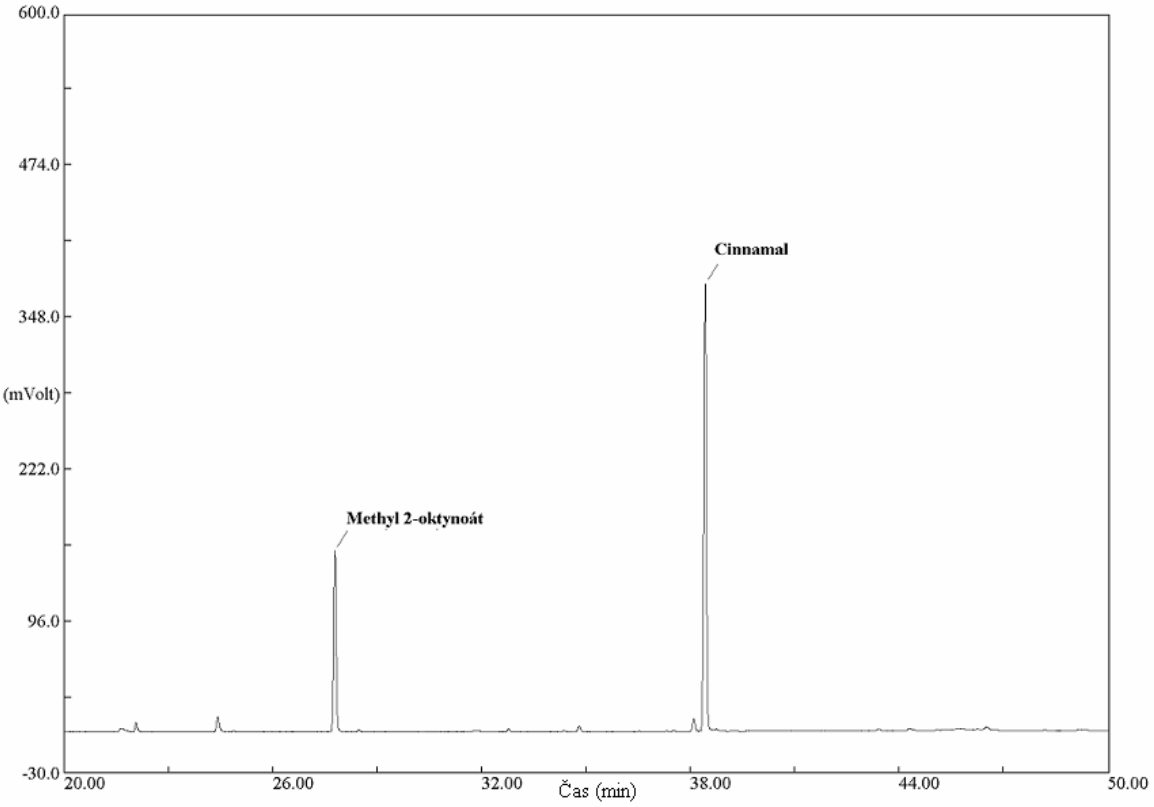
4.1.3 Směsi standardů vonných alergenních látek

Tab. 4.1.3: *Rozdělení standardů do směsí*

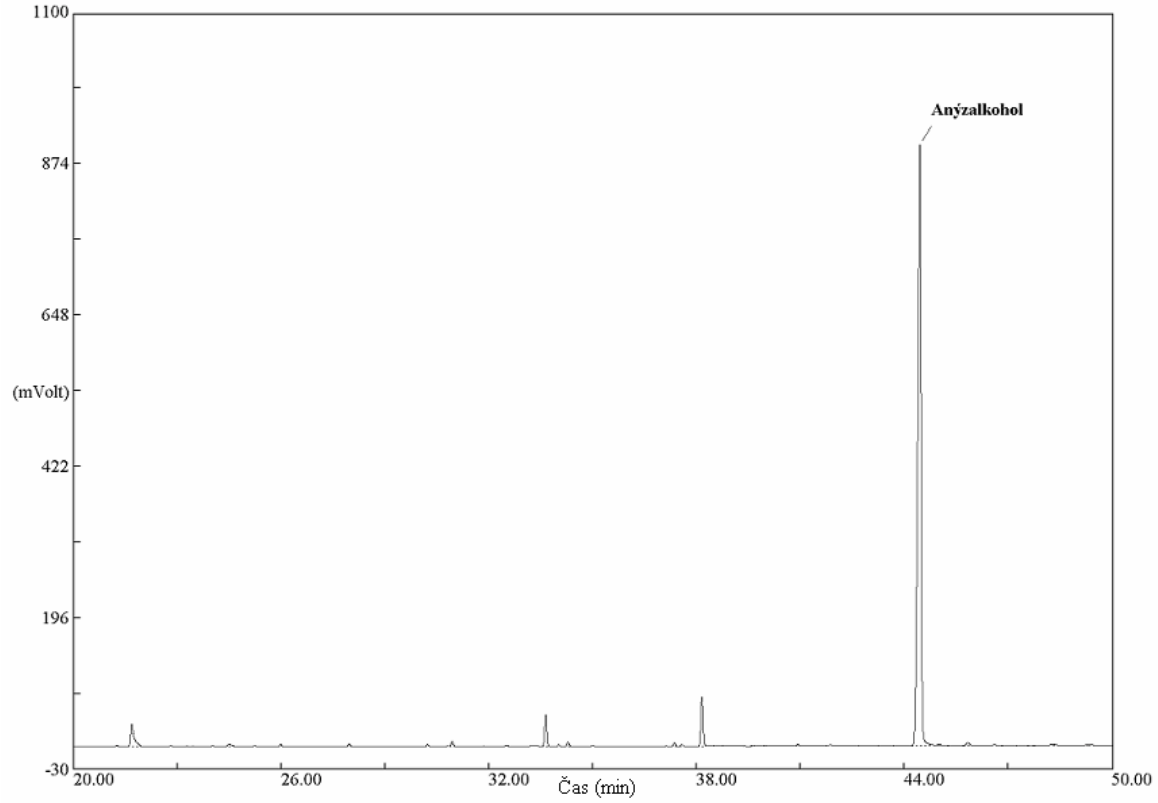
	Alergenní standard	Retenční čas t_R [min]	Rozpouštědlo
Směs A	α-Amylcinnamal I	24,46	Heptan
	7-Hydroxycitronellal	36,02	
	α-Amylcinnamal II	43,53	
	α-Hexylcinnamal	46,67	
Směs B	Methyl 2-oktynoát	27,76	Heptan
	Cinnamal	38,39	
samostatně	Anýzalkohol	44,41	Ethanol
Směs C	Limonen	13,70	Heptan
	Linalool	24,82	
	Citral I	29,02	
	Citral II	30,39	
	Citronellol	31,10	
	Geraniol	33,28	
	Eugenol	41,14	
	Isoeugenol I	43,37	
	Isoeugenol II	46,23	



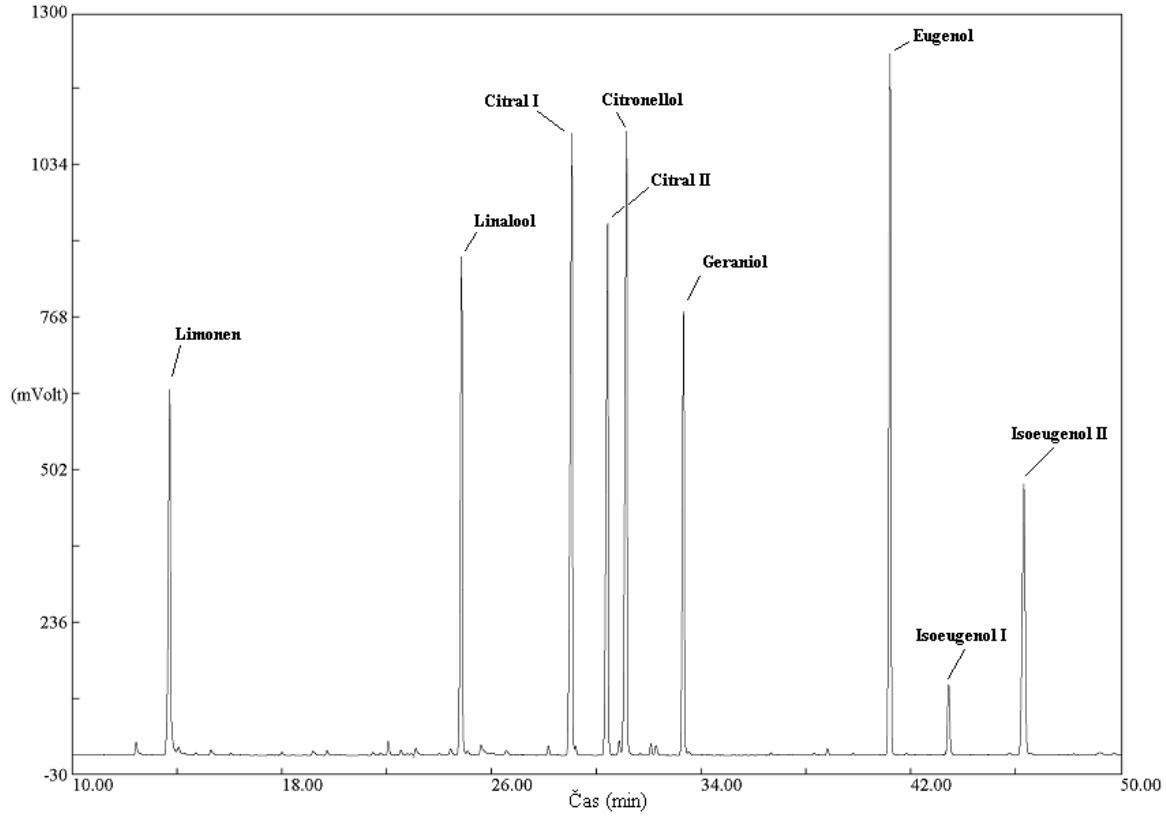
Graf 4.1.1: *Chromatogram standardů: směs A*



Graf 4.1.2: *Chromatogram standardů: směs B*



Graf 4.1.3: *Chromatogram standardu: Anýzalkohol*



Graf 4.1.4: *Chromatogram standardů: směs C*

4.2 Opakovatelnost metody

Ke stanovení opakovatelnosti byly použity směsi identifikovaných standardů. Pro stejnou koncentraci každého standardu vonných alergenních látek bylo provedeno pět měření za účelem porovnání plochy píků. Každá sada pěti měření byla prováděna vždy v jednom dni, jedním pracovníkem a v jedné laboratoři. Následně byla určena směrodatná odchylka a relativní směrodatna odchylka (RSD), která byla vybrána jako hlavní ukazatel opakovatelnosti. Pro výpočet byly použity rovnice číslo 1 – 3 (***kap. 2.8.1***).

Dobrá opakovatelnost závisí na extrakční době, která byla velmi dobře sledována. Vypočtené hodnoty RSD nesmí přesáhnout 10 %.[70] Opakovatelnost metody byla ověřena, hodnoty RSD se pohybovaly v rozmezí 0,53 – 6,15 %. Lze tedy konstatovat, že zvolená metoda SPME-GC-FID je dostatečně přesná pro analýzu uvedených vonných alergenních látek v potravinách. Výsledky jsou uvedeny v ***Tab. 4.2.1 – Tab. 4.2.3***. Pro lepší přehled jsou výsledky znázorněné i graficky (***Graf 4.2.1***).

Tab. 4.2.1: *Opakovatelnost metody pro standardy: α-Amylcinnamal I, 7-Hydroxycitronellal, α-Amylcinnamal II*

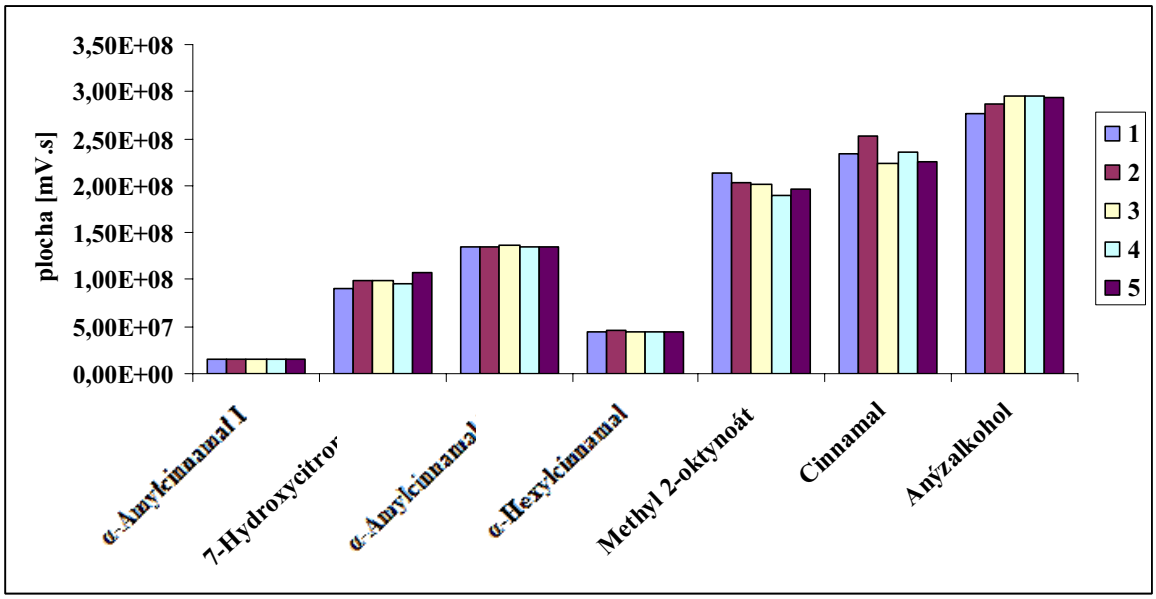
	Číslo měření	**Alergenní standard**		
		α-Amylcinnamal I	7-Hydroxycitronellal	α-Amylcinnamal II
Plocha píku [mV·s]	1	15957390	90374450	134165000
	2	15735820	99744490	135711500
	3	15645510	99552870	135820100
	4	15547870	95637380	134901600
	5	15000730	106853000	135716000
Průměrná plocha píku [mV·s]		15577464	98432438	135262840
Směrodatná odchylka *s*		356212,21	6054465,97	716403,43
RSD [%]		2,29	6,15	0,53

Tab. 4.2.2: *Opakovatelnost metody pro standardy: α-Hexylcinnamal, Methyl 2-oktynoát*

	Číslo měření	**Alergenní standard**	
		α-Hexylcinnamal	Methyl 2-oktynoát
Plocha píku [mV·s]	1	44309890	213844600
	2	45928420	203335100
	3	44829880	202025900
	4	44064290	190070600
	5	44326540	197076200
Průměrná plocha píku [mV·s]		44691804	201270480
Směrodatná odchylka *s* [mV·s]		745207,02	8746014,89
RSD [%]		1,67	4,35

Tab. 4.2.3: Opakovatelnost metody pro standardy: Cinnamal, Anýzalkohol

	Číslo měření	Alergenní standard	
		Cinnamal	Anýzalkohol
Plocha píku [mV·s]	1	234359400	276836200
	2	252415500	286282100
	3	223296000	294907500
	4	236331600	296037100
	5	224636200	293015800
Průměrná plocha píku [mV·s]		234207740	289415740
Směrodatná odchylka *s* [mV·s]		11691201,33	7984779,18
RSD [%]		4,99	2,76



Graf 4.2.1: *Porovnání ploch píků alergenních standardů při zkoušce opakovatelnosti metody*

4.3 Linearita

Linearita metody neboli linearita použitého detektoru byla proměřena pro každý standard, a to minimálně pro pět vzorků v různých ekvidistantních koncentračních rozmezích. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách (***Tab. 4.3.1 – Tab. 4.3.3***).

