

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytické chemie

**Vývoj mikroemulzní elektrokinetické chromatografie pro analýzu ve  
vodě nerozpustných barviv nezákonně používaných v potravinách**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Petrů Ph.D.

Ráda bych na tomto místě poděkovala svojí školitelce Mgr. Kláře Petrů Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a připomínky a hlavně vstřícný a trpělivý přístup při zpracování diplomové práce. Též bych ráda poděkovala panu Doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. za jeho odborný dohled, zhodnocení a konzultace práce a také Mgr. Lucii Pincové za její pomoc a poskytnuté rady při zpracování praktické části diplomové práce.

Tato práce je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/30.0061.

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

V Hradci Králové dne

Jana Bradová

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jana Bradová

Školitel: Klára Petrů Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Název diplomové práce: Vývoj mikroemulzní elektrokinetické chromatografie pro analýzu ve vodě nerozpustných barviv nezákonně používaných v potravinách

V této práci byla navržena a vyvinuta metoda mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC) pro stanovení lipofilních barviv (Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan Red 7B, Sudan Orange G a Methyl Red), nelegálně používaných v potravinách. Za účelem optimalizace separace byl zkoumán vliv povrchově aktivní látky, kosolventu, organického modifikátoru, olejové fáze a délky kapiláry. Výsledný základní roztok elektrolytu (mikroemulze) pro MEEKC obsahoval 30mM fosfátového pufru (pH 7,5), 1,2 % (w/v) dodecylsulfátu sodného, 1,2 % (v/v) hexanu, 15 % (v/v) butan-1-olu a 20 % (v/v) acetonitrilu. V křemenné kapiláře o průměru 75  $\mu\text{m}$  a efektivní délce 36,5 cm bylo během 11 minut těchto 6 barviv rozděleno na základní linii. Analýza probíhala při napětí 20 kV a byla udržována konstantní teplota 25 °C. Analyty byly detekovány VIS spektrometrií při vlnových délkách 500 a 400 nm. Charakteristické hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD) pro opakovatelnost migračních časů a ploch píků analytů se pohybovaly v rozmezí od 0,3 do 0,9 % a 1,7 - 2,7 % ( $n = 5$ ). Kalibrační křivka byla lineární pro všechny analyty ( $R^2 \geq 0.9990$ ) a limit detekce se pohyboval od 0,19  $\mu\text{g/ml}$  (pro Sudan III) do 1,27  $\mu\text{g/ml}$  (pro Sudan Red 7B). Po vhodné úpravě vzorku, za účelem odstranění vlivu matrice a vlastním zakoncentrování, je navržená metoda vhodná pro analýzu potravin obsahujících nežádoucí příměsi.

## Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jana Bradová

Supervisor: Klára Petrů Ph.D.

Consultant: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Title of diploma thesis: Development of microemulsion electrokinetic chromatography method for the analysis of illegal fat-soluble foodstuff dyes

A microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) method was developed and proposed for the determination of fat-soluble dyes (Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan Red 7B, Sudan Orange G, and Methyl Red) illegally used in foodstuffs. The effect of surfactant, co-surfactant, organic modifier and oil as well as the capillary length were examined in order to optimize the separation. Final background electrolyte (solution of the microemulsion) for MEEKC was composed of 30mM phosphate buffer (pH 7.5), 1.2 % (w/v) sodium dodecyl sulfate, 1.2 % (v/v) of n-hexane, 15 % (v/v) of butan-1-ol, and 20 % (v/v) of acetonitrile. A baseline separation of these six dyes was achieved within 11 min by using fused-silica capillary with 75  $\mu\text{m}$  i.d. and effective length 36.5 cm. The applied voltage was 20 kV and temperature 25°C was maintained. The VIS detection wavelengths were 500 and 400 nm. The repeatability of the migration times and peak areas were characterized by RSD values ranging from 0.3 to 0,9 % and 1.7 – 2.7 % (n = 5), respectively. The calibration curves were linear for all analytes ( $R^2 \geq 0.9990$ ) and the limits of detection ranged from 0.19  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (for Sudan III) to 1.27  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (for Sudan Red 7B). The method devised is suitable for the analysis of suspected foodstuffs after appropriate sample pretreatment to eliminate matrix effects and to achieve sample pre-concentration.

# Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce.....	10
3. Teoretická část.....	11
3.1. Barviva používaná v potravinách.....	11
3.2. Sudanová barviva.....	12
3.2.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	13
3.2.2. Použití, toxicita a legislativa.....	17
3.3. Kapilární elektroforéza (CE).....	19
3.3.1. Popis CE zařízení.....	19
3.3.2. Elektroosmotický tok.....	20
3.3.3. Elektroforetická pohyblivost.....	22
3.3.4. Migrační čas.....	23
3.3.5. Nástřik vzorku na krátký konec kapiláry.....	23
3.4. Micelární (MEKC) a mikroemulzní (MEEKC) elektrokinetická chromatografie.....	24
3.4.1. Princip micelární elektrokinetické chromatografie.....	24
3.4.2. Princip mikroemulzní elektrokinetické chromatografie.....	26
3.4.3. Ovlivnění separace MEKC a MEEKC.....	28
3.4.3.1. Vliv pH pufru.....	28
3.4.3.2. Vliv surfaktantu.....	28
3.4.3.3. Vliv organického modifikátoru.....	29
3.4.3.4. Vliv kosurfaktantu.....	29
3.4.3.5. Vliv olejové fáze.....	29
3.4.4. Porovnání MEEKC a MEKC.....	30
3.5. Metody pro stanovení lipofilních barviv.....	31
4. Experimentální část.....	32
4.1. Materiál a pomůcky.....	32
4.1.1. Chemikálie.....	32
4.1.2. Standardy barviv.....	32
4.1.3. Vzorek pro extrakci.....	32

4.1.4.	Přístroje .....	33
4.2.	Podmínky měření.....	34
4.3.	Příprava roztoků .....	34
4.3.1.	Zásobní roztoky standardů.....	34
4.3.2.	Pracovní roztok standardů pro optimalizaci .....	35
4.3.3.	Roztoky pro kalibraci .....	35
4.3.4.	Příprava základního elektrolytu (BGE) .....	36
4.3.4.1.	30mM fosfátový pufr .....	36
4.3.4.2.	Mikroemulze .....	36
4.3.5.	Příprava extraktu .....	36
4.4.	Vyhodnocení a výpočty .....	38
4.4.1.	Testy vhodnosti systému.....	38
4.4.2.	Linearita, LOD, LOQ a Rozsah .....	39
4.5.	Výsledky a diskuze .....	41
4.5.1.	Optimalizace separačních podmínek .....	41
4.5.1.1.	Optimalizace složení vzorku.....	42
4.5.1.2.	Optimalizace pH tetraboritanového pufru .....	43
4.5.1.3.	Identifikace standardů, spektra .....	44
4.5.1.4.	Optimalizace pH fosfátového pufru.....	45
4.5.1.5.	Optimalizace koncentrace SDS .....	47
4.5.1.6.	Optimalizace koncentrace butan-1-olu. ....	48
4.5.1.7.	Optimalizace koncentrace acetonitrilu (ACN) .....	50
4.5.1.8.	Optimalizace n-hexanu v BGE .....	52
4.5.1.9.	Optimalizace délky kapiláry .....	53
4.5.2.	Optimální podmínky.....	54
4.5.3.	Charakterizace metody .....	55
4.5.3.1.	Testy vhodnosti systému (SST) .....	55
4.5.3.2.	Kvantitativní analýza .....	57
4.5.4.	Předběžná studie aplikace metody na reálný vzorek.....	62
4.5.4.1.	Prekoncentrace vzorku .....	63
5.	Závěr.....	64
6.	Zdroje .....	66

## Seznam použitých zkratk

ACN	Acetonitril
ADI	Povolený denní příjem (Acceptable Daily Intake)
BGE	Roztok základního elektrolytu
CAS	Registrační číslo (Chemical Abstract Service)
CE	Kapilární elektroforéza
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
ČL	Český lékopis
DAD	Detektor diodového pole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTAB	Dodecyltrimethylamonium bromid
EOF	Elektroosmotický tok
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MEEKC	Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
Mr	Relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie
NPM	Nejvyšší povolené množství
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsulfát sodný
SST	Testy vhodnosti systému
USP	Lékopis USA
VIS	Viditelné záření



## 1. Úvod

Barviva patří mezi potravinářské přídatné látky (aditiva) přidávané do potravin za účelem zlepšení jejich vlastností, zejména vzhledu. Lipofilní červená barviva Sudan I-IV, Sudan Red 7B, Para Red, Methyl Red, Sudan Orange G a Sudan Red G jsou legálně používána v průmyslu a uplatňují se též ve výzkumu jako indikátory.

Kvůli jejich kancerogenitě a genotoxicitě jsou však ve většině zemí, včetně Evropské unie, pro užití v potravinách zakázána. Přesto jsou tato barviva nalézána v různých dovážených produktech, zvláště u potravin obsahujících chilli. Proto je zapotřebí vyvíjet účinné a rychlé metody pro jejich detekci a identifikaci.

Nejčastěji využívanými metodami pro stanovení těchto barviv jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE).

CE je účinnou separační metodou. S HPLC se doplňují, každá však poskytuje jiný mechanismus separace. CE představuje velmi flexibilní metodu pro rychlou změnu podmínek. Její výhodou je především malá spotřeba vzorku a organických rozpouštědel, čímž se snižuje její ekologická náročnost. Další výhodou je i krátká doba analýzy. Pomocí Mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC) a Micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) lze stanovit lipofilní i hydrofilní molekuly současně, což by metodou HPLC bylo obtížné [1, 2].

## **2. Cíl práce**

Cílem této práce bylo navrhnout, optimalizovat a charakterizovat metodu pro stanovení nelegálních lipofilních barviv ve směsi pomocí mikroemulzní elektrokinetické chromatografie.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Barviva používaná v potravinách

Barviva jsou organické sloučeniny, které díky své chemické struktuře absorbují světlo ve viditelné oblasti a mohou se fyzikálně nebo chemicky vázat se substrátem. Obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb s azo-, nitro-, nitroso-, hydroxy-, amino-, alkamino- nebo karbonylovou skupinou [2].

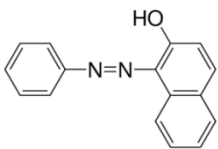
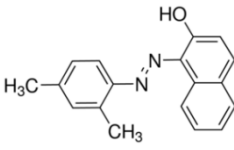
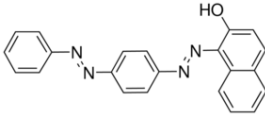
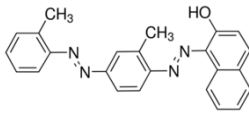
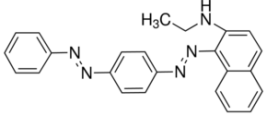
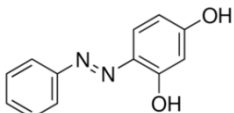
Barviva můžeme podle původu rozdělit na přírodní a syntetická. Přírodní rostlinná barviva jako karotenoidy, flavonoidy, antrachinony, betainy a pyrrolová barviva se považují za zdravotně nezávadná a jsou hojně používány v potravinářském průmyslu, farmacii nebo kosmetologii. Syntetická barviva jsou získávána průmyslovým zpracováním ropy a dehtu. Jejich užívání je často spojeno se zdravotními riziky (karcinogenitou, hemolytickými účinky, inhibicí enzymů, negativním působením na střevní sekreci, alergiemi). Podle chemické povahy se dělí na azobarviva, nitrobarviva, trimethylmethanová, pyrazonová, antrachinonová, chinolinová a indigoidní barviva [2].

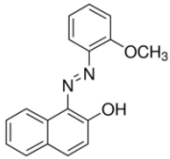
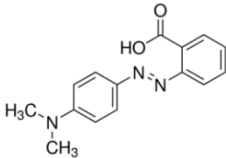
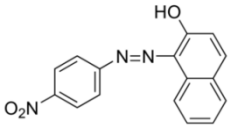
Druhy a množství povolených barviv v potravinách se v jednotlivých zemích liší. Užívání barviv v potravinách je v ČR limitováno stanovením nejvyššího povoleného množství (NPM) [3]. Před povolením používání barviv v potravinách se zkoumá jejich zdravotní nezávadnost u zvířat. Sleduje se akutní, subchronická a chronická toxicita, kancerogenita, mutagenita, teratogenita, kumulace v organismu, bioenergetické účinky, vlivy na imunitu a další účinky. Na základě těchto výsledků je stanoven povolený denní příjem (ADI). Dále je kladen důraz na jejich stálost vůči vnějším vlivům (pH, oxidační a redukční vlivy, světlo, teplo, vlhkost), nesmí interagovat s dalšími složkami potravy a musí být též ekonomicky dostupné. Nejčastěji jsou používány chinolová žluť, tartrazin, ponceau 4R, indigotin, azorubin, brilantní modř, zeleň S, brilantní čerň, amarant. Z přírodních barviv pak např. kurkumin, košenila, karmíny, lutein, beta-apo-8-karotenal, nebo ethylester kys beta-apo-8-karotenové. Některá z těchto barviv (např. lipofilní barviva, ponceau 4R, amarant nebo erythrosin) jsou podezřelá z karcinogenních účinků, což vedlo k jejich zákazu či omezení. V EU je používání ponceau 4R, amarantu a erythrozinu povoleno [2, 4].

