

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza sloučenin fosforu jako konzervantů a reziduí v produktech  
potravinářské chemie pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Svitáková**  
Osobní číslo: **C18105**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Analýza sloučenin fosforu jako konzervantů a reziduí v produktech potravinářské chemie pomocí 31P NMR spektroskopie**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
2. Metodologicky prozkoumat možnosti techniky.
3. Naměřit a srovnat 31P NMR spektra zájmových typů sloučenin.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Dle aktuální rešerše v databázích WoS a SciFinder.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Aleš Růžička, Ph.D.**  
Katedra obecné a anorganické chemie  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Petr Švec, Ph.D.**  
Katedra obecné a anorganické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza sloučenin fosforu jako konzervantů a reziduí v produktech potravinářské chemie pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. července 2021

Martina Svitáková v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé poděkování patří prof. Ing. Aleši Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu při vypracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petru Švecovi, Ph.D. za konzultace, rady, NMR analýzy a čas, který mi věnoval.

Nesmím zapomenout ani na Ing. Pavla Kozáčka, kterému děkuji za cenné rady a opravy překlepů při šálku dobrého čaje. Dále děkuji svým přátelům a rodině za podporu během studia.

## **ANOTACE**

V rámci této bakalářské práce bylo zakoupeno 8 nápojů „colového“ typu a jedna čistě přírodní jablečná šťáva. U všech těchto nápojů byla nejdříve změřena jejich elektrická vodivost a jejich pH. Z odparků jednotlivých nápojů byly připraveny vzorky v D<sub>2</sub>O a DMSO-d<sub>6</sub> pro <sup>1</sup>H a <sup>31</sup>P NMR spektroskopii. Na základě změřených <sup>1</sup>H NMR spekter bylo porovnáváno skutečné složení nápoje se složením deklarovaným výrobcem. Pomocí <sup>31</sup>P NMR spektroskopie byla poté ověřována přítomnost kyseliny fosforečné ve všech nápojích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

konzervanty, kyselina fosforečná, NMR spektroskopie, „colové“ nápoje

## **TITLE**

Analysis of phosphorus compounds as conservants and residua in food chemistry by the help of <sup>31</sup>P NMR spectroscopy

## **ANNOTATION**

Within this Bachelor thesis, 8 drinks of the "cola" type and one pure natural apple juice were purchased. For all these drinks, their electrical conductivity and their pH were first measured. Samples in D<sub>2</sub>O and DMSO-d<sub>6</sub> for <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy were prepared from individual drink residua. Based on the measured <sup>1</sup>H NMR spectra, the actual composition of the drink was compared with that declared by the producer. The presence of phosphoric acid in all drinks was then verified by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy.

## **KEYWORDS**

preservatives, phosphoric acid, NMR spectroscopy, "cola" drinks

# OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....</b>	<b>9</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....</b>	<b>11</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>13</b>
1.1. Konzervace potravin .....	13
1.1.1. Konvenční metody konzervace potravin.....	13
1.1.2. Potencionální metody konzervace potravin .....	17
1.1.3. Kombinované metody konzervace potravin .....	18
1.2. Fosfor jako biogenní prvek v lidském těle.....	19
1.2.1. Metabolismus fosforu .....	19
1.2.2. Hyperfosfatémie.....	20
1.2.3. Fosfor v potravinách .....	20
1.3. Sacharóza .....	27
1.4. Nukleární magnetická rezonance .....	28
1.4.1. Princip měření .....	29
1.4.2. Stínění .....	29
1.4.3. Chemický posun.....	30
1.4.4. Spin-spinové interakce .....	30
1.4.5. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR.....	30
<b>2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>32</b>
2.1. Studované nápoje .....	32
2.1.1. Pepsi Max.....	32
2.1.2. Coca Cola Zero .....	32
2.1.3. Kofola <sup>®</sup> .....	32
2.1.4. Cola 0 % cukru.....	32
2.1.5. Pepsi.....	32
2.1.6. Royal Crown Cola.....	33
2.1.7. Royal Crown Slim Cola .....	33
2.1.8. Coca Cola.....	33
2.1.9. Pure Juice 100 % Apples .....	33
2.2. Použité chemikálie a použitá rozpouštědla .....	33
2.3. Měření pH a elektrické vodivosti nápojů .....	33

2.4.	Zpracování a příprava NMR vzorků .....	34
2.4.1.	NMR spektroskopie .....	34
<b>3.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>35</b>
3.1.	pH, elektrická vodivost a příprava vzorků nápojů .....	35
3.2.	$^1\text{H}$ NMR spektroskopie .....	37
3.3.	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektroskopie .....	46
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>51</b>



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Metody konzervování potravin .....	13
Obrázek 2: Vzorec kyseliny fytové .....	21
Obrázek 3: Příklad struktury lecitinu .....	22
Obrázek 4: Mechanismus inverze sacharózy .....	28
Obrázek 5: Schéma NMR spektrometru .....	29
Obrázek 6: Definice chemického posunu .....	30
Obrázek 7: Chemické posuny vybraných sloučenin fosforu .....	31
Obrázek 8: Naměřené $^1\text{H}$ NMR spektrum glukózy .....	38
Obrázek 9: Naměřené $^1\text{H}$ NMR spektrum glukózového sirupu .....	38
Obrázek 10: Naměřené $^1\text{H}$ NMR spektrum čistého stolního cukru (sacharózy) v $\text{D}_2\text{O}$ .....	39
Obrázek 11: Naměřené $^1\text{H}$ NMR spektrum čisté fruktózy v $\text{D}_2\text{O}$ .....	39
Obrázek 12: $^1\text{H}$ NMR spektrum acesulfamu K v $\text{DMSO-d}_6$ .....	40
Obrázek 13: $^1\text{H}$ NMR spektrum aspartamu v $\text{DMSO-d}_6$ .....	40
Obrázek 14: $^1\text{H}$ NMR spektrum sodné soli cyklamátu v $\text{DMSO-d}_6$ .....	41
Obrázek 15: $^1\text{H}$ NMR spektrum sacharinu v $\text{DMSO-d}_6$ .....	41
Obrázek 16: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Pepsi Max v $\text{D}_2\text{O}$ .....	42
Obrázek 17: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Coca Cola Zero v $\text{D}_2\text{O}$ .....	43
Obrázek 18: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Kofoly <sup>®</sup> v $\text{D}_2\text{O}$ .....	43
Obrázek 19: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Cola 0 % cukru v $\text{D}_2\text{O}$ .....	44
Obrázek 20: Porovnání $^1\text{H}$ NMR spekter odparků Pepsi a Kofoly <sup>®</sup> v $\text{D}_2\text{O}$ .....	44
Obrázek 21: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Royal Crown Cola v $\text{D}_2\text{O}$ .....	45
Obrázek 22: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Royal Crown Slim Cola v $\text{D}_2\text{O}$ .....	45
Obrázek 23: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Coca Cola v $\text{D}_2\text{O}$ .....	46
Obrázek 24: $^1\text{H}$ NMR spektrum odparku Pure Juice 100 % Apples v $\text{D}_2\text{O}$ .....	46
Obrázek 25: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum odparku Coca Cola Zero. ....	48
Obrázek 26: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum odparku Coca Cola .....	48
Obrázek 27: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum odparku Kofoly změřené na TBI sondě a na Prodigy kryosondě .....	49
Tabulka 1: Nejbohatší zdroje fosforu v českých potravinách .....	20
Tabulka 2: Sloučeniny fosforu používané v ČR jako aditiva .....	22
Tabulka 3: Maximální množství aditiv v konkrétních potravinách .....	24

Tabulka 4: Přehled zkoumaných nápojů, hodnot jejich pH, el. vodivosti a vybraných NMR parametrů .....	35
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATP	Adenosintrifosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
GTP	Guanosintrifosfát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OP	Organofosforečné pesticidy
QS	Quantum satis
TMS	Tetramethylsilan
UHT	Ultra-high temperature

## ÚVOD

Konzervace potravin je důležitá k udržení potravin na požadované úrovni kvality. Stav potravin bývá zhoršován různými faktory, a proto je důležité zvolit vhodnou konzervační metodu. Na základě účinku můžeme zvolit inhibici chemické degradace, přímou inaktivaci mikroorganismů, nebo zamezení rekontaminace.

Sloučeniny fosforu se v potravinách používají jako konzervanty, regulátory kyselosti, stabilizátory, nebo např. zahušťovadla. Ideální denní příjem fosforu u dospělého člověka je 700 mg. Pokud je tato doporučená denní dávka dlouhodobě překračována, mohou nastat závažné zdravotní komplikace, jako je obezita nebo zvýšený krevní tlak. Ke zvýšenému příjmu fosforu ve stravě dopomáhá i konzumace „colových“ nápojů, ve kterých se fosfor vyskytuje ve formě kyseliny fosforečné. V důsledku konzumace těchto nápojů se mohou z kostí vyplavovat další důležité minerály.

Proto bylo cílem této práce detekovat v „colových“ nápojích kyselinu fosforečnou, cukry a umělá sladidla. Z poměru signálů k šumu můžeme přibližně porovnat koncentrace jednotlivých látek mezi konkrétními nápoji.

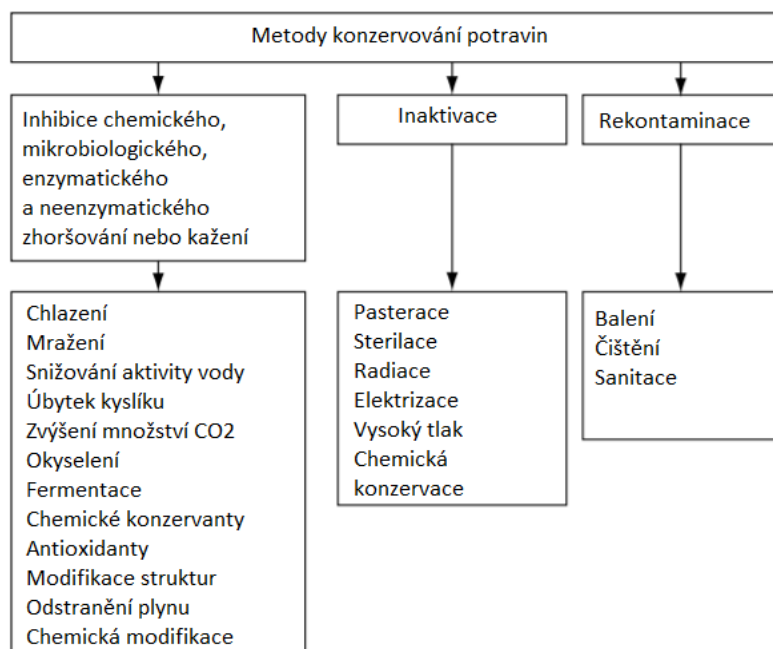
# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Konzervace potravin

Jedním z nejdůležitějších cílů potravinářského výzkumu je, aby byly potraviny co nejbezpečnější, ať už se používají čerstvé nebo zpracované. Uvážlivé používání metod zpracování, skladování a konzervace potravin pomáhá předcházet propuknutí chorob přenášených potravinami, tedy výskytu choroby nebo onemocnění v důsledku konzumace kontaminovaných potravin.

Konzervování potravin je činnost nebo metoda určená k udržení potravin na požadované úrovni kvality. Hlavní procesy zhoršování stavu potravin jsou způsobeny faktory životního prostředí, jako je teplota, vlhkost, přítomnost kyslíku či světla. Ty mohou být důvodem pro několik reakčních mechanismů, které mohou vést ke zhoršování stavu potravin. Mikrobiální účinky jsou hlavní příčinou zhoršování stavu potravin a jejich kazivosti.

Na základě způsobu účinku lze hlavní techniky konzervace potravin zařadit do následujících kategorií: zpomalení nebo inhibice chemické degradace a mikrobiálního růstu, přímá inaktivace bakterií, kvasinek, plísní a enzymů a zamezení rekontaminace před zpracováním a po něm. Tyto techniky a metody jsou znázorněny na obrázku 1.



Obrázek 1: Metody konzervování potravin

### 1.1.1. Konvenční metody konzervace potravin

#### 1.1.1.1. Konzervace potravin tepelnou úpravou

Teplo je zdaleka nejpoužívanější metodou konzervace potravin. Existují různé stupně konzervace ohřevem, které v konečném důsledku určují typ koncového výrobku; jedná se o

pasteraci a sterilizaci. Aby však byly tyto procesy účinné, musí být prováděny v kombinaci přísné kontroly teploty a času, aby bylo zajištěno usmrcení patogenních a nepatogenních mikroorganismů. Tytéž faktory také způsobují tepelnou inaktivaci potravinových enzymů a určité znehodnocení složek potravin.

#### **1.1.1.2. Konzervace potravin za pomoci nízké aktivity vody**

Aktivita vody (dostupnost vody pro mikroorganismy) může být snížena částečným odstraněním vody (sušení, reverzní osmóza, koncentrace) nebo přidáním látek, které zvyšují osmotický tlak potravin nebo média, jako jsou cukry, ethanol, glycerol nebo soli. Většina mikroorganismů je citlivá na stav vody ve svém bezprostředním prostředí a mohou zůstat metabolicky aktivní pouze v úzkém spektru činností s vysokou aktivitou vody. Je typické, že organismy, které jsou tolerantní k nízké aktivitě vody, jsou tolerantní i k velmi vysokým osmotickým tlakům. Nejtolerantnější druhy jsou schopny růst, když osmotický tlak dosahuje asi 800 MPa. Mohou pomalu růst, když aktivita vody dosahuje 0,62.<sup>1</sup> Povaha rozpuštěné látky má další vliv na růstový potenciál. Iontové sloučeniny jako NaCl a KCl mají spíše inhibiční účinky než neiontové sloučeniny jako cukry. Rozpustné látky, jako je glycerol, na rozdíl od solí a cukrů rychle prostupují většinou bakterií, nikoli však kvasinkami. Pro druhy, které jsou odolnější nižší aktivitě vody, tento jednoduchý vztah neplatí. Například *Staphylococcus aureus* je extrémně odolný vůči solím a citlivější při vyšší aktivitě vody v glycerolu než v chloridu sodném.<sup>2</sup>

Snižování aktivity vody různými prostředky může také ovlivnit rychlost enzymatických a chemických změn v potravinách. Zatímco veškerý mikrobiologický růst je zcela zastaven pod aktivitou vody 0,6, některé enzymatické reakce, které způsobují kazivost potravin, pokračují a některé reakce (jako např. oxidace lipidů) mohou být dokonce zrychleny při velmi nízkých hodnotách aktivity vody.

#### **1.1.1.3. Konzervace potravin za pomoci nízkého pH a organických kyselin**

Potravin jsou klasifikovány podle své kyselosti takto: nekyselé (pH 7,0 – 5,3), málo kyselé (pH 5,3 – 4,6), kyselé (pH 4,6 – 3,7) a velmi kyselé (pH < 3,7).<sup>1</sup>

Mikroorganismy žijí v charakteristickém rozmezí hodnot pH, v rámci kterých mohou růst. Rychlost růstu obvykle klesá s poklesem pH pod optimální hodnotu. Pokud se hodnota pH blíží limitující hodnotě pH pro růst, jsou buňky nejprve inhibovány a nakonec usmrceny.

Meze pH růstu se však u mikroorganismů značně liší. Heterotrofní bakterie bývají obecně nejméně tolerantní vůči kyselinám mezi běžnými mikroorganismy vyskytujícími se v potravinách. Přibližný rozsah pH, ve kterém žijí bakterie, je 4,0 – 9,0, kvasinky 1,5 – 8,0,

a plísně 1,5 – 11,0. Bakterie, které rostou mimo tento rozsah, jsou málokdy významnými organismy, které kazí potraviny. Limity pH pro růst v laboratorním médiu jsou často mnohem širší než limity pozorované v potravinách.

Některé organické kyseliny a jejich estery se nacházejí přirozeně v mnoha potravinách nebo mohou vznikat jako produkt mikrobiálního metabolismu ve fermentovaných potravinách. Mnohé potraviny jsou konzervovány přidáním relativně nízkých koncentrací těchto sloučenin, z nichž všechny vykazují jako konzervanty výraznou aktivitu závislou na pH. Tyto sloučeniny působí především proti kvasinkám a plísním v nízké koncentraci, ale postihují i bakterie. Snížení pH zvyšuje podíl nedisociovaných molekul kyseliny, což zvyšuje antimikrobiální účinnost všech těchto organických kyselin.

#### ***1.1.1.4. Konzervace oxidem uhličitým, siřičitany, dusitany a dusičnany***

##### ***1.1.1.4.1. Oxid uhličitý***

Oxid uhličitý hraje významnou roli v modifikaci růstu mikroorganismů. Mechanismy inhibice mikroorganismů nejsou zcela pochopeny, ale nejpravděpodobnějším způsobem účinku je inhibice dekarboxylační reakce v živých buňkách. Modifikované atmosféry obohacené o CO<sub>2</sub> jsou široce rozšířeným přirozeným prostředkem k prodloužení trvanlivosti různých nesterilních chlazených potravin. Běžná koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu je 0,04 %, ale když je vyšší než 5 %, je účinný proti psychrofilním mikroorganismům, které způsobují kažení potravin.<sup>1</sup> Významné konzervační účinky byly prokázány u čerstvého fermentovaného masa a ryb a také u ovoce a mléka.

