

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRFIE**

–

**TESTOVÁNÍ A SROVNÁNÍ MODERNÍCH  
CHROMATOGRFICKÝCH KOLON PRO RYCHLÉ A EFEKTIVNÍ  
SEPARACE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Lucie Dědková

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

*Za odborné vedení, nápady a připomínky k mé práci děkuji PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D., Doc. RNDr Daliboru Šatínskému, Ph.D. a dalším pracovníkům katedry Analytické chemie.*

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Lucie Dědková

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Název diplomové práce: Sekvenční injekční analýza chromatografie - testování moderních chromatografických kolon pro rychlé a efektivní separace

Následující diplomová práce se zabývala optimalizací metody separace tří červených azobarviv (Karmoisin, Ponceau 4R, Red 2G) za použití systému Sekvenční injekční chromatografie. Při dané metodě se používala detekce pomocí VIS detektoru při vlnových délkách 380, 480, 500 a 600 nm. Byla testována kolona Chromolith<sup>®</sup> SpeedROD CN 50x4.6mm. Nejprve byla provedena separace s využitím mobilní fáze o složení: kyselina fosforečná a hydroxid amonný o pH 6 v různých koncentracích. Bohužel žádná koncentrace neumožnila separovat všechna barviva najednou – barvivo Karmoisin bylo eluováno s vysokým retenčním časem a s rozmytým píkem. Proto byl pokus obměněn a byla použita gradientová separace. Byly využity dvě mobilní fáze s koncentracemi 0,06 % a 0,01 %. Tato metoda umožnila separovat všechna barviva v optimálním čase a kvalitě. Byla provedena kalibrace a změřena opakovatelnost a výtěžnost. Jako testovací vzorek byl použit nápojový koncentrát Malina light a Albert sirup černý rybíz.

## ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Analytical chemistry

Candidate: Lucie Dědková

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Title of diploma thesis: Sequential injection chromatography - testing of modern chromatographic columns for fast and effective separations

Following diploma theses is focused on method of optimized separation of three red azo-colorants (Carmoisine, Ponceau 4R, Red 2G) using Sequential injection chromatography system. During this method the spectrophotometric detection in VIS range was used with wavelengths of 380, 480, 500 and 600 nm. Column Chromolith<sup>®</sup> SpeedROD CN 50x4.6 was tested. First the separation with mixture of phosphoric acid and ammonium hydroxide pH 6 as a mobile phase was used. Unfortunately none of used concentration of mobile phase didn't separate all colorants. Carmoisine was eluted quite late. Therefore experiment was changed into gradient separation. Different concentrations of phosphoric acid and ammonium hydroxide based mobile phases were used. First mobile phase had concentration 0.06 % and second one had 0.01 %. This method enabled to separate all colorants in optimum time and quality. Calibration, reproducibility and yield were measured. As sample for comparison two syrups Malina light and Albert sirup černý rybíz were used.

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Použité zkratky .....	8
Seznam obrázků .....	9
Seznam tabulek .....	10
1. Úvod .....	12
2. Cíl práce .....	13
3. Teoretická část.....	14
3.1. Představení průtokových systémů .....	14
3.1.1. Historie průtokových systémů .....	14
3.1.2. Principy .....	15
3.2. Chromatografie .....	19
3.2.1. Separace adsorpcí.....	19
3.2.2. Chromatogram a jeho charakteristiky .....	20
3.2.3. Kolona.....	20
3.2.4. Detekce .....	21
3.2.5. Kapalinová chromatografie (LC) .....	21
3.3 Analyzované látky .....	22
4. Experimentální část .....	25
4.1. Použité přístroje a pomůcky .....	25
4.2. Použité chemikálie.....	25
4.3. Použité vzorky .....	26
4.3.1. Sirup Malina light, 1000 ml .....	26
4.3.2. Sirup Albert Quality, černý rybíz, 700 ml .....	27
4.4. Použité roztoky .....	28
4.4.1. Mobilní fáze .....	28
4.4.2. Roztoky standardů .....	28
4.5. Parametry měření.....	29
4.5.1. Přístroj.....	29
4.5.2. Program.....	29
4.5.3. Podmínky chromatografie.....	31

4.6. Parametry hodnocení metody .....	31
4.6.1. Limit detekce (Limit of detection) a limit kvantifikace (Limit of quantification)..	31
4.6.2. Přesnost – Opakovatelnost <sup>[25]</sup> .....	32
4.6.3. Správnost (Accuracy) <sup>[25]</sup> .....	33
4.6.4. Kalibrace (Calibration) <sup>[25]</sup> .....	33
4.6.5. Stanovení vzorků .....	33
4.7. Vývoj metody .....	33
4.7.1. Pokus s fosforečnanem amonným – izokratická separace .....	34
4.7.2. Pokus s octanem amonným – izokratická separace .....	34
4.7.3. Pokus s kyselinou octovou – izokratická separace .....	35
4.7.4. Pokus s fosforečnanem amonným – gradientová separace .....	36
4.7.5. Pokus s kyselinou fosforečnou – izokratická separace .....	42
4.7.6. Pokus s mravenčanem amonným – gradientová separace .....	42
4.8. Výsledky .....	46
4.9. Stanovení vzorků .....	47
4.9.1. Stanovení sirupu Malina light .....	47
4.9.2. Stanovení sirupu Albert černý rybíz .....	50
5. Diskuse .....	51
6. Závěr.....	52
Seznam použité literatury .....	53

## **Použité zkratky**

FIA – Flow injection analysis (Průtoková injekční analýza)

PO4R – Ponceau 4R

CARM – Karmoisin

EPA – United States Environmental Protection Agency

SIA – Sequential injection analysis (Sekvenční injekční analýza)

LC – Liquid chromatography (Kapalinová chromatografie)

SIC – Sequential injection chromatography (Sekvenční injekční chromatografie)

MF – mobilní fáze

LOQ – Limit of quantification (Limit kvantifikace)



## Seznam obrázků

Obrázek 1. Rozdělení podle principů detekce ve FIA <sup>[2]</sup> .....	15
Obrázek 2. Charakteristiky píku: S – Čas vstříknutí vzorku; H – výška píku; W – šířka píku; A – plocha píku; T – retenční čas; $t_b$ – šířka píku na základně <sup>[2]</sup> .....	16
Obrázek 3. Porovnání přístroje FIA a SIA <sup>[3]</sup> .....	17
Obrázek 4. Programovatelný proud – vzorek (A – červený) a činidlo (B – modrý) jsou sekvenčně nastříknuté do proudu. Mísením a reakcí vzniká produkt (C – žlutý) <sup>[6]</sup> .....	17
Obrázek 5. Schéma sekvenční injekční chromatografie <sup>[6]</sup> .....	18
Obrázek 6. Chemické složení kyano kolony <sup>[14]</sup> .....	20
Obrázek 7. Struktura monolitické kolony <sup>[6]</sup> .....	21
Obrázek 8. Schéma diazotace a kopulace <sup>[13]</sup> .....	22
Obrázek 9. Vzorec Ponceau 4R <sup>[16]</sup> .....	23
Obrázek 10. Vzorec Karmoisinu <sup>[21]</sup> .....	23
Obrázek 11. Vzorec Red 2G <sup>[23]</sup> .....	24
Obrázek 12. Sirup malina light .....	26
Obrázek 13. Sirup Albert Quality černý rybíz .....	27
Obrázek 14. Chromatograf kombinace mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného. ....	36
Obrázek 15. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného ..	38
Obrázek 16. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program.....	41
Obrázek 17. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,6% a 0,1% mravenčanu amonného.....	45
Obrázek 18. Chromatograf, testování finálních podmínek – směs standardů.....	46
Obrázek 19. Chromatogram Malina light a Red 2G .....	47

## Seznam tabulek

Tabulka 1. Program pro promývání kolony .....	29
Tabulka 2. Program pro promytí systému vzorkem .....	30
Tabulka 3. Program pro izokratickou separaci .....	30
Tabulka 4. Finální program pro gradientovou separaci .....	30
Tabulka 5. Proměňování retenčních časů standardů s využitím fosforečnanu amonného jako MF .....	34
Tabulka 6. Proměňování retenčních časů standardů s využitím octanu amonného jako MF ...	35
Tabulka 7. Proměňování retenčních časů standardů s využitím kyseliny octové jako MF .....	35
Tabulka 8. Proměňování retenčních časů standardů při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF .....	36
Tabulka 9. Obměněný program pro gradientovou separaci .....	37
Tabulka 10. Kalibrace s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného .....	38
Tabulka 11. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného .....	39
Tabulka 12. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného .....	39
Tabulka 13. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného .....	39
Tabulka 14. Obměněný program pro gradientovou separaci .....	40
Tabulka 15. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program.....	40
Tabulka 16. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program .....	41
Tabulka 17. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program .....	42
Tabulka 18. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program.....	42
Tabulka 19. Proměňování retenčních časů standardů při gradientové eluci s využitím mravenčanu amonného jako MF .....	43
Tabulka 20. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného .....	43
Tabulka 21. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného.....	43
Tabulka 22. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného .....	44
Tabulka 23. Kalibrace s využitím kombinací mobilních fází 0,06% a 0,01% mravenčanu amonného .....	44
Tabulka 24. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,06% a 0,01% mravenčanu amonného .....	45

Tabulka 25. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného.....	46
Tabulka 26. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného .....	46
Tabulka 27. Proměrování retenčních časů vzorku Malina light při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF .....	47
Tabulka 28. Proměrování retenčních časů standardu Red 2G při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF .....	48
Tabulka 29. Proměrování retenčních časů standardů Red 2G a Karmoisin při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF .....	48
Tabulka 30. Opakovatelnost roztoku vzorku Malina light a standardu Red 2G .....	49
Tabulka 31. Koncentrace Karmoisinu ve vzorku .....	49
Tabulka 32. Poměr píků vzorku Malina light a standardu Red 2G se známým přídatkem Karmoisinu .....	50

## 1. Úvod

Potřeba chemických analýz a analytických technik celkově se stále zvyšuje. Se vzrůstající poptávkou a nároky na kvalitu výsledků je nutné neustále vyvíjet, inovovat a optimalizovat analytické metody. Vývojem optimalizací analytické metody se věnuje i tato práce.

Metoda sekvenční injekční chromatografie použitá v této práci je jedna z progresivních metod analytické separace. Vznikla kombinací sekvenční injekční analýzy a kapalinové chromatografie. Umožňuje zjistit kvalitativní i kvantitativní vlastnosti analyzovaných látek.

V této práci byla metoda Sekvenční injekční chromatografie využita k separaci červených azobarviv, která jsou v České republice využívána především v potravinářství, ale i v dalších oblastech průmyslu. Konkrétně byla vyvíjena optimální metoda pro separaci barviva Ponceau 4R, Red 2G a Karmoisin.

## **2. Cíl práce**

Cílem této diplomové práce je vyvinout a optimalizovat metodu pro separaci 3 červených azobarviv – Karmoisinu, Ponceau 4R a Red 2G v systému sekvenční injekční chromatografie. Je potřeba najít mobilní fázi nebo kombinaci mobilních fází, které umožní kompletně separovat daná barviva v krátkém elučním čase. Cílem je metodu ověřit na analýze reálného vzorku.