### 3.2. Sudanová barviva

Barviva Sudan I-IV, Sudan Red 7B, Sudan Orange G, Sudan Red G, Methyl Red a Para Red jsou lipofilní azobarviva, obsahující charakteristickou skupinu -N=N-. Nejnižší lipofilitu mají Methyl Red (log P 3,3) a Sudan Orange G (log P 3,7) a nejvíce lipofilní jsou Sudan III, Sudan Red 7B, a Sudan IV s log P 7,5 - 8,5. Mají červeno - oranžové zbarvení a maximální absorpci při vlnových délkách v rozsahu přibližně 400 - 600 nm. Základní údaje o barvivech shrnuje

Tabulka 1: Základní charakteristika barviv [6-23]

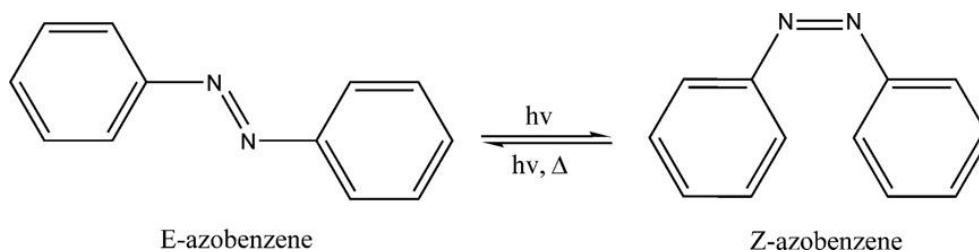
Sudan I		Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
		CAS:	842-07-9
		Mr:	248.28
		log P:	5.07
		λ <sub>max</sub> :	418 a 476 nm
Sudan II		Sumární vzorec:	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O
		CAS:	3118-97-6
		Mr:	276.33
		log P:	6.09
		λ <sub>max</sub> :	493 a 604 nm
Sudan III		Sumární vzorec:	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O
		CAS:	85-86-9
		Mr:	352.39
		log P:	7.47
		λ <sub>max</sub> :	508 - 512 nm
Sudan IV		Sumární vzorec:	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O
		CAS:	85-83-6
		Mr:	380.44
		log P:	8.50
		λ <sub>max</sub> :	357 a 520 nm
Sudan Red 7B		Sumární vzorec:	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub>
		CAS:	6368-72-5
		Mr:	379.46
		log P:	7.60
		λ <sub>max</sub> :	364 a 533 nm
Sudan Orange G		Sumární vzorec:	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		CAS:	2051-85-6
		Mr:	214.22
		log P:	3.77
		λ <sub>max</sub> :	388 nm

Sudan Red G		Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		CAS:	1229-55-6
		Mr:	278.31
		log P:	4.91
		λ <sub>max</sub> :	388 nm
Methyl Red		Sumární vzorec:	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
		CAS:	493-52-7
		Mr:	269.30
		log P:	3.31
		λ <sub>max</sub> :	410 nm
Para Red		Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
		CAS:	6410-10-2
		Mr:	293.28
		log P:	5.01
		λ <sub>max</sub> :	488 nm

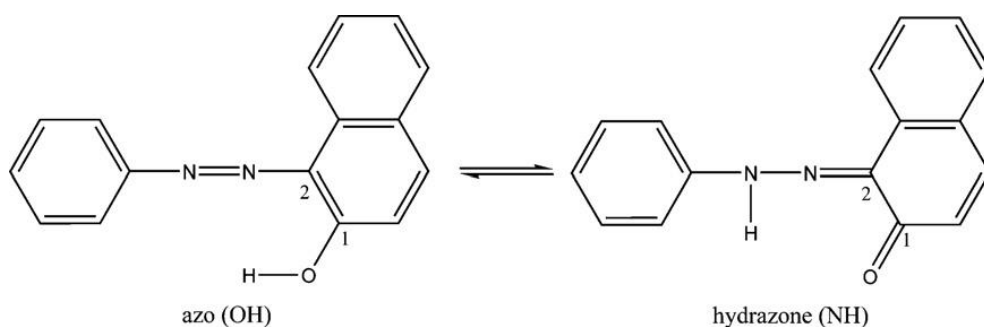
### 3.2.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Rozpustnost sudanových barviv je velmi podobná. Jsou rozpustná v tucích, nerozpustná nebo téměř nerozpustná ve vodě a různě rozpustná v organických rozpouštědlech (např. trichlormethanu, dichlormethanu, acetonu, chloroformu, toluenu, benzenu, acetonitrilu, etanolu nebo metanolu) [24, 25].

Jedná se o analoga azobenzenu, která vlivem UV záření přecházejí z konfigurace E do Z a zase zpět (Obr. 1). Díky azoskupině, která působí jako akceptor vodíku, dochází ke vzniku intramolekulární vodíkové vazby s fenolickou -OH skupinou (Obr. 2), což zvyšuje výslednou hodnotu pKa [24].

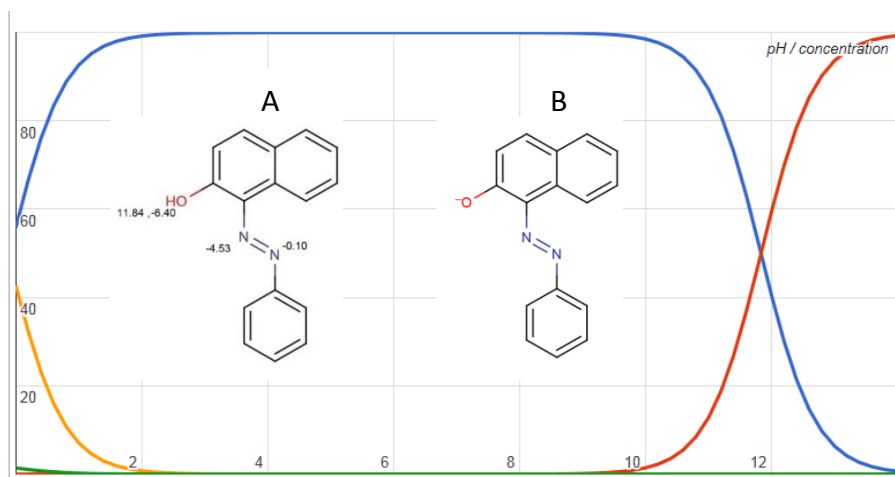


Obr. 1: Konfigurace azobenzenu [24]

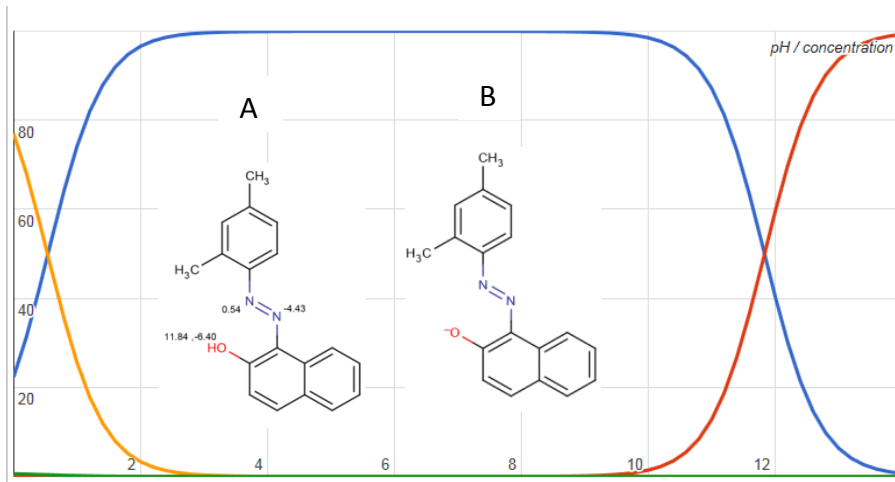


Obr. 2: Rovnováha mezi azo - hydrazonovou tautomerní formou Sudanu I [24]

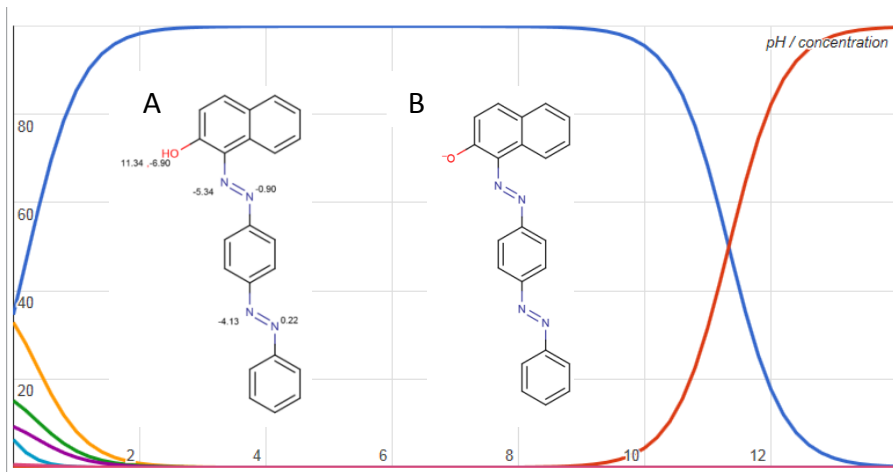
Na obrázcích (*Obr. 3 - Obr. 11*) je znázorněno acidobazické chování barviv. Osa x udává hodnotu pH, osa y pak koncentraci ionizovaných/neionizovaných molekul v %. Modrá čára představuje nenabitě molekuly (A), červenou barvou jsou značeny molekuly s nábojem (B). Pro jednotlivé funkční skupiny je uvedena hodnota pKa. V rozsahu pH 2 - 10 je většina sledovaných barviv neionizovaná. Pouze Sudan Orange G se ionizuje při pH vyšším než 8 a Methyl Red při pH nižším než 4.



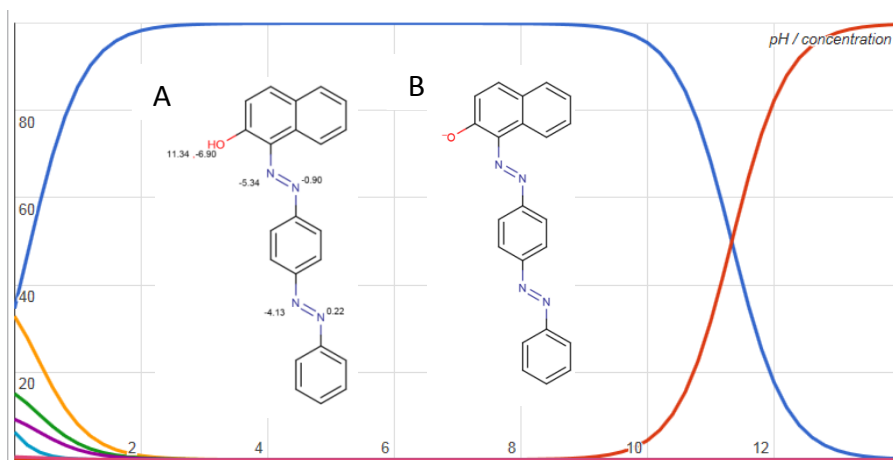
Obr. 3: Acidobazické chování Sudanu I [6]



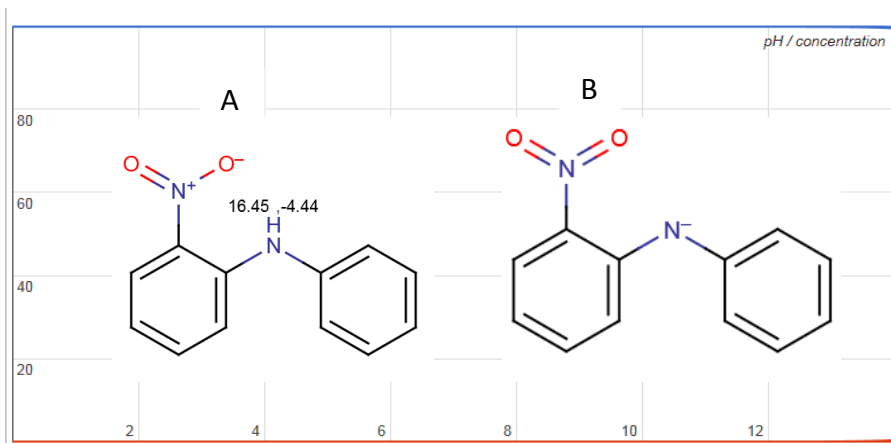
Obr. 4: Acidobazické chování Sudanu II [7]



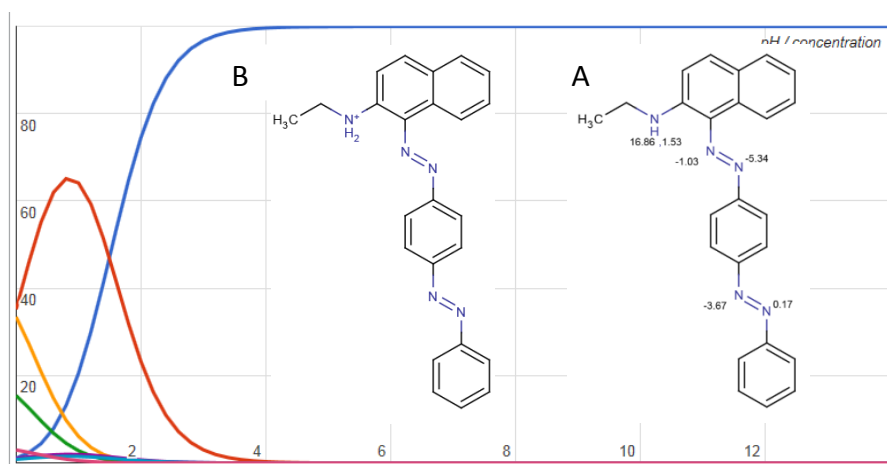
Obr. 5: Acidobazické chování Sudanu III [8]



