

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**VÝVOJ CE-C⁴D METODY PRO ANALÝZU
SACHARIDŮ V MEDU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. PAVEL JÁČ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Bc. Gabriela Šebestová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Bc. Gabriela Šebestová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu, vstřícnost a trpělivost při tvorbě této diplomové práce.

Poděkování patří i Mgr. Ondřeji Jungovi za jeho pomoc, rady a připomínky při zpracování statistické analýzy v rámci této práce a také všem pracovníkům katedry analytické chemie za vstřícný přístup při práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Gabriela Šebestová

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj CE-C⁴D metody pro analýzu sacharidů v medu

Med je běžně využívaná přírodní směs, u které je nutné sledovat kvalitu kvůli možnému nesprávnému zacházení nebo falšování.

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj metody kapilární elektroforézy s kapacitně vázanou bezkontaktní vodivostní detekcí (CE-C⁴D) pro stanovení obsahu sacharidů ve vzorcích medu. Pro optimalizaci separačních podmínek bylo využito plánování experimentů (DoE), které umožňuje nalezení vhodných separačních podmínek na základě multivariantní optimalizace. Během optimalizace byl zkoumán především vliv těchto faktorů: složení elektrolytu, separační napětí a teplota během separace a vnitřní průměr separační kapiláry. Byly optimalizovány dvě metody: jedna s normálním elektroosmotickým tokem (EOF) a druhá za využití obráceného EOF po přidavku CTAB.

Pro validaci a analýzu vzorků medu byla využita metoda v režimu normálního EOF. Separace probíhala v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 20 μm, celkové délce 48,7 cm a efektivní délce 33,8 cm. Teplota byla 27,7 °C a napětí +16,5 kV. Jako optimální byl zvolen základní elektrolyt o koncentraci 35 mM NaOH a 15 mM Na₂HPO₄. Jako vnitřní standard byla zvolena galaktóza. Celková doba separace byla kratší než 5 minut. Limit kvantifikace byl 0,3 mM, což odpovídá obsahu 5 g sacharózy na 100 g medu, a tím tato metoda umožňuje stanovení maximálního povoleného množství sacharózy stanovené vyhláškou č. 76/2003 Sb. Linearita byla ověřena v rozmezí od 0,3 mM do 7,5 mM s korelačními koeficienty vyššími než 0,9984 pro všechny analyty. Touto metodou byly analyzovány tři vzorky medu, které splňovaly nároky předepsané vyhláškou, tj. obsah sacharidů byl vyšší než 60 g/100 g medu a obsah sacharózy byl nižší než 5 g/100 g medu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Gabriela Šebestová

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Development of CE-C4D method for the analysis of saccharides in honey

Honey is a commonly used natural mixture which quality must be monitored due to possible mishandling or adulteration.

This diploma thesis is focused on the development of a capillary electrophoresis method with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) for the determination of carbohydrates in honey samples. Design of Experiments (DoE) was used to optimize the separation conditions. This approach allows to find suitable separation conditions by means of multivariate optimization. During the optimization, the impact of the following factors was investigated: the composition of the background electrolyte, the separation voltage and temperature during separation and the inner diameter of the separation capillary. Two methods were optimized: one with normal electroosmotic flow (EOF) and the other using reversed EOF after CTAB addition.

The method in the normal EOF mode was used for validation and analysis of honey samples. A fused silica capillary with an inner diameter of 20 μm , a total length of 48.7 cm and an effective length of 33.8 cm was used for the separation. The temperature was 27.7 $^{\circ}\text{C}$ and the separation voltage was set at +16.5 kV. The background electrolyte composed of 35 mM NaOH and 15 mM Na₂HPO₄ was chosen as optimal. Galactose was used as the internal standard. Total analysis time was shorter than 5 minutes. The limit of quantification was 0.3 mM, what corresponds to a content of 5 g of sucrose per 100 g of honey allowing the determination of the maximum permitted amount of sucrose set by Decree of Ministry of Agriculture No. 76/2003 Coll. Linearity was verified in the range of 0.3 mM to 7.5 mM with correlation coefficients higher than 0.9984 for all analytes. All three honey samples analyzed by this method met the requirements defined by the decree, i.e. the carbohydrate content was higher than 60 g / 100 g of honey and the sucrose content was lower than 5 g / 100 g of honey.

OBSAH

POUŽITÉ ZKRATKY	8
1. ÚVOD	9
2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Kapilární elektromigrační metody.....	11
3.1.1 Elektroforetická pohyblivost	11
3.1.2 Elektroosmotický tok.....	12
3.1.3 Separační módy kapilární elektroforézy	13
3.1.4 Instrumentální uspořádání kapilární elektroforézy	15
3.1.5 Vyhodnocení elektroforetické separace	19
3.2 Med	20
3.2.1 Sacharidy	21
3.2.2 Proteiny (enzymy)	22
3.2.3 Organické kyseliny.....	22
3.2.4 Těkavé látky.....	23
3.2.5 Vitamíny a minerály	23
3.2.6 Polyfenoly.....	24
3.3 Kvalita medu.....	25
3.3.1 Metody analýzy sacharidů v medu pomocí separačních metod	25
3.4 Plánování experimentu	27
3.4.1 Optimalizované faktory.....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1 Použité přístroje a pomůcky	33
4.2 Chemikálie	33
4.3 Vzorky medu	34
4.4 Příprava roztoků.....	34
4.4.1 Zásobní roztok 0,1M hydrogenfosforečnanu sodného.....	34
4.4.2 Zásobní roztok 0,01M hexadecyltrimethylamonium bromidu.....	34

4.4.3	Základní elektrolyty	34
4.4.4	Zásobní roztoky standardů	35
4.4.5	Pracovní roztok sacharidů	35
4.4.6	Roztoky pro měření kalibrační závislosti	35
4.4.7	Úprava vzorku medů k analýze	36
4.5	Parametry měření	37
4.6	Hodnocení metody – výpočty	38
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1	Volba počátečních podmínek	39
5.1.1	Výběr optimální kapiláry	39
5.2	Chemometrická optimalizace	40
5.2.1	Optimalizace systému s normální polaritou	40
5.2.2	Optimalizace v systému s reverzní polaritou	48
5.2.3	Optimalizace nástřiku vzorku	55
5.3	Optimální podmínky separace	56
5.4	Kalibrační přímky	57
5.4.1	Kalibrační přímky pro sacharózu	58
5.4.2	Kalibrační přímky pro glukózu	59
5.4.3	Kalibrační přímky pro fruktózu	60
5.4.4	Limit kvantifikace	61
5.5	Analýza vzorků medu	62
5.5.1	Stanovení sacharidů ve vzorku z lokality Javorník	63
5.5.2	Stanovení sacharidů ve vzorku medu z lokality Jaroslavice	64
5.5.3	Stanovení sacharidů ve vzorku medu od společnosti „Medokomerc“	65
5.5.4	Výtěžnost	66
6.	ZÁVĚR	67
7.	POUŽITÁ LITERATURA	68

POUŽITÉ ZKRATKY

5-HMF	5-hydroxymethylfurfural
BGE	základní elektrolyt
C ⁴ D	kapacitně vázaná bezkontaktní vodivostní detekce
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DoE	plánování experimentu
EOF	elektroosmotický tok
FRC	fruktóza
GAL	galaktóza
GC	plynová chromatografie
GLC	glukóza
HPCE	vysokoučinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
i.d.	vnitřní průměr
IS	vnitřní standard
kys.	kyselina
LAC	laktóza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
SAC	sacharóza

1. ÚVOD

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj elektromigrační metody vhodné pro stanovení fruktózy (FRC), glukózy (GLC) a sacharózy (SAC) v medu.

Kapilární elektroforéza (CE) umožňuje separaci sacharidů při použití zásaditých elektrolytů. Separace je založena na disociaci poloacetalových skupin molekuly sacharidu v silně zásaditém prostředí [1–4]. Sacharidy za takových podmínek migrují jako anionty. K jejich detekci lze využít buď nepřímou UV detekci [3], nebo kapacitně vázanou bezkontaktní vodivostní detekci (C⁴D) [2,4].

Tyto práce [2,3] představovaly výchozí bod pro plánování experimentů v rámci této diplomové práce. Kromě těchto prací bylo využito poznatků z práce Carvalha a kol. [4], kteří vyvinuli metodu pro separaci a kvantifikaci sacharidů v nápojích pomocí CE-C⁴D.

Kvalitu medu je důležité sledovat kvůli možnému nesprávnému zacházení s medem nebo jeho falšování za účelem vyššího zisku. Požadavky na kvalitu medu jsou definovány jak regulami Evropské unie [5], tak i národními předpisy České republiky [6]. Na těchto normách se podílí i Český svaz včelařů, který vytvořil svazovou normu jakosti medu vyprodukovaného v České republice [7].

Kontrola kvality zahrnuje sledování několika faktorů, jako jsou např. konzistence a vzhled medu, chuť, barva, obsah fruktózy a glukózy, obsah sacharózy, obsah vody nebo kyselost [6]. Tato diplomová práce se věnuje stanovení obsahu FRC, GLC a SAC ve vybraných vzorcích medu. Nadměrné množství sacharózy v medu může znamenat jeho falšování levnějšími sladidly, případně brzké stáčení medu.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vývoj vhodné CE metody pro stanovení sacharidů v medu s použitím bezkontaktní vodivostní detekce (C⁴D). Cílem je vyvinout metodu tak, aby došlo k separaci strukturně podobných sacharidů až na základní linii.

Pro optimalizaci separačních podmínek bude využito plánování experimentu, které umožňuje lépe porozumět vlivu jednotlivých faktorů na samotnou separaci a jejich případným interakcím.

Díličí cíle této práce jsou:

- a) Posouzení vlivu obsahu hydrogenfosforečnanu sodného v základním elektrolytu na kvalitu separace.
- b) Porovnání systémů polarit, tj. rozdíl separace v systému s katodickým elektroosmotickým tokem (normální polarita) a anodickým EOF (reverzní polarita) po přidavku malého množství cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB).
- c) Posoudit vliv vnitřního průměru separační kapiláry na celkovou dobu analýzy (včetně promývání kapiláry mezi jednotlivými kroky analýzy).
- d) Validace metody ve vybraném separačním systému, který umožní rychlou a dostatečně citlivou separaci pro kvantifikaci FRC, GLC a SAC ve vzorcích medu.
- e) Analýza vybraných vzorků medu pomocí validované metody.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody lze souhrnně označit také jako vysokoúčinnou kapilární elektroforézu (HPCE) [8].

Elektromigrační separační metody využívají k separaci dva principy, a to elektroforetickou migraci iontů v elektrickém poli a elektroosmotický tok kapaliny v kapiláře [9].

Výhodou kapilární elektroforézy je, že v základním uspořádání vyžaduje pouze jednoduchou instrumentaci. Ta se skládá z vysokonapěťového zdroje, dvou rezervoárů základního elektrolytu, páru platinových elektrod, kapiláry a detektoru. Toto základní uspořádání může být samozřejmě vylepšováno a doplňováno o další části, jako jsou autosamplery, další detektor apod. [10].

3.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost je definovaná jako rychlost pohybu iontů v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Toto lze vyjádřit následující rovnicí:

$$\mu = v/E \quad [m^2V^{-1}s^{-1}] \quad \text{Rovnice 3-1}$$

kde μ je elektroforetická pohyblivost, v rychlost pohybu iontu a E intenzita elektrického pole. Výsledný pohyb iontů je daný působením dvou sil – silou elektrického pole F_e , která uvádí ion do pohybu, a třecí silou prostředí F_f , která pohyb iontu zpomaluje:

$$F_e = qE \quad \text{Rovnice 3-2}$$

F_e udává sílu elektrického pole, q je náboj iontu.

$$F_f = -6\pi\eta rv \quad \text{Rovnice 3-3}$$

F_f udává třecí sílu prostředí, η označuje viskozitu prostředí, r poloměr iontu [8].

Různě velké ionty o různém náboji se tedy pohybují v elektrickém poli konstantní rychlostí, která je vzájemně odlišná. Tato rychlost je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a velikosti náboje iontu a nepřímo úměrná jeho poloměru [9], jak dokládá Rovnice 3-4, odvozená ze vztahu $F_e = -F_f$, jehož úpravou získáme [8,11]:

$$\mu = q / 6\pi\eta r \quad \text{Rovnice 3-4}$$

3.1.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) vzniká důsledkem působení stejnosměrného elektrického pole na elektrickou dvojrstvu u vnitřní stěny křemenné kapiláry [8,11,12].

Elektrická dvojrstva vzniká jako důsledek kontaktu elektrolytu s vnitřní stěnou kapiláry. Vnitřní povrch křemenných kapilár je tvořen silanolovými skupinami (SiOH). Tyto skupiny při pH elektrolytu vyšším než 3 disociují a nesou přebytečný záporný náboj (SiO⁻), což přitahuje kationty přítomné v roztoku elektrolytu. Interakce mezi záporně nabitou stěnou kapiláry a kationty elektrolytu vede ke vzniku fixní (Sternovy) vrstvy. Nadbytek kladného náboje v BGE oproti zápornému náboji na povrchu kapiláry vede ke vzniku druhé části elektrické dvojrstvy, tzv. difuzní (Gouy-Chapmanovy) vrstvy, která je pohyblivá [11,12].

Rozdíl potenciálů mezi nepohyblivou a pohyblivou vrstvou se nazývá elektrokinetický, nebo též zeta potenciál [8]. Působením stejnosměrného elektrického pole je uvedena do pohybu směrem ke katodě difuzní část dvojrstvy a s ní i roztok v kapiláře [8,11].

EOF unáší všechny ionty stejnou rychlostí, z hlediska separace jde tedy o neselektivní sílu, pozitivně ale ovlivňuje rychlost migrace analytů, a s tím i účinnost separace a celkovou dobu analýzy [8].

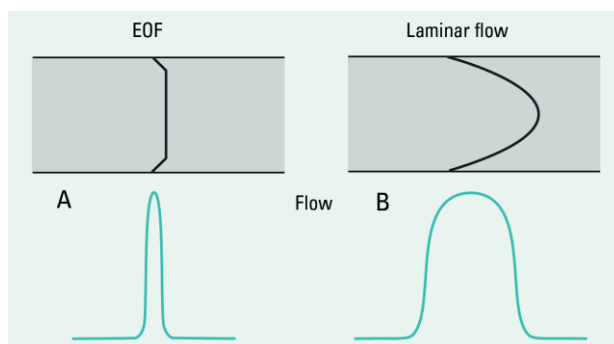
Pro EOF platí následující vztahy:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad \text{Rovnice 3-5}$$

$$\mu_{EOF} = \varepsilon \zeta / \eta \quad \text{Rovnice 3-6}$$

kde v_{EOF} značí rychlost EOF, μ_{EOF} elektroosmotickou pohyblivost, ε je dialektická konstanta roztoku elektrolytu, η viskozita roztoku elektrolytu a ζ označuje elektrokinetický (zeta) potenciál [8,11].

EOF je silně závislý na pH roztoku v kapiláře. Lze jej tedy regulovat změnou složení základního elektrolytu nebo úpravou vnitřního povrchu kapiláry. Výhodou EOF je jeho plochý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry, díky kterému téměř nedochází k disperzi zón analytů [8,12].



Obrázek 1 Porovnání laminárního proudění s EOF. Převzato ze zdroje [12].

3.1.3 Separační módy kapilární elektroforézy

Mezi kapilární elektromigrační metody je řazeno šest základních technik, které se od sebe liší především médiem přítomným v kapiláře během separace a také mechanismem separace. Některé metody je možné použít pouze pro separaci iontů (kapilární zónová elektroforéza – CZE, kapilární gelová elektroforéza – CGE, kapilární izoelektrická fokusace – CIEF a kapilární izotachoforéza – CITP), zbylé dvě metody (micelární elektrokinetická chromatografie – MEKC a kapilární elektrochromatografie – CEC) jsou vhodné pro separaci iontů i neutrálních molekul [13]. Separační režimy se od sebe z velké části liší pouze složením pufru a nastavením experimentálních podmínek separace [11,12].

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší a nejčastěji používanou metodou CE. K separaci dochází díky migraci nabitých analytů různou rychlostí, čímž se vytváří oddělené zóny [12].

CZE je používána pro separace a stanovení jak anorganických sloučenin, které jsou nabitě nezávisle na pH roztoku, tak i organických látek, jejichž molekuly mohou nést záporný náboj důsledkem disociace molekuly (např. fenoly, karboxylové kyseliny, sacharidy) nebo kladný náboj díky protonizaci (např. aminy, aminokyseliny) [13].

Separace je možná díky vlastní pohyblivosti iontů a EOF, jejichž princip je podrobněji popsán v kapitolách 3.1.1 a 3.1.2. Čím vyšší je pH elektrolytu v kapiláře, tím větší náboj je přítomen u vnitřní stěny kapiláry, čímž se zrychluje EOF. Na rychlost EOF má vliv také koncentrace BGE; vyšší koncentrace BGE snižuje zeta potenciál elektrické dvojvrstvy, a to vede k pomalejšímu EOF. Použití příliš zředěných elektrolytů vede k nereprodukovatelným výsledkům kvůli nízké tlumící kapacitě pufru [13].

Separační mechanismus je založen na rozdílech ve velikosti a náboji analytu [10]. Malé molekuly s velkým nábojem se pohybují rychleji než velké molekuly s malým nábojem [14]. Elektroosmotická pohyblivost kationtů je vyšší než pohyblivost EOF, proto migrují jako první. Spolu s EOF se pohybují neutrální molekuly, které nejsou v průběhu separace rozděleny. Anionty se kvůli svému negativnímu náboji pohybují proti směru EOF, ale pokud je elektroosmotická pohyblivost EOF vyšší než pohyblivost aniontů (díky vysokému pH elektrolytu), dochází k jejich migraci za EOF. Díky tomu je možné analyzovat kationty i anionty během jedné analýzy [10–12].

K dosažení rychlé separace je výhodné použít krátkou kapiláru v kombinaci s vysokým napětím [14].

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) kombinuje výhody gelové elektroforézy v plošném uspořádání a jednoduchou instrumentaci CE, čímž se zvyšuje separační účinnost. Kapilára je naplněna gelem, který se chová jako molekulární síto. Separace je založena na rozdílných pohyblivostech makromolekul o různé velikosti skrze póry gelu. Molekuly o malé velikosti se pohybují gelem rychleji než složky s velkou molekulovou hmotností [11].

CGE byla vyvinuta především pro separaci makromolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny [12].

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je v principu kombinací elektroforézy a chromatografie na obrácených fázích. Jedná se o elektromigrační metodu, kterou je možné využít pro separaci neutrálních i nabitých analytů [12]. Byla vyvinuta především pro separaci hydrofilních i hydrofobních neutrálních molekul [13].