Z koncentrací standardů a získaných ploch píků byly sestrojeny grafy lineární závislosti (***Graf 4.3.1 – Graf 4.3.7***). Body jednotlivých závislostí byly proloženy spojnicí trendu a získala se rovnice regrese a dosažené korelační koeficienty R^2 (***Tab. 4.3.4***).

Tab. 4.3.1: *Stanovení linearity pro standardy: α-Amylcinnamal I, 7-Hydroxycitronellal, α-Amylcinnamal II*

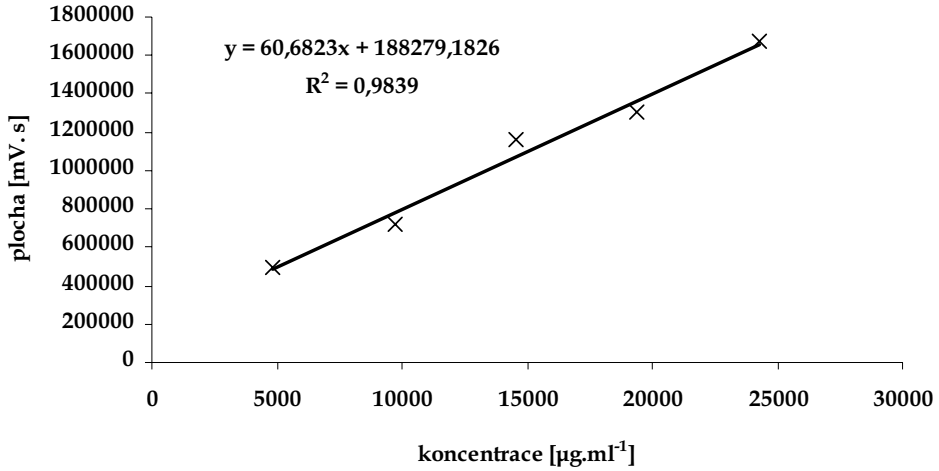
Alergenní standard					
α-Amylcinnamal I		7-Hydroxycitronellal		α-Amylcinnamal II	
Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]
494574	$4{,}85.10^3$	109882	2,53	1255395	$4{,}85.10^3$
724006	$9{,}70.10^3$	244791	4,60	2106877	$9{,}70.10^3$
1156676	$14{,}55.10^3$	527027	25,30	4486553	$14{,}55.10^3$
1305016	$19{,}40.10^3$	1186509	46,00	6804529	$19{,}40.10^3$
1675524	$24{,}25.10^3$	8314005	253,00	8184780	$24{,}25.10^3$

Tab. 4.3.2: *Stanovení linearity pro standardy: α-Hexylcinnamal, Methyl 2-oktynoát*

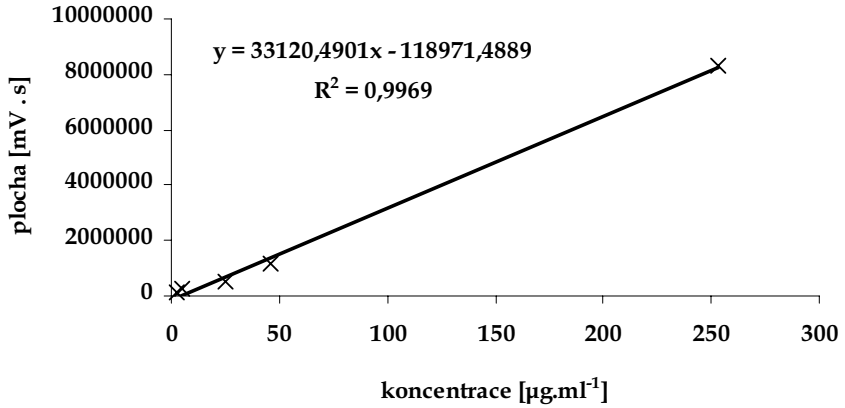
Alergenní standard			
α-Hexylcinnamal		Methyl 2-oktynoát	
Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]
461050	4,77	83571	0,18
1752624	21,44	293582	1,02
3056739	47,65	492780	1,85
15459180	214,42	614616	10,16
28813590	476,51	801849	18,48
–	–	3286580	101,64

Tab. 4.3.3: *Stanovení linearity pro standardy: Cinnamal, Anýzalkohol*

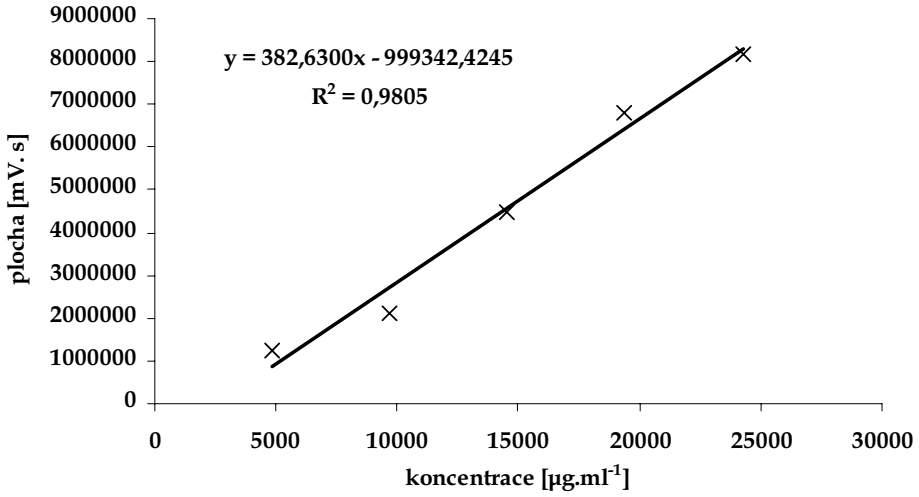
Alergenní standard			
Cinnamal		Anýzalkohol	
Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	Plocha píku [mV·s]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]
20800	0,12	178536	4,18
30299	0,21	329612	7,60
181825	1,15	1963680	41,80
309641	2,10	3349813	76,00
2022571	11,53	13569610	418,00
3955088	20,96	–	–



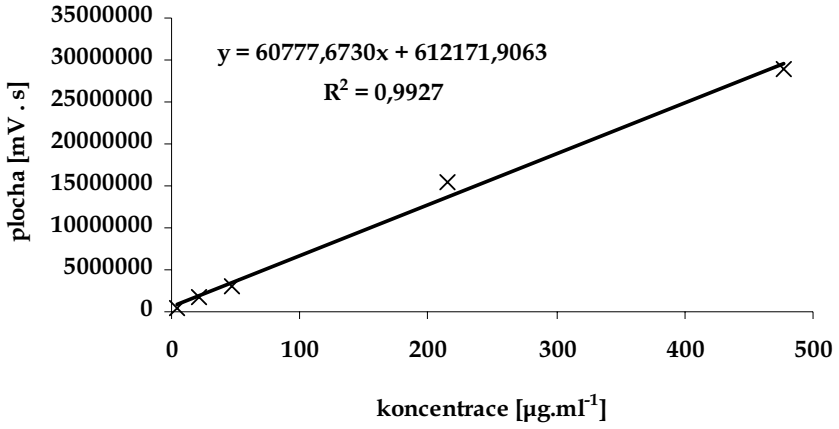
Graf 4.3.1: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: α-Amylcinnamal I*



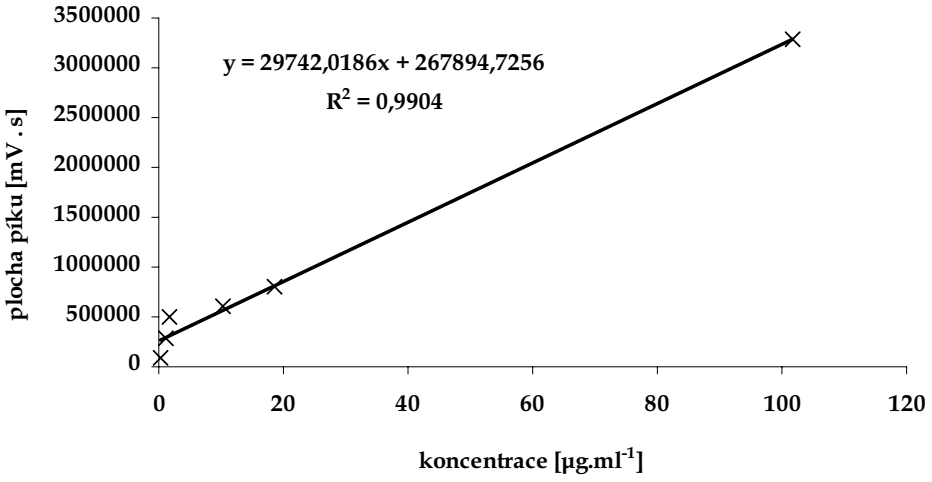
Graf 4.3.2: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: 7-Hydroxycitronellal*



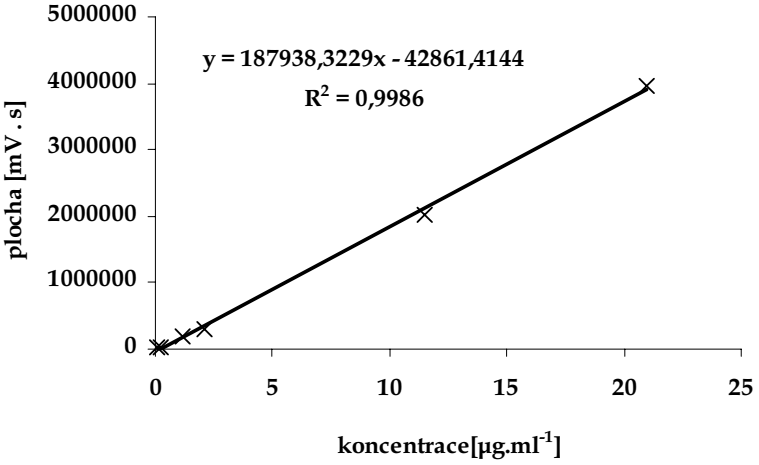
Graf 4.3.3: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: α-Amylcinnamal II*



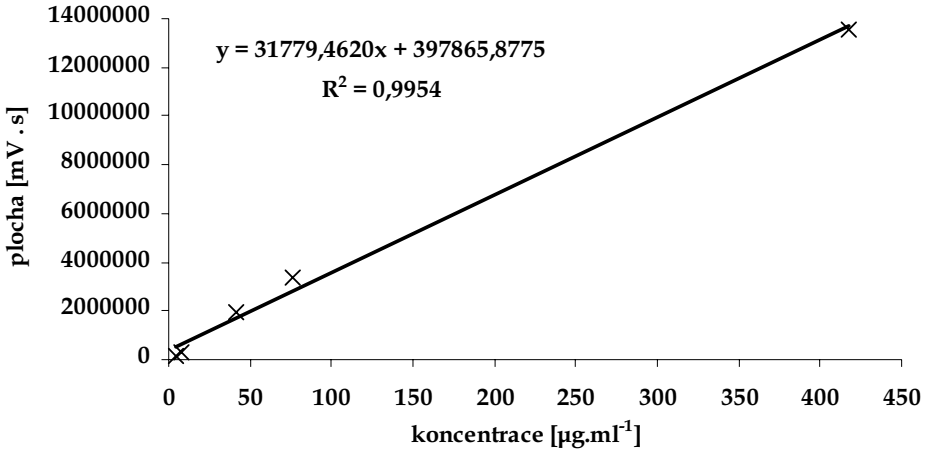
Graf 4.3.4: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: α-Hexylcinnamal*



Graf 4.3.5: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: Methyl 2-oktynoát*



Graf 4.3.6: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: Cinnamal*



Graf 4.3.7: *Lineární závislost plochy píku na koncentraci: Anýzalkohol*

Tab. 4.3.4: *Hodnoty spolehlivosti jednotlivých standardů*

Alergenní standard	Korelační koeficient R^2
α-Amylcinnamal I	0,9839
7-Hydroxycitronellal	0,9969
α-Amylcinnamal II	0,9805
α-Hexylcinnamal	0,9927
Methyl 2-oktynoát	0,9904
Cinnamal	0,9986
Anýzalkohol	0,9954

Linearita ověřované metody byla zhodnocena jako dobrá, všechny hodnoty korelačních koeficientů byly vyšší než 0,9800. Detektor FID se vyznačuje koeficientem linearity rovným jedné, řadí se tedy mezi lineární detektory, což se ověřilo.[83,87,88] U jednotlivých standardů se lineární rozsahy značně liší, přehled koncentračních rozmezí je uveden v ***Tab. 4.3.5***.