##### ***1.1.1.4.2. Oxid siřičitý***

Oxid siřičitý, siřičitany, hydrogensiřičitany a disiřičitany se používají jako konzervační přísady ve víně, ovocných šťávách, uzeninách a jiných potravinách. Jako antioxidanty se používají k inhibici různých enzymatických reakcí, zejména enzymatického a neenzymatického hnědnutí.

##### ***1.1.1.4.3. Dusitany a dusičnany***

Dusitany a dusičnany, jakožto jejich sodné a draselné soli, se široce používají při kvašení masných výrobků, nasolování vepřového masa, výrobě šunky a slaniny. Jsou důležité, protože stabilizují červenou barvu masa a inhibují růst patogenních a škodlivých mikroorganismů. Mnoho bakterií redukuje dusičnany na dusitany, a právě ty pomáhají zabránit mikrobiálnímu poškození. Antibakteriální účinnost dusitanů se zvyšuje s nižším pH.

Tuto metodu konzervování nelze použít pro tepelně upravované potraviny, protože z dusitanů vznikají karcinogenní nitrosaminy.

#### **1.1.1.5. Konzervace pomocí modifikovaných atmosfér**

Udržení konstantní plynné fáze je obtížné, ale úprava atmosféry se používá v průmyslovém měřítku hlavně pro skladování čerstvých a částečně zpracovaných potravin, včetně masa, ryb, ovoce, zeleniny atd. Úprava atmosféry s cílem pomoci konzervaci potravin se vyskytuje na třech úrovních propracovanosti: řízené atmosféry se používají převážně k hromadnému skladování nebo přepravě, plynové obaly slouží k hromadnému skladování a pro maloobchodní balení a vakuový obal se používá převážně pro maloobchodní balení.

Pro konzervaci potravin je nejdůležitější samotný oxid uhličitý nebo ve směsi s dusíkem nebo kyslíkem.<sup>3</sup>

#### **1.1.1.6. Konzervace potravin ozářením**

Účinky ionizujícího záření na biologické materiály jsou přímé a nepřímé. Při přímém působení dochází k chemickým reakcím v důsledku ukládání energie vzniklé zářením v cílové molekule. K nepřímým účinkům dochází v důsledku reaktivních difúzních forem volných radikálů z radiolýzy vody, jako je hydroxyradikál, hydratovaný elektron, atom vodíku, peroxid vodíku a vodík. Peroxid vodíku je silné oxidační činidlo a jed pro biologické systémy, zatímco hydroxylový radikál je silné redukční činidlo. Tyto dva radikály mohou způsobit několik změn v molekulární struktuře organické hmoty, včetně potravin. Ozařování se používá zejména k: dezinfekci vody; poškození hmyzu v různém stádiu vývoje, které by mohly být přítomny v některých potravinách jako třeba obilí; inhibici klíčení brambor, cibule a česneku; zlepšení kvality produktů (např. snížení faktorů produkujících plyn v sójových bobech); nebo snížení potřeby dusičnanů během výroby některých masných výrobků.

Ionizační záření ovlivňuje bakterie, kvasinky a plísně tím, že způsobuje poškození genetického materiálu buňky. Faktory, které ovlivňují citlivost mikroorganismů na ozařování, jsou dávka záření, teplota, složení atmosféry, médium (včetně potravin) a typ organismu. Obecně platí, že čím vyšší je dávka, tím nižší je počet přeživších mikroorganismů.

#### **1.1.1.7. Konzervace pomocí nízkých teplot**

Konzervace potravin chlazením a zmrazováním jsou nejstarší metody využívající přirozené nízké teploty. V roce 1875 byl vynalezen amoniakální chladicí systém, který bylo možno komerčně využít pro chlazení a zmrazování potravin.<sup>1</sup> Zmrazování dnes výrazně ovlivňuje postupy marketingu a potravinářského průmyslu. Chlazení se používá ke snížení



rychlosti biochemických a mikrobiálních změn a tím k prodloužení trvanlivosti čerstvých i zpracovaných potravin.

Snížení teploty pod minimum nezbytné pro mikrobiální růst prodlužuje generační dobu mikroorganismů a zabraňuje nebo zpomaluje jejich reprodukci. Na základě teplot pro růst existují čtyři kategorie mikroorganismů: termofilní (minimum 30 – 40 °C, optimum 55 – 65 °C), mezofilní (minimum 5 – 10 °C, optimum 30 – 40 °C), psychrotrofní (minimum 0 – 5 °C, optimum 20 – 30 °C), psychrofilní (minimum 0 – 5 °C, optimum 12 – 18 °C).

Chlazení zabraňuje růstu termofilních a mezofilních mikroorganismů. Zmrazení je způsob konzervace potravin, při kterém je teplota potravin snížena pod bod mrazu a část vody prochází změnou tak, že se vytvoří ledové krystalky, čímž se změní koncentrace rozpuštěných látek v nezmražené vodě, respektive se sníží aktivita vody a pH.

### **1.1.2. Potencionální metody konzervace potravin**

Spotřebitelské trendy a trhy s potravinami se mění a v budoucnu se budou pravděpodobně měnit směrem k potravinám čerstvějším s vysoce kvalitními vlastnostmi, v důsledku čehož se bude používat méně externích ošetření a méně přídatných látek. To znamená menší poškození teplem a chladem, větší čerstvost, méně kyselin, soli, cukru, tuku atd. Aby byly tyto požadavky splněny, musí být dosaženo určitých změn v tradičně používaných konzervačních technikách. Z mikrobiologického hlediska mají tyto změny významné důsledky, neboť bezpečnost potravin je aspektem rostoucího významu. Bezpečnost a kvalita potravin by měly být dobře vyváženy v každé nové metodě konzervace potravin.

#### **1.1.2.1. Pulzní elektrická pole**

Inaktivace organismů je připisována rázové vlně generované elektrickým obloukem, který podněcuje tvorbu vysoce reaktivních volných radikálů generovaných z různých typů chemických sloučenin obsažených v potravině. Obecně bylo zjištěno, že zvýšení intenzity elektrického pole a počtu pulsů vede ke zvýšení inaktivace mikroorganismů.

#### **1.1.2.2. Vysoký tlak**

Základem tohoto procesu je Le Chatelierův princip, podle kterého každá reakce, jako je konformační změna nebo fázový přechod, který je doprovázen poklesem objemu, bude při vysokém tlaku upřednostněna, zatímco reakce zahrnující nárůst objemu budou inhibovány.

Technologie hydrostatického tlaku je technologie netepelného zpracování potravin, kdy jsou potraviny vystaveny vysokému hydrostatickému tlaku, obvykle v rozmezí 100 – 600 MPa při běžné teplotě. Obecně platí, že vegetativní mikrobiální formy jsou inaktivovány

tlakem mezi 400 a 600 MPa, zatímco spory některých druhů mohou odolávat tlakům vyšším než 1000 MPa při teplotách okolí. Grampozitivní bakterie jsou odolnější vůči vyšším tlakům než gramnegativní. Vysoký tlak může inaktivovat i enzymy.<sup>1</sup>

#### **1.1.2.3. Ultrafialové záření**

Ultrafialová frakce slunečního světla je již dlouho známa jako hlavní faktor baktericidního působení světla. Používá se především při sterilizaci vzduchu. Při použití ve vysokých dávkách dochází k výrazné změně chuti a zhoršování zápachu před dosažením uspokojivé sterilizace potravin. Nízká úroveň záření při pečlivě aplikovaných dávkách však může často prodloužit trvanlivost potravin, aniž by poškodila jejich kvalitu. Používání UV záření k likvidaci bakterií ve vodě je bezpečné, šetrné k životnímu prostředí a nákladově efektivnější na instalaci a provoz než konvenční chlorování. K ničení bakterií na povrchu potravin se používají UV-C lampy.

Vlnová délka pro maximální germicidní účinek je 260 nm. Smrtící účinek se mění v závislosti na době expozice a intenzitě světla a dalších faktorech, jako je teplota, pH a počet exponovaných buněk. Spory bakterií jsou obecně odolnější vůči UV záření než vegetativní bakterie. Plísně jsou odolnější než vegetativní bakterie, zatímco kvasinky se v tomto ohledu od bakterií liší méně.

#### **1.1.2.4. Konzervace potravin pomocí zvuku**

Ultrazvuk je zvuková energie s frekvenčním rozsahem od 20 kHz do stovek MHz. Bakterie a spory jsou vůči němu velmi odolné. Ultrazvuk se používá k uvolnění bakterií ulpívajících na povrchu, aby se usnadnilo odstranění vegetace kontaminujících potravin, a k mytí.

#### **1.1.2.5. Aplikace bakteriocinů**

Bakteriocin je definován jako bílkovina, která má baktericidní účinek proti omezenému spektru mikroorganismů, které jsou většinou blízce příbuzné. Zajímavými zdroji bakteriocinů jsou bakterie mléčného kvašení. Po staletí se tyto mikroorganismy používaly při fermentaci potravin k výrobě stabilních potravinářských výrobků, jako jsou sýry, uzeniny, nebo kysané zelí.

### **1.1.3. Kombinované metody konzervace potravin**

Mikrobiální stabilita a bezpečnost většiny tradičních i nových potravin je založena na kombinaci několika konzervačních faktorů, které mikroorganismy přítomné v potravinách nejsou schopny překonat. Dokládá to takzvaný překážkový efekt, který zavedl Leistner

(1978).<sup>4</sup> Koncept překážky ve skutečnosti ilustruje pouze dobře známou skutečnost, že komplexní interakce teploty, vodní aktivity, pH, redoxního potenciálu atd. jsou významné pro mikrobiální stabilitu potravin. Potraviny konzervované touto metodou jsou bezpečné, stabilní, výživné, chutné a hospodárné. Z pochopení překážkového efektu byla odvozena překážková technologie, která umožňuje zlepšit bezpečnost a kvalitu potravin pomocí záměrné a vhodně zvolené kombinace překážek. Pro zajištění stálosti a bezpečnosti potravin se používá mnoho metod konzervace, např. ohřev, chlazení, zmrazování, sušení, nasolování, přidávání cukru, přikyselování, fermentace, uzení, odstraňování kyslíku atd.

## **1.2. Fosfor jako biogenní prvek v lidském těle**

V těle dospělého člověka se nachází přibližně 420 – 840 g fosforu, z toho 70 – 85 % tvoří kosti a zuby. V krvi najdeme cca 400 mg.dm<sup>-3</sup> fosforu, ve svalech 1700 – 2500 mg.kg<sup>-1</sup>, v nervové tkáni 3600 mg.kg<sup>-1</sup> a v kostech a zubech je ho 22 % hmotnosti.<sup>5,6</sup>

Fosfor je esenciální prvek a jeho funkce souvisí s tím, v jakých sloučeninách je obsažen. Funkci stavební plní anorganické fosforečnany v kostech a zubech, nebo fosfolipidy v biomembránách. Realizace energeticky náročných biosyntetických reakcí je plněna hydrolyzou makroergických fosfátů, jako jsou adenosintrifosfát (ATP), guanosintrifosfát (GTP), fosfoenolpyruvát a keratin-fosfát a naopak uložení chemické energie do ATP se odehrává při oxidativní fosforylaci, v rámci citrátového cyklu a glykolýze. Uložení a exprese (vyjádření informace obsažené v genu do bílkovinné struktury) genetické informace zajišťují nukleové kyseliny, kterých je součástí i fosfor.

Doporučená denní dávka fosforu je 300 – 500 mg pro děti do 1 roku a 700 mg fosforu pro dospělé. Důležitější však je hlídat si správný poměr vápníku a fosforu ve stravě. Je-li vápník v nadbytku, zvýší se exkrece fosforu a naopak.<sup>5,7</sup>

### **1.2.1. Metabolismus fosforu**

Resorpce fosforu probíhá ve střevě převážně ve formě hydrogenfosforečnanů a je závislá i na obsahu vápníku ve stravě. Stupeň resorpce ovlivňuje složení stravy, věk a zdravotní stav konzumenta.

Co se týče resorpce různých sloučenin fosforu, nejlépe se resorbují soli a estery kyseliny ortho-fosforečné, snižena je resorpce kyseliny meta-fosforečné a polyfosforečnanů. Pouze z 20 – 50 % je resorbována kyselina fytoová, protože organismus ji nedokáže hydrolyzovat.<sup>8,9</sup>

### 1.2.2. Hyperfosfatémie

Jako těžká hyperfosfatémie se označuje hladina fosfátů v plasmě nad 2,10 mmol/l, u mírné hyperfosfatémie se hodnota fosfátů v plasmě pohybuje mezi 1,62 a 2,10 mmol/l. V současné době se doporučuje udržovat hladinu fosfátů v normálním rozmezí – od 0,97 do 1,61 mmol/l.<sup>10</sup>

Zvýšená hladina fosfátů v plasmě pravděpodobně negativně ovlivňuje kvalitu kostní tkáně<sup>11</sup>. (vyšší konzumace „colových“ nápojů – a tím i kofeinu a kyseliny fosforečné – způsobuje hlavně u žen vyplavování minerálů z kostí<sup>12</sup>), kardiovaskulární systém<sup>13</sup>, zvyšuje krevní tlak a způsobuje obezitu.<sup>14</sup>

### 1.2.3. Fosfor v potravinách

Ve většině potravin se fosfor vyskytuje v koncentracích větších než 100 mg.kg<sup>-1</sup>, stopový obsah fosforu najdeme například i v rafinovaných tucích a rafinovaném cukru. Bohatým zdrojem fosforu jsou ořechy, mléčné výrobky, vaječný žloutek, obilniny a luštěniny. Nejbohatší zdroje fosforu v českých potravinách jsou uvedeny v tabulce 1.<sup>15</sup>

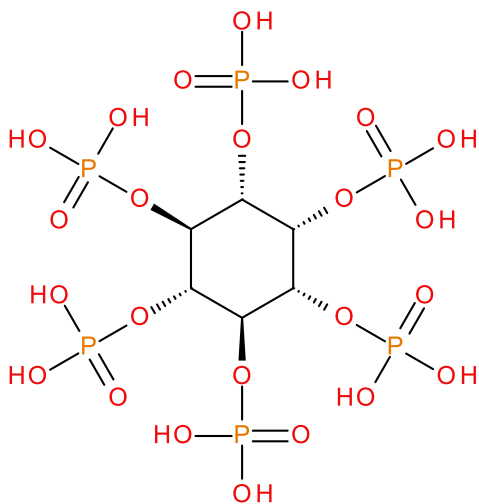
*Tabulka 1: Nejbohatší zdroje fosforu v českých potravinách*

Název potraviny	Obsah fosforu [mg/100g]
Droždí sušené	1900
Semena tykvová (dýňová), sušená	1174
Sýr, tavený, nízkoenergetický, Lipno, 30 % t. v s.	1059
Otruby pšeničné	1055
Mléko sušené, nízkotučné	1054
Mléko sušené, odstředěné	995
Mák	936
Mléko sušené, polotučné	894
Vejce slepičí, celé, hmota sušená	807
Mléko sušené, plnotučné	786
Semena slunečnicová	709
Semena sezamová	701
Sója extrudovaná („maso“ sójové), kostky, neochucené	685
Prášek kakaový	661
Hřib smrkový, sušený	649

### 1.2.3.1. Kyselina fytová a fytátový fosfor

Kyselinu fytovou (Obr. 2) najdeme například v obilovinách, luštěninách nebo olejninách. Její hlavní formou je směs hořečnaté a vápenaté soli, tzv. fytinu. Kyselinu fytovou mohou doprovázet i parciální fosforečné estery myo-inositolu.

Kyselina fytová se v potravinářském průmyslu používá jako aditivum pro číření vín. Železité ionty se odstraní vysrážením fytátu železitého.



Obrázek 2: Vzorec kyseliny fytové

### 1.2.3.2. Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou lipidy odvozené od glycerolu, obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou. V rostlinných i živočišných organismech jsou součástí buněčných a vnitrobuněčných membrán, ovlivňují rozpustnost lipoproteinů s nízkou hustotou v plazmě a díky emulgační schopnosti stabilizují lipoproteiny.

Fosfolipidy v malém množství obsahují rostlinné oleje, ovšem kvůli rafinaci používané k úpravě olejů jsou z konečného produktu odstraněny. Extra panenský olivový olej tímto procesem neprochází a díky tomu si zachovává všechny své fosfolipidy.<sup>5</sup>

### 1.2.3.3. Fosfoproteiny

Fosfoproteiny se přirozeně vyskytují v mléce, sóje nebo například vejcích. Jsou důležité díky svým vlastnostem jako je stabilizace gelů, pěn, těst a emulzí. Například ovalbumin, hlavní složka vaječného bílku, je důležitou složkou potravin s vysokou funkcí včetně emulgačních vlastností a stability pěny. Fosfoproteiny se používají jako emulgátory v pečených výrobcích, sladkostech, dezertech a pivu.<sup>5</sup>

#### 1.2.3.4. Lecitiny

Lecitiny jsou fosfolipidové extrakty živočišného nebo rostlinného původu, mají povrchově aktivní vlastnosti. Příklad struktury lecitinu můžeme vidět na obrázku 3. Syntetické lecitiny, jako jsou fosfatidy amonné, se používají jako emulgátory sloužící ke zlepšení struktury potravin, například čokolády nebo kakaových výrobků.