K separaci dochází za použití BGE s vysokým pH a obsahem povrchově aktivních látek – tenzidů (např. dodecylsírany sodného, SDS) [13,14]. Při koncentracích vyšších, než je kritická micelární koncentrace, dochází ke tvorbě micel [9,12]. Micely jsou tvořeny hydrofilními skupinami na povrchu a hydrofobními řetězci v jádře [14]. Micely migrují vlastní elektroforetickou rychlostí a unášejí s sebou solubilizované (většinou hydrofobní) molekuly směrem k detektoru [9,12]. Mechanismus separace neutrálních analytů je v podstatě chromatografický, kdy dochází k rozdělování analytu mezi vodnou a micelární fází BGE [12].

Při použití SDS mají micely záporný náboj, v důsledku kterého migrují směrem k anodě. Díky přítomnosti EOF s rychlostí vyšší, než je elektroforetická rychlost micel, migrují analyty v základním uspořádání směrem ke katodě [9,12,13].

Kapilární elektrochromatografie (CEC) kombinuje selektivitu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a separační účinnost CE. Analyty jsou separovány na základě rozdělovacích koeficientů mezi stacionární fází a mobilní fází, případně i na základě jejich rozdílné pohyblivosti. Pohyb kapilárou směrem k detektoru je typicky umožněn pomocí EOF [9,11].

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) je vysokorozlišovací elektroforetická technika pro separaci proteinů a peptidů na základě jejich izoelektrického bodu pI [12]. Separace probíhá v gradientu pH vytvořeném v kapiláře působením elektrického pole na směs amfolytů, které tvoří separační elektrolyt. Separované látky migrují pouze do místa, kde je pH rovno jejich pI [8]. Tento proces je označován jako fokusace [12]. Při něm vznikají úzké zóny jednotlivých proteinů, které se nerozmývají, což zaručuje vysokou separační účinnost metody [11]. Po dosažení ustáleného stavu je nutné vzniklé zóny mobilizovat, aby bylo možné jednotlivé analyty detekovat a kvantifikovat [8,11].

Kapilární izotachoforéza (CITP) využívá systému dvou elektrolytů, vedoucího a koncového. Vzorek je dávkován mezi tyto elektrolyty. Pohyblivost iontů ve vzorku musí být intermediární vzhledem k pohyblivosti vedoucího iontu vedoucího elektrolytu a koncového iontu v koncovém elektrolytu [8]. Po vložení elektrického pole dochází k pohybu iontů k příslušné elektrodě, čímž se vytváří oddělené zóny, které se v ustáleném stavu pohybují stejnou rychlostí [12]. Koncentrace separované látky v izotachoforetické zóně je nezávislá na její koncentraci v původním vzorku; ustanovuje se v závislosti na koncentraci vedoucího elektrolytu. Díky této vlastnosti je CITP využívána jako prekoncentrační krok před vlastní CZE, MEKC nebo CGE separací [8,12]. Omezením této metody je fakt, že je v principu možné separovat pouze anionty, nebo kationty, nikoli oba typy iontů současně [12].

3.1.4 Instrumentální uspořádání kapilární elektroforézy

Hlavními komponentami CE systému jsou vysokonapěťový zdroj, dvě nádoby (tzv. vialky) s elektrolytem, dvě (většinou platinové) elektrody vložené do těchto nádobek, kapilára naplněná elektrolytem, detektor a systém pro vyhodnocování dat [11]. Nejdůležitější části tohoto systému jsou popsány níže.

3.1.4.1 Zdroj vysokého napětí

V kapilární elektroforéze je používán stejnosměrný vysokonapěťový zdroj, který je schopen pracovat v rozsahu 0 kV až 30 kV. Napájecí zdroj musí být schopen přepínat polaritu, a tím obrátit směr EOF [12]. Zdroj napětí umožňuje vložit napětí na kapiláru, a tím způsobit migraci iontů ve vzorku, který je nadávkován na vstupním konci kapiláry, směrem k detektoru, který je umístěn na výstupním konci kapiláry [11].

3.1.4.2 Separační kapilára

Kapiláry používané v CE mohou být vyrobeny ze skla, křemenného skla nebo teflonu [11]. Materiál kapiláry musí být chemicky a elektricky inertní [12]. Nejvíce používané jsou křemenné kapiláry, a to z několika důvodů. Umožňují spektrofotometrickou detekci přímo na kapiláře, protože jsou prostupné pro UV i VIS záření a jejich výroba je poměrně jednoduchá a nenákladná. Křemičité kapiláry jsou pokryté polyimidem, který zajišťuje jejich mechanickou odolnost a pružnost, a tím umožňuje manipulaci s kapilárou [11,12].

Křemenné kapiláry jsou dostupné s vnitřním průměrem od 2 do 200 μm . Pro CE jsou používány kapiláry s průměrem 20 až 100 μm [2,15]. Nejčastěji používané jsou kapiláry s vnitřním průměrem 50 μm . Nižší vnitřní průměr (i.d.) kapiláry umožňuje použití vyššího napětí, neboť je lépe odváděno vznikající teplo. Tím se zároveň zkrátí doba analýzy a zvýší separační účinnost. Při použití kapilár s malým i.d. ale také dochází ke snížení citlivosti detektoru [11].

3.1.4.3 Dávkování vzorku

Separační kapilára použitá v CE má velmi malý vnitřní objem (mění se samozřejmě v závislosti na délce a vnitřním průměru kapiláry); dávkuje se tedy pouze velmi malý objem vzorku. Délka zóny vzorku by měla být cca 1 až 2 % celkové délky kapiláry [12].

Dávkování lze uskutečnit buď hydrodynamicky nebo elektrokineticky.

Hydrodynamické dávkování je nejrozšířenější metodou. Provádí se za použití tlaku na vstupním konci kapiláry, vakua na výstupním konci, nebo sifonovým efektem, ke kterému dojde po zdvižení vialky se vzorkem nad úroveň vialky s elektrolytem na výstupním konci. Typicky se používá tlak od 50 do 100 mbar a doba nástřiku 0,5 až 5 s [12,16].

Elektrokinetické dávkování je umožněno ponořením vstupního konce kapiláry do vialky se vzorkem a následným vložením napětí, které je nižší, než jaké je použito pro separaci. Ke vstupu vzorku do kapiláry dochází díky EOF a elektroforetické pohyblivosti analytů [12,16].

Elektrokinetické dávkování je méně reprodukovatelné než hydrodynamické, ale např. pro vysoce viskózní vzorky nebo v módu CGE může být jeho použití výhodnější [16].

3.1.4.4 Kontrola teploty

Na okolní teplotě závisí viskozita vzorku a pufrů i migrační čas analytu, proto je nutné teplotu kontrolovat. Udržování teploty na konstantní úrovni je důležité pro opakovatelnost analýzy [12].

Průchodem elektrického proudu kapilárou vzniká tzv. Jouleho teplo. Jeho vznik závisí na elektrickém výkonu (součin elektrického proudu v kapiláře a napětí vloženého na elektrody) [12,13]. Jouleho teplo ohřívá BGE v kapiláře a vytváří v ní teplotní gradient, což deformuje plochý rychlostní profil EOF. Více tepla vzniká při použití většího i.d. kapiláry a také při použití vysoce vodivého BGE [13]. Teplotní gradient se mění také v závislosti na tloušťce stěny kapiláry a na tloušťce polyimidového povlaku kapiláry [12]. Změna teploty o 1 °C během separace může vést ke změně migračních časů až o 3 % [12].

Nejefektivnější pro odstranění tepla z vnější stěny kapiláry je použití chlazení proudícím vzduchem [12,13].

3.1.4.5 Detekce

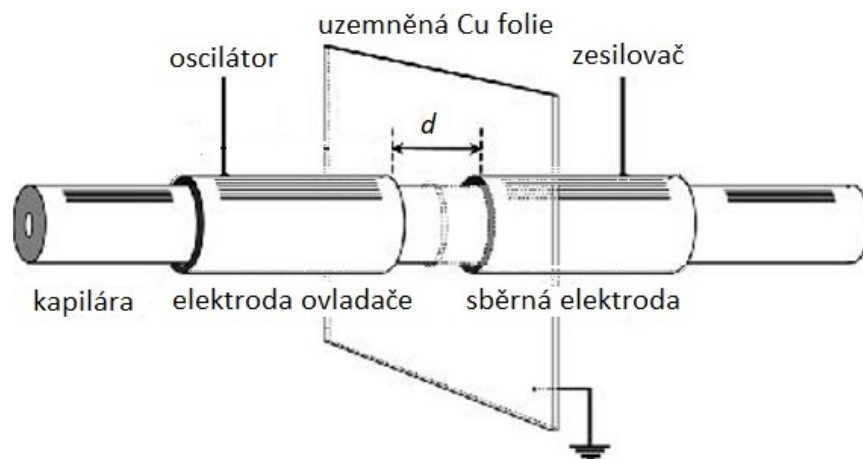
Vzhledem k malým objemům analytu, který je možné nadávkovat do kapiláry, je detekce v CE poměrně obtížnou disciplínou. Je používána řada detekčních metod, mnohé jsou podobné detekčním metodám využívaných v kapalinové chromatografii.

Používá se UV-VIS detekce, fluorescenční detekce, laserem indukovaná fluorescence, amperometrie, vodivostní detekce, hmotnostní spektrometrie a nepřímá UV detekce [12,17].

Nejčastěji používaná je **UV-VIS detekce** [12]. UV-VIS detektory jsou poměrně levné, jednoduché a snadno použitelné. Výhodou je detekce přímo na kapiláře. Tyto detektory lze také rozšířit o detektor s diodovým polem (DAD), který umožní změření absorpčního spektra. To je možné porovnat s knihovnou spekter a na základě toho identifikovat analyt nebo ověřit čistotu píku. Optická detekce má omezenou citlivost při použití kapiláry s malým i.d., ve kterých dochází ke snížení objemu vzorku a délky optické dráhy [11]. Podmínkou využití UV-VIS detekce je, že detekovatelný analyt musí obsahovat chromofor [18].

Pro účely této práce byl využit **kapacitně vázaný bezkontaktní vodivostní detektor** (C⁴D).

C⁴D detekce byla představena v roce 1998 nezávisle na sobě Zemannem a kol. [18] a da Silvou a spolupracovníky [19]. Tato metoda je řazena do skupiny elektrochemických detekcí [20]. Vodivostní detekce je jednoduchá a univerzální technika pro elektroforetické systémy [21]. Využívá měření rozdílu vodivosti mezi zónou analytu a elektrolytem v kapiláře. Detektor (viz Obrázek 2) je složen ze dvou elektrod, které jsou umístěny kolem polyimidového povlaku křemičité kapiláry. Elektrody tvoří válcový kondenzátor, elektrická vodivost roztoku je měřena v mezeře mezi elektrodami (označeno *d*) [18]. Použitím oscilační frekvence dochází ke kapacitnímu přechodu mezi elektrodou ovladače a kapalinou v kapiláře. Po průchodu detekční mezerou dochází ke druhému kapacitnímu přechodu mezi elektrolytem a sběrnou elektrodou [22].



Obrázek 2 Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru. Převzato ze zdroje [22] a upraveno.

$C^{4}D$ detekci je možné využít i ve spojení s kapilárami o velmi malých vnitřních průměrech nebo v čipovém uspořádání. To je možné díky tomu, že detekční signál není získán příčně kapilárou, ale v podélném rozměru kapiláry. Výhodou je zachování flexibility kapiláry. Detekci lze použít i s jinými než křemennými kapilárami (např. teflonovými) [22].

$C^{4}D$ detekce má široké využití – umožňuje detekci iontových sloučenin bez chromoforů jako jsou malé anorganické ionty [23], mastné kyseliny [24] nebo léčiva [25]. Bylo také prokázáno, že tuto detekci je vhodné použít k detekci neutrálních sloučenin, jako jsou oligosacharidy (např. cyklodextriny) [26] nebo alkoholy [27] a také pro biomolekuly se střední a vysokou molekulovou hmotností [28].

3.1.5 Vyhodnocení elektroforetické separace

Migrační čas analytu je časový úsek mezi nadávkováním analytu a jeho detekcí. Může být vypočítán podle následující rovnice:

$$t_m = l/v \quad \text{Rovnice 3-7}$$

kde t_m označuje čas migrace, l efektivní délku kapiláry a v rychlost pohybu iontu.

Účinnost je vyjadřována počtem teoretických pater N , který může být vyjádřen přímo z elektroferogramu následovně:

$$N = 5,54(t_m/w_{1/2})^2 \quad \text{Rovnice 3-8}$$

Když t_m označuje migrační čas a $w_{1/2}$ šířku píku v polovině jeho výšky.

Počet teoretických pater lze také vyjádřit pomocí Rovnice 3-9,

$$N=(l/\sigma)^2 \quad \text{Rovnice 3-9}$$

kde l označuje efektivní délku kapiláry a σ je označení pro standardní odchylku Gaussovského píku (v čase, délce, nebo objemu) [12]; tato hodnota udává rozmytí píku způsobené rozdílnou rychlostí analytu v rámci zóny analytu [11].

Účinnost může být také vztažena na výškový ekvivalent teoretického patra H [11,12].

$$H=l/N \quad \text{Rovnice 3-10}$$

Rozlišení R_s píků odpovídajících jednotlivým složkám v analyzovaném vzorku je hlavním cílem separačních metod. Určuje, zda jsou píky analytů rozděleny na základní linii. Pokud k takovému rozdělení dojde, je hodnota $R_s > 1,5$ [15].

Hodnotu R_s lze vypočítat z experimentálních údajů:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad \text{Rovnice 3-11}$$

kde t je čas migrace a w šířka píku na základní linii [12].

V této diplomové práci bylo rozlišení počítáno na základě Rovnice 3-12 [29],

$$R_s = \frac{(2,35/2)(t_2 - t_1)}{w'_1 + w'_2} \quad \text{Rovnice 3-12}$$

ve které w' označuje šířku píku v polovině jeho výšky a t migrační čas analytu.

Korigovaná plocha je využívána v případě, že jsou migrační časy analytů nestabilní nebo se posunují (např. vlivem kondice kapiláry) [12].

$$A_c = A/t_m$$

Rovnice 3-13

A_c označuje korigovanou plochu, A je plocha píku a t_m migrační čas příslušného analytu.

3.2 Med

Med je vysoce viskózní kapalina produkovaná převážně včelami. Podle zdroje nektaru jej můžeme dělit na květový med a medovicový med. Medovice je tvořena stejnokřídlým hmyzem, který se živí mizou stromů. Tento hmyz (především se jedná o mšice) následně exkretuje přebytečné látky zpět na list nebo jehličí stromu. Medovice je včelami sbírána a zpracována stejně jako nektar z květů [30]. Vzniklý med bývá někdy nesprávně označován jako med lesní [6]. Parametry medovicového medu a květového medu se liší. Posuzuje se např. elektrická vodivost (medovicový med musí mít elektrickou vodivost minimálně 80,0 mS/m, u květového je maximální hranice stanovena na 80,0 mS/m [6]), pH, optická rotace nebo obsah cukrů a minerálů [30].

Květový med, jehož analýzou se zabývám v této práci, vzniká z květového nektaru. Včely dělnice sbírají nektar z květů, který je poté smíchán s enzymy, což vede k rozkladu složených cukrů a vzniku monosacharidů (glukózy a fruktózy) [31]. Květový med může být dělen na jednodruhový a vícedruhový med [32]. Podle způsobu zpracování pak dále na vytočený, plástečkový, lisovaný, vykapaný, med s plástečky, filtrovaný a pastový med [6].

Konzistence květového medu je silně viskózní, přípustná je i plně krystalická konzistence. Oproti medovicovému medu se liší chutí, která je výrazně sladká, a barvou, která je proměnlivá od vodově čiré až po zlatavě žlutou (medovicový med má tmavohnědé až červenohnědé zbarvení). Maximální povolený obsah vody pro oba druhy medů je 20 g/100 g [6].

Med je komplexní směs složenou z více než 200 složek [33], jejichž obsah se liší v každém medu. Poměr těchto složek je závislý nejen na druhu medu, ale také na jeho původu, druhu včel i práci včelaře [34]. Uvádí se, že má antimikrobní aktivitu (inhibuje růst bakterií, hub a protozoí) a dříve se uplatňoval při léčbě ran a popálenin [32].

Jedná se o přírodní směs složenou převážně z cukrů a dalších složek, jako jsou enzymy, aminokyseliny, organické kyseliny, karotenoidy, vitamíny (zejména vitamín B6), minerály, polyfenolické látky a aromatické látky. Obsahuje také pevné částice, které se do něj dostávají převážně při stáčení. Může se jednat např. o pyl, propolis nebo vosk. Tyto pevné částice lze odstranit filtrováním medu [33].

Následující kapitoly se zabývají hlavními obsahovými složkami medu.

3.2.1 Sacharidy

Pod pojmem sacharidy jsou zahrnuty polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které mají ve struktuře nejméně 3 uhlíkové atomy, a také látky, které se z nich tvoří kondenzací.

Sacharidy lze dělit na monosacharidy, oligosacharidy (2-10 monosacharidových jednotek) a polysacharidy (více než 10 monosacharidů). Mono- a oligosacharidy lze označit také souhrnně jako cukry. Sacharidy jsou v přírodě nejrozšířenější látky [35]. Také v medu jsou hlavní obsahovou látkou, tvoří 95 až 99 % nevodného obsahu [34].

75 % cukrů obsažených v medu představují monosacharidy, 10–15 % disacharidy a malé množství jiných cukrů. Sacharidy jsou zodpovědné za hlavní vlastnosti medu, jako jsou vysoká energetická hodnota, viskozita a hygroskopicitu [33].

U většiny květových medů je z monosacharidů nejvíce zastoupená fruktóza. Poměr mezi fruktózou a glukózou je i ukazatelem pro botanickou klasifikaci medu, neboť tato hodnota závisí na zdroji nektaru. Průměrně se poměr fruktózy ke glukóze pohybuje kolem 1,2 : 1. Výjimkou jsou medy řepkové (brukev řepka olejka; *Brassica napus*) a pampeliškové (pampeliška lékařská; *Taraxacum officinale*), u kterých je poměr fruktóza : glukóza opačný [33]. Poměr fruktózy a glukózy má vliv na chuť medu a jeho sklon ke krystalizaci – fruktóza je sladší a lépe rozpustná ve vodě než glukóza [3].

Cukry, stejně jako další složky medu, se mohou měnit během skladování. Při zahřívání nebo příliš dlouhém skladování dochází rozkladem pentóz a hexóz Maillardovou reakcí ke vzniku nežádoucích sloučenin, zejména 5-hydroxymethylfurfuralu (5-HMF), 2-acetylfuranu či isomaltolu. Tyto produkty ovlivňují barvu, chuť a vůni medu. 5-HMF lze použít jako marker tepelného zpracování medu i jiných potravin a ukazatel stáří skladovaného medu [33]. Celkové množství 5-HMF v medu nesmí být vyšší než 40 mg/kg medu (výjimkou jsou medy z tropických oblastí, kde je limit zvýšen na 80 mg/kg) [5].