Tab. 4.3.5: *Koncentrační rozmezí linearity jednotlivých standardů*

Alergenní standard	Koncentrační rozmezí linearity [$\mu g \cdot ml^{-1}$]
α-Amylcinnamal I	$4{,}85.10^3 – 24{,}25.10^3$
7-Hydroxycitronellal	2,53 – 253,00
α-Amylcinnamal II	$4{,}85.10^3 – 24{,}25.10^3$
α-Hexylcinnamal	4,77 – 476,51
Methyl 2-oktynoát	0,18 – 101,64
Cinnamal	0,12 – 20,96
Anýzalkohol	4,18 – 418,00

4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Ke stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti byly alergenní standardy postupně zřeďovány s ekvidistantními rozdíly koncentrací a proměřovány metodou SPME-GC-FID. Pro každý standard minimálně pět hodnot koncentrace. Po analýze se již pracovalo s chromatogramy za účelem zjistit mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro výpočet byly použity rovnice číslo 5 – 8 (***kap. 2.8.3*** a ***2.8.4***).

Z koncentrací standardů a zjištěných výšek píků z příslušných chromatogramů (***Tab. 4.4.1 – Tab. 4.4.3***) byly sestrojeny grafy lineární závislosti. Body jednotlivých závislostí byly proloženy spojnicí trendu a získaly se odpovídající rovnice regrese z nichž byly odečteny směrnice kalibračních přímek b_1 (***Graf 4.4.1 – Graf 4.4.7***).

Z chromatogramu slepého pokusu neboli ze záznamu šumu detektoru bylo určeno maximální kolísání základní linie (h_{max}) v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaného analytu.[90]

Tab. 4.4.1: *Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro standardy: α-Amylcinnamal I, 7-Hydroxycitronellal, α-Amylcinnamal II*

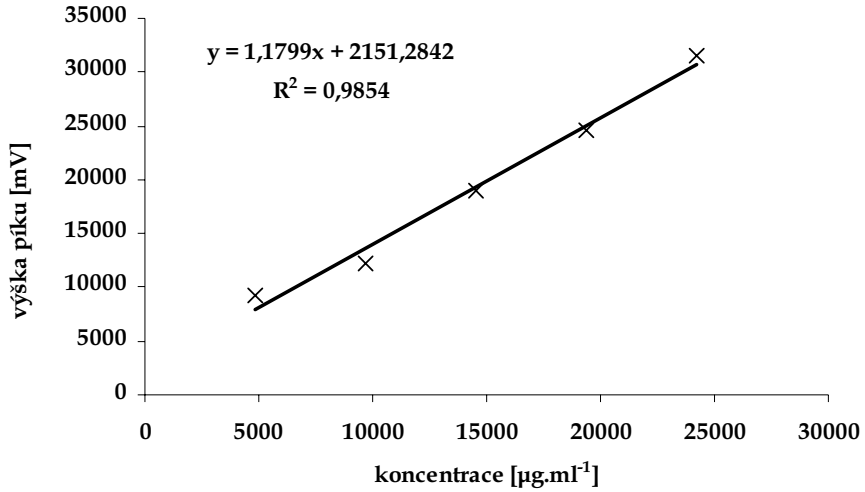
Alergenní standard					
α-Amylcinnamal I		7-Hydroxycitronellal		α-Amylcinnamal II	
Výška píku [mV]	c [μg·ml^{-1}]	Výška píku [mV]	c [μg·ml^{-1}]	Výška píku [mV]	c [μg·ml^{-1}]
9220	4,85.10^3	1609	2,53	17593	4,85.10^3
12174	9,70.10^3	3660	4,60	36161	9,70.10^3
18967	14,55.10^3	7493	25,30	76522	14,55.10^3
24622	19,40.10^3	17556	46,00	125016	19,40.10^3
31607	24,25.10^3	121655	253,00	161917	24,25.10^3

Tab. 4.4.2: *Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro standardy: α-Hexylcinnamal, Methyl 2-oktynoát*

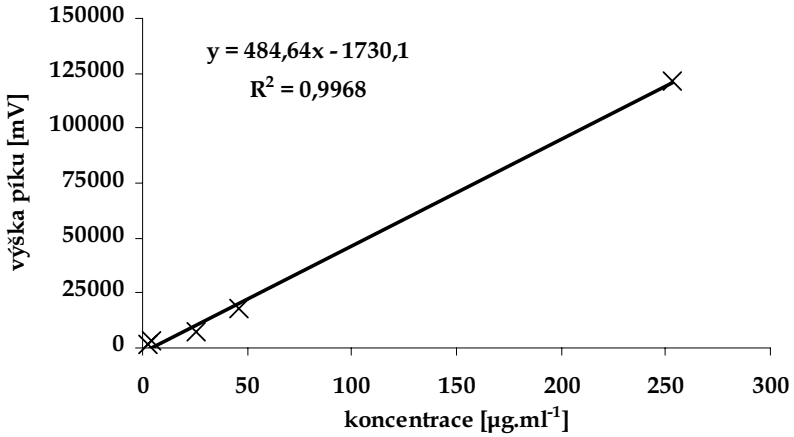
Alergenní standard			
α-Hexylcinnamal		Methyl 2-oktynoát	
Výška píku [mV]	c [μg·ml^{-1}]	Výška píku [mV]	c [μg·ml^{-1}]
5160	4,77	1472	0,19
19422	21,44	4510	1,02
34145	47,65	8102	1,85
170478	214,42	10794	10,16
308965	476,51	14187	18,48
–	–	52369	101,64

Tab. 4.4.3: *Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti pro standardy: Cinnamal, Anýzalkohol*

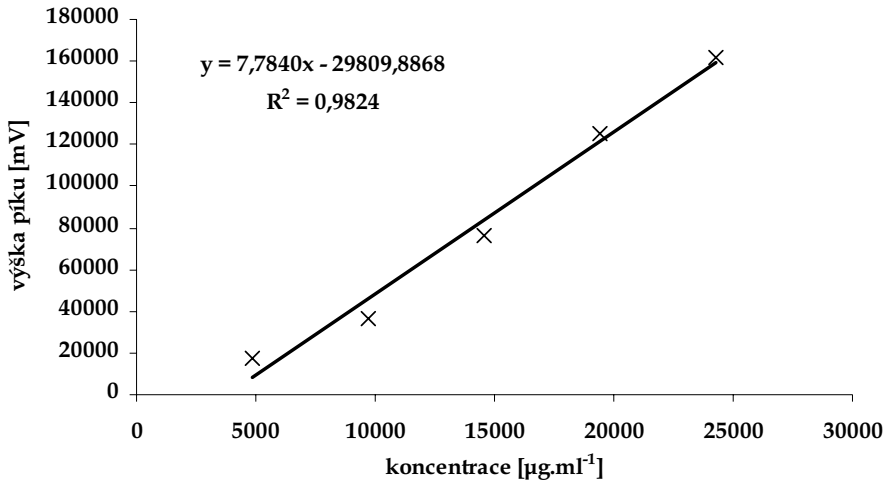
Alergenní standard			
Cinnamal		Anýzalkohol	
Výška píku [mV]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	Výška píku [mV]	c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]
386	0,12	2664	4,18
586	0,21	4921	7,60
3444	1,15	29452	41,80
5885	2,10	50477	76,00
37823	11,53	200323	418,00
74621	20,96	–	–



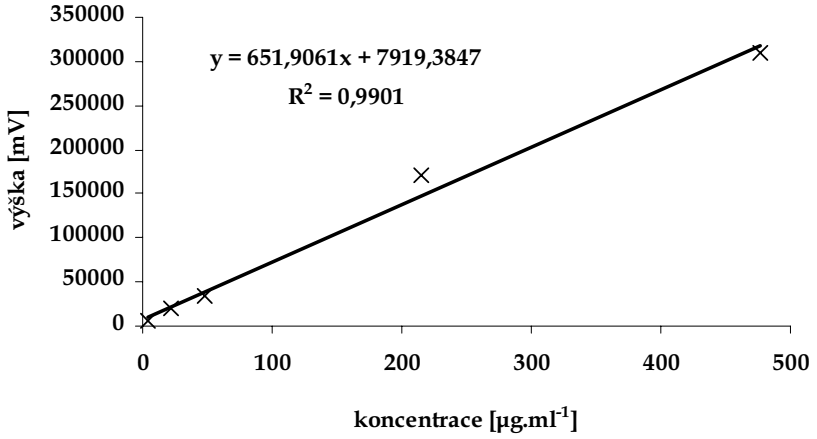
Graf 4.4.1: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: α-Amylcinnamal I*



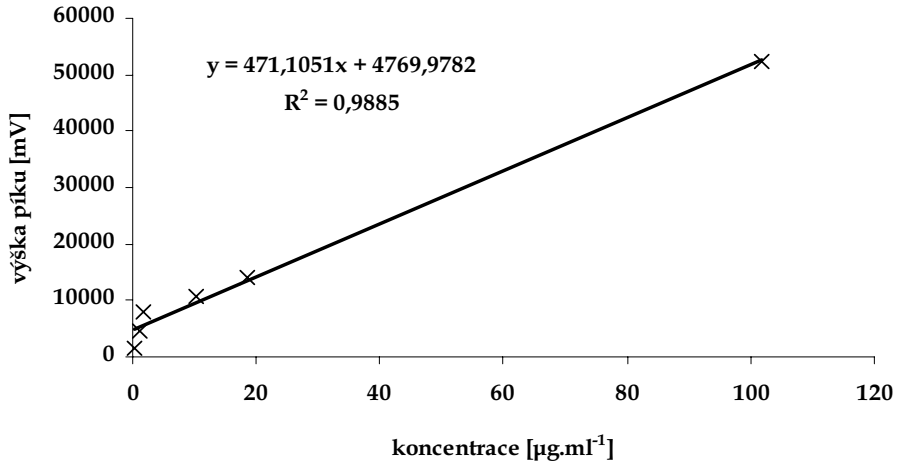
Graf 4.4.2: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: 7-Hydroxycitronellal*



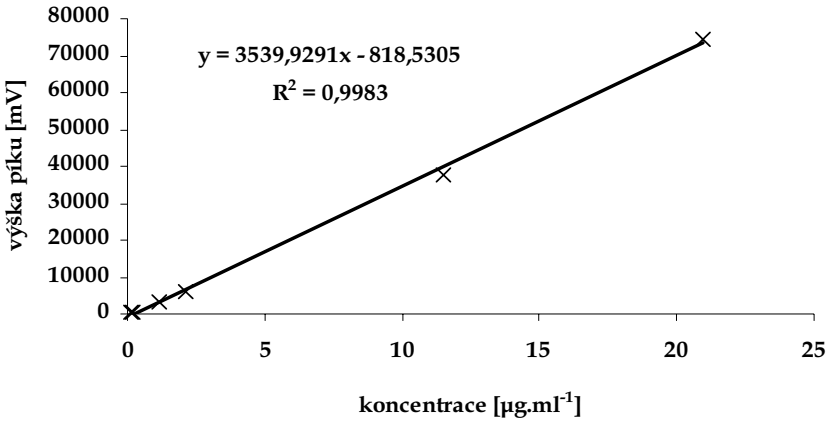
Graf 4.4.3: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: α-Amylcinnamal II*



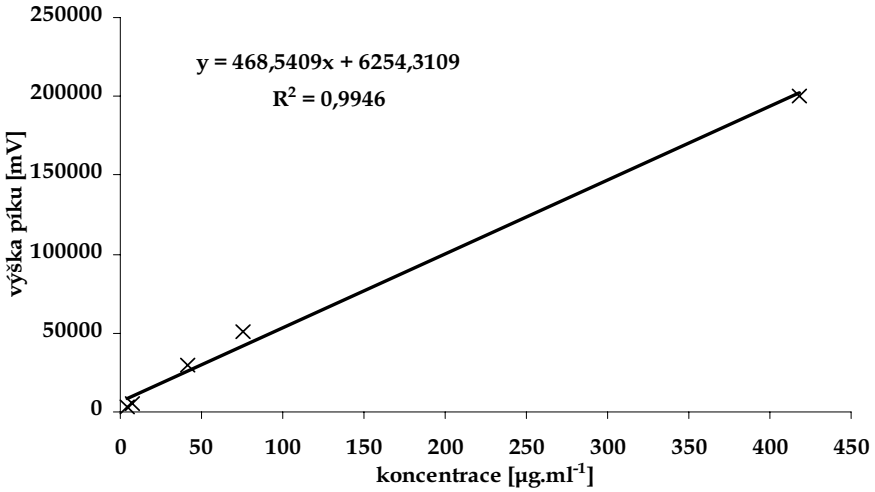
Graf 4.4.4: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: α-Hexylcinnamal*



Graf 4.4.5: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: Methyl 2-oktynoát*



Graf 4.4.6: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: Cinnamal*



Graf 4.4.7: *Lineární závislost výšky píku na koncentraci: Anýzalkohol*

4.4.1 Příklad výpočtu meze detekce a meze stanovitelnosti

Rovnice číslo 5 – 8 k výpočtům jsou uvedeny v ***kap. 2.8.3*** a ***2.8.4***.

- Alergenní standard: α-Amylcinnamal I
- Maximální kolísání základní linie: h_{max} = 563 mV
- Mez detekce
  - ✓ Odezva meze detekce: $y_D = 3.h_{max}$

    $y_D = 3.563 = 1689$ mV
  - ✓ Směrnice (z rovnice regresní přímky kalibrační křivky): $b_1 = 1{,}18$
  - ✓ Koncentrace na mezi detekce; LOD: $x_D = \dfrac{y_D}{b_1}$

$$x_D = \frac{1689}{1{,}18} = 1{,}43.10^{-3}\ \mu g{\cdot}ml^{-1}$$

- Mez stanovitelnosti
  - ✓ Odezva meze stanovitelnosti: $y_S = 10.h_{max}$

    $y_S = 10.563 = 5630$ mV
  - ✓ Směrnice (z rovnice regresní přímky kalibrační křivky): $b_1 = 1{,}18$
  - ✓ Koncentrace na mezi stanovitelnosti; LOQ: $x_S = \frac{y_S}{b_1}$

$$x_S = \frac{5630}{1{,}18} = 4{,}77.10^{-3}\ \mu g \cdot ml^{-1}$$

Uvedený způsob výpočtu meze detekce a meze stanovitelnosti byl použit u všech alergenních standardů. Výsledky jsou uvedeny v ***Tab. 4.4.4*** a ***Tab. 4.4.5***.