### 3. Teoretická část

#### 3. 1. Představení průtokových systémů

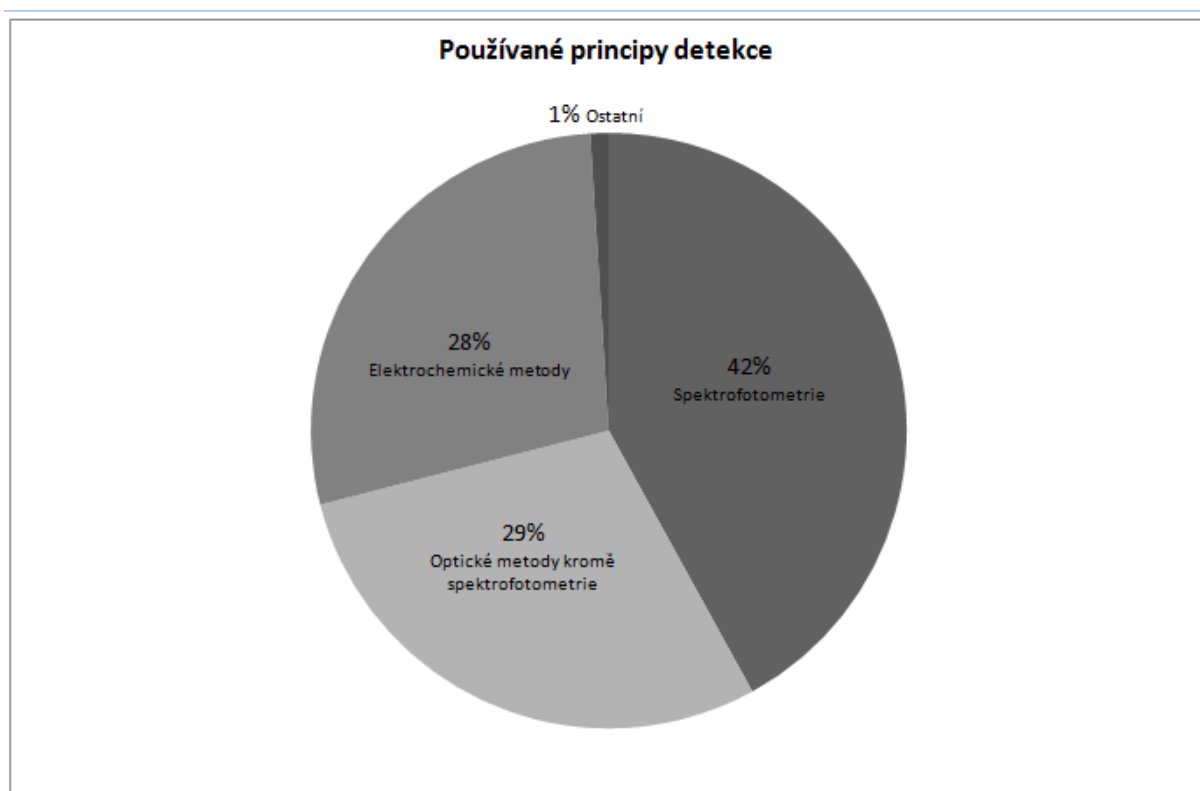
Průtokové systémy jsou systémy, ve kterých přímo měříme analyzovanou kapalinu vhodným detektorem. Výhodou těchto systémů je, že jsou velmi rychlé, miniaturizované, automatizované a je odstraněna chyba nepřesným odměřováním objemů<sup>[1]</sup>.

Jsou univerzální, protože umožňují, aby byl proud promícháván, zastaven, znovu uveden do pohybu, umožňují pohyb proudu nazpátek, rozdělení a to vše ve velmi přesně monitorovaných časech. Průtokové systémy umožňují použití většiny běžných analytických detektorů<sup>[2]</sup>.

##### 3.1.1. Historie průtokových systémů

Poprvé byla FIA (Průtoková injekční analýza) popsána v září roku 1974 v článku „Flow Injection Analysis. Part 1. A new Concept of Fast Continuous Flow Analysis“, který se objevil v Analytica Chimica Acta na jaře 1975. Autorem článku byl J. Růžička a E. H. Hansen<sup>[2]</sup>.

Koncept FIA byl velmi rychle přijat a do 5 let bylo publikováno více než 1400 prací. Toto rychlé přijetí metody je nepochybně z důvodu vysoké univerzálnosti, která umožňuje spojení s velkým množstvím detektorů a analytických technik pro stanovení množství organických i anorganických látek. Při bližším pohledu zjišťujeme, že využívání optických metod, hlavně spektrometrie, dominuje<sup>[2]</sup>.



Obrázek 1. Rozdělení podle principů detekce ve FIA <sup>[2]</sup>.

Od první publikace rozsah FIA vzrostl a stala se z ní důležitá a nezávislá disciplína analytické chemie, která se dále rozvíjela a zdokonalovala. Důležitým mezníkem v konceptu průtokových systémů bylo vyvinutí metody SIA (Sekvenční injekční analýza), která byla poprvé publikována v roce 1990 v *Analytica Chimica Acta* J. Růžičkou a G. D. Marshall<sup>[3]</sup>.

Průtokové metody se stále vyvíjejí a zdokonalují. Objevují se kombinace průtokových metod s dalšími metodami. Příkladem je SIC metoda (Sekvenční injekční chromatografie), která je kombinací Kapalinové chromatografie (LC) a Sekvenční injekční analýzy (SIA). Metoda SIC je použita v této diplomové práci<sup>[4]</sup>.

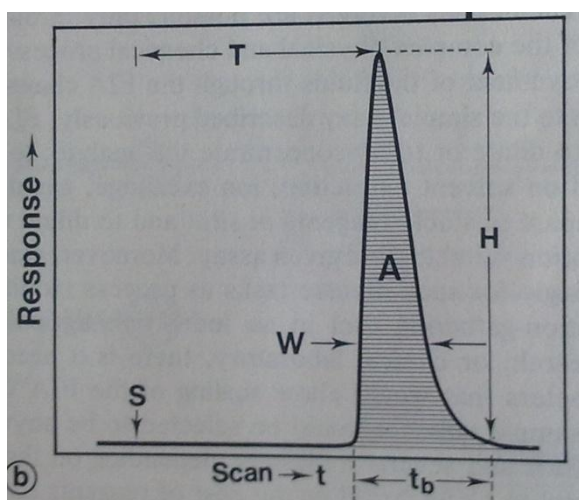
### 3.1.2. Principy

Průtokové injekční analýzy (FIA) jsou založené na vstříknutí kapalného vzorku do pohybujícího se, nerozděleného proudu vhodné kapaliny. Proud nosné kapaliny je čerpán peristaltickým čerpadlem konstantní rychlostí. Vstříknutý vzorek tvoří zónu, která je transportována směrem k detektoru. Ten průběžně měří absorbanci, elektrodový potenciál

nebo další parametry, které se kontinuálně mění díky protékání vzorku měřicí celou. Signál z detektoru je veden do zapisovače nebo je zpracováván počítačem<sup>[2]</sup>.

Nejjednodušší FIA systém sestává z pumpy pohánějící proud skrz úzkou trubičku, vstřikovacího ventilu, přes který je vstřikován definovaný objem vzorku do proudu a mikroreaktoru (mísící cívky), kde je vzorek dispergován a reaguje s komponenty pohyblivého proudu. Proud dále prochází průtokovou celou detektoru<sup>[2]</sup>.

Typický výstup FIA analýzy má formu píků. Pík je charakterizován výškou  $H$ , šířkou  $W$  a plochou  $A$ , které souvisí s koncentrací analytu. Čas mezi nástřikem vzorku a píkem je čas, během kterého probíhá chemická reakce<sup>[2]</sup>.



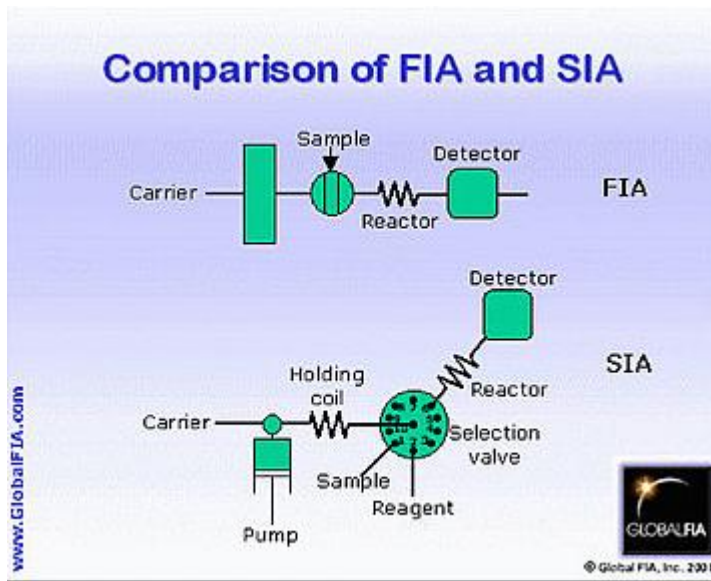
Obrázek 2. Charakteristiky píku:  $S$  – Čas vstříknutí vzorku;  $H$  – výška píku;  $W$  – šířka píku;  $A$  – plocha píku;  $T$  – retenční čas;  $t_b$  – šířka píku na základně<sup>[2]</sup>.

FIA je založená na kombinaci tří principů: vstříknutí vzorku, kontrolované disperze vzorku a reprodukovatelného načasování pohybů vzorku směrem k detektoru. Oproti ostatním metodám instrumentální analýzy dochází k chemické reakci, zatímco je vzorek dispergován v činidle a tím je vytvářen koncentrační gradient<sup>[2]</sup>.

Oproti systému FIA, systém SIA je o něco složitější. Klasická peristaltická pumpa je nahrazena dvojsměrnou injekční pumpou, umožňující tok nosného proudu oběma směry. V systému je navíc mísící cívka, která umožňuje homogenní a dobře opakovatelné promíchávání. Dále systém obsahuje vícecestný ventil schopný nasátí reagentů, jejich

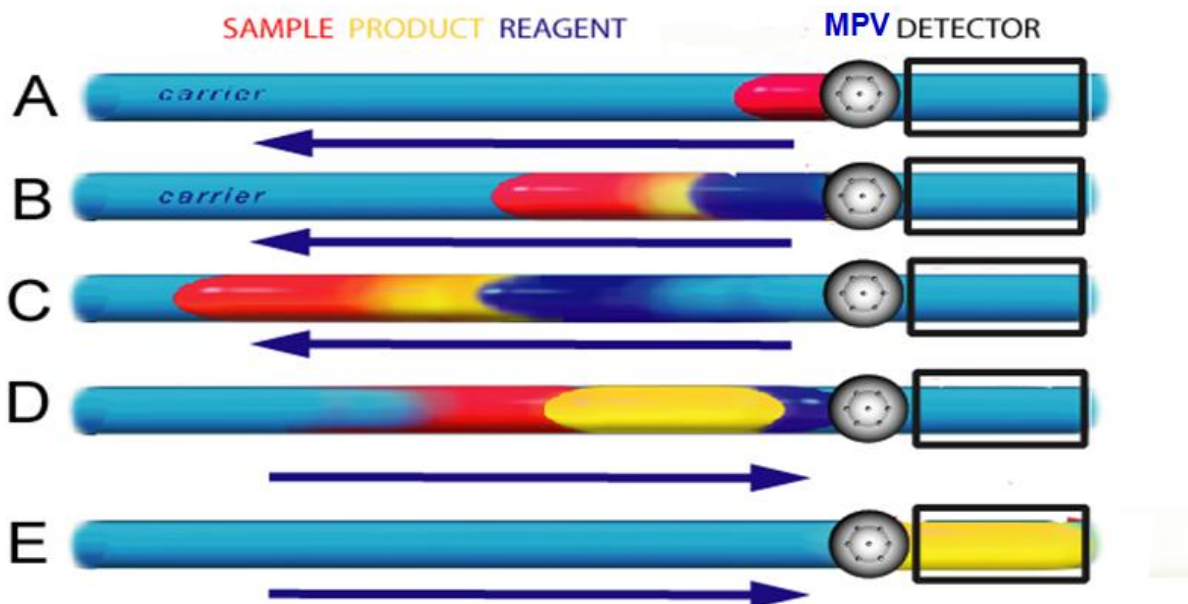


promíchávání, detekování a odtékání do odpadu. Tím je dosaženo lepší promíchání vzorku<sup>[4;5;6]</sup>.