Obsah cukru v květovém medu nesmí být nižší než 60 g/100 g medu. Naopak množství sacharózy nesmí překročit 5 g/100 g medu. Výjimečně je povolený obsah sacharózy až 15 g/100 g medu u jednodruhových medů z brutnáku lékařského nebo levandulového medu, nebo až 10 g/100 g v případě jednodruhových medů z tolíce vojtěšky, z banksie, kopyšníku, blahovičnicku nebo citrusů [5,6].

Koncentrace sacharózy je také důležitým parametrem pro hodnocení zralosti medu. Vysoké hladiny značí, že s medem bylo nesprávně manipulováno (příliš časně stáčení), nebo byl falšován (přidání levné sacharózy, prodloužené umělé dokrmování včel sacharózovými sirupy pro zvýšení zisku) [3,33].

3.2.2 Proteiny (enzymy)

Hlavním zdrojem proteinů v medu je pyl, ale podíl na obsahu proteinů a aminokyselin v medu mají i slinné žlázy včel [33].

Nejhojněji zastoupenou aminokyselinou je prolin, který pochází z organismu včely při přeměně nektaru na med [36]. Mezi další zastoupené aminokyseliny patří např. kyselina glutamová, kyselina asparagová, glutamin, histidin, glycin, threonin, alanin a mnohé další [33].

Enzymy tvoří jen malou část všech obsažených proteinů [33]. Obsah enzymů se liší v závislosti na zdroji pylu, dominantními enzymy jsou amylázy, α -glukosidáza a glukóza oxidáza. Obsah amylázy a α -glukosidázy je považován za ukazatel čerstvosti medu, neboť oba enzymy podléhají tepelnému rozkladu a jejich obsah se snižuje také se stárnutím medu [37].

3.2.3 Organické kyseliny

Organické kyseliny přítomné v medu vznikají ze sacharidů působením enzymů včel. Je možné je využít pro rozdělení medů podle jejich botanického nebo geografického původu. Ovlivňují také barvu a chuť medu, i jeho chemické vlastnosti (pH, elektrická vodivost).

Z organických kyselin v medu převládá kyselina glukonová, která vzniká působením glukózo oxidázy, kterou produkují včely během zrání medu. Přítomna je také kys. citronová, která je spolu s kys. glukonovou spolehlivým ukazatelem pro rozlišení květového a medovicového medu [33]. Jejich obsah je v květovém medu vyšší než v medovicovém [38].

Dalšími zastoupenými kyselinami jsou např. kys. levulinová a kys. mravenčí, které mohou být odvozeny z 5-HMF v následných reakcích. Obsah kyselin se zvyšuje se stárnutím medu [33].

3.2.4 Těkavé látky

Obsah těkavých látek v medu se liší v závislosti na nektaru, zpracování medů i jeho skladování. Jednodruhové medy si většinou zachovávají charakteristické senzorycké vlastnosti dané rostliny. Obsah těkavých látek mohou ovlivnit také včely, případně přítomnost mikroorganismů při stáčení medu.

V medu bylo identifikováno přes 400 různých těkavých látek, z nichž některé je možné využít jako markery komerčních medů (např. 3,9-epoxy-1-p-mentadien a t-8-p-methanoxid-1,2-diol pro citrusové medy, diketony a alkany pro eukalyptové medy, hexanal a heptanal pro levandulové medy apod.). Také tyto látky podléhají degradaci během dlouhodobého skladování [33].

3.2.5 Vitamíny a minerály

Z vitamínů jsou v medu přítomné především vitamíny skupiny B – B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (kys. nikotinová), B5 (kys. pantothenová), B6 (pyridoxin), B8 (biotin; také označovaný jako vitamín. H) a B9 (kys. listová). Zastoupen je také vitamín C. Všechny vitamíny jsou v medu zachovány díky nízkému pH. Filtrací, a tím odstraněním veškerého pylu, dojde k výraznému snížení obsahu vitamínů. Taktéž dochází k degradaci po vystavení teple.

Med obsahuje také množství minerálů, např. draslík (asi 1/3 celkového obsahu minerálů), hořčík, vápník, železo, fosfor, sodík, mangan, jód, zinek, lithium, kobalt, nikl, kadmium, měď, baryum a mnohé další. Obsah minerálů se pohybuje od 0,04 % do 0,2 %, vyšší obsah mají tmavé medy. Na základě obsahu minerálů lze určit botanický původ medu. Pro těžké kovy, které mohou být taktéž součástí medu, jsou stanoveny maximální povolené hladiny (arsen 15 µg/kg, olovo 25 µg/kg, rtuť 5 µg/kg, kadmium 7 µg/kg). Zvýšená koncentrace těchto stopových prvků byla nalezena ve vzorcích medů z průmyslových oblastí. K degradaci minerálů v medu prakticky nedochází [33].

3.2.6 Polyfenoly

Polyfenolické sloučeniny (flavonoidy a fenolkarboxylové kyseliny) jsou látky přirozeně se vyskytující v medu. Patří mezi ně např. kys. vanilová, kys. kávová, kys. syringová, kvercetin, kaempferol, myricetin, a mnohé další [33].

Polyfenoly mají antioxidační vlastnosti, a tím i příznivé účinky na lidský organismus [33]. K celkové antioxidační aktivitě medu přispívají hlavně flavonoidy [33]. Ty se jako antioxidanty projevují různými způsoby, včetně přímého vychytávání reaktivních forem kyslíku, inhibicí enzymů zodpovědných za produkci superoxidových aniontů nebo chelatací přechodných kovů zapojených do procesů vytvářejících radikály [39].

Medy s tmavší barvou mají celkový obsah polyfenolů vyšší a z toho důvodu mají také vyšší antioxidační kapacitu [40].

Polyfenolické látky je možné použít také jako markery botanického původu medu [33,41]. Např. hesperetin je možné použít jako marker pro citrusový med, kaempferol pro rozmarýnový med nebo kvercetin pro med slunečnicový [41]. Botanický původ medu často určuje jeho cenu [42].

3.3 Kvalita medu

Pro uvedení na trh musí med splňovat podmínky stanovené mezinárodním Kodexem [5,33]. Tento kodex se vztahuje na všechny druhy a typy medu určeného k lidské spotřebě. Účelem kodexu je stanovit požadavky na minimální jakost medu. Jsou hodnoceny senzorické a fyzikálně chemické vlastnosti medu, vyhodnocován obsah cukrů a vlhkosti, obsah popela, a zkoumána elektrická vodivost, ve vodě nerozpustné pevné látky a vyhodnocováno množství 5-HMF pro ověření stáří medu [33].

V České republice je kodex zastoupen Vyhláškou č. 76/2003 Sb. [6], a Svazovou normou Český med (Norma jakosti č. ČSV 1/1999), kterou vydává Český svaz včelařů [7].

Celosvětově je stále více medu úmyslně falšováno cukrem (sacharózou) pro zvýšení ekonomického výnosu [34].

3.3.1 Metody analýzy sacharidů v medu pomocí separačních metod

Stanovení sacharidů v medu může být provedeno různými separačními metodami. Kromě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [43] lze použít také plynovou chromatografii (GC) [44].

Pro HPLC separaci obvykle není potřeba derivatizace vzorků. Pro detekci je používáno několik typů detektorů. Nejčastěji používaná je refraktometrická detekce. Její nevýhodou je nízká citlivost a selektivita [45].

Plynová chromatografie poskytuje lepší rozlišení a selektivitu v kratším čase než HPLC, ale použití této metody vyžaduje předchozí derivatizaci cukrů na těkavé sloučeniny. Při tomto procesu může docházet ke ztrátám analytu [46]. Nejpoužívanější je plamenově ionizační detektor [45].

Další separační technikou používanou v analýze sacharidů je kapilární elektroforéza. Tuto metodu lze využít pro analýzu sacharidů v různých matricích jako je ovoce, mléčné výrobky, nápoje či med [2,34].

Separace sacharidů v CE může být založena na disociaci poloacetalových skupin v silně bazických médiích [47], na tvorbě komplexů s kyselinou boritou [48] nebo na derivatizaci sacharidů [48,49]. Z důvodu absence chromoforů ve struktuře sacharidů je k detekci využívána nepřímá UV detekce [3], přímá elektrochemická detekce [50] nebo hmotnostní spektrometrie [51]. Nejjednodušší metodou detekce sacharidů je C^4D [2,4]. Metody použité v pracích, ze kterých vychází diplomová práce, ve zkratce shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Analýza sacharidů pomocí CE – výchozí práce pro experimentální část

Práce	BGE	Čas analýzy	Detekce	Limit detekce	Kapilára	Separační napětí/dávkování vzorku	Příprava vzorku	Zdroj
A	20 mM kys. sorbová, 0,2 mM CTAB, 40 mM NaOH; pH 12,2	< 2 min	DAD (254 nm)	64-161 μ M	60/8,5 cm 50 μ m i.d.	+25 kV (separace na krátkém konci); 50 mbar, 3 s	2,5 g medu v 50 ml H ₂ O, filtrováno (filtr 0,45 μ m), ředěno 1 : 10	[3]
B	75 mM NaOH; pH 12,8	< 2,5 min	C ⁴ D	0,4-0,9 μ M	32,6/18,3 cm 5 μ m i.d.	+15 kV; 50 mbar, 80 s	1 g medu v 50 ml H ₂ O, filtrováno, smícháno s ACN (50% konc.), ředěno 50 \times	[2]
C	10 mM NaOH, 4,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,2 mM CTAB	3,5 min	C ⁴ D	13-31 μ M	44/35,5 cm 20 μ m i.d.	-25 kV, 10 cm 20 s.	vzorky slazených nápojů byly ředěny podle druhu (od 1 : 100 do 10 : 100)	[4]

Práce **A** [3] popisuje stanovení FRC, GLC a SAC ve vzorcích medu pomocí CE s nepřímou UV detekcí. Byl použit systém s obráceným EOF a dávkováním na krátkém konci kapiláry, což umožnilo velice krátký čas analýzy. Přesto došlo k dobrému rozlišení píků jednotlivých analytů. Dosažené hodnoty LOD a LOQ značí poměrně dobrou citlivost metody. LOD pro SAC byl 0,022 g/l (64,27 μ M) a LOQ byl 0,074 g/l (216,19 μ M). Hodnoty pro SAC jsou uvedeny proto, že její koncentrace ve vzorcích je z měřených analytů zpravidla nejnižší, a proto vyžaduje nejcitlivější detekci.

Práce **B** [2] využívá metody CE s C^4D detekcí pro analýzu SAC, LAC, GAL, GLC, manózy, FRC a ribózy. Byla použita kapilára s i.d. 5 μ m, aby bylo zabráněno vzniku Jouleho tepla a rozmývání píků. V práci bylo prokázáno, že vyšší koncentrace NaOH vede ke zlepšení separace sacharidů. Jako BGE byl použit 75mM NaOH (pH 12,8). Díky vysokému pH BGE došlo ke zrychlení celé analýzy v důsledku rychlejšího EOF. Díky obsahu ACN (koncentrace 50 % v/v) ve vzorku bylo dosaženo dobré separační účinnosti i navzdory poměrně velké délce zóny vzorku při dávkování do kapiláry (5 % efektivní délky).

Práce **C** [4] využívá CE metodu s bezkontaktní vodivostní detekcí. Sacharidy GLC, SAC, LAC a FRC byly analyzovány ve vzorcích nápojů, jako IS byla použita GAL. LOD značí nižší citlivost metody než je např. v práci B [2]. Výhodou metody je krátká doba analýzy se zachováním vysokého rozlišení analytů.

Parametry metody použité v práci C byly použity jako výchozí pro tuto diplomovou práci.

3.4 Plánování experimentu

Běžným způsobem přístupu k optimalizaci metody je studovat každou experimentální proměnnou odděleně. Tato strategie je poměrně široce rozšířená a jednoduchá, ale je značně neefektivní [52]. Tento tzv. univariantský způsob optimalizace nemusí poskytovat informace o optimu, a to zejména tehdy, pokud mezi jednotlivými faktory existují interakce. Pokud změna jednoho z faktorů nevede k dalšímu zlepšení výsledků, je často experimentátorem jako optimální označena metoda, která nemusí odpovídat skutečnému optimu [53]. Dalším důvodem, proč může být univariantská optimalizace nevyhovující, je nutnost provádět velký počet analýz, který je spojený s časovou i finanční náročností.

Ke snížení nákladů a zkrácení času na vývoj je nezbytné, aby byla optimální metoda nalezena za použití co nejmenšího počtu experimentů [53]. K tomu je vhodný multivariantský přístup optimalizace, kdy se všechny relevantní faktory mění současně. Taková optimalizace je označována jako „design of experiments“ (DoE, plánování experimentu).

V posledních letech se použití DoE rozmáhá díky rozšiřování specializovaných softwarů i možnostem rychlejšího přenosu „know-how“ [54]. Výhodou plánování experimentu je organizovaný přístup k řešení experimentálních problémů. DoE vyžaduje nižší počet experimentů než univariální přístup, navíc jsou všechny experimenty logicky a teoreticky vzájemně propojeny. Díky tomu je v DoE možné získat užitečnější a přesnější informace o optimalizovaném systému [53].

V DoE jsou podmínky experimentu přidělovány systematicky, na základě toho jsou prováděny analýzy a výsledky jsou vyhodnocovány statisticky [55].

Důležité je definovat základní pojmy této metody:

faktory	vstupní (optimalizované) veličiny, děleny na kvalitativní a kvantitativní
odezvy	výstupní veličiny, měřitelné
úrovně	hodnoty, kterých nabývají faktory
znáhodnění	náhodné určení pořadí experimentů, zajišťuje eliminaci vedlejších vlivů a nezávislost jednotlivých experimentů [56]

Před provedením experimentů je nutné určit vstupní podmínky: počet a rozsah faktorů, počet odezvy a cíl experimentu. Teprve poté je vytvořen návrh experimentu a experimenty jsou prováděny buď paralelně, nebo jeden po druhém. Jednotlivé experimenty poskytují výsledky, tzv. hodnoty odezvy. Získaná data jsou poté analyzována regresní analýzou. Tím lze získat model vztahu faktorů a odezvy. Výsledky z modelu mohou být zobrazeny také jako vrstevnicové grafy, které znázorňují body, kde jsou očekávány nejlepší experimentální podmínky [53].

DoE je používán ke třem hlavním cílům – screeningu, optimalizaci a testování robustnosti.

Screening je používán na počátku vývoje metody. Cílem je prozkoumat velké množství faktorů a odhalit, zda mají nějaký vliv na odezvy, případně jak je jejich vliv významný, a také identifikovat rozsahy jednotlivých faktorů. Screening umožňuje vybrat pro následnou optimalizaci pouze takové faktory, které mají signifikantní vliv na daný proces.

Optimalizace je proces určený k předpovězení hodnot odezvy pro možné kombinace faktorů v experimentu a také k identifikaci optimálního experimentálního bodu. Při současném zpracování několika cílů je obvykle nemožné identifikovat bod, kdy jsou splněny všechny cíle pro všechny odezvy, proto konečný výsledek představuje kompromis mezi protichůdnými faktory.

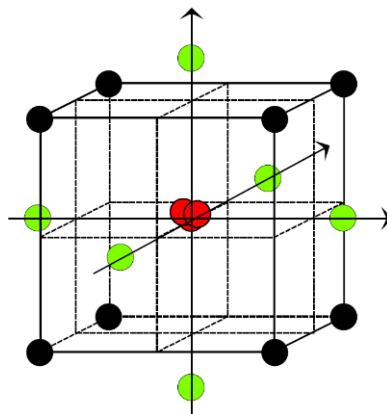
Testování robustnosti je použito jako poslední krok před samotným použitím metody. Cílem je zjistit, jak je daná metoda robustní vůči drobným výkyvům faktorů a porozumět tomu, jaká změna faktorů umožní, aby byla robustnost ještě zachována [53].

Jedním z nejjednodušších využití DoE je jednoúrovňový faktoriální design. Tato metoda je použita, pokud je počet faktorů roven jedné a počet úrovní je vyšší než jedna. Je zkoumán vliv tohoto faktoru na odezvu. Dvouúrovňový design je metoda pro experimenty se dvěma faktory. Experimentální výsledky jsou často měřeny opakovaně pro specifické úrovně [55].

Plně faktoriální design je takový, který zahrnuje všechny možné úrovně pro všechny faktory (dva nebo více). Počet experimentů v takovém designu je pak vypočítán jako množství úrovní umocněné počtem faktorů (např. 4 faktory na 2 úrovních – 2^4 experimentů) [57]. Tento design umožňuje odhad interakcí a vyhodnocení účinku jednoho faktoru nezávisle na ostatních faktorech. Plně faktoriální návrhy se používají s 2 až 4 faktory, s 5 a více faktory je počet experimentů obvykle příliš vysoký [53].

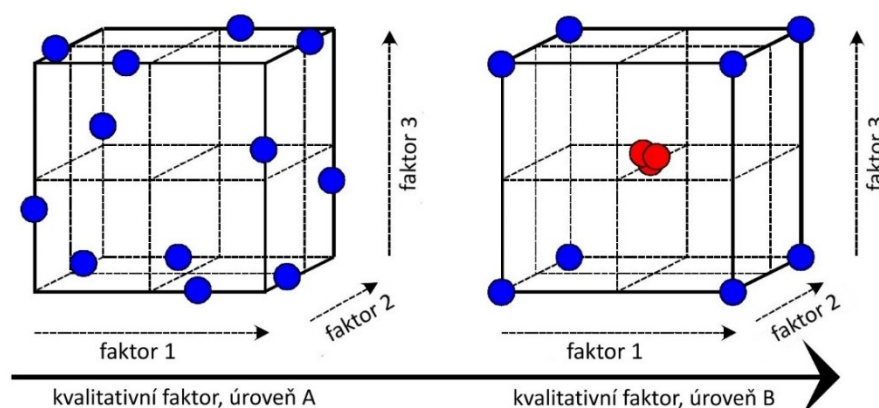
Částečně faktoriální design (frakční) je výhodnější pro sledování více faktorů. Tento typ je tvořen pouze částí experimentů, které by byly potřeba pro plně faktoriální design. Je možné rozdělit plně faktoriální design na poloviny nebo čtvrtiny a tím získat částečně faktoriální design. Např. design 2^5 (= 32) lze redukovat o jeden krok, tzn. 2^{5-1} (= 16) nebo o dva kroky 2^{5-2} (= 8), a 5 faktorů lze tedy zkoumat místo 32 experimentů pomocí 16 nebo 8 pokusů. Frakční design je užitečný pro screening velkého počtu faktorů pomocí relativně malého počtu experimentů. Kromě toho umožňuje nalézt dominantní faktory a jejich optimální rozsahy. Je možné jej využít až do 15 faktorů. Kromě experimentů ve faktoriální části je vhodné zahrnout do designu také replikované experimenty, obvykle středové body faktorů [53].

