UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FAMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

VÝVOJ HPLC METODY PRO STANOVENÍ UMĚLÝCH BARVIV VE VZORCÍCH ZELENÉHO PIVA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph. D.

Hradec Králové 2015 Bc. Ivana Stachová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph. D. za odborné rady, informace, vedení a podporu při vypracování této diplomové práce.

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.

Souhlasím, aby byla práce půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne…… v Hradci Králové Podpis:……...

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Ivana Stachová

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph. D.

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení umělých barviv ve vzorcích zeleného piva.

V této diplomové práci byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení syntetických, ve vodě rozpustných barviv E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline yellow, E 110 - Sunset yellow, E 131 - Patent blue E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant blue FCF a E 143 - Fast green FCF. Tato metoda byla aplikována na stanovení přítomnosti zmíněných barviv ve vzorcích zeleného piva Jarní pivo 11° (Primátor, Náchod), Krasličák 14° (Ježek, Jihlava), Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice), Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno), Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava), Rohozec 11° (Rohozec, Malý Rohozec), Zelená nefiltrovaná 12° (Žlebské Chvalovice), Velikonoční zelený ležák 12° (Purkmistr, Plzeň), Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany), Valášek 12° (Valášek, Vsetín), Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno).

Pro analýzu byla použita kolona Chromolith Performance CN 100 x 4,6 mm s předkolonkou Chromolith CN 5 x 4,6 mm Merck. Jako mobilní fáze byl zvolen 40% MeOH s 2% pufrem z kyseliny octové s přídavkem NH_3, upravený na pH 7. Při použití gradientové eluce byly analyty úspěšně separovány do 12 minut. Analýza probíhala za teploty 30°C a průtoku 2 ml/min, dávkování bylo 10 µl vzorku.

Pro detekci byl použit DAD detektor a analyty byly detekovány při 3 vlnových délkách 420 nm (Tartrazine a Quinoline yellow), 482 nm (Sunset yellow) a 625 nm (Indigo carmine, Green S, Brilliant blue FCF, Patent blue a Fast green FCF).

Skoro ve všech analyzovaných vzorcích byla zjištěna přítomnost barviva Brilliant blue kromě piv Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice), Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany) a Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno), kde nebylo přítomné žádné námi stanovované barvivo. V pivech Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar Jihlava), Zelená nefiltrovaná 12° (Žlebské Chvalovice), Velikonoční zelený ležák 12° (Purkmistr, Plzeň), Valášek 12° (Valášek, Vsetín) byla kromě barviva Brillant blue navíc zjištěna přítomnost Tartrazinu.

Klíčová slova: HPLC, E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline yellow, E 110 - Sunset yellow, E 131 - Patent blue E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant blue FCF a E 143 - Fast green FCF, umělá barviva, pivo

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Ivana Stachová

Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph. D.

Title of diploma Thesis: HPLC method development for artificial colorants determination in green beer samples

HPLC method was used and validated for the simultaneous determination of synthetic water-soluble dyes: E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline Yellow, E 110 - Sunset Yellow, E 131 - Patent blue, E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant Blue FCF and E 143 - Fast Green FCF. The method was applied for direct determination of these dyes in samples of green beers Jarní pivo 11° (Primátor, Náchod), Krasličák 14° (Ježek, Jihlava), Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice), Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno), Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava) Rohozec 11° (Rohozec, Malý Rohozec), Zelená nefiltrovaná 12° (Žlebské Chvalovice), Velikonoční zelený ležák 12° (Purkmistr, Plzeň), Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany), Valášek 12° (Valášek, Vsetín), Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno).

Analytical Chromolith Performance CN 100 x 4.6 mm column and guard column Chromolith CN 5 x 4.6 mm Merck were used and mobile phase contained 40% (v/v) methanol / 2% (v/v) acetic acid buffer with addition of ammonia for pH adjustment to value 7.0. Successful separation was obtained for all the compounds using an optimized gradient elution within 12 minutes. Analysis was carried out at temperature of 30°C and the flow rate 2 ml/min, the injection volume was set at 10 µl.

The DAD detector was used for monitoring the dyes at the 3 wavelengths 420 nm ((Tartrazine a Quinoline yellow), 482 nm (Sunset yellow) a 625 nm (Indigo carmine, Green S, Brilliant blue FCF, Patent blue a Fast green FCF).

Almost all of the analyzed samples contained Brilliant blue, except Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice), Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany), Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno). There was found no artificial colorant. Moreover, in samples Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava), Zelená nefiltrovaná 12° (Žlebské Chvalovice), Velikonoční zelený ležák 12° (Purkmistr, Plzeň), Valášek 12° (Valášek, Vsetín) was found Tartrazine.

Keywords: HPLC, E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline yellow, E 110 - Sunset yellow, E 131 - Patent blue E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant blue FCF and E 143 - Fast green FCF, synthetic dyes, beer

Obsah

1. Zkratky 11
2. Úvod 13
3. Cíl a zadání diplomové práce 14
4. Teoretická část 15
4.1. Umělá ve vodě rozpustná potravinová barviva 15
4.1.1. E 102 - Tartrazine 16
4.1.2. E 104 Quinoline yellow 17
4.1.3. E 110 Sunset yellow 17
4.1.4. E 131 Patent blue 18
4.1.5. E 132 Indigo carmine 19
4.1.6. E 133 Brilliant blue FCF 20
4.1.7. E 142 Green S 21
4.1.8. E 143 Fast green FCF 22
4.2. Metody stanovení syntetických barviv 23
4.2.1. HPLC – DAD 23
4.2.2. HPLC – DAD 23
4.2.3. HPLC – DAD 24
4.2.4. RP – HPLC –DAD 24
4.3. HPLC 25
4.4. Monolitické kolony 26
4.4.1. Anorganické monolity 26
4.4.2. Polymerní monolity 27
5. Chemikálie, pomůcky a přístrojové vybavení 28
5.1. Standardy barviv 28
5.2. Chemikálie 28
5.3. Vzorky Velikonočního piva 28

5.4. Přístrojové vybavení 29
6. Roztoky 30
6.1. Příprava pracovních roztoků pro optimalizaci 30
6.2. Příprava kalibračních roztoků pro validaci 30
7. Optimalizace metody 33
7.1. Kolona 33
7.2. Mobilní fáze 33
7.2.1. Kyselina octová s NH_3 33
7.2.2. Pufr s přídavkem ACN 38
7.3. Optimalizace gradientové eluce 42
7.3.1. Gradient 01 43
7.3.2. Gradient 02 44
7.3.3. Gradient 03 44
7.3.4. Gradient 04 45
7.3.5. Gradient 05 47
7.3.6. Gradient 06 48
7.3.7. Gradient 07 49
7.3.8. Gradient 08 50
7.3.9. Gradient 09 50
7.3.10. Gradient 10 52
7.3.11. Gradient 11 53
7.3.12. Gradient 12 54
7.3.13. Gradient 13 55
7.4. Vlnová délka 55
7.5. Optimální podmínky separace pro validaci metody 56
8. Validace 57
8.1. Test vhodnosti chromatografického systému (System suitability test - SST) 57

8.1.1. Účinnost chromatografického systému – Asymetrie chromatografických píků (T) a Rozlišení chromatografických píků (R) 57
8.1.2. Linearita standardů 58
8.1.3. Linearita standardů v matrici piva 67
8.1.4. Opakovatelnost 76
8.1.5. Přesnost 77
8.1.6. Správnost 81
9. Stanovení zelených barviv ve vybraných zelených pivech 86
9.1. Jarní pivo 11°, (Primátor, Náchod) 86
9.2. Krasličák 14° (Ježek, Jihlava) 87
9.3. Zelený král Vratislav 12°, (Konrád, Vratislavice) 87
9.4. Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno) 88
9.5. Velikonoční ležák 12°(Radniční pivovar, Jihlava) 89
9.6. Vzorky zelených piv 2015 90
10. Závěr 91
11. Zdroje 93

1. Zkratky

ACN – acetonitril

BRIL – Brilliant blue FCF

CCFAC – Codex Committee on Food Additives and Contaminants

DAD – Diode Array Detector

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EFSA – Europan Food Safe Authority

FAO - Food and Agriculture Organization

FAST – Fast green FCF

FDA – Food and Drug Administration

GRE S – Green S

HPLC – High – Performance Liquid chromarography

INDI – Indigo carmine

INS – International Numbering System

JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives

k – kapacitní faktor

k - směrnice

MeOH – metanol

MF – mobilní fáze

MW – molární hmotnost

N – počet teoretických pater

n – počet bodů

NaOH – hydroxid sodný

PAT – Patent blue

q – absolutní člen

QUIN – Quinoline yellow

R – rozlišení chromatografických píků

r – korelační koeficient

RP – HPLC – Reversed Phase High – Performance Liquid Chromatography

RSD – relativní směrodatná odchylka

s – reziduální odchylka

SD – směrodatná odchylka

SST – System Suitability Test

SUN – Sunset yellow

T – asymetrie chromatografických peaků

TAR – Tartrazine

t_R – retenční čas

V - objem

WHO – World Health Organization

2. Úvod

Potravinová barviva jsou důležitou třídou potravinových aditiv. Jsou používána v nápojích, džusech, masných výrobcích a sladkostech aby se zachovala nebo obnovila přírodní barva potravin. V dnešní době se začínají čím dál více používat přírodní barviva, ale v potravinářství stále ještě převažují barviva umělá, hlavně díky jejich nízké ceně a vysoké stabilitě (1).

Většina umělých barviv představuje jen velmi malé riziko pro zdraví zvířat a lidí. Ovšem některé z těchto látek jsou potenciálním rizikem pro lidské zdraví, obzvlášť jsou-li konzumovány ve větší míře. Například azobarviva, ty jsou rozkládána střevní mikroflórou na aromatické aminy, které způsobují časté bolesti hlav u dospělých, zatímco u dětí způsobují nepozornost a hyperaktivitu. Navíc nedávné studie prokázali, že užívání umělých barviv se může podílet na poškození DNA, vzniku astmatu, alergie, nebo dokonce i rakoviny. Proto je použití syntetických barviv v potravinách pod přísnou kontrolou právních předpisů po celém světě. Z těchto důvodů je třeba vyvíjet přesné a spolehlivé metody pro stanovení syntetických barviv, které zajistí bezpečnost potravin a zdraví spotřebitele (1, 2).

Bylo vyvinuto mnoho analytických technik, ale v dnešní době se nejvíce preferuje HPLC a iontově výměnná chromatografie ve spojení s UV nebo detektory diodového pole, pro jejich vysoké rozlišení, citlivost a selektivnost (3).

V této práci jsme vyvinuli chromatografickou metodu, která dokáže stanovit ve vodě rozpustná zelená barviva a barviva, která pomáhají dotvořit zelenou barvu: E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline yellow, E 110 - Sunset yellow, E 131 - Patent blue E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant blue FCF a E 143 - Fast green FCF. Metoda byla použita na stanovení umělých barviv ve vzorcích Velikonočního zeleného piva získaného na českém trhu.

3. Cíl a zadání diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení a separaci ve vodě rozpustných umělých barviv E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline yellow, E 110 - Sunset yellow, E 131 - Patent blue E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant blue FCF a E 143 - Fast green FCF. Následně vyvinutou metodu pak aplikovat na stanovení barviv ve vzorcích zeleného piva.

4. Teoretická část

4.1. Umělá ve vodě rozpustná potravinová barviva

Potravinová barviva jsou nejzajímavější skupinou potravinových doplňků. Barva produktu často ovlivňuje jeho atraktivitu pro zákazníka. Sytá barva je spojená s čerstvostí a dobrou chutí. Proto se používají především umělá barviva, která jsou na rozdíl od přírodních barviv stabilní a nepodléhají degradaci (2).

Syntetická barviva jsou chemicky vyráběné sloučeniny a jsou rozděleny do 5 hlavních skupin podle jejich chemické struktury. Těmito skupinami jsou azo-, triarylmethanové, chinolinové, xanténové a indigosloučeniny (4).

Syntetická barviva se dnes získávají z vysoce přečištěných ropných produktů na rozdíl od minulosti, kdy jejich zdrojem byl uhelný dehet. Syntetická barviva musí obsahovat minimálně 85% čistého barviva, zbytek tvoří nečistoty ve formě anorganických solí, sloučenin kovů a organických látek (5).

Na základě opatření, které vydal Codex Alimentarius (společný orgán FAO/WHO pro vytváření mezinárodních standardů potravin) ke značení potravin, vznikla potřeba identifikovat potravinářské přídatné látky. CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) vytvořil mezinárodní systém číslování (International Numbering System, INS), který umožňuje identifikaci potravinářských přídatných látek na seznamu přísad pomocí čísla. To nahrazuje specifický název přídatné látky, který je často dlouhý, neboť popisuje komplexní chemickou strukturu. V rámci Evropské unie byl zaveden pro identifikaci potravinářských přídatných látek systém E-kódů. Seznam INS-čísel je ale podstatně obsáhlejší než seznam E-čísel a jsou na něm i ty potravinářské přídatné látky, jejichž toxikologická nezávadnost nebyla dosud potvrzena Spojeným výborem expertů FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky (JECFA). JECFA slouží jako poradní orgán CCFAC (6).

Evropská směrnice 1994/36/EC uvádí barviva, která mohou být přidána do potravin, a také definuje potraviny, u nichž mohou být přidána jen některá barviva, jejich maximální přípustné množství a jejich omezené užití. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) má na starosti přehodnocení všech povolených aditiv v souladu s nařízením komise 2010/257/ES. Ve skutečnosti povolené množství syntetických barviv je přísně řízeno kvůli potenciálnímu ohrožení lidského zdraví. Byla prokázána existence funkčního vztahu mezi konzumací umělých barviv a zvýšeným výskytem a trváním hyperaktivity u dětí. Některá umělá barviva,

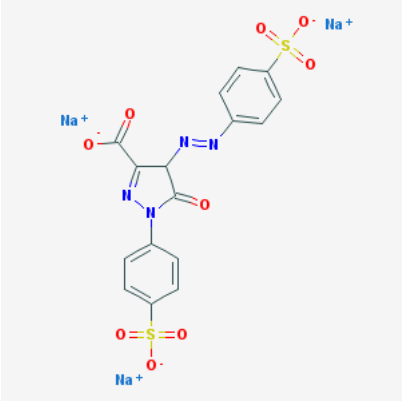
konkrétně azobarviva, mohou být redukována azoreduktázami střevních bakterií a v jaterních buňkách, a do organismu se poté uvolňují aromatické aminy. Azobarviva byla v potravinářské výrobě před vstupem ČR do EU zakázána pro jejich karcinogenitu, dnes jsou některá z nich do přesně specifikovaných koncentrací povolena (5, 7).

4.1.1. E 102 - Tartrazine

Synonyma: Yellow 5, Acid yellow 23

Sumární vzorec: $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$

MW: 534,37 g/mol (8)



Obr. 1: Vzorec Tartrazinu (8)

Tartrazin je monoazobarvivo obsahující pyrazolonový kruh. Je stabilní na světle a při vysokých teplotách. Jedná se o světle oranžový prášek, rozpustný ve vodě i alkoholu. V ČR je toto barvivo povoleno k barvení mnoha druhů potravin. Používá se v ovocných džusech, čokoládách, konzervovaném ovoci, hrášku, plechovkových omáčkách, v koření, polévkách, hořčici, cukrovinkách či zmrzlině. Společně s brilantní modří (E 133) a zelení S (E 142) se také používá k vytvoření různých odstínů zelené. Průmyslově v syntetických barvách či k barvení krmiv pro zvířata nebo zdravotních pilulek. V posledních letech je snaha jeho používání omezit (4, 9, 10).

Bylo zjištěno, že 0,1% populace není schopno snášet tartrazin. U jednotlivců mohou nastat po jeho příjmu příznaky podobné senné rýmě. Výzkumy ukazují, že někteří lidé po požití tartrazinu trpí kopřivkou, astmatem, alergickými reakcemi či tvorbou akné. Lidé alergičtí na aspirin, jsou též pravděpodobně alergičtí na tartrazin. Výsledky výzkumu Washingtonské

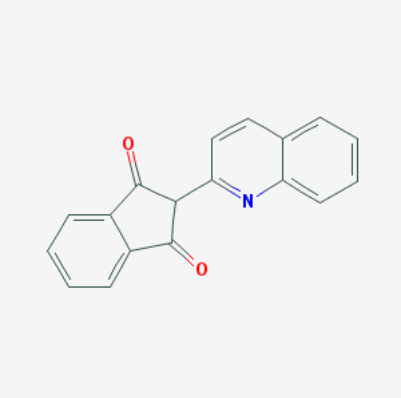
univerzity naznačují, že je tartrazin potencionální původce kožních nádorů. Možným důsledkem požívání tartrazinu je i vznik dětské hyperaktivity (9).

4.1.2. E 104 Quinoline yellow

Synonyma: Quinnophtalone, Solvent yellow 33, D a C Yellow No. 11, 11641 Yellow, Erio Chinoline Yellow 4G

Sumární vzorec: $C_{18}H_{11}NO_2$

MW: 273, 28 g/mol (11)



Obr. 2: Vzorec Quinoline yellow (11)

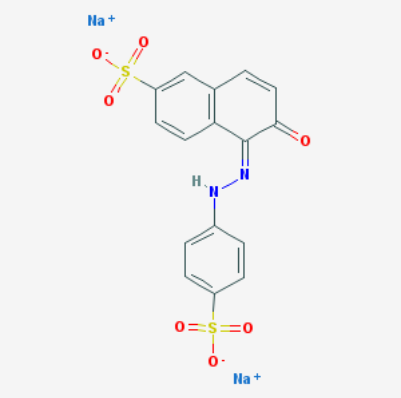
Jedná se o zeleno – žluté barvivo, které absorbuje vodu. Nalezneme jej v omáčkách, nealkoholických nápojích, cukrovinkách, hořčicích, sušenkách, žvýkačkách, mléčných výrobcích, koláčích či pudincích. Průmyslově se používá k výrobě barviv nebo jako rozpouštědlo pryskyřic. Užívá se ke konzervaci tkání nebo jiných anatomických preparátů. Je vyráběn synteticky destilací uhelného dehtu, kostí, alkaloidů nebo reakcí acetaldehydu s acetaldehydem nebo formaldehydem (12).

4.1.3. E 110 Sunset yellow

Synonyma: Žluť SY, Orange yellow, Food yellow 3, FD&C Yellow 6

Sumární vzorec: $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$

MW: 452,36 g/mol (13)



Obr. 3: Vzorec Sunset yellow (13)

Žluto – oranžové barvivo, vyráběné synteticky. Je rozpustné ve vodě, částečně i v etanolu a je termostabilní. Patří do skupiny tzv. Azobarviv. Je schváleno WHO a je povoleno pro užívání v EU a Spojených státech. Často se používá v kombinaci s barvivem E 123 (Amaranth) pro vytvoření hnědé barvy. Pro svou jasně oranžovou barvu je tato látka hojně využívána v nealkoholických nápojích, v mnoha druzích sladkostí, pekařských výrobcích, v meruňkovém džemu, marcipánu, zmrzlině, hořčici, žvýkačkách, instantních polévkách a dalších. Také se používá ve farmaceutickém průmyslu a k netrvalému barvení vlasů a v ostatní kosmetice (4, 14).

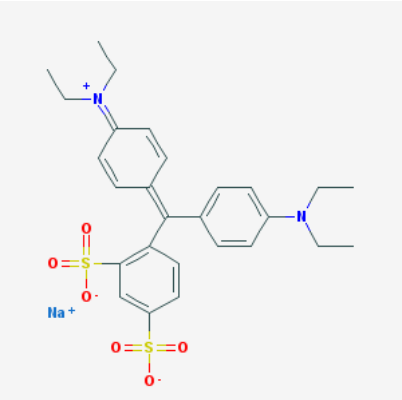
Žluť SY je chemicky odvozená od látky Sudan I, což je prokázaný karcinogen a může se ve žluti objevit jako nečistota. Může vyvolat alergické a astmatické reakce, kopřivku, otoky kůže, vyrážku či dráždit žaludek a vyvolat zvracení nebo průjem. Látka je v podezření za způsobování dětské hyperaktivity a může vyvolávat nesnášenlivost aspirinu. Přijatelný denní příjem je stanoven na 4 mg/kg tělesné hmotnosti/den (14).

4.1.4. E 131 Patent blue

Synonyma: Potravinářská modř V, Sulfan Blue, Patent blue violet, Patent Blue VF, Acid blue 1, Blue VRS, Sulphanblau

Sumární vzorec: $C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$

MW: 566,66 g/mol (15)



Obr. 4: Vzorec Patent blue (15)

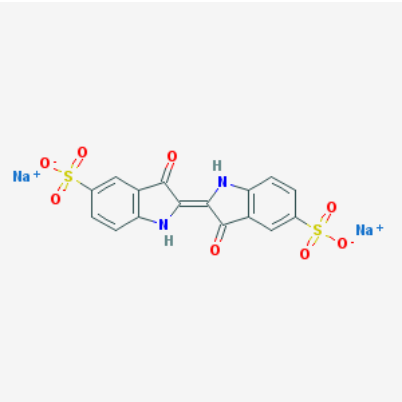
Jedná se o tmavě modré barvivo, které se používá v řadě odvětví, avšak ne moc často. V USA, Austrálii a Norsku je zakázáno. V ČR je povoleno k barvení řady potravin. Používá se například ve sladkostech, žvýkačkách, polevách, alkoholických i nealkoholických nápojích a likérech. V lékařství se využívá k barvení a následné diagnostice lymfatických uzlin (16).