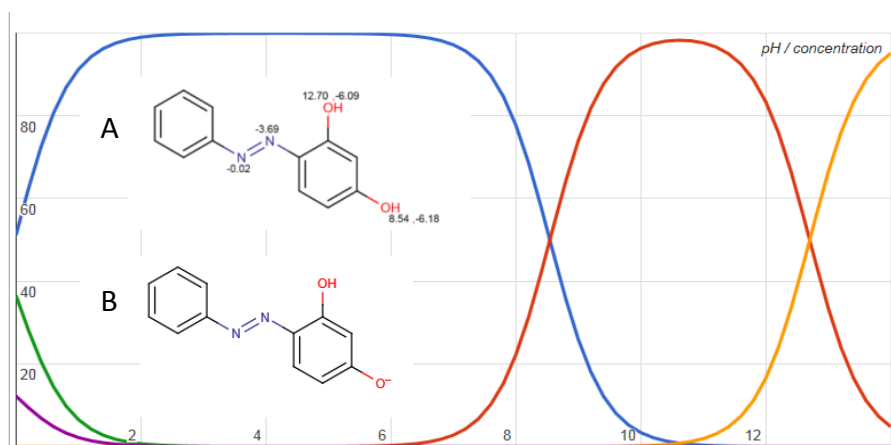
Obr. 6: Acidobazické chování Sudanu IV [9]



Obr. 7: Acidobazické chování Para Red [14]

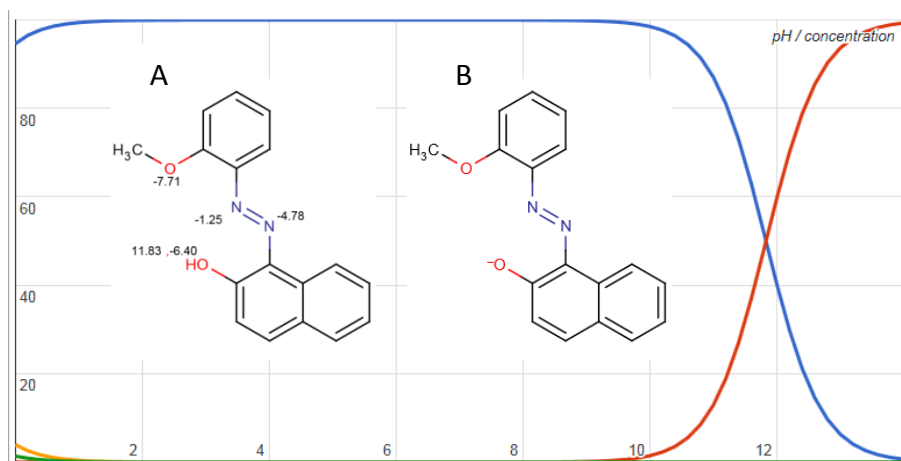


Obr. 8: Acidobazické chování Sudanu Red 7B [10]

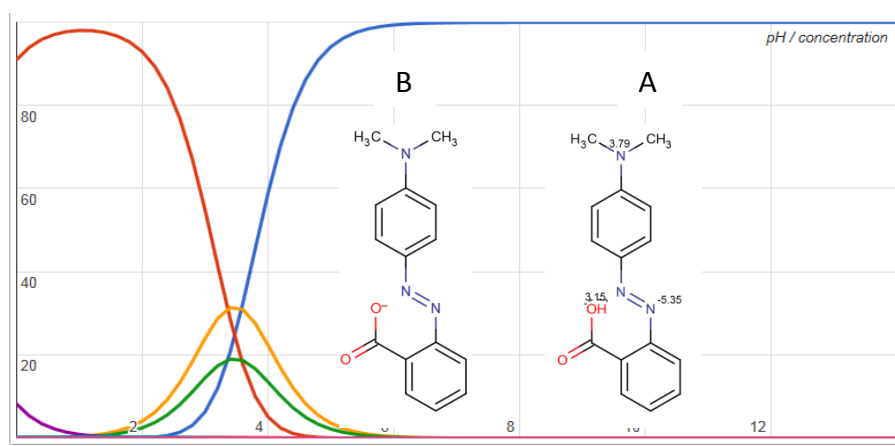


Obr. 9: Acidobazické chování Sudanu Orange G [11]





Obr. 10: Acidobazické chování Sudanu Red G [12]



Obr. 11: Acidobazické chování Methyl Red [13]

### 3.2.2. Použití, toxicita a legislativa

Sudanová barviva jsou používána převážně v průmyslu k barvení rozpouštědel, minerálních olejů, vosků, mýdel, svíček, textilu a dalších materiálů. Svoje užití mají též v kosmetice a ve výzkumu např. k indikaci pH (Methyl Red), nebo ke stanovení lipidů pro vizualizaci a analytické účely (Sudan IV)[24-26].

Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikuje Sudany jako karcinogeny kategorie 3, tedy „neklasifikovatelné“. Existují experimentální důkazy, že Sudan I je genotoxický i karcinogenní. U ostatních barviv však přesvědčivé důkazy o jejich toxicitě pro člověka chybí. Nicméně díky strukturální podobnosti se Sudanem I, lze předpokládat, že mohou být potenciálně stejně karcinogenní a genotoxické jako Sudan I [25, 26].

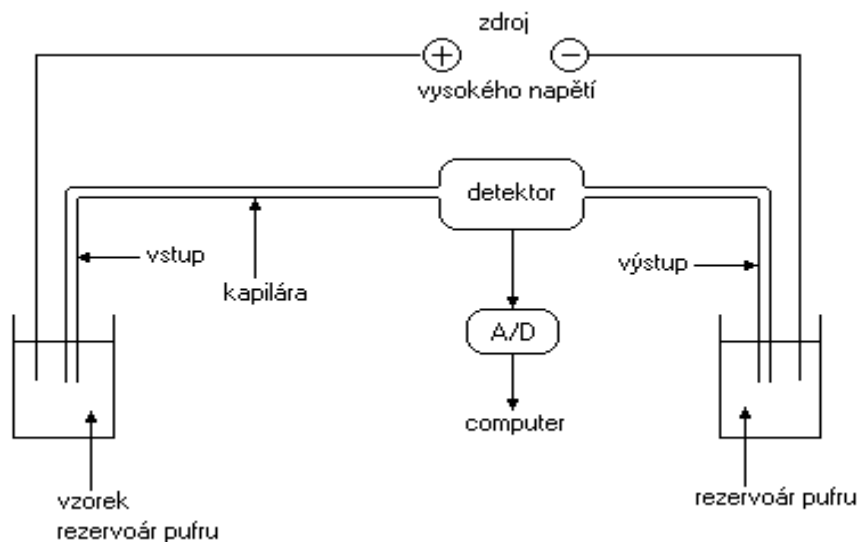
Přesto bylo v chilli papričkách a různých chilli produktech, pocházejících zejména z Indie, v roce 2003 objeveno barvivo Sudan I a to až v koncentraci 4000 mg/kg. Na základě těchto skutečností vydala Evropská komise Rozhodnutí o mimořádných opatřeních [27], které stanovují, že dovážení chilli papriček a chilli koření do členských států je zakázáno, pokud není analyticky doložena nepřítomnost Sudanu I. Dále bylo toto rozhodnutí změněno a doplněno o Sudany II-IV. Kromě těchto barviv bylo v koření objeveno i několik dalších nelegálních barviv - Para Red, Sudan Orange G, Sudan Red 7B a další, které nebyly schváleny v potravinách, v souladu se Směrnicí Evropského parlamentu o barvivech použitých v potravinách [4, 26].

### 3.3. Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza (CE) je separační metoda, založená na rozdílné schopnosti migrace iontů v elektrickém poli [28]. Podle separačních principů můžeme dále rozlišit CE na zónovou elektroforézu, izotachoforézu, izoelektrickou fokusaci a micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), od které je odvozená mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC). V zónové elektroforéze a izotachoforéze je separace způsobena rozdílem efektivních pohyblivostí. V izoelektrické fokusaci dochází k rozdělení analytů na základě rozdílů v izoelektrických bodech. Micelární a mikroemulzní elektrokinetické chromatografie jsou založené na odlišném rozdělování mezi mobilní a pseudostacionární fázi [29].

#### 3.3.1. Popis CE zařízení

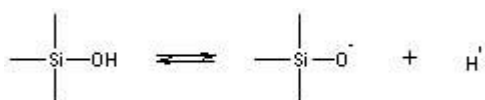
Separace obvykle probíhá v křemenných kapilárách, o vnitřním průměru 50 - 70  $\mu\text{m}$  a celkové délce 20 - 100 cm, pokrytých vrstvou polyamidu [29]. Konce kapiláry jsou umístěny v zásobnících s elektrolytickým pufrem. Obsah zásobníků je stejný jako v kapiláře. K zásobníkům jsou připojeny elektrody, které vytvářejí kontakt mezi vysokým napětím a kapilárou. Vzorek je nanášen nahrazením jednoho z rezervoárů (obvykle na anodě) rezervoárem vzorku za použití elektrického pole nebo vnějším tlakem. Po zpětné výměně rezervoárů je aplikováno napětí a probíhá separace [28]. Signál je snímán pomocí detektoru, který je zpravidla umístěn na koncové části kapiláry, a dále zpracováván počítačem [29]. Schematické znázornění modelu kapilární elektroforézy je uvedeno na *Obr. 12*.



Obr. 12: Schematické znázornění modelu kapilární elektroforézy [30]

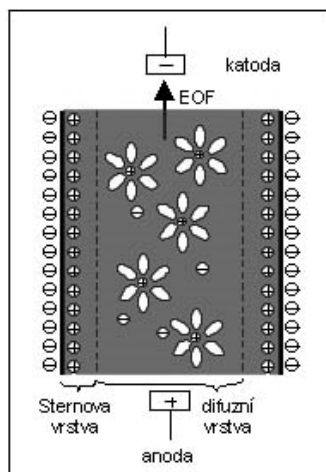
### 3.3.2. Elektroosmotický tok

Pokud je na kapiláru vloženo napětí, vzniká elektroosmotický tok (EOF), který je vyvolán negativním nábojem silanolových skupin na povrchu kapiláry (Obr. 13) [29].



Obr. 13: Ionizace povrchu kapiláry [31]

Hromaděním protiiontů (kationtů) v blízkosti stěny kapiláry se vytváří dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva), která je zdrojem zeta potenciálu. Při aplikaci napětí jsou kationty tvořící difuzní dvojvrstvu přitahovány ke katodě. Směr pohybu EOF je tedy od kladně nabitě anody k záporné katodě (Obr. 14) [28].



Obr. 14: Směr pohybu EOF [31]

Velikost EOF je charakterizována rychlostí ( $v_{EOF}$ ), kterou popisuje Rovnice 1, kde  $\epsilon$  značí dielektrickou konstantu,  $\zeta$  elektrokinetický potenciál zeta a  $E$  intenzitu elektrického pole [28].

$$v_{EOF} = \left( \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) E$$

Rovnice 1

Náboj stěny kapiláry a tedy i EOF závisí na pH a iontové síle pufru. Při nízkém pH je ionizace kapiláry potlačena a EOF je velmi malý, ale při vysokém pH jsou silanolové skupiny převážně ionizovány a EOF se zvětší. Zvýšením iontové síly pufru se sníží tlak v dvojité vrstvě, čímž se sníží i zeta potenciál a EOF [28].

Díky EOF mohou migrovat všechny částice ve stejném směru. Kationty putují nejrychleji, protože jsou elektroforeticky přitahovány ke katodě, tedy ve směru EOF. Neutrální látky migrují spolu s EOF, ale nedojde k jejich oddělení. Nejpomaleji se pohybují anionty, které jsou přitahovány k anodě [28]. Avšak díky plochému profilu toku převyšuje EOF už při neutrálním pH elektroforetickou mobilitu většiny aniontů, takže ve výsledku jsou nesený EOF též ke katodě [29].

### 3.3.3. Elektroforetická pohyblivost

Pohyb elektricky nabité částice v elektrickém poli je určen znaménkem náboje a orientací elektrického pole [29]. Rychlost  $v$  [m/s] definuje *Rovnice 2*. Je dána elektroforetickou pohyblivostí  $\mu_e$  [m<sup>2</sup>/Vs] a intenzitou elektrického pole  $E$  [V/cm], která je funkcí aplikovaného napětí a délky kapiláry [28].

$$v = \mu_e \cdot E$$

*Rovnice 2*

Elektroforetická pohyblivost je konstanta charakteristická pro každý iont, vyjadřuje rychlost pohybu částice nebo iontu v jednotkovém elektrickém poli. Je dána podílem elektrické a třecí síly. Popsuje ji *Rovnice 3*, kde  $q$  označuje náboj iontu,  $\eta$  viskozitu roztoku a  $r$  poloměr iontu. Z toho vyplývá, že malé vysoce nabitě molekuly mají velkou pohyblivost, zatímco velké a minimálně nabitě molekuly mají pohyblivost malou [28, 29].