Centrálně kompozitní design (Box-Wilsonův centrálně kompozitní design) provádí testování na celkem pěti úrovních. Jedná se o optimalizační design, který zahrnuje hraniční body ležící na hranici návrhu, „hvězdicové“ body, které leží ve specifické vzdálenosti od středu v závislosti na počtu faktorů v návrhu, a středové body, které doplňují návrh. Tento typ designu poskytuje spolehlivé předpovědi v celém prostoru, ale podmínkou je, že při výběru faktoru musí být všechny body (především hvězdicové) na proveditelné úrovni [58].



Obrázek 3 Centrálně kompozitní design pro 3 faktory. Převzato ze zdroje [53] a upraveno. Hvězdicové body jsou označeny zeleně, středové body červeně.

D-optimální design je počítačem generovaný návrh, který je používán při screeningu a optimalizaci v případě, kdy je potřeba vytvořit nestandardní design (např. pro nepravidelné experimentální oblasti, pro víceúrovňové kvalitativní faktory, nebo pokud je požadován menší počet analýz než umožňuje klasický design) [53]. Patří mezi pokročilé metody návrhu experimentu Matrice D-optimálního návrhu jsou obvykle neortogonální a je korelován odhad efektu. Experimentátor musí specifikovat model pro návrh a celkový počet analýz. Počítačový algoritmus poté vybere optimální sestavu experimentů. Tato sestava je ale vybrána pouze z kombinací, které zvolil experimentátor, proto není zaručeno, že vygenerovaný design je skutečně optimální [58].



Obrázek 4 D-optimální design pro 3 kvantitativní a 1 kvalitativní faktor na dvou úrovních. Převzato ze zdroje [53] a upraveno.

3.4.1 Optimalizované faktory

Cílem optimalizace elektromigračních metod je separace všech analytů za co nejkratší dobu, vysoká separační účinnost a citlivost. V průběhu CE separace se obvykle optimalizují následující faktory:

3.4.1.1 Složení základního elektrolytu

Klíčovou složkou základního elektrolytu je pufr. Na zvoleném pufru a jeho pH je závislá elektroforetická pohyblivost iontů i EOF. Pufr musí splňovat několik požadavků:

- Vysoká kapacita pufru ve zvoleném rozsahu pH
- Nízká odezva detektoru
- Nízká pohyblivost (minimalizuje vznik proudu)
- Dostupnost ve vysoké čistotě
- Nízký teplotní koeficient (změny pH v závislosti na změnách teploty)

Nejdůležitějším parametrem pufru, který významně ovlivňuje separaci, je jeho pH [11,59]. Optimální selektivita je dosaženo při použití pufrů s hodnotami pH blízkými pKa analytů [60]. Čím vyšší je pH BGE, tím větší negativní náboj je rozprostřen u vnitřní stěny kapiláry, a tím je zrychlen EOF [13].

Pufr musí být zvolen s ohledem na odezvu použitého detekčního systému, intenzitu proudu a rozsah pH, při kterém může být používán. Analyty v něm musí být rozpustné a stabilní. Omezená rozpustnost některých analytů ve vodných pufrch může být vyřešena přidáním aditiv do pufru. Často jsou využívány fosfátové, citrátové, nebo borátové pufrы [11].

Zvýšením koncentrace či iontové síly pufru dojde ke zpomalení EOF, a tím k prodloužení celkové doby analýzy. Zároveň je generován větší elektrický proud, což vede ke vzniku tepla. Kromě těchto negativních fenoménů vede zvýšení koncentrace pufru k symetrickým tvarům píků [11,59].

3.4.1.2 Separační napětí

Zvýšení napětí vloženého na kapiláru vede ke zvýšení separační účinnosti v CE, zrychlení EOF a zkrácení migračních časů analytů. Zvyšování napětí je limitováno generováním vyššího proudu během analýzy, a tím vznikem Jouleho tepla. Tento jev je podrobněji vysvětlen v kapitole 3.1.4.4. Určitá omezení má také samotný přístroj, maximální aplikovatelné napětí je obvykle 30 kV [11,59].

3.4.1.3 Vlastnosti kapiláry

Materiál, ze kterého je kapilára vyrobena, může mít vliv na separační účinnost a rozlišení. Povaha vnitřní stěny kapiláry i její kondicionace před analýzou jsou rozhodujícími faktory pro separaci. Zabránění adsorpce analytu na stěnu kapiláry vede k lepší účinnosti separaci a vyššímu rozlišení píků.

Vysoký poměr povrchu kapiláry ku jejímu objemu u kapilár s malým i.d. zajišťuje dobrý odvod tepla, což umožňuje použití vyššího napětí. Kratší kapiláry poskytují výrazně rychlejší analýzu, prodloužení kapiláry umožňuje zvýšení rozlišení, kapiláry s větším i.d. poskytují vyšší citlivost [11].

3.4.1.4 Dávkování vzorku

Délka zóny vstřikovaného vzorku má vliv na citlivost, separační účinnost i rozlišení. Obecně by neměla přesáhnout 1-2 % celkové délky kapiláry. Nejvyšší separační účinnosti je dosaženo při dávkování malého množství vzorku, což může vést ke snížení citlivosti stanovení [11,59].

3.4.1.5 Teplota

Pokud není během analýzy udržována stálá teplota, mohou vznikat gradienty viskozity pufu v kapiláře. V důsledku toho může docházet ke změnám elektroosmotické a elektroforetické pohyblivosti, což vede k narušení rychlostního profilu, a tím k rozšiřování píků a zmenšení separační účinnosti. Proto analýza v CE probíhá většinou v termostatovaném prostoru.

Se zvyšováním teploty dochází ke snížení viskozity BGE, a tím ke zrychlení EOF. Vyšší teplota také může být využita ke zlepšení tvaru píku a zkrácení doby analýzy [11].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Použité přístroje a pomůcky*

- Analyzátor Agilent CE 7100 Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Waldbron, Německo) s C⁴D detekcí (CCD-ADMET Rev. 5.06, Česká republika)
- Křemenná kapilára, i.d. 20 µm, Polymicro Technologies, Phoenix, USA, Lot No. BIBE03A
- Křemenná kapilára, i.d. 15 µm, Polymicro Technologies, Phoenix, USA, Lot No. BFPB02A
- Software Agilent OpenLab CDS (Rev.C.01.08[210]), Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Software BECKMAN CE Expert, Ver. 1.0
- Software Modde Pro, verze 12.0.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Švédsko
- Stříkačkové teflonové filtry CHS FilterPure, 0,22 µm, Chromservis; Lot No. 20161130PC008I
- Stříkačkové nylonové filtry Captiva Econofilter, 0,45 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo; Lot No. 170927037
- Milli-Q-System, Milipore, Bedford, MA, USA

4.2 *Chemikálie*

- D-(+)-Glukóza, ≥ 99.5%, Sigma-Aldrich, Lot No. 071M0145V
- D-(-)-Fruktóza, ≥ 99%, Sigma-Aldrich, Lot No. SLBB6798V
- Sacharóza, BioXtra, ≥ 99.5%, Sigma-Aldrich, Lot No. SLBB8675V
- D-(+)-Galaktóza, ≥ 99%, Sigma-Aldrich, Lot No. BCBR6985
- Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, puriss. p.a., Reag. Ph. Eur., 98.5-101.0%, Sigma-Aldrich, Lot No. SZBD2660V
- Hydroxid sodný 1,0259M, Sigma-Aldrich, Lot No. BCCC2100
- Hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB), ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Lot No. 055K0140

4.3 Vzorky medu

Obsah sacharidů byl stanovován celkem ve třech vzorcích květového medu. Dva vzorky byly získány přímo od včelaře. První z nich z oblasti Javorník – Proseč pod Ještědem (okres Liberec), druhý z oblasti Jaroslavice (okres Znojmo). Třetí vzorek je komerčně dostupný květový med firmy „Medokomerc“ (sídlo firmy Čestín, okres Kutná Hora).

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 Zásobní roztok 0,1M hydrogenfosforečnanu sodného

Do kádinky bylo naváženo 1,7799 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Navážka byla rozpuštěna v přibližně 50 ml vody na ultrazvukové lázni. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.2 Zásobní roztok 0,01M hexadecyltrimethylamonium bromidu

Do kádinky bylo naváženo 0,7289 g CTAB. Navážené množství bylo následně pomocí ultrazvukové lázně rozpuštěno v dostatečném množství vody. Roztok byl kvantitativně převeden do 200ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.3 Základní elektrolyty

Všechny roztoky elektrolytů použité během plánování experimentů (viz Tabulka 3 a Tabulka 6) byly připraveny do 25 ml odměrných baněk. BGE pro experiment N4 byl připraven pipetováním 853 μl 1,0259M NaOH do 25 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. BGE pro experiment N9 byl připraven pipetováním 7,50 ml 0,1M Na_2HPO_4 a 853 μl 1,0259M NaOH do 25 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Obdobně byly připraveny všechny použité BGE (viz Tabulka 3).

V případě analýz s reverzní polaritou (Tabulka 6) bylo do baňky kromě NaOH a Na_2HPO_4 pipetováno 500 μl 0,01M CTAB a poté doplněno vodou po rysku. Např. v případě BGE pro experiment N21 bylo do 25 ml odměrné baňky pipetováno 6,88 ml 0,1M Na_2HPO_4 , 670 μl 1,0259M NaOH a 500 μl 0,01M CTAB a následně doplněno vodou po rysku.

Roztoky základních elektrolytů pro analýzy s katodickým EOF (normální polarita) byly filtrovány přes stříkačkové nylonové filtry Captiva Econofilter s póry o velikosti 0,45 μm a odplyněny na ultrazvukové lázni. Roztoky s obsahem CTAB byly pouze odplyněny. Tyto elektrolyty nebyly filtrovány, protože molekuly CTAB mají tendenci se zachytávat na membráně filtru. pH BGE nebylo upravováno.

4.4.4 Zásobní roztoky standardů

Byly připraveny 4 zásobní roztoky standardů (GLC, FRC, SAC a GAL) o koncentraci 0,05 M. Příslušné množství standardu sacharidu (pro GLC, FRC a GAL byla vypočítána teoretická navážka 0,0901 g a pro SAC 0,1712 g) bylo naváženo do kádinky, rozpuštěno v dostatečném množství vody, kvantitativně převedeno do 10ml odměrné baňky a doplněno vodou po rysku.

Tyto roztoky byly připravovány čerstvé pro každou sadu experimentů.

4.4.5 Pracovní roztok sacharidů

Do 2ml zkumavky Eppendorf bylo napipetováno 120 μ l od každého standardu a doplněno 1520 μ l vody. Byl tak získán směsný roztok stanovovaných sacharidů o koncentraci 3 mM.

4.4.6 Roztoky pro měření kalibrační závislosti

Pracovní roztoky pro ověření linearity byly připraveny ředěním zásobních roztoků standardů jednotlivých sacharidů. Příslušné množství (viz Tabulka 2) bylo pipetováno do 5ml odměrné baňky a doplněno vodou po rysku. Celkem bylo připraveno 9 roztoků obsahujících 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 a 7,5 mM analytu (SAC, GLC, FRC) a 2,5 mM IS (GAL).

Každý roztok byl analyzován třikrát, pro každý den měření byly připravovány nové roztoky.

Tabulka 2 Příprava kalibračních roztoků

	Koncentrace kalibračního roztoku [mM]	0,3	0,5	0,75	1	2	3	4	5	7,5
Objem zásobního roztoku [μ l]	GLC	30	50	75	100	200	300	400	500	750
	FRC	30	50	75	100	200	300	400	500	750
	SAC	30	50	75	100	200	300	400	500	750
	IS (GAL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250

4.4.7 Úprava vzorku medů k analýze

Před odběrem vzorku byl celý objem zkoumaného medu 3 minuty promícháván, aby došlo k homogenizaci medu a odebraný vzorek tak byl co nejvíce reprezentativní. Med byl poté nabrán do 1ml injekční stříkačky, aby bylo možné pohodlně navážit příslušné množství vzorku.

Příprava zásobního roztoku vzorku: Do vialky bylo naváženo přibližně přesně 0,1 g medu. Voda pro naředění medu byla pipetována v takovém objemu, aby konečný roztok měl koncentraci 0,1 g medu na 5 ml vody. Vzniklý roztok byl promíchán na vortexu, aby došlo k úplnému rozpuštění medu.

Pro přípravu **fortifikovaného zásobního roztoku** vzorku byl navážen vzorek o hmotnosti přibližně přesně 0,1 g. Navážka medu byla doplněna 50mM roztokem glukózy, fruktózy a sacharózy tak, aby výsledná koncentrace těchto sacharidů v zásobním roztoku odpovídala 20 mM v případě GLC a FRC a 3 mM v případě SAC. Roztok byl doplněn vodou tak, aby výsledný obsah medu v roztoku byl přesně 0,1 g medu na 5 ml vody. Konečný roztok byl promíchán na vortexu.

Zásobní roztok vzorku či fortifikovaného vzorku byl před vlastní analýzou dále 10× zředěn a doplněn o vnitřní standard tak, aby jeho konečná koncentrace byla 2,5 mM.

Např. fortifikovaný vzorek „Medokomerc A“ byl připraven navážením 0,1348 g medu. K navážce bylo následně pipetováno 2,695 ml 50mM roztoku GLC; 2,695 ml 50mM roztoku FRC a 404 μ l 50mM roztoku SAC. Vzorek byl doplněn 946 μ l H₂O, aby výsledný objem roztoku byl 6,74 ml, což odpovídá 0,1 g medu na 5 ml vody.

4.5 Parametry měření

Pro měření byly použity křemenné kapiláry o vnitřním průměru 15 μm a 20 μm . Celková délka obou kapilár byla 48,7 cm a efektivní délka 33,8 cm.

Před prvním použitím byla nová kapilára kondicionována 10 min methanolem, 30 min 1M hydroxidem sodným, 30 min 0,1M hydroxidem sodným a 30 minut vodou. Promývací tlak byl 1000 mbar.

Před každou analýzou byla 20 μm kapilára 10 min promývána příslušným elektrolytem (odpovídá 3,6násobku objemu kapiláry), 15 μm kapilára byla promývána po dobu 20 min (cca 1 objem kapiláry).

Během analýzy byl vzorek dávkován do 20 μm kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 12 s, do 15 μm kapiláry pod stejným tlakem po dobu 21 s. Napětí vkládané na kapiláru a teplota, na kterou byla kapilára temperována, byly faktory, měněné podle návrhu experimentu. Při použití elektrolytu s obsahem CTAB bylo vkládané napětí záporné, při použití elektrolytu bez CTAB kladné.

Po poslední analýze v sekvenci byla kapilára promývána 30 min 0,1M hydroxidem sodným a 30 min vodou.

4.6 Hodnocení metody – výpočty

Počet teoretických pater

$$N = 5,54(t_m/w_{1/2})^2 \quad \text{Rovnice 3-8}$$

Rozlišení

$$R_s = \frac{(2,35/2)(t_2 - t_1)}{w'_1 + w'_2} \quad \text{Rovnice 3-12}$$

Korigovaná plocha

$$A_c = A/t_m \quad \text{Rovnice 3-13}$$

Směrodatná odchylka

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Rovnice 4-1}$$

Relativní směrodatná odchylka [%]

$$RSD = 100 * \frac{SD}{\bar{x}} \quad \text{Rovnice 4-2}$$

Poměr signálu k šumu

$$\frac{S}{N} = 3 * \frac{2H}{h} \quad \text{Rovnice 4-3}$$

H označuje výšku píku v polovině výšky a h je rozpětí šumu pozadí. S značí signál, N šum.

Limit detekce (LOD)

$$LOD = 3 * \frac{S}{N} \quad \text{Rovnice 4-4}$$

Limit kvantifikace (LOQ)

$$LOQ = 10 * \frac{S}{N} \quad \text{Rovnice 4-5}$$

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Volba počátečních podmínek

Výchozí podmínky experimentů byly částečně převzaty z práce Carvalha a kol. [4] a Tůmy a kol. [2]. Základní elektrolyt o podobném složení byl také použit v práci Rizelia a kol. [3]. V průběhu vývoje metody a optimalizace separačních podmínek bylo cílem sledovat mj. vliv Na_2HPO_4 na separaci a zjistit, zda je potřeba jej do BGE přidávat [3,4] či se lze bez něj zcela obejít, jak je naznačeno v práci Tůmy a kol. [2]. Kromě toho bylo smyslem optimalizace zjistit, jestli je výhodnější použít přídavek CTAB k obrácení EOF, což je na první pohled logické experimentální uspořádání pro separaci aniontů, nebo bude dostačující katodický EOF, jak bylo dříve úspěšně demonstrováno [2]. Jako vnitřní standard při analýze sacharidů v nápojích byla použita GAL [4], a proto byla použita jako IS i v této práci.

5.1.1 Výběr optimální kapiláry

Původním záměrem bylo testovat 4 kapiláry s různými vnitřními průměry – 5 μm , 10 μm , 15 μm a 20 μm . V CE je potřeba dbát na dobrou kondici stěny kapiláry, tzn. mezi analýzami je nutné kapiláru promýt, aby byl odstraněn předchozí BGE a případné zbytky vzorku.

Proto byl pomocí softwaru CE expert spočítán čas potřebný na promytí kapiláry mezi analýzami tak, aby se kapilára propláchla 5 objemy, jak je doporučováno Americkým lékopisem [61]. Tento software používá k výpočtům Hagen-Poiseuillovu rovnici:

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta l_t} \quad \text{Rovnice 5-1}$$

V_{inj} je označení pro objem dávkovaného vzorku, ΔP označuje rozdíl tlaků na začátku a na konci kapiláry, d je vnitřní průměr kapiláry, t_{inj} označuje dobu nástřiku vzorku, η je viskozita BGE a l_t celková délka kapiláry.

Potřebný čas by pro 5 μm i.d. kapiláru o rozměrech 48,7/33,8 cm odpovídal promývání 209 min mezi jednotlivými analýzami. I v případě, že by kapilára byla promývána po kratší dobu tak, aby došlo k výměně pouze jednoho objemu kapiláry, by bylo zapotřebí promývat po dobu 42 min. U kratší 5 μm i.d. kapiláry o rozměrech 32,6/18,3 cm bylo při změně BGE promýváno 20 min [2], což dle výpočtů softwaru CE Expert odpovídá 1 objemu kapiláry. To je zcela nezbytné minimum, které ale neodpovídá obecným doporučením [61]. Vzhledem k tomu, že čas potřebný pro promývání mezi analýzami je třeba zahrnout do celkové doby analýzy, bylo od kapilár s i.d. 5 μm a 10 μm upuštěno, protože časy na promývání by byly neúměrně dlouhé.

Pro porovnání – promývání kapiláry o délce 48,7/33,8 cm a i.d. 20 μm by bylo za dobu 10 min vyměněno 3,64 objemu a pro 15 μm i.d. kapiláru je za 10 minut vyměněn 1 objem. Za stejný časový úsek by v 5 μm i.d. kapiláře došlo k výměně pouze 0,239 násobku objemu kapiláry.