Obrázek 3: Příklad struktury lecitinu (převzato z databáze Reaxys<sup>16</sup>.)

#### 1.2.3.5. Fosfáty a kyselina fosforečná

Volná kyselina fosforečná může být přítomna pouze v potravinách s pH nižším než 4. Obsah přirozeně vyskytujícího se fosforu může být zvýšen přidáním aditiv na bázi solí polyfosforečných kyselin nebo solí kyseliny trihydrogenfosforečné. Sloučeniny fosforu, které se v České republice mohou používat jsou uvedeny v tabulce 2.<sup>17</sup>

Tabulka 2: Sloučeniny fosforu používané v ČR jako aditiva

Číslo E	Název	Funkce
E101	Riboflavin, riboflavin-5'-fosfát	Barvivo
E338	Kyselina fosforečná	Regulátor kyselosti, antioxidant

E339	Fosforečnany sodné – $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{Na}_3\text{PO}_4$	Regulátor kyselosti, emulgátor, stabilizátor, sekvestrant, zvlhčující látka, zahušťovadlo
E340	Fosforečnany draselné – $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{K}_3\text{PO}_4$	Regulátor kyselosti, emulgátor, stabilizátor, sekvestrant, zvlhčující látka, zahušťovadlo, kypřící látka
E341	Fosforečnany vápenaté – $\text{CaHPO}_4$ , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Regulátor kyselosti, látka zlepšující mouku, plnidlo, zvlhčující látka, zahušťovadlo, protispékavá látka
E442	Amonné soli fosfatidových kyselin	Emulgátor
E450	Difosforečnany – $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , $\text{Na}_3\text{HP}_2\text{O}_7$ , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Emulgátor, stabilizátor, regulátor kyselosti, kypřící látka, sekvestrant, zvlhčující látka
E451	Trifosforečnany – $\text{NaP}_3\text{O}_8$ , $\text{KP}_3\text{O}_8$	Sekvestrant, regulátor kyselosti, zahušťovadlo
E452	Polyfosfosfáty – polyfosfát sodný, polyfosfát draselný, polyfosfát sodnovápenatý, polyfosfát vápenatý	Emulgátor, stabilizátor, regulátor kyselosti, kypřící látka, sekvestrant, zvlhčující látka
E541	Kyselý fosforečnan sodno-hlinitý	Regulátor kyselosti, emulgátor
E1410	Fosforečnan škrobu	Zahušťovadlo, stabilizátor
E1412	Zesíťovaný fosforečnan škrobu	Zahušťovadlo, stabilizátor
E1413	Fosforečnan zesíťovaného fosforečnanu škrobu	Zahušťovadlo, stabilizátor
E1414	Acetylovaný zesíťovaný fosforečnan škrobu	Zahušťovadlo, stabilizátor
E1442	Hydroxypropylester zesíťovaného fosforečnanu škrobu	Zahušťovadlo, stabilizátor

Všechny tyto látky smějí být používány pouze v omezeném množství a jsou stanoveny i konkrétní druhy potravin, ve kterých mohou být použity. Maximální množství jednotlivých aditiv jsou uvedena v tabulce 3.<sup>18</sup>

Fosfáty se přidávají do potravin kvůli hydrataci bílkovin a polysacharidů. Také zvyšují vaznost vody v některých masných výrobcích, používají se jako kypřící systémy v pečících výrobcích, zlepšují texturu tavených sýrů a používají se jako stabilizátory v UHT (Ultra-high

temperature) a sterilovaném mléce. Polyfosfáty mají antimikrobiální účinky a používají se jako čiridla piva nebo vína. V nealkoholických nápojích se jako okyselující látka používá kyselina fosforečná a u nápojů v plechovkách je koroze zpomalena díky fosfátům.

*Tabulka 3: Maximální množství aditiv v konkrétních potravinách*

<b>Aditivum</b>	<b>Název potraviny</b>	<b>Max. množství [mg/kg] nebo [mg/l]</b>
E338 – 452	Potraviny v práškové formě (tj. potraviny sušené během výrobního procesu a jejich směsi)	10000
E338 – 452	Sterilované a UHT mléko	1000
E338 – 452	Ochucené fermentované mléčné výrobky včetně tepelně ošetřených	3000
E338 – 452	Zahuštěné mléko s obsahem sušiny méně než 28 %	1000
E338 – 452	Zahuštěné mléko s obsahem sušiny více než 28 %	1500
E338 – 452	Sušené mléko a sušené mléko odtučněné	2500
E1410, E1412 – 1414, E1442	Neochucené kysané smetanové výrobky s živou kulturou a náhražky o obsahu tuku nižším než 20 %	QS*
E338 – 452	Sterilovaná, pasterovaná, UHT a šlehaná smetana	5000
E338 – 452	Nezrající sýry kromě sýra mozzarella	2000
E338 – 452	Tavené sýry	20000
E338 – 452	Nezrající výrobky ze sýra	2000
E338 – 452	Analogy šlehané smetany	5000
E338 – 452	Analogy tavených sýrů	20000
E338 – 452	Náhrady mléka do teplých nápojů	30000
E338 – 452	Náhrady mléka pro přípravu nápojů pro prodejní automaty	50000
E338 – 452	Máslo z kysané smetany	2000
E338 – 452	Roztíratelné tuky	5000
E338 – 452	Rozprašovací emulze na bázi vody pro potírání pečicích plechů	30000
E338 – 452	Zmrzliny	1000



E338 – 452	Ovocné přípravky kromě kompotů	800
E338 – 452	Leštící látky pro zeleninové výrobky	4000
E338 – 452	Ořechové pomazánky	5000
E338 – 452	Zpracované výrobky z brambor včetně před smažených zmrazených a hluboce zmrazených brambor	5000
E338 – 452	Cukrovinky na bázi cukru, kromě proslazeného ovoce	5000
E338 – 452	Proslazené ovoce	800
E338 – 452	Žvýkačky	QS
E338 – 452	Dekorace, polevy a náplně, kromě náplní na bázi ovoce	5000
E338 – 452	Sladké dezertní omáčky (toppingy) (sirupy pro lívance, ochucené sirupy pro míchané mléčné nápoje a zmrzliny; podobné výrobky)	3000
E338 – 452	Mouky	2500
E338 – 452	Mouka s práškem do pečiva	20000
E338 – 452	Snídaňové cereálie	5000
E338 – 452	Nudle	2000
E338 – 452	Šlehané těsto	12000
E338 – 452	Soda bread	20000
E338 – 452	Jemné pečivo	20000
E541	Scones a piškotové pečivo	1000
E338 – 452	Breakfast sausages; v těchto výrobcích je maso pomleté takovým způsobem, aby se svalová a tuková tkáň úplně rozptýlila a vláknina vytvořila emulzi s tukem, což dává těmto výrobkům jejich charakteristický vzhled	5000
E338 – 452	Tepelně neopracované zpracované maso	5000
E338 – 452	Tepelně opracované zpracované maso kromě foie gras, foie gras entier, blocs de foie gras, libamáj, libamáj egészben, libamáj tömbben	5000
E338 – 452	Leštící látky pro maso	4000
E338 – 452	Zmrazené a hluboce zmrazené rybí filé	5000
E338 – 452	Zmrazení a hluboce zmrazené měkkýši a korýši	5000
E338 – 452	Konzervované výrobky z korýšů; surimi a podobné výrobky	1000

E338 – 452	Pasty z ryb a korýšů a ve zpracovaných zmrazených a hluboce zmrazených měkkýších a korýších	5000
E338 – 452	Tekutá vejce (bílek, žloutek nebo celé vejce)	10000
E338 – 452	Cukry a sirupy sušená v prášku	10000
E338 – 452	Sůl	10000
E338 – 452	Náhražky soli	10000
E338 – 452	Polévky a vývary	3000
E338 – 452	Omáčky	5000
E338 – 452	Nápoje s obsahem rostlinných bílkovin	20000
E338 – 340	Počáteční kojenecká výživa	1000
E338 – 340	Pokračovací kojenecká výživa	1000
E338	Obilné a ostatní příkrmy pro úpravu pH	1000
E339 – 341	Obilné příkrmy	1000
E341	Dezerty na bázi ovoce jako příkrmy pro kojence a malé děti	1000
E1410, E1412 – 1414	Upravené obilné příkrmy a ostatní příkrmy	50000
E338 – 340	Ostatní výživa pro malé děti	1000
E1410, E1412 – 1414	Ostatní výživa pro malé děti	50000
E338	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely pro kojence a zvláštní počáteční výživa pro kojence pro úpravu pH	1000
E339 – 341	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely pro kojence a zvláštní počáteční výživa pro kojence	1000
E338 – 452	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely	5000
E338 – 452	Dietní potraviny pro diety zaměřené na regulaci hmotnosti určené k náhradě celodenní stravy nebo jednotlivého pokrmu (celý objem nebo část celodenní stravy)	5000
E338 – 452	Potraviny vhodné pro osoby s nesnášenlivostí lepku	5000
E338 – 452	Balené stolní vody	500
E338 – 452	Ochucené nápoje	700
E338 – 452	Sportovní nápoje	500

E338 – 452	Sportovní nápoje s obsahem syrovátkových bílkovin	4000
E338 – 452	Nápoje s obsahem rostlinných bílkovin	20000
E338 – 452	Nápoje na bázi mléka obsahující čokoládu a slad	2000
E338 – 452	Nápoje na bázi kávy pro prodejní automaty; instantní čaje a instantní bylinné čaje	2000
E338 – 452	Cider a perry	1000
E338 – 452	Ovocné víno a made wine	1000
E338 – 452	Medovina	1000
E338 – 452	Lihoviny kromě whisky, whiskey	1000
E338 – 452	Aromatizovaná vína	1000
E338 – 452	Aromatizované vinné nápoje	1000
E338 – 452	Aromatizované vinné koktejly	1000
E338 – 452	Ostatní alkoholické nápoje včetně směsí alkoholických nápojů s nealkoholickými nápoji a destiláty s obsahem alkoholu do 15 %	1000
E338 – 452	Bramborové, obilné, moučné nebo škrobové snacky	5000
E338 – 452	Zpracované ořechy	5000
E338 – 452	Dezerty	3000
E338 – 452	Sušené dezertové směsi v prášku	7000
E338 – 452	Doplňky stravy dodávané v pevné formě, včetně tobolek a tablet a podobných forem, kromě výrobků určených ke žvýkání	QS
E338 – 452	Doplňky stravy dodávané v tekuté podobě	QS
E338 – 452	Doplňky stravy dodávané ve formě sirupu nebo určené ke žvýkání	QS

\*QS = Quantum satis

#### 1.2.3.6. Organofosforečné pesticidy

Organofosforečné pesticidy (OP) se používají v zemědělství, kde nahradily organochlorové pesticidy z důvodu menší perzistence v životním prostředí. OP nebo produkty jejich rozkladu mohou být zaváděny do potravinového řetězce.<sup>8,9</sup>

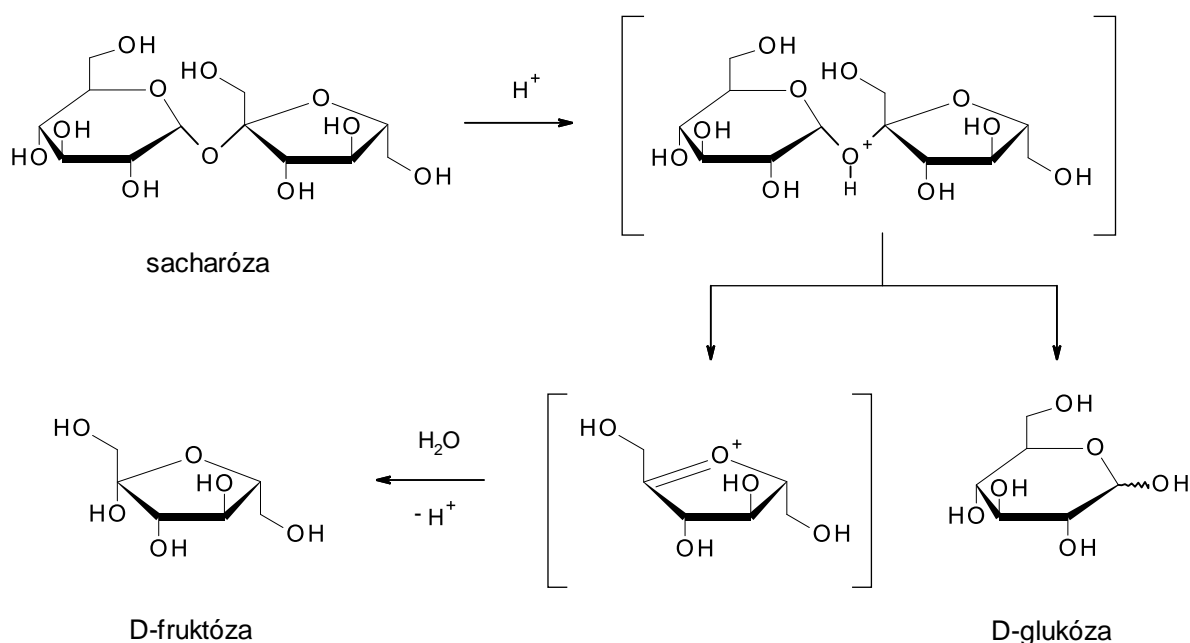
### 1.3. Sacharóza

Sacharóza (řepný, třtinový cukr) je neredukující disacharid skládající se ze dvou monosacharidů – glukózy a fruktózy. Vzorec sacharózy můžeme vidět na obrázku 4.

Inverzí sacharózy (kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou) se vyrábí směs D-glukózy a D-fruktózy. Tato směs se používá jako aditivní látka nejčastěji ve formě sirupu. Slouží i pro získávání D-glukózy a D-fruktózy, náhradních sladidel (jako je glucitol nebo mannitol) a dalších látek.

Kyselou hydrolýzou získáme i stopová množství produktů reverze glukózy a fruktózy, enzymatickou hydrolýzou stopová množství některých málo běžných oligosacharidů.

Hydrolýza sacharózy (Obr. 4) probíhá poměrně rychle – asi  $10^3$  krát rychleji než hydrolýza jiných disacharidů. Jedná se o reakci 1. řádu, rychlostní konstanta při  $100\text{ }^\circ\text{C}$  v roztocích o pH 1 – 3 je cca  $1 \cdot 10^{-3}$  s. Tato reakce probíhá i za nízkých teplot, v přítomnosti malého množství vody a i v přítomnosti zředěných minerálních nebo organických kyselin.<sup>5</sup>



Obrázek 4: Mechanismus inverze sacharózy

#### 1.4. Nukleární magnetická rezonance (NMR spektroskopie)

Nejdůležitějším využitím NMR spektroskopie je strukturní analýza organických a anorganických látek. NMR spektroskopie studuje jádra s nenulovým jaderným spinem. Pokud na molekuly analytu nepůsobí vnější homogenní magnetické pole, jsou jaderné spiny orientovány nahodile. Když ale tato jádra vložíme mezi póly magnetu, natočí se spiny jader ve směru nebo proti směru magnetického pole. Orientace ve směru magnetického pole je energeticky výhodnější.<sup>19., 20.</sup>

Pokud ozáříme takto orientovaná jádra elektromagnetickým zářením v oblasti radiových vln o vhodné frekvenci, dojde k absorpci energie a překlopení spinu. Jádra tak

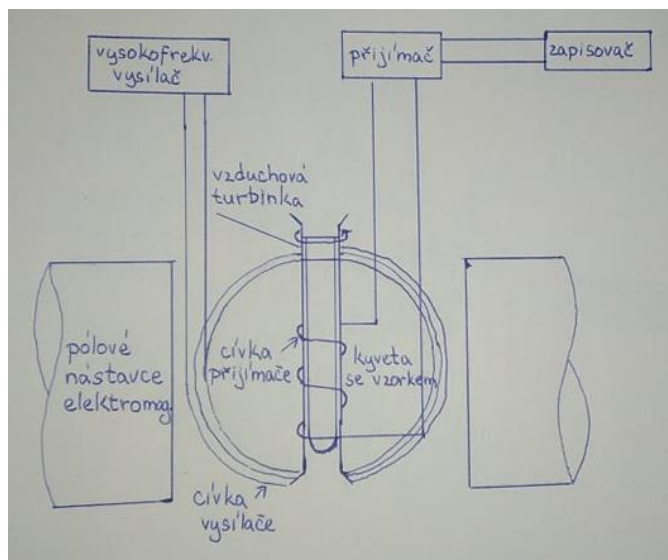
přejdou ze stavu o nižší energii do stavu o vyšší energii. Čím silnější je magnetické pole, tím vyšší energie je zapotřebí k překlopení jaderného spinu.

Magnetické vlastnosti mají všechna jádra, která mají lichý počet protonů a všechna jádra s lichým počtem neutronů, například to jsou:  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  nebo  $^{31}\text{P}$ . Naopak jádra se sudým počtem protonů i neutronů, jako jsou  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ , magnetické vlastnosti nemají.