4.1.5. E 132 Indigo carmine

Synonyma: Indigotin, Acid Blue 74, Food Blue No. 2, Indigotindisulfonate sodium

Sumární vzorec: $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$

MW: 466,35 g/mol (17)



Obr. 5: Vzorec Indigo carmine (17)

Jedná se o tmavě modré barvivo. Na světle velmi lehce vybledne. V ČR a USA povoleno k barvení řady potravin. Používá se při výrobě nealkoholických nápojů, pekařských výrobků, cereálií, sladkostí, želé, mražených dezertů, krémů, léků, krmiv pro zvířata nebo parfémů.

Dále se využívá k provádění ledvinových testů nebo testování mléka. Indigotin se získává z asijského indigovníku, jeho zpracování ale probíhá synteticky za přítomnosti modrých barviv (ty se vyrábějí z uhelného dehtu) (18).

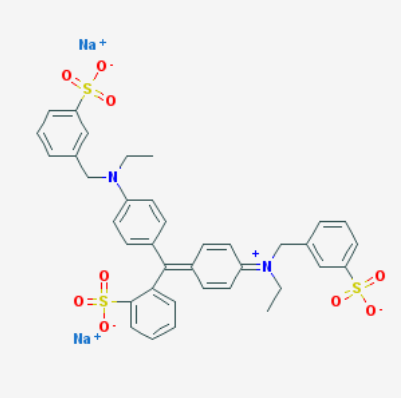
Na základě studií, prováděných na krysách, byl dokázán vznik zhoubného nádoru v místě vpichu pod kůži. Při ústním podání nebyl zjištěn žádný nežádoucí účinek. V souvislosti s Indigotinem probíhají rozsáhlé vědecké diskuze, dostupná data však nejsou dostačující na to, aby se dalo barvivo považovat za karcinogen. Může však způsobit nevolnost, zvracení, vyšší krevní tlak, vyrážky a další alergické reakce. Přijatelná denní dávka je 0 – 5 mg na 1 kg tělesné váhy (18).

4.1.6. E 133 Brilliant blue FCF

Synonyma: Acid Blue 9, Erioglaucine, Alphazurine FG, Blue 1206, FD&C Blue No. 1

Summární vzorec: $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$

MW: 792, 84 g/mol (19)



Obr. 6: Vzorec Brilliant blue FCF (19)

Jasně modré syntetické barvivo, často používané v kombinaci s dalšími syntetickými barvivy. V USA i v ČR povoleno k barvení mnoha druhů potravin. Používá se k barvení limonád, sladkostí, zmrzliny, cukrovinek, pekařských výrobků, cereálií, pudingů. Dále se používá v barvách na vlasy, make – upech, deodorantech, zubních pastách a jiných drogistických a kosmetických výrobcích. Známé je jako barvivo v likéru Blue Curacao (10, 20).

Pro jiné využití než v potravinách je barvivo zcela neškodné. Studie prováděné na krysách zjistily výskyt zhoubných nádorů v místě injekčního vpichu nebo po požití. Byly

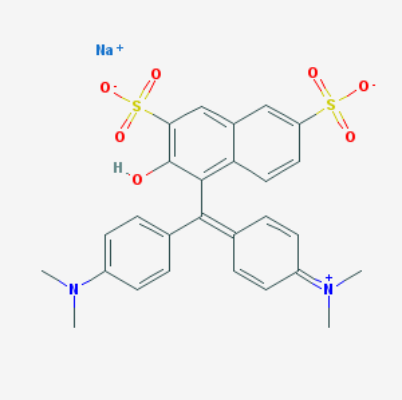
zaznamenány případy toxické povahy barviva na pacientech - v případech, kdy mělo barvivo posloužit k diagnostice aspiračních funkcí pacientů, bylo objeveno, že zabarvuje moč, stolici i pokožku. S tím byly spojené i negativní účinky jako pokles krevního tlaku, vznik metabolické acidózy nebo smrt. Vzhledem k povaze výzkumů, kdy pacienty tvořili pouze dobrovolníci, nelze přesně říci, jaké procento barviva se opravdu do těla vstřebává. Na pozoru by však měli být zejména lidé citliví na aspirin. Může způsobit astma, kopřivku či jiné alergické reakce. Přijatelná denní dávka je 0 - 12,5 mg na 1 kg tělesné váhy. Maximální přípustná úroveň barviva v nápojích 70 mg/l, v jídle 290 mg/l (20).

4.1.7. E 142 Green S

Synonyma: Acid green 50, Wool Green S, Lissamine green B, Green 5, Acid Leather Green S, Acid Brilliant Green BS, Food green S, zeleň S

Sumární vzorec: $C_{27}H_{25}N_2NaO_7S_2$

MW: 576,61 g/mol (21)



Obr. 7: Vzorec Green S (21)

Zelenomodré barvivo, které dodává potravinám, např. limonádám a sladkostem, subjektivní pocit sladší chuti. Látka je v malých dávkách pravděpodobně nezávadná. Některé cukrovinky, zmrzliny, želé, nealkoholické nápoje, konzervy s hráškem se tímto barvivem upravují. U limonád a sladkostí dodává subjektivní pocit sladší chuti. Průmyslově se používá jako dezinfekce či jako prostředek proti plísním a hmyzu. Vyrábí se synteticky z naftalenového uhelného dehtu (22).

Byla provedena studie na 24 krysách (samčí i samičí), přičemž dalších 24 kontrolních krys bylo krmeno paralelně destilovanou vodou. Výsledky prokázaly zkrácení průměrné délky

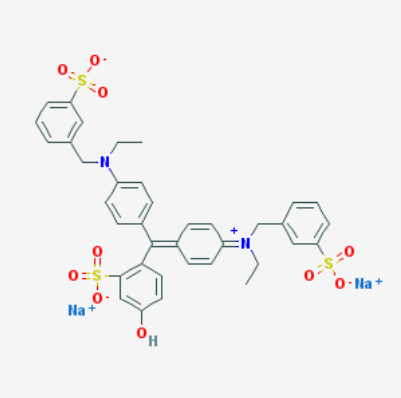
života o 3 měsíce na 21 měsíců oproti 24 měsícům u kontrolních krys. Karcinogenita se však žádným způsobem neprojevila. Látka není povolena v USA ani v Kanadě. V ČR až na výjimečné druhy potravin je povolena. Přijatelná denní dávka je 0-1 mg na 1 kg tělesné váhy. Maximální úroveň barviva v nápojích byla stanovena na 70 mg/l a 290 mg/kg v jídle (22).

4.1.8. E 143 Fast green FCF

Synonyma: Food Green 3, FD&C Green No. 3, Solid Green FCF, Food Green No. 3

Sumární vzorec: $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$

MW: 808,84 g/mol (23)



Obr. 8: Vzorec Fast green FCF (23)

Modrozelené barvivo, které je určené pro barvení potravin, drogerie či kosmetiky, která se nepoužívá v oblasti očí. Používá se k barvení želé, mražených dezertů, cukrovinek, džemů, nápojů, mléčných výrobku, sirupů, kečupů, pekařských výrobků, cereálií. Dále se využívá pro výrobu krmiv pro zvířata, kosmetiky či tělových mýdel (24).

Toto barvivo je v podezření ze způsobování alergií. Studie na zvířatech (krysách) prokázaly vznik zhoubných nádorů v místě vpichu pod kůži a vznik rakoviny močového měchýře. Světová zdravotnická organizace (WHO) však barvivo hodnotí z hlediska jeho toxicity jako přijatelné. Podle FDA (Organizace pro správu potravin a léčiv ve Spojených státech) lze látku považovat za bezpečnou. Přijatelná denní dávka je 0-5 mg na 1 kg tělesné váhy. Maximální úroveň látky v nápojích byla stanovena na 290 mg/l, v jídle 70 mg/kg. V ČR tato látka není povolena pro výrobu potravin, v USA je její použití povoleno (24).

4.2. Metody stanovení syntetických barviv

V odborné literatuře existuje řada metod, které se zabývají stanovením syntetických barviv v potravinách a nápojích. Nejčastější používané analytické metody jsou metody chromatografické. Pro porovnání jsou uvedeny podmínky separace některých z nich.

4.2.1. HPLC – DAD

Kolona: Waters Atlantis T3 (2,1 mm x 150 mm, 3 µm)

MF: solvent A - 20 mM octan amonný, solvent B - ACN

Gradient: 5% solvent B (počátek), 5 – 40% solvent B (0 – 4 min.), 40 - 90% solvent B (4 – 9 min.) a 90% solvent B (9 – 11 min). Po 11. minutě byla koncentrace solventu B snížena na 5%, promývání: 5 min.

Celková doba analýzy: 16 min., průtoková rychlost MF: 0,2 ml/min, teplota: 30 °C

Detektor diodového pole: nastaven na 2 vlnové délky: 484 a 526 nm

Současné stanovení 7 barviv: Ponceau 4RC, Sunset yellow, Allura red, Azophloxine, Ponceau xylidine, Erythrosine and Orange II (1)

4.2.2. HPLC – DAD

Kolona: Discovery C18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA, 250 nm x 4,6 nm, i.d.), plně end - kapovaná ,velikost částic 5 µm

MF: solvent A – 1% vodný roztok octanu amonného, upravený pomocí NaOH (10%) na pH 7,5, solvent B – směs MeOH a ACN (80:20)

Gradient: 100% solvent A a 0% solvent B (počátek), 100% solvent A a 0% solvent B (0 – 2 min.), 47,5% solvent A a 52,5% solvent B (2 – 22 min.), 0% solvent A a 100% solvent B (22 – 37,6 min.), 0% solvent A a 100% solvent B (37,6 – 40 min.). Ve 41. minutě se koncentrace solventů A a B vrátila do počátečního stavu a následovaly 2 minuty promývání.

Celková doba analýzy: 43 min., průtoková rychlost MF: 1,5 ml/min., nástřik 20 µl, teplota: laboratorní

Detektor diodového pole: nastaven na měření absorbance barviv od 350 nm do 800 nm

Současné stanovení 13 barviv: Tartrazine, Suset yellow, Amaranth, Erythrosine, Quinoline yellow, Indigo carmine, Green S, Carmoisine, Ponceau 4R, Red 2G, Brilliant blue FCF, Allura red AC a Patent blue (3)

4.2.3. HPLC – DAD

Kolona: Luna C8 (150 mm x 4,6 mm, velikost částic 3 μm, Phenomenex, CA, USA)

MF: solvent A - ACN, solvent B - 100 mM pufr octanu sodného, pH 7

Gradient: 1% solvent A a 99% solvent B (0 – 2 min.), 1 – 40% solvent A a 99 – 60% solvent B (2 – 25 min.), 40% solvent A a 60% solvent B (25 – 30 min.), 40% - 1% solvent A a 60 – 99% solvent B (30 – 35 min.)

Celková doba analýzy: 35 min., průtok: 1 ml/min., teplota: laboratorní, nástřik: 20 μl

Detektor diodového pole: nastaven na měření absorbance barviv od 240 do 700 nm (515 nm červená, 420 a 480 nm žlutá a 620 nm modrá barviva)

Současné stanovení 17 barviv: Azorubine, Amaranth Cochineal red A, Red 2G, Allura red, Azocarmine B, Azocarmine G, Ponceau 2R, Ponceau 6R, Tartrazine, Sunset yellow, Quinoline yellow, Orange II, Metanil yellow, Patent blue , Indigo carmine a Brilliant blue FCF (7)

4.2.4. RP – HPLC –DAD

Kolona: Agilent Zorbax Eclipse XDB – C18 (4,6 mm x 250 mm, 5μm), Phenomenex C18 ochranná kolonka (4 mm x 3 mm) Phenomenex, Torrance, CA

MF: solvent A - 0,1 M vodný roztok octanu amonného, solvent B - směs MeOH a ACN (80:20), eluce isokratická - směsí solventů A a B v poměru 55:45

Průtok: 0,8 ml/min., teplota: laboratorní, nástřik: 5 μl

Detektor diodového pole: nastaven na rozmezí 350 – 800 nm

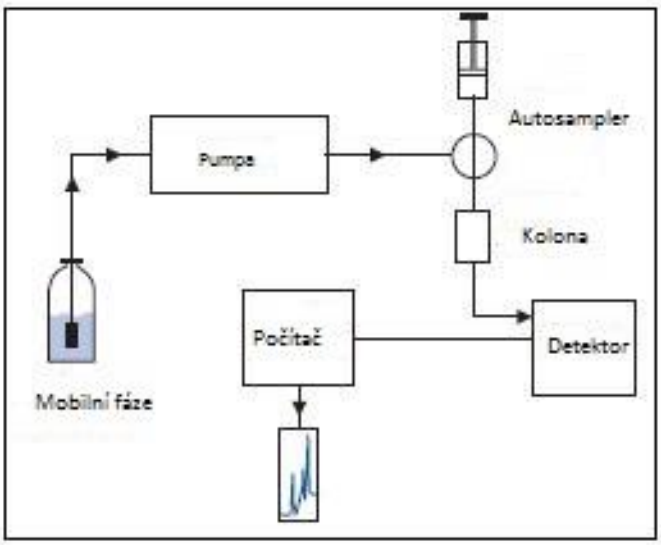
Současné stanovení: Tartrazine, Sunset yellow, Allura red, a Azorubine (25)

4.3. HPLC

HPLC chromatograf obsahuje vysokotlaké čerpadlo, které čerpá mobilní fázi ze zásobníku a umožňuje konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1 – 10 ml/min) za vysokého tlaku (až 40 MPa). Při dělení látek využíváme 2 typy eluce: izokratická – slouží k dělení analytů, jejichž eluční parametry se příliš neliší, jednou mobilní fází, jejíž složení se během procesu nemění. A gradientová eluce, která slouží k separaci složek, jejichž eluční vlastnosti jsou velmi rozdílné. V průběhu separace je pomocí směšovače přidáváno rostoucí množství jedné mobilní fáze s větším elučním účinkem k druhé. Tím vzniká plynulý koncentrační gradient mobilní fáze během separace. Vzorek je dávkován buď pomocí speciální injekční mikrostříkačky nebo autosamplerem (26).

Účinné dělení je dáno kvalitou sorbentu (stacionární fáze), tzn. velikostí částic, tvarem, porozitou a strukturou (částice, monolit atd.), a také chemickou modifikací. Většina HPLC aplikací využívá nemodifikované nebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu nebo jiné další polymery, či hybridní stacionární fáze. Mobilní fáze pro HPLC separace musí být zbavené rozpustných plynů, toho docílíme probubláváním heliem nebo degaserem (26).

Detektory používané při HPLC musí splňovat určité požadavky jako je: vysoká citlivost, univerzálnost, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci, reprodukovatelnost a linearita odezvy. Nejvíce se užívají spektrometrické detektory (26).



Obr. 9: Schéma HPLC systému

4.4. Monolitické kolony

Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitické HPLC kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Klasické 3 – 5 μm částicové kolony vykazují výbornou separační účinnost, ale se snižující se velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, takže maximální rychlost průtoku je omezená. Největší výhodou monolitických kolon ve srovnání s klasickými, částicemi plněnými, kolonami jsou jejich hydrodynamické vlastnosti (28).

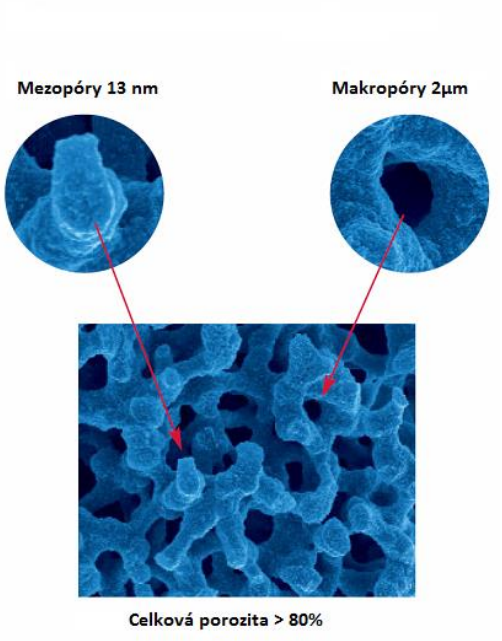
Monolitické stacionární fáze obsahují dva typy pórů: a) velké póry (makropóry) zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, b) středně velké póry (mezopóry) poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje použití monolitů při značně vysokých průtokových rychlostech mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti a to i pro separované makromolekuly (bílkoviny, syntetické polymery) (28, 29).

Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze rozdělit na anorganické monolity, makropórézní polymerní monolity, stlačitelné monolity (komprimované) (28).

4.4.1. Anorganické monolity

Připravují se hydrolytickou polymerací tetramethoxysilanu nebo tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octové v přítomnosti polyethylenglykolu. Technologie výroby umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou, kdy vznikají výhradně mezopóry a makropóry vhodných a nastavitelných rozměrů. Makropóry vytváří síť průtokových kanálků, která umožňuje aplikaci vysokých průtokových rychlostí bez významného nárůstu zpětného tlaku v systému. Mezopóry naplněné stagnantní mobilní fází pak umožňují molekulám analytu přístup k místům interakce se stacionární fází. Objem mezopórů ovlivňuje odpor proti převodu hmoty, a tím rozmývání elučních zón. Výhodou je, že existuje v podstatě jeden unikátní postup výroby silikagelových monolitů a popis jejich složení. Nevýhodou je objemová kontrakce, ke které při zrání monolitu dochází, což následně vyžaduje zatěsnění monolitu do pláště/ kolony před jeho aplikací v HPLC. Připravené silikagelové monolitické kolony mohou být snadno modifikovány, například oktadecylovými funkčními skupinami pro použití v chromatografii s reverzními fázemi. Monolitické kolony poskytují srovnatelnou

účinnost jako kolony konvenční s velikostí částic 5 µm. Výhodou monolitu je ovšem skutečnost, že mohou být aplikovány podstatně vyšší průtoky mobilní fáze. Silikagelové monolity se na rozdíl od organických monolitů osvědčily i při separaci malých molekul (28, 29).



Obr. 10: Mezopóry a makropóry monolitu (SEM obrázek)

4.4.2. Polymerní monolity

Tyto monolity jsou připravovány přímo v prázdné koloně, která je naplněna polymerační směsí, tedy směsí monomerů, porogenů a iniciátorem. Pak je uzavřena a je provedena polymerace za zvýšené teploty. Monolit je následně promyt vhodným rozpouštědlem pro odstranění nezpolymerizovaných látek a může být rovnou použit pro HPLC separace. Mezi organické polymery používané pro výrobu monolitů jsou řazeny především polymerní gely na bázi hydroxyethylmethakrylátu, glycidyl – methakrylátu a polystyrenu (29).

Složením polymerizační směsi lze výrazně ovlivnit výsledné vlastnosti monolitu, jako je struktura a velkost pórů, účinnost separace, zpětný tlak a biokompatibilita. Polymerní monolity nalézají velmi široké uplatnění v proteomických aplikacích. Jsou zde používány ve formě kapilárních kolon, často velmi dlouhých, aby tak byla získána vysoká kapacita separace pro komplexní proteomické vzorky (29).

5. Chemikálie, pomůcky a přístrojové vybavení

5.1. Standardy barviv

E 102 Tartrazine 99% (Fluka)

E 132 Indigo carmine 98% (Fluka)

E 104 Quinoline yellow 95% (Fluka)

E 110 Sunset yellow 95% (Fluka)

E 142 Green S 98% (Fluka)

E 133 Brilliant blue FCF, koncentrace neuvedena (Sigma – Aldrich)

E 131 Patent blue 97% (Fluka)

E 143 Fast green FCF 98% (Fluka)

5.2. Chemikálie

Kyselina octová ledová 99% (Fluka)

Amoniak 26% (Sigma – Aldrich)

Acetonitril (HPLC Gradient grade)

Methanol p.a. (HPLC Gradient grade, Sigma – Aldrich)

Destilovaná voda (Millipore systém)

5.3. Vzorky Velikonočního piva

Jarní pivo 11° (Primátor, Náchod), (rok 2014)

Krasličák 14° (Ježek, Jihlava), (rok 2014)

Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice), (rok 2014)

Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno), (rok 2014)

Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava), (rok 2014)

Rohozec 11° (Rohozec, Malý Rohozec), (rok 2015)

Zelená nefiltrovaná 12° (Žlebské Chvalovice), (rok 2015)

Velikonoční zelený ležák 12° (Purkmistr, Plzeň), (rok 2015)

Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany), (rok 2015)

Valášek 12° (Valášek, Vsetín), (rok 2015)

Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno), (rok 2015)

5.4. Přístrojové vybavení

Chromatografická sestava: Shimadzu LC - 10

Pumpy: LC – 10 AD VP

Degasser: DGU – 14 A

Autosampler: SIL – HTA

Termostat kolony: CTO – 10 AC VP

Kolona: Chromolith Performance CN 100 – 4,6 mm

Předkolona: Chromolith CN 5 – 4,6 mm Merck

Vyhodnocení: Chromatografický software LC Solution

pH metr: Hanna Instruments

Ultrazvuková lázeň: Banderin Sonotex digitex

Analytické váhy: Sartorius CPA 12 4S

Další pomůcky: laboratorní sklo, pipety, PTFE filtry a injekční stříkačky

Detektor: DAD detektor SPD M – 10A VP

6. Roztoky

6.1. Příprava pracovních roztoků pro optimalizaci

Navážky jednotlivých standardů byly rozpuštěny v 1 ml MeOH a poté se roztoky standardů zředili 20x s vodou do vialek (50 µl roztoku + 950 µl vody). Navážky jednotlivých standardů jsou uvedeny v Tab. 1. Dále byl připraven směsný roztok všech standardů tak, že do vialky bylo napipetováno 100 µl z každého připraveného zásobního roztoku.