Výše uvedené výpočty jsou teoretickou kalkulací pro promývání ultračistou vodou.

5.2 Chemometrická optimalizace

V rámci DoE byly optimalizovány následující faktory: koncentrace Na_2HPO_4 a NaOH v roztoku základního elektrolytu, teplota během analýzy a napětí vkládané na kapiláru. Vliv přítomnosti či nepřítomnosti CTAB v elektrolytu na separaci byl porovnáván v rámci dvou nezávislých návrhů experimentu.

Cílem optimalizace bylo maximalizovat rozlišení mezi jednotlivými píky (zejména pro dvojici GAL/GLC, u které je i dle literatury obtížné docílit separace na základní linii) a poměr signálu a šumu a minimalizovat čas analýzy.

Základním elektrolytem pro analýzu je vodný roztok se 2 složkami v případě režimu normální polaroty, se 3 složkami v případě reverzní polaroty. Hodnoty jednotlivých faktorů byly zvoleny na základě údajů v literatuře [2–4].

5.2.1 Optimalizace systému s normální polaritou

Pro optimalizaci byl použit D-optimální design s 26 experimenty a 3 replikáty ve středu experimentální matrice (viz Tabulka 3). Vnitřní průměr kapiláry byl brán jako kvalitativní faktor, zatímco zbylé faktory byly brány jako kvantitativní a byly optimalizovány v níže definovaném rozmezí. Optimalizovanými parametry byly:

1. Vnitřní průměr kapiláry (15 μm ; 20 μm)
2. Koncentrace NaOH (5-35 mM)
3. Koncentrace Na_2HPO_4 (0-30 mM)
4. Teplota (15-30 $^{\circ}\text{C}$)
5. Separační napětí (+15 až +30 kV)

Tabulka 3 Plán experimentu pro optimalizaci separačních podmínek pomocí D-optimálního designu v systému s normální polaritou.

		Faktory					Odezvy					
Exp.	Pořadí exp.	i.d. kap. [μm]	Na ₂ HPO ₄ [mM]	NaOH [mM]	Teplota [°C]	Napětí [kV]	Čas [min]	S/N	Rs1	Rs2	Rs3	Rs4
N4	1	20	0	35	30	+15	4,1	27,61	2,64	5,49	1,02	1,77
N9	2	20	30	35	25	+30	2,7	5,96	5,73	5,99	1,59	2,83
N6	3	20	0	35	15	+30	2,8	3,75	2,48	5,98	1,11	1,59
N10	4	20	30	15	30	+30	1,9	8,41	2,63	2,0	0,9	1,75
N1	5	20	0	5	15	+15	2,6	13,34	1,76	0	0	0
N3	6	20	30	5	30	+15	3,4	18,87	1,52	0,25	0,72	0
N13	7	20	15	20	22,5	+15	4,5	52,25	4,43	5,35	1,49	2,55
N5	8	20	30	5	15	+30	2,3	6,1	0,74	2,12	0,92	0
N12	9	20	0	20	22,5	+22,5	2,4	3,82	2,38	4,22	0,96	1,63
N7	10	20	0	5	30	+30	1,0	6,01	1,66	0	0	0
N2	11	20	30	35	15	+15	7,4	11,93	8,64	6,47	1,91	2,55
N11	12	20	20	35	30	+30	2,3	10,48	5,19	7,05	1,52	3,0
N8	13	20	30	35	30	+20	3,7	6,44	5,58	5,76	1,66	3,0
N20	14	15	30	5	30	+30	1,7	16,91	0,36	0	0	0
N16	15	15	0	5	30	+15	*	*	*	*	*	*
N14	16	15	30	5	15	+15	4,6	23,87	1,45	0	0	0

Tabulka 3 (pokračování) Plán experimentu pro optimalizaci separačních podmínek pomocí D-optimálního designu v systému s normální polaritou.

Exp.	Pořadí exp.	i.d. kap. [μm]	Na ₂ HPO ₄ [mM]	NaOH [mM]	Teplota [°C]	Napětí [kV]	Čas [min]	S/N	Rs1	Rs2	Rs3	Rs4
N26	17	15	15	20	15	+22,5	3,5	26,07	4,25	4,47	1,17	1,95
N24	18	15	10	35	30	+30	2,2	11,07	4,68	7,60	1,46	2,76
N28	19	15	15	20	22,5	+22,5	2,9	24,90	3,38	4,25	1,22	2,23
N23	20	15	0	25	30	+30	1,7	15,17	2,09	4,14	0,95	1,83
N19	21	15	30	35	15	+30	3,4	5,37	7,34	4,91	1,59	2,08
N29	22	15	15	20	22,5	+22,5	2,9	33,35	3,40	4,24	1,23	2,20
N17	23	15	30	35	30	+15	4,9	10,62	4,66	4,42	1,54	2,54
N25	24	15	15	5	22,5	+22,5	2,3	50,34	1,13	1,06	0,84	1,04
N22	25	15	0	35	20	+30	2,5	9,65	6,74	6,99	1,22	1,96
N21	26	15	0	35	30	+25	2,4	17,19	5,26	6,24	1,17	2,15
N15	27	15	0	35	15	+15	5,9	13,23	7,56	7,18	1,34	1,19
N18	28	15	0	5	15	+30	*	*	*	*	*	*
N27	29	15	15	20	22,5	+22,5	2,9	19,92	3,25	4,0	1,21	2,18

Cílem optimalizace bylo dosáhnout co nejkratšího času analýzy a maximalizovat poměr signálu k šumu a rozlišení mezi jednotlivými píky. Nastavení požadovaných hodnot pro jednotlivé odezvy v rámci optimalizace ukazuje Tabulka 4. Hodnota generovaného elektrického proudu nebyla zahrnuta mezi odezvy, protože její hodnota během všech experimentů v průběhu optimalizace byla nejvýše 22 μA , což je hodnota, která je plně akceptovatelná z hlediska rizika vzniku Jouleho tepla a následně neopakovatelných analýz. Zároveň byl proudový profil vždy stabilní.

Tabulka 4 Nastavení parametrů jednotlivých odezev pro nalezení optimálních separačních podmínek pomocí optimizera softwaru Modde Pro.

	Minimální hodnota	Cílová hodnota	Maximální hodnota	Cíl
Čas [min]	-	3,5	5	minimalizace
Signál/šum	20	50	-	maximalizace
Rs1 (EOF/SAC); Rs2 (SAC/GAL)	3	5	-	maximalizace
Rs3 (GAL/GLC)	1,5	3	-	maximalizace
Rs4 (GLC/FRC)	2	5	-	maximalizace

Analyty migrovaly během všech analýz v režimu normální polarizace v následujícím pořadí: SAC, GAL, GLC a FRC. Hodnoty ve sloupci čas (Tabulka 3) značí migrační čas posledního analytu (FRC), a tím tedy i dobu trvání celé separace. Ve sloupci S/N jsou zaneseny hodnoty poměru signálu k šumu taktéž pro poslední pík. Rs1 označuje hodnoty rozlišení mezi 1. a 2. píkem, tedy píkem EOF a SAC, Rs2 mezi SAC a GAL, Rs3 mezi GAL a GLC a Rs4 mezi GLC a FRC. Odezva Rs3 byla kritická z důvodu velmi podobných migračních časů obou analytů.

Během experimentů N1 a N7 v kapiláře s i.d. 20 μm nebyl v roztoku BGE přítomen Na_2HPO_4 a koncentrace NaOH byla pouze 5 mM. Za těchto podmínek byl pozorován jeden pík všech 4 sacharidů migrujících za EOF. V průběhu experimentů N20 a N14 v kapiláře s i.d. 15 μm BGE obsahoval 30 mM fosforečnanu a opět 5 mM NaOH . Za těchto podmínek opět všechny analyty migrovaly společně v jedné zóně za EOF, a tak nedošlo k jejich vzájemné separaci.

U experimentů N3 a N5 v kapiláře s i.d. 20 μm byla koncentrace Na_2HPO_4 v BGE 30 mM a koncentrace NaOH pouze 5 mM. Během těchto experimentů došlo pouze k částečné separaci analytů. Poslední migrující analyty, tedy GLC a FRC, migrovaly nerozseparovány v jedné zóně.

U experimentů N16 a N18 v kapiláře 15 μm i.d. byl generován proud nižší než 1 μA . Z tohoto důvodu nebyly na elektroferogramu patrné žádné píky a tyto experimenty byly

vyřazeny z optimalizace. U obou experimentů byl použit BGE s koncentrací NaOH 5mM, z čehož vyplývá, že takto nízká koncentrace NaOH nemůže být v této kapiláře vůbec použita.

Ostatní experimenty, kde BGE obsahoval buď minimálně 10 mM Na₂HPO₄, nebo byl tvořen pouze NaOH o vyšší koncentraci (min. 15 mM) došlo alespoň k částečné separaci analytů.

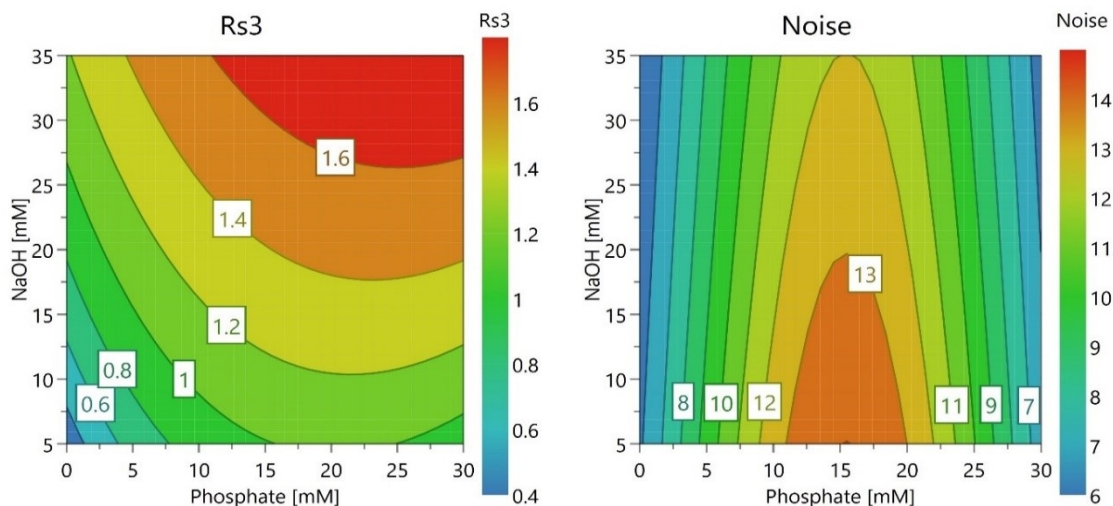
Kritický pár GLC/GAL byl na základní linii rozseparován během experimentů N9, N13, N2, N11 a N8 v 20 μm i.d. kapiláře a N19 a N17 v 15 μm i.d. kapiláře. Koncentrace Na₂HPO₄ v BGE byla během těchto experimentů nejméně 15 mM a koncentrace NaOH nejméně 20 mM.

Z uvedených údajů vyplývá, že pro úspěšné rozdělení všech analytů je zapotřebí dostatečně vysoká koncentrace jak NaOH, tak Na₂HPO₄.

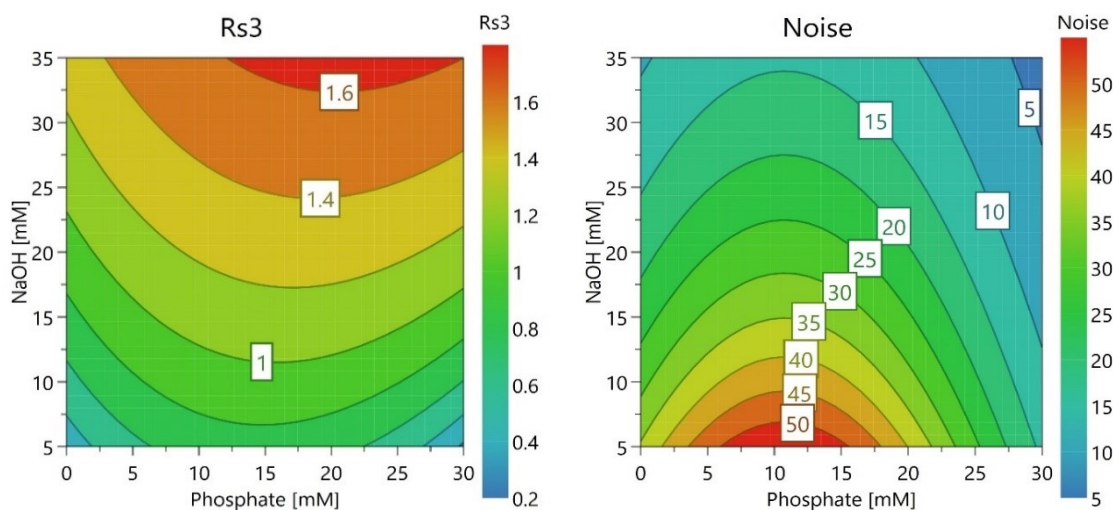
Jak je patrné z následujících vrstevnicových grafů (Obrázek 5 a Obrázek 6), se zvyšující se koncentrací Na₂HPO₄ a NaOH se zlepšuje rozlišení mezi píky analytů, jak je demonstrováno na kritickém páru GLC/GAL. Zároveň ale se zvyšující se koncentrací Na₂HPO₄ nelze říct, že dochází ke zhoršení šumu základní linie, jak demonstrují vrstevnicové grafy. To odporuje práci Tůmy [2], kde je uvedeno, že BGE s obsahem fosfátu není vhodný pro CE-C⁴D, neboť způsobuje kolísání základní linie.

S rostoucí koncentrací Na₂HPO₄ došlo ke zvýšení hodnot S/N a po dosažení jistého optima se se zvyšující se koncentrací Na₂HPO₄ hodnota S/N opět snižuje, a to pravděpodobně v důsledku vyšší iontové síly, která způsobí vyšší zahřívání elektrolytu v kapiláře. Zároveň lze dle DoE dosáhnout vyšších hodnot S/N v 15 μm kapiláře, což je v souladu s výsledky Tůmy [2].

Tůma také uvádí [2], že ke zlepšení separace docházelo se zvyšováním koncentrace NaOH v BGE, což je v souladu s našimi výsledky.



Obrázek 5 Vrstevnicové grafy pro vybrané odezvy; kapilára s i.d. 20 μm , při $t = 22,5\text{ }^\circ\text{C}$ a $U = +22,5\text{ kV}$. Znáznorněn je vliv koncentrace NaOH a Na_2HPO_4 na R_{s3} (GAL/GLC) a na poměr signál/šum.



Obrázek 6 Vrstevnicové grafy pro vybrané odezvy; kapilára s i.d. 15 μm , při $t = 22,5\text{ }^\circ\text{C}$ a $U = +22,5\text{ kV}$. Znáznorněn je vliv koncentrace NaOH a Na_2HPO_4 na R_{s3} (GAL/GLC) a na poměr signál/šum.

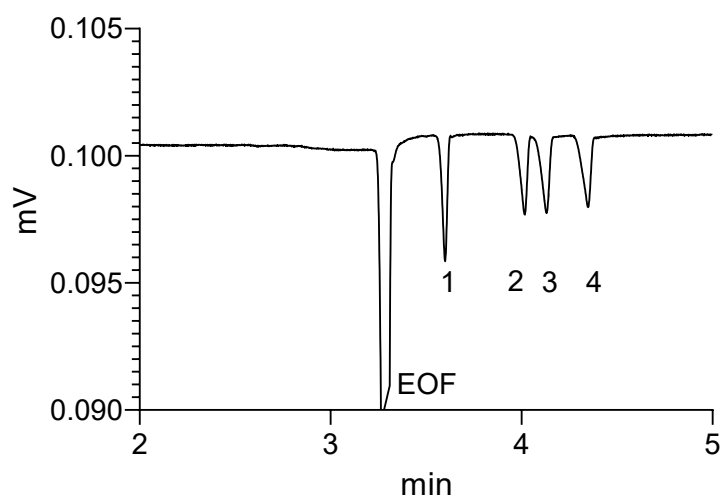
Z předložených vrstevnicových grafů (Obrázek 5 a Obrázek 6) je zřejmé, že vliv koncentrace NaOH a Na_2HPO_4 na odezvy R_{s3} a signál/šum je v obou kapilárách protichůdný.

Hodnoty obou odezvy, jak R_{s3} , tak poměru signálu k šumu je nutno maximalizovat. Pro vytvoření optimální metody je tedy nutné nalézt kompromis mezi koncentrací NaOH a fosforečnanu tak, aby bylo dosaženo požadovaných kritérií pro odezvy R_{s3} a S/N (viz Tabulka 4).

Pomocí optimalizačního nástroje programu Modde byly nalezeny možné kombinace nastavení faktorů, které co nejlépe splňují požadavky na odezvy (viz Tabulka 4). Doporučené optimální hodnoty faktorů byly následující: $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 15 \text{ mM}$, $c(\text{NaOH}) = 35 \text{ mM}$, $t = 27,7 \text{ }^\circ\text{C}$, $U = +16,5 \text{ kV}$ za použití $20 \text{ }\mu\text{m}$ i.d. kapiláry.

Z důvodu kratší analýzy v kapiláře s i.d. $20 \text{ }\mu\text{m}$ (do celkového času analýzy je nutné započítat i čas potřebný k promytí kapiláry mezi analýzami) a srovnatelných výsledků predikce odezvy byla pro další optimalizace za reverzní polarity vyloučena kapilára s i.d. $15 \text{ }\mu\text{m}$ (kapitola 5.2.2).

Obrázek 7 zobrazuje elektroferogram získaný při použití optimálních podmínek separace v režimu normální polarity. Analyzován byl směsný roztok standardů o koncentraci 3 mM .



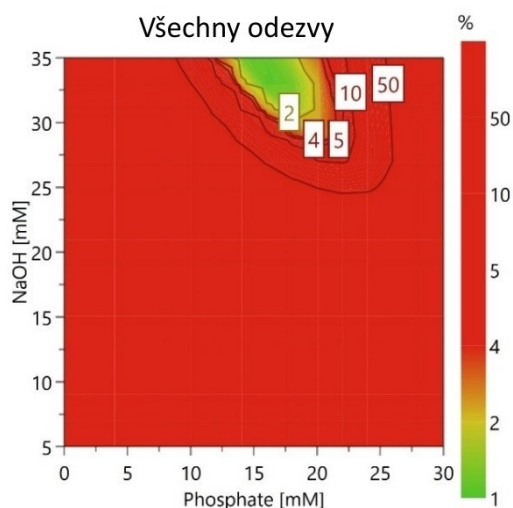
Obrázek 7 Elektroferogram roztoku standardů (3 mM pro každý analyt) za optimálních podmínek v systému normální polarity – 15 mM Na_2HPO_4 ; 35 mM NaOH; $t = 27,7 \text{ }^\circ\text{C}$; $U = +16,5 \text{ kV}$. Kapilára $20 \text{ }\mu\text{m}$ i.d., délka 48,7/33,8 cm. Pík 1 – SAC, 2 – GAL, 3 – GLC, 4 – FRC

Tabulka 5 zobrazuje porovnání odezev predikovaných programem Modde při použití optimálních hodnot faktorů s hodnotami odezev získanými v průběhu experimentálního ověření optimálních separačních podmínek. Až na odezvu S/N bylo dosaženo akceptovatelné shody mezi predikovanými a experimentálně zjištěnými hodnotami odezev.