#### 1.4.1. Princip měření

Vzorek ve válcové kyvetě je umístěn mezi póly silného magnetu. Vytváří se stejnosměrné magnetické pole  $B_0$ . Aby se zprůměrovaly prostorové orientace molekul, rotuje kyveta kolem své osy. Kyveta je obklopena vysílačem a přijímačem radiofrekvenčního záření. Schéma NMR spektrometru můžeme vidět na obrázku 5.

Kombinací radiofrekvenčního záření a magnetického pole  $B_0$  se jádra excitují. Jádro se excituje, když energie radiofrekvenčního záření dosáhne hodnoty energetického rozdílu mezi základním a excitovaným spinovým stavem. Rezonující jádra v přijímací cílce vyvolají elektrický signál, který je zaznamenán jako pík v NMR spektru. Moderní spektrometry využívají krátký, intenzivní radiofrekvenční pulz (doba trvání v  $\mu\text{s}$ ). Ten současně excituje všechny protony – spektrum se získá Fourierovou transformací.<sup>21</sup>



Obrázek 5: Schéma NMR spektrometru

#### 1.4.2. Stínění

Jelikož jsou atomová jádra v molekule obklopena elektronovými oblaky, při vložení do magnetického pole dojde k cirkulaci elektronů, a tak vzniknou slabá lokální magnetická pole o indukci orientované proti vnějšímu poli. Atomová jádra jsou tedy proti vloženému magnetickému poli stíněna elektrony, které jádra obklopují. Protože má každý typ jader různé

elektronové okolí, je stínění rozdílné, a proto v NMR spektru pozorujeme různé signály pro různé druhy jader (např.  $^{13}\text{C}$  nebo  $^1\text{H}$ ).

### 1.4.3. Chemický posun

NMR spektra se zapisují tak, že magnetická indukce stoupá zleva doprava. Na levé straně najdeme signály těch jader, která rezonují při nižší magnetické indukci a jsou odstíněna, naopak na pravé straně najdeme signály jader, která jsou silně stíněna a rezonují při vyšší magnetické indukci.

Poloha signálu určitého jádra se nazývá chemický posun. Chemický posun se udává ve stupnici  $\delta$  v miliontinách pracovní frekvence spektrometru (ppm). Abychom zjistili polohu signálu, je spektrum kalibrováno na určitý standard, jehož signálu je přiřazena hodnota 0. Například při měření  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  je standardem TMS (tetramethylsilan). Oblast chemických posunů bývá úzká, např. jádra  $^1\text{H}$  rezonují mezi  $\delta$  0 – 10 ppm, jádra  $^{13}\text{C}$  nejčastěji mezi 0 – 220 ppm.<sup>19</sup>

Chemický posun lze kvantitativně vyjádřit jako poměr rozdílu rezonanční frekvence vzorku  $\nu_{vz}$  a rezonanční frekvence standardu  $\nu_{st}$  ku pracovní frekvenci oscilátoru  $\nu_{os}$ .

$$\delta(\text{ppm}) = \frac{\nu_{vz} - \nu_{st}}{\nu_{os}} \cdot 10^6 = \frac{\nu_{vz} - \nu_{TMS}}{\nu_{os}} \cdot 10^6 = \frac{\Delta\nu}{\nu_{os}} \cdot 10^6$$

*Obrázek 6: Definice chemického posunu (s TMS jako standardem)*

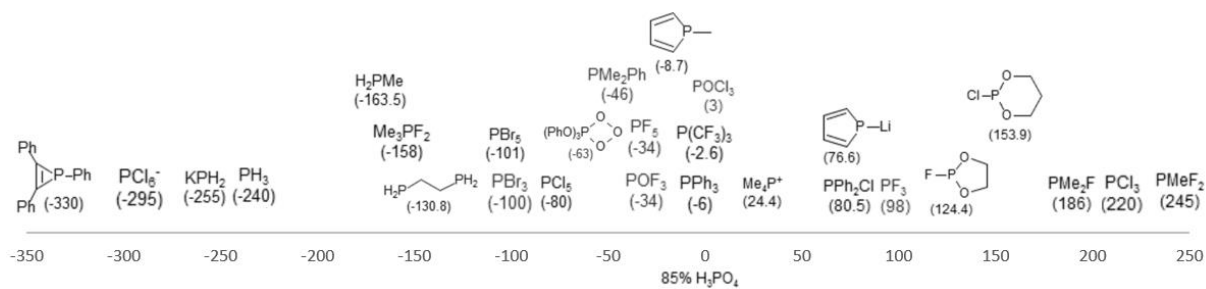
### 1.4.4. Spin-spinové interakce

V měřeném vzorku se jaderné spiny vzájemně ovlivňují. Spinová interakce vzniká přenosem vlivu orientace jaderného spinu určitého jádra na orientaci jiného jádra prostřednictvím vazebných elektronů přes jejich vzájemnou vazbu. Důsledkem spinových interakcí se jednoduchý rezonanční signál rozštěpí na příslušný multiplet (např. doublet, triplet, aj.).<sup>20</sup>

### 1.4.5. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR

Jádro  $^{31}\text{P}$  má spin  $1/2$ , 100% přirozený výskyt a přiměřeně dobrou přirozenou citlivost, která je mnohem větší než u  $^{13}\text{C}$ . Oblast chemického posunu sloučenin fosforu pokrývá asi 600 ppm – od -350 do 250 ppm; jako standard se používá 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta(^{31}\text{P}) = 0,0$  ppm. Některé vybrané sloučeniny fosforu a jejich chemické posuny můžeme vidět na obrázku 7. Pokud se ale zaměříme na sloučeniny fosforu v potravinách, ve spektrech NMR je nalezneme v poměrně úzké oblasti 20 – 40 ppm, protože většina sloučenin je ve formě

fosforečnanů. Sloučeniny fosforu v oxidačním stavu III získané derivatizací některých složek potravin se objevují v rozmezí 100 – 200 ppm.<sup>6</sup>



Obrázek 7: Chemické posuny vybraných sloučenin fosforu (převzato z ACS Division of Organic Chemistry<sup>22</sup>.)

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1. Studované nápoje

**2.1.1. Pepsi Max** (distribuuje KMV BEV CZ s.r.o., Kolbenova 510/50, 190 00 Praha 9, Česká republika, se souhlasem firmy PepsiCo, Inc., Purchase, N.Y., USA)

Deklarované složení: voda, oxid uhličitý, barvivo (E150d), sladidla (aspartam a acesulfam K), kyseliny (kyselina fosforečná a kyselina citronová), regulátor kyselosti: citronany sodné, aroma: kofein, aroma.

Deklarovaný obsah sacharidů/cukrů 0 g.

**2.1.2. Coca Cola Zero** (distribuuje Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., se souhlasem The Coca-Cola Company)

Deklarované složení: voda, oxid uhličitý, barvivo: E150d, sladidla: cyklamát sodný, acesulfam K a aspartam, kyselina: kyselina fosforečná, přírodní aromata včetně kofeinu, regulátor kyselosti: citronany sodné.

Deklarovaný obsah sacharidů/cukrů 0 g.

**2.1.3. Kofola®** (Kofola a.s., Za Drahou 1, 794 01 Krnov)

Deklarované složení: voda, sirup KOFO® (ovocný sirup, glukózo-fruktózový sirup, voda, karamel – pálený cukr, barvivo E150d, kyselina: kyselina citronová, chlorid sodný, esence pro KOFO® - aroma, bylinný extrakt – přírodní aroma, kofein, konzervant E211), oxid uhličitý.

Deklarovaný obsah sacharidů 8 g, z toho 8 g cukru.

**2.1.4. Cola 0 % cukru** (VESETA spol. s r.o., V. Vlčka 202, Kyšice, Česká republika)

Deklarované složení: pitná voda, oxid uhličitý, ochucující složka (barvivo E150d; kyselina: kyselina fosforečná; aroma, kofein); sladidla: acesulfam K, aspartam, sodná sůl sacharinu; konzervant: benzoan sodný; regulátor kyselosti: kyselina citronová.

Deklarovaný obsah sacharidů méně než 0,5 g, z toho méně než 0,5 g cukru.

**2.1.5. Pepsi** (distribuuje PEPSICO CZ s.r.o., Kolbenova 510/50, Praha 9, Česká republika, se souhlasem firmy PepsiCo, Inc., Purchase, N.Y., USA)

Deklarované složení: voda, cukr, oxid uhličitý, barvivo: karamel (E150d), kyselina: kyselina fosforečná, aroma: kofein, přírodní aroma.

Deklarovaný obsah sacharidů 11 g, z toho 11 g cukru.



**2.1.6. Royal Crown Cola** (Kofola a.s., Za Drahou 1, 794 01 Krnov, vyrobeno se souhlasem: Royal Crown Cola International U.S.A.)

Deklarované složení: voda, třtinový cukr, oxid uhličitý, kyseliny: kyselina fosforečná, kyselina citronová; barvivo E150d; kofein, aroma.

Deklarovaný obsah sacharidů 11 g, z toho 11 g cukru.

**2.1.7. Royal Crown Slim Cola** (Kofola a.s., Za Drahou 1, 794 01 Krnov, vyrobeno se souhlasem: Royal Crown Cola International U.S.A.)

Deklarované složení: voda, třtinový cukr, oxid uhličitý, kyselina: kyselina fosforečná; barvivo: E150d; přírodní aromata, přírodní kofein, sladidlo: steviol-glykosidy.

Deklarovaný obsah sacharidů 5,5 g, z toho 5,0 g cukru.

**2.1.8. Coca Cola** (Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., se souhlasem The Coca-Cola Company)

Deklarované složení: voda, fruktózo-glukózový sirup, oxid uhličitý, barvivo: E150d, kyselina: kyselina fosforečná, přírodní aromata včetně kofeinu.

Deklarovaný obsah sacharidů 11,2 g, z toho 11,2 g cukru.

**2.1.9. Pure Juice 100 % Apples** (Darguner Brauerei GmbH, Brauereistraße 3, Dargun, Německo)

Deklarované složení: 100% jablečná šťáva.

Deklarovaný obsah sacharidů 10,3 g, z toho 9,8 g cukru.

## **2.2. Použité chemikálie a použitá rozpouštědla**

Chemicky čistá fruktóza a sacharóza pro přípravu NMR vzorků byla získána z dostupných zásob Katedry obecné a anorganické chemie, Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Deuterovaná rozpouštědla (D<sub>2</sub>O a DMSO-d<sub>6</sub>) byla zakoupena od komerčního dodavatele (Eurisotop, Saint-Aubin, Francie; [www.eurisotop.com](http://www.eurisotop.com)).

## **2.3. Měření pH a elektrické vodivosti nápojů**

K měření pH byl použit Pocket pH-Meter ad 110 pH (výrobce Amarell Electronic, dodavatel Fisher Scientific). Pro měření vodivosti byl použit konduktometr Gryf 107 (výrobce Gryf HB, spol. s r.o., Havlíčkův Brod).

## 2.4. Zpracování a příprava NMR vzorků

Nejprve bylo z každého jednotlivého nápoje odměřeno 100 ml do vhodné kádinky a přes noc bylo toto množství promícháváno na magnetické míchačce, tak aby došlo k úplnému odplynění. Po odplynění byl celý objem z kádinky převeden do předem zvážené 250 ml baňky s kulatým dnem a odpařen na rotační vakuové odparce do té míry, že už nedocházelo k další kondenzaci par na chladiči odparky (cca 1 hodina). Z rozdílu hmotností byla pak zjištěna hmotnost odparku. Vzorky pro NMR spektroskopii byly připraveny rozpuštěním zhruba 100-110 mg příslušného odparku v 0,7 ml deuterovaného rozpouštědla.

### 2.4.1. NMR spektroskopie

NMR spektra jednotlivých vzorků nápojů byla měřena v deuterovaných rozpouštědlech ( $D_2O$  a  $DMSO-d_6$ ) v pětimilimetrových kyvetách při teplotě cca 295 K na přístroji Bruker Ascend<sup>TM</sup> 500 v pulzním módu s Fourierovou transformací.  $^1H$  (500,13 MHz) a  $^{31}P\{^1H\}$  (202,48 MHz) NMR spektra byla měřena v pětimilimetrové širokopásmové laditelné TBI sondě se Z-gradientem. Hodnoty  $^1H$  chemických posunů byly vztaženy k residuálním signálům deuterované vody ( $\delta(^1H) = 4,79$  ppm) a  $DMSO-d_6$  ( $\delta(^1H) = 2,50$  ppm). Počet pulzů během akvizice  $^1H$  NMR spekter byl 8. Hodnoty chemických posunů  $^{31}P$  byly vztaženy k 85%  $H_3PO_4$  ve vodě ( $\delta(^{31}P) = 0,0$  ppm). Pokud není uvedeno jinak, tak standardní počet pulzů během akvizice  $^{31}P$  NMR spekter byl 32. Kladné hodnoty chemických posunů označují posun k vyšším frekvencím vzhledem ke standardu. Naměřená spektra byla zpracována a vyhodnocena v počítačovém programu TopSpin 3.2. Pro automatický výpočet hodnoty S/N (tzv. signal-to-noise ratio; tedy poměr signálu k šumu) v  $^{31}P$  NMR spektrech byl použit příkaz „sino“, případně šlo hodnotu S/N zjistit i manuálně v grafickém rozhraní softwaru TopSpin 3.2 (záložka Analysis → Signal/Noise calculation).

### 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1. pH, elektrická vodivost a příprava vzorků nápojů

Pro studium fyzikálně-chemických vlastností (pH, elektrická vodivost) nápojů a jejich složení, zejména přítomnosti kyseliny fosforečné (NMR spektroskopie), bylo v maloobchodních prodejnách potravin a nápojů zakoupeno celkem 8 druhů „colových“ nápojů a 1 čistě přírodní jablečná šťáva (Tabulka 4).

Tabulka 4: Přehled zkoumaných nápojů, hodnot jejich pH, el. vodivosti a vybraných NMR parametrů

Nápoj	$\Delta m^a$ [g]	G [ $\mu$ S]	pH	$\delta(^{31}\text{P})$ DMSO- $d_6$ [ppm]	$\delta(^{31}\text{P})$ D $_2$ O [ppm]	S/N (D $_2$ O)
Demineralizovaná						
voda (z rozvodů fakulty)	-	259	7,0	-	-	-
Kohoutková (pitná) voda	-	678	6,7	-	-	-
Pepsi Max	0,250	670	2,7	-0,43	0,00	367
Coca Cola Zero	0,254	870	2,9	-0,82	-0,01	425
Kofola®	8,032	1080	2,8	-1,43	-0,14	2,7/21,5 <sup>b</sup>
Cola 0 % cukru	0,288	800	3,3	-1,06	-0,07	348
Pepsi	11,661	1000	2,4	-1,37	-0,04	26,7
Royal Crown Cola	12,286	710	2,6	-1,19	-0,04	25,7
Royal Crown Slim Cola	7,725	1100	2,4	-1,04	-0,05	41
Coca Cola	11,971	860	2,5	-1,06	0,00	19,5
Pure 100 % Juice Apples	6,270	1835	3,5	-	-	-

<sup>a</sup>hmotnost odparku po odpaření 100 ml nápoje

<sup>b</sup>měřeno na Prodigy kryosondě (počet pulzů = 32)

Nejprve bylo u všech nápojů změřeno jejich pH a elektrická vodivost ( $G$  [ $\mu\text{S}$ ]) ihned po otevření lahve či plechovky (před odplyněním). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 4. Ze získaných dat je patrné, že všechny nápoje „colového“ typu jsou poměrně hodně kyselé, neboť hodnoty jejich pH se pohybují v rozmezí 2,4 – 3,3. Překvapivě hodně kyselá byla i 100% jablečná šťáva ( $\text{pH} = 3,5$ ), a to zřejmě z důvodu přítomnosti organických kyselin (zejména kys. jablečná). Pro srovnání bylo změřeno i pH kohoutkové (pitné) vody ( $\text{pH} = 6,7$ ) a demineralizované vody z vlastních rozvodů fakulty ( $\text{pH} = 7,0$ ).

Po měření pH následovalo měření elektrické vodivosti nápojů (viz Tabulka 4). Z naměřených dat je zjevné, že všechny nápoje „colového“ typu jsou dobrými vodiči el. proudu ( $G_{\min} = 670 \mu\text{S}$  (Pepsi Max);  $G_{\max} = 1100 \mu\text{S}$  (Royal Crown Slim Cola)). Nejvyšší hodnota el. vodivosti byla naměřena pro 100% jablečnou šťávu ( $G = 1835 \mu\text{S}$ ). Na tomto místě je vhodné dodat, že destilovaná voda má běžně el. vodivost pod  $5 \mu\text{S}$ , pro kohoutkovou (pitnou) vodu byla v rámci této práce naměřena el. vodivost  $678 \mu\text{S}$  a pro demineralizovanou vodu z rozvodů fakulty pak  $259 \mu\text{S}$ .