Tab. 4.4.4: *Meze detekce pro jednotlivé standardy*

Alergenní standard	**h_{max} [mV]**	**b_1**	**y_D [mV]**	**LOD [μg·ml^{-1}]**
α-Amylcinnamal I	563	1,18	1689	$1{,}43.10^3$
7-Hydroxycitronellal	121	484,64	363	0,75
α-Amylcinnamal II	3889	7,78	11667	$1{,}50.10^3$
α-Hexylcinnamal	296	651,91	888	1,36
Methyl 2-oktynoát	10	471,11	30	0,06
Cinnamal	45	3539,93	135	0,04
Anýzalkohol	205	468,54	615	1,31

Tab. 4.4.5: *Meze stanovitelnosti pro jednotlivé standardy*

Alergenní standard	**h_{max} [mV]**	**b_1**	**y_S [mV]**	**LOQ [μg·ml^{-1}]**
α-Amylcinnamal I	563	1,18	5630	$4{,}77.10^3$
7-Hydroxycitronellal	121	484,64	1210	2,50
α-Amylcinnamal II	3889	7,78	38890	$4{,}99.10^3$
α-Hexylcinnamal	296	651,91	2960	4,54
Methyl 2-oktynoát	10	471,11	100	0,21
Cinnamal	45	3539,93	450	0,13
Anýzalkohol	205	468,54	2050	4,38

Obecně by měla mez stanovitelnosti odpovídat hodnotě y_1, což je první bod kalibračního modelu, a odpovídající hodnotě x_1[90], což bylo u všech proměřovaných standardů splněno.

Meze detekce jednotlivých analytů se pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,04 – 1,36 μg·ml^{-1} a meze stanovitelnosti koncentračním rozmezí 0,13 – 4,54 μg·ml^{-1}. Plynová chromatografie s FID detektorem ve spojení s SPME extrakcí je pro tyto standardy dostatečně citlivá. Vysokou mez detekce i stanovitelnosti, oproti ostatním alergenním standardům, měl pouze α-amylcinnamal. Jeho odezva byla slabá, proto je citlivost metody u tohoto standardu nízká. Navrhuji bližší studium v jedné z navazujících prací.

4.5 Reálné vzorky

Namátkově byla vybrána škála různých vzorků potravinářských výrobků (***Tab. 3.3.1***), které byly analyzovány testovanou metodou SPME-GC-FID. Na obale těchto potravin uvádí výrobce většinou pojem *„aroma“*, případně *„přírodně identické aromatické látky“*. Mohou tedy obsahovat i některé z vybraných alergenních aromatických látek.

Sledované alergenní aromatické látky byly z chromatogramů reálných vzorků identifikovány na základě retenčních časů standardů (***Tab. 4.5.1***, ***Tab. 4.5.2*** a ***Tab. 4.5.3***) a porovnány s případnou deklarací na obale výrobku.

Vzhledem k tomu, že u části identifikovaných látek nebyly z časových důvodů k dispozici parametry standardů potřebné pro kvantifikaci, v tabulkách je uvedena pouze přítomnost dané látky. Po dokončení validace metody a kompletního proměření všech legislativou daných standardů (což bude náplní dalších navazujících diplomových prací) bude samozřejmě sledována přítomnost daných látek i z hlediska kvantitativního.

Chromatogramy reálných vzorků jsou uvedeny v ***Příloha I – Příloha XI.***

Tab. 4.5.1*: Výskyt zkoumaných látek ve vybraných typech potravin*

Reálné vzorky		Avokádo – Špagety	Becherovka Lemond	Bon Pari	Dilmah Strawberry
Standardy vonných alergenních látek I	α-Amylcinnamal I	✓	✓	✓	–
	Methyl 2-oktynoát	–	✓	–	–
	7-Hydroxycitronellal	–	–	–	–
	Cinnamal	✓	✓	–	✓
	α-Amylcinnamal II	–	–	–	–
	Anýzalkohol	–	–	–	–
	α-Hexylcinnamal	✓	–	✓	–
Standardyvonných alergenních látek II	Limonen	✓	✓	✓	✓
	Linalool	✓	✓	✓	✓
	Citral I	–	✓	✓	–
	Citral II	–	✓	✓	✓
	Citronellol	–	–	✓	–
	Geraniol	✓	✓	–	✓
	Eugenol	✓	✓	✓	–
	Isoeugenol I	✓	–	–	✓
	Isoeugenol II	–	–	–	–

Na obale kořenícího přípravku Avokádo – Špagety je uveden obsah bazalky, oregány, pepře černého a dalších přísad. Silice bazalky obsahuje linalool, limonen, eugenol a isoeugenol, silice oregána taktéž linalool. Do kořenících směsí se přidává cinnamal a ke zlepšení, nebo zvýraznění chuti amylcinnamal.[7,16,19] Chromatogram kořenícího přípravku je uveden v ***Příloha I***.

U Becherovky Lemond uvádí výrobce na etiketě obsah přírodního aroma. Tento bylinný likér obsahuje vonné látky citral a limonen, které mu udávají citrusové aroma (***Příloha II***).[16]

Bonbóny Bon Pari s příchutí melounu s višňovou náplní, mají na obale uvedeno, že obsahují přírodní aroma, v kterém bylo identifikováno osm vonných alergenních látek (***Příloha III***).

Dilmah Strawberry je pravý černý Cejlonský čaj aromatizovaný přírodním aroma jahody (uvedeno na etiketě), čemuž může odpovídat přítomnost linaloolu a limonenu. Do aromatizovaných čajů se používá také isoeugenol.[16] Dále tento čaj obsahuje cinnamal, citral, citronellol a geraniol (***Příloha IV)***.

Tab. 4.5.2*: Výskyt zkoumaných látek ve vybraných typech potravin*

Reálné vzorky		HALLS Blackcurrant	Hamánek Borůvka	Lipo	Millenium Vital
Standardy vonných alergenních látek I	α-Amylcinnamal I	–	✓	✓	✓
	Methyl 2-oktynoát	✓	–	–	✓
	7-Hydroxycitronellal	–	–	–	–
	Cinnamal	–	–	✓	✓
	α-Amylcinnamal II	–	✓	✓	–
	Anýzalkohol	–	–	–	–
	α-Hexylcinnamal	–	✓	✓	–
Standardyvonných alergenních látek II	Limonen	✓	–	✓	✓
	Linalool	✓	–	✓	✓
	Citral I	✓	–	✓	–
	Citral II	✓	✓	✓	–
	Citronellol	✓	–	✓	–
	Geraniol	–	–	✓	–
	Eugenol	–	–	✓	–
	Isoeugenol I	–	–	–	–
	Isoeugenol II	–	–	–	–

Dropsy s příchutí mentolu a černého rybízu HALLS, obsahují aroma s terpenickými látkami, které odpovídají především citrónovým silicím (***Příloha V***).[16]

Hamánek je kojenecká výživa s borůvkami od dokončeného 4. měsíce dítěte, by neměla obsahovat umělá aromata, jak uvádí výrobce na obale. Z chromatogramu (***Příloha VI***) jsou patrné opravdu minimální množství aromatických látek. Největší podíl tvoří citral, který je nejspíš součástí aroma borůvky.

Komprimát s ovocnými příchutěmi Lipo má na etiketě uvedeno aroma: pomeranč, citron, hruška, meruňka, malina. Složkou pomerančových aromat bývá limonen a linalool. Do meruňkových je přidáván taktéž linalool a dále geraniol. Aroma citron obsahuje samozřejmě citral a citronellol, zaručující vůni i chuť výrobku.[16] Dá se říci, že Lipo je opravdu bohaté na potenciálně alergenní aromaticky aktivní látky (***Příloha VII***), přitom se jedná o pochutinu, která je konzumována především dětmi.

Na obale bylinného čaje Millenium Vital, BIO Relax z ekologického zemědělství je uveden obsah květu levandule, šípku a plodu černého rybízu. Mezi vonné látky obsažené v levanduli patří především linalool a trochu geraniolu.[7,19] Tento čaj neobsahuje velké množství vybraných vonných látek, jak je patrné z chromatogramu (***Příloha VIII***).

Rostliny obsahují jen malá množství α-amylcinnamalu, methyl 2-oktynoátu, cinnamalu, limonenu a linaloolu.

***Tab. 4.5.3**: Výskyt zkoumaných látek ve vybraných typech potravin*

Reálné vzorky		Nestea Peach	Orbit Watermelon	PICKWICK Cranberry & Raspberry
Standardy vonných alergenních látek I	α-Amylcinnamal I	✓	✓	✓
	Methyl 2-oktynoát	–	✓	–
	7-Hydroxycitronellal	✓	✓	–
	Cinnamal	–	✓	✓
	α-Amylcinnamal II	✓	✓	–
	Anýzalkohol	–	✓	–
	α-Hexylcinnamal	✓	✓	–
Standardyvonných alergenních látek II	Limonen	–	✓	✓
	Linalool	✓	✓	✓
	Citral I	–	✓	–
	Citral II	–	✓	✓
	Citronellol	–	✓	–
	Geraniol	–	–	✓
	Eugenol	✓	✓	–
	Isoeugenol I	–	–	–
	Isoeugenol II	–	–	–

Ledový čaj s příchutí broskve Nestea Peach obsahuje linalool, který se přidává do potravinářských aromat pro požadovanou vůni a příchuť broskve.[16] Dále obsahuje α-amylcinnamal, 7-hydroxycitronellal, α-hexylcinnamal a eugenol (***Příloha IX***).

Žvýkačky Orbit s melounovou příchutí obsahují aroma s bohatou škálou vybraných vonných látek. Ze šestnácti analyzovaných standardů aromaticky aktivních látek (včetně izomerů) bylo na chromatogramu (***Příloha X***) identifikováno třináct. Opět se jedná o pochutinu konzumovanou často dětmi.

Posledním analyzovaným vzorkem byl ovocný aromatizovaný čaj PICKWICK s příchutí brusinek a malin (***Příloha XI***).

5 ZÁVĚR

Analýza vůně, její identifikace a vyhodnocení může představovat cenný zdroj informací o kvalitě a zdraví potravin, který zahrnuje jak organoleptickou kvalitu, tak zdravotní nezávadnost pro spotřebitele.

Potravinářská aromata jsou vyráběna z přírodních materiálů (silic, destilátů, extraktů), dále z přírodně identických látek a také z látek, které se v přírodě nevyskytují a jsou vyrobeny synteticky (umělé aromatické látky). Přítomnost těchto aromat v potravině se obecně označuje pouze slovem *„aroma“* ve výčtu složek. Aroma lze dále specifikovat jako *„přírodní“*, *„přírodně identické“* nebo *„umělé“*, případně konkrétním názvem popisujícím druh aromatu, ale detailní složení ze štítku potravinářského výrobku nevyčteme.

Pozornost v této diplomové práci byla věnována problematice aromaticky aktivních látek jako potenciálních alergenů v potravinách a také ověřením vhodnosti a selektivnosti analytické metody SPME-GC-FID a její validace. Bylo analyzováno celkem třináct standardů alergenních vonných látek z celkového počtu 26, které uvádí Evropská kosmetická legislativa.

Pro následujících šest standardů: anýzalkohol, α-amylcinnamaldehyd (*cis* + *trans*), cinnamaldehyd, α-hexylcinnamaldehyd, 7-hydroxycitronellal a methyl 2-oktynoát, byly stanoveny základní validační parametry metody SPME s plynovou chromatografií, tj. opakovatelnost, linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti. Bylo identifikováno i dalších sedm standardů vonných alergenních látek: citral (*cis* + *trans*), citronellol, eugenol, geraniol, isoeugenol (*cis* + *trans*), limonen a linalool, jejichž další parametry byly náplní předchozích diplomových prací.

Opakovatelnost metody byla ověřena a zhodnocena jako dobrá. Hodnoty RSD se pohybovaly v rozmezí 0,53 – 6,15 %.

Linearita ověřované metody byla taktéž uspokojivá, všechny hodnoty korelačních koeficientů byly vyšší než 0,9800. Detektor FID se řadí mezi lineární detektory, což bylo ověřeno.

Meze detekce jednotlivých analytů se pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,04 – 1,36 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a meze stanovitelnosti koncentračním rozmezí 0,13 – 4,54 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Vysokou mez detekce ($1{,}50.10^3$ $\mu g \cdot ml^{-1}$) i stanovitelnosti ($4{,}99.10^3$ $\mu g \cdot ml^{-1}$), oproti ostatním alergenním standardům, vykazoval α-amylcinnamal. Jeho odezva byla slabá, proto je citlivost metody u tohoto standardu nízká. Navrhuji bližší studium v jedné z navazujících prací.

Poté byla metoda aplikována na jedenáct reálných vzorků potravinářských výrobků, které byly zakoupeny v běžné obchodní síti. Vybrané potravinové vzorky obsahovaly nejčastěji limonen, linalool a α-amylcinnamaldehyd.

V budoucnu je možné, že obsah těchto látek v potravinách bude také legislativně ošetřen, stejně jak je tomu v kosmetických výrobcích. Tato metoda je příkladem, jak lze kontrolovat (identifikovat a kvantifikovat) obsah aromaticky aktivních látek v potravinách. Metoda plynové chromatografie s FID detektorem ve spojení s SPME extrakcí je dostatečně přesná a citlivá pro analýzu uvedených vonných alergenních látek v potravinách. Je rychlá, univerzální a šetrná k životnímu prostředí.