Tabulka 5 Porovnání predikovaných a naměřených hodnot odezev v systému s normální polaritou (n=6)

Odezva	Predikovaná hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka [%]
Čas [min]	4,6	4,3	5,88
Rs1	5,33	5,45	2,34
Rs2	7,45	7,25	2,66
Rs3	1,62	1,62	0,28
Rs4	2,97	2,82	4,89
S/N	33,45	40,54	21,19

Pro nalezený optimální bod byl také vypočítán tzv. operační prostor (design space), kde se v zeleně vyznačené oblasti nachází bod s podmínkami, které vyhovují pro separaci analytů (viz Obrázek 8). Jak je z obrázku patrné, pravděpodobnost selhání pro optimální bod je nižší než 2 %.



Obrázek 8 Operační prostor pro optimální BGE s pravděpodobností selhání 2 %; normální polarita, zahrnuty všechny odezvy optimalizace – signál/šum, čas, Rs1, Rs2, Rs3, Rs4. Kapilára 20 μm i.d.; $t = 27,7\text{ }^\circ\text{C}$; $U = +16,5\text{ kV}$ (optimální podmínky separace).

5.2.2 Optimalizace v systému s reverzní polaritou

Pro optimalizaci systému s reverzní polaritou byl využit centrálně kompozitní design. Ten zahrnoval celkem 23 experimentů včetně 3 opakování středového bodu (viz Tabulka 6). Na základě předchozích experimentů (viz kapitola 5.2.1) byla pro optimalizaci v systému s reverzní polaritou zvolena pouze kapilára s i.d. 20 μm , efektivní délkou 33,8 cm a celkovou délkou 48,7 cm. Ostatní optimalizované faktory byly, stejně jako v systému normální polarity, brány jako kvantitativní faktory. Rozmezí koncentrací NaOH a Na_2HPO_4 je oproti systému s normální polaritou upraveno na základě výsledků optimalizace v systému s normální polaritou. Jednotlivé parametry byly optimalizovány v níže definovaném rozmezí:

1. Koncentrace NaOH (5-50 mM)
2. Koncentrace Na_2HPO_4 (5-50 mM)
3. Teplota (15-30 °C)
4. Separační napětí (-15 až -30 kV)

Koncentrace CTAB byla po celou dobu optimalizace 0,2 mM, protože takto malý přídavek CTAB v elektrolytu pouze obrací směr EOF a v takto malých koncentracích nemá významný vliv na selektivitu separace. Tento parametr tedy nebyl optimalizován a koncentrace CTAB byla konstantní během všech experimentů. Kvůli tomu, že CTAB způsobuje obrácení EOF, musí být v systému reverzní polarity na kapiláru vkládáno záporné napětí.

Tabulka 6 Plán experimentu pro optimalizaci pomocí centrálně kompozitního designu v systému s reverzní polaritou (všechny BGE obsahují 0,2mM CTAB)

Exp.	Pořadí exp.	Faktory				Odezvy					
		Na ₂ HPO ₄ [mM]	NaOH [mM]	Teplota [°C]	Napětí [kV]	Čas [min]	S/N	Rs1	Rs2	Rs3	Rs4
N21	1	27,5	27,5	22,5	-22,5	5,2	12,19	2,92	1,96	7,11	10,55
N11	2	50	5	30	-30	2,6	8,02	0	0	0	2,95
N20	3	27,5	27,5	22,5	-30	3,8	6,41	2,73	1,84	7,38	10,45
N1	4	5	5	15	-15	6,9	5,13	1,86	1,05	3,69	3,70
N17	5	27,5	27,5	15	-22,5	6,4	5,78	2,38	1,80	7,17	12,80
N6	6	50	50	30	-15	7,1	11,39	2,76	2,02	6,33	11,46
N2	7	50	5	15	-15	7,6	2,7	0	0	0	4,41
N15	8	27,5	5	22,5	-22,5	4,2	9,99	0,75	0,77	0,64	4,01
N9	9	50	50	15	-30	4,6	1,65	1,92	1,90	6,69	14,71
N14	10	50	27,5	22,5	-22,5	5,1	4,93	1,96	1,66	3,03	10,41
N5	11	5	50	30	-15	5,0	12,31	1,80	1,06	7,84	10,62
N19	12	27,5	27,5	22,5	-15	8,0	23,84	2,89	2,02	6,86	10,57
N12	13	50	50	30	-30	3,2	3,09	2,96	1,92	6,81	10,42
N16	14	27,5	50	22,5	-22,5	5,1	15,70	2,69	1,93	10,03	14,72
N18	15	27,5	27,5	30	-22,5	4,4	15,72	3,16	1,88	7,02	8,89
N22	16	27,5	27,5	22,5	-22,5	5,2	10,46	2,87	1,94	7,20	10,81

Tabulka 6 (pokračování) Plán experimentu pro optimalizaci pomocí centrálně kompozitního designu v systému s reverzní polaritou (všechny BGE obsahují 0,2mM CTAB)

Exp.	Pořadí exp.	Na ₂ HPO ₄ [mM]	NaOH [mM]	Teplota [°C]	Napětí [kV]	Čas [min]	S/N	Rs1	Rs2	Rs3	Rs4
N4	17	50	5	30	-15	5,3	7,27	0	0	0	3,43
N13	18	5	27,5	22,5	-22,5	4,2	19,74	2,45	1,54	9,21	10,77
N10	19	5	5	30	-30	2,3	18,63	1,60	0,67	2,06	2,64
N23	20	27,5	27,5	22,5	-22,5	5,2	12,31	2,81	1,88	7,10	10,69
N3	21	5	50	15	-15	7,0	15,73	1,47	1,16	8,24	13,35
N7	22	5	5	15	-30	3,2	9,20	1,35	0,75	2,54	3,44
N8	23	5	50	15	-30	3,2	3,34	1,72	1,20	8,67	13,35

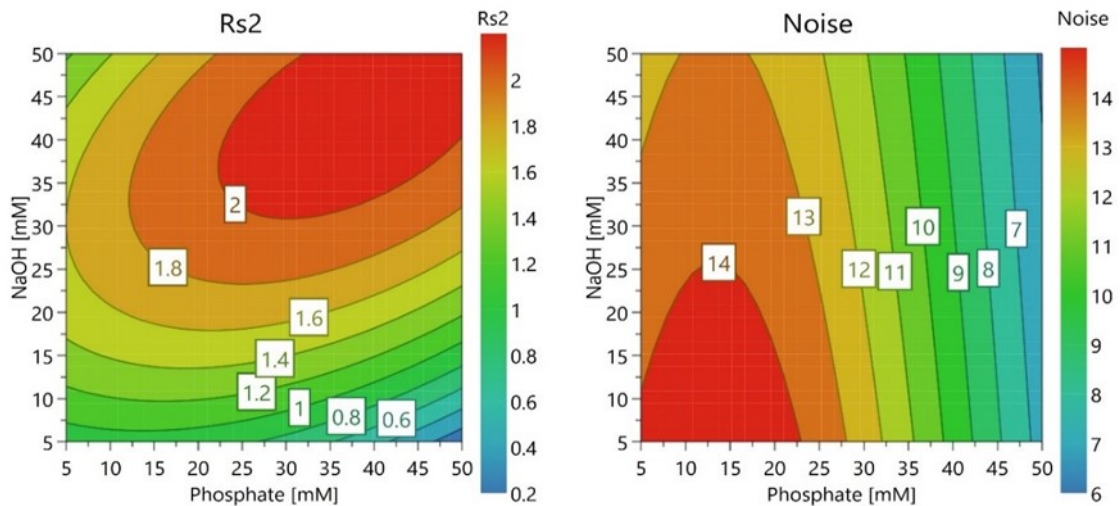
Požadované hodnoty pro jednotlivé odezvy shrnuje Tabulka 7. Cílem bylo opět dosáhnout co nejkratší doby analýzy a maximalizovat S/N a rozlišení píků jednotlivých analytů.

Tabulka 7 Nastavení parametrů jednotlivých odezev pro nalezení optimálních separačních podmínek v systému reverzní polarity.

	Minimální hodnota	Cílová hodnota	Maximální hodnota	Cíl
Čas [min]	X	4	7	minimalizace
Signál/šum	12	50	X	maximalizace
Rs1 (FRC/GLC)	2	4	X	maximalizace
Rs2 (GLC/GAL)	1,8	3	X	maximalizace
Rs3 (GAL/SAC) Rs4 (SAC/EOF)	4	6	X	maximalizace

V režimu reverzní polarity migrovaly analyty v pořadí FRC, GLC, GAL a SAC, následovány EOF. Rs1 tedy v tomto systému označuje rozlišení mezi píkem FRC a GLC, Rs2 mezi píky GLC a GAL, Rs3 je rozlišení mezi píky GAL a SAC a Rs4 mezi SAC a EOF. V tomto systému polarity je kritickým rozlišením Rs2 (GLC a GAL). Ve sloupci čas (Tabulka 6) jsou zaneseny hodnoty migračního času EOF, neboť se jedná o poslední pík, a tím pádem jde o čas trvání celé separace. Do sloupce S/N byla zanášena data pro poměr signál/šum pro pík glukózy, případně, pokud nedošlo k separaci analytů, pro první pík. K separaci nedošlo u experimentů N11, N2 a N4. Během všech tří zmíněných experimentů byla koncentrace NaOH v BGE pouze 5 mM. I přes přítomnost Na₂HPO₄ ve vysoké koncentraci migrovaly všechny analyty v jedné zóně před EOF a nebyly rozseparovány. K separaci všech analytů (včetně kritického páru GLC/GAL) na základní linii došlo během analýz N21, N20, N17, N6, N9, N14, N19, N12, N16, N18, N22 a N23. BGE u všech zmíněných experimentů obsahoval minimálně 27,5 mM Na₂HPO₄ společně s nejméně 27,5 mM NaOH. Výjimkou je experiment N13, u kterého došlo k separaci všech analytů na základní linii i přes relativně nízkou koncentraci Na₂HPO₄ (5 mM).

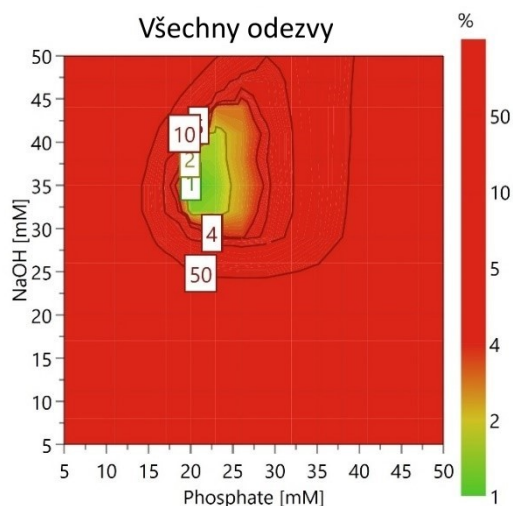
V systému s reverzní polaritou, stejně jako v systému s normální polaritou, zlepšuje rozlišení mez jednotlivými analyty přítomnost fosfátu a hlavně vyšší koncentrace NaOH v BGE. Vliv koncentrace Na_2HPO_4 a NaOH na odezvy Rs2 a poměr signálu k šumu jsou protichůdné (viz Obrázek 9). Při zvyšování koncentrace Na_2HPO_4 a NaOH v roztoku BGE se výrazně zvyšuje rozlišení. Hodnota poměru signálu k šumu klesá se zvyšující se koncentrací NaOH. Tento trend je ještě výraznější se zvyšující se koncentrací Na_2HPO_4 .



Obrázek 9 Vrstevnicové grafy pro odezvy Rs2 s signál/šum; při $t = 22,5 \text{ }^\circ\text{C}$ a $U = -22,5 \text{ kV}$. Znárodnují vliv koncentrace NaOH a Na_2HPO_4 na odezvy Rs2 a poměr signál/šum v systému reverzní polarity.

Optimalizační nástroj programu Modde navrhl 20 možných alternativ nastavení faktorů, které splňují požadavky na odezvy (Tabulka 7). Zvolená byla navržená metoda s parametry: $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 19,9 \text{ mM}$, $c(\text{NaOH}) = 37,7 \text{ mM}$, $t = 27,2 \text{ }^\circ\text{C}$, $U = -18,8 \text{ kV}$.

Pro optimální podmínky byl vytvořen graf pravděpodobnosti selhání (Obrázek 10). V zeleně vyznačené oblasti se nachází bod s optimálními podmínkami pro separaci analytů v systému reverzní polarity.



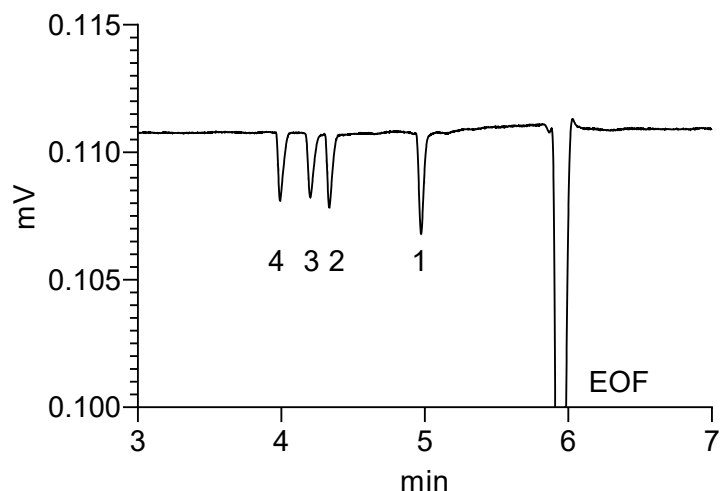
Obrázek 10 Operační prostor pro optimální BGE s pravděpodobností selhání 2 %; reverzní polarita, zahrnutý všechny odezvy optimalizace – signál/šum, čas, Rs1, Rs2, Rs3 a Rs4. Kapilára 20 μm i.d.; $t = 27,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $U = -18,8 \text{ kV}$ (optimální podmínky separace).

Následující tabulka zobrazuje hodnoty odezev predikovaných programem Modde při použití optimálních hodnot faktorů s hodnotami odezev naměřenými během analýzy za navržených optimálních podmínek. Pro všechny odezvy s výjimkou Rs3 a S/N byla shoda predikovaných a naměřených hodnot akceptovatelná. I přes vyhovující validitu modelu byla shoda pro odezvu S/N enormně špatná.

Tabulka 8 Porovnání predikovaných a naměřených hodnot odezev v systému s reverzní polaritou za optimálních podmínek ($n = 6$).

Odezva	Predikovaná hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka [%]
Čas [min]	5,4	5,8	6,68
Rs1 FRC/GLC	2,95	2,98	1,30
Rs2 GLC/GAL	1,91	1,90	1,54
Rs3 GAL/SACH	8,55	9,92	16,13
Rs4 SACH/EOF	11,62	11,72	2,83
S/N	17,29	29,22	68,88

Elektroferogram (viz Obrázek 11) byl získaný za optimálních podmínek v systému reverzní polarity. Koncentrace analytů ve vzorku byla 3 mM.



Obrázek 11 Elektroferogram v systému reverzní polarity za optimálních podmínek – 19,9 mM Na₂HPO₄; 37,7 mM NaOH; t = 27,2 °C; U = -18,8 kV. Kapilára 20 μm i.d., délka 48,7/33,8 cm. Pík 1 – SAC, 2 – GAL, 3 – GLC, 4 – FRC.

Po porovnání elektroferogramů získaných za optimálních podmínek v obou systémech polarit (Obrázek 7 pro systém s normální polaritou, Obrázek 11 pro systém s reverzní polaritou) je zřejmé, že rychlejší analýzy bylo dosaženo za použití systému s normální polaritou.

Výhodou systému s normální polaritou je možnost provádět analýzu bez předchozího pokrytí vnitřních stěn kapiláry CTAB. Rozlišení je u systému s normální polaritou nižší, ale stále dochází k rozlišení píků až na základní linii. Přehledné srovnání ukazuje následující Tabulka 9.

Tabulka 9 Porovnání optimálních podmínek obou systémů

Průměrné hodnoty z 6 měření:	Normální polarita	Reverzní polarita
Čas [min]	4,3	5,8
Signál/šum*	40,54	29,22
Rs (EOF – SAC)	5,45	11,72
Rs (SAC – GAL)	7,25	9,92
Rs (GAL – GLC)	1,62	1,90
Rs (GLC – FRC)	2,82	2,89

* v systému normální polarity byl sledován S/N pro pík FRC (analyt s nejdelším migračním časem), v systému reverzní polarity byl sledován S/N pro pík GLC.

5.2.3 Optimalizace nástřiku vzorku

Doba nástřiku byla optimalizována z důvodu možného zvýšení odezvy, a tím snížení limitu kvantifikace a zvýšení citlivosti detekce. Tato optimalizace byla provedena za optimálních separačních podmínek v systému s normální polaritou. Byly zkoumány časy nástřiku vzorku od 12 s do 36 s, což na základě výpočtů pomocí softwaru CE Expert odpovídá dávkované zóně vodného vzorku cca 0,5-2 % efektivní délky kapiláry.

Výsledky optimalizace shrnuje Tabulka 10.

Tabulka 10 Optimalizace doby nástřiku pro kapiláru s i.d. 20 μ m, délka 48,7/33,8 cm (n=3).

Doba nástřiku [s]	12	18	24	30	36
Objem vzorku v kapiláře [%]	0,63	0,94	1,26	1,57	1,89
Rs3 (GAL – GLC)	1,54	1,38	1,19	1,10	0,99
Poměr signál/šum píku sacharózy (0,3 mM)	8,95	6,15	6,02	5,68	4,97
RSD poměru S/N píku SAC (0,3 mM) [%]	16,03	6,98	12,68	16,67	2,89

Prodloužením nástřiku docházelo k rozšiřování píků. Oproti teoretickým předpokladům při delším nástřiku nedocházelo k lepšímu zakoncentrování analytu zesílením elektrického pole (tzv. Field Amplified Sample Stacking), jak by se dalo předpokládat při dávkování čistě vodného roztoku vzorku do silně vodivého roztoku BGE. Jak je patrné z tabulky, prodloužení doby nástřiku způsobilo snížení poměru signálu k šumu u všech píků (v tabulce je pro přehlednost uveden pouze signál/šum píku pro sacharózu, jejíž obsah v medu je nejnižší) a také snížení rozlišení mezi jednotlivými píky (opět jsou uvedeny hodnoty pouze pro kritické rozlišení mezi galaktózou a glukózou).