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

*Rovnice 3*

Elektroforetickou pohyblivost pro jednotlivé ionty můžeme nalézt v tabulkách, kde je stanovena pro plně nabitě molekuly a nekonečné zředění. Tyto hodnoty se však liší od experimentálně stanovené efektivní pohyblivosti [28]. Tento rozdíl je dán tím, že všechny ionizované formy těžé látky putují stejnou rychlostí, která je výsledkem disociace analytů v pufu. Efektivní pohyblivost ( $\bar{\mu}$ ) můžeme tedy stanovit, podle *Rovnice 4*, jako součet pohyblivostí jednotlivých iontových forem příslušného iontu  $\mu_i$  vynásobených odpovídajícím molárním zlomkem  $x_i$  [29].

$$\bar{\mu} = \sum_{i=1}^n \mu_i x_i$$

*Rovnice 4*

### 3.3.4. Migrační čas

Migrační čas je definován jako čas, který potřebuje látka k elektromigraci z místa nástřiku do místa detekce a je dán podílem migrační vzdálenosti a rychlosti. Může být použit pro výpočet zdánlivé pohyblivosti analytů ( $\mu_a$ ) podle vztahu *Rovnice 5*, kde  $V$  značí aplikované napětí,  $l$  efektivní délku kapiláry (z místa injekce do místa detekce),  $L$  celkovou délku kapiláry,  $t$  migrační čas a  $E$  elektrické pole [28, 29].

$$\mu_a = \frac{1}{t E} = \frac{l L}{t V}$$

*Rovnice 5*

Efektivní pohyblivost  $\mu_e$  lze vypočítat ze vztahu  $\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$  nezávislým měřením EOF pomocí neutrálních markerů, které se pohybují stejnou rychlostí jako EOF (např. dimethyl sulfoxid) [28].

### 3.3.5. Nástřik vzorku na krátký konec kapiláry

Na komerčních přístrojích je minimální efektivní délka kapiláry limitována konstrukcí kazety pro umístění kapiláry, tedy vzdáleností mezi místem nástřiku a pozicí detektoru. Podle výrobce se mohou minimální délky lišit, obecně se pohybuje okolo 25 - 50 cm. Pro získání rychlé analýzy by mělo být aplikováno co nejvyšší napětí na co nejkratší kapiláru. To je však spojeno s tvorbou Joulova tepla. Z důvodu elektrické izolace může být maximální aplikované napětí okolo 30 kV [32].

Jedním z řešení, jak zkrátit efektivní délku kapiláry, může být aplikace vzorku na opačný konec kapiláry, tedy blíže k detektoru. Tomuto postupu se říká nástřik vzorku na krátký konec. Pro praktické provedení je však nezbytné změnit polaritu vkládaného napětí, protože analyty musí migrovat k detektoru v opačném směru. Tento postup může zkrátit dobu analýzy až o dvě třetiny oproti klasickému nástřiku. Je považován za běžnou operaci pro úspěšné snížení času analýzy, zvýšení citlivosti a snížení spotřeby pufru. Umožňuje také použití vysoce silných elektrolytů, které by za běžných podmínek, kvůli generovanému Joulovu teplu a vysokému proudu, nebylo možné použít [32].

### **3.4. Micelární (MEKC) a mikroemulzní (MEEKC) elektrokinetická chromatografie**

#### **3.4.1. Princip micelární elektrokinetické chromatografie**

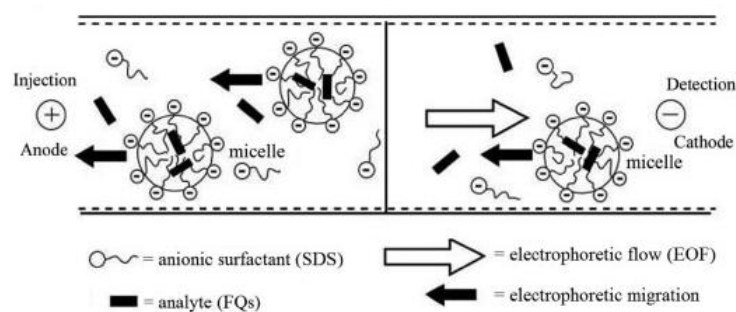
Protože v klasické zónové kapilární elektroforéze mohou být separovány pouze nabitě nebo ionizované analyty, byla podle Nakadawova předpokladu, že micely iontového surfaktantu mohou migrovat ve vodném roztoku pomocí elektroforézy, vyvinuta micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) [33].

MEKC je jedna z nejpoužívanějších metod CE. Její předností je právě možnost separace nabitých i neutrálních molekul. Pracovní elektrolyt obsahuje přídavek ionogenního smáčedla v takové koncentraci, která převyšuje kritickou micelární koncentraci, a začnou se tvořit micely. Molekuly smáčedla jsou orientované svými nabitými konci směrem k povrchu micely a nenabitě konce tvoří hydrofobní jádro, které umožňuje vstup nenabitých molekul, a díky náboji na povrchu micely je možná jejich elektroforetická separace [28, 29].

Náboj micely závisí na volbě surfaktantu. Z anionických smáčedel se nejčastěji používá dodecylsulfát sodný (SDS) nebo žlučové kyseliny, z kationických pak např. cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) nebo dodecyltrimethylamonium bromid (DTAB). Pokud je zapotřebí snížit rychlost micel, lze použít i přídavek neionogenního smáčedla [29].

Micelární roztok je homogenní. Mezi samostatnými molekulami surfaktantu a agregáty (micelami) se vytváří dynamická rovnováha. Micely surfaktantu se chovají jako pseudostacionární fáze. Micela migruje jinou rychlostí než vodná fáze v závislosti na elektroforetických podmínkách. SDS jako anionický surfaktant, široce užívaný v MEKC, tvoří negativně nabitě micely, které jsou v elektrickém poli elektroforeticky přitahovány k anodě. V neutrálním nebo bazickém pH je však rychlost EOF větší než elektroforetická migrace micel. Micely tedy migrují směrem ke katodě (viz *Obr. 15*), ale jsou oproti vodné fázi pomalejší [34].





Obr. 15: Migrace micel anionického surfaktantu v elektrickém poli [35]

Během migrace mohou micely interagovat s rozpuštěnými látkami jak chromatograficky, tak pomocí hydrofobních a elektrostatických interakcí. Nabité látky nejsou v kontaktu s micelami a jsou separovány elektrostaticky pomocí EOF [28]. Neutrální molekuly se distribuují mezi micely a vodnou fází. Ty, které nejsou umístěny v micelách, jsou nesený EOF stejnou rychlostí ke katodě. Analyty, které jsou bezzbytku inkorporovány do micel, migrují nejpomaleji [34]. Celkový poměr látkového množství rozpuštěné látky v micelle k látkovému množství látky v mobilní fázi udává kapacitní faktor  $k'$ , též označovaný jako distribuční poměr. Ten lze vypočítat z Rovnice 6, kde  $t_r$  značí retenční čas solutu,  $t_0$  retenční čas s micelami neinteragujícího solutu, pohybujícího se s EOF,  $t_m$  migrační čas micely,  $K$  je rozdělovací koeficient,  $V_S$  objem micelární fáze a  $V_M$  objem mobilní fáze [28]. Jako příklad neinteragujícího solutu může být metanol, který má hodnotu  $K = 0$  a do micel nevstupuje. Za migrační čas micely lze považovat retenční čas Sudanu III s hodnotou  $K = \infty$ , který vstupuje do micely beze zbytku [29].

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)} = K \left(\frac{V_S}{V_M}\right)$$

Rovnice 6

Výsledná rychlost migrace elektricky neutrálních analytů se tedy pohybuje mezi rychlostí EOF a micel. Analyty jsou detekovány v pořadí od nejnižšího distribučního poměru k nejvyššímu [34]. Čím více lipofilní sloučenina je, tím více interaguje s micelami a je zadržována déle [28]. Rozdělovací koeficienty solutů lze ovlivnit například přidáním kovů, které mají vliv na povrchový náboj micely. Změnou pH pracovního elektrolytu můžeme ovlivnit ionizaci a tím i

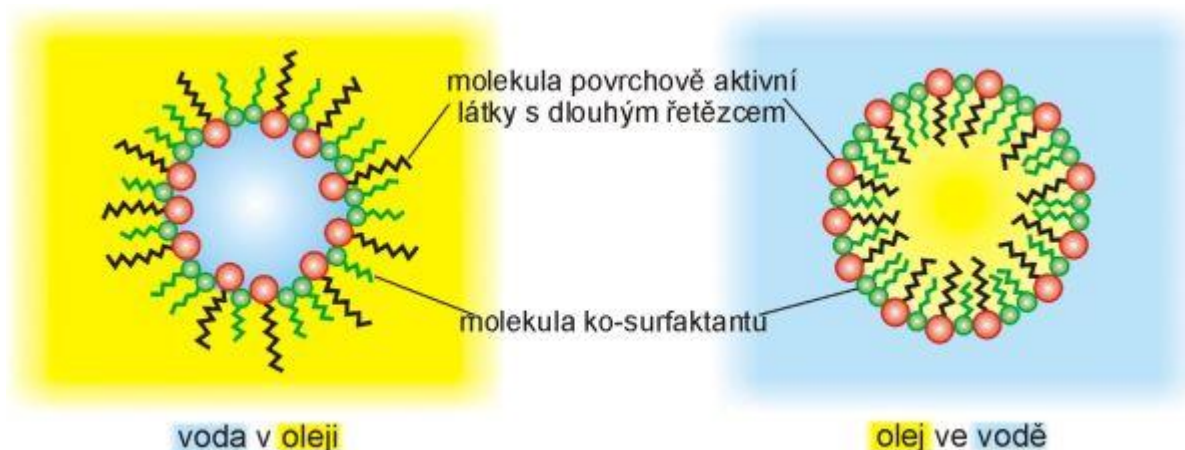
rozdělování mezi micely a mobilní fázi. Časté je také přidávání nevodných rozpouštědel (např. metanolu, acetonitrilu, propan-2-olu), čímž se změní micelární struktura a tím i interakce mezi solutem a micelou [28, 29].

### **3.4.2. Princip mikroemulzní elektrokinetické chromatografie**

Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC) je jednou z metod kapilární elektroforézy (CE), která umožňuje separaci neutrálních i nabitých molekul. K rozdělení jednotlivých složek využívá mikroemulzi [36].

Mikroemulze jsou stabilní, izotropicky čisté a opticky transparentní roztoky. Skládají se z olejové a vodné fáze, surfaktantu a kosurfaktantu [36, 37]. Podle systému navrženého Winsorem můžeme mikroemulze rozdělit na typ voda v oleji (v/o) nebo olej ve vodě (o/v). Surfaktant je vždy rozpustný v převládající složce mikroemulze. V mikroemulzi typu o/v se surfaktant rozpouští ve vodné fázi, naopak v mikroemulzi typu v/o má větší rozpustnost ve fázi olejové [37].

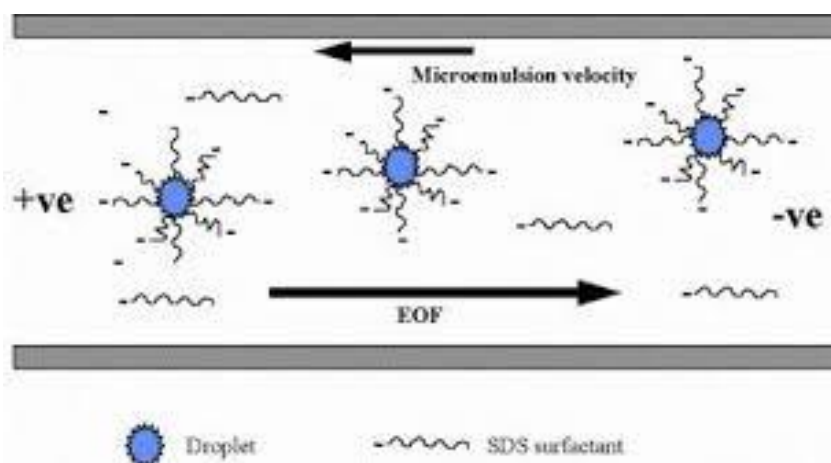
V mikroemulzi typu o/v je olejová fáze (např. n-hexan) dispergovaná ve vodném pufru. Mezi olejovou a vodnou fází je vysoké povrchové napětí, které se přidáním surfaktantu, v koncentraci převyšující jeho kritickou micelární koncentraci, snižuje a vzniká mikroemulze. Molekuly surfaktantu jsou orientované svými neutrálními skupinami směrem k olejovým kapkám a nabitými skupinami k vodné fázi. Olejová kapka se tedy nachází uvnitř vzniklé micely. V mikroemulzi typu v/o je toto uspořádání opačné viz *Obr. 16*. Povrchové napětí se dále snižuje (skoro až k nulovým hodnotám) po přidání kosurfaktantu, alkoholu s krátkým řetězcem, který je nezbytný pro stabilizaci mikroemulze. Kosurfaktant se rozmístí na rozhraní olejové a vodné fáze, kde snižuje mezifázový odpor [36, 37].



Obr. 16: Uspořádání mikroemulzní kapky [38]

Princip separace MEEKC je podobný jako u MEKC. Micely, tvořící pseudostacionární fázi, jsou v MEEKC nahrazeny mikroemulzí. Mikroemulzní kapky mohou být, stejně jako micely, pozitivně nebo negativně nabitě, v závislosti na volbě surfaktantu. Nejčastěji je v MEEKC používán anionický surfaktant SDS, který dává mikroemulzním kapkám záporný náboj. Migrace záporně nabitých mikroemulzních kapek v elektrickém poli odpovídá migraci negativních micel (Obr. 17) [29, 36].