Problematika aromat je velmi složitá vzhledem k počtu používaných preparátů. Jejich složení může v některých případech i kolísat. Proto bych v rámci možného navázání na tuto práci doporučila stanovení aromaticky aktivních látek jako potenciálních alergenů v potravinách i technikou SPME-GC-MS.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITRATURY

1. CHISVERT, A., SALVADOR, A. Perfumes in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods for Fragrance Ingredients and other Related Chemicals in Cosmetics. *Analysis of Cosmetic Products.* Ed. Elsevier, 2007, pp. 243-256. ISBN 978-0-444-52260-3.
2. GURYČOVÁ, H. *Syntetické vonné látky ve vodním ekosystému.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009. 89 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
3. ČERVENÝ, L. Syntetické vonné a chuťové látky. *Chemické listy 93*, 1999, č. 7, s. 412-420. ISSN 1213-7103.
4. CUYPER, M., BULTE, J. W. M. *Physics and Chemistry Basic of Biotechnology.* Boston: Kluwer Academic Publishers. 2001. 334 p. ISBN 0-7923-7091-0.
5. PLUTOWSKA, B., WARDENCKI, W. Aromagrams – Aromatic profiles in the appraciation of food quality. *Food Chemistry*. 2007, vol. 101, issue 2, pp. 845-872. ISSN 0308-8146.
6. TAYLOR, A. J. *Food Flavour Technology*. Blackwell Publishing, 2002. 316 p. ISBN 978-1-84127-224-5.
7. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 320 s. ISBN 80-86659-01-1.
8. Vyhláška č. 127/2008 Sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, v platném znění.
9. 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, v platném znění.
10. TREPKOVÁ, E., VONÁŠEK, F. *Vůně a parfémy: Tajemství přitažlivosti*. Praha: Maxdorf, 1997. 173 s. ISBN 80-85800-48-9.
11. ČOPÍKOVÁ, J. *Technologie čokolády a cukrovinek.* 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1999. 168 s. ISBN 80-7080-365-7.
12. SCHVAB, W., DAVIDOVICH-RIKANATI, R., LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The plant Journal.* 2008, vol. 54, issue 4, pp. 712-732.
13. RUTH, S. M. *Aroma measurement: Recent developments in isolation and characterisation*. Physics and Chemistry Basis of Biotechnology. Kluwer Academic Publisher, 2001. pp. 305-328. ISBN 0-7923-7091-0.
14. NEUGEBAUEROVÁ, J. *Pěstování léčivých a kořeninových rostlin.* 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. 122 s. ISBN 80-7157-997-1.
15. MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A*. 2002, vol. 967, issue 1, pp. 115-130. ISSN 0021-9673.
16. VONÁŠEK, F., TREPKOVÁ, E., NOVOTNÝ, L. *Látky vonné a chuťové*. Praha: SNTL – Státní nakladatelství technické literatury, 1987. 437 s.
17. HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., REIGLOVÁ, J. *Analýza potravin.* 2. vyd. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2001. 101 s. ISBN 80-86494-02-0.
18. STARÝ, F. *Citrusové silice* [online]. 14.12.2006. [cit. 21.4.2010]. Dostupné z WWW: <http://mladazena.maminka.cz/assets/mlada-zena/dieta/prirodni-lekarna/citrusy_200.jpg>.

19. DUCHOVÁ, I. *Využití rostlin z čeledi Hluchavkovité (Lamiaceae).* Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2008. 87 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Mudr. Jan Šimůnek, CSc.
20. SURBURG, H., PANTEN, J. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses.* 5th completely revised and enlarget edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2006. 318 p. ISBN 978-3-527-31315-0.
21. PRUDEL, M. Aromata pro průmyslovou výrobu potravin. *Potravinárská Revue*. AGRAL s. r. o., 2007, č. 1, s. 27-31.
22. WINKLEROVÁ, D., RUPRICH, J., OSTRÝ, V. Aromatické látky v potravinách. [online]. *Vědecký výbor pro potraviny*. 27. 12. 2007. [cit. 14.4.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/info_2007_25_deklas_AROMA.pdf>.
23. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3.* 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.
24. HRDINA, V., HRDINA, R., JAHODÁŘ, L., MARTINEC, Z., MĚRKA, V. *Přírodní toxiny a jedy.* Praha: Galén a Karolinum, 2004. 302 s.
25. BRIDGES, B. Fragrance: emerging health and environmental concerns. *Flavour and Fragrance Journal.* 2002, vol. 17, issue 5, pp. 361-371. ISSN 0882-5734.
26. SALVADOR, A., CHISVERT, A. *Analytical methods to determine potentially allergenic fragrance-related substances in cosmetic.* Analysis of Cosmetic Products. Ed. Elsevier, 2007. 487 p. ISBN 978-0-444-52260-3.
27. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/15/ES o sbližování právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků, v platném znění.
28. MITSUI, T. Cosmetics and fragrances. *New Cosmetic Science.* Ed. Elsevier, 1997. 499 p. ISBN 978-0-444-82654-1.
29. *PubChem.* [databáze online]. 2004. [cit. 15.3.2010]. Dostupné z WWW: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
30. MATHELIER-FUSADE, P. Alergie aux parfums: quels tests pour quels conseils? *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.* 2009, vol. 49, issue 4, pp. 366-370. ISSN 0335-7457.
31. KRATOCHVÍL, F. *Epikutánní testy* [online]. 2007 [cit. 15.3.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.epitesty.cz/default.asp?inc=fset>.
32. BICKERS, D. R., CALOW, P., GREIM, H. A., HANIFIN, J. M., ROGERS, A. E., SAURAT, J. H., SIPES, I. G., SMITH, R. L., TAGAMI, H. The safety assessment of fragrance materials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2003. vol. 37, issue 2, pp. 218-273. ISSN 0273-2300.
33. SILVA, C. B., GUTERRES S. S., WEISHEIMER, V., SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2008, vol. 12, no. 1. ISSN 1413-8670.
34. LAMBE, J., CADBY, P, GIBNEY, M. Comparison of stochastic modelling of the intakes of intentionally added flavouring substances with theoretical added maximum daily intakes (TAMDI) and maximized survey-derived daily intakes (MSDI). *Food Additives and Contaminants.* 2002, vol. 19, issue 1, pp. 2-14. ISSN 1944-0049.
35. ŠTOLCOVÁ, M. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny.* 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2006. 75 s. ISBN 80-213-1567-9.

36. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology.* 2004, vol. 94, issue 3, pp. 223-253. ISSN 0168-1605.
37. LAI, P. K., ROY, J. Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices. *Current Medicinal Chemistry.* 2004, vol.11, no. 11, pp. 1454-1460. ISSN 0929-8673.
38. TAN, B. K. H, VANITHA, J. Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: a Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2004, vol. 11, no. 11, pp. 1423-1430. ISSN 0929-8673.
39. Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance [online]. *Vědecký výbor pro potraviny.* 19. 11. 2003. [cit. 14.4.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/alerg_2003_3_deklas.pdf>.
40. WATSON, D. H. *Food Chemical Safety, Volume 2 – Additives.* Woodhead Publishing, 2001. 308 p. ISBN 978-1-85573-563-7.
41. TAMAGAWA-MINEOKA, R., KATOH, N., KISHIMOTO, S. Allergic contact cheilitis due to geraniol in food. *Contact Dermatitis.* 2007, vol. 56, pp. 242-243. ISSN 0105-1873.
42. KARLOVÁ, I., VIKTORINOVÁ, M., BIENOVÁ, M. Exacerbace kontaktní alergické dermatitidy po perorálním požití alergenu. *Dermatologie pro praxi.* 2008, č. 2, s. 41-42. ISSN 1802-2960.
43. VIKTORINOVÁ, M. Kontaktní kopřivky. *Dermatologie pro praxi.* 2008, č. 2, s. 16-18. ISSN 1802-2960.
44. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, v platném znění.
45. CIGIC, I. K., ZUPANCIC-KRALJ, L. Changes in odour of bartlett pear brandy influenced by sunlight irradiation. *Chemosphere*. 1999, vol. 38, no. 6, pp. 1299-1303. ISSN 0045-6535.
46. PALIYATH, G., WHITING, M. D., STASIAK, M. A., MURR, D. P., CLEGG, B. S. Volatile production and fruit quality during development of superficial scald in Red Delicious apples. *Food Research International*. 1997. vol. 30, issue 2, pp. 95-103. ISSN 0963-9969.
47. BOUDHRIOUA, N., GIAMPAOLI, P., BONAZZI, C. Changes in aromatic components of banana during ripening and air-drying. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology.* 2003, vol. 36, issue 6, pp. 633−642. ISSN 0023-6438.
48. IBÁÑEZ, E., LÓPEZ-SEBASTIÁN, S., RAMOS, E., TABERA, J., REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry.* 1998, vol. 63, issue 2, pp. 281-286. ISSN 0308-8146.
49. AUGUSTO, F., VALENTE, A. L. P., TADA, E. S., RIVELLINO, S. R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2000, vol. 873, issue 1, pp. 117-127. ISSN 0021-9673.
50. MAZIDA, M. M., SALLEH, 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, vol. 18, issue 5, pp. 427-437. ISSN 0889-1575.

51. BERNA, A. Z., LAMMERTYN, J., SAEVELS, S., NATALE, C., NICOLAI, B. M. Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile. *Sensors and Actuators B.* 2004, vol. 97, issues 2-3, pp. 324−333. ISSN 0925-4005.
52. KANAVOURAS, A., KIRITSAKIS, A., HERNANDEZ, R. J. Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chemistry.* 2005, vol. 90, issues 1-2, pp. 69−79. ISSN 0308-8146.
53. TURA, D., PRENZLER, P. D., BEDGOOD, D. R., ANTOLIVICH, M., ROBARDS, K. Varietal and processing effects on the volatile profile of Australian olive oils. *Food Chemistry.* 2004, vol. 84, issue 3, pp. 341-349. ISSN 0308-8146.
54. BISWAS, S., HEINDSELMEN, K., WOHLTJEN, H., STAFF, C. Differentiation of vegetable oils and determination of sunflower oil oxidation using a surface acoustic wave sensing device. *Food Control.* 2004, vol. 15, issue 1, pp. 19-26. ISSN 0956-7135.
55. POVOLO, 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, vol. 985, issues 1-2, pp. 117-125. ISSN 0021-9673.
56. SERVILI, M., SELVAGGINI, R., TATICCHI, A., BEGLIOMINI, A. L., MONTEDORO, G. F. 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, vol. 71, issue 3, pp. 407-415. ISSN 0308-8146.
57. BOSCH-FUSTÉ, J., RIU-AUMATELL, M., GUADAYOL, J. M., CAIXACH, J., LÓPEZ-TAMAMES, E., BUXADERAS, S. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*. 2007, vol. 105, issue 1, pp. 428-435. ISSN 0308-8146.
58. SORIA, A. C., GONZALEZ, M., LORENZO, C., MARTINEZ-CASTRO, I., SANZ, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry.* 2004, vol. 85, no. 1, pp. 121-130. ISSN 0308-8146.
59. CAI, J., LIU, B., SU, Q. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. *Journal of Chromatography A.* 2001, vol. 930, issuee 1-2, pp. 1-7. ISSN 0021-9673.
60. WILLIAMS, A., RYAN, D., GUASCA, A. O., MARRIOTT, P., PANG, E. Analysis of strawberry volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography with headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography B.* 2005, vol. 817, issue 1, pp. 97-107. ISSN 1570-0232.
61. GRISON-PIGÉ, L., HOSSAERT-McKEY, M., GREEFF, J. M., BESSIÉRE, J. M. Fig volatile compounds-a first comparative study. *Phytochemistry*. 2002, vol. 61, issue 1, pp. 61-71. ISSN 0031-9422.
62. LAVILLA, T., RECASENS, I., LOPEZ, M. L., PUY, J. Multivariate analysis of maturity stages, including quality and aroma, in „Royal Glory“ peaches and „Big Top“ nectarines. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2002, vol. 82, no. 15 , pp. 1842-1849. ISSN 0022-5142.

63. KOCSIS, N., AMTMANN, M., MEDNYÁNSZKY, Z., KORÁNY, K. GC-MS Investigation of the Aroma Compounds of Hungarian Red Paprika (*Capsicum annuum*) Cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2002, vol. 15, issue 2, pp. 195-203. ISSN 0889-1575.
64. BORSE, B. B., RAO, L. J. M., NAGALAKSHMI, S., KRISHNAMURTHY, N. Fingerprint of black teas from India: identification of the regio-specific characteristics. *Food Chemistry.* 2002, vol. 79, issue 4, pp. 419-424. ISSN 0308-8146.
65. TOGARI, N., KOBAYASHI, A., AISHIMA, T. Pattern recognition applied to gas chromatographic profiles of volatile components in three tea categories. *Food Research International.* 1995, vol. 28, issue 5, pp. 495-502. ISSN 0963-9969.
66. CORTÉS, S., GIL, M. L., FERNÁNDEZ, E. Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits. *Food Control.* 2005, vol. 16, issue 4, pp. 383-388. ISSN 0956-7135.
67. EGGERS, N., KENEFICK, S., RICHARDSON, S., WIGGLESWORTH, T., GIRARD, B. Evaluation of closed-loop stripping for the isolation of wine aroma compounds from aqueous solution. *Americal Journal of Enology and Viticulture.* 2003, vol. 54, issue 2, pp. 92-98. ISSN 0002-9254.
68. VERSARI, A., NATALI, N., RUSSO, M. T., ANTONELLI, A. Analysis of some Italian lemon liquors (Limoncello). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, issue 17, pp. 4978-4983.
69. COSTA, N. C., ANASTASIOU, T. J. *Flavors in Noncarbonated Beverages.* Analysis of Volatile in Limoncello Liqueur and Aging Study with Sensory. 2010, chapter 13, pp. 177-193. ISBN 13: 9780841225510.
70. ALPENDURADA, M. Solid-phase microextraction: a promising technigue for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 889, issues 1-2, pp. 3-14. ISSN 0021-9673.
71. Katalog Sigma-Aldrich. *Mikroextrakce tuhou fází SPME*. [online]. [cit. 10.4. 2010]. Dostupné z WWW: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/11.Par.0001.File.tmp/11.pdf>.
72. PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH, 1997, 247 p. ISBN 0-471-19034-9.
73. PAWLISZYN, J., PAWLISZYN, B., PAWLISZYN, M. Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator*. 1997, vol. 2, issue 4, pp. 1-7. ISSN 1430-4171.
74. HOLT, R. U. Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, vol. 937, issues 1-2, pp. 107-114. ISSN 0021-9673.
75. WARDENCKI, W., MICHULES, M., CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science & Technology*. 2004, vol. 39, issue 7, pp. 703-717.
76. KATAOKA, H., LORD, H. L., PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 880, issues 1-2, pp. 35-62. ISSN 0021-9673.