Jako nejvhodnější tedy byly zvoleny původní podmínky: 50 mbar po dobu 12 s.

5.3 Optimální podmínky separace

Následující tabulka uvádí souhrn optimálních podmínek pro separaci. Za těchto podmínek byla provedena validace metody a analýza vzorků medu.

Tabulka 11 Optimální podmínky pro analýzu

Parametr	Hodnota
c Na ₂ HPO ₄ v BGE [mM]	15
c NaOH v BGE [mM]	35
i.d. kapiláry [μm]	20
Efektivní délka kapiláry [cm]	33,8
Celková délka kapiláry [cm]	48,7
Doba dávkování vzorku [s]	12
Tlak pro dávkování vzorku [mbar]	50
Teplota během separace [°C]	27,7
Napětí vkládané na kapiláru [kV]	+16,5

5.4 Kalibrační přímky

Pro hodnocení linearity byly použity poměry korigované plochy píku analytu ku korigované ploše píku vnitřního standardu, tj. $A_c(\text{analyt})/A_c(\text{IS})$ na koncentraci daného analytu. Všechny koncentrační hladiny byly měřeny v triplikátu a pro kalibrační přímku byly použity průměrné hodnoty poměru korigovaných ploch píků ($A_c(\text{analyt})/A_c(\text{IS})$). Linearita byla ověřována pro kalibrační rozmezí 0,3 mM – 7,5 mM. Vyhodnocení proběhlo pomocí lineární regrese:

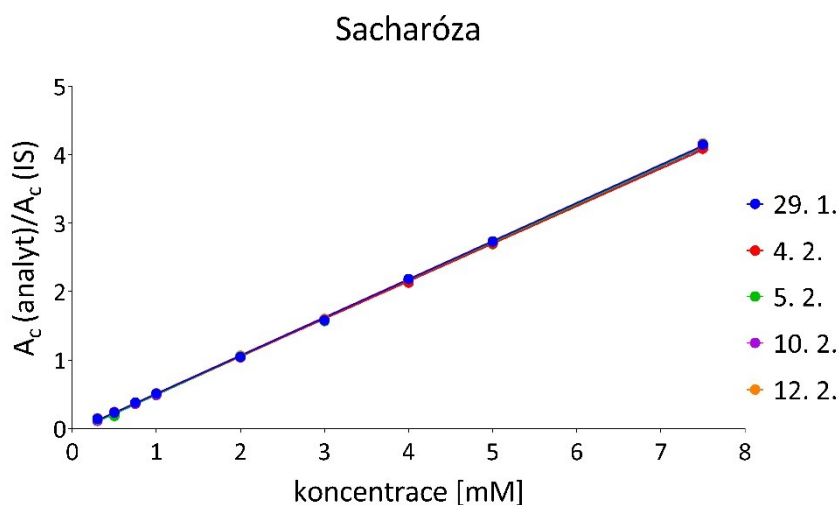
$$y = kx + q \qquad \text{Rovnice 5-2}$$

Hodnota y označuje poměr korigované plochy píku analytu ku korigované ploše píku IS ($A_c(\text{analyt})/A_c(\text{IS})$), k je směrnice přímky, x značí koncentraci analytu (mM) a q je absolutní člen.

Pro určení mezidenní přesnosti byla linearita ověřována v průběhu dvou týdnů. Porovnány byly sklony 5 kalibračních křivek. Zde je nutno podotknout, že analýzy proběhly ve dvou kapilárách stejné šarže.

5.4.1 Kalibrační přímky pro sacharózu

Na Grafu 1 je znázorněno 5 kalibračních přímek pro sacharózu.



Graf 1 Kalibrační přímky pro sacharózu

Z kalibračních přímek byly vyloučeny dvě odlehlé hodnoty, a to koncentrace 1 mM z měření dne 4. 2. a koncentrace 2 mM z měření 10. 2. Toto vyloučení bylo navrženo makro šablonou programu Excel Farmaceutické fakulty.

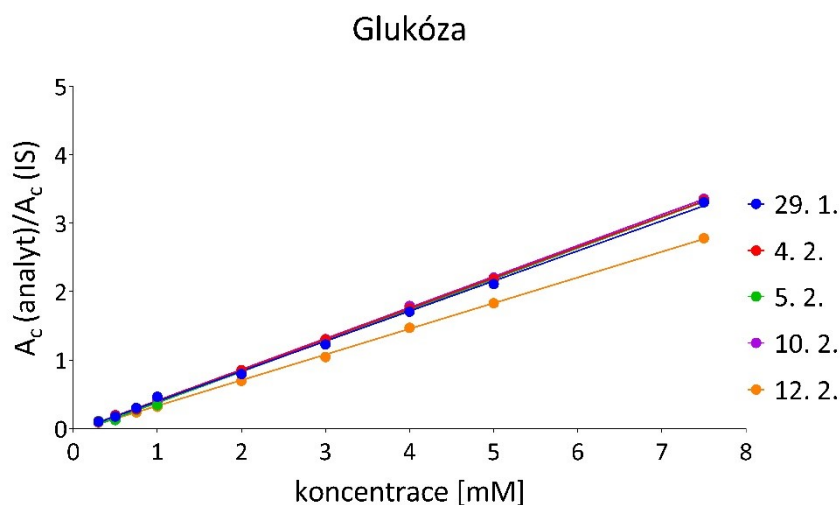
V tomto případě lze konstatovat, že mezidenní přesnost stanovení je excelentní, což dokazuje RSD hodnota sklonu z pěti kalibračních křivek, která je 0,68 % (n=5).

Tabulka 12 Výsledky měření kalibrační závislosti a porovnání sklonů přímek pro sacharózu

Datum měření	Rovnice přímky	k	R ²
29. 1. 20	$y = 0,557x - 0,04838$	0,5570	0,9998
4. 2. 20	$y = 0,5483x - 0,0424$	0,5483	0,9999
5. 2. 20	$y = 0,5563x - 0,0639$	0,5563	0,9995
10. 2. 20	$y = 0,554x - 0,0567$	0,5540	0,9999
12. 2. 20	$y = 0,5574x - 0,0447$	0,5574	0,9998
	Průměrná hodnota	0,5546	-
	SD	0,0038	-
	RSD [%]	0,68	-

5.4.2 Kalibrační přímky pro glukózu

Na Grafu 2 je znázorněno 5 kalibračních přímek pro glukózu.



Graf 2 Kalibrační přímky pro glukózu

Hodnota koncentrace 1 mM ze 4. 2. byla makro šablonou vyhodnocena jako odlehlá hodnota a byla vyloučena.

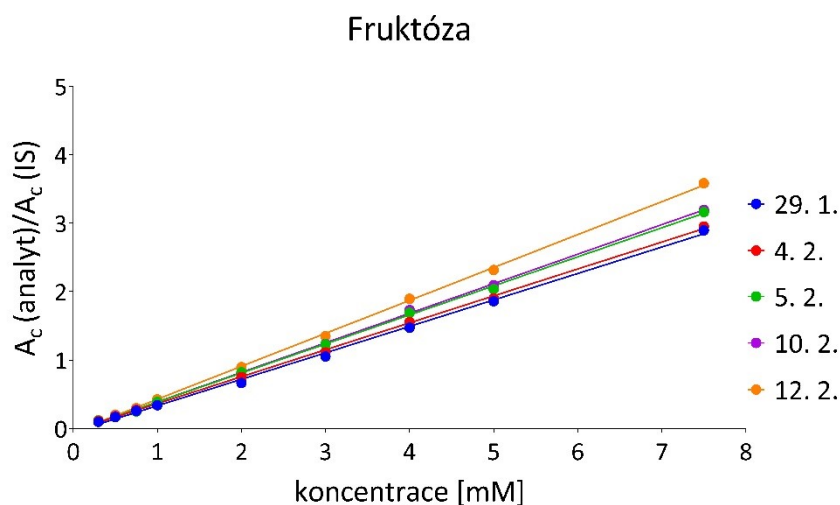
Mezidenní přesnost stanovení je výrazně horší než v případě sacharózy. Kalibrační křivka ze 12. 2. 20 má pro GLC jiný sklon, než další 4 křivky, což zhoršuje hodnotu RSD na 7,62 % (n=5).

Tabulka 13 Výsledky měření kalibrační závislosti a porovnání sklonů přímek pro glukózu

Datum měření	Rovnice přímky	k	R ²
29. 1. 20	$y = 0,4393x - 0,0419$	0,4393	0,9986
4. 2. 20	$y = 0,4483x - 0,0409$	0,4483	0,9999
5. 2. 20	$y = 0,4516x - 0,0744$	0,4516	0,9994
10. 2. 20	$y = 0,4525x - 0,0431$	0,4525	0,9998
12. 2. 20	$y = 0,375x - 0,0349$	0,3750	0,9996
	Průměrná hodnota	0,4333	-
	SD	0,0330	-
	RSD [%]	7,62	-

5.4.3 Kalibrační přímky pro fruktózu

Na Grafu 3 je znázorněno 5 kalibračních přímek pro fruktózu.



Graf 3 Kalibrační přímky pro fruktózu

Hodnota koncentrace 1 mM ze 4. 2. byla vyhodnocena jako odlehlá hodnota a byla vyloučena.

Sklon jednotlivých křivek se pro tento analyt liší nejvíce, jak je dokumentováno hodnotou RSD 8,87 %. Jako v případě GLC, sklon kalibrační křivky ze 12. 2. 20 se výrazně liší od dalších analýz.

Tabulka 14 Výsledky měření kalibrační závislosti a porovnání sklonů přímek pro fruktózu

Datum měření	Rovnice přímky	k	R ²
29. 1. 20	$y = 0,3863x - 0,0532$	0,3863	0,9984
4. 2. 20	$y = 0,3933x - 0,0295$	0,3933	0,9994
5. 2. 20	$y = 0,4242x - 0,0372$	0,4242	0,9994
10. 2. 20	$y = 0,4313x - 0,0418$	0,4313	0,9996
12. 2. 20	$y = 0,4808x - 0,0525$	0,4808	0,9995
	Průměrná hodnota	0,42318	-
	SD	0,0376	-
	RSD [%]	8,87	-

5.4.4 Limit kvantifikace

Limit kvantifikace je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze přesně a správně stanovit. Limitem kvantifikace byla určena nejnižší hodnota kalibrační křivky, tedy koncentrace 0,3 mM. Tato koncentrace odpovídá 5 g sacharózy ve 100 g medu a je tedy dostatečná pro odhalení případného překročení nejvyššího přípustného množství sacharózy v medu [5,6]. Při bližším hodnocení validačních dat bylo zjištěno, že hodnota S/N na nejnižší koncentrační hladině je v rozmezí 3,23 až 4,72, což je hodnota dostatečná pro LOD. Porovnáním hodnot poměrů korigovaných ploch analytu ku plochám vnitřnímu standardu bylo zjištěno, že RSD se na nejnižším bodě kalibrační křivky pohybuje v rozmezí 9,93 až 10,33 %, což je pro takto vysokou koncentraci (0,3 mM), nevyhovující hodnota. Z tohoto důvodu by bylo potřeba v rámci dalšího vývoje metody zapracovat na zvýšení citlivosti metody, například použitím organických rozpouštědel pro finální ředění vzorku, které sníží vodivost roztoku, a tím umožní lepší on-line zakoncentrování v kapiláře. Jako vhodné rozpouštědlo by se mohly jevit acetonitril [2], methanol, ethanol aj.

Tabulka 15 Hodnoty S/N \pm SD, korigovaných ploch a RSD poměru korigovaných ploch analytu a IS [%] na koncentrační hladině 0,3 mM (n = 15).

Analyt	S/N \pm SD	A _c (analyt)/ A _c (IS)	RSD A _c (analyt)/ A _c (IS) [%]
Sacharóza	4,72 \pm 1,68	0,1360	10,33
Glukóza	3,23 \pm 1,09	0,1020	10,22
Fruktóza	4,22 \pm 1,52	0,1088	9,93

5.5 Analýza vzorků medu

Optimalizovaná CE-C⁴D metoda byla použita pro stanovení glukózy, fruktózy a sacharózy ve třech vzorcích medu, i přestože nejnižší bod kalibrační křivky (LOQ) vykazuje hodnoty S/N mezi 3 a 10 s poměrně malou přesností poměrů ploch (RSD 9,93 až 10,33). Protože ale byly kalibrační křivky lineární v rozsahu 0,3-7,5 mM a opakovatelné s akceptovatelnými hodnotami RSD, byly touto metodou analyzovány tři vzorky medu. Dva vzorky byly získány od včelaře a jeden vzorek byl komerční. Tyto analýzy a jejich výsledky lze tedy považovat za pilotní experiment, který může poukázat na aplikovatelnost této metody v praxi. Na základě těchto výsledků lze případně navrhnout změny nutné k vylepšení metody z pohledu kvantifikace ve vzorcích medu.

Všechny plochy píků byly korigovány migračním časem příslušného analytu podle Rovnice 3-13. Obsah analytů byl hodnocen výpočtem z rovnice kalibračních přímek (Rovnice 5-2).

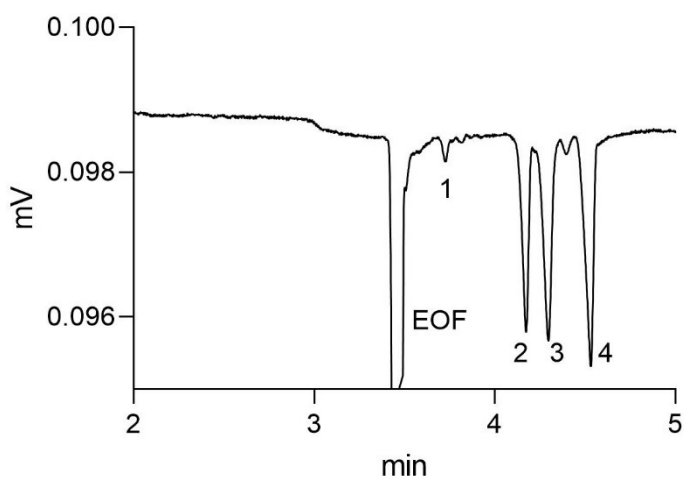
Výsledky jsou v tabulkách uváděny jako množství analytu v g vztažené na 100 g medu. Hodnoty SAC jsou označeny hvězdičkou (*), protože se pohybují pod nejnižším bodem kalibrační křivky, tedy pod hodnotou LOQ.

5.5.1 Stanovení sacharidů ve vzorku z lokality Javorník

Jak je patrné z elektroferogramu a tabulky, obsah sacharózy ve vzorku medu byl 4,45 g/100 g medu, což je hodnota nižší než je LOQ. To značí, že med nebyl falšován přidáním sacharózy. Zároveň je třeba tuto hodnotu brát spíše jako „semikvantitativní“, protože správně nelze provést stanovení pod hodnotou LOQ. Z tohoto důvodu je třeba u této metody zlepšit citlivost tak, aby bylo možné stanovit i množství sacharózy pod hodnotou 5 g/100 g vzorku (viz kapitola 5.4.4). Celkový obsah sacharidů byl v tomto vzorku 67,16 g/100 g medu, což splňuje kritéria stanovená vyhláškou [6]. Výsledky kvantifikace jsou opakovatelné s RSD 0,38 % až 1,52 % s výjimkou stanovení FRC a poměru FRC : GLC, kde je RSD 4,51 respektive 5,33 %. Přestože barvou se med jevil spíše jako medovicový, poměr FRC : GLC odpovídá medu květovému.

Tabulka 16 Výsledky stanovení sacharidů v medu z lokality Javorník

Datum měření	12.2. A	12.2. B	12.2. C	Průměr	SD	RSD [%]
SAC* [g/100 g]	4,437	4,45	4,47	4,45	0,02	0,38
GLC [g/100 g]	33,83	34,429	34,20	34,15	0,30	0,88
FRC [g/100 g]	30,04	27,95	27,68	28,56	1,29	4,51
celkem cukry [g/100 g]	68,30	66,83	66,35	67,16	1,02	1,52
poměr FRC : GLC	0,89	0,81	0,81	0,84	0,04	5,33



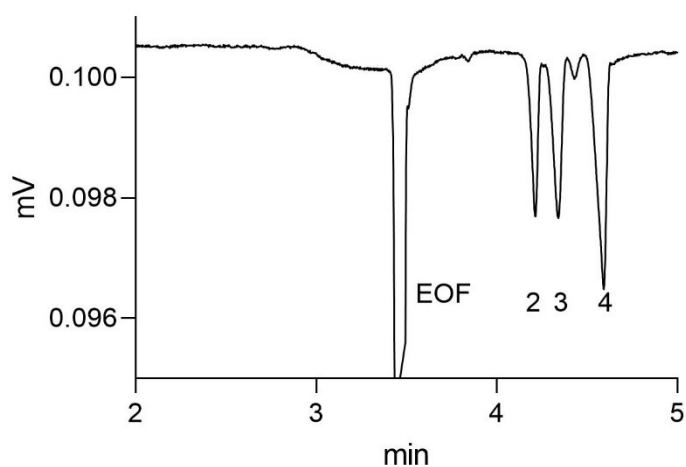
Obrázek 12 Elektroferogram stanovení sacharidů ve vzorku medu z lokality Javorník, podmínky separace: BGE 15 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaOH; t = 27,7 °C; U = +16,5 kV. Generovaný proud 10 μA. Kapilára 20 μm i.d., délka 48,7/33,8 cm. Označení píků: 1 – SAC, 2 – GAL, 3 – GLC, 4 – FRC.

5.5.2 Stanovení sacharidů ve vzorku medu z lokality Jaroslavice

Ve vzorku medu „Jaroslavice“ nebyl kvantifikován pík pro SAC, protože intenzita signálu byla velice nízká. Tento med byl stejně jako v předešlém případě správně stáčen a nebyl falšován přídavkem SAC. Tento med také vyhovuje nařízení, podle kterého musí být obsah redukujících cukrů v medu (tedy GLC a FRC) vyšší než 60 % [6]. Poměr mezi těmito dvěma cukry odpovídá hodnotám udávaným pro květové medy (a tedy, že poměr FRC : GLC se pohybuje od 1 do 1,3) [62]. Opakovatelnost tří paralelních stanovení je excelentní s RSD nižší než 0,82 %

Tabulka 17 Výsledky stanovení sacharidů v medu z lokality Jaroslavice

Datum měření	12.2. A	12.2. B	12.2. C	Průměr	SD	RSD [%]
SAC [g/100 g]	pík pro sacharózu má nízkou odezvu					
GLC [g/100 g]	31,29	31,39	31,31	31,33	0,05	0,16
FRC [g/100 g]	35,23	35,41	34,84	35,16	0,29	0,82
celkem cukry [g/100 g]	66,53	66,79	66,15	66,49	0,32	0,49
poměr FRC : GLC	1,13	1,13	1,11	1,12	0,01	0,73



Obrázek 13 Elektroferogram stanovení sacharidů ve vzorku medu z lokality Jaroslavice, podmínky separace: BGE 15 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaOH; t = 27,7 °C; U = +16,5 kV. Generovaný proud 10 μA. Kapilára 20 μm i.d., délka 48,7/33,8 cm. Označení píků: 2 – GAL, 3 – GLC, 4 – FRC.