Tab. 1: Navážky jednotlivých standardů použitých k přípravě zásobních roztoků

Barvivo	navážka (mg)
Tartrazine	1,07
Indigo carmine	0,95
Quinoline yellow	1,13
Sunset yellow	1,04
Green S	0,98
Brilliant blue FCF	1,15
Patent blue	1,05
Fast green FCF	1,01

6.2. Příprava kalibračních roztoků pro validaci

Vzhledem k tomu, že při přípravě předchozích roztoků pro optimalizaci separačních podmínek nedošlo k úplnému rozpuštění některých barviv v methanolu, bylo nutné pro validaci metody připravit nové roztoky standardů v jiném rozpouštědle, tak aby byla zajištěná úplná rozpustnost a deklarovaná koncentrace. Experimentálním zkoušením byla nalezena vhodná rozpouštědla pro „problematické“ standardy Tartrazine, Indigo carmine, Quinoline yellow a Sunset yellow. Navážky standardů pak byly rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle viz Tab. 2.

Tab. 2: Navážky a rozpouštědla pro přípravu kalibračních roztoků

Barvivo	navážka (mg)	rozpouštědlo
Tartrazine	5,11	1 ml MeOH + 0,25 ml H_2O
Indigo carmine	5,19	1,25 ml H_2O
Quinoline yellow	5,06	1,25 ml THF
Sunset yellow	4,92	1,25 ml H_2O
Green S	5,04	1,25 ml MeOH
Brilliant blue FCF	5,09	1,25 ml MeOH
Patent blue	5,02	1,25 ml MeOH
Fast green FCF	5,11	1,25 ml MeOH

Následně byl ze standardních roztoků připraven směsný roztok, o koncentraci 500 mg/l, smícháním 250 µl každého standardu. Tento roztok byl následně naředěn vodou dle následující Tabulky 3. Tímto způsobem jsme si připravili 10 roztoků o koncentracích 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100 mg/l, 75 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l a 5 mg/l.

Tab. 3: Příprava kalibračních roztoků s H_2O

koncentrace (mg/l)	V* směsného roztoku (µl)	V* vody (µl)
500	500	0
400	400	100
300	300	200
200	200	300
100	100	400
75	75	425
50	50	450
25	25	475
10	10	490
5	5	495

***V - objem**

Bohužel po přidání vody se v roztocích pro kalibraci vytvořily sraženiny a výsledky se nedaly vyhodnotit, navíc koncentrace 300 mg/l a výš byly už velmi vysoké a jednotlivé látky se nedaly stanovit. Proto bylo třeba připravit nové kalibrační roztoky stejným způsobem, ale ke zředění byl místo vody použit MeOH a roztoky byly připraveny jen do koncentrace 200 mg/l viz Tab. 4. Bohužel ani tento postup nebyl optimální pro všechny stanovované látky.

Vzhledem k tomu, že kalibrační závislost pro Indigo carmine a Quinoline yellow vycházela u vyšších koncentrací velmi špatně (korelační koeficient Indigo carminu byl 0,81801 a pro Quinoline yellow 0,97963), byly roztoky nakonec ředěny do 50% ACN s vodou (1:1). Tato směs nevykazovala žádné známky precipitace, což bylo potvrzeno i změřením linearity pro vyšší koncentrace.

Tab. 4: Příprava kalibračních roztoků s 50% acetonitrilem

koncentrace (mg/l)	V směsného roztoku (µl)	V 50%ACN (µl)
200	200	300
100	100	400
75	75	425
50	50	450
25	25	475
10	10	490
5	5	495
2	2	498

7. Optimalizace metody

Cílem této práce bylo vyvinout optimální chromatografickou metodu, která dokáže separovat a kvantitativně stanovit barviva: E 102 Tartrazine, E 132 Indigo carmine, E 104 Quinoline yellow, E 110 Sunset yellow, E 142 Green S, E 133 Brilliant blue FCF, E 131 Patent blue a E 143 Fast green FCF ve směsi v přijatelném čase v porovnání s ostatními publikovanými metodami.

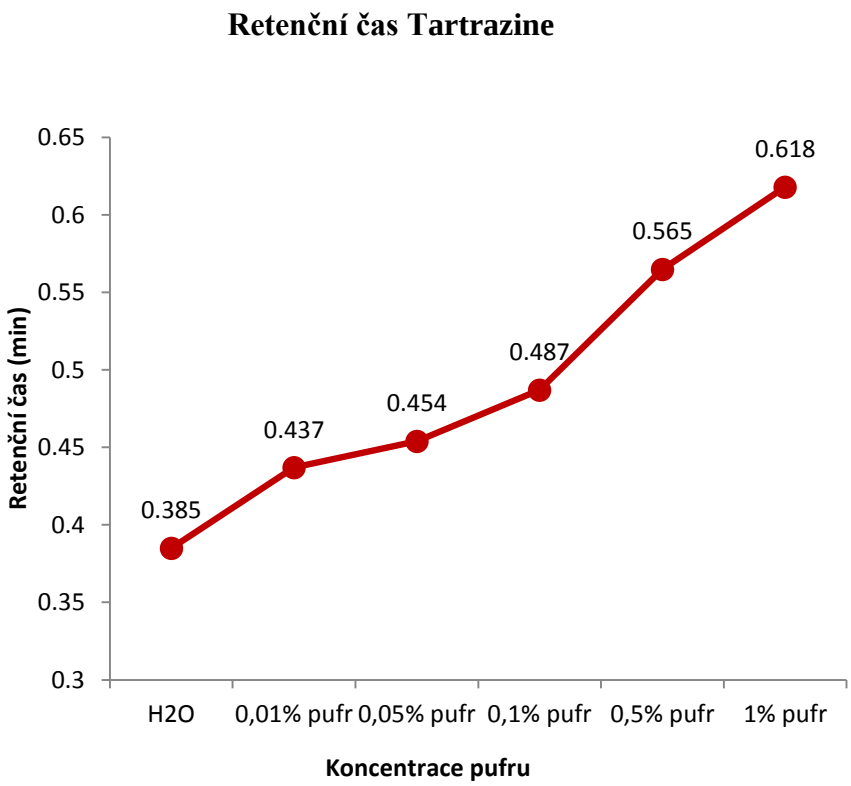
7.1. Kolona

Pro separaci byla použita monolitní kolona Chromolith Performance CN 100 – 4,6 mm s předkolonkou Chromolith CN 5 – 4,6 mm Merck. Volba této kolony vycházela z předchozí diplomové práce (T. Boháčová - Vývoj metody zelené chromatografie pro stanovení červených barviv v nápojích (30)), kde se stacionární fáze Chromolith CN jevila jako ideální pro separaci červených barviv bez použití organických rozpouštědel. Jako ideální mobilní fáze se v našem případě po testování různých směsí pufrů a organických rozpouštědel ukázal být MeOH v gradientové eluci. Optimalizace separace na koloně Chromolith Performance CN 100 – 4,6 mm je detailněji rozebrána v následujících kapitolách.

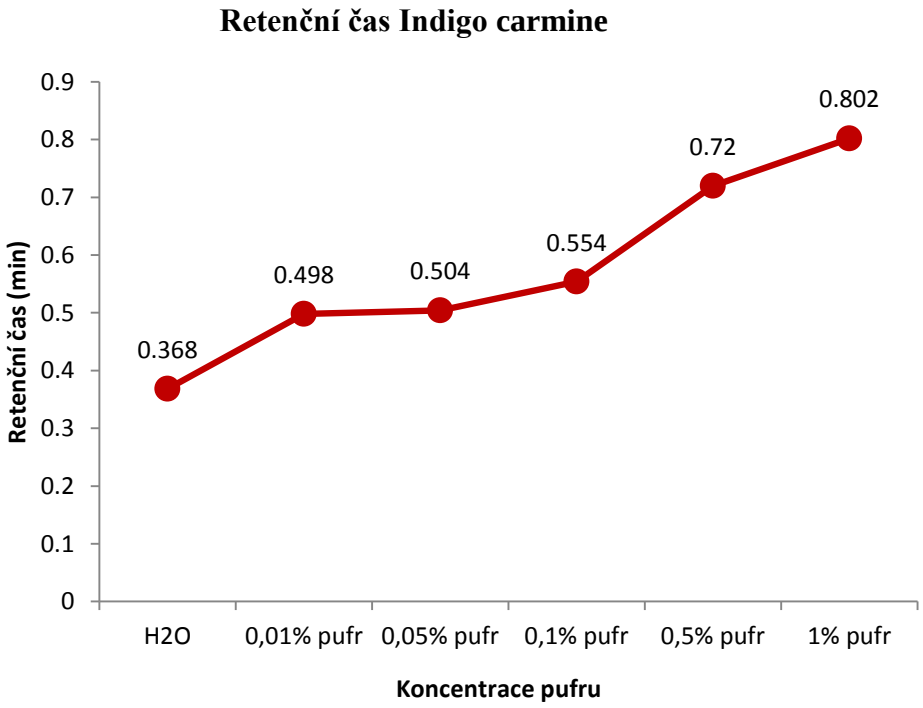
7.2. Mobilní fáze

7.2.1. Kyselina octová s NH_3

Nejprve byla zkoušena jako mobilní fáze čistá voda a pufr, v našem případě kys. octová s NH_3, upravená na pH 7, (kys. oct. + NH_3, pH7), v koncentraci 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%. Retenční čas analytů se s rostoucí koncentrací kyseliny zvyšoval, viz následující grafy retencí jednotlivých barviv.



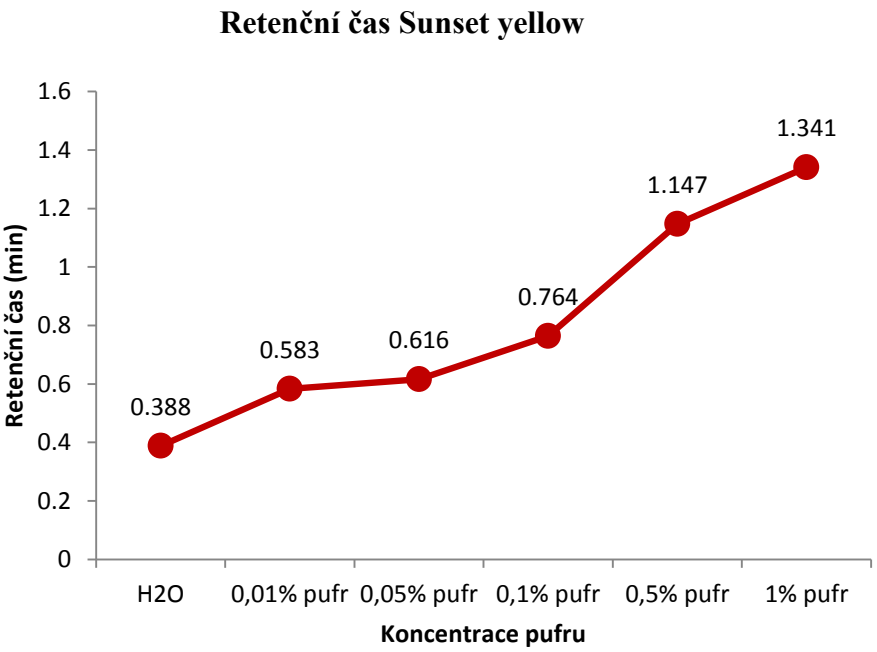
Obr. 11: Retenční čas Tartrazinu v závislosti na rostoucí koncentraci pufru



Obr. 12: Retenční čas Indigo carminu v závislosti na rostoucí koncentraci pufru

Retenční čas Quinoline yellow

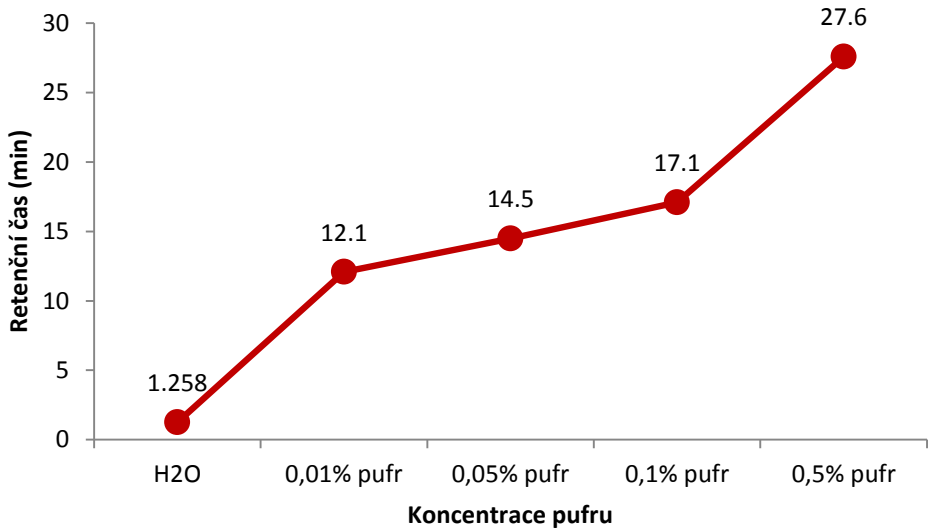
Vzhledem k tomu, že retenční časy chinolinové žluti byly delší než 20 min. i pro nejnižší koncentraci pufru, tak retenční časy tohoto analytu při hledání vhodné mobilní fáze nebyly testovány. Předpokladem eluce chinolinové žluti bylo použití organické fáze, která byla testována až v dalších krocích.



Obr. 13: Retenční čas Sunset yellow v závislosti na rostoucí koncentraci pufru

Retenční čas Green S

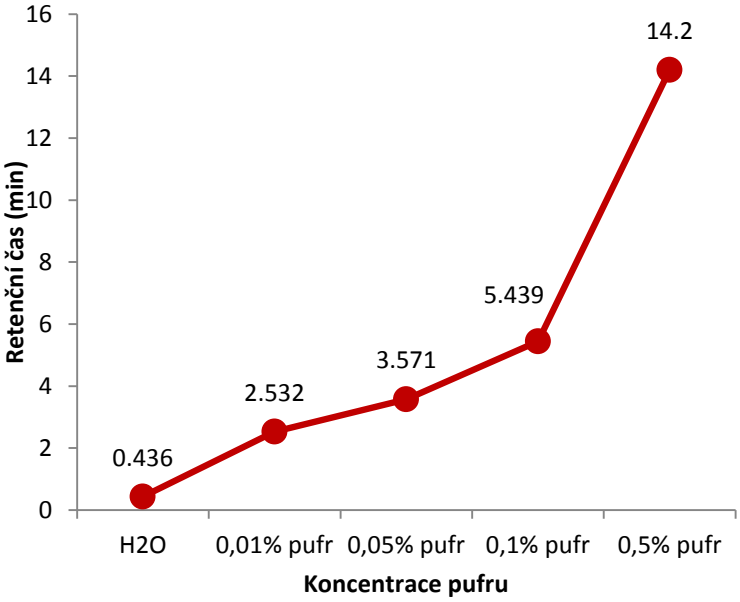
V 1% pufru se retenční čas prodloužil nad 30 min., proto nebyla tato koncentrace již vyhodnocována.



Obr. 14: Retenční čas Green S v závislosti na rostoucí koncentraci pufru

Retenční čas Brilliant blue FCF

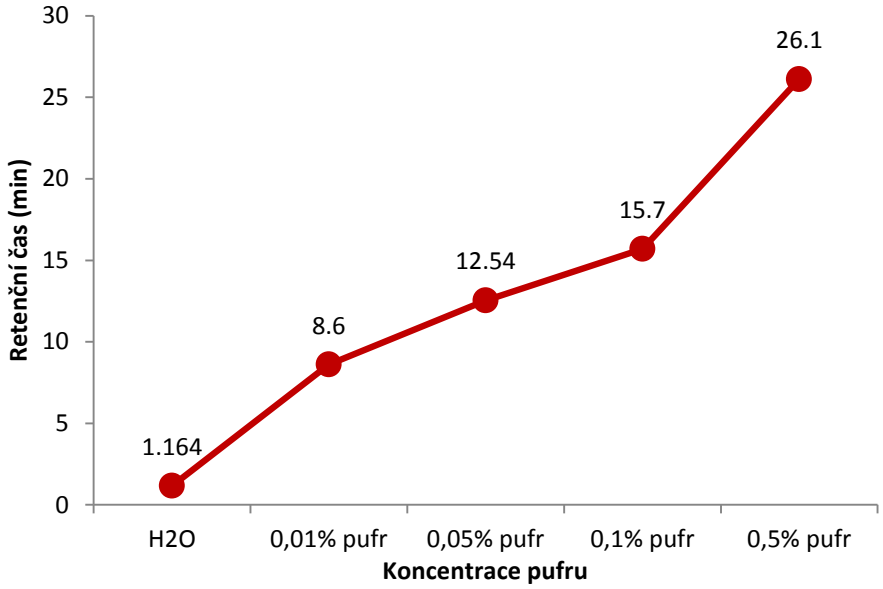
V 1% pufru se retenční čas prodloužil nad 30 min., proto nebyla tato koncentrace již vyhodnocována.



Obr. 15: Retenční čas Brilliant blue FCF v závislosti na rostoucí koncentraci pufru

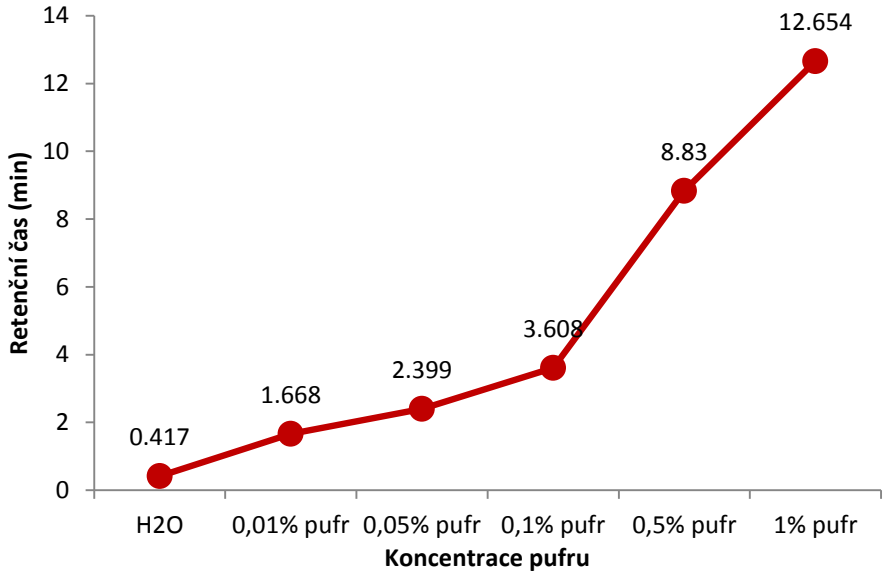
Retenční čas Patent blue

V 1% pufru se retenční čas prodloužil nad 30 min., proto nebyla tato koncentrace již vyhodnocována.