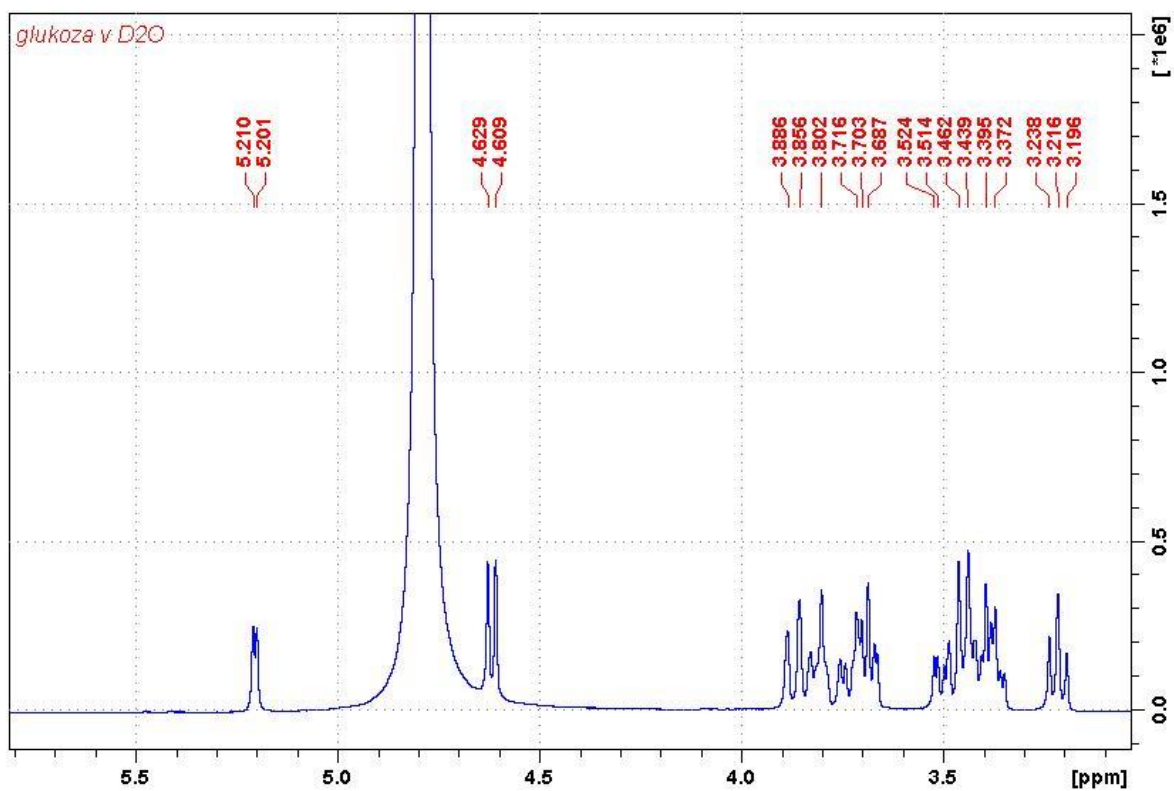
Před vlastním měřením  $^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spekter bylo nutné vzorky jednotlivých nápojů zahustit (tedy odstranit přítomnou vodu), a to ze dvou důvodů: *i*) signál nadbytečné vody by v  $^1\text{H}$  NMR spektrech byl velmi intenzivní a překrýval by tak některé signály sloučenin obsažených v nápojích (cukry) a *ii*) odpaření vody má za následek zvýšení relativní koncentrace prakticky netěkavé kyseliny fosforečné, jejíž  $^{31}\text{P}$  NMR signál tak mohl být změřen na standardní počet 32 pulzů.

Jak již bylo popsáno v experimentální části této práce, z každého nápoje bylo odebráno 100 ml a po odplynění (odstranění  $\text{CO}_2$ ) byla prakticky všechna voda odpařena na vakuové rotační odparce. Touto cestou bylo možné zjistit i hmotnost odparku a porovnat ji s deklarovaným složením, zejména s obsahem cukru, resp. glukózo-fruktózoového sirupu, v jednotlivých nápojích. Výsledky zcela jasně prokázaly, že nápoje obsahující umělá (náhradní) sladidla jako acesulfam K, aspartam, sodnou sůl sacharinu či cyklamát sodný (tedy s „nulovým“ obsahem sacharidů/cukrů) měly hmotnosti odparků pouze v řádech stovek miligramů (Pepsi Max 250 mg, Coca Cola Zero 254 mg a Cola 0 % cukru 288 mg). Naopak hmotnost odparků nápojů slazených běžným cukrem či glukózo-fruktózovým sirupem dosahovala hodnot v rozmezí 7,725 g (Royal Crown Slim Cola; deklarovaný obsah sacharidů 5,5 g) až 12,286 g (Royal Crown Cola; deklarovaný obsah sacharidů 11 g). Obecně lze samozřejmě říci, že hmotnost odparku závisí jednak na obsahu zbytkové (neodpařené) vody,

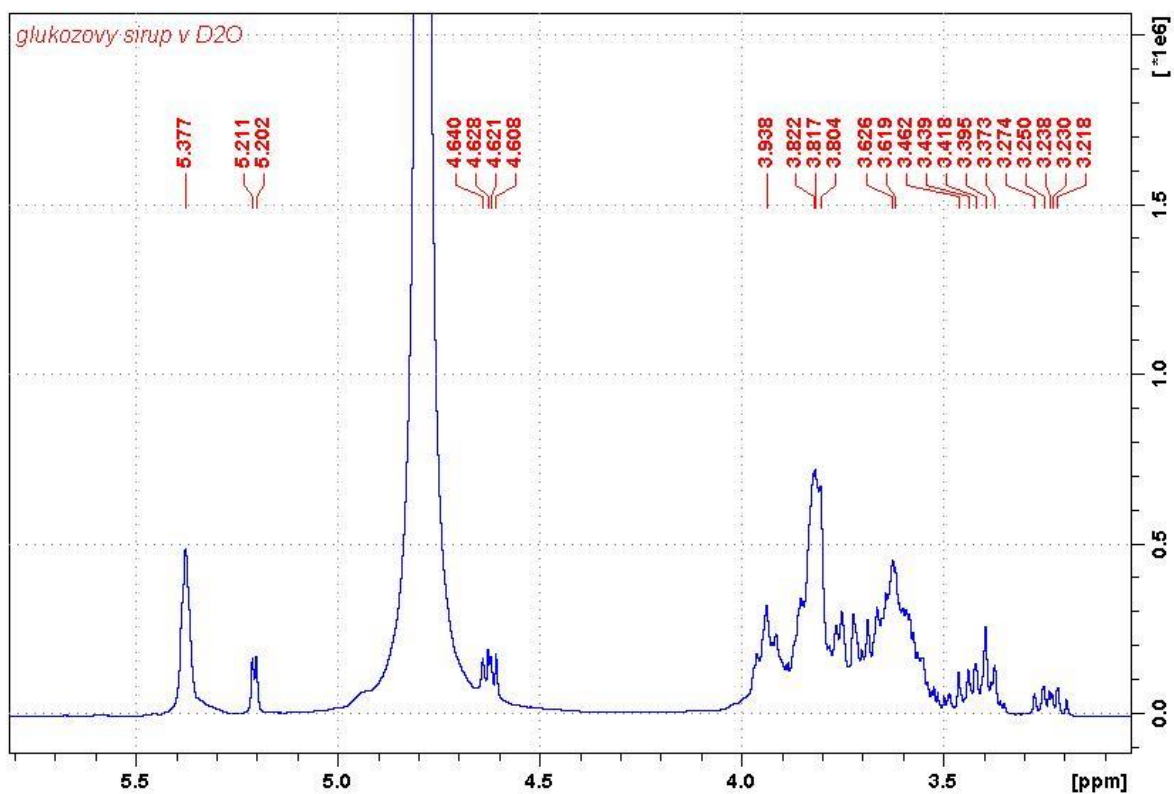
ale především na obsahu sacharidů v nápoji, neboť konzervanty, umělá barviva, aromata a především umělá sladidla jsou do nich přidávána pouze v malém množství (použitá umělá sladidla jsou zhruba 30 – 200krát sladší než stolní cukr). Výsledky zjištěné v této práci tento fakt jen potvrzují (hmotnost odparků všech nápojů je uvedena v Tabulce 4).

### 3.2. $^1\text{H}$ NMR spektroskopie

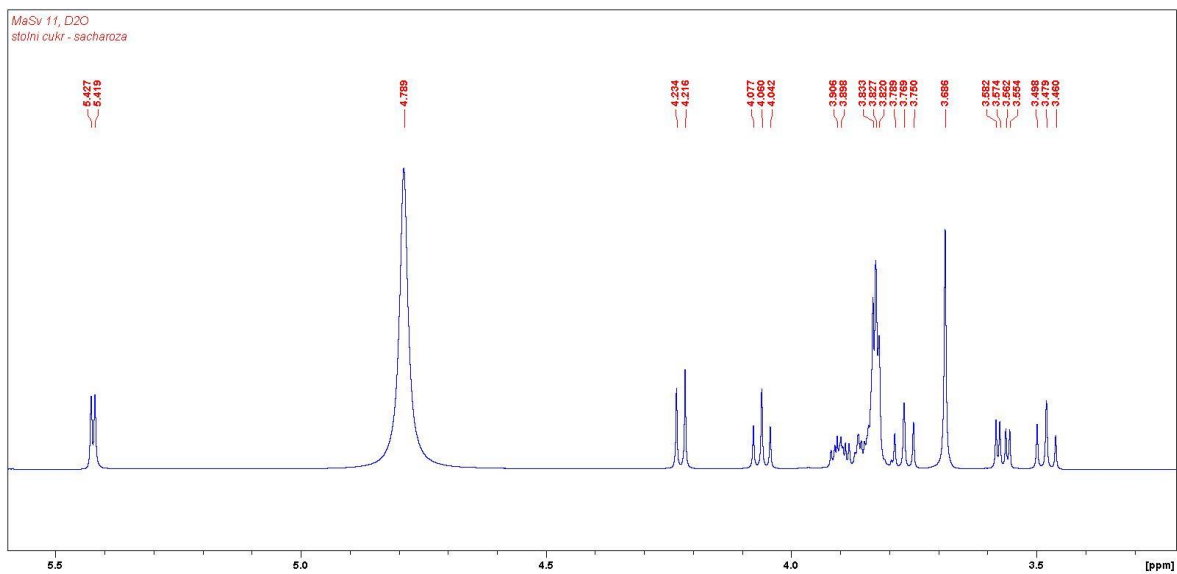
Jak už samotný název této bakalářské práce naznačuje, tak primárním cílem bylo ověřit přítomnost (resp. obsah) kyseliny fosforečné v zakoupených nápojích pomocí  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spektroskopie. Vzhledem k tomu, že studované nápoje obsahují mimo jiné běžný stolní cukr (sacharózu) nebo glukózo-fruktózový sirup či umělá sladidla (viz kapitola 3.1. Studované nápoje – složení), bylo rozhodnuto měřit i standardní  $^1\text{H}$  NMR spektra připravených vzorků a potvrdit tak přítomnost těchto sloučenin v zakoupených nápojích. Vzhledem k tomu, že v  $^1\text{H}$  NMR spektrech připravených vzorků nápojů změřených v  $\text{DMSO-}d_6$  byly signály zřetelně rozšířené a navíc byl prakticky ve všech těchto spektrech v rozsahu cca 3 – 5 ppm na pozadí přítomen velmi široký signál (který tak překrýval další signály), budou dále diskutována a zobrazena už jen spektra naměřená v deuterované vodě. Na základě změřených  $^1\text{H}$  NMR spekter glukózy (Obr. 8), glukózového sirupu (Obr. 9), sacharózy (Obr. 10), fruktózy (Obr. 11) a volně dostupných  $^1\text{H}$  NMR spekter příslušných umělých sladidel (Obr. 12 – 16) tak bylo možné potvrdit přítomnost těchto sloučenin v jednotlivých nápojích.



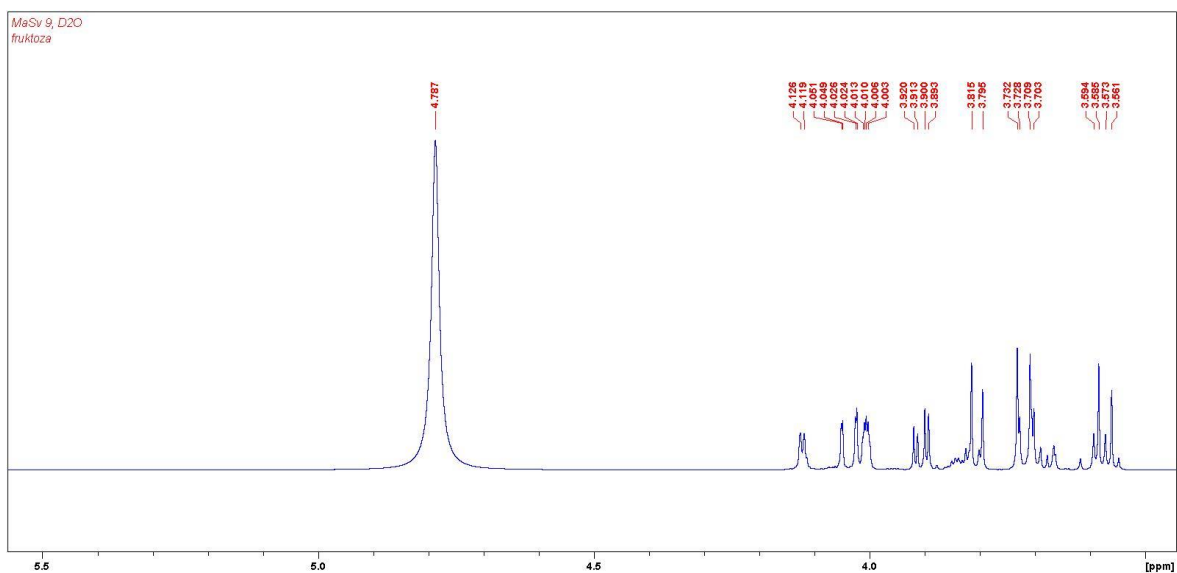
Obrázek 8: Naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum glukózy



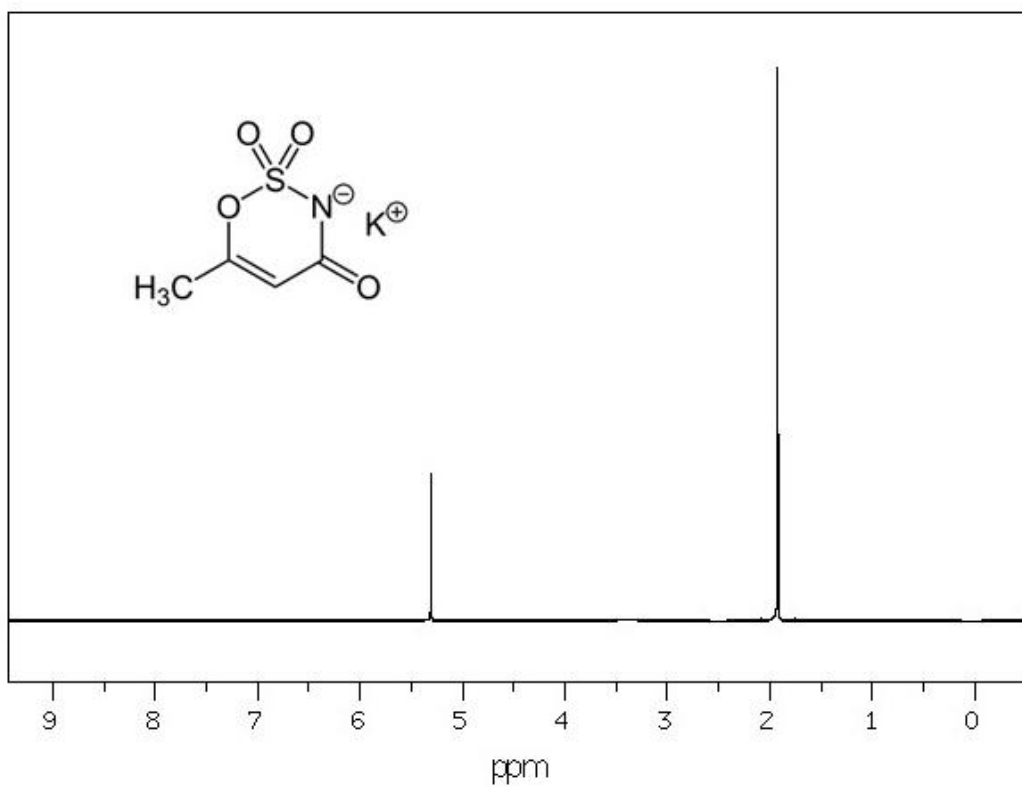
Obrázek 9: Naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum glukózového sirupu