Analyty se selektivně rozdělují mezi vodnou fázi a pohybující se mikroemulzní olejové kapky. Tento děj je chromatografický. Hydrofobní sloučeniny pronikají více do olejových kapek, a proto migrují déle. Nabitě směsi se separují také elektroforeticky, podle charakteru a síly svých nábojů. Pozitivní ionty mohou tvořit iontový pár s negativním povrchem kapky, negativní ionty se s kapkami odpuzují [36, 37].



Obr. 17: Migrace záporně nabitě mikroemulzní kapky [39]

Migrační čas neutrálních směsí ( $t_r$ ) se nachází mezi migračním časem elektroosmotického markeru (např. metanolu) a migračním časem mikroemulzního markeru (např. dodecylbenzenu). Lze vypočítat podle Rovnice 7, kde  $t_0$  značí migrační čas elektroosmotického markeru,  $t_{ME}$  migrační čas mikroemulzního markeru a  $k'$  kapacitní faktor [39].

$$t_r = \left( \frac{1 + k'}{1 + \frac{t_0}{t_{ME}} k'} \right) t_0$$

Rovnice 7

Distribuční poměry solutů  $k'$  jsou počítány analogicky jako u MEKC. Migrační čas analytů se prodlužuje s rostoucím distribučním poměrem, který je přímo úměrný hydrofobní povaze molekuly [37, 39].

### 3.4.3. Ovlivnění separace MEKC a MEEKC

Na separaci pomocí MEKC mají vliv různé faktory jako například volba vhodného pH a koncentrace pufru, použití různých typů surfaktantů a obsah organických modifikátorů. V MEEKC hraje roli navíc výběr a koncentrace olejové fáze a kosurfaktantu [36].

#### 3.4.3.1. Vliv pH pufru

Zvolení vhodného pH pufru má vliv na rychlost EOF, stupeň ionizace analytů a tím i na rozdělování analytů mezi pseudostacionární a mobilní fázi. Obvykle jsou používány pufrы s pH v rozmezí 7 - 9 a nízkou iontovou silou (např. borátový a fosfátový pufr), které při vloženém napětí generují vysoký EOF a nízký proud. Většina sloučenin je při tomto pH ionizována. Příliš vysoká koncentrace pufru potlačuje EOF a generuje vysoký proud, což omezuje velikost vkládaného napětí [29, 39].

#### 3.4.3.2. Vliv surfaktantu

Koncentrace a typ surfaktantu ovlivňuje velikost a náboj olejových kapek mikroemulze, velikost a směr EOF a párování iontů. Anionické surfaktanty jako SDS a choláty tvoří negativně nabitě mikroemulzní kapky, snižují povrchové napětí mezi olejovou a vodnou fází a stabilizují mikroemulzi. Se zvyšující koncentrací SDS se zvětšuje hustota negativního náboje mikroemulzní kapky, tím se zvýší migrační pohyblivost proti EOF a migrační čas se prodlouží [36, 40].

Kationické surfaktanty (např. CTAB) dávají olejovému jádru pozitivní náboj. Adhezí monomerů CTAB na stěnu kapiláry dochází ke změně náboje stěny kapiláry a směru EOF. Proto je potřeba při práci s CTAB změnit polaritu napětí. CTAB se používá k potlačení iontového párování kationtů s SDS. Neionické surfaktanty mohou být též použity pro tvorbu mikroemulze, vytvářejí však nenabitě kapky, které migrují stejnou rychlostí jako EOF, takže pro separaci neutrálních molekul nejsou vhodné [28, 36].

Zvýšením koncentrace surfaktantu se zvýší iontová síla pufru, EOF se sníží a prodlouží se migrační čas [36].

#### **3.4.3.3. Vliv organického modifikátoru**

Organická rozpouštědla (modifikátory) jsou často přidávána k základnímu elektrolytu v MEKC. Vlivem organických rozpouštědel dochází ke snížení hydrofobních interakcí mezi micelou a rozpouštědlem. Standardně jsou používány metanol, acetonitril nebo isopropanol [28, 36]. Působí také na EOF, rozdělování analytů mezi olejovou a vodnou fází a na elektroforetickou mobilitu nabitých částic. Zlepšují též rozlišení mezi jednotlivými píky. Přidáním organických modifikátorů se zvýší migrační čas, což je způsobeno pravděpodobně ovlivněním viskozity elektrolytu a snížením EOF [1].

#### **3.4.3.4. Vliv kosurfaktantu**

Kosurfaktant butan-1-ol je distribuován na rozhraní olejové a vodné fáze. Zvýšením koncentrace se zvětšuje velikost mikroemulzní kapky, membrána kapky se ztenčí a je flexibilnější pro vstupování analytů, což má vliv na rychlost analýzy. Při vysoké koncentraci však může butan-1-ol pronikat i do olejového jádra a způsobit až rozpad mikroemulzní struktury [1]. Též má vliv na viskozitu elektrolytu a tím i na rychlost EOF. Se zvyšující se koncentrací butan-1-olu se zkracuje migrační čas neutrálních látek [36]

#### **3.4.3.5. Vliv olejové fáze**

Bylo zjištěno, že typ olejové fáze nemá na separaci neutrálních molekul zásadní vliv. Pro tvorbu olejové fáze jsou používány alkany (např. hexan, oktan nebo heptan), ale také cyklohexan, chloroform a další organické látky [39].

#### **3.4.4. Porovnání MEEKC a MEKC**

Na základě závěrů pozorovaných při aplikacích MEKC/MEEKC bylo konstatováno, že mikroemulze má oproti klasickému micelárnímu roztoku větší solubilizační sílu pro hydrofilní i hydrofobní sloučeniny. Přítomnost olejového jádra zvyšuje solubilizační kapacitu a umožňuje lepší rozdělení analytů. Bylo pozorováno, že lipofilní látky jsou separovány lépe pomocí MEEKC, protože lipofilní sloučeniny se mohou rozdělovat do olejových kapek mikroemulze snáze než do ohraničených micel, lze ji tedy aplikovat na větší rozsah analytů. MEEKC také poskytuje širší škálu parametrů, které mohou být optimalizovány, k dosažení větší efektivity a selektivity [37].

### 3.5. Metody pro stanovení lipofilních barviv

Stanovení lipofilních barviv je prováděno nejčastěji metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [26, 41-50].

CE metody byly vyvíjeny pro separaci úzce příbuzných standardů barviv ve směsi a barviv běžně se vyskytujících ve vybraných potravinách. Jsou používány především pro stanovení hydrofilních barviv obsahujících karboxy-, sulfo- nebo hydroxy- skupiny. Tyto skupiny tvoří v zásaditém prostředí negativně nabitě ionty, které jsou ideální pro separaci CE. Je tedy možné separovat tato barviva během jedné analýzy a v krátkém čase [2, 51].

Práci zbývajících se CE stanovením lipofilních barviv je jen velmi málo. Jsou zaměřeny na separaci a stanovení Sudanů I-IV pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) [52-54]. Ve všech stanoveních byl jako surfaktant použit dodecylsulfát sodný (SDS) a jako organické rozpouštědlo acetonitril (ACN). Dále byly základní roztoky elektrolytů složeny z bikarbonátového [52, 53] a borátového pufru [54]. Barviva byla detekována buď UV spektrofotometrií [54], nebo hmotnostní spektrometrií (MS) [52, 53]. Metody byly ověřeny pomocí extrakce barviv ze vzorků chilli koření a rajčatové chilli omáčky.

Další možnost stanovení lipofilních barviv poskytuje metoda mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC). Tato metoda byla s úspěchem aplikována např. na vitamíny rozpustné v tucích [1], beta-blokátory [55], steroidní hormony [56] a další lipofilní i hydrofilní látky. Stanovení sudanových barviv touto metodou zatím nebylo popsáno.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Materiál a pomůcky

#### 4.1.1. Chemikálie

Acetonitril (ACN) - 99,9 %, Sigma Aldrich

Butan- 1-ol - p.a., Lachema,

Destilovaná voda - Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA)

Dimethyl sulfoxid (DMSO) - 99,9 %, Sigma Aldrich

Dodecyl sulfát sodný (SDS) - 99 %, Sigma Aldrich

Hydroxid sodný (NaOH) - p.a., Penta

Kyselina fosforečná 85 % - p.a., MERCK

Kyselina chlorovodíková - p.a., Penta

n- hexan - 96%, Riedel de Haen

Tetraboritan sodný dekahydrát - p.a., Sigma Aldrich,

Tetrahydrofuran (THF) - pro HPLC, Sigma Aldrich

#### 4.1.2. Standardy barviv

Methyl Red - p.a., Sigma Aldrich

Para Red - 95 %, Sigma Aldrich

Sudan I - 97 %, Sigma Aldrich

Sudan II - 90 %, Sigma Aldrich

Sudan III - 90 %, Sigma Aldrich

Sudan IV - 80 %, Sigma Aldrich

Sudan Orange G - 85 %, Sigma Aldrich

Sudan Red 7B - 95 %, Sigma Aldrich

Sudan Red G - p.a., Sigma Aldrich

#### 4.1.3. Vzorek pro extrakci

Chilli Mojo - směs koření obsahující chilli v práškové formě, komerční produkt zakoupený v místním supermarketu.



#### 4.1.4. Přístroje

Měření bylo provedeno na komerčním elektroforetickém systému Agilent CE 7100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) se zabudovaným spektrofotometrickým UV/VIS detektorem s diodovým polem (DAD).

Ovládání a vyhodnocování dat bylo umožněno softwarem Agilent ChemStation version B.04.02.

Analýzy probíhaly v nepotažených křemenných 75 $\mu$ m kapilárách (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

Standardy byly navažovány na automatických analytických vahách Sartorius 2004 MP (Goettingen, Německo) a Mettler AE163 (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, USA).

K homogenizaci a odplyňování roztoků byla používána ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec (Bandelin Electronic, Německo) a Vortex 3 (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Německo).

Hodnota pH byla měřena pomocí kombinované elektrody pHC2011-P (Hach Lange Sensors, Francie) s číslem BCN-8 E16M318, systémem Red Rod a rozsahem měření od 0 do 14 pH, a pH metru MeterLab PHM 220 (Radiometer Copenhagen, Francie).

Extrakt byl odstředován na centrifuze (Ependorf minispin plus, Hamburk, Německo).

Roztoky elektrolytů byly filtrovány přes 0,45 $\mu$ m nylonové filtry (Tecknokroma, Barcelona, Španělsko).

K přípravě roztoků byly použity automatické pipety (Brand, Německo) s rozsahem 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 1-10 ml, 0,5-5 ml.

## 4.2. Podmínky měření

Pokud není uvedeno jinak, separace probíhala při napětí 20 kV a teplotě 25 °C v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 75 µm, celkovou délkou 45 cm, efektivní délkou 36,5 cm a číslem šarže AOAHO2A. Za těchto podmínek se proud pohyboval okolo 80 µA. Hydrodynamický nástřik vzorku trval 6 s při tlaku 50 mbar, což odpovídalo 2,6 % objemu kapiláry. Analyty byly detekovány VIS spektrometrií při vlnových délkách 400 a 500 nm.

Kapilára byla před prvním použitím kondicionována 3 min metanolem, 15 min 1M NaOH, 5 min vodou, 10 min 0,1M NaOH a 5 min vodou.

Vždy před první analýzou byla kapilára 10 min proplachována základním elektrolytem (BGE).

Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára proplachována 2 minuty BGE.

Po posledním měření byla kapilára proplachována 5 min 1M NaOH, 5 min 0,1M NaOH a 5 min vodou.

## 4.3. Příprava roztoků

### 4.3.1. Zásobní roztoky standardů

Přibližně přesné navážky standardů barviv Methyl Red, Sudanu Orange G, Sudanu Red 7B, Sudanu I-IV, Sudan Red G a Para Red byly rozpuštěny v DMSO tak, aby koncentrace roztoků odpovídaly přibližně 2 mg/ml (Methyl Red, Sudan Orange G, Sudan Red 7B a Sudan I, Sudan Red G), 1 mg/ml (SudanII), 0,5 mg/ml (Sudan III, Para Red) a 0,2 mg/ml (Sudan IV). Roztoky byly uchovávány v digestoři při pokojové teplotě. Přesné navážky a koncentrace zásobních roztoků standardů popisuje *Tabulka 2*.

*Tabulka 2: Přesné navážky a koncentrace standardů*

Standardy barviv	Navážka standardu (g)	Koncentrace (mg/ml)
Sudan I	0,0022	2,200
Sudan II	0,0020	1,000
Sudan III	0,0009	0,450
Sudan Red 7B	0,0022	2,200
Sudan Orange G	0,0019	1,900
Methyl Red	0,0018	1,800

### 4.3.2. Pracovní roztok standardů pro optimalizaci

Ze zásobních roztoků standardů byl připraven směsný pracovní roztok. Z každého zásobního roztoku byl pipetován do odměrné baňky určený objem tak, aby koncentrace standardů v pracovním roztoku odpovídala přibližně koncentraci 20 µg/ml. Objem baňky byl doplněn připraveným BGE po rysku.