Obr. 16: Retenční čas Patent blue v závislosti na rostoucí koncentraci pufru

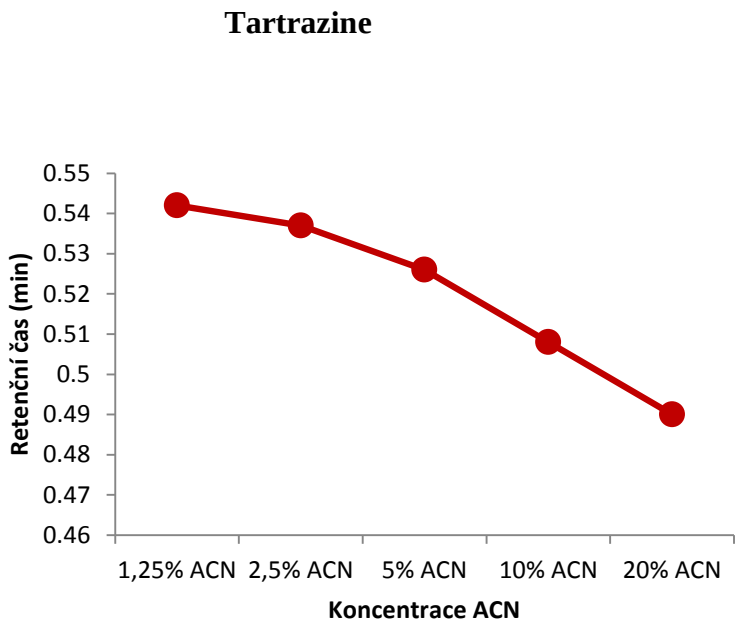
Retenční čas Fast green FCF



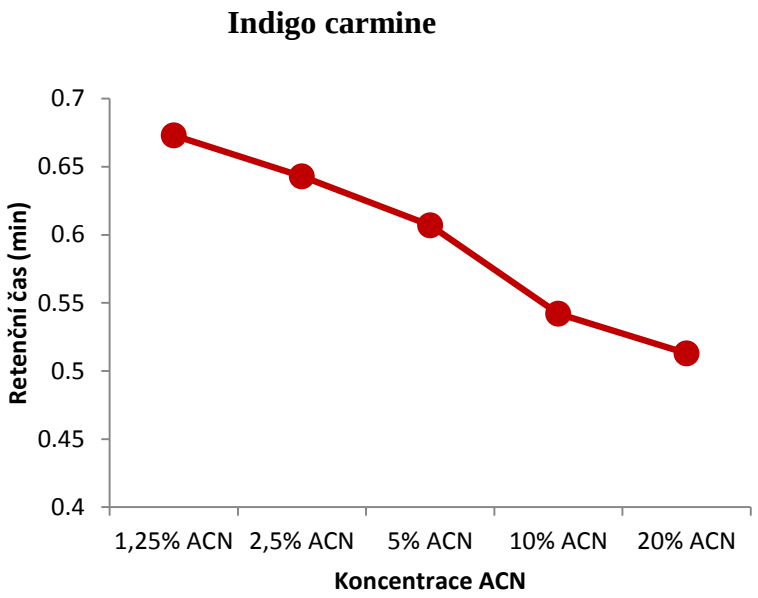
Obr. 17: Retenční čas Fast green FCF v závislosti na rostoucí koncentraci pufru

7.2.2. Pufr s přídavkem ACN

Vzhledem k dlouhým t_R některých látek byly dále zkoušeny různé kombinace pufru, 0,5% kys. oct. + NH_3, pH 7, v kombinaci s přídavkem ACN o různé koncentraci (1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%). Dlouhé retenční časy většiny stanovovaných látek se výrazně zkrátily, jak je zaznamenáno v následujících grafech.

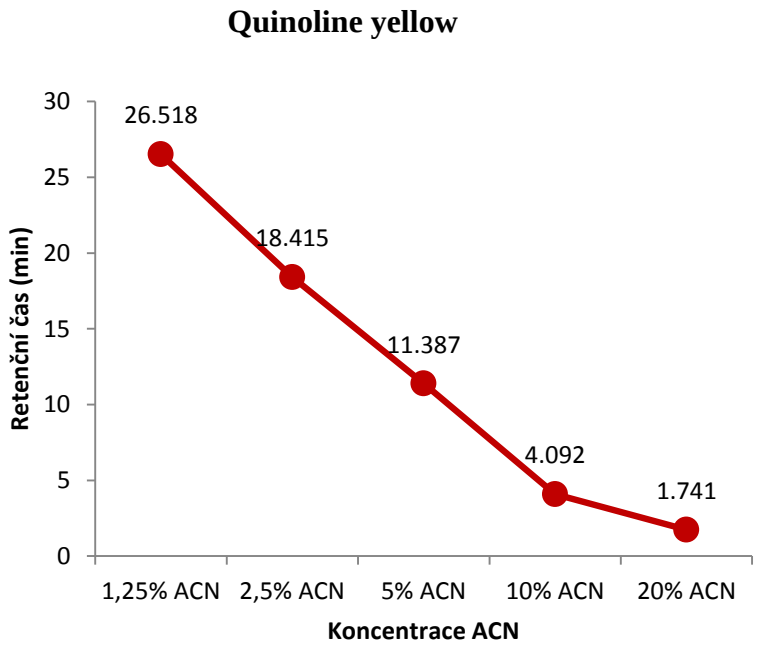


Obr. 18: Retenční čas Tartrazinu v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN

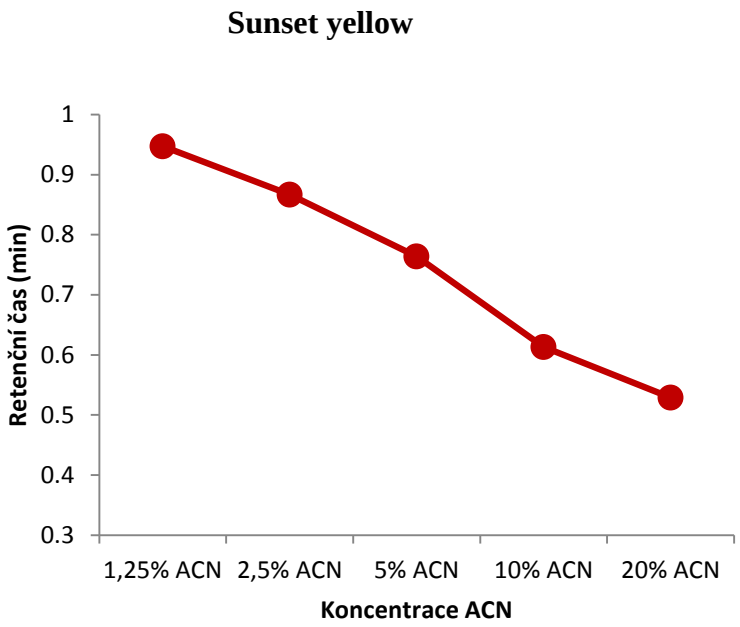


Obr. 19: Retenční čas Indigo carminu v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN

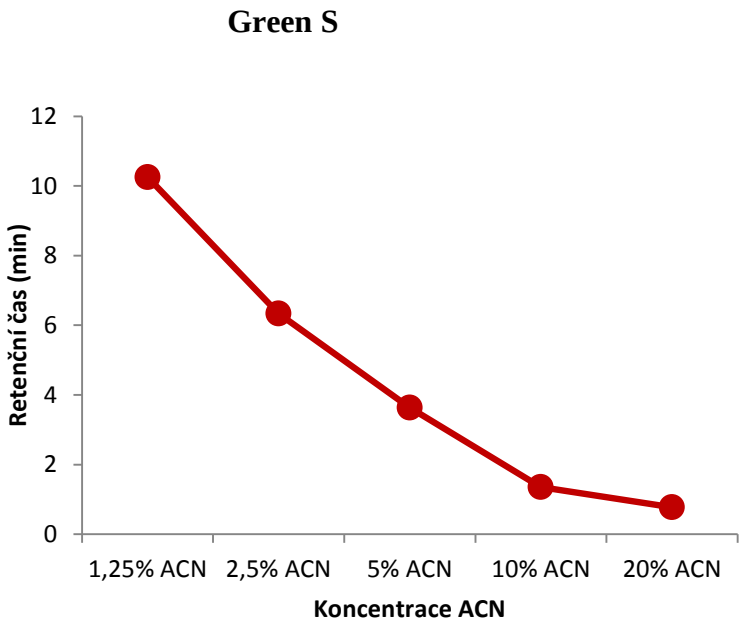
.



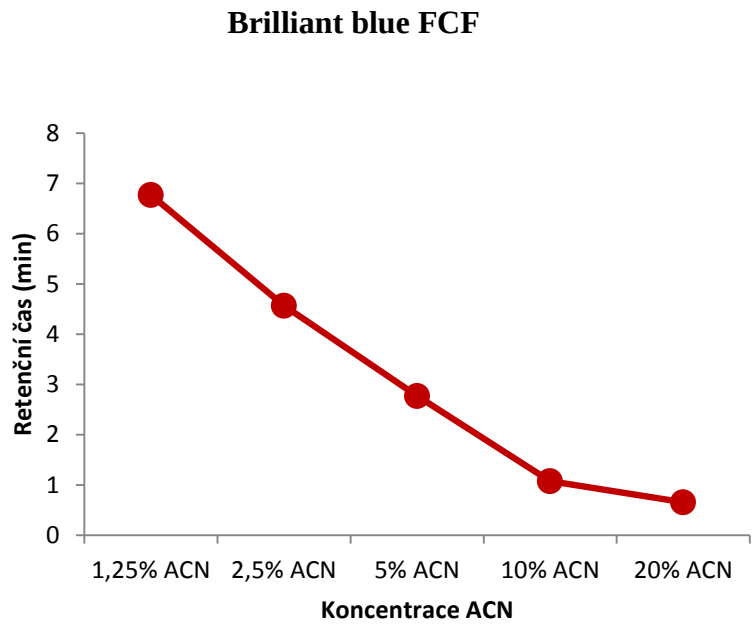
Obr. 20: Retenční čas Quinoline yellow v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN



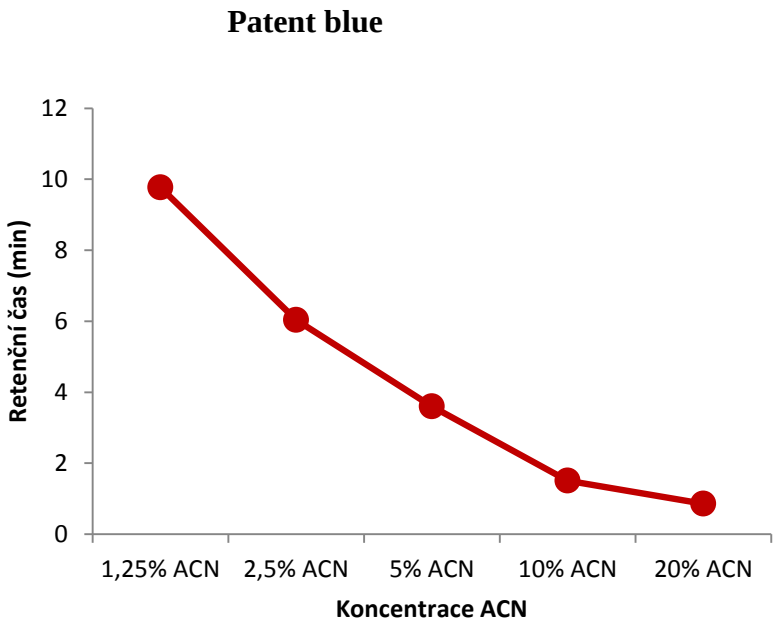
Obr. 21: Retenční čas Sunset yellow v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN



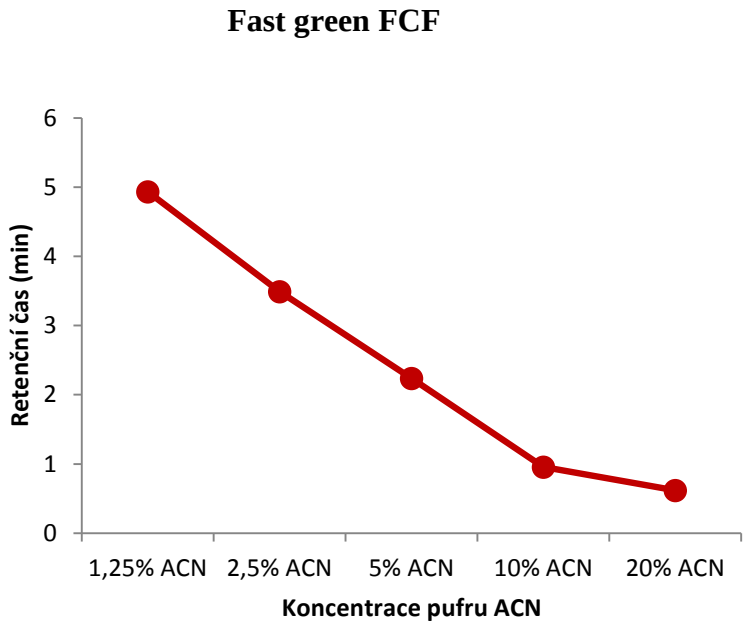
Obr. 22: Retenční Green S v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN



Obr. 23: Retenční čas Brilliant blue FCF v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN



Obr. 24: Retenční čas Patent blue v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN



Obr. 25: Retenční čas Fast green FCF v 0,5% pufru s přídavkem různých koncentrací ACN

7.3. Optimalizace gradientové eluce

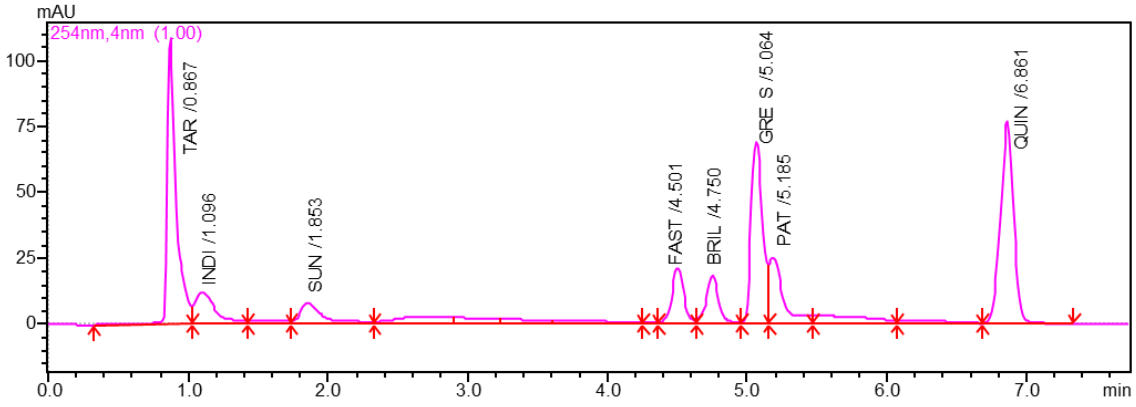
Vzhledem k tomu, že se po přidání ACN k testovanému octanovému pufru t_R látek zkrátili, byla tato kombinaci použita pro separaci stanovovaných látek a bylo třeba najít vhodné podmínky gradientové eluce. Tedy podmínky kdy dojde k dostatečné separaci analyzovaných látek a jejich píky budou mít optimální symetrii. Z předchozích grafů je patrné, že některé dvojice látek mají velmi podobné t_R, konkrétně se jedná o páry: Tartrazine – Indigo carmine a Green S – Patent blue. Proto cílem této optimalizace bylo najít takový gradient, který umožní stanovení všech analyzovaných látek s dostatečným rozlišením.

7.3.1. Gradient 01

Byl použit 1% octanový pufr o pH 7 a 40% ACN ve vodě, průtok byl nastaven na 2 ml/min.

Tab. 5: Podmínky separace pro gradient 1

čas (min.)	mobilní fáze	
	1% pufr (%)	40% ACN (%)
0.01	start	
1.00	100	0
10.00	0	100
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 26: Chromatogram pro gradient 01

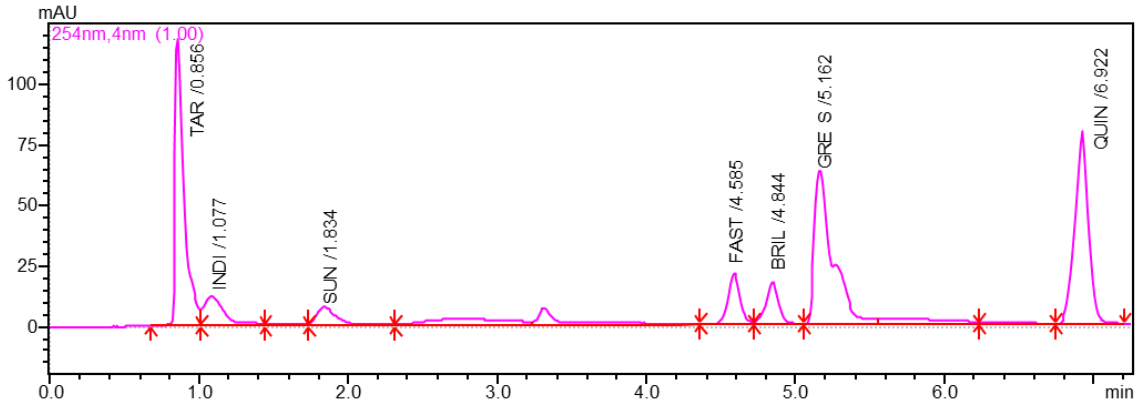
Za těchto podmínek se odseparovaly skoro všechny látky, kromě Green S a Patent blue, které vytvořily dvojitý pík. Byl vyzkoušen i 20% ACN, výsledek separace byl velmi podobný a navíc se významně prodloužili retenční časy t_R Patent blue, Green S a Quinoline yellow.

7.3.2. Gradient 02

Byl použit 1% pufr a čistý ACN z důvodů zachování stejné koncentrace pufru, průtok byl zachován na 2 ml/min

Tab. 6: Podmínky separace pro gradient 02

čas (min.)	mobilní fáze	
	1% pufr (%)	ACN (%)
0.01	start	
1.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 27: Chromatogram pro gradient 02

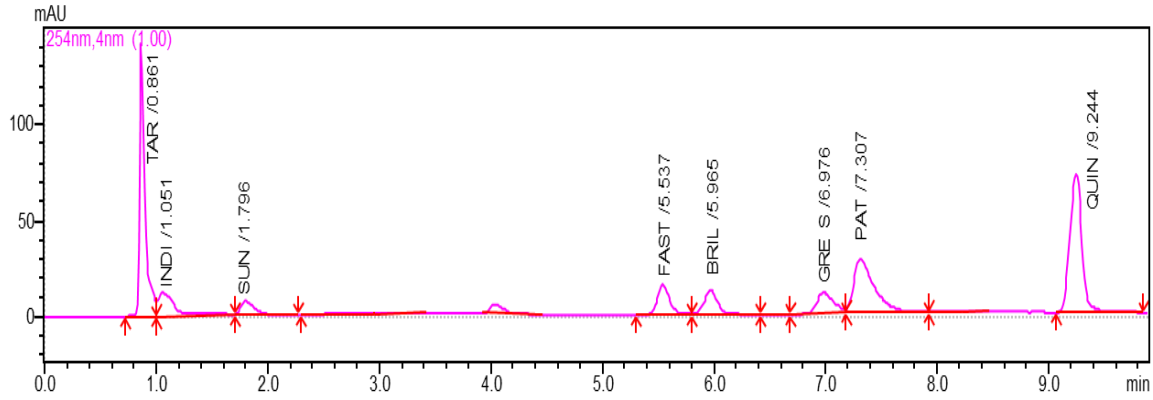
Za těchto podmínek se stále vyskytoval dvojitý pík Green S a Patent blue. Byl také testován gradient do hodnoty 20% čistého ACN, kdy výsledný chromatogram byl obdobný jako při použití čistého ACN do hodnoty 40% a navíc se zkrátili t_R Tartrazinu a Indigo carminu.

7.3.3. Gradient 03

Vzhledem k tomu, že se s ACN nepodařilo odseparovat od sebe Patent blue a Green S, byla zvolena kombinace 1% octanového pufru o pH 7 a gradient s čistým MeOH místo ACN. Průtok byl nastaven na 2 ml/min.

Tab. 7: Podmínky separace pro gradient 03

čas (min.)	mobilní fáze	
	1% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
1.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 28: Chromatogram pro gradient 03

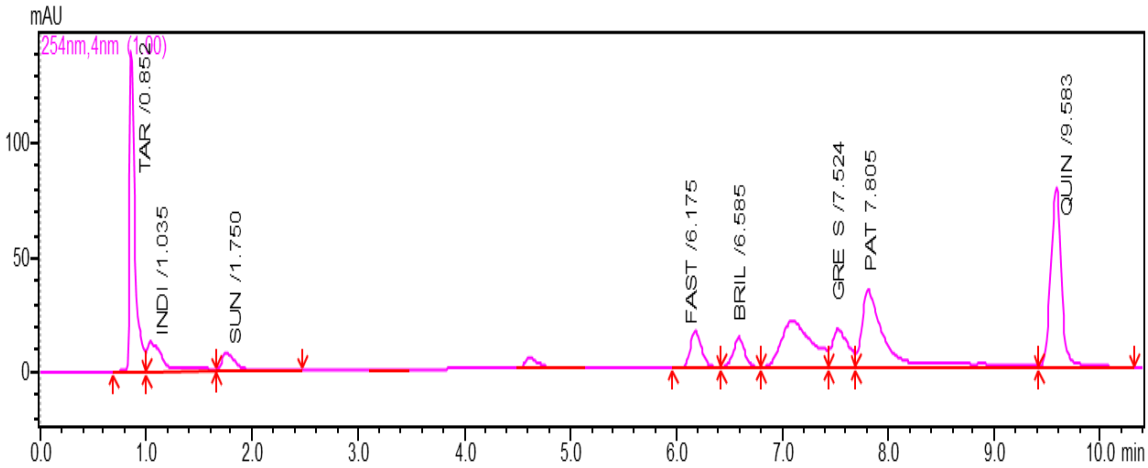
Za těchto podmínek se začaly mírně odlišovat t_R Green S a Patent blue, navíc nedocházelo k separaci Tartrazin s Indigo carminem (dvojitý pík). Dále byl ještě zkoušen MeOH do 20%, ale účinnost separace byla nižší než při použití MeOH do 40%.