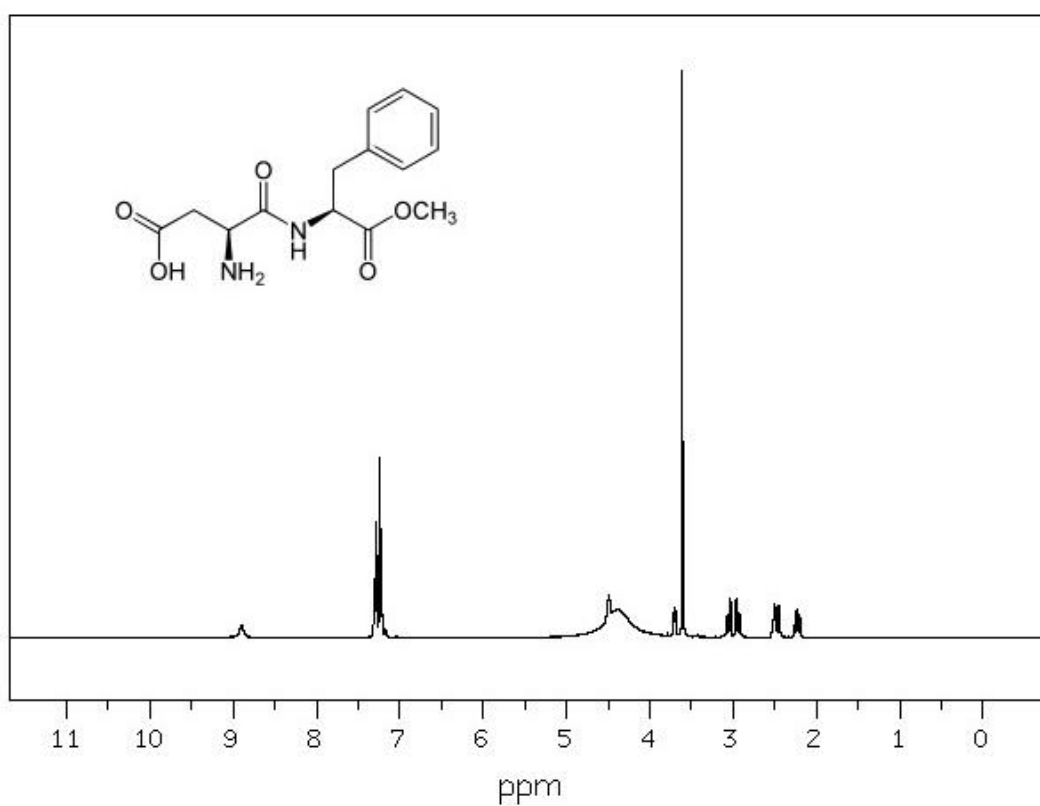
Obrázek 10: Naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum čistého stolního cukru (sacharózy) v  $\text{D}_2\text{O}$



Obrázek 11: Naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum čisté fruktózy v  $\text{D}_2\text{O}$

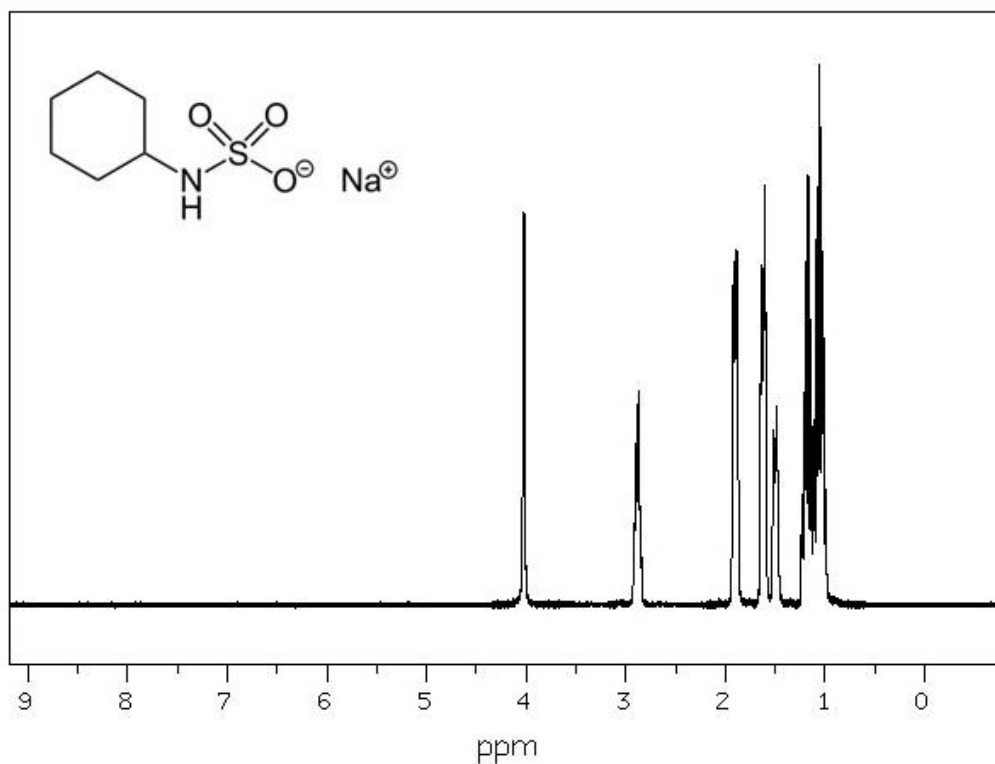


Obrázek 12:  $^1\text{H}$  NMR spektrum acesulfamu K v DMSO- $d_6$  (obrázek převzat z volně přístupné databáze AIST<sup>23</sup>.)

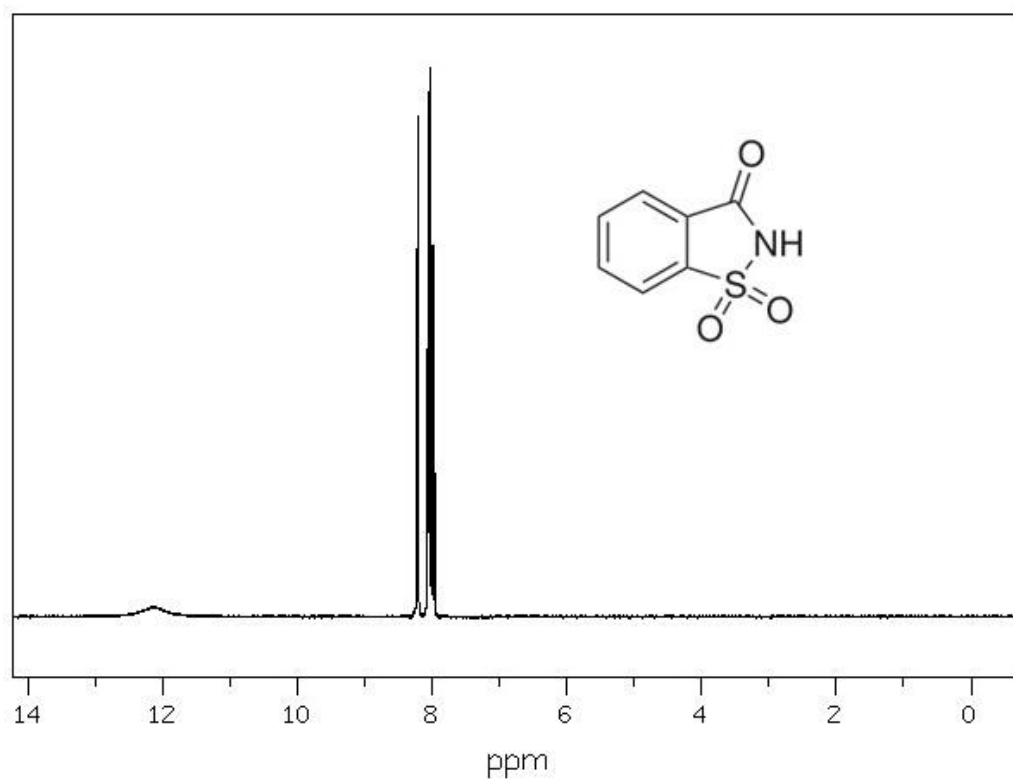


Obrázek 13:  $^1\text{H}$  NMR spektrum aspartamu v DMSO- $d_6$  (obrázek převzat z volně přístupné databáze AIST<sup>23</sup>.)



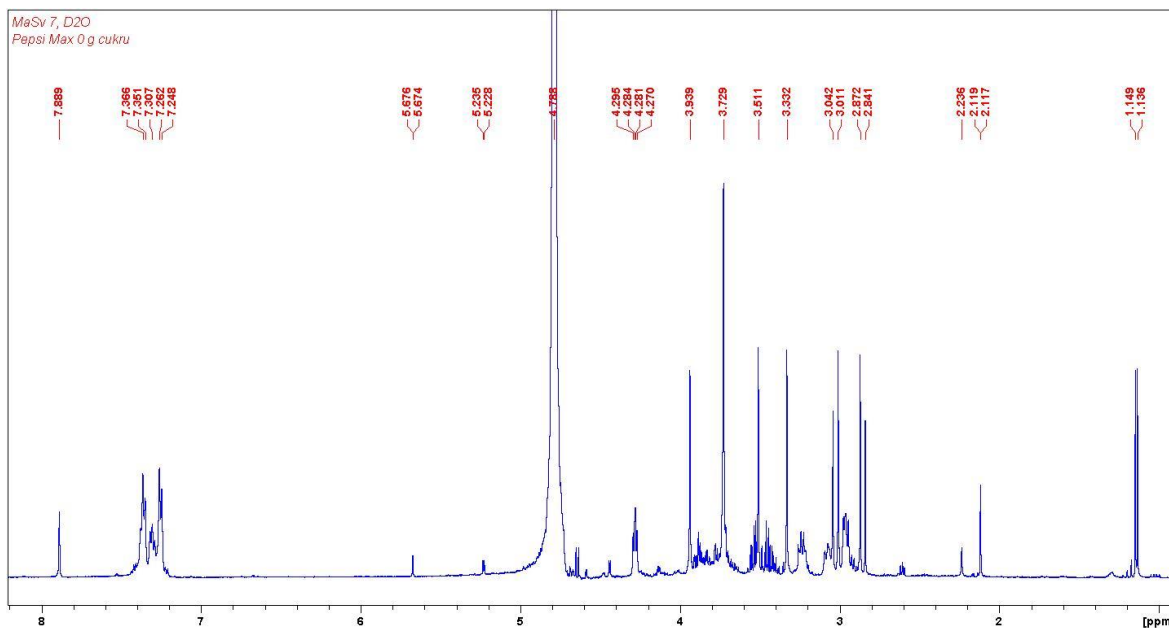


Obrázek 14:  $^1\text{H}$  NMR spektrum sodné soli cyklamátu v  $\text{DMSO-d}_6$  (obrázek převzat z volně přístupné databáze AIST<sup>23</sup>.)



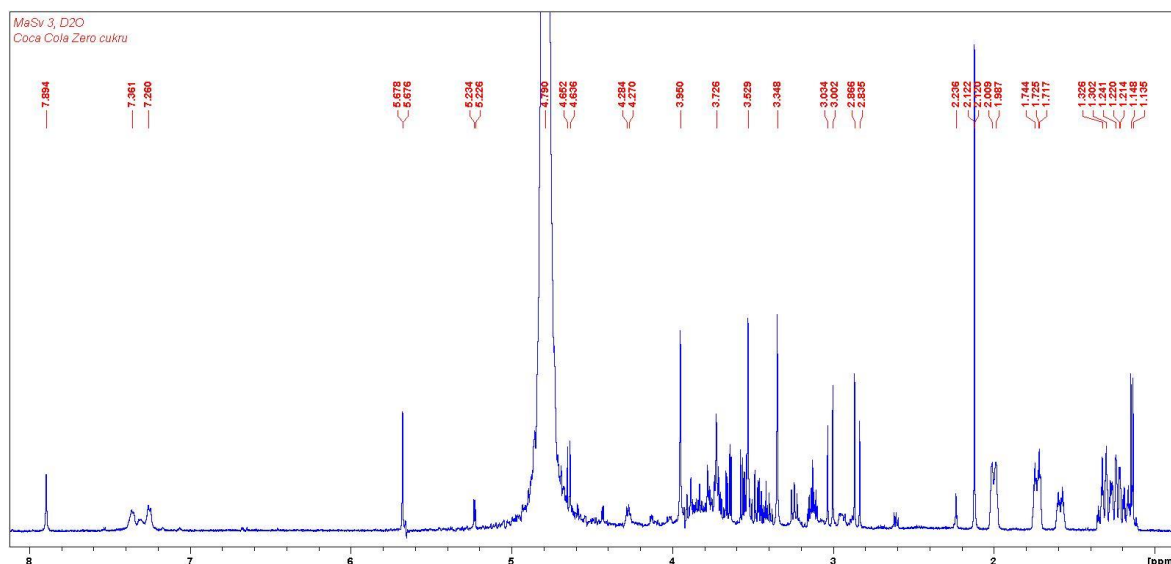
Obrázek 15:  $^1\text{H}$  NMR spektrum sacharinu v  $\text{DMSO-d}_6$  (obrázek převzat z volně přístupné databáze AIST<sup>23</sup>.)

V odparku Pepsi Max s deklarovaným obsahem 0 g cukru (Obr. 16) nejsou tedy přítomny žádné cukry (ať už sacharóza či glukózo-fruktózový sirup), ale  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie prokázala přítomnost acesulfamu K (signály s chemickým posunem 5,23 a 2,11 ppm) i aspartamu (signály v aromatické části spektra s chemickým posunem 7,36 - 7,24 ppm; v alifatické části spektra pak multiplety s chemickým posunem okolo 3 ppm). Další resonance jsou v naměřeném spektru přítomny v důsledku obsahu dalších látek v nápoji (např. kofein, kyselina citrónová, citronany sodné).



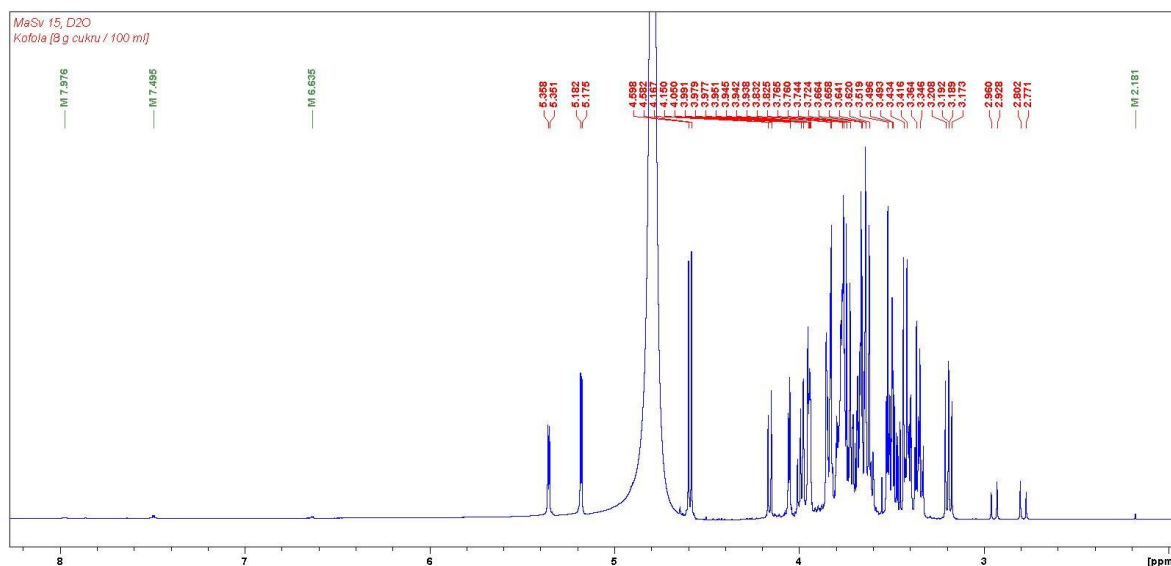
Obrázek 16:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Pepsi Max v  $\text{D}_2\text{O}$

Ani v odparku Coca Cola Zero cukru s deklarovaným obsahem 0 g cukru (Obr. 17) nejsou přítomny žádné cukry, ale  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie prokázala přítomnost acesulfamu K (signály s chemickým posunem 5,23 a 2,12 ppm), aspartamu (signály v aromatické části spektra s chemickým posunem 7,36 - 7,26 ppm; v alifatické části spektra pak multiplety s chemickým posunem okolo 3 ppm) i cyklamátu sodného (charakteristické multiplety cyklohexylového substituentu v oblasti 1 - 2 ppm). Další resonance jsou v naměřeném spektru přítomny v důsledku obsahu dalších látek v nápoji (např. kofein, citronany sodné, umělá barviva).