Obrázek 3. Porovnání přístroje FIA a SIA <sup>[3]</sup>

## Analyzing by Programmable Flow



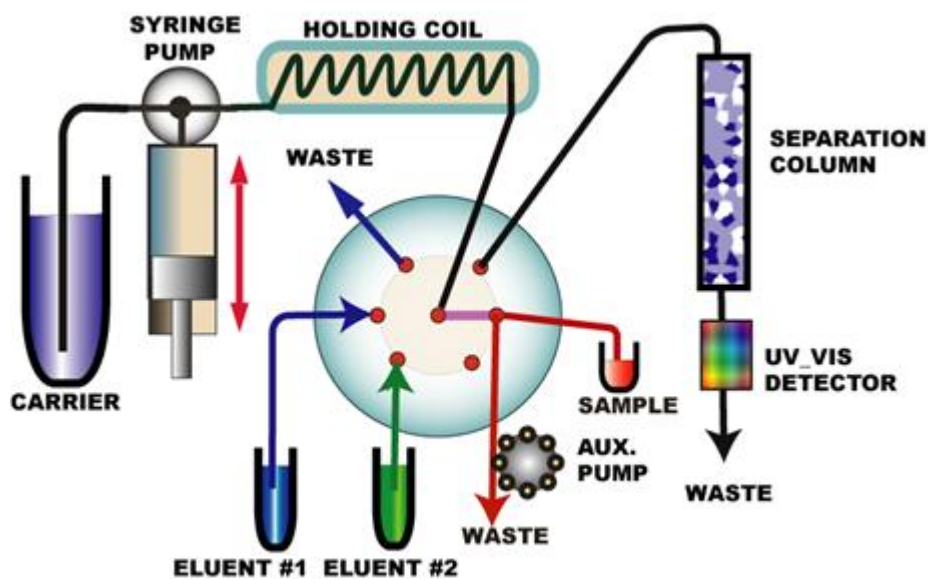
Obrázek 4. Programovatelný proud – vzorek (A – červený) a činidlo (B – modrý) jsou sekvenčně nastříknuté do proudu. Mísením a reakcí vzniká produkt (C – žlutý)<sup>[6]</sup>.

Hlavní výhodou SIA je všestrannost systému založená na programovatelném proudu – ředění, míchání i reakční čas jsou modifikovány a kontrolovány softwarem počítače.

V poslední řadě je potřeba zmínit systém Sekvenční injekční chromatografie. Jak již bylo uvedeno výše, jedná se o kombinaci Kapalinové chromatografie (LC) a Sekvenční injekční analýzy (SIA). Využívá separační výhody Kapalinové chromatografie a všestrannost a jednoduchost ovládání Sekvenční injekční analýzy.

Metoda SIC je založena na programovatelném proudu mobilní fáze, který dovoluje vstříknutí vhodného objemu vzorku a formování elučního gradientu. Výsledkem je zjednodušená přístrojová náročnost a snížení spotřeby chemikálií.

Sekvenční injekční chromatografie je v principu stejná jako Sekvenční injekční analýza. Rozdíl je v tom, že v SIC je vzorek chromatograficky separován na monolitické koloně před tím, než je detekován<sup>[6]</sup>.



Obrázek 5. Schéma sekvenční injekční chromatografie <sup>[6]</sup>

## 3.2. Chromatografie

Chromatografie je analytická metoda k separování komponent roztoků na základě opakovaného ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi – pohyblivou fází, zvanou mobilní (kapalnou nebo plynou) a nepohyblivou, stacionární fází (pevnou nebo kapalnou). Jednotlivé složky se rozdělují na základě interakce s některou z fází. Stacionární fáze zadržuje analyzovanou látku v závislosti na adsorpci (tato metoda je využita v této práci), rozpustnosti, afinitě nebo velikosti molekul. Mobilní fáze unáší nezadržené látky. Chromatografie umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu<sup>[7]</sup>.

Metoda chromatografie byla vyvinuta na začátku 20. století ruským botanikem Mikhailem S. Tswettem, který se soustředil na separování sloučenin listových barviv<sup>[8]</sup>.

### 3.2.1. Separace adsorpcí

Separční mechanismus závisí na rozdílné polaritě mezi jednotlivými komponenty vzorku. Čím polárnější molekula je, tím silněji je adsorbována polární stacionární fází a naopak nepolární látky jsou silně adsorbovány k nepolární stacionární fází.

Během separačního procesu dochází k soutěžení o vazebná místa polární fáze mezi separovanými materiály a mobilní fází. Molekuly s nižší polaritou jsou zachyceny na polární stacionární fází mnohem kratší čas než molekuly polárnější. Z toho vyplývá, že směs analytu je eluována v pořadí podle zvyšující se polarity.

Výběr stacionární fáze závisí na polaritě separovaných vzorků. Pokud by vzorky byly adsorbovány příliš silně, bylo by obtížné je odstranit z polární fáze. Naopak slabě polární látky by měly být separovány na vysoce aktivních absorbentech, jinak by nemusely být vůbec odděleny od mobilní fáze.

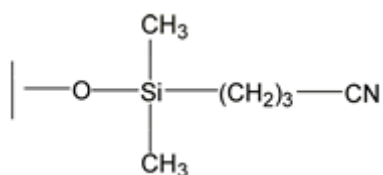
Výběr mobilní fáze je stejně důležitý jako výběr stacionární fáze. Polarita mobilní fáze by měla být vybrána tak, aby doplňovala stacionární fází<sup>[9]</sup>.

### 3.2.2. Chromatogram a jeho charakteristiky

Chromatogram je viditelný výstup chromatografie v grafické podobě, v podstatě se jedná o odezvu detektoru v čase. Je to křivka, která tvoří píky. Píky jsou úměrné koncentraci eluované látky. Každý pik je charakterizován plochou a časem, ve kterém byl eluován z kolony. Je důležité, aby píky byly od sebe oddělené na základní linii. Z chromatogramu můžeme určit charakteristiky jako retenční čas a objem, hmotnostní distribuční poměr, distribuční koeficient, faktor symetrie, účinnost kolony, poměr signálu k šumu a další<sup>[10;11]</sup>.

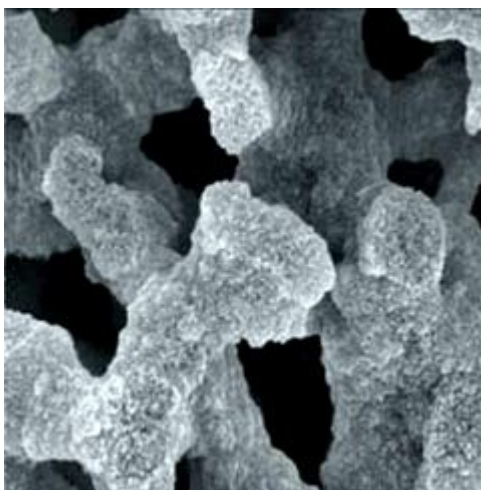
### 3.2.3. Kolona

Kolona je trubička, která obsahuje vhodné částice stacionární fáze, které zadržují procházející vzorek podle afinity a tím ho rozdělují na jednotlivé části<sup>[8]</sup>. Kolony musí být chemicky a mechanicky stabilní. Pro normální chromatografii je stacionární fáze polární, při reverzní chromatografii je použita kolona s nepolární stacionární fází<sup>[12]</sup>. V této diplomové práci byla využita kyano kolona. Využívá princip polární stacionární fáze, ale není tolik polární jako silikagelové kolony. Umožňuje efektivní separace a šetří množství použitých činidel, protože zadržuje slaběji než C18 kolony<sup>[14]</sup>.



Obrázek 6. Chemické složení kyano kolony<sup>[14]</sup>

Kolony pro kapalinovou chromatografii jsou tvořeny sférickými částicemi silikagelu a pro protlačení vzorku je potřeba vyšších tlaků. V této diplomové práci byla použita monolitická kolona, která je tvořena jedním kusem monolitního porézního materiálu. Má větší póry a díky nim je odpor kolony velmi malý a nevzniká vysoký zpětný tlak. Oproti klasickým kolonám mají také delší životnost a lepší reprodukovatelnost<sup>[6;12]</sup>.



Obrázek 7. Struktura monolitické kolony <sup>[6]</sup>

#### 3.2.4. Detekce

Detekce probíhá pomocí detektoru hned po výstupu z kolony. Detektor obsahuje průtokovou celu, která detekuje každou sloučeninu odlišnou od mobilní fáze. Vhodný detektor odhalí každou sloučeninu a vyšle odpovídající elektrický signál do počítače. Výběr detektoru probíhá na základě charakteristik pokusu a koncentrací analyzovaných látek. Detektory mohou být spektrofotometrické, elektrochemické, hmotnostní a další<sup>[8]</sup>.

#### 3.2.5. Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní kapalnou a stacionární. Kapalinovou chromatografií můžeme rozdělit na planární techniky (chromatografie na tenké vrstvě – TLC; papírová chromatografie – PC) a kolonové. Vzhledem k povaze diplomové práce se budu zabývat pouze kolonovými technikami – jsou totiž nejpoužívanější a mají velký rozsah použitelnosti<sup>[8;11]</sup>.

Přístroj pro kapalinovou chromatografii se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na zpracovávání dat<sup>[11]</sup>.

Vzorek se musí nejprve rozpustit ve vhodném médiu a potom transportovat (obvykle konstantní rychlostí) do kolony. Kolona obsahuje vhodné částice tvořící stacionární fázi.

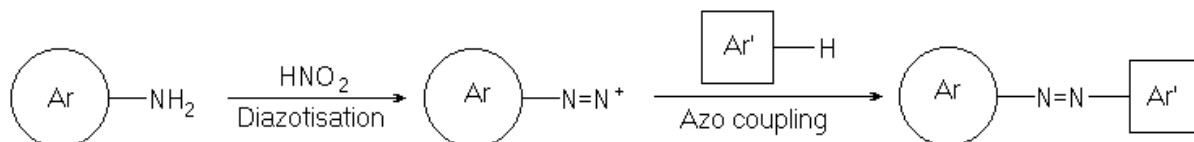
Rozpouštědlo, mobilní fáze, prochází skrz kolonu. Při protékání kolonou je vzorek zachycen v koloně v závislosti na adsorpci, rozpustnosti, afinitě nebo velikosti molekul<sup>[8]</sup>.

### 3.3 Analyzované látky

V diplomové práci byla analyzována 3 červená azobarviva – Ponceau 4R, Karmoisin a Red 2G.

Azobarviva jsou syntetické sloučeniny obsahující azo skupinu,  $-N=N-$ , ve své struktuře. Většina barviv má pouze jednu skupinu, ale existují i látky s více skupinami. V této práci byly použity pouze látky s jednou azo skupinou.

Azobarviva se používají převážně v textilním a potravinářském průmyslu a mohou mít všechny barvy, ale žlutá a červená převažují. Vyrábějí se diazotací a následnou kopulací.

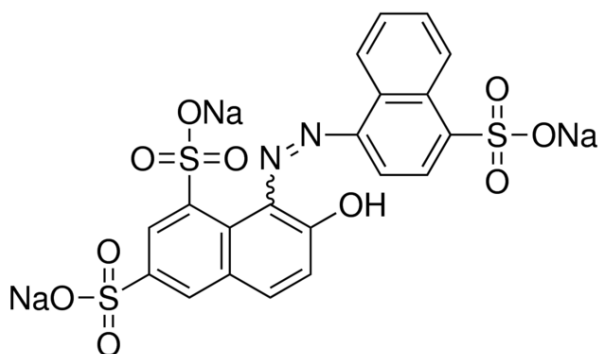


Obrázek 8. Schéma diazotace a kopulace<sup>[13]</sup>

Azobarviva jsou rozpustná ve vodě a neakumulují se v lidském těle. Jsou metabolizována játry pomocí azoreduktázy a vylučována močí. K dosažení letální dávky by průměrný člověk musel zkonzumovat přes 100 kg azobarviva v potravě každý den. Nicméně některá tato barviva byla zakázána kvůli vedlejším účinkům, jako je mutagenita a karcinogenita. U některých látek je podezření, že způsobují hyperaktivitu u dětí<sup>[15]</sup>.