77. SAISON, D., SCHUTTER, D. P., DELVAUX, F., DELVAUX, F. R. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol. 1190, issues 1-2, pp. 342-349. ISSN 0021-9673.
78. ACHOURI, A., BOYE, J. I., ZAMANI, Y. Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chemistry*. 2006, vol. 99, issue 4, pp. 759-766. ISSN 0308-8146.
79. MIRHOSSEINI, H., TAN, CH. P., YUSOF, S., NAZIMAH, S. A. H. Solid-phase microextraction for determining twelve orange flavour compounds in a model beverage emulsion. *Phytochemical Analysis.* 2008, vol. 19, issue 5, pp. 429-437.
80. FANG, Y., QIAN, M. C. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1080, issue 2, pp. 177-185. ISSN 0021-9673.
81. LORD, H., PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 885, issues 1-2, pp. 153-193. ISSN 0021-9673.
82. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
83. SOMMER, L. a kol. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
84. CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek.* 1. vyd. Praha: SNTL – Státní nakladatelství technické literatury, 1990. 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
85. *Plynová chromatografie.* Aplikační list – Plynová chromatografie s HiQ® speciálními plyny. The Linde Group. [online]. 2009. [cit. 16.4.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.linde-gas.cz/international/web/lg/cz/like35lgcz.nsf/ repositorybyalias/pdf_plynova_chromatografie/$file/Plynova_chromatografie.pdf>.
86. *Plamenoionizační detektor.* Aplikační list - HiQ® speciální plyny v plynové chromatografii. The Linde Group. [online]. 2009. [cit. 16.4.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.linde-gas.cz/international/web/lg/cz/like35lgcz.nsf/ repositorybyalias/pdf_plamenoionizacni_detektor/>.
87. VOLKA, K. a kol. *Analytická chemie II.* Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80 7080-227-8.
88. ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
89. SUCHÁNEK, M., PLZÁK, Z., ŠUBRT, P., KORUNA, I. *Kvalimetrie 7. Validace analytických metod*. Praha: EURACHEM-ČR, 1997. 137 s. ISBN 80-901868-2-3.
90. *Validační program pro statistické zpracování analytických dat.* [online]. [cit. 12.4.2010]. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Validace/index.htm>.
91. BAREK, J., et al. Nomenklatura a terminologie. Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy 94*, 2000, č. 7, s. 439-444. ISSN 1213-7103.
92. HENDL, J. *Přehled statistických metod zpracování dat.* Praha: Portál, 2004. 584 s. ISBN 80-7178-820-1.
93. ZELNÍČKOVÁ, H. *Vývoj a validace metody stanovení reziduí některých hormonálně účinných látek v biologickém materiálu metodou GC/MS.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2008. 86 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Libor Rejthar.

94. BABÁK, L. *Biostatistika - přednášky* . [online]. VUT Brno, 2010. [cit. 12.4.2010]. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/elearning/course/view.php?id=89723>.
95. MOKÁŇOVÁ, R. *Analýza vonných látek v kosmetických prostředcích metodou plynové chromatografie.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009. 92 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.
96. JELÍNKOVÁ, M. *Stanovení vonných látek rostlinného původu v potravinách.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009. 79 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
97. ŠTOURAČOVÁ, A. *Vliv podmínek a doby skladování na obsah aromaticky aktivních látek ve sterilovaných tavených sýrech.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2008. 70 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
98. MALINA, L. *Vliv aromaticky aktivních látek na chutnost ovocných jogurtů.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2008. 81 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CAR	Carboxen
CAS	*Chemical Abstracts Service,* Databáze chemických látek
CoE	*Council of Europe*, Rada Evropy
CLSA/GC-MS	*Closed-loop stripping analysis/gas chromatography-mass spectrometry*, „Closed-loop stripping“ analýza ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem
DHS/GC-FID	*Dynamic headspace/gas chromatography-flame ionization detector*, Dynamická headspace ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem
DHS/GC-MS	*Dynamic headspace/gas chromatography-mass spectrometry*, Dynamická headspace ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem
DI/GC-FID	*Direct injection/gas chromatography-flame ionization detector*, Přímý nástřik/plynovová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
DI/GC-MS	*Direct injection/gas chromatography-mass spectrometry*, Přímý nástřik/plynovová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
EC	*European Commission*, Evropská komise
ECD	*Electron capture detector*, Detektor elektronového záchytu
EFSA	*European Food Safety Autority*, Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EHS	Evropské hospodářské společenství
EK	Evropská komise
ES	Evropské společenství
EU	Evropská unie
FID	*Flame ionization detector*, Plamenově ionizační detektor
GC	*Gas chromatography*, Plynová chromatografie
GC-MS	*Gas chromatography-mass spectrometry*, Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HS	*Static headspace*, Statická headspace
HS-SPME/GC-MS	*Headspace-solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry,* Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem
HS-SPME/GC-FID	*Headspace-solid phase microextraction/gas chromatography-flame ionization detector*, Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem
HS-SPME/GC/GC-FID	*Headspace-solid phase microextraction/two-dimensional gas chromatography-flame ionization detector*, Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s dvourozměrnou plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem
HS-SPME/GC-O	*Headspace-solid phase microextraction/gas chromatography-olfactometric analysis detector*, Headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií-olfaktometrií

INCI	*International Nomenclature for Cosmetic Ingredients*, Mezinárodní názvosloví pro označování ingrediencí na kosmetických prostředcích
LAKR	Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny
LLE/GC-MS	*Liquid-liquid extraction/gas chromatography-mass spectrometry*, Extrakce kapalina-kapalina ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem
LLE/GC-FID	*Liquid-liquid extraction/gas chromatography-flame ionization detector*, Extrakce kapalina-kapalina ve spojení s plynovou chromatografií a plamenově ionizačním detektorem
LOD	*Limit of Detection*, Mez detekce
LOQ	*Limit of Quantification*, Mez stanovitelnosti
MSDI	*Maximized Survey-Derived Daily Intake*, Maximální denní příjem odvozený z průzkumu (specifická metoda)
m-TAMDI	*modified-Theoretical Added Maximum Daily Intake*, Modifikovaný teoretický maximální přidaný denní příjem
NM	Nezbytné množství
NPM	Nejvyšší přípustné množství
O/V	Emulze typu olej ve vodě
PASs	*Potentially Allergenic Substances*, Potenciálně alergenní substance
PDMS	Polydimethylsiloxan
RSD	*Relative standard deviation*, Relativní směrodatná odchylka
SCCP	*Scientific Committee on Consumer Products*, Vědecký výbor pro spotřební zboží
SCCPNFP	*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products*, Vědecký výbor pro kosmetické produkty a nepotravinové produkty určené spotřebitelům
SDE/GC-MS	*Simultaneous distillation extraction/gas chromatography-mass spectrometry*, Simultánní destilační extrakce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem
SDE/GC-FID	*Simultaneous distillation extraction/gas chromatography-flame ionization detector*, Simultánní destilační extrakce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem,
SPME	*Solid phase microextraction*, Mikroextrakce tuhou fází
TAMDI	*Theoretical Added Maximum Daily Intake,* Teoretický maximální přidaný denní příjem
TCD	*Thermal conductivity detector*, Tepelně vodivostní detektor
TD/GC-MS	*Thermal desorption/gas chromatography-mass spectrometry*, Tepelná desorpce ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Avokádo – Špagety.

Příloha II: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Becherovka Lemond

Příloha III: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bon Pari

Příloha IV: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Dilmah Strawberry

Příloha V: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. HALLS Blackcurrant

Příloha VI: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Hamánek Borůvka

Příloha VII: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Lipo

Příloha VIII: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Millenium Vital

Příloha IX: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Nestea Peach

Příloha X: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Orbit Watermelon

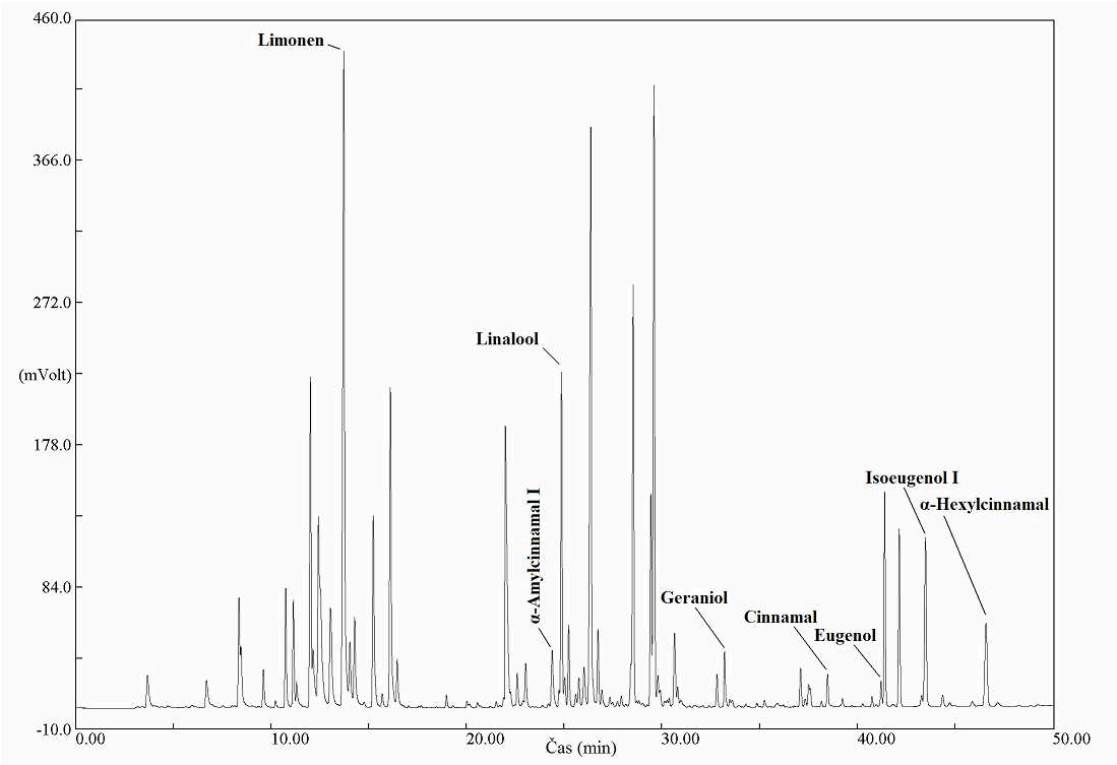
Příloha XI: Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. PICKWICK Cranberry & Raspberry

Příloha XII: Aparatura pro sorpci analytů na SPME vlákno

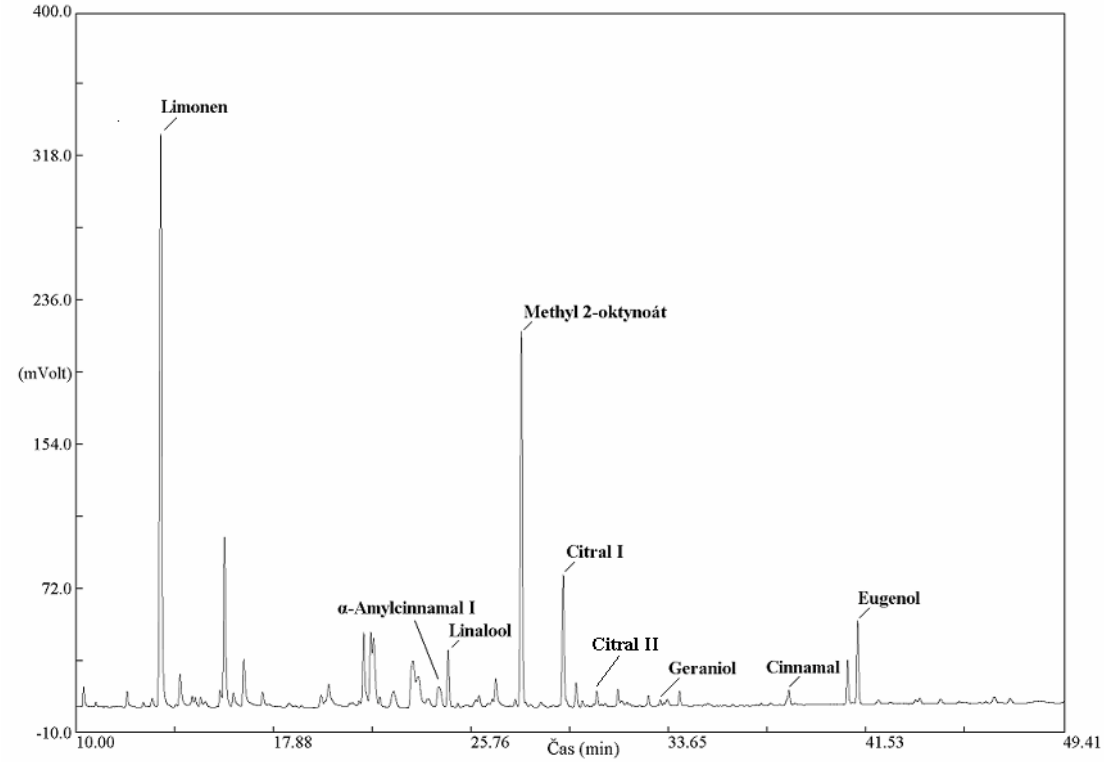
Příloha XIII: Plynový chromatograf TRACE GC 2000 s plamenově ionizačním detektorem při probíhající desorpci analytů z SPME vlákna do GC