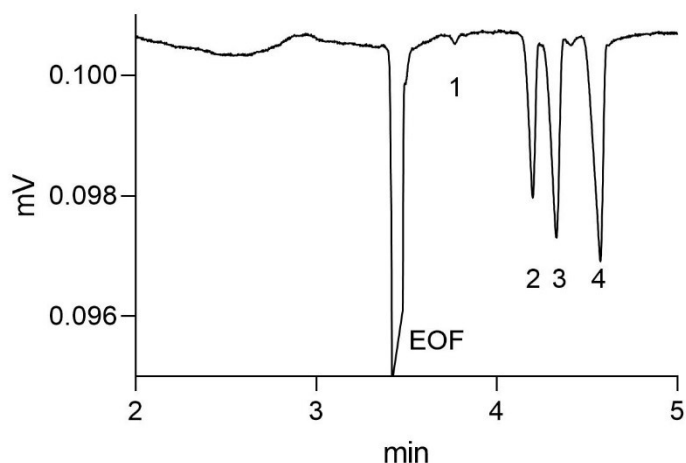
5.5.3 Stanovení sacharidů ve vzorku medu od společnosti „Medokomerc“

Vzorek medu „Medokomerc“ je jako jediný z analyzovaných medů komerčně dostupný. Porovnáním s údaji na etiketě výrobku bylo zjištěno, že naměřené hodnoty jsou nižší než hodnoty udávané výrobcem. Výrobce udává, že celkové množství sacharidů ve 100 g medu je 81,7 g. Během analýzy byla získána hodnota 75,32 g sacharidů na 100 g medu, což odpovídá 92,2 % deklarovaného obsahu, což je hodnota, kterou lze ještě považovat za shodnou.

Obsah SAC ve vzorku je nižší než 5 g/100 g medu a celkový obsah sacharidů je vyšší než 60 %. Med tedy odpovídá příslušné vyhlášce [6]. Opakovatelnost stanovení je akceptovatelná s hodnotou RSD pod 2,75 %. Jen pro stanovení SACH byla hodnota RSD 8,22 %, což je očekávatelné vzhledem k tomu, že je tato hodnota pod nejnižším bodem kalibrační křivky, tedy pod LOQ.

Tabulka 18 Výsledky stanovení sacharidů v medu od společnosti „Medokomerc“

Datum měření	10.2. A	10.2. B	10.2. C	Průměr	SD	RSD [%]
SAC* [g/100 g]	3,33	2,93	2,87	3,04	0,25	8,22
GLC [g/100 g]	32,17	32,30	32,35	32,27	0,09	0,29
FRC [g/100 g]	38,73	40,70	40,57	40,00	1,10	2,75
celkem cukry [g/100 g]	74,23	75,93	75,79	75,32	0,94	1,25
poměr FRC : GLC	1,20	1,26	1,25	1,24	0,03	2,49



Obrázek 14 Elektroferogram stanovení sacharidů ve vzorku medu od společnosti "Medokomerc", podmínky separace: BGE 15 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaOH; t = 27,7 °C; U = +16,5 kV. Generovaný proud 10 μA. Kapilára 20 μm i.d., délka 48,7/33,8 cm. Označení píků: 1 – SAC, 2 – GAL, 3 – GLC, 4 – FRC.

5.5.4 Výtěžnost

Pro měření výtěžnosti byl zvolen vzorek medu „Medokomerc“. Roztok tohoto medu byl fortifikován přidáním 20 mM roztoku GLC a FRC a 3 mM roztoku SAC k roztoku medu. Po zředění roztoku pro analýzu byly v pracovním roztoku tyto koncentrace 2 mM pro GLC a FRC a 0,3 mM pro SAC. Takto upravený roztok byl analyzován optimální metodou a pomocí Rovnice 5-3 byla vypočítána nalezená koncentrace přídatku. Výsledná hodnota byla dosazena do Rovnice 5-4 a byla tak vypočítána hodnota R (recovery, výtěžnost).

Výtěžnost by se měla pohybovat mezi 90 až 110 %.

$$c_{p\,nal} = c_F - c \quad \text{Rovnice 5-3}$$

$$R = \frac{c_{p\,nal}}{c_{p\,teor}} 100\% \quad \text{Rovnice 5-4}$$

$c_{p\,nal}$ označuje nalezenou hodnotu přídatku analyzované látky, c_F koncentraci analytu ve fortifikovaném vzorku, c je koncentrace analytu v nefortifikovaném roztoku medu, R označuje výtěžnost, $c_{p\,teor}$ značí teoretickou hodnotu přídatku.

Měření správnosti bylo provedeno třikrát (viz Tabulka 19). Průměrná hodnota výtěžnosti pro SAC se pohybuje na spodní hranici požadovaných hodnot pro validovanou metodu (tzn. výtěžnost mezi 90 až 110 %) a hodnota RSD je příliš vysoká, což potvrzuje nutnost další optimalizace metody pro spolehlivé stanovení SAC. U GLC a FRC bylo dosaženo prakticky ideálních hodnot okolo 100 %, ale stále s poměrně vysokou hodnotou RSD okolo 6 %.

Tabulka 19 Fortifikovaný med „Medokomerc“

Analýza	A	B	C	Průměr	SD	RSD [%]
R(SAC) [%]	83,33	89,79	103,77	92,30	10,45	11,32
R(GLC) [%]	104,67	103,16	93,68	100,50	5,96	5,93
R(FRC) [%]	93,16	104,81	103,18	100,38	6,31	6,28

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byl představen vývoj CE-C⁴D metody pro stanovení obsahu sacharidů v medu za použití chemometrické optimalizace.

Metoda vyvinutá za pomoci návrhu experimentu umožňuje poměrně rychlou separaci a stanovení základních sacharidů přítomných v medu. Během optimalizace byly sledovány faktory jako vnitřní průměr kapiláry, složení elektrolytu, separační napětí, teplota během separace nebo doba nástřiku.

Bylo prokázáno, že přítomnost hydrogenfosforečnanu sodného v roztoku základního elektrolytu vede ke zlepšení rozlišení a do jisté míry i citlivosti stanovení. Bylo také provedeno porovnání dvou systémů polarit během analýzy.

Přestože během analýzy v systému s reverzní polaritou (anodický EOF) byly odezvy srovnatelné se systémem normální polarit, z důvodu možnosti provádět analýzu bez předchozího pokrytí vnitřních stěn kapiláry CTAB a kratšího času separace byla pro analýzu zvolena separace v normálním uspořádání (katodický EOF).

Vliv vnitřního průměru separační kapiláry na celkovou dobu analýzy byl posouzen pouze teoreticky za využití softwaru CE Expert. Bylo vypočítáno, že použití kapiláry s 5 μm i.d. je velmi nevýhodné z hlediska doby potřebné k jejímu důkladnému promytí. Ze stejného důvodu byla z optimalizace vyloučena také kapilára s i.d. 10 μm .

Navržená metoda umožňuje separovat sacharidy přítomné v medu v čase kratším než 5 minut. Limit kvantifikace je dostatečný pro odhalení případného pančování medů, ale pro širší využití metody je zapotřebí dosáhnout citlivější detekce, a tím zlepšení limitu kvantifikace, a to především pro sacharózu. Pro další zvýšení citlivosti vyvinuté metody by bylo zapotřebí testovat přítomnost organických rozpouštědel v roztoku vzorku pro lepší zakoncentrování zóny vzorku, jako jsou např. acetonitril nebo ethanol. Tím by bylo umožněno kvantifikovat SAC i pod 5 g/100 g medu. Dále by bylo možné změnit rozsah metody k nižším koncentracím i pro GLC a FRC, a tím zvýšit R_s mezi kritickým párem GLC/GAL. Jak je totiž patrné z elektroferogramů vzorků (Obrázek 12, Obrázek 13 a Obrázek 14), R_s pro dvojici GALC/GLC nebylo až na základní linii, jak tomu bylo u standardů (viz Obrázek 7).

Metoda byla použita pro analýzu obsahu sacharidů ve třech vzorcích medu. Žádný z medů nebyl falšovaný přidávkem sacharózy a všechny vzorky také odpovídaly kritériím na celkový obsah sacharidů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. Žídková, J. Chmelík, Kapilární elektroforéza sacharidů, *Chem. List.* 94 (2001) 1093–1103. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2460>.
- [2] P. Tůma, K. Málková, E. Samcová, K. Štulík, Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Anal. Chim. Acta.* 698 (2011) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.055>.
- [3] V.M. Rizelio, L. Tenfen, R. Silveira, L.V. Gonzaga, A. Carolina, O. Costa, R. Fett, Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples, *Talanta.* 93 (2012) 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.034>.
- [4] A.Z. Carvalho, J.A.F. da Silva, C.L. do Lago, Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis.* 24 (2003) 2138–2143. <https://doi.org/10.1002/elps.200305408>.
- [5] Codex Alimentarius Commission, Codex Standard for Honey, *Codex Stan.* 12-1981. (2001) 1–8. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/>.
- [6] Vyhláška č. 76/2003 Sb., 2003. <https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=76&r=2003> (navštíveno 26. 2. 2020).
- [7] Český svaz včelařů, Norma jakosti č. ČSV 1/1999, Svazová Norma ČESKÝ MED. (2004) 3. <https://www.vcelarstvi.cz/dokumenty-cms/smernicemed.pdf> (navštíveno 27. 2. 2020).
- [8] V. Kašička, Theoretical Bases and Separation Principles of Capillary Electromigration Methods, *Chem. List.* 91 (1997) 326–329. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/issue/view/245>.
- [9] P. Coufal, Kapilární elektromigrační separační metody, (1996) 1–2. <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.pdf> (navštíveno 27. 2. 2020).
- [10] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*, Elsevier, 1992.
- [11] M.L. Marina, A. Ríos Castro, M. Valcárcel Cases, *Analysis and detection by capillary electrophoresis*, Elsevier, 2005.
- [12] D. Heiger, H.H. Lauer, G.P. Rozing, *High-performance capillary electrophoresis*, *Agil. Technol.* (2014).
- [13] K. Štulík, *Analytické separační metody*, Karolinium, 2004.
- [14] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, (2003) 132.

- [15] P. Camilleri, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Second Edition, CRC Press, 1997.
- [16] H. Sorensen, S. Sorensen, C. Bjerregaard, *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, GBR, 1999.
- [17] J. Tanyanyiwa, B. Galliker, M.A. Schwarz, P.C. Hauser, Improved capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis, *Analyst*. 127 (2002) 214–218. <https://doi.org/10.1039/b108884j>.
- [18] A.J. Zemmann, E. Schnell, D. Volgger, G.K. Bonn, Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 563–567. <https://doi.org/10.1021/ac9707592>.
- [19] J.A. Fracassi Da Silva, C.L. Do Lago, An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4339–4343. <https://doi.org/10.1021/ac980185g>.
- [20] K. Swinney, D.J. Bornhop, Detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 21 (2000) 1239–1250. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1239::AID-ELPS1239>3.0.CO;2-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1239::AID-ELPS1239>3.0.CO;2-6).
- [21] M. Pumera, Contactless conductivity detection for microfluidics: Designs and applications, *Talanta*. 74 (2007) 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.058>.
- [22] A.J. Zemmann, Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 24 (2003) 2125–2137. <https://doi.org/10.1002/elps.200305476>.
- [23] V. Unterholzner, M. Macka, P.R. Haddad, A. Zemmann, Simultaneous separation of inorganic anions and cations using capillary electrophoresis with a movable contactless conductivity detector, *Analyst*. 127 (2002) 715–718. <https://doi.org/10.1039/b202765h>.
- [24] M.A.L. Oliveira, C.L. Do Lago, M.F.M. Tavares, J.A. Fracassi Da Silva, Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Quim. Nova*. 26 (2003) 821–824. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000600007>.
- [25] J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, Capillary and microchip electrophoresis of basic drugs with contactless conductivity detection, *Electrophoresis*. 25 (2004) 3010–3016. <https://doi.org/10.1002/elps.200405989>.
- [26] M. Pumera, I. Jelínek, J. Jindřich, Determination of cyclodextrins and their derivatives by capillary electrophoresis with indirect UV and conductivity detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 369 (2001) 666–669. <https://doi.org/10.1007/s002160100721>.

- [27] J.A.F. da Silva, C.L. do Lago, Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector, *Electrophoresis*. 21 (2000) 1405–1408. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1405::AID-ELPS1405>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1405::AID-ELPS1405>3.0.CO;2-O).
- [28] V. Šolínová, V. Kašička, Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1743–1762. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600167>.
- [29] Agilent Technologies, *Understanding Your ChemStation*, 2004. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2070-91126_Understanding.pdf.
- [30] V. Vasić, S. Đurđić, T. Tosti, A. Radoičić, D. Lušić, D. Milojković-Opsenica, Ž. Tešić, J. Trifković, Two aspects of honeydew honey authenticity: Application of advance analytical methods and chemometrics, *Food Chem.* 305 (2020) 125457. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125457>.
- [31] P. Pattamayutanon, S. Angeli, P. Thakeow, J. Abrahan, T. Disayathanoowat, P. Chantawannakul, Volatile organic compounds of Thai honeys produced from several floral sources by different honey bee species, *PLoS One*. 12(2): e01 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172099>.
- [32] R. Ramirez, *Honey: geographical origins, bioactive properties and health benefits*, Nova Science Publishers, 2016.
- [33] P.M. Da Silva, C. Gauche, L.V. Gonzaga, A.C.O. Costa, R. Fett, Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chem.* 196 (2016) 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>.
- [34] Y. Lu, Y. Hu, T. Wang, X. Yang, Y. Zhao, Rapid determination and quantitation of compositional carbohydrates to identify honey by capillary zone electrophoresis, *CYTA - J. Food.* 15 (2017) 531–537. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1308970>.
- [35] M. Černý, T. Trnka, M. Buděšínský, *Sacharidy*, Edice Chemické listy, Česká společnost chemická, 2010.
- [36] I. Hermosín, R.M. Chicón, M.D. Cabezudo, Free amino acid composition and botanical origin of honey, *Food Chem.* 83 (2003) 263–268. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00089-X).
- [37] D. Somerville, B. Winner, E. Frost, *Honey: Harvesting and extracting*, NSW Agriculture, 2017.
- [38] I. Mato, J.F. Huidobro, J. Simal-Lozano, M.T. Sancho, Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1541–1550. <https://doi.org/10.1021/jf051757i>.

- [39] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
- [40] G. Beretta, M. Orioli, R.M. Facino, P. Granata, M. Ferrero, Article in *Analytica Chimica Acta · March*, *Anal. Chim. Acta.* 533 (2005) 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>.
- [41] F.A. Tomás-Barberán, I. Martos, F. Ferreres, B.S. Radovic, E. Anklam, HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 485–496. <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>.
- [42] K. Pyrzynska, M. Biesaga, Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015>.
- [43] S. Wang, Q. Guo, L. Wang, L. Lin, H. Shi, H. Cao, B. Cao, Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography, *Food Chem.* 172 (2015) 669–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.044>.
- [44] M.L. Sanz, J. Sanz, I. Martínez-Castro, Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey, *J. Chromatogr. A.* 1059 (2004) 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.095>.
- [45] A. Pascual-Maté, S.M. Osés, M.A. Fernández-Muiño, M.T. Sancho, Methods of analysis of honey, *J. Apic. Res.* 57 (2018) 38–74. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411178>.
- [46] V. Kaškonienė, P.R. Venskutonis, V. Čeksteryte, Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania, *LWT - Food Sci. Technol.* 43 (2010) 801–807. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.007>.
- [47] X. Xu, W.T. Kok, H. Poppe, Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions, *J. Chromatogr. A.* 716 (1995) 231–240. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00552-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00552-X).
- [48] C.R. Noe, J. Freissmuth, Capillary zone electrophoresis of aldose enantiomers: separation after derivatization with S-(-)-1-phenylethylamine, *J. Chromatogr. A.* 704 (1995) 503–512. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00237-H](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00237-H).
- [49] A.E. Vorndran, E. Grill, C. Huber, P.J. Oefner, G.K. Bonn, Capillary zone electrophoresis of aldoses, ketoses and uronic acids derivatized with ethyl p-aminobenzoate, *Chromatographia.* 34 (1992) 109–114. <https://doi.org/10.1007/BF02276121>.
- [50] Q. Chu, L. Fu, Y. Guan, J. Ye, Fast determination of sugars in Coke and Diet Coke by miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 234–238. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400015>.

- [51] C. Campa, A. Coslovi, A. Flamigni, M. Rossi, Overview on advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates: A tabulated review, *Electrophoresis*. 27 (2006) 2027–2050. <https://doi.org/10.1002/elps.200500960>.
- [52] J.L. Goupy, *Methods for experimental design: principles and applications for physicists and chemists*, Elsevier, 1993.
- [53] L. Eriksson, E. Johansson, N.K.- Wold, C. Wikstrom, S. Wold, Design of Experiments, Principles and Applications, *J. Chemom.* 15 (2001).
- [54] S. Orlandini, R. Gotti, S. Furlanetto, Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 290–307. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.014>.
- [55] G.J. Park, *Analytic methods for design practice*, Springer London, 2007. <https://doi.org/10.1007/978-1-84628-473-1>.
- [56] Z. Lachnit, *Návrh experimentu*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. <https://dspace.vutbr.cz/handle/11012/18448> (navštíveno 23. 3. 2020).
- [57] E. Klimešová, *Využití metody plánování experimentů (DOE) k optimalizaci analytické metody ve vodohospodářské laboratoři*, Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství, 2011. <https://theses.cz/id/h3wwgk/> (navštíveno 24. 3. 2020).
- [58] NIST/SEMATECH, *e-Handbook of Statistical Methods*, 2013. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri521.htm>.
- [59] P. Jáč, *Analýza biologicky aktivních látek s využitím kapilárních elektromigračních metod*, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008. <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/62386/> (navštíveno 25. 3. 2020).
- [60] S. Terabe, T. Yashima, N. Tanaka, M. Araki, Separation of Oxygen Isotopic Benzoic Acids by Capillary Zone Electrophoresis Based on Isotope Effects on the Dissociation of the Carboxyl Group, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1673–1677. <https://doi.org/10.1021/ac00168a009>.
- [61] The United States Pharmacopoeial Convention, *The United States Pharmacopoeia*, Rockville, 2008. http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c727.html (navštíveno 5. 5. 2020).
- [62] V. Veselý, *Včelařství*, Brázda, 2003.