Azobarviva můžeme stanovit několika metodami. Kromě metody uvedené v této práci také pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo iontově interakční chromatografie.

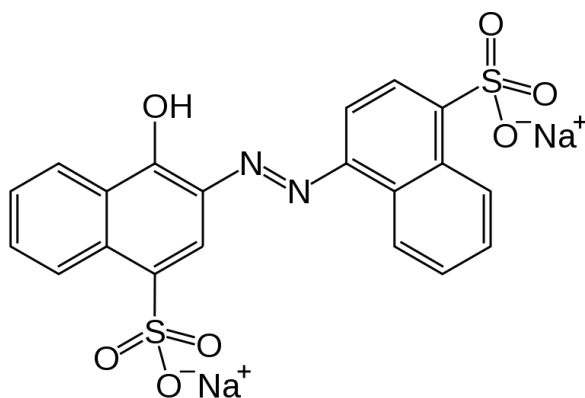
### Ponceau 4R (Košenilová červeň A, E124)



Obrázek 9. Vzorec Ponceau 4R <sup>[16]</sup>

Červené potravinářské barvivo, které je díky svému podezření z karcinogenity zakázané v USA a ve Velké Británii. V České republice je stále používáno. Můžeme ho najít v kečucech, cukrovinkách, marmeládách, zmrzlinách, kompotovaném ovoci a dalších produktech<sup>[17;18]</sup>. Barvivo Ponceau 4R můžeme detekovat také pomocí elektrochemických senzorů z hliníkových mikrovláken<sup>[19]</sup> nebo imunologickou metodou Western blotting<sup>[20]</sup>.

### Karmoisin (Azorubin, E122)

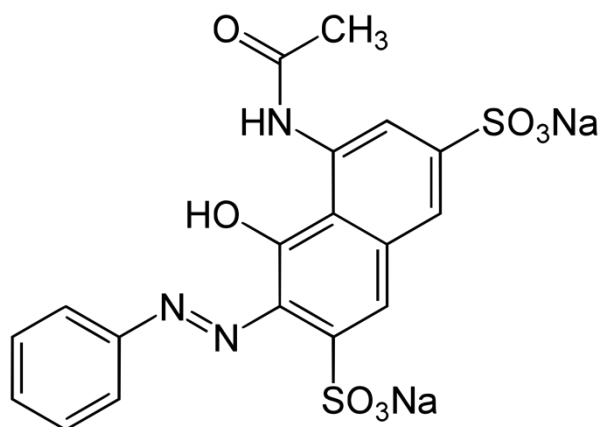


Obrázek 10. Vzorec Karmoisinu <sup>[21]</sup>

Je to jedno z nejčastěji používaných červených barviv v potravinářství. Od roku 2008 v zemích EU je pro produkty s karmoisinem povinnost mít na štítku varování, že tento výrobek může způsobit hyperaktivitu u dětí. Kromě hyperaktivity může způsobit alergické reakce na kůži a je karcinogenní. Najdeme ho v instantních polévkách, jogurtech, marmeládách, marcipánu, cukrovinkách, zmrzlině a dalších.<sup>[17;18]</sup>

Jak již bylo uvedeno dříve, barviva Ponceau a Karmoisin jsou stále využívána v potravinářském průmyslu. Jsou uvedeny v tabulce 1. v Seznamu barviv povolených při výrobě potravin ve Vyhlášce č. 4/2008 Sb., která stanovuje druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. V této vyhlášce v tabulce 5. v Seznamu potravin nebo skupin potravin, při jejichž výrobě lze použít uvedená barviva je uvedeno povolené množství barviv v ochucených nealkoholických nápojích a koncentrátech pro jejich přípravu, které je 100 mg/kg<sup>[22]</sup>.

#### Red 2G (Azogeranin, E128)



Obrázek 11. Vzorec Red 2G<sup>[23]</sup>

Red 2G je syntetické červené barvivo, které se vyskytuje hlavně ve formě disodné soli. Dříve se používal v potravinářském průmyslu. Bylo povolené pouze pro barvení mastných výrobků s minimálním obsahem obilné složky 6% a pro barvení masa do hamburgerů s minimálním obsahem obilné složky 4%. Po prokázání jeho zdravotních rizik bylo toto barvivo v Evropské unii zakázáno úplně a to nařízením EU platným od 28. 7. 2007<sup>[23;24]</sup>.

Zdravotní rizika tohoto barviva jsou hyperaktivita u dětí a karcinogenita. Barvivo se ve střevech metabolizuje na toxický anilin, který interferuje s krevním hemoglobinem<sup>[23]</sup>.



## **4. Experimentální část**

### **4.1. Použité přístroje a pomůcky**

Kolona: Chromolith<sup>®</sup> SpeedROD CN 50x4.6 (Merck, Germany)

Přístroj: Systém SICrom<sup>™</sup> (FIALab<sup>®</sup>, Bellevue, WA, USA)

Osmicestný selekční ventil z nerezové oceli (VICI<sup>®</sup> Valco Instruments, TX, USA)

Pumpa S17 (Sapphire<sup>™</sup> Engineering, MA, USA)

Lampa HL-2000 (Ocean-optics, USA)

Detektor CCD UV-VIS USB 4 000 (Ocean-optics, FL, USA)

Ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX RK 52 (Berlín, SRN)

Detekční průtoková Z cela Ultem<sup>®</sup> SMA, efektivní délka 20 mm (FIALab<sup>®</sup>, Bellevue, WA, USA)

Váhy analytické Sartorius Analytic

Digitální pHmetr, Hanna Instruments (SRN)

Spojovací PEEK trubičky o vnitřních průměrech 0,25 a 0,5 mm (Upchurch, USA)

Optická vlákna o vnitřním průměru 0,6 mm (FIALab<sup>®</sup>, Bellevue, WA, USA)

Automatické pipety, Biohit

### **4.2. Použité chemikálie**

Acetonitril 99,9% HPLC gradient grade (Sigma-Aldrich, Česká republika)

Kyselina fosforečná 85 %, p.a. (Merck, Německo)

Amoniak vodný roztok 25-29% (Penta, Česká republika)

Kyselina octová ledová, p.a. (Penta, Česká republika)

Kyselina mravenčí 98%, p.a. (Penta, Česká republika)

Ultračistá voda Millipore Milli-Q RG (Millipore, Česká republika)

Carmosine  $\geq 98,0\%$  (Fluka, Česká republika)

Ponceau 4R  $\geq 99,0\%$  (Fluka, Česká republika)

Red 2G  $\geq 98,0\%$  (Fluka, Česká republika)

### 4.3. Použité vzorky

#### 4.3.1. Sirup Malina light, 1000 ml

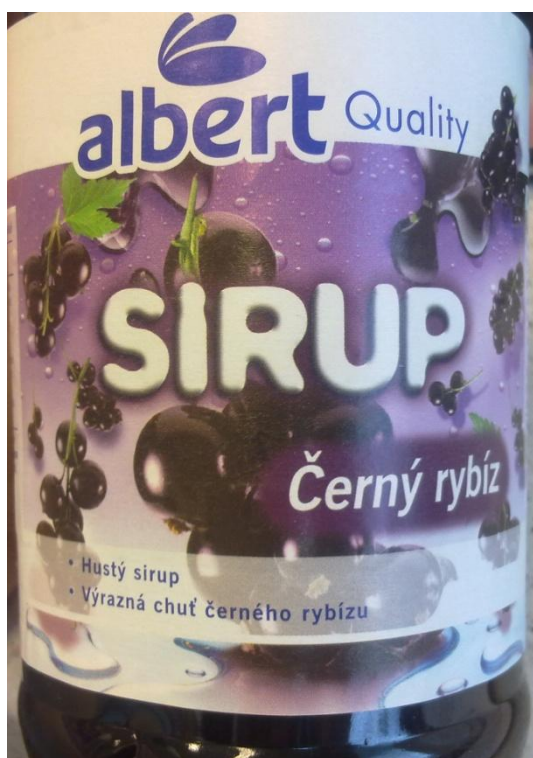


Obrázek 12. Sirup malina light

Sirup Malina light je nízkoenergetický koncentrát se sladidly s příchutí maliny s doporučeným ředěním 1:7. Obal výrobku obsahuje upozornění, že barvivo azorubicin (karmoisin) může nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí a že je zdrojem fenylalaninu, který je nevhodný pro nemocné s fenylketonurií a také, že je chemicky konzervován.

Složení: pitná voda, regulátor kyselosti, kyselina citronová, aroma (obsahuje aroma malinové, barvivo azorubicin E122 a konzervant sorban draselný), sladidla: sacharin a aspartam, konzervant: sorban draselný

#### 4.3.2. Sirup Albert Quality, černý rybíz, 700 ml



Obrázek 13. Sirup Albert Quality černý rybíz

Hustý sirup s výraznou chutí černého rybízu má doporučené ředění 1:8. Tento sirup byl vyroben pro AHOLD Czech Republic, a.s. výrobcem NELI a.s. ve Vyškově, Česká republika. Na obalu je uvedeno upozornění, že barviva azorubicin a ponceau 4R mohou nepříznivě ovlivňovat pozornost u dětí.

Složení: glukózo-fruktózový sirup, pitná voda, kyselina citronová, aroma (obsahuje barviva: azorubicin, ponceau 4R, brilantní modř a konzervant: sorban draselný).

#### **4.4. Použité roztoky**

##### *4.4.1. Mobilní fáze*

V pokusu byla postupně použita řada mobilních fází. Každá byla připravena ze zásobního roztoku o dané koncentraci a upravena na pH 6. Takto připravené mobilní fáze byly dále ředěny ultračistou vodou s pomocí odměrného válce na námi požadovanou koncentraci. Pracovní roztoky mobilní fáze byly řádně promíchány. Mobilní fáze byly připravovány průběžně.

Použité mobilní fáze:

0,2 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  +  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; pH 6

0,2 % kyselina octová +  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; pH 6

0,2 % kyselina octová; pH 2,65

0,2 % kyselina mravenčí +  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; pH 6

##### *4.4.2. Roztoky standardů*

Byly používány tři zásobní roztoky standardů, které měly koncentraci 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  daného barviva rozpuštěné v ultračisté vodě. Jako čtvrtý zásobní roztok byla použita směs všech azobarviv v koncentraci 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Tyto roztoky se uchovávaly v lednici a z nich se připravovaly pracovní roztoky standardů. Pracovní roztoky standardů se připravovaly každý den a připravovaly se odměřením požadovaného objemu ze zásobního roztoku a naředěním se slabší mobilní fází na požadovanou koncentraci. Každý pracovní roztok byl důkladně promíchán.

## 4.5. Parametry měření

### 4.5.1. Přístroj

V diplomové práci byl po celou dobu měření využíván přístroj s počítačovým systémem SICrom™, s osmicestným selekčním ventilem z nerezové oceli, pumpou S17, lampou HL-2000, detektorem CCD UV-VIS USB 4 000 a detekční průtokovou Z celou Ultem® SMA, o efektivní délce 20 mm.

Během měření bylo umožněno nasátí nebo vytlačení reagentů pumpou. Pomocí vícecestného ventilu se zvolilo, odkud se nasává činidlo a kam se vytlačuje. Každý port ventilu má svoje číslo – 1. odpad; 2. mobilní fáze; 3. kolona; 8. mobilní fáze; 5. vzorek. Dále je systém doplněn mísící cívkou a detektorem. (Viz obrázek č. 5)

### 4.5.2. Program

Na začátku každého dne a při změně podmínek byl využíván program pro promývání kolony a program pro promývání systému při použití jiného vzorku. Ostatní programy se optimalizovaly a upravovaly podle potřeby. Níže je uveden program pro izokratickou eluci, se kterou se začínalo. Dále je uveden finální program pro gradientovou eluci, který byl použit i pro měření vzorků.