Z takto připraveného směsného roztoku standardů bylo pipetováno 100 µl do vialky s inzertem. Před měřením byla vialka odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

### 4.3.3. Roztoky pro kalibraci

Ze zásobních roztoků standardů (*Tabulka 2*) byly připraveny směsné pracovní roztoky o 7 různých koncentracích (*Tabulka 3*). Koncentrace standardů ve směsném roztoku byly zvoleny tak, aby odezvy jednotlivých analytů byly přibližně stejné. Nejprve byl připraven roztok s analyty o nejvyšší koncentraci (Roztok 7), další (Roztoky 1-6) pak vždy naředěním předchozího (koncentrovanějšího) roztoku slepým roztokem, který se skládal z DMSO a BGE v poměru 1 : 4,7. Z každého směsného roztoku bylo pipetováno 100 µl do vialky s inzertem. Před měřením byla vialka zbavena plynu v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

*Tabulka 3: Koncentrace kalibračních roztoků standardů*

Standardy barviv	Koncentrační hladiny analytů						
	Roztok 1 (µg/ml)	Roztok 2 (µg/ml)	Roztok 3 (µg/ml)	Roztok 4 (µg/ml)	Roztok 5 (µg/ml)	Roztok 6 (µg/ml)	Roztok 7 (µg/ml)
Sudan I	0,83	1,65	3,3	4,13	8,25	16,5	33
SudanII	1	2	4	5	10	20	40
Sudan III	0,45	0,9	1,8	2,25	4,5	9	18
S. Red 7B	2,75	5,5	11	13,75	27,5	55	110
S. Orange G	0,475	0,95	1,9	2,38	4,75	9,5	19
Methyl Red	0,9	1,8	3,6	4,5	9	18	36

#### 4.3.4. Příprava základního elektrolytu (BGE)

##### 4.3.4.1. 30mM fosfátový pufr

K 20 ml vody bylo přidáno 0,172 ml kyseliny fosforečné, a pomocí 1M NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 7,5. Takto připravený roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a vodou doplněn po rysku.

##### 4.3.4.2. Mikroemulze

Do 25ml odměrné baňky bylo naváženo 0,3000 g SDS, poté bylo přidáno 0,3 ml n-hexanu, 3,75 ml butan-1-olu a 5 ml acetonitrilu. Objem byl doplněn 30mM fosfátovým pufrům po rysku. Takto připravený roztok byl 10 min v ultrazvukové lázni homogenizován, až vznikl čirý roztok mikroemulze. Konečné složení mikroemulze je popsáno v tabulce (*Tabulka 4*). Ostatní BGE používané při optimalizaci byly připravovány stejným způsobem.

*Tabulka 4: Složení mikroemulze ve fosfátovém pufru*

Složení	%
SDS	1,2 (w/v)
n-hexan	1,2 (v/v)
butan-1-ol	15 (v/v)
acetonitril	20 (v/v)

Fosfátový pufr byl připravován do zásoby a uchováván při pokojové teplotě. Konečná mikroemulze byla připravována na každý den čerstvá. Připravený BGE byl filtrován přes 0,45 $\mu$ m nylonový filtr do vialek. Před měřením byly vialky zbaveny plynu v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

#### 4.3.5. Příprava extraktu

K naváženému vzorku chilli Mojo, který byl ve třence zhomogenizován, byly přidány zásobní roztoky standardů barviv Sudanu I, Sudanu II, Sudanu III, Methyl Red, Sudanu Red 7B a Sudanu Orange G rozpuštěných v DMSO. Výsledná koncentrace barviv ve vzorku byla přibližně 20  $\mu$ g/ml. Ke vzorku bylo přidáno DMSO a BGE. Celkový podíl gramů vzorku a objemu přidávaných kapalin byl 1:10, poměr DMSO a BGE ve vzorku byl 1:5. Vzorek byl extrahován 15 minut v ultrazvukové lázni. Po extrakci byl vzorek 5 minut centrifugován při 1400 rcf. Poté byl supernatant odebrán a přefiltrován přes 0,45 $\mu$ m nylonový filtr. Objem byl doplněn roztokem

BGE a DMSO v poměru 1:5. Z celkového objemu bylo pipetováno 100  $\mu$ l do vialky s inzertem. Vialka byla zbavena plynu 5 minutami v ultrazvukové lázni. Souběžně byl extrahován i slepý vzorek, ke kterému byl přidán místo zásobního roztoku standardů pouze DMSO.

#### 4.4. Vyhodnocení a výpočty

Pro optimální podmínky byly vyhodnoceny parametry vhodnosti systému, kam patří zdánlivý počet teoretických pater, rozlišení, faktor symetrie a opakovatelnost nástřiku. V rámci kvantitativní analýzy byla určena linearita a rozsah kalibrace, limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Pro vyhodnocení kalibrační přímky lineární regrese a k výpočtům směrodatné (SD) a relativní směrodatné (RSD) odchylky byl použit program Excel 2007.

##### 4.4.1. Testy vhodnosti systému

Testy způsobilosti systému a opakovatelnost byly vyhodnocovány při vlnových délkách 500 nm (Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan Red 7B) a 400 nm (Sudan Orange G a Methyl Red). Hodnoty byly stanoveny pro roztok č. 4 a 5 kalibrační řady (str. 35). K výpočtu byl použit vždy průměr z 5 měření.

Pro výpočet účinnosti separace (počet teoretických pater  $N$ ) byl použit vztah *Rovnice 8*, kde  $t_r$  značí migrační čas analytu a  $W_h$  šířku píku v polovině jeho výšky [57]. Výpočet byl proveden automaticky dle metody „Efficiency Plates per Halfwidth metod“ programem Agilent Chemstation.

$$N = 5,54 \times \left[ \frac{t_r}{W_h} \right]^2$$

*Rovnice 8*

Rozlišení mezi dvěma sousedními analyty bylo vypočteno podle *Rovnice 9*, kde  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  značí migrační časy dvou sousedních píků,  $W_{h1}$  a  $W_{h2}$  pak šířky píků v polovině jejich výšky, pro  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  platí ztaz  $t_{R1} > t_{R2}$  [57]. Hodnota byla vygenerována dle metody „Halfwidth“ (Agilent Chemstation).

$$R_{S=} = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

*Rovnice 9*

Faktor symetrie ( $A_s$ ) byl vypočten podle *Rovnice 10*, kde  $W_{0,05}$  značí šířku píku v polovině jeho výšky a  $d$  vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky [57]. Hodnota byla získána výpočtem dle metody „USP Tailing“ (Agilent Chemstation).

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

*Rovnice 10*

Pro stanovení opakovatelnosti analýzy byly vypočteny průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky migračních časů a ploch píků.

#### 4.4.2. Linearita, LOD, LOQ a Rozsah

K vyhodnocení byly použity výsledky měření při vlnové délce 400 (Sudan Orange G, Methy Red) a 500 nm (Sudan I-III, Sudan Red 7B). K výpočtu byly použity průměry z 6 měření.

Linearita byla stanovena jako závislost plochy píku na koncentraci standardu, která byla vyhodnocena metodou lineární regrese s příslušnou hodnotou spolehlivosti ( $R^2$ ) a rovnicí lineární regrese (*Rovnice 11*), kde  $y$  odpovídá ploše píku,  $x$  koncentraci analytu,  $a$  značí směrnici přímky a  $b$  je absolutní člen rovnice přímky. Z rovnice přímky lineární regrese vychází i výpočet LOD a LOQ.

$$y = ax + b$$

*Rovnice 11*

Pro výpočet LOD byl použit vztah *Rovnice 12*, kde  $SD_b$  značí směrodatnou odchylku průměru hodnot  $b$  z rovnice přímky lineární regrese;  $a_p$  jsou průměrné hodnoty  $a$  z rovnice přímky lineární regrese [58]. LOD udává nejnižší koncentraci analytu, kterou lze ještě kvalitativně detekovat.

$$LOD = 3,3 \frac{SD_b}{a_p}$$

*Rovnice 12*

LOQ byl vypočten podle vztahu *Rovnice 13*, kde  $SD_b$  značí směrodatnou odchylku průměru hodnot  $b$  z rovnice přímky lineární regrese;  $a_p$  jsou průměrné hodnoty  $a$  z rovnice přímky lineární regrese [58]. Udává nejnižší koncentraci, kterou je ještě možné kvantitativně stanovit.

$$LOQ = 10 \frac{SD_b}{a_p}$$

*Rovnice 13*

Rozsah udává interval mezi horním a dolním bodem koncentrace, ve kterém je závislost lineární.



## 4.5. Výsledky a diskuze

### 4.5.1. Optimalizace separačních podmínek

Cílem optimalizace bylo zjištění vhodných podmínek pro separaci jednotlivých standardů barviv, při kterých se všechny složky směsi rozdělí a bude možné jejich kvantitativní a kvalitativní stanovení.

Bylo zapotřebí upravit separační podmínky (promývání, délka kapiláry, vložené napětí, délka a způsob nástřiku), složení BGE a způsob úpravy standardů barviv.

Pro testování podmínek byl vzorek analyzován vždy ve dvou opakováních. Měřen byl též slepý roztok, který obsahoval DMSO a BGE ve stejném poměru jako vzorek. Experimentálně bylo zjištěno, že výsledky analýz byly opakovatelné, pokud byl roztok BGE připravován každý den čerstvý. Pracovní roztoky standardů byly připraveny s taktéž čerstvým BGE.

Na základě dosavadního poznání získaného rešerší literatury [1], která se zabývala MEEKC stanovením hydrofilních a lipofilních vitamínů, strukturálně a vlastnostmi podobnými lipofilním barvivům, byly nastaveny následující výchozí podmínky.

Jako výchozí BGE byla použita mikroemulze, která obsahovala 1,2 % SDS (w/v), 1,2 % n-hexanu (v/v), 21 % butan-1-olu (v/v) a 18 % acetonitrilu (v/v) ve 20mM tetraboritanovém pufru o pH 9,3.

Nejprve byl analyzován směsný roztok 9 standardů nelegálních lipofilních barviv - Sudan I (1 mg/ml), Sudan II (0,2 mg/ml), Sudan III (0,2 mg/ml), Sudan IV (0,2 mg/ml), Sudan Red 7B (1 mg/ml), Sudan Orange G (1 mg/ml), Sudan Red G (1 mg/ml), Para Red (0,4 mg/ml) a Methyl Red (1 mg/ml). Koncentrace všech analytů ve směsném roztoku byla asi 20 µg/ml.

Separace probíhala při napětí 20 kV a teplotě 25 °C. Hydrodynamický nástřik vzorku trval 3 s při tlaku 50 mbar, což odpovídalo 0,84 % kapiláry. Kapilára měla vnitřní průměr 75 µm, celkovou délku 56 cm a efektivní délku 47,5 cm. Před analýzou byla kapilára kondicionována 3 minuty vodou a 3 minuty mikroemulzí.

#### 4.5.1.1. Optimalizace složení vzorku

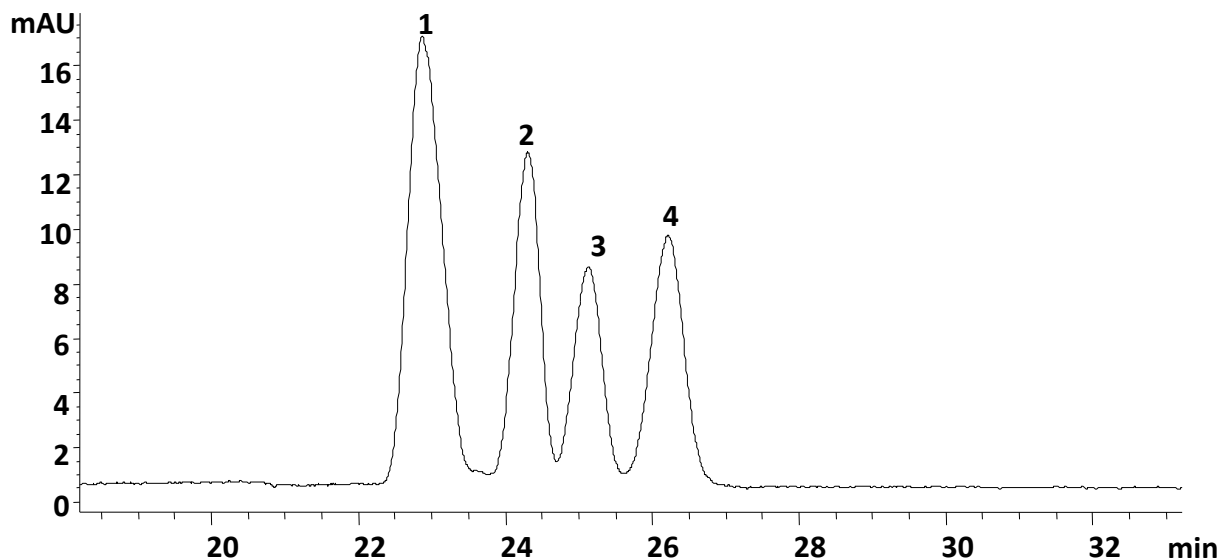
Vzhledem k tomu, že podíl nevodné organické složky ve vzorku zásadním způsobem ovlivňoval průběh analýzy a způsoboval nestabilitu proudu, byl nejprve optimalizován poměr organické složky a mikroemulze ve vzorku ve smyslu zvýšení podílu vodné složky při zachování rozpustnosti analytů. Byly připraveny zásobní roztoky standardů v DMSO o koncentraci 2 mg/ml.

Méně rozpustné analyty Sudanu II, Sudanu III, Para Red a Sudanu IV byly připraveny v koncentracích 1 mg/ml (Sudan II), 0,5 mg/ml (Sudan III a Para Red) a 0,2 (Sudan IV). Pro porovnání byly připraveny také zásobní roztoky standardů rozpuštěné v BGE (*Tabulka 5*).