9 PŘÍLOHY

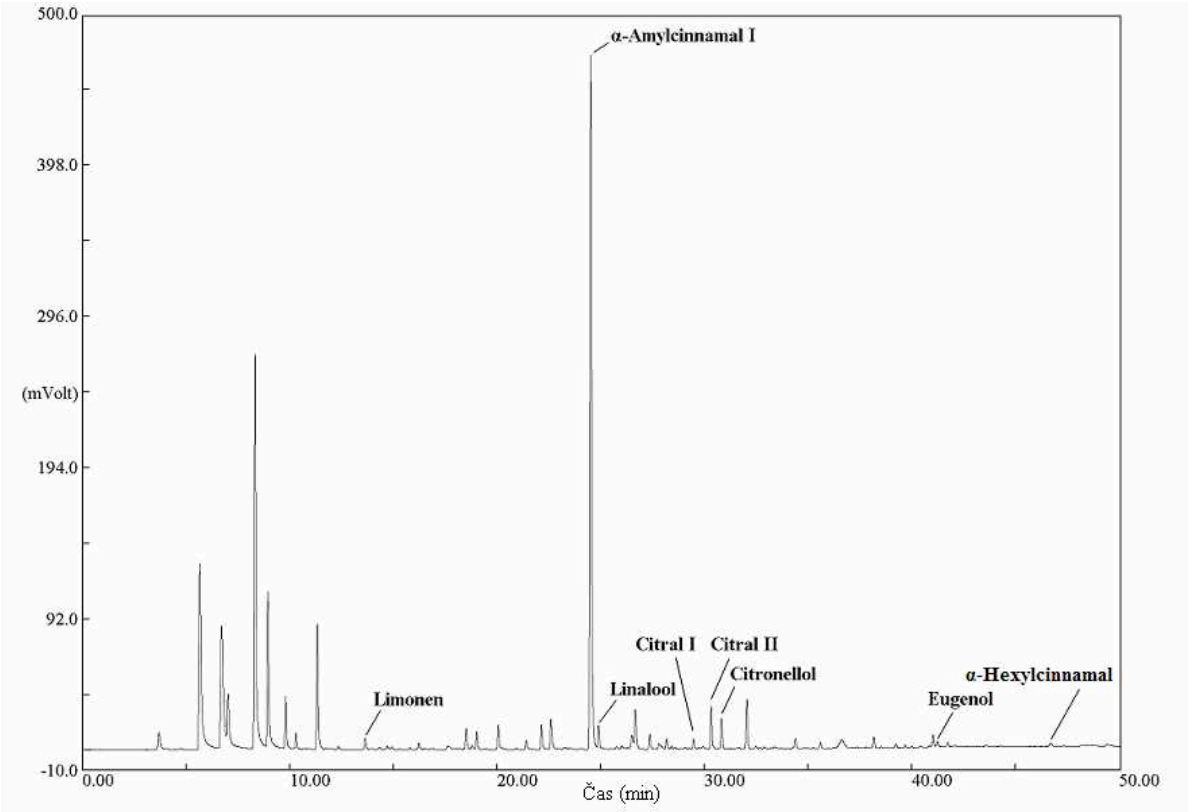
Příloha I: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Avokádo – Špagety.*



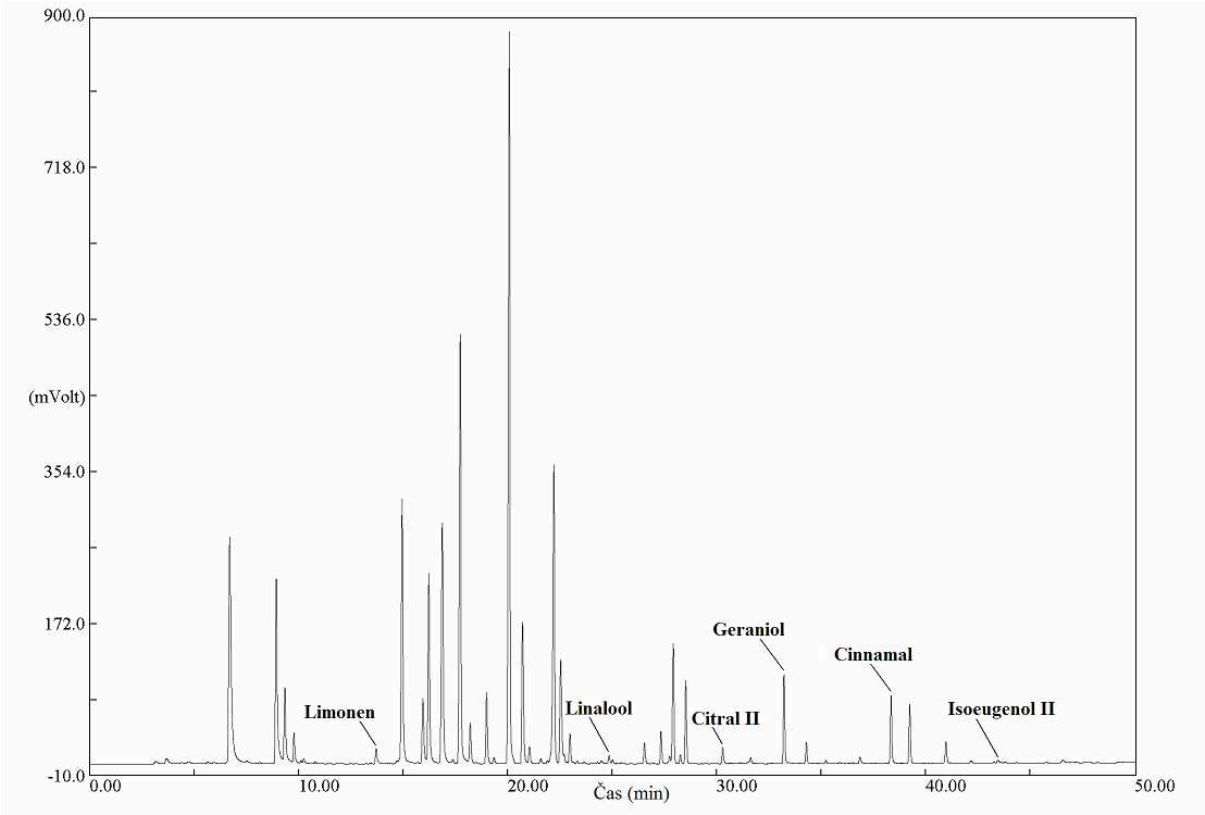
Příloha II: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Becherovka Lemond*



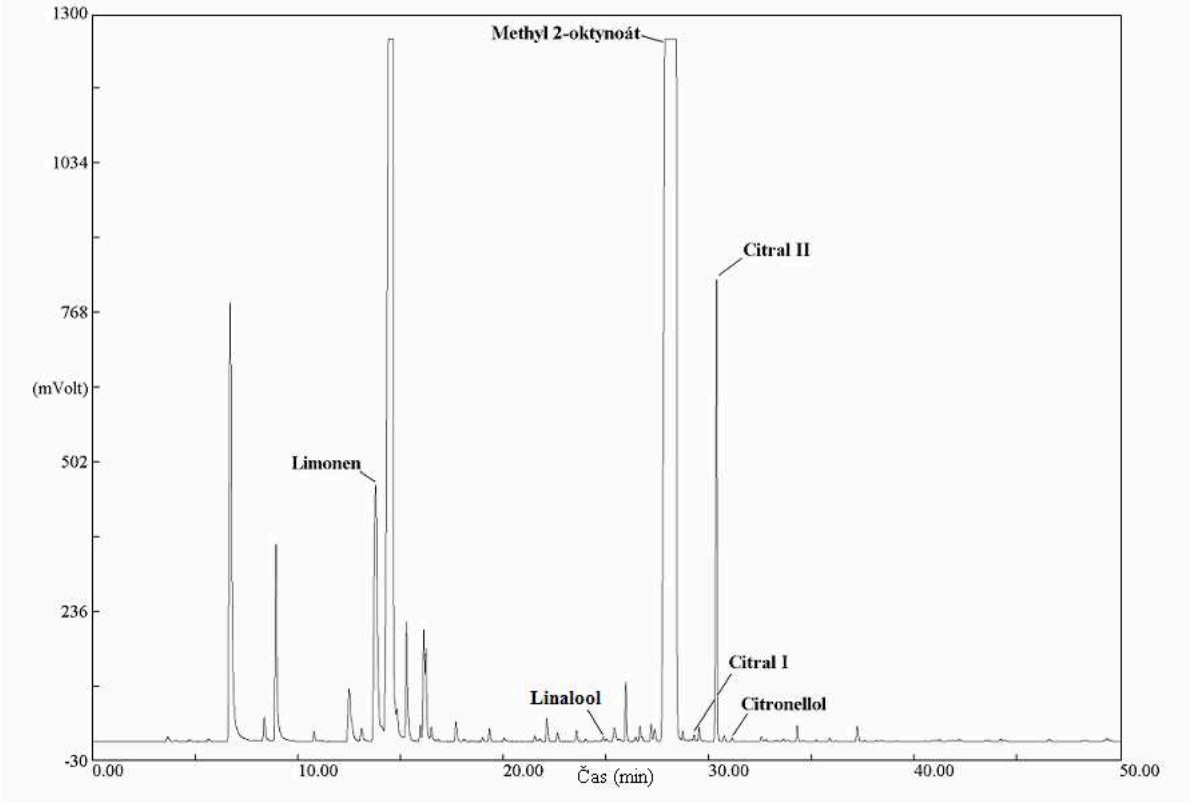
Příloha III: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Bon Pari*



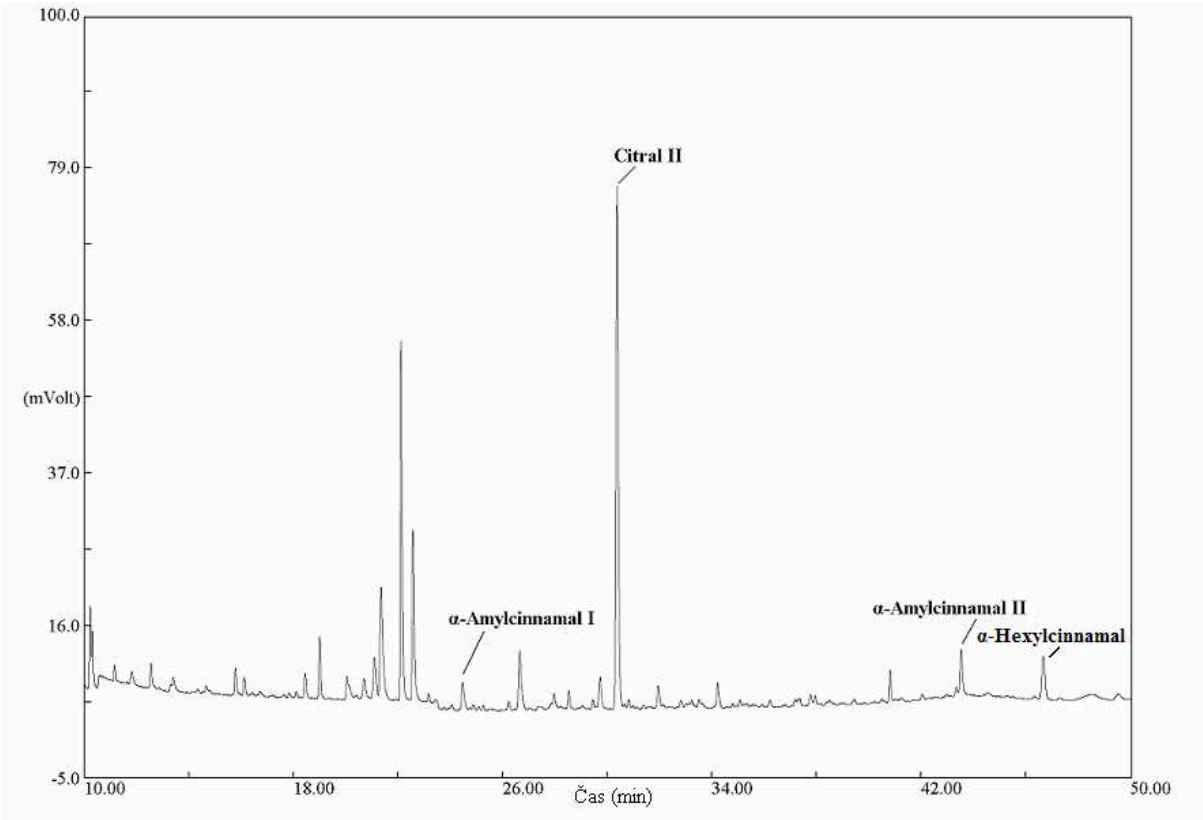
Příloha IV: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Dilmah Strawberry*



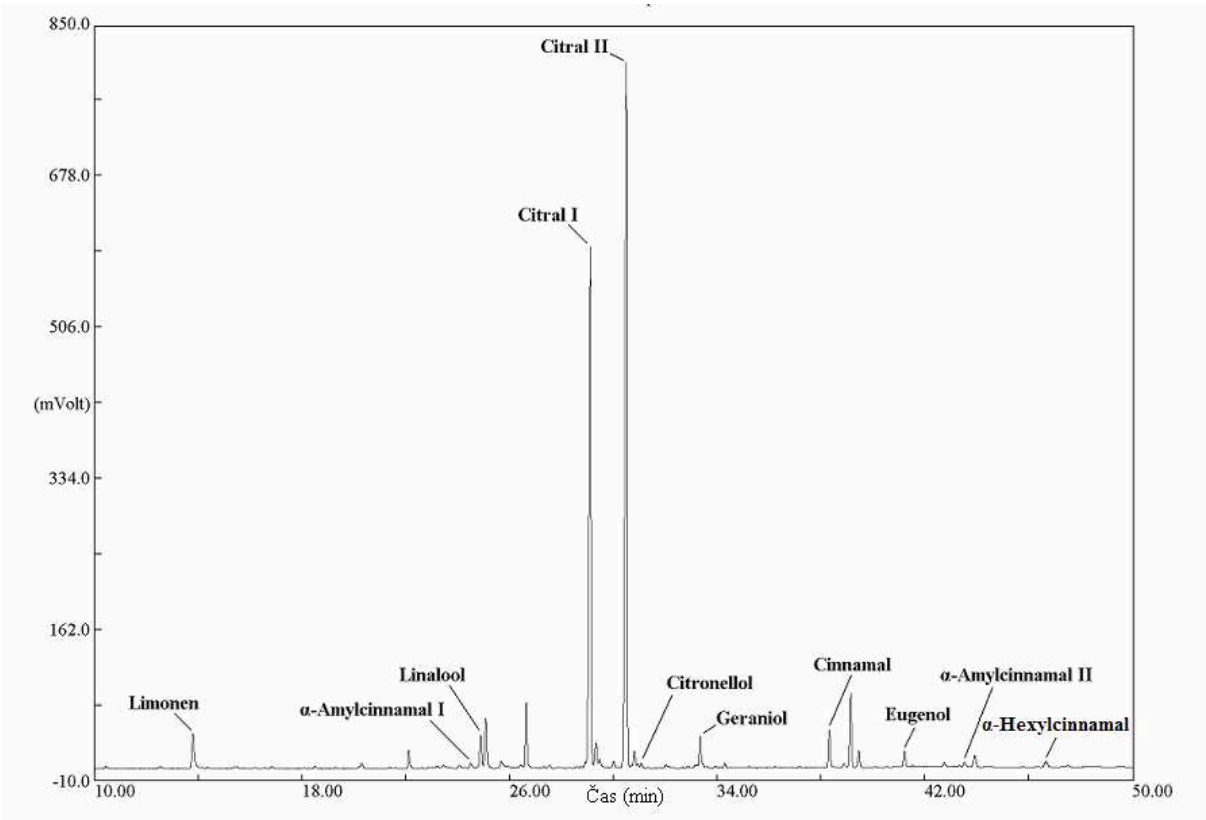
Příloha V: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. HALLS Blackcurrant*