Program pro promývání kolony: v tabulce je uveden 1 cyklus promytí, v praxi se používaly 2 cykly

Tabulka 1. Program pro promývání kolony

Jednotka	Příkaz/Děj
Spektrometr	Skenovat absorpenci a referenční spektrum
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 3 800 µl rychlostí 70 µl/s; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 10 µl/s; počkat do konce
Spektrometr	Ukončit skenování

Program pro promývání systému při použití jiného vzorku: v tabulce je uveden 1 cyklus promytí, v praxi se používaly 3 cykly

Tabulka 2. Program pro promytí systému vzorkem

<b>Jednotka</b>	<b>Příkaz/Děj</b>
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 150 $\mu\text{l}$ rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$ ; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 50 $\mu\text{l/s}$ ; počkat do konce

Program pro izokratickou separaci:

Tabulka 3. Program pro izokratickou separaci

<b>Jednotka</b>	<b>Příkaz/Děj</b>
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 3 800 $\mu\text{l}$ rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$ ; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5
Pumpa	Nasát 10 $\mu\text{l}$ rychlostí $\mu\text{l/s}$ ; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$ ; počkat 20 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum
Pumpa	Počkat do konce
Spektrometr	Ukončit skenování

Program pro gradientovou separaci:

Tabulka 4. Finální program pro gradientovou separaci

<b>Jednotka</b>	<b>Příkaz/Děj</b>
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
Pumpa	Nasát 3 200 $\mu\text{l}$ rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$ ; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 450 $\mu\text{l}$ rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$ ; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5

Pumpa	Nasát 10 µl rychlostí 10 µl/s; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 20 µl/s; počkat 15 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 180s
Pumpa	Počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 400 µl rychlostí 70 µl/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 20 µl/s; počkat 5 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 25s
Pumpa	Počkat do konce
Spektrometr	Ukončit skenování

#### 4.5.3. Podmínky chromatografie

Byla použita monolitická kolona Chromolith® SpeedROD CN 50x4.6, která obsahuje kyanoskupiny a je schopna vázat polární látky. Na začátku dne byla kolona promyta mobilní fází, která se potom používala, aby nedocházelo ke zkreslování výsledků. Po ukončení měření byla kolona promyta a uchovávána v roztoku 70 % acetonitrilu.

## 4.6. Parametry hodnocení metody

### 4.6.1. Limit detekce (*Limit of detection*) a limit kvantifikace (*Limit of quantification*)

Limit detekce (LOD) je nejmenší množství analytu, které je možné detekovat. Závisí na poměru signál/šum = 3.

Limit kvantifikace (LOQ) se určí z nejmenšího množství analytu, které je možné správně stanovit. Opět se vypočítává z poměru signálu k šumu<sup>[25]</sup>. S/N = 10

Poměr signálu k šumu (*S/N*) se využívá pro určení přesnosti kvantitativní analýzy, ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se vypočítá ze vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

v němž značí:

$H$  - výšku píku

$h$  - rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce <sup>[11]</sup>

#### 4.6.2. Přesnost – Opakovatelnost<sup>[25]</sup>

Přesnost (Precision) je soulad mezi nezávislými a našimi výsledky za předem stanovených podmínek. Uvádí se ve formě směrodatné odchylky. Ta nám udává, jak hodně jsou změřené hodnoty rozptýleny od průměrných hodnot.

Vyjadřuje vliv náhodných, nepravidelných chyb a vypočítá se jako směrodatná odchylka podle vzorce:

$$\text{SMODCH} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}, \text{ kde platí:}$$

$x$  - vyjadřuje jednotlivé hodnoty charakteristiky píku (v našem případě výška píku, používá se i plocha píku nebo poměr ploch vzorku a standardu)

$\bar{x}$  - průměr hodnot

$n$  - počet hodnot minus 1

Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka v procentech podle vzorce:

$$\text{RSD} = \frac{\text{SMODCH}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Pro ověření přesnosti je možné použít metodu opakovatelnosti.

Opakovatelnost (Repeatability) se stanovuje pro vlastní metodu, ne pro výsledek. Ověřuje správnost metody. Opakovatelnost je prováděna stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu.



#### 4.6.3. Správnost (Accuracy) <sup>[25]</sup>

Jedná se o přesnost od přípravy vzorku až po jeho analýzu. Hodnotí přítomnost soustavné chyby, shodu výsledku se správnou hodnotou. Porovnává se několik stejných, samostatně připravených vzorků se vzorkem z přesného množství standardů.

$$R = \frac{h_v}{(h_{v+s} - h_v)} \cdot 100, \text{ kdy:}$$

$h_v$  – odezva vzorku (výška píku)

$h_{v+s}$  – odezva vzorku s přidavkem standardu (výška píku)

Správnost bývá také označována jako výtěžnost a hodnota R se má pohybovat v rozmezí 95% - 105%

#### 4.6.4. Kalibrace (Calibration) <sup>[25]</sup>

Kalibrace je postup, při kterém se stanoví vztahy mezi měřenými veličinami. V našem případě se hodnotil vztah mezi koncentrací měřeného vzorku a výškou píku.

#### 4.6.5. Stanovení vzorků

U reálných vzorků bylo potřeba zjistit koncentraci azobarviva. Ta se spočítala z poměru velikostí píků neznámé koncentrace a píku vnitřního standardu o známé koncentraci. Do výpočtu byl zahrnut poměr píků standardů o známých koncentracích, podle vzorce:

$$c(v) = \frac{R(v;r) \times c(r)}{R(r;k) \times \frac{c(r)}{c(k)}}$$

v – vzorek; r – Red 2G; k – Karmoisin; c – koncentrace; R – průměr poměrů výšek píků

### 4.7. Vývoj metody

Metoda byla vyvíjena pro kompletní separaci vybraných látek. Nejprve byla použita eluce za izokratických podmínek, ale nebylo možné odseparovat všechny látky

v odpovídajícím čase, proto se přistoupilo ke gradientové eluci. Počítačový program se upravoval tak, aby vyvinutá metoda byla řádně optimalizována. Byla využita řada mobilních fází. Právě podle využití mobilních fází je rozdělen popis postupu vývoje metody.

#### 4.7.1. Pokus s fosforečnanem amonným – izokratická separace

První měření bylo provedeno s mobilní fází 0,2 %  $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{OH}$  o pH 6 a vzorkem Ponceau o koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$  s využitím programu pro izokratickou separaci. Mobilní fáze byla dále naředěna na koncentrace 0,15 %, 0,1 % a 0,05%. Jako poslední byla použita mobilní fáze složená pouze z ultračisté vody. Při tomto pokusu se zjistilo, že čím je mobilní fáze zředěnější, tím jsou retenční časy nižší. Za stejných podmínek byly změřeny vzorky azobarviv Red 2G o koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$  a Karmoisinu o stejné koncentraci. Vztah retenčních časů a koncentrace je uveden v tabulce.

Tabulka 5. Proměrování retenčních časů standardů s využitím fosforečnanu amonného jako MF

Koncentrace MF	Retenční čas [s]		
	PO4R	RED 2G	CARM
0,2 %	280	analyt nevymyt	analyt nevymyt
0,15 %	261	analyt nevymyt	analyt nevymyt
0,1 %	226	analyt nevymyt	analyt nevymyt
0,05 %	180	270	analyt nevymyt
0,025 %	vymyt spolu s mrtvým objemem	200	450
$\text{H}_2\text{O}$	149	148	149

Z tabulky také vyplývá, že při žádné koncentraci není možné oddělit všechny tři barviva v jednom nástřiku.

#### 4.7.2. Pokus s octanem amonným – izokratická separace

Pokus byl obměněn a byla použita mobilní fáze o složení 0,2 % kyselina octová +  $\text{NH}_4\text{OH}$  o pH 6. Zbytek pokusu zůstal nezměněn – postupně byly změřeny retenční časy

vzorků o koncentraci 40 µg/ml v programu pro izokratickou separaci se snižováním koncentrace mobilní fáze. Bohužel ani tato obměna neumožnila separaci všech barviv. Barvivo Karmoisin nebylo ani při nejnižší koncentraci separováno v čase pro analýzu (480 s).

Tabulka 6. Proměřování retenčních časů standardů s využitím octanu amonného jako MF

Koncentrace MF	Retenční čas [s]		
	PO4R	RED 2G	CARM
0,2 %	273	416	analyt nevymyt
0,1 %	231	357	analyt nevymyt
0,05 %	190	286	analyt nevymyt
0,025 %	vymyt spolu s mrtvým objemem	223	analyt nevymyt
H <sub>2</sub> O	149	148	149

#### 4.7.3. Pokus s kyselinou octovou – izokratická separace

Bylo rozhodnuto provést poslední pokus v programu izokratické separace s využitím mobilní fáze 0,2 % kyseliny octové o pH 2,65. Koncentrace i složení vzorků zůstalo stejné.

Tabulka 7. Proměřování retenčních časů standardů s využitím kyseliny octové jako MF

Koncentrace MF	Retenční čas [s]		
	PO4R	RED 2G	CARM
0,1 %	165	246	analyt nevymyt
0,05 %	vymyt spolu s mrtvým objemem	210	analyt nevymyt
0,025 %	vymyt spolu s mrtvým objemem	185	409
H <sub>2</sub> O	149	148	149

Ani tato analýza neumožnila optimální separaci. Proto byla izokratická eluce nahrazena gradientovou.

#### 4.7.4. Pokus s fosforečnanem amonným – gradientová separace

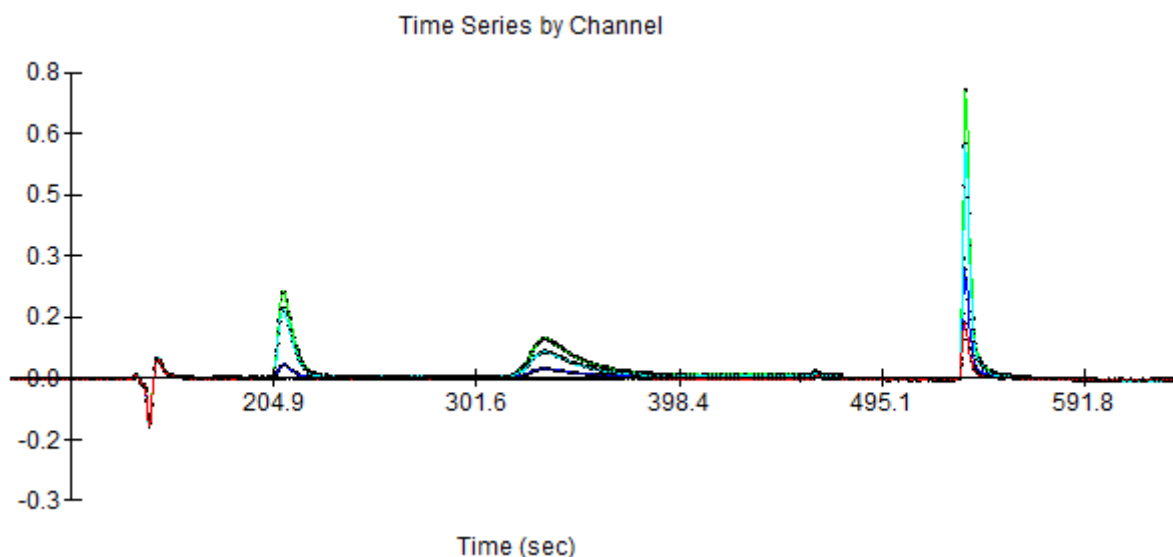
Gradientová separace spočívá v tom, že se do systému nejprve nasaje slabší mobilní fáze, u které se předpokládá vymytí 1. píku. V našem případě vzorku Ponceau. V další fázi se nasaje silnější mobilní fáze, která vymyje zbytek.