Analýza 9 standardů rozpuštěných v roztoku BGE sice vykazovala v neoptimalizovaném BGE 4 symetrické intenzivní píky (Obr. 18), při delším uchování však docházelo ke zpětnému vysrážení standardů ze zásobních roztoků. Zásobní roztoky by tedy musely být připravovány každý den čerstvé, proto bylo od této přípravy upuštěno a dále se pracovalo pouze se zásobním roztokem standardů rozpuštěných v DMSO, který byl v čase potřeby ředěn BGE.

*Tabulka 5: Koncentrace zásobních roztoků standardů*

Standardy	Koncentrace standardů v BGE (mg/ml)	Koncentrace standardů v DMSO (mg/ml)
Methyl Red	2	2
Sudan Orange G	2	2
Sudan Red 7B	2	2
Sudan I	2	2
Sudan II	0,2	1
Sudan III	0,2	0,5
Sudan Red G	2	2
Para Red	0,4	0,5
Sudan IV	0,2	0,2



Obr. 18: Elektroferogram analýzy standardů rozpuštěných v BGE

Experimentální podmínky: kapilára - vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 56 cm; efektivní délka 47,5 cm; nástřik - 3 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda=500$  nm; BGE - SDS 1,2 %, n-hexan 1,2 %, butan-1-ol 21 %, ACN 18 %, 20mM; tetraboritanový pufr (pH=9,3); vzorek - směs barviv  $c=20$   $\mu\text{g/ml}$   
 Identifikace: 1-4 - nerozdělené standardy.

#### 4.5.1.2. Optimalizace pH tetraboritanového pufru

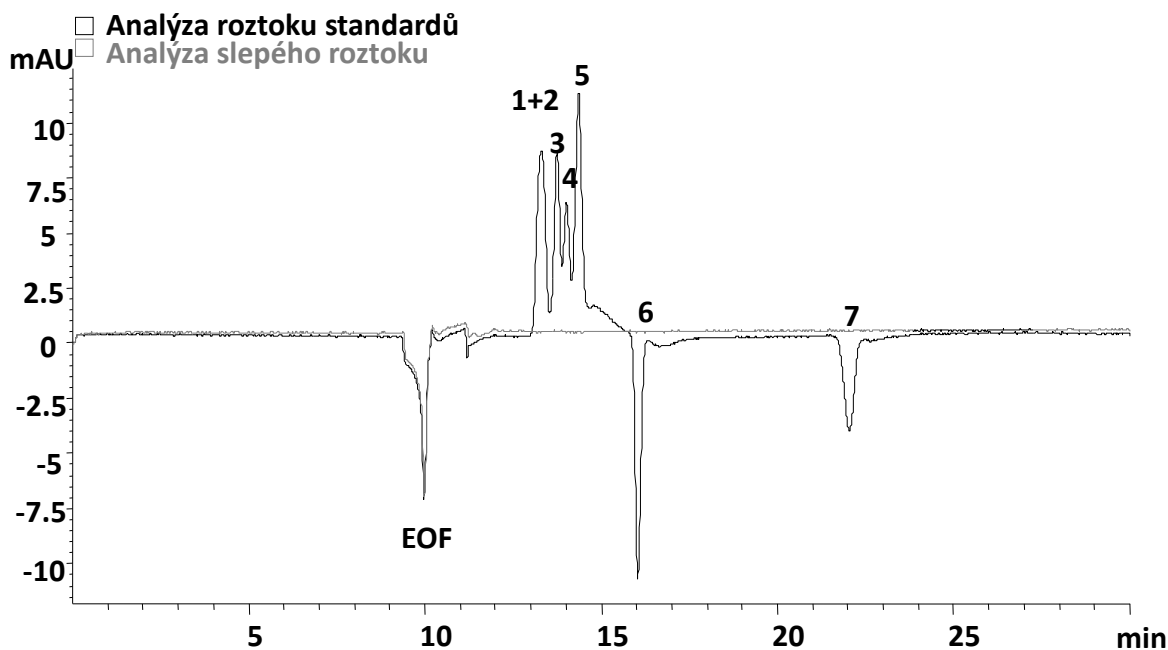
Změna pH může zásadním způsobem ovlivnit ionizaci analytů a následně i migraci v elektrickém poli (viz str. 28) .

Rozmezí pH tetraboritanového pufru ( $pK_a$  9,2) bylo optimalizováno v rozsahu od 8 do 10,5. Stanovení bylo provedeno u hodnot pH 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5. Tetraboritanový pufr byl upravován 1M NaOH a 1M HCl.

Změna pH tetraboritanového pufru neměla na separaci standardů zásadní vliv. Změny v migračních časech analytů byly nepatrné, což koreluje s tím, že většina standardů je v testovaném rozmezí pH neutrální (Obr. 3 - Obr. 11, str. 14 - 17).

Vzhledem k neúspěšné separaci byl pro další zkoumání tetraboritanový pufr nahrazen 30mM fosfátovým pufrům o pH 7.

Ukázalo se, že první 4 analyty migrují velmi blízko u sebe a jejich rozdělení bylo předmětem další optimalizace.



Obr. 19: Elektroferogram analýzy standardů barviv s fosfátovým pufrům v BGE

Experimentální podmínky: kapilára- vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 56 cm; efektivní délka 47,5 cm; nástřik - 3 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda=500$  nm; BGE - SDS 1,2 %, n-hexan 1,2 %, butan-1-ol 21 %, ACN 18 %, 30mM fosfátový pufr o pH=7; vzorek - směs standardů  $c=20$   $\mu\text{g/ml}$

Identifikace: 1+2 - komigrace Sudan I a Sudan Red G; 3 - Sudan II; 4 - Sudan III; 5 - Sudan Red 7B; 6 - Sudan Orange G; 7 - Methyl Red

#### 4.5.1.3. Identifikace standardů, spektra

Cílem identifikace bylo stanovit pořadí migrace jednotlivých standardů.

Identifikace analytů byla provedena porovnáním záznamů směsného roztoku standardů o  $c=20$   $\mu\text{g/ml}$  a paralelním měřením stejného roztoku s přidavkem standardu. Pořadí migrace uvádí Tabulka 6.

Tabulka 6: Pořadí migrace standardů

Pořadí migrace	1	2	3	4	5	6
Standardy	Sudan I + S. Red G	Sudan II	Sudan III	S. Red 7B	S. Orange G	Methyl Red

Při identifikaci se ukázalo, že analyty Sudan Red G a Sudan I migrují současně. Para Red a Sudan IV se nepodařilo ve směsi identifikovat. To mohlo být způsobeno jejich vysokou lipofilitou a špatnou rozpustností. Vzhledem k těmto poznatkům byly Sudan IV a Para Red z analýzy

vypuštěny. Zjištění podmínek pro úplné rozdělení všech 9 složek směsi může být předmětem dalšího zkoumání.

Také byly provedeny samostatné nástřiky identifikovaných standardů, ze kterých byly získány absorpční spektra a příslušná maxima. Měřením bylo zjištěno, že Sudan I absorboval při vlnové délce 228 a 490 nm, Sudan II 230 a 498 nm, Sudan III 230 a 498 nm, Sudan Red 7B 250 a 498 nm, Sudan Orange G 430 nm, Methyl Red 264 a 414 nm. Pokud není uvedeno jinak, byly standardy Sudan I - III, Sudan Red G a Sudan Red 7B vyhodnocovány při vlnové délce 500 nm, a Sudan Orange G a Methyl Red při vlnové délce 400 nm.

#### 4.5.1.4. Optimalizace pH fosfátového pufru

Cílem měření bylo zjistit závislost migračních časů standardů na pH fosfátového pufru a zvolit pH, při kterém budou mít standardy rozlišení větší než 1,5 [57].

Rozmezí pH fosfátového pufru (pKa 7,2) bylo optimalizováno v rozsahu od 6 do 8. Stanovení bylo provedeno u pufru s pH 6; 6,5; 7; 7,5 a 8.

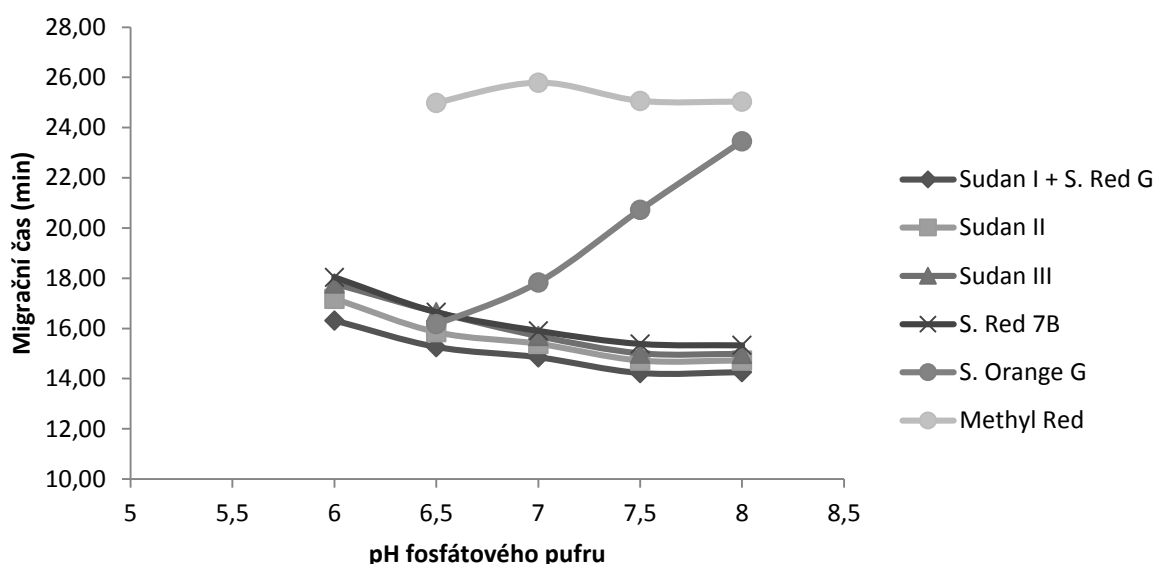
U BGE s pH fosfátového pufru 6 nebylo možné stanovit poslední 2 analyty, protože nedošlo k jejich rozdělení. Ostatní výsledky shrnuje *Tabulka 7*.

*Tabulka 7: Migrační časy analytů odpovídající BGE s uvedeným pH fosfátového pufru; N - nedostupné výsledky*

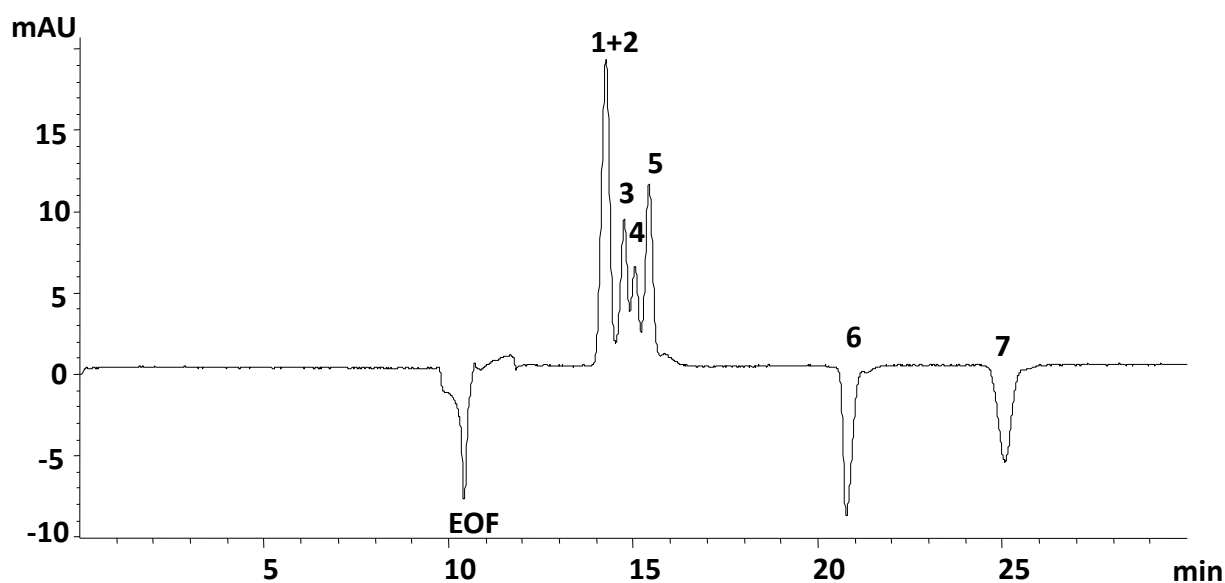
pH	Migrační čas (min)						Rs mezi píky 1-4
	Sudan I + S. Red G	Sudan II	Sudan III	S. Red 7B	S. Orange G	Methyl Red	
6	16,3	17,2	17,8	18,0	N	N	0,61 -1,17
6,5	15,3	15,9	16,7	N	16,2	25,0	1,31-2,25
7	14,9	15,4	15,7	15,9	17,8	25,8	0,74-1,25
7,5	14,2	14,7	15,0	15,4	20,7	25,1	0,79-1,29
8	14,3	14,7	15,0	15,3	23,5	25,0	0,69-1,21

Komigrace Sudanu Orange G a Methyl Red s ostatními analyty v pH 6 mohlo být zapříčiněno nízkou koncentrací ionizované formy. Největší vliv měla změna pH právě na Sudan Orange G. Migrační čas tohoto standardu se se zvyšujícím pH prodlužoval. Toto chování odpovídá ionizaci Sudanu Orange G ve stanovovaném pH (viz *Obr. 9, str. 16*). Ostatní analyty zůstávají v celé škále pH nenabitě a změna pH na ně neměla velký vliv, uplatňoval se zde pouze MEEKC princip.