7.3.4. Gradient 04

Dále byly testovány upravené podmínky separace za použití MeOH a 1% pufru. Kdy čistý pufr protékal kolonou po dobu 2 minut a průtok byl stále nastaven na 2 ml/min. Tzn., že start gradientu byl o dvě minuty opožděn.

Tab. 8: Podmínky separace pro gradient 04

čas (min.)	mobilní fáze	
	1% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 29: Chromatogram pro gradient 04

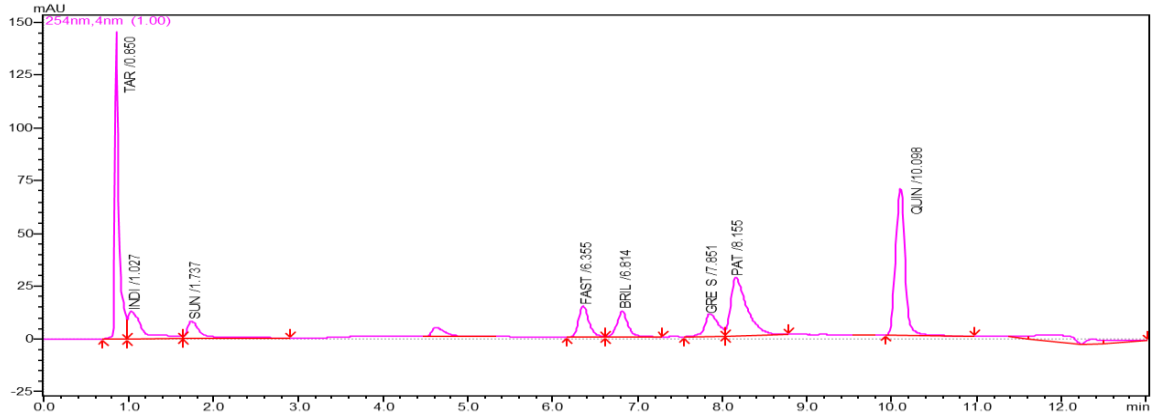
Stále přetrvával problém s dvojitými píky u párů Tartrazinu s Indigo carminem, Green S s Patent blue a Brilliant blue FCF s Fast green FCF.

7.3.5. Gradient 05

Proto byl dále testován posun času celého gradientu o 1 minutu z důvodu pozvolnějšího nárůstu koncentrace organické složky, průtok byl opět ponechán na 2 ml/min.

Tab. 9: Podmínky separace pro gradient 05

čas (min.)	mobilní fáze	
	1% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
11.00	60	40
11.10	100	0
13.00	stop	



Obr. 30: Chromatogram pro gradient 05

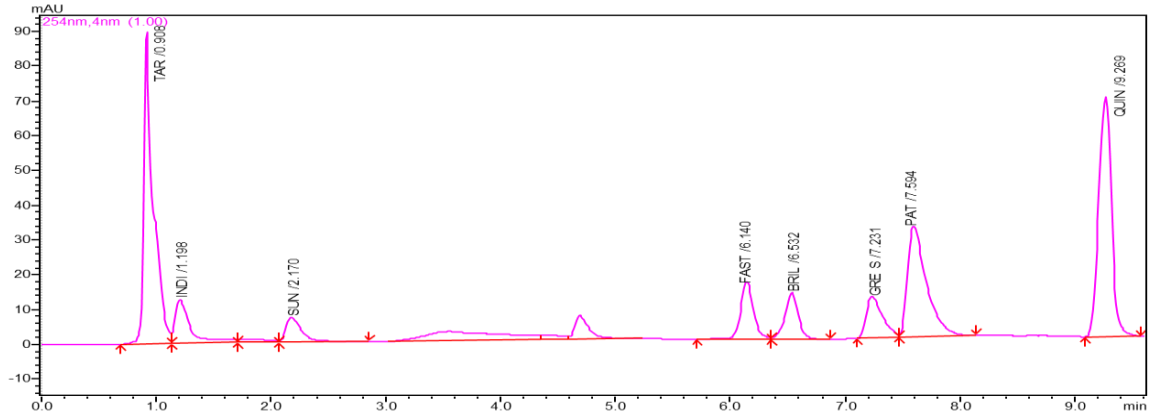
Za těchto podmínek se téměř zcela odseparovali Green S a Patent blue, ale stále zůstává dvojitý pík u dvojic Tartrazine – Indigo carmin a Brilliant blue FCF – Fast green FCF.

7.3.6. Gradient 06

Vzhledem k problému s nedostatečnou separací výše uvedených kritických párů byla zvýšena koncentrace octanového pufru na 2%. Průtok byl ponechán na 2 ml/min.

Tab. 10: Podmínky separace pro gradient 06

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
1.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 31: Chromatogram pro gradient 06

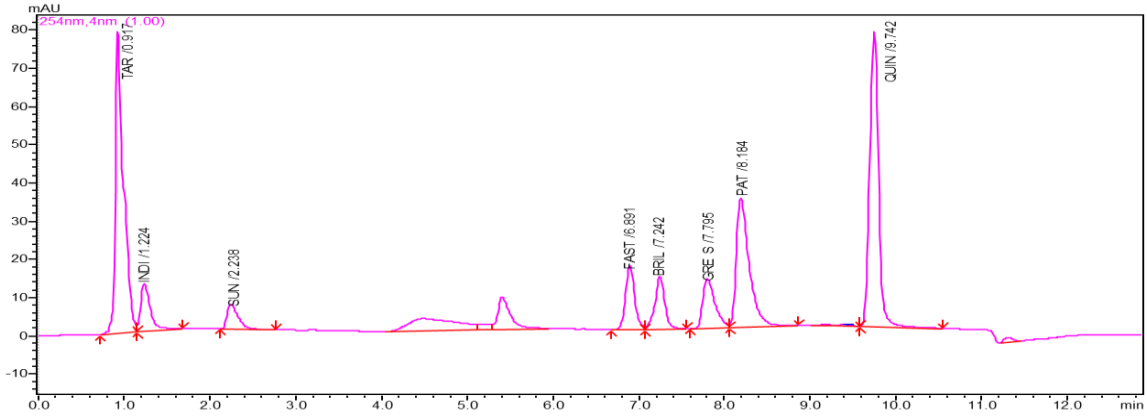
Většina problémových látek se odseparovala s dostatečným rozlišením, prakticky až na nulovou linii. Téměř neseparovaná zůstala jen dvojice Tartrazine s Indigo carminem.

7.3.7. Gradient 07

Dále byly použity stejné mobilní fáze a prodloužena isokratická eluce čistým 2% pufrem na 2 minuty (zpožděný start gradientu), průtok zůstal zachován na 2 ml/min.

Tab. 11: Podmínky separace pro gradient 07

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 32: Chromatogram pro gradient 07

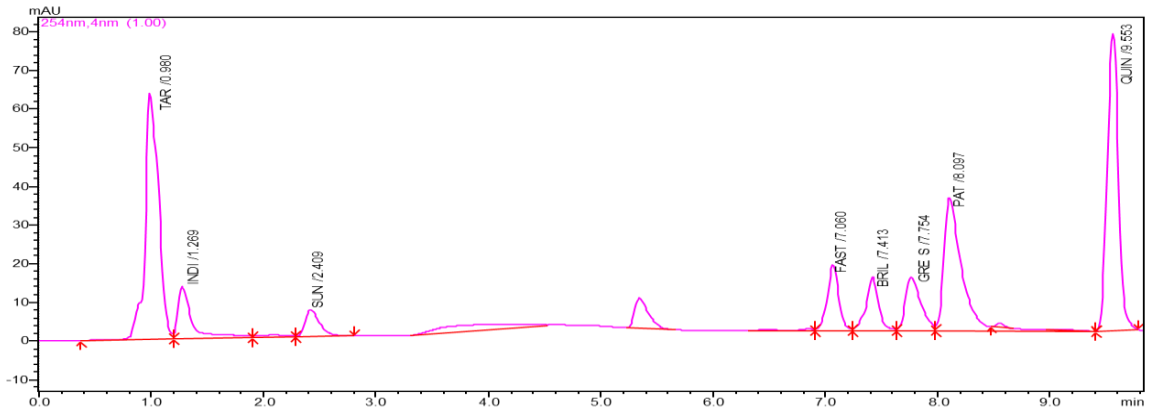
Tento gradient vyřešil problém dvojpíku Fast green FCF s Brilliant blue a Green S s Patent blue, ale dvojice Tartrazine – Indigo carmine se zcela neodseparovala.

7.3.8. Gradient 08

Dále byl k separaci látek zkoušen čistý MeOH v kombinaci s koncentrovanějším 4% octanovým pufrem pH 7, průtok 2 ml/min.

Tab. 12: Podmínky separace pro gradient 08

čas (min.)	mobilní fáze	
	4% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
1.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 33: Chromatogram pro gradient 08

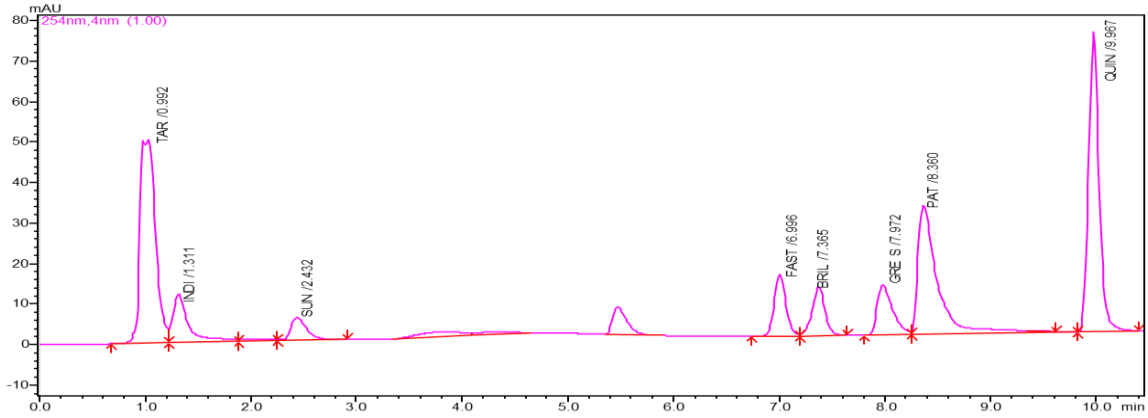
Separace všech látek proběhla téměř dostatečně. Ale koncentrace pufru již byla zbytečně vysoká a nebylo dosaženo významného zlepšení v porovnání s předchozími podmínkami (gradient 07).

7.3.9. Gradient 09

Dále byla pro testovanou kombinaci gradientu s využitím 100% MeOH s 2% pufrem připojena k analytické koloně monolitní předkolonka (5 x 4,6 mm) o stejné stacionární fázi - CN, průtok zůstal zachován na hodnotě 2 ml/min.

Tab. 13: Podmínky separace pro gradient 09 s přidanou předkolonkou (5 x 4,6 mm)

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 34: Chromatogram pro gradient 09

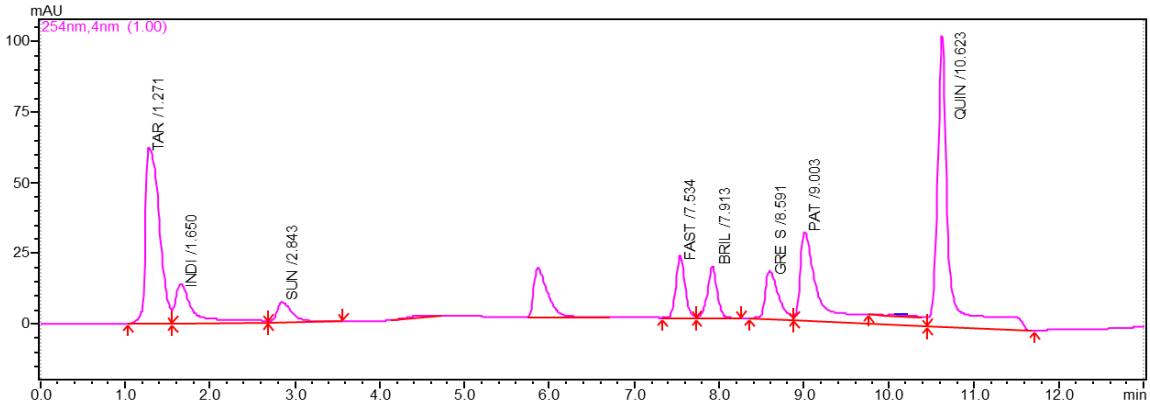
Separace látek byla téměř identická, pouze u píků Brilliant Blue a Green S bylo dosaženo většího rozlišení. Tyto testované podmínky se jevily jako optimální pro validaci metody.

7.3.10. Gradient 10

Kvůli dosažení požadavku na lepší separaci prvních dvou píků byly dále testovány podmínky převzaté z gradientu 09, avšak s nižší průtokovou rychlostí mobilní fáze 1,5 ml/min.

Tab. 14: Podmínky separace pro gradient 10

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 35: Chromatogram pro gradient 10

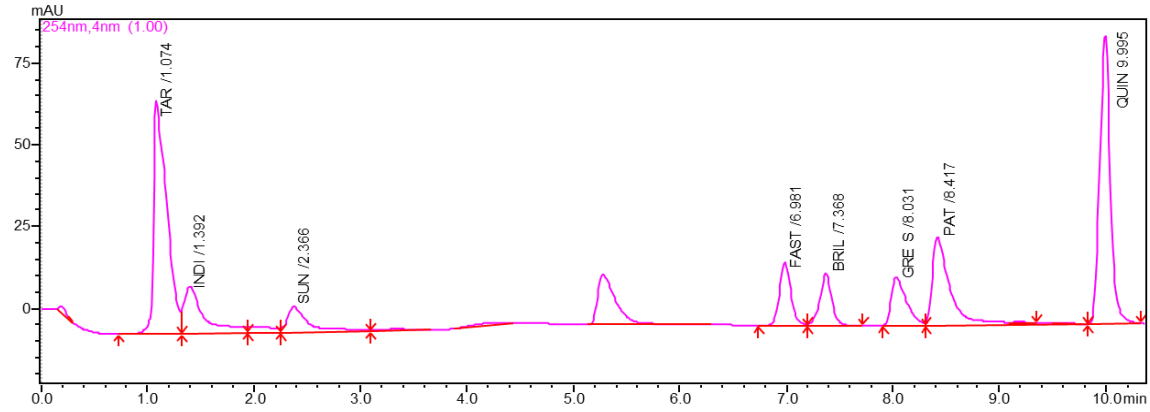
Tyto podmínky nebyly optimální, došlo k většímu chvostování některých píků. Separace prvních dvou píků nebyla významně zlepšena.

7.3.11. Gradient 11

Dále byl průtok mobilní fáze upraven na 1,75 ml/min při zachování ostatních podmínek.

Tab. 15: Podmínky separace pro gradient 11

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 36: Chromatogram pro gradient 11

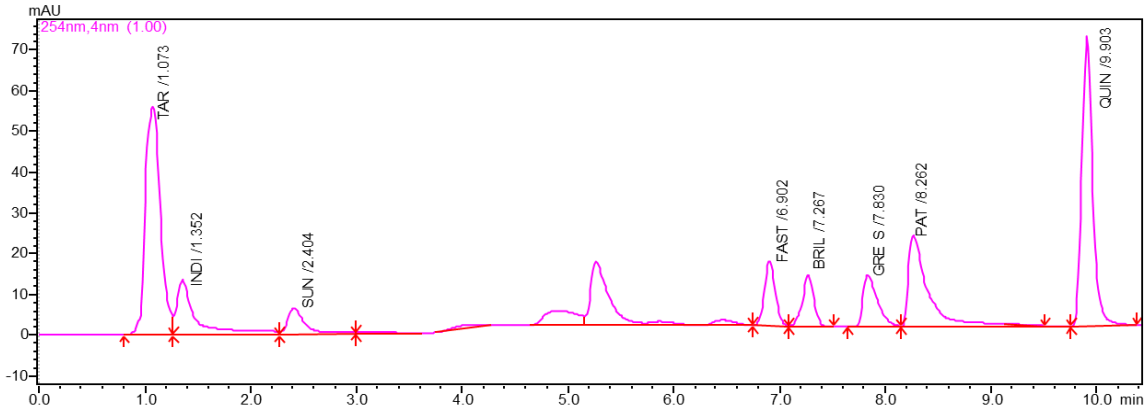
Tato změna nevedla k výraznějšímu zlepšení.

7.3.12. Gradient 12

Jako předposlední byly testovány stejné podmínky jako pro gradient 09 avšak se zapojením delší předkolony 10 x 4,6 mm o stejné stacionární fázi.(gradient s 2% pufrem a 40% MeOH, průtok 2 ml/min).

Tab. 16: Podmínky separace pro gradient 12

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 37: Chromatogram pro gradient 12

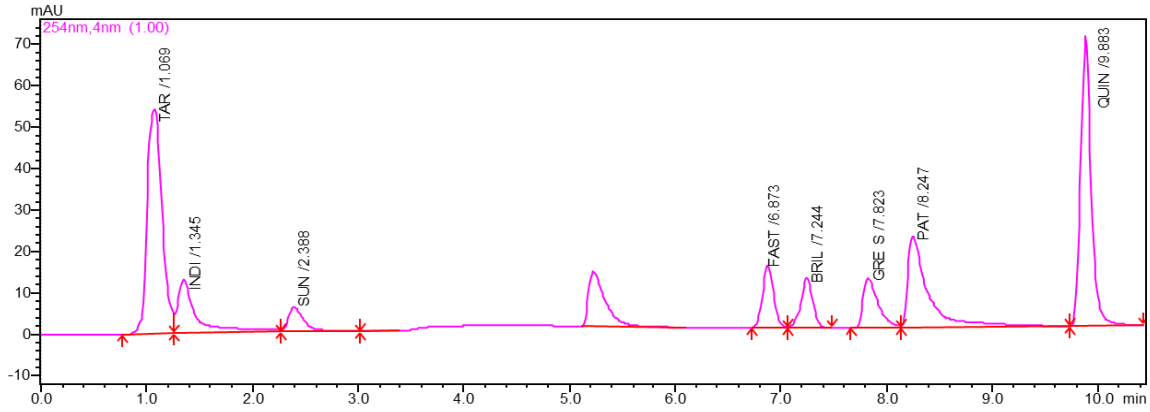
Ani tato změna nevedla k výraznějšímu zlepšení.

7.3.13. Gradient 13

Stejné podmínky s delší předkolonou byly zkoušeny i s průtokem 1,75 ml/min

Tab. 17: Podmínky separace pro gradient 13

čas (min.)	mobilní fáze	
	2% pufr (%)	MeOH (%)
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	



Obr. 38: Chromatogram pro gradient 13

Vzhledem k tomu, že výsledky separace při použití 5 mm a 10 mm předkolonky se prakticky nelišili, a navíc při použití 10 mm předkolonky začal výrazněji chvostovat pík Patent blue, zvolili jsme jako ideální pro validaci metody podmínky uvedené v gradientu 09. Nedostatečné rozlišení píků Tartrazinu a Indigo carminu nebylo pro validaci metody problematické, jelikož obě dvě látky byly hodnoceny při jiných vlnových délkách absorpčních maxim, které mezi sebou vzájemně neinterferují.

7.4. Vlnová délka

Vzhledem k rozdílné barevnosti a různým absorpčním vlastnostem analyzovaných látek byly pro stanovení vybrány 3 vlnové délky, při kterých dané látky vykazovaly absorpční maxima: 420 nm, 482 nm a 625 nm, viz Tab. 18.

Tab. 18: Vlnové délky, při kterých jednotlivé látky vykazovaly absorbční maxima

420 nm	Tartrazine, Quinoline yellow
482 nm	Sunset yellow
625 nm	Indigo carmine, Fast green FCF, Brilliant blue FCF, Green S, Patent blue

7.5. Optimální podmínky separace pro validaci metody

Kolona: Chromolith performance CN 100 – 4,6 mm

Předkolonka: Chromolith CN 5 x 4,6 mm Merck

Mobilní fáze: čistý MeOH s 2% pufrem (kys. oct. + NH_3, pH7)

Detekce: 420 nm, 482 nm a 625 nm, UV/VIS

Objem vzorku: 10µl

Gradient: Gradient 09

Tab. 19: Podmínky separace pro gradient 09

čas (min.)	**mobilní fáze**	
	2% pufr (%)	**MeOH (%)**
0.01	start	
2.00	100	0
10.00	60	40
10.10	100	0
12.00	stop	

Průtok: 2 ml/min

Teplota: 30 °C

8. Validace

8.1. Test vhodnosti chromatografického systému (System suitability test - SST)

Ke stanovení SST byl použit roztok standardů o koncentraci 50 mg/l.