Nejprve byl proveden pokus s gradientem vytvořeném v mísící cívce s různými kombinacemi koncentrací mobilní fáze  $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{OH}$  o pH 6. Jako úspěšná se ukázala kombinace mobilních fází o koncentraci 0,1 % a 0,01 %.

Tabulka 8. Proměrování retenčních časů standardů při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF

Koncentrace MF	Retenční čas [s]		
	PO4R	RED 2G	CARM
0,1 % a 0,01 %	209	334	534

Tato kombinace mobilních fází umožnila separaci všech barviv. Menším problémem bylo, že pík vzorku Red 2G byl hodně rozmytý.



Obrázek 14. Chromatograf kombinace mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného.

Proto byl vyzkoušen pokus s využitím postupného gradientu. Jako vzorek byla separována směs standardů. Jako první mobilní fáze byla využívána směs  $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{OH}$  o různých koncentracích a jako druhá mobilní fáze se použila voda. Nejlépe se osvědčila

kombinace 0,1 % první mobilní fáze o objemu 3,2 ml a vody o objemu 3 ml. Tato kombinace funguje, ale vzorek Red 2G je stále rozmytý a Karmoisin má vysoký retenční čas.

Nakonec jsme se vrátili ke kombinaci mobilních fází  $H_3PO_4$  +  $NH_4OH$  o koncentracích 0,1 % a 0,01 %. Program byl obměněn tak, že první mobilní fáze se nasály 3,2 ml a druhé 3 ml. Pro tuto kombinaci byla změřena kalibrace a opakovatelnost.

Program:

Tabulka 9. Obměněný program pro gradientovou separaci

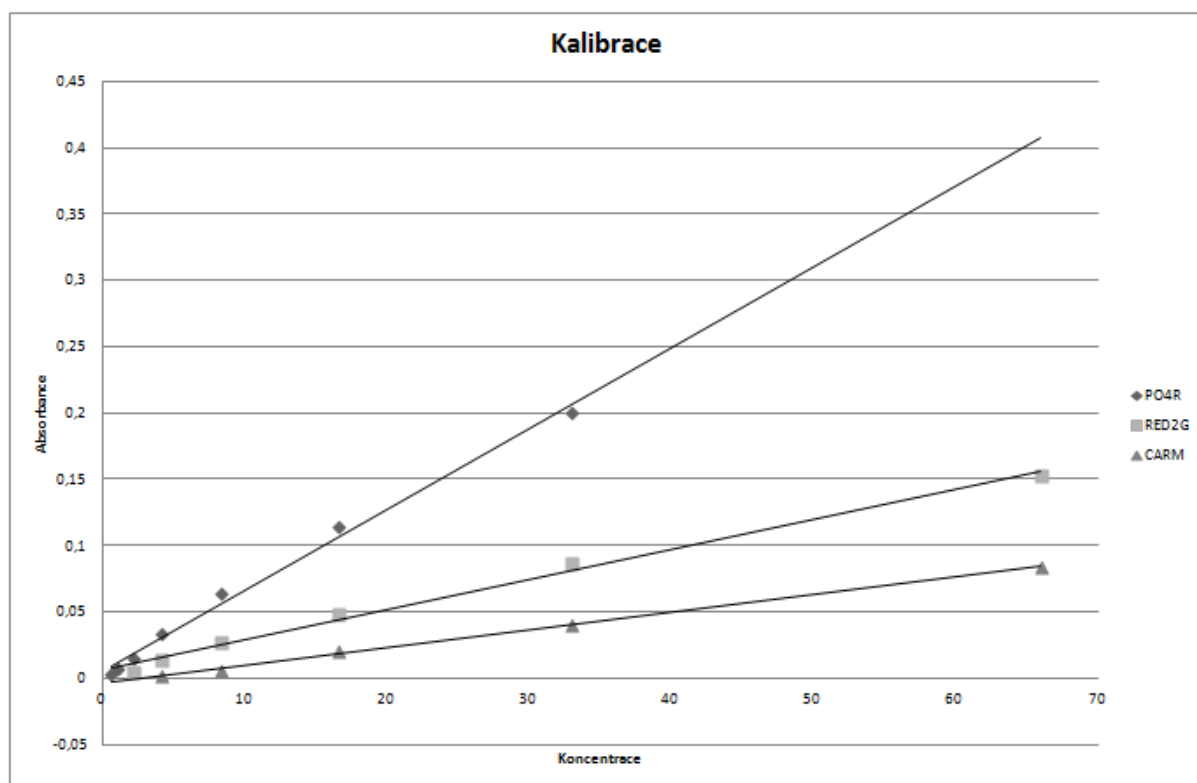
Jednotka	Příkaz/Děj
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 3 200 $\mu$ l rychlostí 70 $\mu$ l/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5
Pumpa	Nasát 10 $\mu$ l rychlostí $\mu$ l/s; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 10 $\mu$ l/s; počkat 15 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 320 s
Pumpa	Počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
Pumpa	Nasát 3 000 $\mu$ l rychlostí 70 $\mu$ l/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 10 $\mu$ l/s; počkat 15 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 300 s
Pumpa	Počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 3 800 $\mu$ l rychlostí 70 $\mu$ l/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 10 $\mu$ l/s; počkat 5 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 250 s
Pumpa	Počkat do konce
Spektrometr	Ukončit skenování

Kalibrace:

Tabulka 10. Kalibrace s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného

Koncetrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Absorbance (průměr)		
	PO4R	RED 2G	CARM
66	0,255	0,153	0,084
33	0,200	0,087	0,040
16,5	0,115	0,048	0,020
8,25	0,064	0,027	0,006
4,125	0,033	0,014	0,002
2,0625	0,015	0,005	Pod LOQ
1,03125	0,007	Pod LOQ	Pod LOQ
0,05625	0,004	Pod LOQ	Pod LOQ

Při nízkých koncentracích byly některé vzorky pod limitem kvantifikace (LOQ).



Obrázek 15. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného

Hodnota spolehlivosti pro Poncaeu je 0,9922, pro Red 2G 0,9931 a pro Karmoisin 0,9988.

Opakovatelnost:

Tabulka 11. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného

<b>PO4R</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,2440	0,0126	5,1733
20	0,1562	0,0041	2,5989
10	0,0843	0,0037	4,3658

Tabulka 12. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného

<b>RED 2G</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,098	0,00301	3,068
20	0,063	0,00306	4,831
10	0,033	0,00172	5,187

Tabulka 13. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného

<b>CARM</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,0633	0,0016	2,485
20	0,0377	0,0021	5,617
10	0,0188	0,0012	6,605

Pokus byl úspěšný. Proto se ponechaly koncentrace mobilních fází 0,1 % a 0,01 %. Program byl opět obměněn a pro tuto kombinaci byla opět změřena kalibrace a opakovatelnost.

Program:

Tabulka 14. Obměněný program pro gradientovou separaci

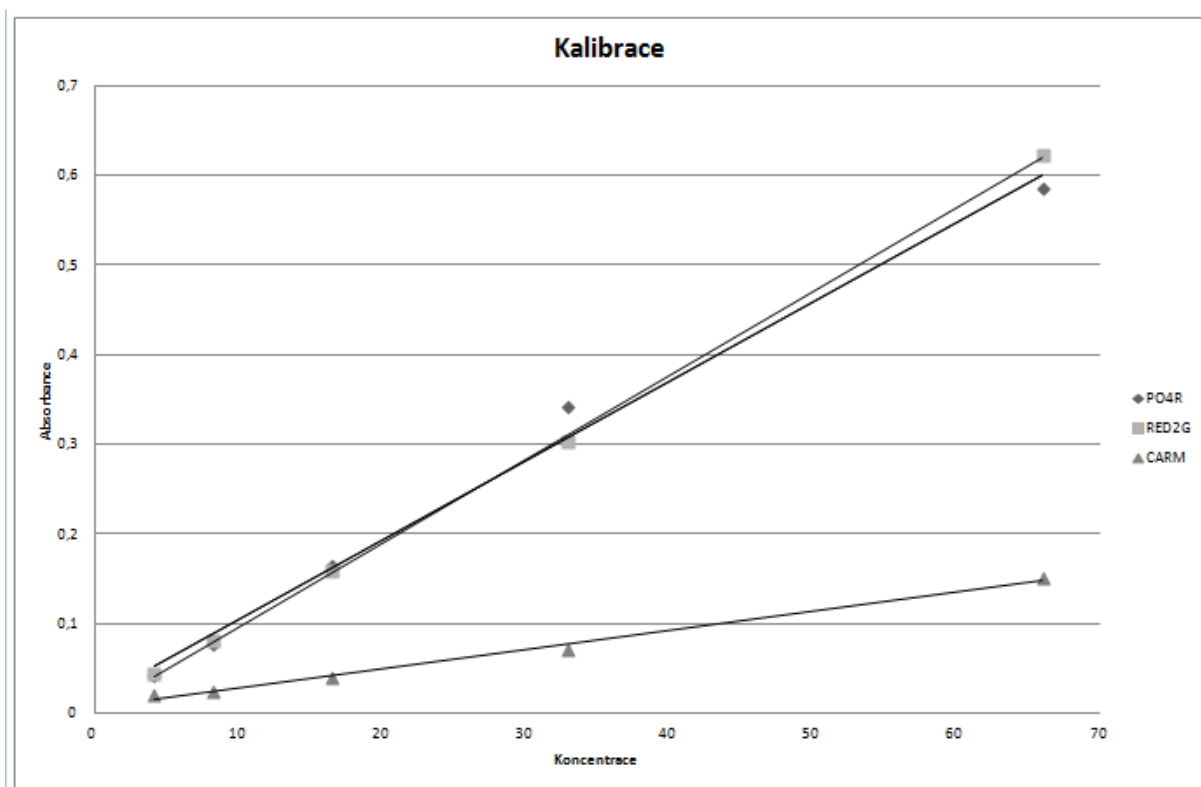
<b>Jednotka</b>	<b>Příkaz/Děj</b>
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
Pumpa	Nasát 3 200 µl rychlostí 70 µl/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 450 µl rychlostí 70 µl/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5
Pumpa	Nasát 10 µl rychlostí 10 µl/s; počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 20 µl/s; počkat 15 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 180 s
Pumpa	Počkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 400 µl rychlostí 70 µl/s; počkat do konce; počkat 2 s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit všechnen objem rychlostí 20 µl/s; počkat 5 s
Spektrometr	Skenovat absorbanci a referenční spektrum 125 s
Pumpa	Počkat do konce
Spektrometr	Ukončit skenování

Kalibrace:

Tabulka 15. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program

<b>Koncentrace [µg/ml]</b>	<b>Absorbance (průměr)</b>		
	<b>PO4R</b>	<b>RED 2G</b>	<b>CARM</b>
66	0,585	0,623	0,150
33	0,341	0,303	0,072
16,5	0,164	0,159	0,040
8,25	0,078	0,080	0,025
4,125	0,041	0,044	0,021





Obrazek 16. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program

Hodnota spolehlivosti pro Ponceau je 0,9921, pro Red 2G 0,9996 a pro Karmoisin 0,9938.

Opakovatelnost:

Tabulka 16. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program

PO4R			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,511	0,0155	3,0348
20	0,298	0,0057	1,9089
10	0,149	0,0060	4,0669

Tabulka 17. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program

<b>RED 2G</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,509	0,02478	4,866
20	0,286	0,00489	1,713
10	0,149	0,00354	2,381

Tabulka 18. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,1% a 0,01% fosforečnanu amonného, obměněný program

<b>CARM</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,078	0,0059	7,672
20	0,049	0,0019	3,935
10	0,029	0,0038	13,36

#### 4.7.5. Pokus s kyselinou fosforečnou – izokratická separace

Po sérii úspěšných pokusů se mobilní fáze změnila ze směsi  $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{OH}$  o pH 6 se na samotnou  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Zjistilo se, že kyselina fosforečná jako mobilní fáze nefunguje.