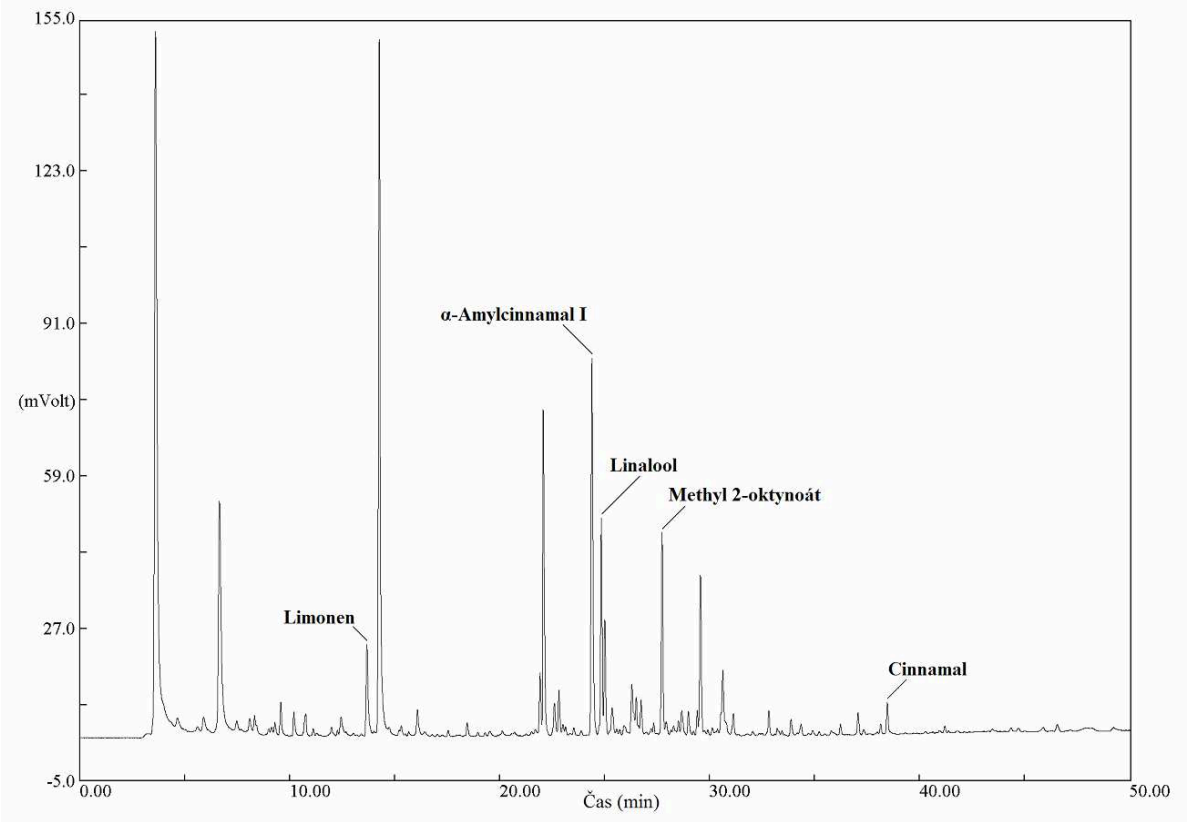
Příloha VI: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Hamánek Borůvka*



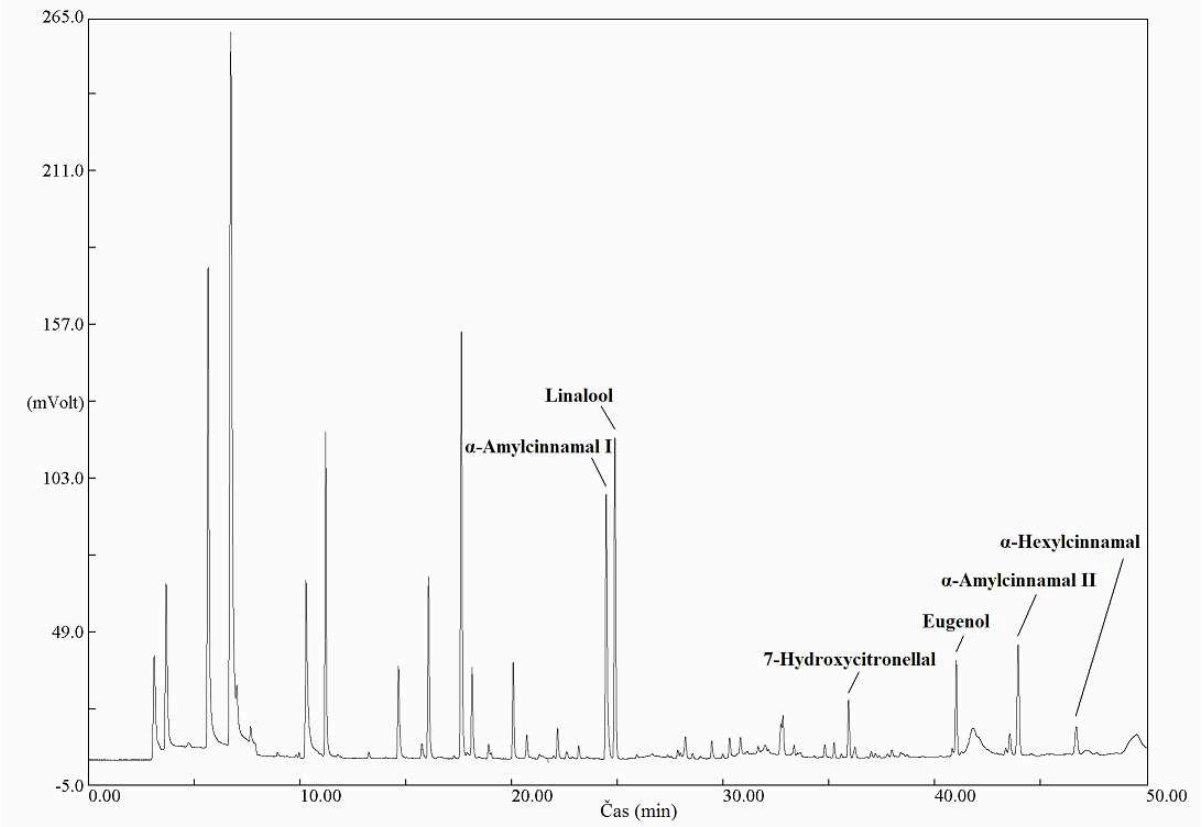
Příloha VII: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Lipo*



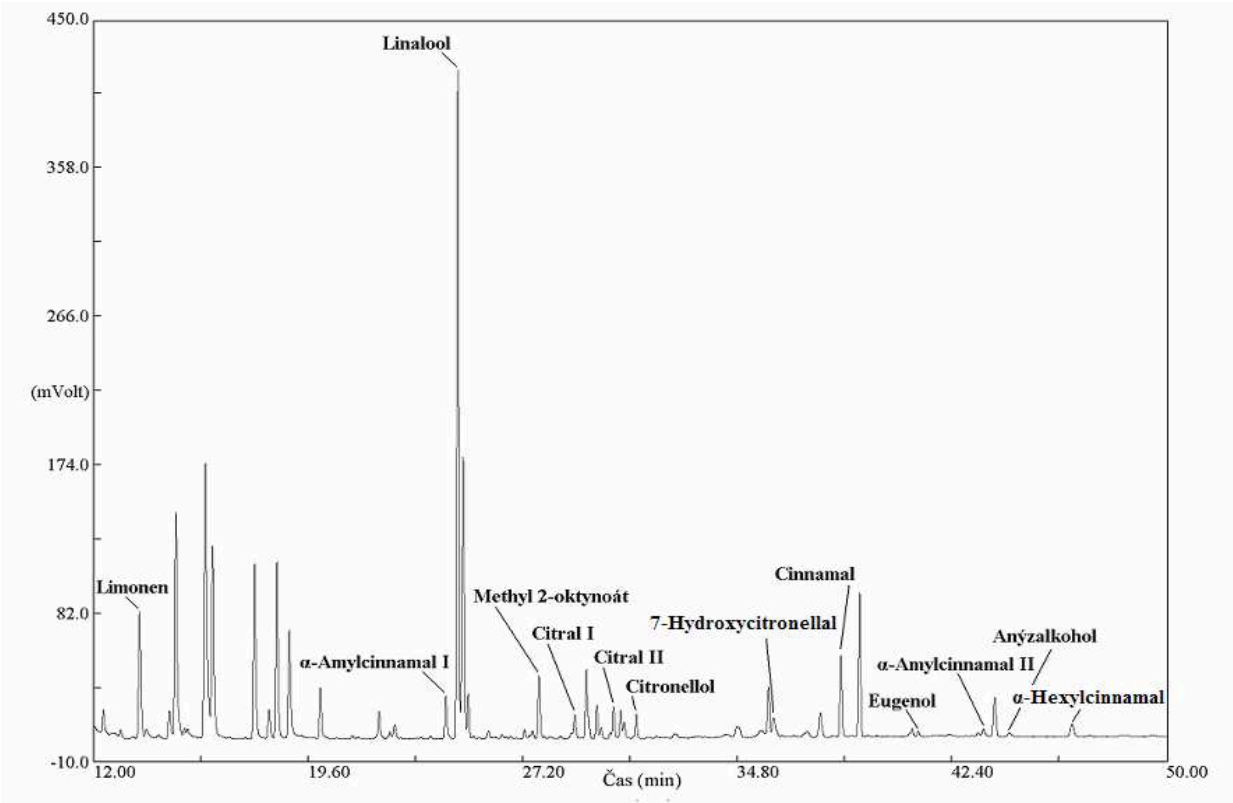
Příloha VIII: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Millenium Vital*



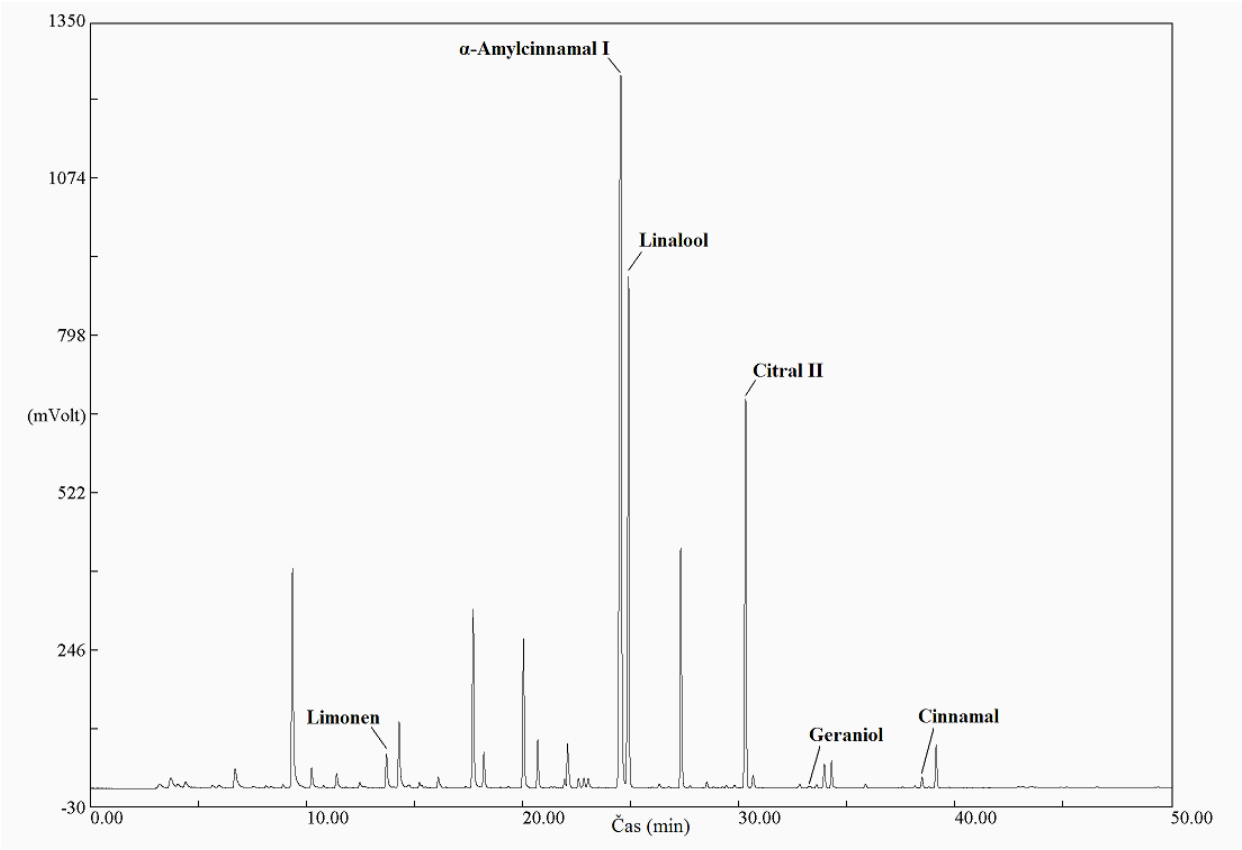
Příloha IX: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Nestea Peach*



Příloha X: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. Orbit Watermelon*



Příloha XI: *Chromatogram identifikovaných alergenních vonných látek. PICKWICK Cranberry & Raspberry*



Příloha XII: *Aparatura pro sorpci analytů na SPME vlákno*

Příloha XIII: *Plynový chromatograf TRACE GC 2000 s plamenově ionizačním detektorem při probíhající desorpci analytů z SPME vlákna do GC*