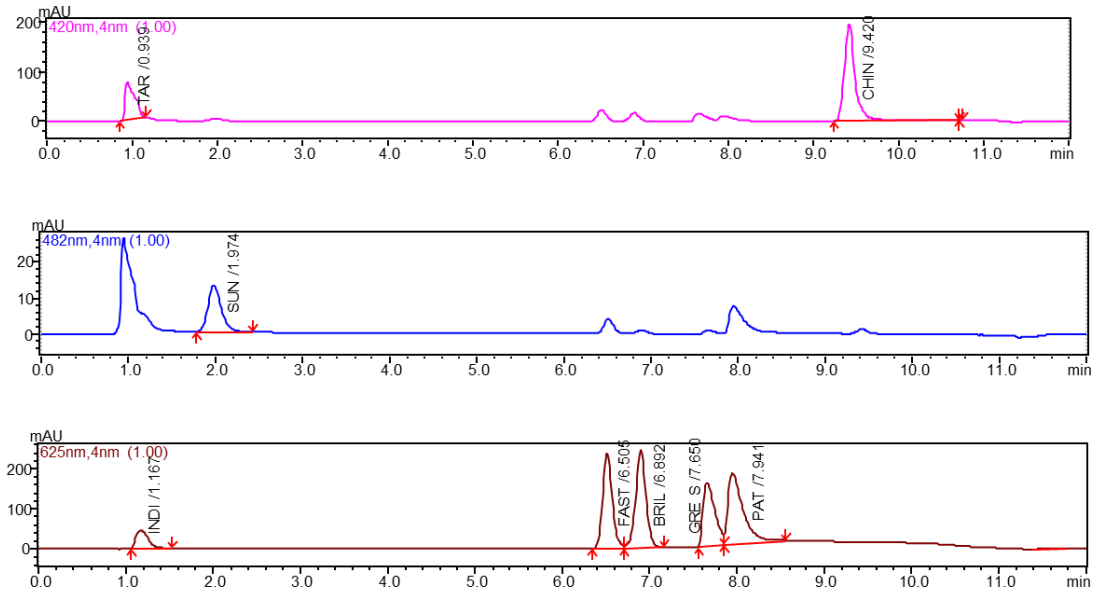
8.1.1. Účinnost chromatografického systému – Asymetrie chromatografických píků (T) a Rozlišení chromatografických píků (R)

Pro stanovení parametrů byly použity výsledky získané ze směsi roztoků pro stanovení linearity.

Tab. 20: SST - retenční čas (t_r), kapacitní faktor (k), asymetrie chromatografických píků (T) a rozlišení chromatografických píků (R)

Analyt	t_R (min)	k	T	R
Tartrazine	0.949	0.000	2.468	-
Indigo carmine	1.175	0.239	1.378	0.759
Sunset yellow	1.989	1.097	1.318	2.755
Fast green FCF	6.526	5.879	1.188	18.506
Brilliant blue FCF	6.913	6.287	1.089	1.765
Green S	7.671	7.087	1.525	3.304
Patent blue	7.964	7.395	2.320	1.106
Quinoline yellow	9.443	8.954	1.288	5.652

Vzhledem k rozdílným vlastnostem látek nebylo možné stanovit některé parametry SST, protože hodnotíme výsledky při 3 různých vlnových délkách (420, 482 a 625 nm). Proto jsme pro stanovení parametrů SST museli použít univerzální vlnovou délku, stejnou pro všechny analyty (254 nm), kde rozlišení jednotlivých píků není úplně optimální a proto R není vždy >1,5. Na obr. 39 jsou jednotlivé analyty při vhodných vlnových délkách.



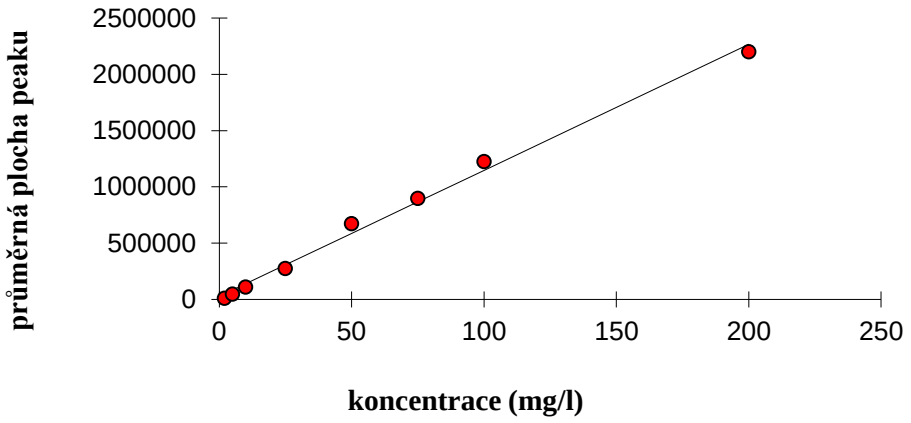
Obr. 39: Záznam separace analytů při 3 vlnových délkách

8.1.2. Linearita standardů

Ke stanovení linearity bylo použito 8 kalibračních roztoků o koncentraci 200, 100, 75, 50, 25, 10, 5 a 2 mg/l. Postup na jejich přípravu je popsán v kapitole 2.2.. Od každé koncentrace byly provedeny 3 nástřiky. Z výsledků pro každou koncentraci byl vypočítán aritmetický průměr plochy píků. Pomocí metody lineární regrese byla stanovena závislost plochy píků na jejich koncentraci.

8.1.2.1. **Kalibrační závislost pro Tartrazine**

Kalibrační závislost pro Tartrazine byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 40: Kalibrační závislost pro Tartrazine

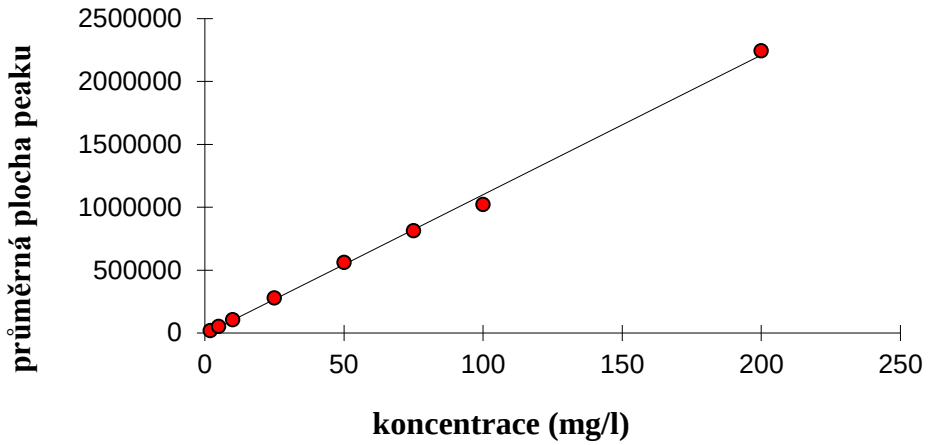
Tab. 21: Parametry lineární regrese pro Tartrazine

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	11209	±	351
Abs. člen	q =	26705	±	30131
Korelační koef.	r =	0,997		
Reziduální odch.	s =	62452		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,997.

8.1.2.2. **Kalibrační závislost pro Indigo carmine**

Kalibrační závislost pro Indigo carmine byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 41: Kalibrační závislost Indigo carmine

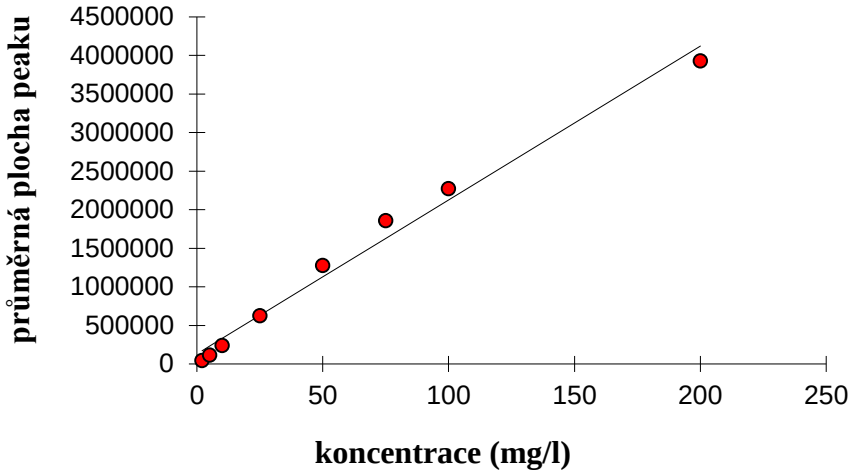
Tab. 22: Parametry lineární regrese pro Indigo carmine

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	11101	±	201
Abs. člen	q =	-10235	±	17304
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	35865		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.2.3. **Kalibrační závislost pro Quinoline yellow**

Kalibrační závislost pro Quinoline yellow byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 42: Kalibrační závislost pro Quinoline yellow

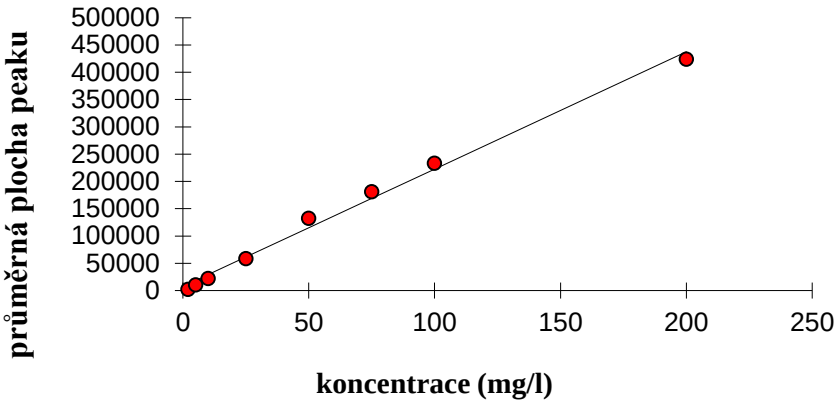
Tab. 23: Parametry lineární regrese pro Quinoline yellow

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	19942	±	949
Abs. člen	q =	132128	±	81439
Korelační koef.	r =	0,993		
Reziduální odch.	s =	168796		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,993.

8.1.2.4. **Kalibrační závislost pro Sunset yellow**

Kalibrační závislost pro Sunset yellow byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 43: Kalibrační závislost pro Sunset yellow

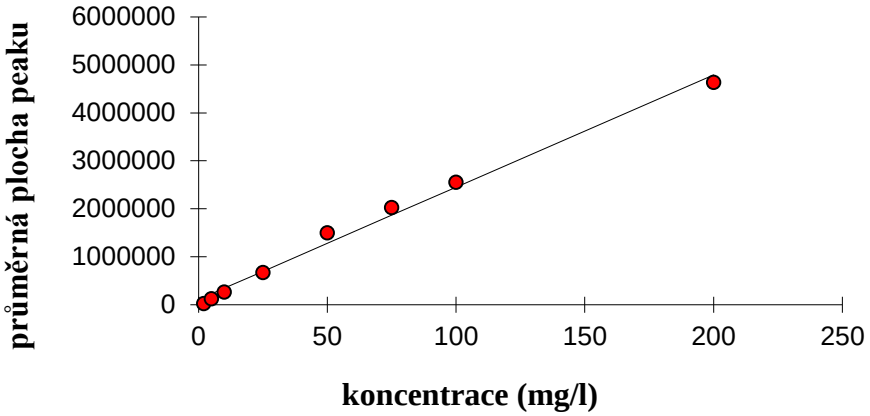
Tab. 24: Parametry lineární regrese pro Sunset yellow

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	2149	±	71
Abs. člen	q =	7683	±	6134
Korelační koef.	r =	0,996		
Reziduální odch.	s =	12714		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,996.

8.1.2.5. **Kalibrační závislost pro Green S**

Kalibrační závislost pro Green S byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 44: Kalibrační závislost pro Green S

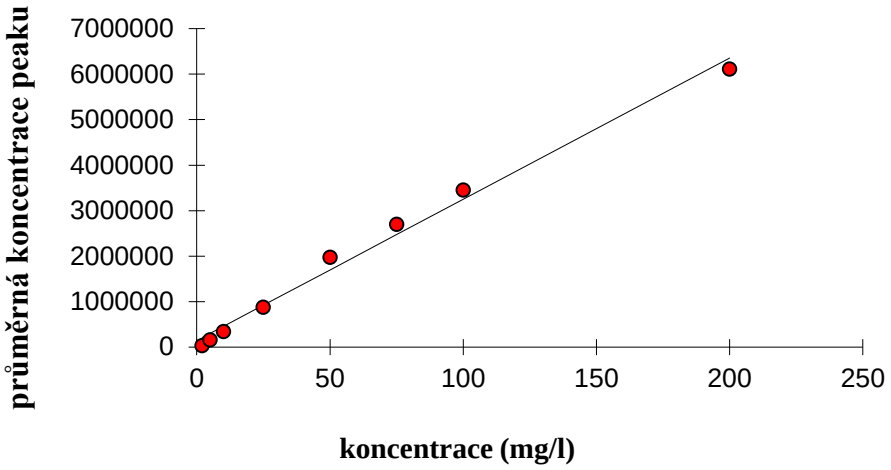
Tab. 25: Parametry lineární regrese pro Green S

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	23429	±	869
Abs. člen	q =	108323	±	74567
Korelační koef.	r =	0,995		
Reziduální odch.	s =	154553		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,995.

8.1.2.6. **Kalibrační závislost pro Brilliant blue FCF**

Kalibrační závislost pro Brilliant blue FCF byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 45: Kalibrační závislost pro Brilliant blue FCF

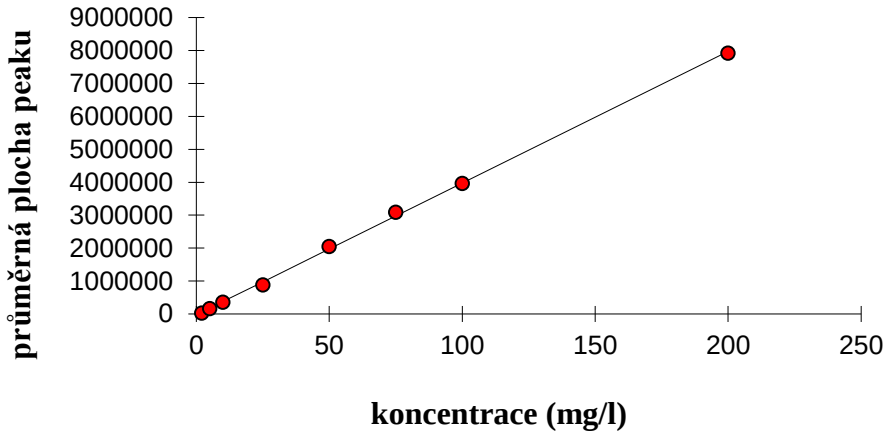
Tab. 26: Parametry lineární regrese pro Brilliant blue FCF

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	31052	±	1244
Abs. člen	q =	144120	±	106736
Korelační koef.	r =	0,995		
Reziduální odch.	s =	221230		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,995.

8.1.2.7. **Kalibrační závislost pro Patent blue**

Kalibrační závislost pro Patent blue byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 46: Kalibrační závislost pro Patent blue

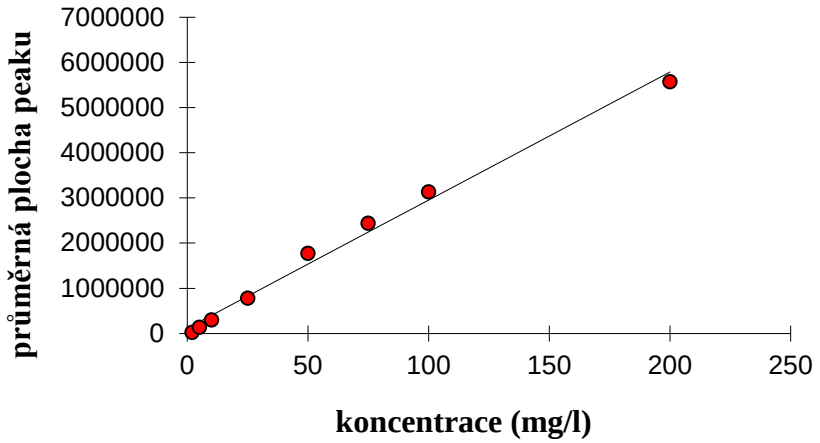
Tab. 27: Parametry lineární regrese pro Patent blue

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	39944	±	400
Abs. člen	q =	-20928	±	34324
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	71142		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.2.8. **Kalibrační závislost pro Fast Green FCF**

Kalibrační závislost pro Fast Green FCF byla stanovena při koncentracích v rozmezí 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 47: Kalibrační závislost pro Fast green FCF

Tab. 28: Parametry lineární regrese pro Fast green FCF

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	28331	±	1096
Abs. člen	q =	119410	±	94041
Korelační koef.	r =	0,995		
Reziduální odch.	s =	194918		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,995.

8.1.3. Linearita standardů v matrici piva

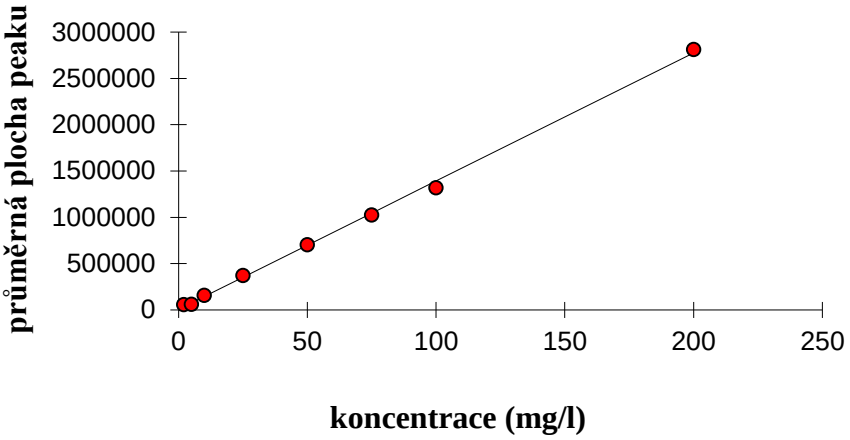
Kromě kalibrace standardů v roztocích rozpouštědel byla připravena také matricová kalibrace, kdy směs kalibračních roztoků byla zředěna roztokem ACN a piva (Gambrinus 11° Excelent) v poměru 1:1. Tento roztok ACN a piva bylo třeba ještě před použitím přefiltrovat kvůli vysráženým bílkovinám. Ředění matrice acetonitrilem bylo nutné kvůli rozpustnosti standardů. Roztoky pro matricovou kalibraci byly připraveny ve stejném koncentračním rozmezí jako pro kalibraci standardů (200 – 2 mg/l) viz Tab. 29

Tab. 29: Příprava roztoků pro matricovou kalibraci

koncentrace (mg/l)	V směsného roztoku (µl)	V ACN + pivo (µl)
200	200	300
100	100	400
75	75	425
50	50	450
25	25	475
10	10	490
5	5	495
2	2	498

8.1.3.1. Matricová kalibrační závislost pro Tartrazine

Matricová kalibrační závislost pro Tartrazine jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 48: Matricová kalibrační závislost pro Tartrazine

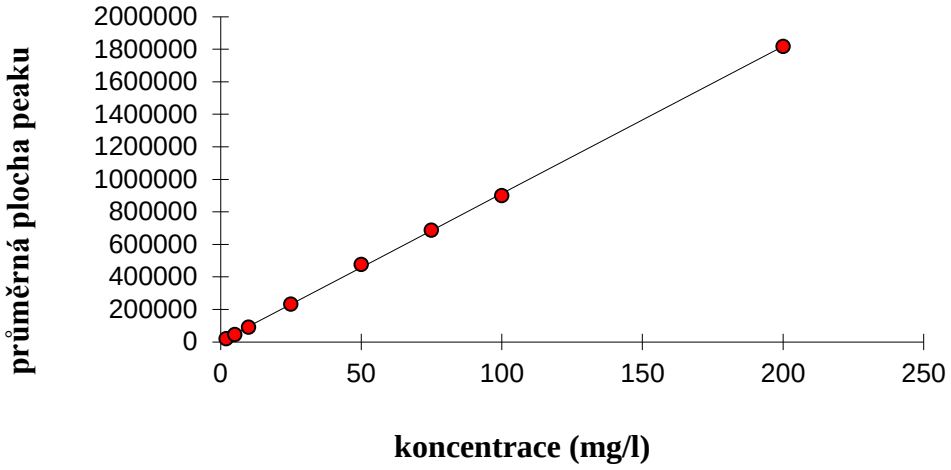
Tab. 30: Parametry lineární regrese pro Tartrazine v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	13858	±	203
Abs. člen	q =	5601	±	17465
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	36199		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.3.2. **Matricová kalibrace pro Indigo carmine**

Matricová kalibrační závislost pro Indigo carmine jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 49: Matricová kalibrační závislost pro Indigo carmine