#### 4.7.6. Pokus s mravenčanem amonným – gradientová separace

Dále se jako mobilní fáze zkoušel  $\text{HCOONH}_4$ , který se ukázal jako ideální mobilní fáze.

Tabulka 19. Proměňování retenčních časů standardů při gradientové eluci s využitím mravenčanu amonného jako MF

Koncentrace MF	Retenční čas [s]		
	PO4R	RED 2G	CARM
0,2 %	242	380	analyt nevymyt
0,1 %	202	308	analyt nevymyt
0,05 %	170	240	analyt nevymyt
0,02 %	155	183	344
H <sub>2</sub> O	149	148	149

Nejprve se zkoušely různé koncentrace mobilní fáze (viz tabulka). Poté se zvolila optimální kombinace koncentrací – 0,05 % a 0,02 % a byla změřena opakovatelnost.

Opakovatelnost:

Tabulka 20. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného

PO4R			
Koncentrace [µg/ml]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,533	0,0119	2,2266
20	0,181	0,0049	2,6878
10	0,109	0,0050	4,6216

Tabulka 21. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného

RED 2G			
Koncentrace [µg/ml]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,248	0,00755	3,043
20	0,124	0,00359	2,903
10	0,061	0,00316	5,213

Tabulka 22. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného

<b>CARM</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
40	0,078	0,0059	7,672
20	0,049	0,0019	3,935
10	0,029	0,0038	13,36

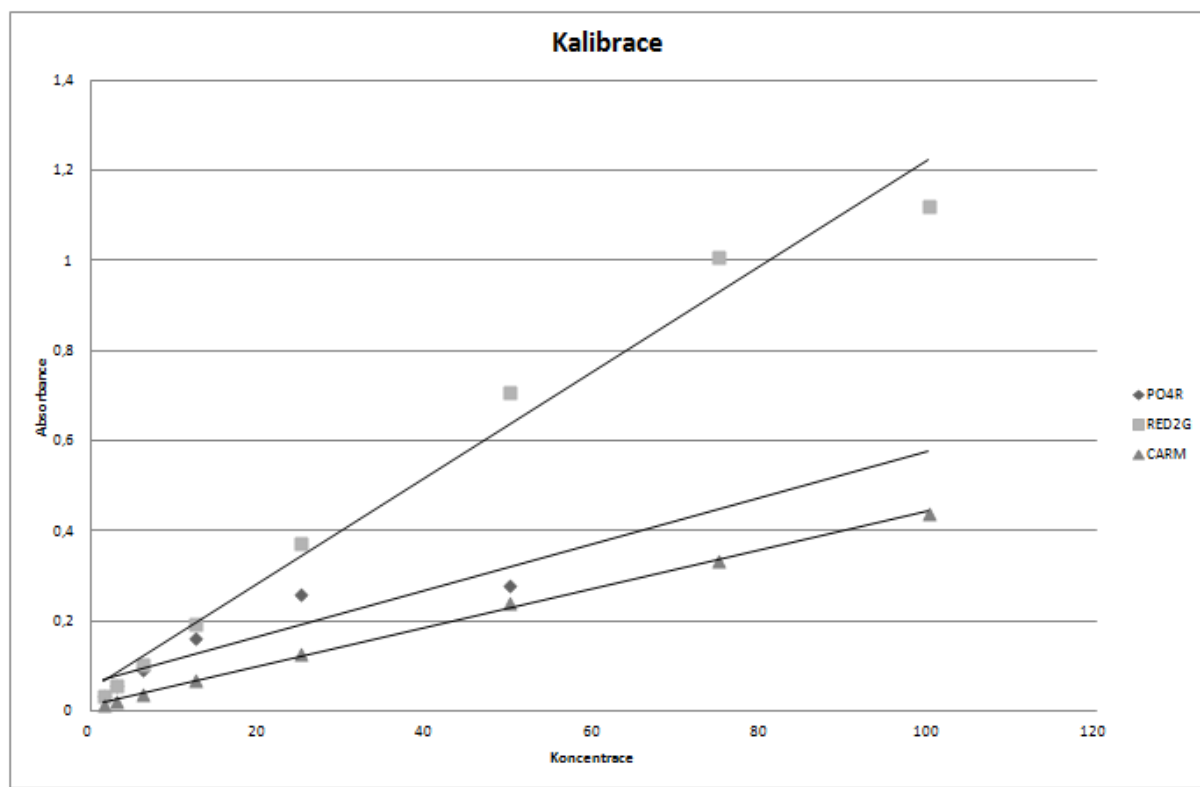
V posledním pokusu se změnila koncentrace mobilních fází na 0,06 % a 0,01 % mravenčanu amonného. Byla použita finální verze programu (popsána v tabulce 7.) a byla změřena kalibrace a opakovatelnost.

Kalibrace:

Tabulka 23. Kalibrace s využitím kombinací mobilních fází 0,06% a 0,01% mravenčanu amonného

<b>Koncentrace</b> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	<b>Absorbance (průměr)</b>		
	PO4R	RED 2G	CARM
100	*	1,2153	0,4373
75	*	1,0073	0,3347
50	0,2797	0,7080	0,2397
25	0,2597	0,3723	0,1267
12,2	0,1607	0,1943	0,0680
6,25	0,0913	0,1010	0,0370
3,125	0,0543	0,0550	0,0217
1,5625	0,0333	0,0323	0,0140

\* Koncentrace Ponceau 4R byla příliš vysoká a pík nebyl jasně kvantifikovatelný, protože se rozdělil na 2 nižší.



Obrázek 17. Kalibrace s kombinací mobilních fází 0,6% a 0,1% mravenčanu amonného

Hodnota spolehlivosti pro Ponceau je 0,8286, pro Red 2G 0,9934 a pro Karmoisin 0,9985.

Opakovatelnost:

Při měření opakovatelnosti byla použita směs vzorků, kdy nebyly všechny ve stejné koncentraci. Koncentrace byly vždy v poměru 2:5:5 (Ponceau : Red 2G : Karmoisin).

Tabulka 24. Opakovatelnost pro standard Ponceau s využitím kombinací mobilních fází 0,06% a 0,01% mravenčanu amonného

PO4R			
Koncentrace [μg/ml]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
10	0,108	0,0029	2,668
20	0,128	0,0026	2,030
2	0,035	0,0016	4,622

Tabulka 25. Opakovatelnost pro standard Red 2G s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného

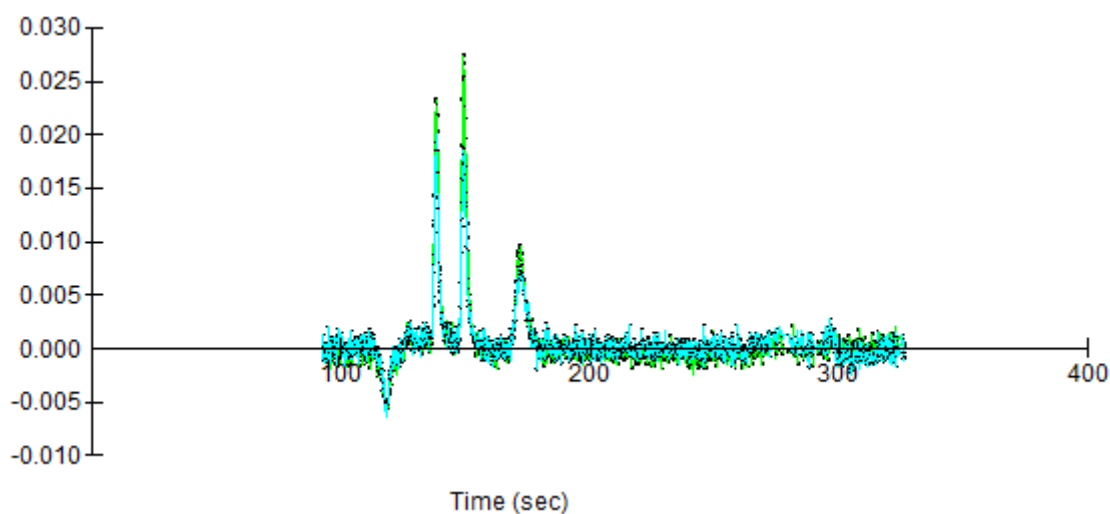
<b>RED 2G</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
25	0,345	0,024	7,042
50	0,808	0,037	4,615
5	0,080	0,007	9,264

Tabulka 26. Opakovatelnost pro standard Karmoisin s využitím kombinací mobilních fází 0,05% a 0,02% mravenčanu amonného

<b>CARM</b>			
Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměr absorbancí	Směrodatná odchylka	RSD %
25	0,090	0,018	20,08
50	0,184	0,011	5,773
5	0,028	0,001	3,467

#### 4.8. Výsledky

Finální měření bylo provedeno s mobilní fází fosforečnanem amonným v koncentracích 0,05% a 0,005%. Pro tyto kombinace mobilních fází již nebyla změřena kalibrace ani opakovatelnost, protože jsou velmi podobné změřeným podmínkám.



Obrázek 18. Chromatograf, testování finálních podmínek – směs standardů

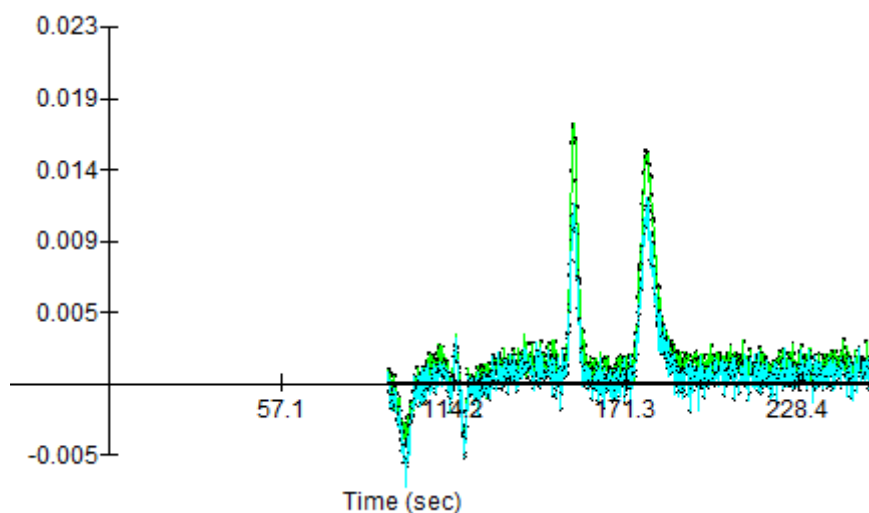
## 4.9. Stanovení vzorků

Oba vzorky byly změřeny v programu pro gradientovou separaci. Jako mobilní fáze byla použita kombinace koncentrací 0,05 % a 0,005 % fosforečnanu amonného pH 6. Barvivo Red 2G bylo použito jako vnitřní standard, protože není obsaženo v žádném vzorku.

### 4.9.1. Stanovení sirupu Malina light

Vzorek sirupu Malina light byl naředěn v poměru 1:10 s mobilní fází 0,05 %. Sirup obsahuje barvivo Karmoisin a v pokusu byla ověřena schopnost separovat toto barvivo danou metodou.

V dalším kroku se separovala směs Maliny light 100  $\mu$ l a Red 2G 6  $\mu$ l. Standard azobarviva Red 2G byl použit jako vnitřní standard.