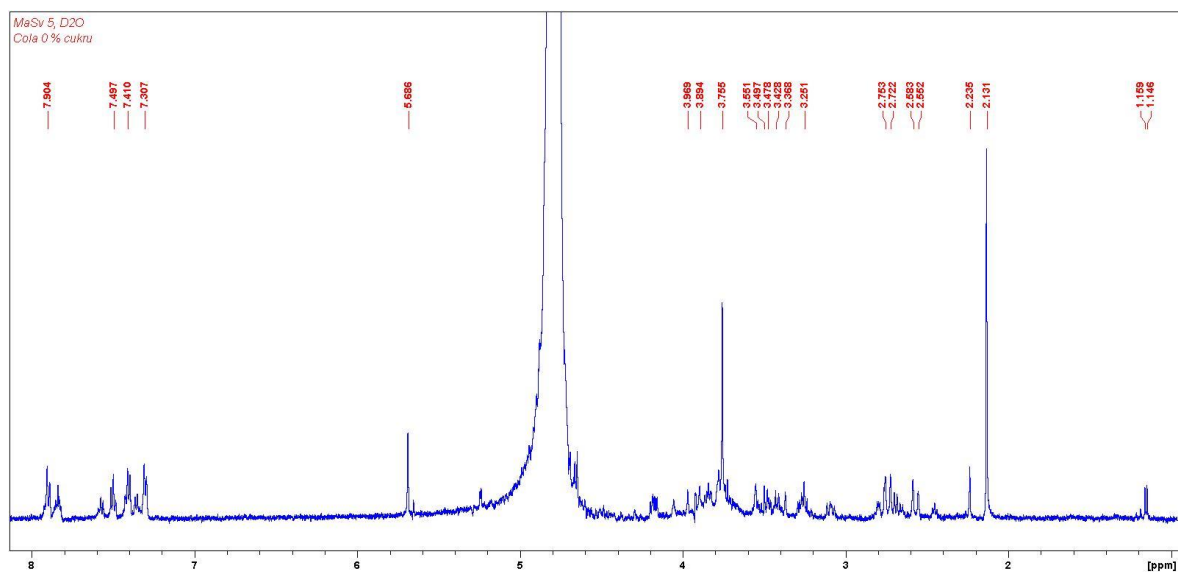
Obrázek 17:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Coca Cola Zero v  $\text{D}_2\text{O}$

Na rozdíl od předchozích dvou nápojů obsahuje odparek Kofoly<sup>®</sup> cukr, resp. glukózo-fruktózový sirup (deklarováno 8 g cukru ve 100 ml nápoje) a naopak neobsahuje žádná umělá sladidla (viz Obr. 18). V  $^1\text{H}$  NMR spektru odparku Kofoly<sup>®</sup> tak lze pozorovat velmi intenzivní charakteristické multiplety glukózo-fruktózového sirupu. Ve spektru jsou dále přítomny i další málo intenzivní signály (např. 7,49 a 6,63 ppm), které pravděpodobně souvisí s obsahem bylinných extraktů, konzervantů či barviv.

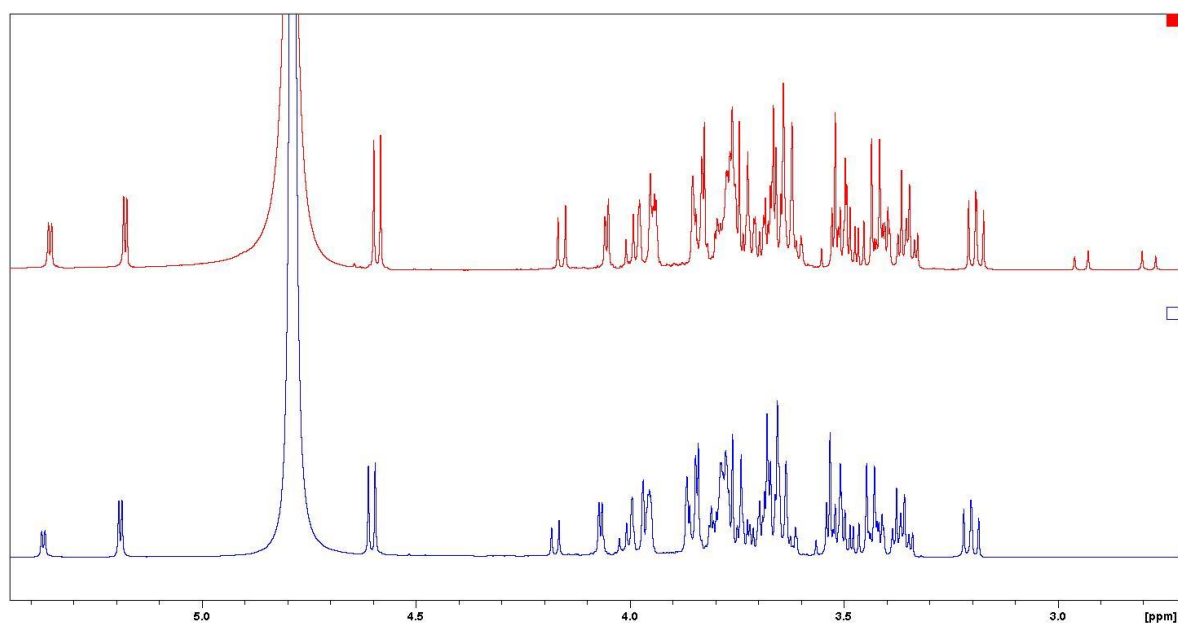


Obrázek 18:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Kofoly<sup>®</sup> v  $\text{D}_2\text{O}$

Dalším studovaným nápojem s deklarovaným obsahem cukru menším než 0,5 g ve 100 ml byla Cola 0 % cukru. Tento nápoj obsahuje umělá sladidla acesulfam K ( $\delta(^1\text{H}) = 5,68$  a 2,13 ppm), aspartam (signály v aromatické části spektra a charakteristické multiplety v alifatické části spektra) a sodnou sůl sacharinu (signály v aromatické části spektra; Obr. 19).



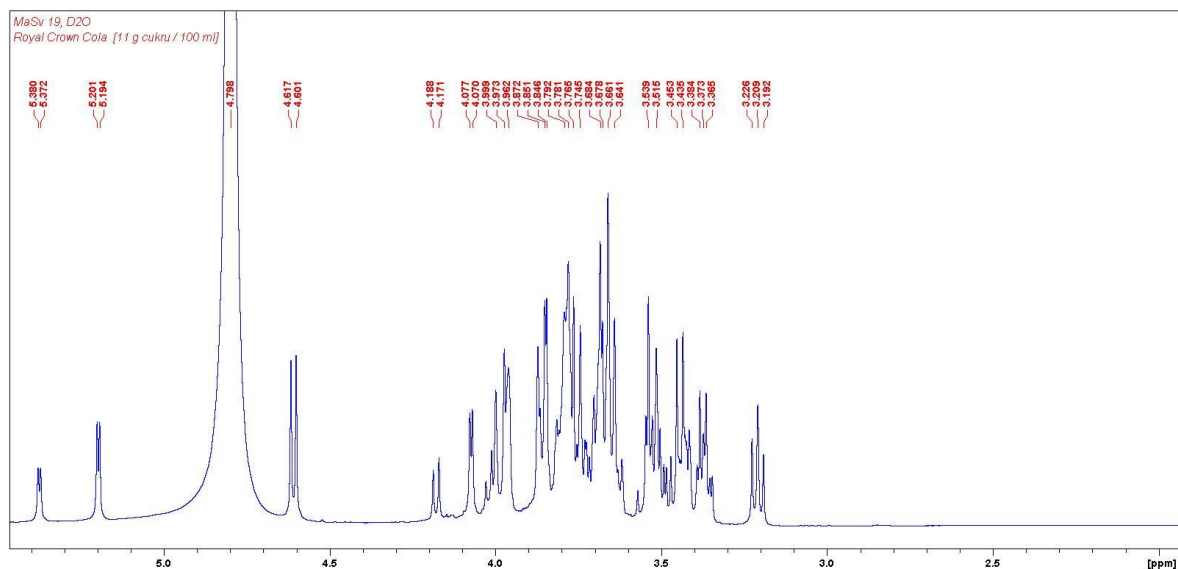
Obrázek 19:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Cola 0 % cukru v  $\text{D}_2\text{O}$



Obrázek 20: Porovnání  $^1\text{H}$  NMR spekter odparků Pepsi (modrá) a Kofoly<sup>®</sup> (červená) v  $\text{D}_2\text{O}$

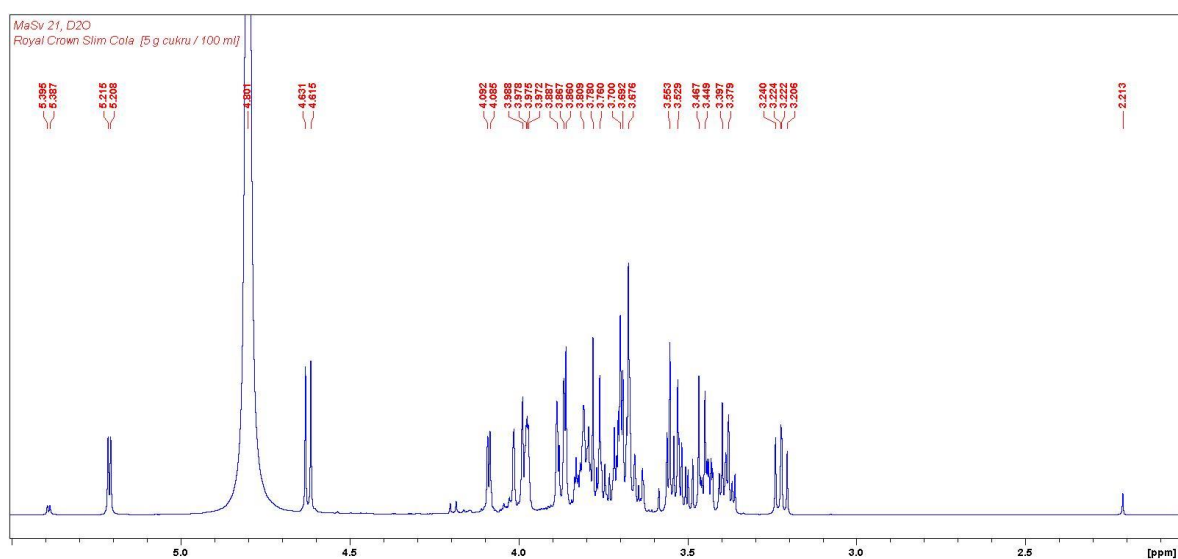
Dle informací od výrobce obsahuje nápoj Pepsi 11 g cukru na 100 ml a nejsou proto použita žádná umělá sladidla, což bylo potvrzeno pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Je poměrně zajímavé, že naměřené spektrum je prakticky shodné s naměřeným  $^1\text{H}$  NMR spektrem Kofoly<sup>®</sup> slazené glukózo-fruktózovým sirupem (viz Obr. 20). Vzhledem k tomu, že výrobce Pepsi nespecifikuje použitý cukr, tak by se dalo očekávat, že cukrem je myšlena sacharóza. Její  $^1\text{H}$  NMR spektrum však vykazuje menší počet signálů (viz Obr. 10). Jednoduchým vysvětlením tohoto faktu by mohlo být to, že v relativně kyselém prostředí nápoje ( $\text{pH} = 2,4$ ) dochází ke štěpení disacharidu sacharózy (stolního cukru) na směs glukózy a fruktózy (tzv. invertní cukr).

$^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Royal Crown Coly (Obr. 21) je taktéž prakticky identické s  $^1\text{H}$  NMR spektrem Pepsi (Obr. 20). Výrobce Royal Crown Coly deklaruje použití pouze třtinového cukru, který se pak opět v kyselém prostředí nápoje zjevně rozkládá za vzniku invertního (invertovaného) cukru.



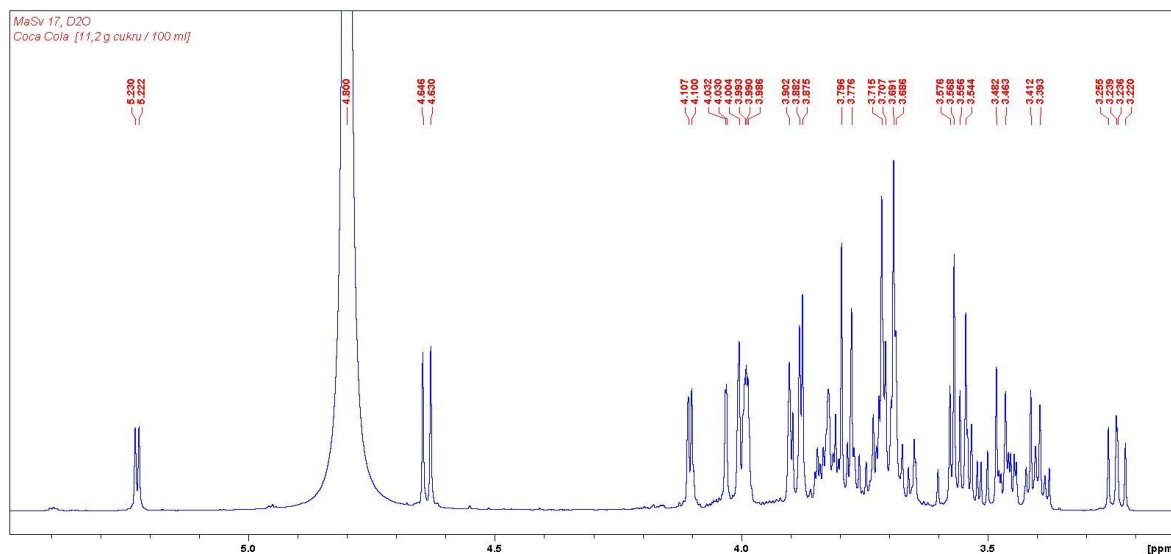
Obrázek 21:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Royal Crown Cola v  $\text{D}_2\text{O}$

U nápoje Royal Crown Slim Cola uvádí výrobce obsah sacharidů pouze 5,5 g, z toho 5 g cukru. Nápoj je dále doslazen přidavkem steviol-glykosidu a obsahuje přírodní aroma a kofein. V  $^1\text{H}$  NMR spektru odparku tohoto nápoje (Obr. 22) jsou pozorovány stejné signály jako v odparcích nápojů Pepsi a Royal Crown Cola. Na první pohled je však patrné, že intenzita některých signálů je o mnoho nižší, což by nasvědčovalo, že v nápoji je jiný poměr (mono)sacharidů.



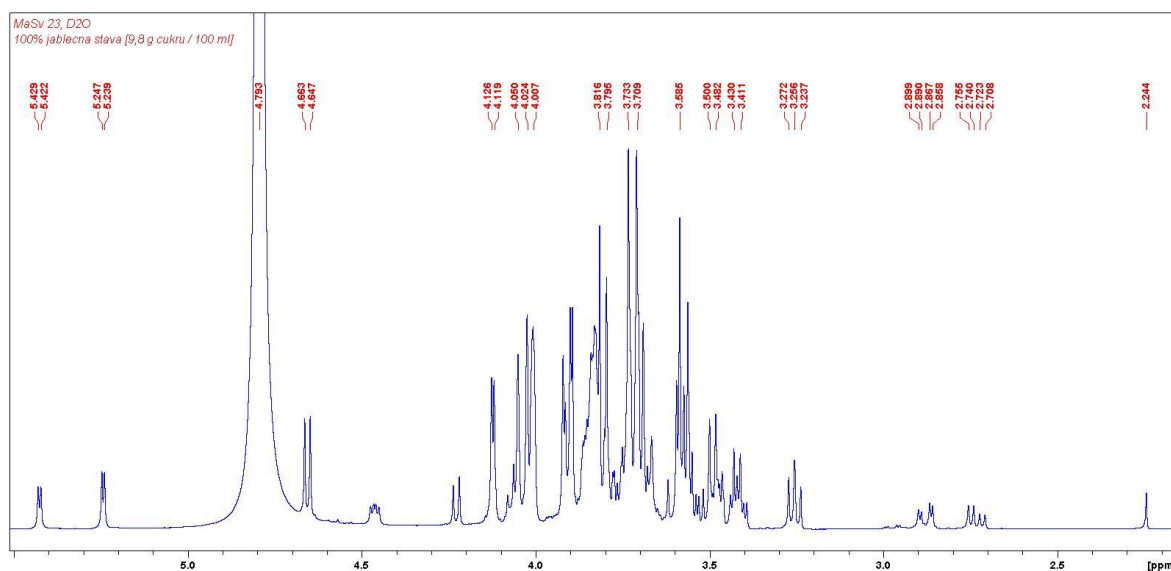
Obrázek 22:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Royal Crown Slim Cola v  $\text{D}_2\text{O}$

Posledním studovaným nápojem „colového“ typu byla klasická Coca Cola s obsahem cukrů (fruktózo-glukózového sirupu) 11,2 g na 100 ml nápoje. V  $^1\text{H}$  NMR spektru odparku tohoto nápoje je tak opět pozorována přítomnost charakteristických resonancí (Obr. 23) jako v předchozích případech nápojů slazených cukrem nebo glukózo-fruktózovým sirupem.



Obrázek 23:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Coca Cola v  $\text{D}_2\text{O}$

Pro účely této práce byla také zakoupena přírodní 100% jablečná šťáva Pure Juice 100 % Apples. Tento nápoj obsahuje tedy pouze přírodní cukry a  $^1\text{H}$  NMR spektrum jeho odparku je zobrazeno na Obr. 24.