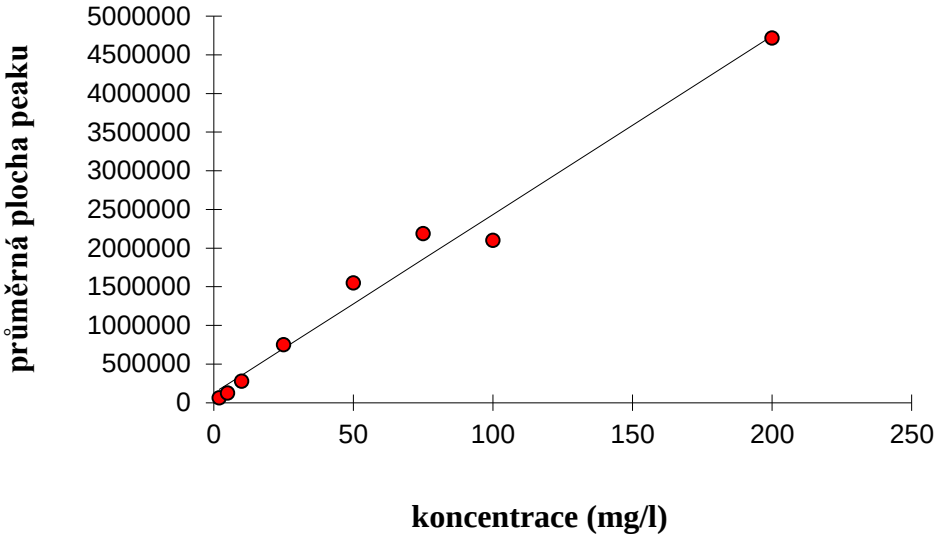
Tab. 31: Parametry lineární regrese pro Indigo carmine v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	9063	±	51
Abs. člen	q =	5338	±	4397
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	9115		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.3.3. **Matricová kalibrace pro Quinoline yellow**

Matricová kalibrační závislost pro Quinoline yellow jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 50: Matricová kalibrační závislost pro Quinoline yellow

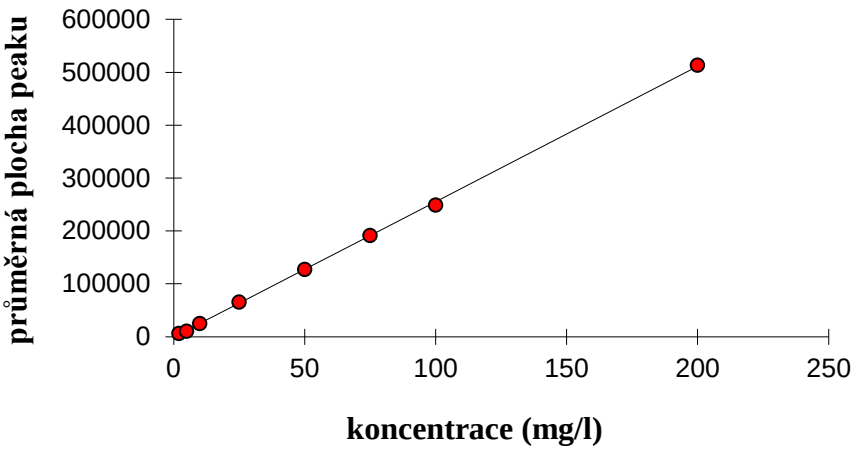
Tab. 32: Parametry lineární regrese pro Quinoline yellow v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	23089	±	1315
Abs. člen	q =	124516	±	112849
Korelační koef.	r =	0,990		
Reziduální odch.	s =	233899		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,990.

8.1.3.4. **Matricová kalibrace pro Sunset yellow**

Matricová kalibrační závislost pro Sunset yellow jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 51: Matricová kalibrační závislost pro Sunset yellow

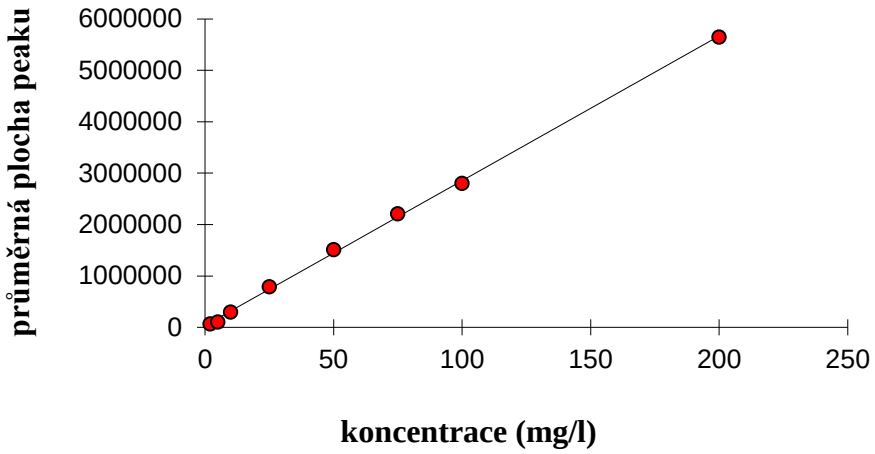
Tab. 33: Parametry lineární regrese pro Sunset yellow v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	2558	±	16
Abs. člen	q =	-556	±	1449
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	3004		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.3.5. **Matricová kalibrace pro Green S**

Matricová kalibrační závislost pro Green S jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 52: Matricová kalibrační závislost pro Green S

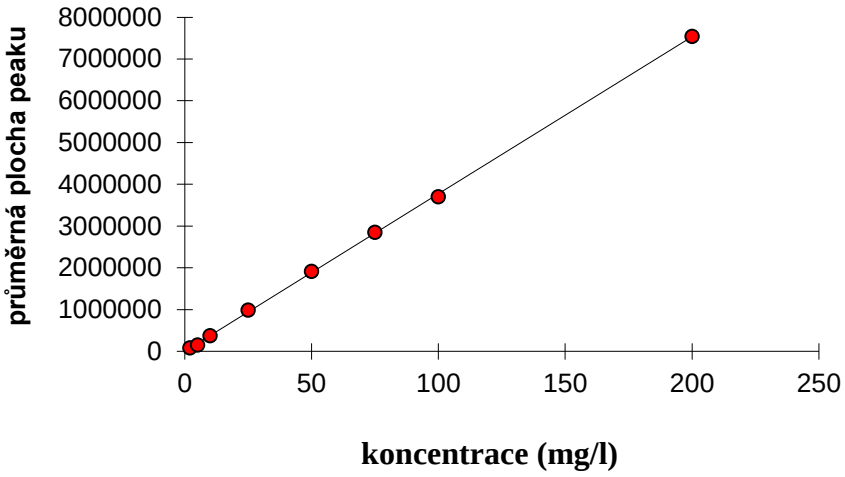
Tab. 34: Parametry lineární regrese pro Green S v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	28157	±	322
Abs. člen	q =	36603	±	27685
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	57383		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.3.6. **Matricová kalibrace pro Brilliant blue FCF**

Matricová kalibrační závislost pro Brilliant blue FCF jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 53: Matricová kalibrační závislost pro Brilliant blue FCF

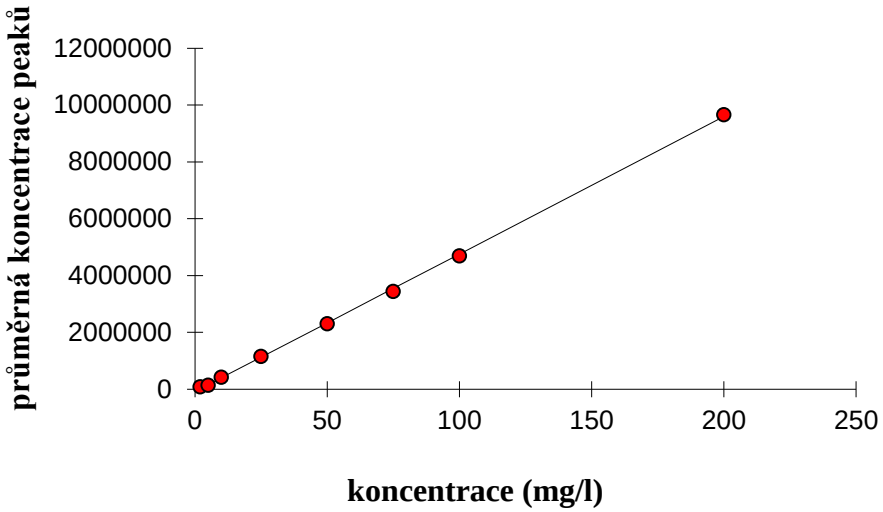
Tab. 35: Parametry lineární regrese pro Brilliant blue FCF v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	37646	±	221
Abs. člen	q =	5317	±	19020
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	39424		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.3.7. **Matricová kalibrace pro Patent blue**

Matricová kalibrační závislost pro Patent blue jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 54: Matricová kalibrační závislost pro Patent blue

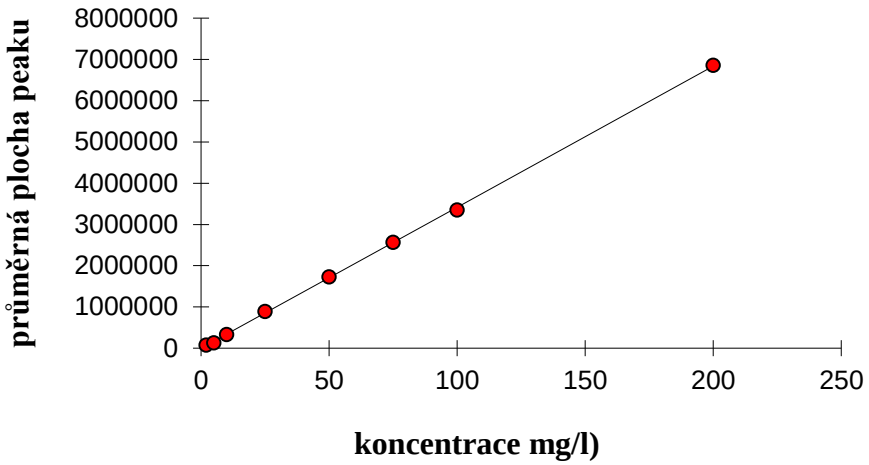
Tab. 36: Parametry lineární regrese pro Patent blue v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	48383	±	375
Abs. člen	q =	-83155	±	32249
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	66842		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.3.8. **Matricová kalibrace pro Fast green FCF**

Matricová kalibrační závislost pro Fast green FCF jsme měřili při koncentracích 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l a 200 mg/l.



Obr. 55: Matricová kalibrační závislost pro Fast green FCF

Tab. 37: Parametry lineární regrese pro Fast green FCF v matrici

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	34196	±	213
Abs. člen	q =	-1347	±	18341
Korelační koef.	r =	0,999		
Reziduální odch.	s =	38016		

Korelační koeficient pro měřené koncentrační rozmezí je 0,999.

8.1.4. Opakovatelnost

Pro test opakovatelnosti byly připraveny roztoky standardů na třech koncentračních hladinách 200, 50 a 5 mg/l. Tyto roztoky byly připraveny stejným způsobem jako roztoky kalibrační, viz kapitola 2.2. Pro každý roztok dané koncentrace bylo provedeno 8 nástřiků. Byly získány hodnoty průměrných ploch píků a z nich potom byla vypočítána relativní směrodatná odchylka.

Tab. 38: Stanovení opakovatelnosti pro roztoky analytů o koncentraci 5 mg/l

5 mg/l	Průměr	SD	RSD (%)
Tartrazin	60327	394	0,65
Quinoline yellow	124365	5409	4,35
Sunset yellow	11105	83	0,75
Indigo carmine	16621	146	0,88
Fast green FCF	157760	966	0,61
Brilliant blue FCF	173738	1777	1,02
Green S	138667	474	0,34
Patent blue	193327	1906	0,99

Relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 0,34 – 4,35 %. U roztoku Quinoline yellow byla RSD > 1 %.

Tab. 39: Stanovení opakovatelnosti pro roztoky analytů o koncentraci 50 mg/l

50 mg/l	Průměr	SD	RSD (%)
Tartrazine	620602	4255	0,69
Quinoline yellow	1449317	11389	0,79
Sunset yellow	120248	692	0,58
Indigo carmine	165264	1024	0,62
Fast green FCF	1563421	11141	0,71
Brilliant blue FCF	1732790	10439	0,60
Green S	1360131	11901	0,88
Patent blue	2354999	49936	2,12

Relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 0,58 – 2,12 %. U roztoku Patent blue byla > 1 %.

Tab. 40: Stanovení opakovatelnosti pro roztoky analytů o koncentraci 200 mg/l

200 mg/l	Průměr	SD	RSD (%)
Tartrazine	2604882	16573	0,64
Quinoline yellow	6254036	83826	1,34
Sunset yellow	503676	2577	0,51
Indigo carmine	563603	10923	1,94
Fast green FCF	6646344	47639	0,72
Brilliant blue FCF	7286352	38971	0,53
Green S	5497373	88041	1,60
Patent blue	8442515	54813	0,65

Relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 0,51 – 1,94 %. Vyšší než 1 byla u Quinoline yellow, Green S a Indigo carmine.

8.1.5. Přesnost

Pro stanovení přesnosti bylo připraveno 8 roztoků o koncentraci všech barviv 50 mg/l, které byly ředěny do piva s ACN (1:1). Tento postup přídavku barviv do matrice piva byl zvolen pro parametr přesnosti, jelikož nebyl k dispozici reálný vzorek piva, který by obsahoval všechny barviva dohromady. Pro každý roztok byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků pak byla vypočítána průměrná hodnota. Přesnost pak byla vyjádřena jako hodnota RSD (%).

8.1.5.1. Tartrazine

Tab. 41: Přesnost pro Tartrazine

plocha peaku	695 479 691 802 694 034 708 746 706 238 705 494 706 369 720 987
Průměr	**703 644**
SD	**9589**
RSD (%)	**1,36**

Výsledek přesnosti pro Tartrazine je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.2. **Quinoline yellow**

Tab. 42: Přesnost pro Quinoline yellow

plocha peaku	1 460 158 1 439 782 1 438 463 1 470 180 1 457 499 1 450 623 1 449 596 1 482 997
Průměr	**1 456 162**
SD	**15 070**
RSD (%)	**1,03**

Výsledek přesnosti pro Quinoline yellow je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.3. **Sunset yellow**

Tab. 43: Přesnost pro Sunset yellow

plocha peaku	142 153 139 079 141 491 143 888 142 694 143 035 141 862 144 908
Průměr	**142 389**
SD	**1 740**
RSD (%)	**1,22**

Výsledek přesnosti pro Sunset yellow je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.4. **Indigo carmine**

Tab. 44: Přesnost pro Indigo carmine

plocha peaku	518 816 505 375 499 672 502 719 504 045 512 700 511 463 523 607
Průměr	**509 799**
SD	**8354**
RSD (%)	**1,64**

Výsledek přesnosti pro Indigo carmine je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.5. **Fast green FCF**

Tab. 45: Přesnost pro Fast green FCF

plocha peaku	1 643 428 1 631 303 1 637 127 1 663 569 1 656 169 1 655 387 1 653 231 1 683 940
Průměr	**1 653 019**
SD	**16471**
RSD (%)	**1,00**

Výsledek přesnosti pro Fast green FCF je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.6. **Brilliant blue FCF**

Tab. 46: Přesnost pro Brilliant blue FCF

plocha peaku	1 732 527 1 722 729 1 726 994 1 756 971 1 749 478 1 749 454 1 748 134 1 777 813
Průměr	**1 745 513**
SD	**17902**
RSD (%)	**1,03**

Výsledek přesnosti pro Brilliant blue FCF je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.7. **Green S**

Tab. 47: Přesnost pro Green S

plocha peaku	1 015 509 1 014 419 1 037 211 1 037 418 1 035 558 1 077 634 1 093 317 1 081 053
Průměr	**1 049 015**
SD	**30666**
RSD (%)	**2,92**

Výsledek přesnosti pro Green S je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.5.8. **Patent blue**

Tab. 48: Přesnost pro Patent blue

plocha peaku	2 451 876 2 477 459 2 428 275 2 540 847 2 475 650 2 446 966 2 492 979 2 605 566
Průměr	**2 489 952**
SD	**57853**
RSD (%)	**2,32**

Výsledek přesnosti pro Patent blue je vyjádřen jako RSD a je < 5%.

8.1.6. <u>Správnost</u>

Pro stanovení správnosti byly připraveny 3 roztoky standardů o koncentraci 50 mg/l. Jejich příprava byla stejná jako pro kalibrační roztoky viz kapitola 2.2.. Dále bylo připraveno 8 roztoků standardů v matrici piva také o koncentraci všech barviv 50 mg/l stejným způsobem jako roztoky pro přesnost, dle kapitoly 4.1.5. Každý roztok byl analyzován třikrát a byl spočítán průměr z těchto tří hodnot. Správnost pak byla určena jako poměr průměrů ploch píků roztoků barviv v matrici a roztoků čistých standardů.

8.1.6.1. **Tartrazine**

Tab. 49: Správnost pro Tartrazine

Hodnoty výtěžnosti (%)	104,06 103,51 103,85 106,05 105,67 105,56 105,69 107,88
Prům. výtěžnost	**105,28**
SD	**1,43**
RSD (%)	**1,36**

Průměrná výtěžnost pro Tartrazine je mimo rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.2. **Quinoline yellow**

Tab. 50: Správnost pro Quinoline yellow

Hodnoty výtěžnosti (%)	100,40 99,00 98,91 101,09 100,22 99,75 99,68 101,97
Prům. výtěžnost	**100,13**
SD	**1,04**
RSD (%)	**1,03**

Průměrná výtěžnost pro Quinoline yellow je v rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.3. **Sunset yellow**

Tab. 51: Správnost pro Sunset yellow

Hodnoty výtěžnosti (%)	100,78 98,60 100,32 102,01 101,17 101,41 100,58 102,74
Prům. výtěžnost	**100,95**
SD	**1,23**
RSD (%)	**1,22**

Průměrná výtěžnost pro Sunset yellow je v rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.4. **Indigo carmine**

Tab. 52: Správnost pro Indigo carmine

Hodnoty výtěžnosti (%)	100,95 98,34 97,23 97,82 98,08 99,76 99,52 101,89
Prům. výtěžnost	**99,20**
SD	**1,63**
RSD (%)	**1,64**

Průměrná výtěžnost pro Indigo carmine je v rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.5. **Fast green FCF**

Tab. 53: Správnost pro Fast green FCF

Hodnoty výtěžnosti (%)	100,83 100,08 100,44 102,06 101,61 101,56 101,43 103,31
Prům. výtěžnost	**101,42**
SD	**1,01**
RSD (%)	**1,00**

Průměrná výtěžnost pro Fast green FCF je v rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.6. **Brilliant blue FCF**

Tab. 54: Správnost pro Brilliant blue FCF

Hodnoty výtěžnosti (%)	102,25 101,68 101,93 103,70 103,25 103,25 103,18 104,93
Prům. výtěžnost	**103,02**
SD	**1,06**
RSD (%)	**1,03**

Průměrná výtěžnost pro Brilliant blue FCF je v rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.7. **Green S**

Tab. 55: Správnost proGreen S

Hodnoty výtěžnosti (%)	93,84 93,74 95,85 95,87 95,70 99,58 101,03 99,90
Prům. výtěžnost	**96,94**
SD	**2,83**
RSD (%)	**2,92**

Průměrná výtěžnost pro Green S je v rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

8.1.6.8. **Patent blue**

Tab. 56: Správnost pro Patent blue

Hodnoty výtěžnosti (%)	104,76 105,86 103,75 108,56 105,78 104,55 106,52 111,33
Prům. výtěžnost	**106,39**
SD	**2,47**
RSD (%)	**2,32**

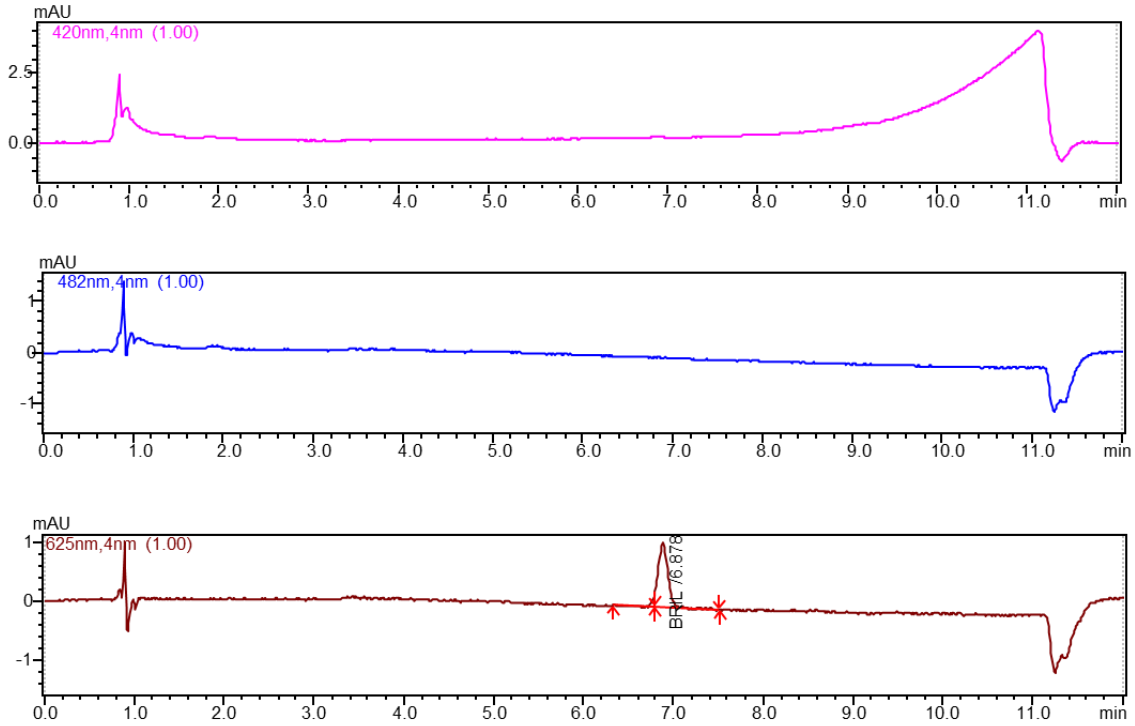
Průměrná výtěžnost pro Patent blue je nad rozmezí 95 – 105% a RSD <5%.