Obrázek 19. Chromatogram Malina light a Red 2G

Tabulka 27. Proměrování retenčních časů vzorku Malina light při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF

MALINA LIGHT	
Objem [ $\mu$ l]	Výška píku
100	0,015
200	0,028

Tabulka 28. Proměrování retenčních časů standardu Red 2G při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF

<b>RED 2G</b>	
Objem [μl] / Koncentrace [μg/ml]	Výška píku
6 / 0,6	0,017
12 / 1,2	0,037

Potom pokus pokračoval separací známého objemu standardu Karmoisinu s použitím Red 2G jako vnitřního standardu.

Tabulka 29. Proměrování retenčních časů standardů Red 2G a Karmoisin při gradientové eluci s využitím fosforečnanu amonného jako MF

Objem [μl] / Koncentrace [μg/ml]	Výška píku	
	RED 2G	CARM
20 / 40	0,03	0,060
10 / 20	0,017	0,037

V téměř posledním pokusu se měřila opakovatelnost. Bylo připraveno 6 stejných roztoků vzorků o složení 400 μl sirupu Malina light, 20 μl roztoku standardu Red 2G a 1580 μl mobilní fáze 0,05 %. Byly připravovány ve větších objemech, aby se eliminovala chyba pipetováním. Každý vzorek byl proměřen třikrát.



Tabulka 30. Opakovatelnost roztoku vzorku Malina light a standardu Red 2G

Měření	Nástřik	1. pík – RED 2G	2. pík – CARM	Poměr píků
1	1	0,033	0,048	1,45
	2	0,031	0,038	1,22
	3	0,036	0,038	1,06
2	1	0,034	0,046	1,35
	2	0,033	0,045	1,36
	3	0,032	0,039	1,22
3	1	0,035	0,047	1,34
	2	0,035	0,044	1,25
	3	0,033	0,042	1,27
4	1	0,033	0,047	1,42
	2	0,033	0,045	1,36
	3	0,034	0,048	1,41
5	1	0,041	0,050	1,22
	2	0,043	0,053	1,23
	3	0,043	0,052	1,21
6	1	0,039	0,050	1,28
	2	0,031	0,041	1,32
	3	0,037	0,050	1,35

Z poměru píků je možné vypočítat koncentraci Karmoisinu ve vzorku.

Tabulka 31. Koncentrace Karmoisinu ve vzorku

Měření	Průměr poměrů píků	Koncentrace CARM [ $\mu\text{g/ml}$ ] ve vzorku
1	1,25	47,74
2	1,21	50,22
3	1,29	49,32
4	1,40	53,54
5	1,22	46,78
6	1,32	50,48

Při měření byl vzorek sirupu Malina light zředěn přidáním mobilní fáze a vnitřního standardu RED 2G. Průměrná koncentrace Karmoisinu ve vzorku je  $49,68 \pm 2,17 \mu\text{g/ml}$ .

V další části pokusu se k 400  $\mu\text{l}$  sirupu Malina light a 20  $\mu\text{l}$  roztoku standardu Red 2G přidalo 20  $\mu\text{l}$  roztoku standardu Karmoisinu. Výška píku Karmoisinu se na chromatogramu zvýšila a snížil se poměr velikostí píků.

Tabulka 32. Poměr píků vzorku Malina light a standardu Red 2G se známým přídatkem Karmoisinu

Nástřík	1. pík – RED 2G	2. pík – CARM	Poměr píků
1	0,038	0,067	1,76
2	0,030	0,059	1,97
3	0,034	0,062	1,82

S použitím poměrů píků bez přídatku Karmoisinu a s přídatkem se vypočítala výtěžnost na 106,52%.

#### 4.9.2. Stanovení sirupu Albert černý rybíz

Tento sirup podle informací na etiketě obsahuje barviva Karmoisin a Ponceau. Bohužel námi vyvinutá metoda měla limit kvantifikace vyšší, než byla koncentrace barviva Ponceau, a proto toto barvivo nebylo možné kvantifikovat. V dalším měření se nepokračovalo.

## 5. Diskuse

Během své práce jsem vyvíjela a optimalizovala metodu pro separaci vybraných azobarviv. Tuto metodu jsem na závěr ověřovala měřením koncentrace barviva v reálném vzorku. Metodu jsem vyvíjela pro monolitickou kyanokolonu, která je slabě polární. Hledala jsem optimální mobilní fázi nebo kombinaci mobilních fází, která by umožnila by separovat všechna barviva.

Nejprve se předpokládalo, že bude možné využít izokratickou separaci. Jako první se vyzkoušel fosforečnan amonný, který se ukázal být nevhodnou mobilní fází. Barvivo Karmoisin nebylo touto mobilní fází dostatečně vymýváno a bylo zadržováno v koloně velmi dlouhou dobu. Když se mobilní fáze naředila tak, aby se Karmoisin vymyl dříve, barvivo Ponceau 4R bylo vymyto v mrtvém čase separace.

Byly vyzkoušeny i další mobilní fáze jako kyselina fosforečná a kyselina octová. V obou případech bylo barvivo Karmoisin zadržováno v koloně dlouhou dobu a nebylo vymyto při použití 3 800 $\mu$ l mobilní fáze.

Protože využití izokratické eluce nesplnilo základní předpoklad a to vymytí všech píků, přistoupilo se ke gradientové separaci. Slabší mobilní fáze (ve vyšší koncentraci) vymyje 1. pík Ponceau a Red 2G a potom dáme silnější mobilní fázi (více zředěnou), která vymyje 2. pík. Tato změna pozitivně ovlivnila celý pokus a umožnila separaci všech azobarviv.

S využitím fosforečnanu amonného v koncentracích 0,05 % a 0,005 % v programu gradientové separace byla separována všechna barviva.

Metoda se ověřila na reálném vzorku. Byla zjišťována koncentrace barviva Karmoisin v sirupu Malina light. Zjištěná koncentrace je  $49,68 \pm 2,17$   $\mu$ g/ml. Povolená norma barviva je 100  $\mu$ g/ml.

V diplomové práci z roku 2014, Vývoj metody zelené chromatografie pro stanovení červených barviv v nápojích, naměřené Terezou Boháčovou je uvedena koncentrace Karmoisinu v sirupu Malina light jako 65,063  $\mu$ g/ml, která je vyšší, než v mém měření.

Vyšší variabilita výsledků v porovnání s výsledky typickými pro HPLC vychází zejména z nižší robustnosti metody Sekvenční injekční chromatografie a separace, která byla poměrně citlivá na složení mobilní fáze a vytvořený gradient. Také kvantifikace podle výšky

píku pro ne zcela symetrické a velmi úzké píky přináší vyšší chybovost. Pokud by bylo použito hodnocení plochy píku, byly by výsledky přesnější. Bohužel toto software SIC přístroje zatím neumožňuje.

## **6. Závěr**

Práce na vývoji analytické metody pro separaci 3 červených azobarviv – Karmoisinu, Ponceau 4R a Red 2G v systému Sekvenční injekční chromatografie byla úspěšná.

Nejprve bylo zjištěno, že izokratickou elucí není možné separovat všechna barviva v krátkém elučním čase. Byly zkoušeny čtyři druhy mobilní fáze – fosforečnan amonný, octan amonný, kyselina octová a kyselina fosforečná.

Dále byly provedeny pokusy s gradientovou elucí. Jako mobilní fáze byly využity kombinace koncentrací fosforečnanu amonného a kombinace koncentrací mravenčanu amonného. Separace byla možná při kombinaci mobilních fází: 0,1% a 0,01% fosforečnan amonný; 0,05% a 0,02% mravenčan amonný; 0,06% a 0,01% mravenčan amonný a 0,05% a 0,005% fosforečnan amonný.

Fosforečnan amonný se ukázal jako vhodnější mobilní fáze a proto byl použit jako mobilní fáze pro separaci reálného vzorku. Separací barviva Karmoisin v reálném vzorku byla metoda ověřena a cíl diplomové práce splněn.

## Seznam použité literatury

1) [online] – Přírodovědecká fakulta:

[http://web.natur.cuni.cz/~analchem/ssm/11\\_Prutokove\\_metody\\_analyzy.pdf](http://web.natur.cuni.cz/~analchem/ssm/11_Prutokove_metody_analyzy.pdf) 6. 12. 2014

2) [kniha] Flow Injection Analysis, Jaromír Růžička, Elo H. Hansen; 1988; New York; ISBN 0-471-81355-9

3) [online] – Global Fia: <http://www.globalfia.com/tutorials/lesson-7-sequential-injection-analysis-> 31. 3. 2015

4) [online] – FIALab:

[http://www.flowinjection.com/~flowinje/images/Sequential\\_Injection\\_Chromatography.pdf](http://www.flowinjection.com/~flowinje/images/Sequential_Injection_Chromatography.pdf)  
31. 3. 2015

5) [online] – Přírodovědecká fakulta: [http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia\\_dus.pdf](http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia_dus.pdf)  
31. 3. 2015

6) [cd-rom] Růžička Jaromír, Flow Injection Analysis, FIALab Instruments, 2007, 4. edice, volně dostupné z [www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com)

7) [online] – Encyclopaedia Britannica:

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/115917/chromatography> 7. 12. 2014

8) [online] – Waters: [http://www.waters.com/waters/en\\_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055](http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055) 27. 3. 2015

9) [online] – Separation processes:

[http://www.separationprocesses.com/Adsorption/AD\\_Ch05a.htm](http://www.separationprocesses.com/Adsorption/AD_Ch05a.htm) 3. 5. 2015

10) [kniha] Jiří Klimeš a kolektiv, Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, vydal RNDr. František Skopec, CSc, Hradec Králové, 2011; ISBN 978-80-870009-29-1

11) [kniha] Český lékopis 2009, Praha, Grada Publishing a.s., 2009; ISBN 80-347-1532-5

12) [přednášky] Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta Hradeck Králové:

<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/> 31. 3. 2015

- 13) [online] – University of Bristol – School of Chemistry:  
<http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/price/azo.htm> 7. 12. 2014
- 14) [online] – Sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/discovery-hplc/discovery-cyano-hplc-columns.html> 21. 4. 2015
- 15) [online] – Food Info: <http://www.food-info.net/uk/colour/azo.htm> 7. 12. 2014
- 16) [online] – Sigma-Aldrich:  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/FLUKA/18137?lang=en&region=CZ&gclid=CjwKEAiAkpCkBRCTstKQo5ia5nESJACsCikRNbH99Kgf3uZD88v0TtEokXkRJH9JHvPoqUjgDfVHSxoCBWLw\\_wcB](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/FLUKA/18137?lang=en&region=CZ&gclid=CjwKEAiAkpCkBRCTstKQo5ia5nESJACsCikRNbH99Kgf3uZD88v0TtEokXkRJH9JHvPoqUjgDfVHSxoCBWLw_wcB) 7. 12. 2014
- 17) [článek] Chem. Listy 107, s.233–s.235 (2013) ISSN 1213-7103
- 18) [online] – Zdravá potravina: [www.emulgatory.cz](http://www.emulgatory.cz) 7. 12. 2014
- 19) [online] – Pub Med: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25053067> 31. 3. 2015
- 20) [online] – Wikipedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Ponceau\\_S](http://en.wikipedia.org/wiki/Ponceau_S) 31. 3. 2015
- 21) [online] – Wikipedia:  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Azorubine#mediaviewer/File:Azorubine.svg> 7. 12. 2014
- 22) [online] – Ministerstvo zemědělství:  
<http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065004.html> 31. 3. 2015
- 23) [online] – Wikipedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Red\\_2G](http://en.wikipedia.org/wiki/Red_2G) 30. 4. 2015
- 24) [online] – Food Standards Agency: [https://www.food.gov.uk/business-industry/imports/banned\\_restricted/red2g](https://www.food.gov.uk/business-industry/imports/banned_restricted/red2g) 30. 4. 2015
- 25) [online] – Jihočeská univerzita České Budějovice, Zemědělská fakulta:  
<http://home.zf.jcu.cz/~krizek/vyuka/files/> - Kvalimetrie; 9. 4. 2014