Obrázek 24:  $^1\text{H}$  NMR spektrum odparku Pure Juice 100 % Apples v  $\text{D}_2\text{O}$

### 3.3. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektroskopie

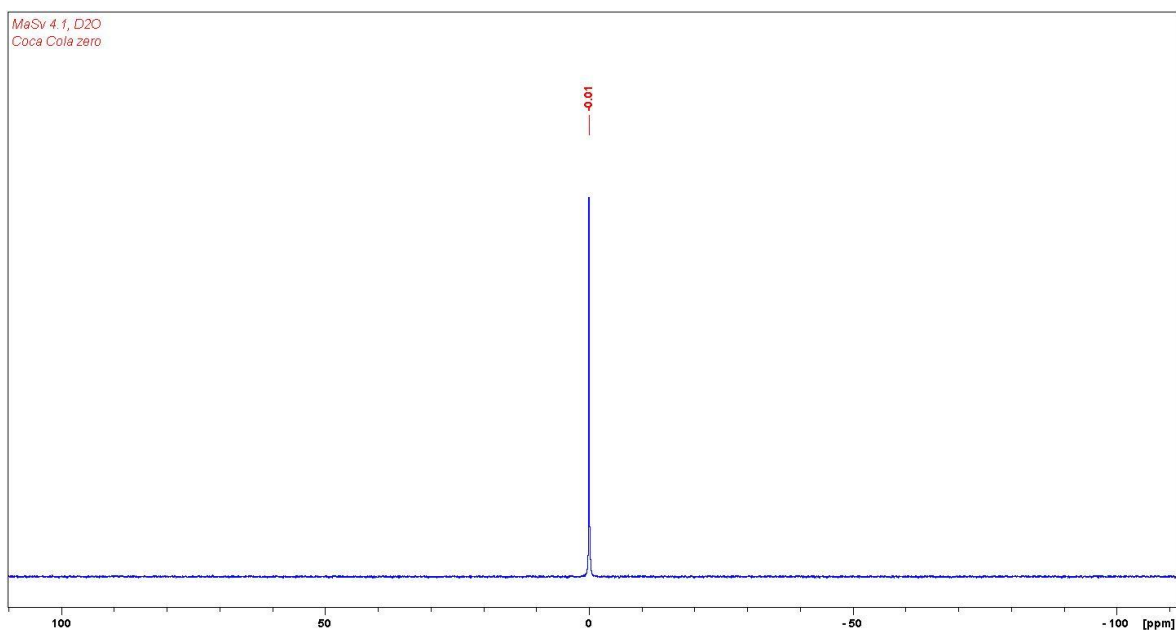
Vzhledem k tomu, že ve všech změřených  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech odparků „colových“ nápojů byl pozorován pouze jeden signál patřící  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , jsou v této práci zobrazena pouze některá spektra. Obecně lze říci, že ve vzorcích měřených v  $\text{D}_2\text{O}$  mají resonance kyseliny

fosforečné hodnotu chemického posunu prakticky rovnou nule (viz Tabulka 4), což samozřejmě souvisí s tím, že kyselina fosforečná slouží jako standard (85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve vodě;  $\delta(^{31}\text{P}) = 0,00$  ppm). Ve vzorcích odparků v  $\text{DMSO-d}_6$  se pak signál této kyseliny pohybuje v rozmezí -0,43 až -1,43 ppm.

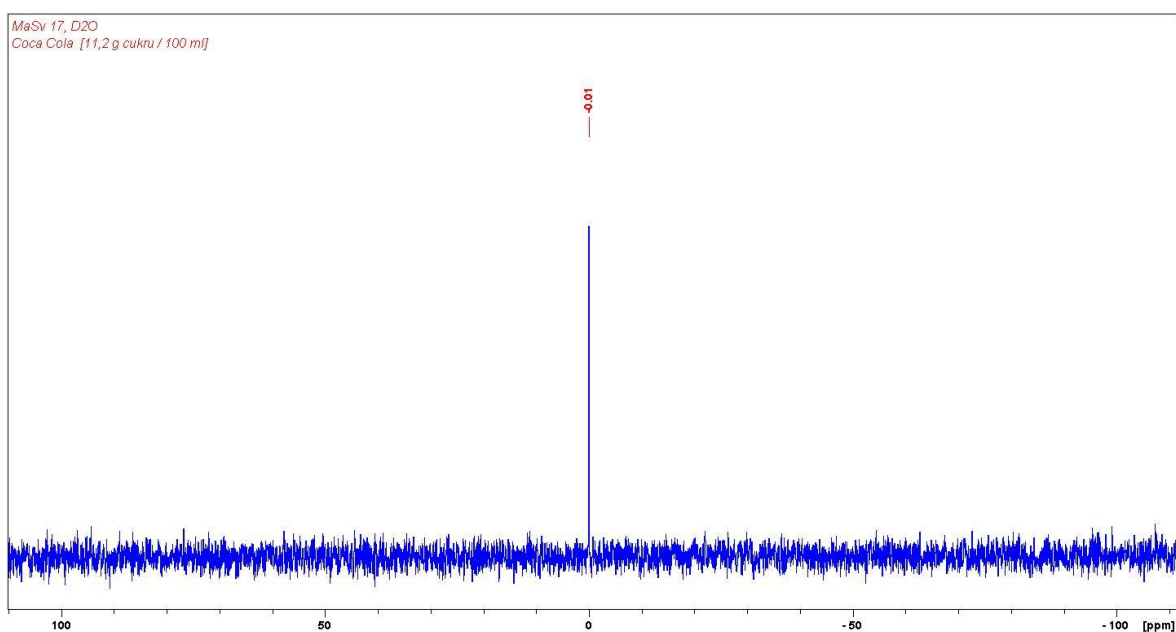
Všechny nápoje „colového“ typu mimo Kofolu<sup>®</sup> obsahují dle prohlášení výrobců kyselinu fosforečnou. Žádný výrobce bohužel neuvádí přesný obsah (resp. koncentraci) této kyseliny v nápojích. Stanovení absolutního obsahu  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve vzorcích nápojů je proto jen pomocí NMR spektroskopie nemožné, ale na základě vypočítaného poměru signálu k šumu (tzv. signal-to noise ratio;  $S/N$  – viz Tabulka 4) lze alespoň velmi hrubě porovnat relativní koncentraci kyseliny v rámci jednotlivých nápojů, a to za dodržení následujících podmínek: *i*) pro přípravu NMR vzorku bylo vždy odebráno 100-110 mg příslušného odparku a rozpuštěno v 0,7 ml deuterovaného rozpouštědla ( $\text{D}_2\text{O}$  nebo  $\text{DMSO-d}_6$ ); *ii*) NMR vzorky byly měřeny na stejném NMR spektrometru na stejné sondě; a *iii*) počet pulzů během akvizice  $^{31}\text{P}$  NMR spekter byl vždy roven 32.

Pro všechny vzorky odparků „colových“ nápojů v  $\text{D}_2\text{O}$  byly na základě získaných  $^{31}\text{P}$  NMR spekter v počítačovém programu TopSpin 3.2 vypočítány příslušné hodnoty  $S/N$ , které jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 4. Lze konstatovat, že čím vyšší je hodnota  $S/N$ , tím vyšší je i relativní obsah kyseliny fosforečné. Zde je však nutné vzít v úvahu to, že v odparcích nápojů slazených umělými sladidly je samozřejmě relativně vyšší koncentrace  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (neboť hmotnost těchto odparků se pohybuje v řádech stovek miligramů), a proto je hodnota  $S/N$  o jeden řád vyšší než v případě vzorků získaných z nápojů obsahujících cukr (tam je hmotnost odparků až kolem 12 gramů).

Pro „colové“ nápoje slazené umělými sladidly byly zjištěny následující hodnoty  $S/N$ : Pepsi Max 367, Coca Cola Zero 425 (Obr. 25) a Cola 0 % cukru 348. V nápojích „colového“ typu slazených cukrem nebo glukózo-fruktózovým sirupem se pak hodnoty  $S/N$  pohybují v rozmezí 19,5 (Coca Cola; Obr. 26) – 26,7 (Pepsi).



Obrázek 25:  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum odparku Coca Cola Zero.  $S/N = 425$ .

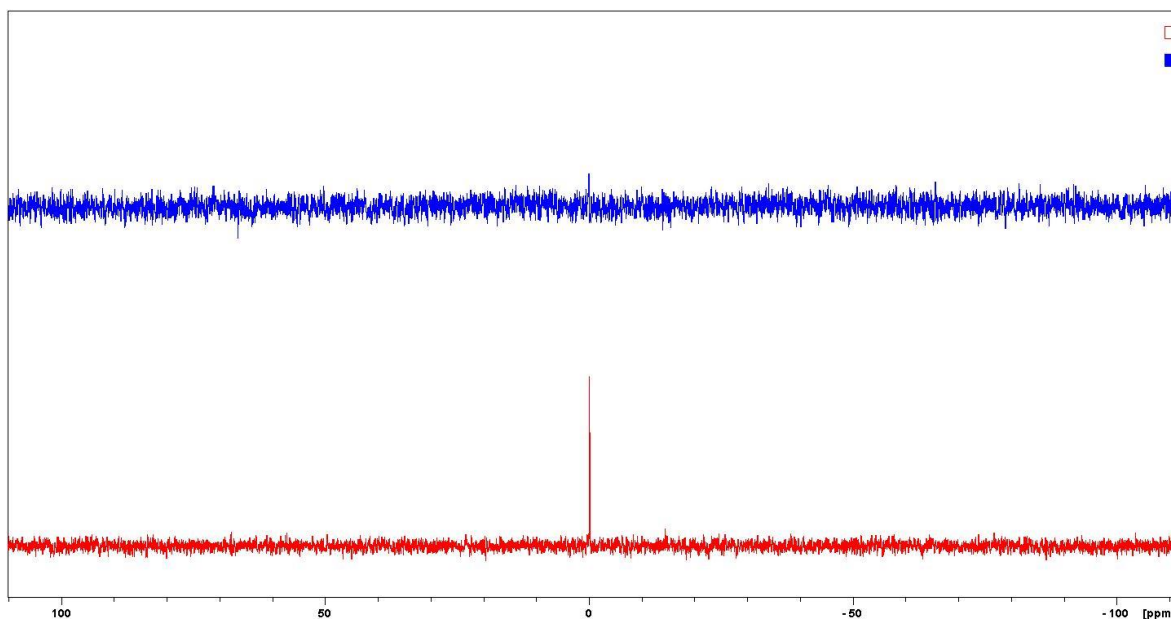


Obrázek 26:  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum odparku Coca Cola.  $S/N = 19,5$ .

I přesto, že výrobce Kofoly ve složení nápoje neuvádí žádnou kyselinu fosforečnou, bylo  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum připraveného vzorku změřeno. Překvapivě bylo zjištěno, že na standardní počet 32 pulzů, se v oblasti kolem 0,0 ppm objevila téměř nepozorovatelná rezonance, která by hodnotou svého chemického posunu odpovídala právě  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Obr. 27;  $S/N = 2,7$ ). Aby mohla být potvrzena nebo naopak vyvrácena tato domněnka, byl tento vzorek ještě přeměřen na kapalným dusíkem chlazené Prodigy kryosondě. Tato sonda má mnohonásobně vyšší citlivost než v experimentální části popsaná TBI sonda, a to díky



potlačení elektronického šumu za nízkých teplot, na které je sonda chlazena (cca 80 K). Toto dodatečné měření pak definitivně potvrdilo přítomnost kyseliny fosforečné v Kofole, i když v podstatě jen ve stopovém množství (Obr. 27; S/N = 21,5). Možným vysvětlením tohoto zjištění by mohlo být to, že kyselina fosforečná je přirozenou součástí použitých přírodních bylinných extraktů nebo použitého ovocného sirupu.



Obrázek 27:  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum odparku Kofoly změřené na TBI sondě (modré spektrum; počet pulzů 32; S/N = 2,7) a na Prodigy kryosondě (červené spektrum; počet pulzů 32; S/N = 21,5)

#### 4. ZÁVĚR

Stejně jako se zvyšuje konzumace limonád a technologicky upravených potravin, zvyšuje se i příjem fosforu v lidské potravě a nápojích. Pro správnou funkci organismu by však měl být poměr mezi přijímaným fosforem a vápníkem vyrovnaný. Nedostatečná konzumace potravin obsahujících vápník může vést k řadě zdravotních komplikací. Je důležité si uvědomit, že obsah kyseliny fosforečné ve studovaných nápojích „colového“ typu je poměrně vysoký, neboť pH těchto nápojů se pohybovalo v rozmezí 2,4 – 3,3. Na druhou stranu je také nutno vzít v úvahu, že pH nápojů bylo měřeno před odplyněním, a tudíž výsledné pH bylo samozřejmě ovlivněno i přítomností rozpuštěného oxidu uhličitého.

V „colových“ nápojích byl pomocí NMR spektroskopie zjišťován obsah kyseliny fosforečné a přidaných sladidel a cukrů.

Přítomnost aspartamu a acesulfamu K byla prokázána u Coly 0 % cukru, Coca Coly Zero a Pepsi Max, přesně jak uvádí výrobce na etiketě. U Coly 0 % cukru je navíc přítomná sodná sůl sacharinu a u Coca Coly Zero cyklamát sodný. Glukózo-fruktózový sirup byl prokázán v Kofole<sup>®</sup> a Coca Cole, ovšem <sup>1</sup>H spektra Pepsi, Royal Crown Coly a Royal Crown Slim Coly, v nichž by měl být přítomen cukr, jsou téměř totožná se spektry nápojů, kde je přítomen glukózo-fruktózový sirup.

Kyselina fosforečná byla prokázána u všech nápojů „colového“ typu. Překvapivá je její přítomnost v Kofole<sup>®</sup>, u které, přestože není přímo uvedena na etiketě, může být součástí přírodních složek.

## 5. POUŽITÁ LITERATURA

1. T. PROKOPOV, S. TANCHEV, Methods of Food Preservation, Food Safety, (A. McElhatton, Ed.). Msida, Malta, 2007, str. 3 – 24, ISBN 978-0387-33509-4.
2. J. A. TRAILER, Effect of water activity on enterotoxin B. production and growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 1971, 21(3), str. 435-441.
3. A. L. BRODY, The Market. In Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food, (R. T. Parry, Ed.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1993, str. 19 – 40.
4. L. LEISTNER, W.K. Downey (Ed.), Food Quality and Nutrition. Elsevier (1978), str. 553-557.
5. J. VELÍŠEK, J. HAJŠLOVÁ, *Chemie potravin I. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, str. 124, 127, 237, 311, 312, 465 - 469, ISBN 978-80-86659-15-2.
6. A. SPYROS, P. DAIS, 31P NMR spectroscopy in food analysis, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Rethymnon, Řecko, 2008, str. 195 – 205.
7. Referenční hodnoty pro příjem živin. V ČR 2. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 2019, str. 200, ISBN 978-80-906659-3-4.
8. J. VELÍŠEK, J. HAJŠLOVÁ, *Chemie potravin II. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, str. 379 a 381, ISBN 978-80-86659-16-9.
9. J. DAVÍDEK, G. JANÍČEK, *Chemie potravin*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, str. 132.
10. A. RODRIGUEZ-BENOTMD, Mild Hyperphosphatemia and Mortality in Hemodialysis Patients. *Elsevier*, 2005, 46(1), str. 68, doi: 10.1053/j.ajkd.2005.04.006
11. E. TAKEDA, H. YAMAMOTO, Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutrition Reviews*, 2012, 70(6), str. 311, Online ISSN 1753-4887
12. K. L. TUCKER, K. MORITA, Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis

Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 84(4), str. 936 – 942, doi: 10.1093/ajcn/84.4.936

13. E. SHUTO, Y. TAKETANI, Dietary Phosphorus Acutely Impairs Endothelial Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20(7), str. 1504, doi:10.1681/asn.2008101106

14. J. J. B. ANDERSON, Potential health concerns of dietary phosphorus: cancer, obesity, and hypertension. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1301(1), str. 1–7, doi:10.1111/nyas.12208

15. Fosfor. Centrum pro databázi složení potravin: Databáze složení potravin ČR, verze 8.20 [online]. Praha: Ústav zemědělské ekonomiky a informací, 2020 [cit. 2021-06-13]. Dostupné z: <https://www.nutridatabase.cz/vyhledavani-potravin/podle-nutrientu/?id=32>

16. Reaxys. Copyright © 2021 Elsevier Life Sciences IP Limited. <https://www.reaxys.com/#/search/quick>, den přístupu 2021-07-01.

17. D. WINKLEROVÁ, J. VRKOSLAVOVÁ, E kódy. Státní zdravotní ústav, verze 3.0 [online]. Praha: Státní zdravotní ústav, 2012 [cit. 2021-06-13]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/e-kody-1>

18. J. VRKOSLAVOVÁ, Nová evropská nařízení týkající se potravinářských aditiv. Státní zdravotní ústav, verze 3.0 [online]. Praha: Státní zdravotní ústav, 2012 [cit. 2021-06-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/nova-evropska-narizeni-tykajici-se-potravinarskych-aditiv>

19. J. MCMURRY, Organická chemie. Brno: VUTIUM, Překlady vysokoškolských učebnic, 2007, str. 424 – 453, ISBN 978-80-214-3291-8.

20. F. ČŮTA, Instrumentální analýza. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, str. 106 – 115.

21. V. MACHÁČEK, J. PANCHARTEK, M. VEČEŘA, Organická chemie I. část. Pardubice, 2001, str. 104 – 106.

22. HANS REICH'S COLLECTION, NMR Spectroscopy. ACS Division of Organic Chemistry. Poslední aktualizace: 2021-06-15 [cit. 2021-06-28]. Dostupné z: [https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/nmr/?index=nmr\\_index%2F31P\\_shift](https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/nmr/?index=nmr_index%2F31P_shift)
23. Spectral Database for Organic Compounds, <https://sdfs.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, den přístupu do databáze 2021-06-24)