9. Stanovení zelených barviv ve vybraných zelených pivech

Vyvinutá a validovaná metoda byla použita ke stanovení zelených barviv ve vybraných Velikonočních zelených pivech. Testovali jsme přítomnost Tartrazinu (E 102), Quinoline yellow (E 104), Sunset yellow (E 110), Patent blue (E 131), Indigo carminu (E 132), Brilliant blue FCF (E 133), Green S (E 142), a Fast green FCF (E143). Celkem bylo analyzováno 11 vzorků. 5 vzorků z roku 2014 a dodatečně 6 vzorků z roku 2015 (ty jsou uvedeny v tabulce). Kde pouze u jednoho byla uvedena přítomnost E133 (Krasličák 14° Ježek, Jihlava). Pro analýzu bylo použito 50 ml nápoje, z něhož byl do vialky napipetován 1ml pro přímý nástřik na kolonu bez další úpravy vzorku. Pro každý nápoj byly připraveny 2 vzorky a z každého vzorku byly provedeny 2 nástřiky.

9.1. Jarní pivo 11°, (Primátor, Náchod)

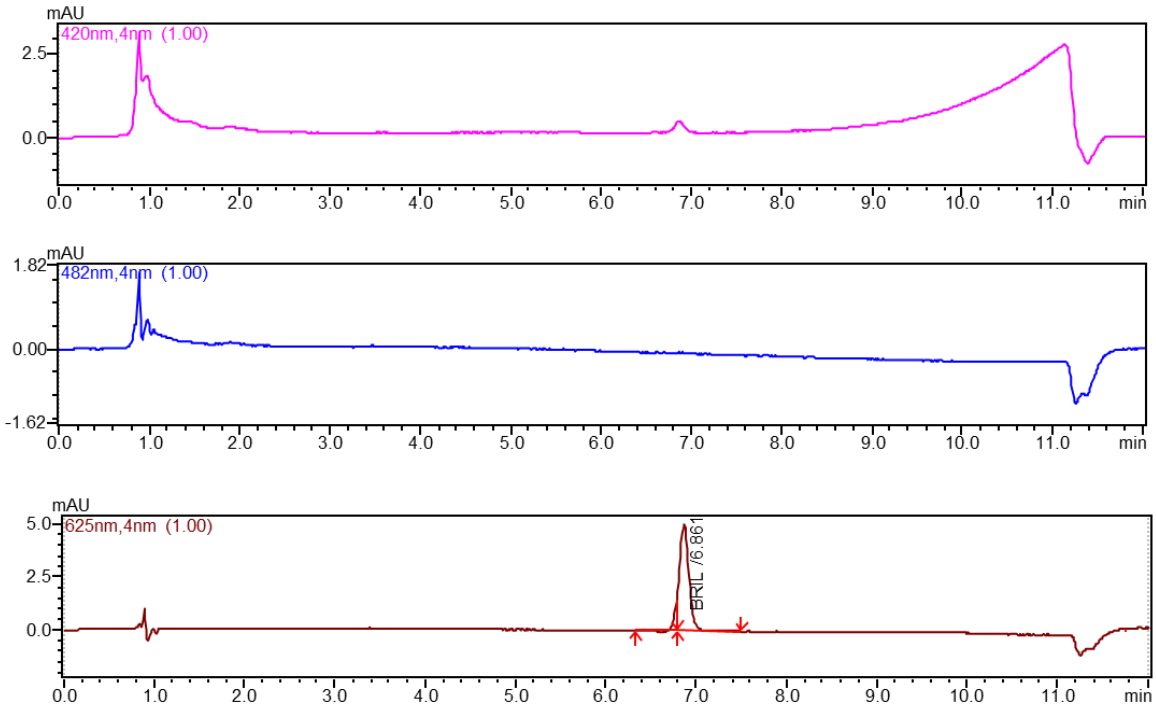
Ve vzorku piva byla pomocí vyvinuté metody zjištěna přítomnost Brilliant blue FCF E133. Průměrný obsah barviva v tomto nápoji byl 0,45 mg/l.



Obr. 56: HPLC záznam analýzy vzorku Jarní pivo 11° (Primátor, Náchod)

9.2. Krasličák 14° (Ježek, Jihlava)

Ve vzorku byla vyvinutou metodou zjištěna přítomnost Brilliant blue FCF E133. Průměrný obsah barviva v tomto nápoji byl 2,1 mg/l. Přítomnost barviva byla uvedena i ve složení.



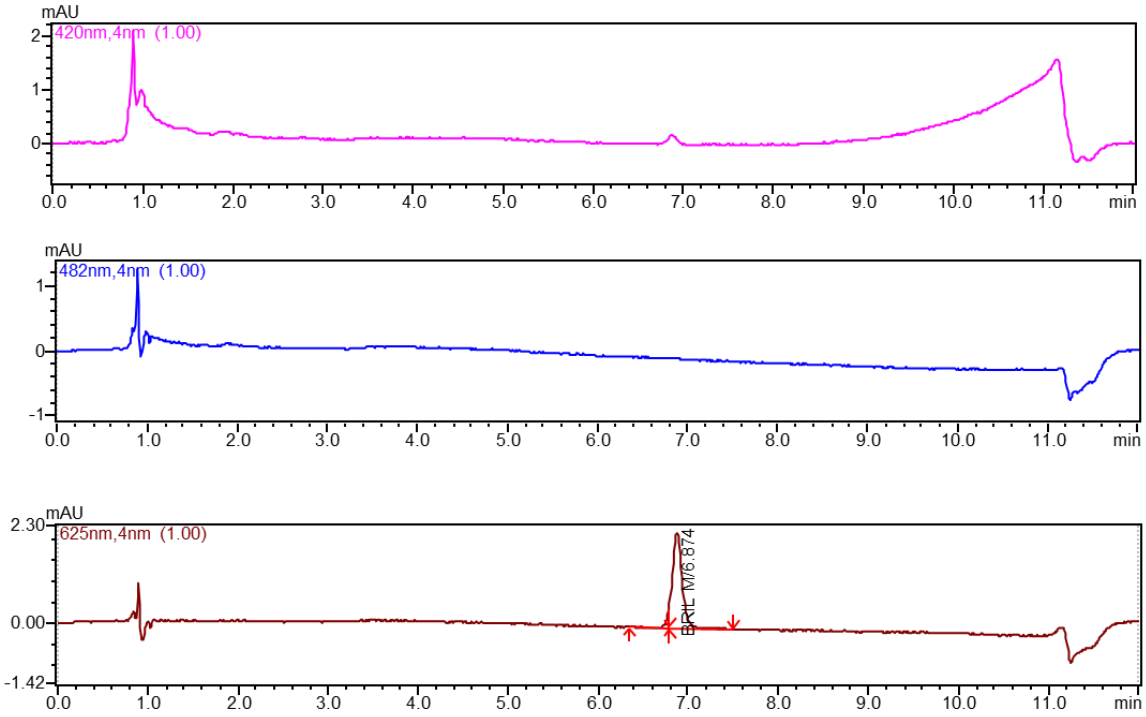
Obr. 57: HPLC záznam analýzy vzorku Krasličák 14° (Ježek, Jihlava)

9.3. Zelený král Vratislav 12°, (Konrád, Vratislavice)

Ve vzorku nebylo nalezeno žádné, námi stanovované barvivo.

9.4. Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno)

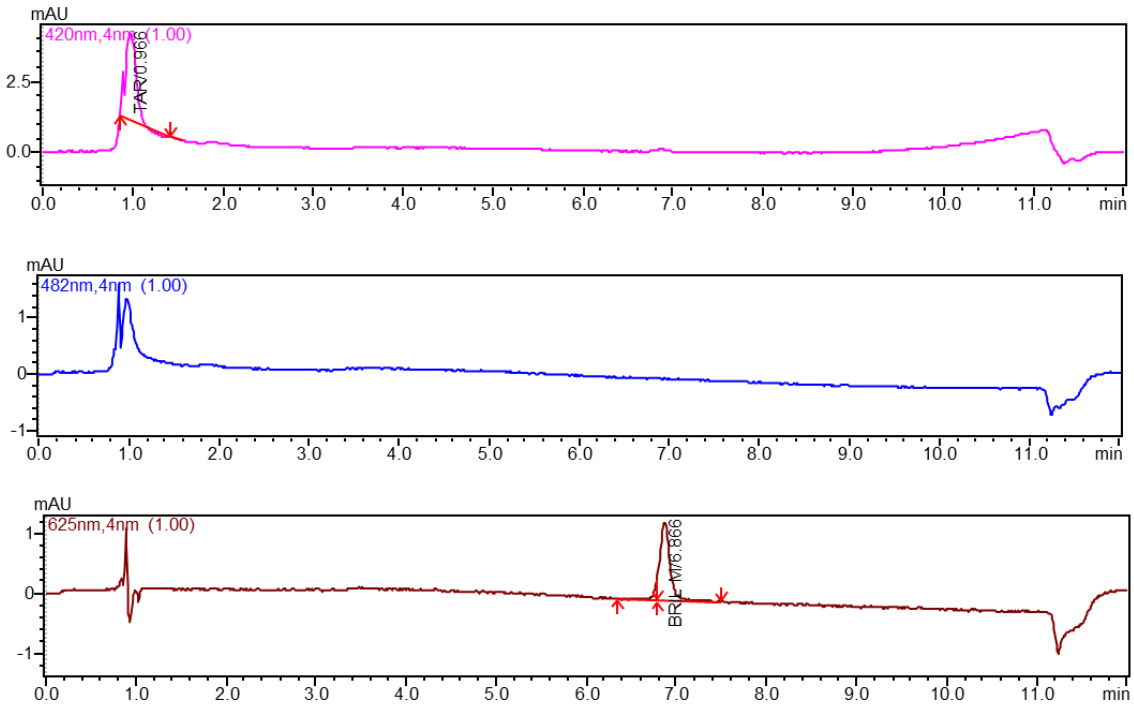
Pomocí metody bylo zjištěno, že nápoj obsahoval Brilliant blue FCF E133. Průměrný obsah barviva v tomto vzorku byl 1,3 mg/l.



Obr. 58: HPLC záznam analýzy vzorku Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno)

9.5. Velikonoční ležák 12°(Radniční pivovar, Jihlava)

Ve vzorku byla zjištěna přítomnost 2 barviv, Brilliant blue FCF E133 a Tartrazine 102. Průměrný obsah Brilliant blue FCF v nápoji byl 0,68 mg/l a průměrný obsah Tartrazinu byl 2,4 mg/l.



Obr. 59: HPLC záznam analýzy vzorku Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava)

9.6. Vzorky zelených piv 2015

Z testovaných piv v roce 2015 nebylo nalezeno žádné námi testované barvivo v zelených pivech Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany) a Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno). Ostatní vzorky obsahovali buď samotnou Brilliant blue nebo dvojici barviv Brilliant blue a Tartrazine viz Tab. 57.

Tab. 57: Výsledky analýzy vzorků z roku 2015

	Tartrazine (mg/l)	**Brilliant blue (mg/l)**
Rohozec 11°	-	0,964
Žlabské Chvalovice 12°	1,577	0,78
Pukrmistr 12° zelené	3,49	2,183
Modrá hvězda Kopřivová 12°	-	-
Valášek 12°, Vsetín	2,446	2,363
Podkováň 12°, Dolní Cetno	-	-

10. Závěr

Byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení a separaci ve vodě rozpustných umělých barviv E 102 - Tartrazine, E 104 - Quinoline yellow, E 110 - Sunset yellow, E 131 - Patent blue E 132 - Indigo carmine, E 142 - Green S, E 133 - Brilliant blue FCF a E 143 - Fast green FCF ve vzorcích zeleného piva z roku 2014: Jarní pivo 11° (Primátor, Náchod), Krasličák 14° (Ježek, Jihlava), Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice), Velikonoční speciál 14° (Starobrno, Brno), Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava) a dalších velikonočních speciálů z roku 2015.

Analýza probíhala na koloně Chromolith Performance CN 100 x 4,6 mm s předkolonkou Chromolith CN 5 x 4,6 mm, Merck. Jako mobilní fáze byl zvolen 40% MeOH s 2% pufrem (kys. octová + NH_3, pH 7) a její průtok byl nastaven na 2 ml/min. Eluce probíhala v gradientovém módu. Teplota pro analýzu byla zvolena 30°C a nástřik 10 µl. Celková doba separace byla 12 minut a analyzované látky byly detekovány při 420 nm, 482 nm a 625 nm.

Korelační koeficient, který se sleduje u testování linearity byl 0,997068 pro Tartrazine, 0,993271 pro Quinoline yellow, 0,996696 pro Sunset yellow, 0,999699 pro Patent blue, 0,999011 pro Indigo carmine, 0,995219 pro Brilliant blue FCF, 0,995897 pro Green S, a 0,995539 pro Fast green FCF.

Faktor asymetrie chromatografických píků T byl pro analyty v rozmezí 1,089 - 2,468. Požadavek $T < 2$ byl splněn skoro pro všechny analyty kromě Tartrazine a Patent blue. Dále bylo stanoveno rozlišení chromatografických píků R. Jeho hodnoty byly v rozmezí 0,759 – 18,506. Podmínka $R > 1,5$ proto tedy nebyla splněna pro dvojici Tartrazine – Indigo carmine a Green S – Patent blue. Dvojice Tartrazine – Indigo carmine však byly kvantifikovány při různých vlnových délkách, takže se vzájemně neovlivňovaly.

Bylo testováno celkem 5 vzorků piv z roku 2014, z toho ve 4 byla nalezena testovaná barviva. Jarní pivo 11°(Primátor, Náchod) obsahoval 4,4 mg/l Brilliant blue. Krasličák 14° (Ježek, Jihlava) obsahoval 3,5 mg/l Brilliant blue a jako jediný uváděl přítomnost tohoto barviva ve složení. Ve Velikonočním speciálu 14° (Starobrno, Brno) bylo obsaženo 4,1 mg/l Brilliant blue. Velikonoční ležák 12° (Radniční pivovar, Jihlava) obsahoval dokonce 2 barviva, 4,3 mg/l Brilliant blue a Tartrazine o průměrné koncentraci 2,4 mg/l. Jediným vzorkem, který neobsahoval žádné testované barvivo, byl Zelený král Vratislav 12° (Konrád, Vratislavice). Dále bylo dodatečně testováno 6 vzorků piva z roku 2015. Rohozec 11° (Rohozec, Malý

Rohozec) obsahoval 0,964 mg/l Brilliant blue. Zelená nefiltrovaná 12° (Žlebské Chvalovice) obsahovala 0,78 mg/l Brilliant blue a 1,577 Brilliant blue. Ve velikonočním zeleném ležáku 12° (Purkmistr, Plzeň) byla přítomna také 2 barviva, Tartrazin a Brilliant blue o koncentraci 3,49 mg/l a 2,183 mg/l. Valášek 12° (Valášek, Vsetín) obsahoval také Tartrazin a Brilliant blue o koncentraci 2,446 mg/l a 2,363 mg/l. V pivech Podkováň 12° (Podkováň, Dolní Cetno) a Velikonoční kopřivová 12° (Modrá Hvězda, Dobřany) nebyla zjištěna žádná umělá barviva.

V rámci diplomové práce bylo zjištěno, že někteří výrobci piva neuvádí obsah umělých barviv ve Velikonočních speciálech, přesto však dochází k jejich použití k docílení požadované barvy (např. přimícháním jiného nápoje barvivo obsahující). Tato skutečnost je však pro běžného konzumenta těžko odhalitelná, jelikož se jedná o časově omezenou produkci těchto pivních speciálů, které se navíc dodávají na trh pouze jako piva stáčená a ne lahvovaná.

11. Zdroje

(1) Tingting Z., Pingli H., Amangul Y., Zhen L., Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors, Food Chemistry, 138 (2013) 1742–1748.

(2) Kucharska M., Grabka J., A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes, Talanta, 80 (2010) 1045–1051.

(3) Minioti K. S., Sakellariou Ch. F., Thomaidis N. S., Determination of 13synthetic food colorants in water – soluble foods by reversed – phase high – performance liquid chromatography coupled with diode – array detector, Analytica Chimica Acta, 583 (2007) 103 – 110.

(4) Nollet L. M. L., Toldrá F., Food Analysis by HPLC, Third Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, 2013, str. 516, 517, ISNB: 978-1-4398-3085-7.

(5) Klescht V., Hrnčiříková I., Mandelová L., Éčka v potravinách, Computer press, 2006: str. 11, ISNB: 80-251-1292-6.

(6) Informační centrum bezpečnosti potravin, http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/prilohy/Identifikace_PPL.pdf, datováno 28. 2. 2015.

(7) Bonan S., Fedrizzi G., Menotta S., Elisabetta C., Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high – performance liquid chromatogrphy coupled with diode – arraydetector, Dyes and Pigments, 99 (2013) 36 – 40.

(8) PubChem, Tartrazine Compound Summary, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tartrazine#section=Top, datováno 2. 3. 2015.

(9) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 102 – Tartrazin (Cl potravinářská žluť 4), http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E102, datováno 2. 3. 2015.

(10) Neviditelný čert, Prášková potravinářská barviva, http://www.neviditelnycert.cz/ncnew/blog/pel-mel/1265-praskova-potravinarska-barviva.html, datováno 3. 3. 2015.

(11) PubChem, Quinophtalone Coumpound Summary, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinophthalone#section=Top, datováno 2. 3. 2015.

(12) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 104 – Chinolinová žluť, http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E104, datováno 2. 3. 2015.

(13) PubChem, Sunset Yellow FCF Compound Summary, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6093232#section=Top, datováno 3. 3. 2015.

(14) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 110 – Žluť SY (Cl potravinářská žluť 3), http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E110, datováno 3. 3. 2015.

(15) PubChem, Sulfan Blue Compound Summary, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8507#section=Top, datováno 3. 3. 2015.

(16) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 131 – Patentní modř V (Cl potravinářská modř V), http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E131, datováno 3. 3. 2015.

(17) PubChem, Indigo carmine Compound Summary, http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E131, datováno 4. 3. 2015.

(18) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 132 – Indigotin (Cl potravinářská modř 1, Indigocarmine), http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E132, datováno 4. 3. 2015.

(19) PubChem, Brilliant Blue FCF Compound Summary, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19700#section=Top, datováno 4. 3. 2015.

(20) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 133 – Brilantní modř FCF (Cl potravinářská modř 2), http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E133, datováno 4. 3. 2015.

(21) PubChem, Acid Green 50 Compound Summary, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91525#section=Top, datováno 4. 3. 2015.

(22) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 142 – Zeleň S, http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E142, datováno 4. 3. 2015.

(23) PubChem, Fast Green FCF, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16887#section=Top, datováno 4. 3. 2015.

(24) Zdravá potravina, Éčka v potravinách, E 143 – Fast green FCF, http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E143, datováno 4. 3. 2015.

(25) Li W – J., Zhou X., Tong S – S., Jia Q., Poly (N – isopropylacrylamide – co - N, N´ methylene bisacrylamide) monolithic column embedded with g alumina nanoparticles microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of synthetic food dyes in soft drink samples, Talanta 105 (2013) 386–392.

(26) Karlíček R., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, 2007: 276 – 281, ISNB: 978-80-246-1453-3.

(27) Pall Corporation, http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=1252, datováno 9. 3. 2015.

(28) HPLC.CZ, Monolitické kolony, http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm, datováno 10. 3. 2015.

(29) Nováková L., Douša M. a kol., Moderní HPLC separace v teorii a praxi, Europrint a. s., 2013: 239 – 241, ISNB: 978-80-260-4243-3.

(30) Boháčová Tereza, Vývoj metody zelené chromatografie pro stanovení červených barviv v nápojích (Diplomová práce), FAF UK, Hradec Králové, 2014.