Jejich migrační časy a s nimi související rozlišení se příliš nezměnily (*Graf 1*). Rozlišení prvních 4 píků se pohybovalo od 0,6 do 1,3 (*Tabulka 7*). Jako optimální bylo zvoleno pH fosfátového pufru 7,5 (*Obr. 20*). Při tomto pH bylo částečně rozděleno 6 standardů z 9 a rozlišení prvních 4 píků bylo největší (0,79 - 1,29).



*Graf 1: Závislost migračních časů analytů na pH fosfátového pufru*



*Obr. 20: Elektroferogram analýzy standardů barviv při optimálním pH fosfátového pufru*

*Experimentální podmínky: kapilára- vnitřní průměr 75  $\mu$ m, celková délka 56 cm; efektivní délka 47,5 cm; nástřik - 3 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda=500$  nm; BGE - SDS 1,2%, n-hexan 1,2%, butan-1-ol 21%, ACN 18%, 30mM fosfátový pufr o pH=7,5; vzorek - směs standardů c = 20  $\mu$ g/ml  
 Identifikace: 1+2 - komigrace Sudan I a Sudan Red G; 3 - Sudan II; 4 - Sudan III; 5 - Sudan Red 7B; 6 - Sudan Orange G; 7 - Methyl Red*

#### 4.5.1.5. Optimalizace koncentrace SDS

SDS je anionický surfaktant, který má vliv na stabilitu mikroemulze a účinnost separace MEEKC. Ovlivňuje náboj a velikost mikroemulzní kapky, velikost a směr elektroosmotického toku (EOF) a úroveň iontového párování s nabitými částicemi [36].

Pokud dojde k interakci nenabitých částic s micelami, migrační časy micel se prodlouží [28].

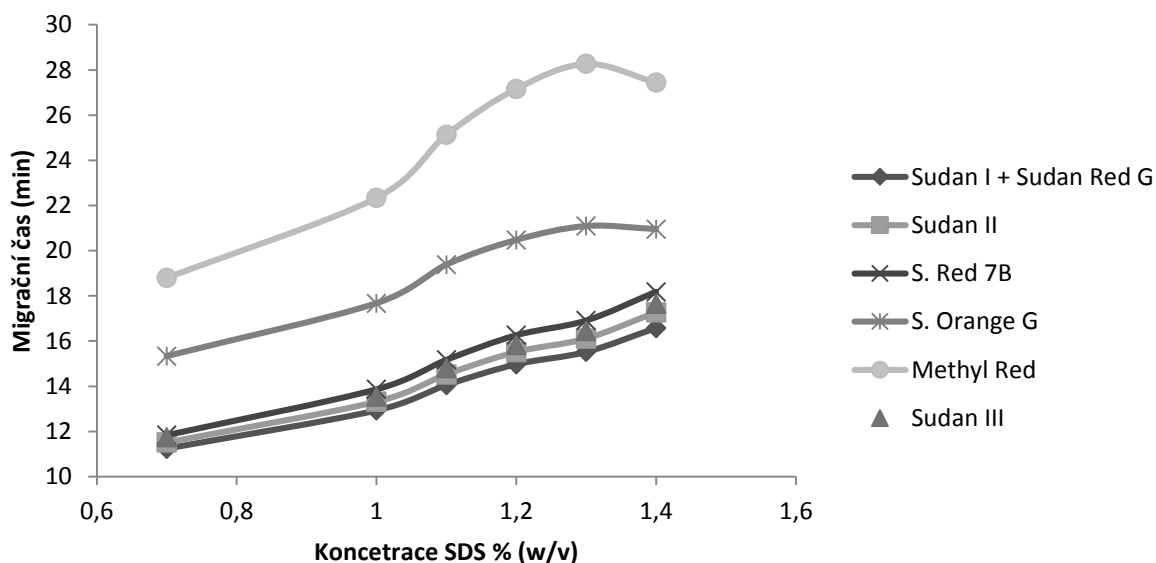
Cílem měření bylo zjistit vliv koncentrace SDS v BGE na kvalitu separace a zvolit optimální koncentraci. Rozmezí zkoušených hodnot se pohybovalo od 0,7 % do 3,3 % (w/v). Byly analyzovány koncentrace SDS 0,7; 1; 1,1; 1,2; 1,3 a 1,4 % (w/v).

Byla stanovena závislost migračních časů standardů na koncentraci SDS v BGE (*Graf 2*).

Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce (*Tabulka 8*).

*Tabulka 8: Migrační časy analytů odpovídající BGE s uvedenou koncentrací SDS*

Koncentrace SDS % (w/v)	Migrační časy analytů (min)						Rs mezi píky 1-4
	Sudan I + S. Red G	Sudan II	Sudan III	S. Red 7B	S. Orange G	Methyl Red	
0,7	11,2	11,5	11,7	11,8	15,3	18,8	0,36-0,83
1	12,9	13,3	13,6	13,9	17,7	22,3	0,67-1,14
1,1	14,0	14,5	14,8	15,2	19,4	25,1	0,60-1,06
1,2	15,0	15,5	15,8	16,3	20,5	27,2	0,66-1,14
1,3	15,5	16,1	16,5	16,9	21,1	28,3	0,71-1,19
1,4	16,6	17,3	17,7	18,2	21,0	27,4	0,67-1,23



Graf 2: Závislost migračních časů analytů na koncentraci SDS v BGE

Se zvyšující se koncentrací SDS se prodlužovaly migrační časy standardů, což odpovídá teoretickým předpokladům. Koncentrace SDS neměla na rozlišení analytů v testovaném rozsahu zásadní vliv. Koncentrace SDS 1,2 % (w/v) byla zvolena jako kompromis mezi rozlišením a dobou analýzy.

#### 4.5.1.6. Optimalizace koncentrace butan-1-olu.

Kosurfaktant butan-1-ol stabilizuje mikroemulzi tím, že snižuje povrchové napětí mezi olejovou a vodnou fází. Ovlivňuje viskozitu elektrolytu a tím i rychlost EOF [36].

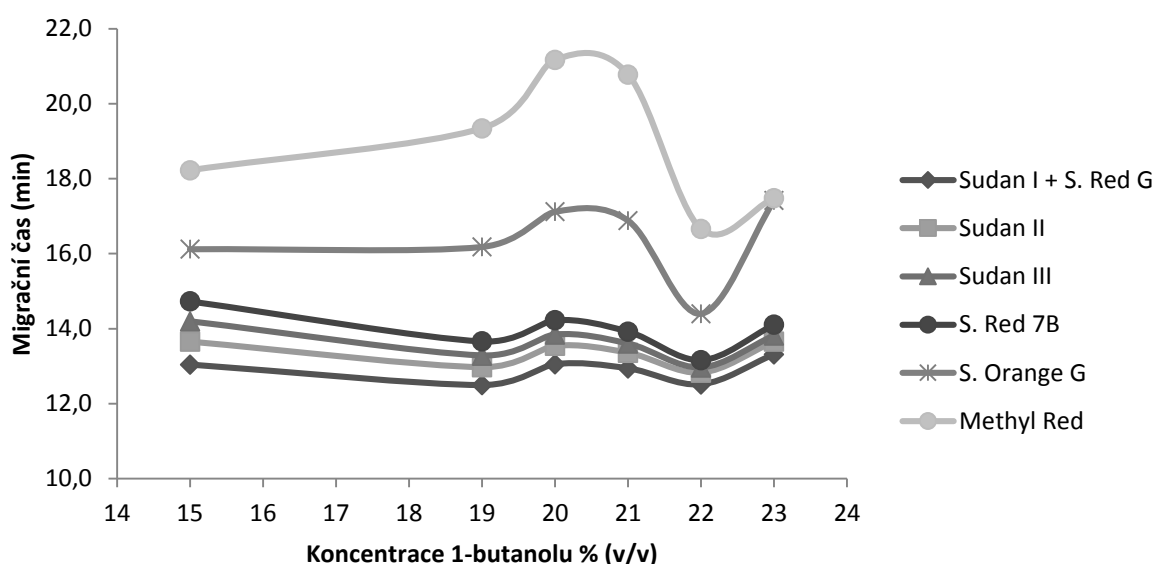
Cílem měření bylo zlepšit rozlišení standardů.

Koncentrace butan-1-olu byla optimalizována v rozmezí od 10 % do 23 % (v/v). Měřeny byly koncentrace 10; 15; 19; 20; 21; 22 a 23 % (v/v). Analýza 10% (v/v) butan-1-olu v BGE nebyla hodnocena, z důvodu změny pořadí migrace a detekce analytů. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 9)



Tabulka 9: Migrační časy analytů odpovídající BGE s uvedenou koncentrací butan-1-olu, N - nedostupné výsledky

Koncentrace butan-1.olu % (v/v)	Migrační čas (min)						Rs mezi píky 1-4
	Sudan I + S. Red G	Sudan II	Sudan III	S. Red 7B	S. Orange G	Methyl Red	
10	N	N	N	N	N	N	N
15	13,0	13,7	14,2	14,7	16,1	18,2	1,43-1,48
19	12,5	13,0	13,3	13,7	19,3	19,3	1,12-1,48
20	13,1	13,5	13,8	14,2	17,1	21,2	1,04-1,48
21	12,9	13,4	13,6	13,9	16,9	20,8	1,01-1,30
22	12,5	12,8	13,0	13,2	14,4	16,7	0,53-1,06
23	13,3	13,7	13,8	14,1	17,4	17,5	0,46-0,94



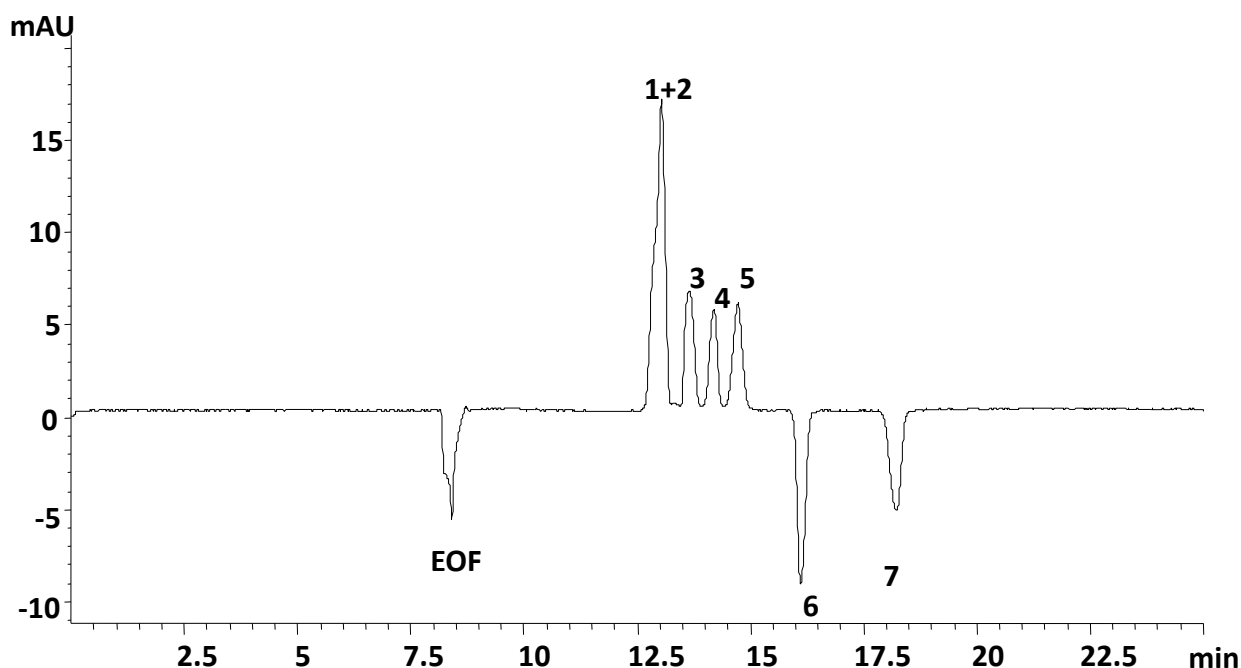
Graf 3: Závaznost migračních časů analytů na koncentraci butan-1-olu v BGE

Vliv koncentrace butan-1-olu na separaci standardů popisuje Graf 3.

Se stoupající koncentrací butan-1-olu se zvětšuje velikost mikroemulzní kapky, membrána kapky se ztenčí a pronikání analytů do olejového jádra a zpět je snadnější. Při vyšších koncentracích však dochází i k pronikání butan-1-olu a může dojít až k rozpadu mikroemulzní struktury [1].

Analýzou bylo zjištěno, že koncentrace butan-1-olu měla zásadní vliv na rozdělení standardů. Rozlišení jednotlivých píků se zhoršovalo se vzrůstajícím podílem butan-1-olu v BGE. Jako

optimální byla zvolena koncentrace butan-1-olu 15 % (v/v) - Obr. 21, při které bylo rozlišení prvních 4 píků největší (1,43 - 1,48).



Obr. 21: Elektroferogram analýzy barviv při optimální koncentraci butan-1-olu v BGE

Experimentální podmínky: kapilára- vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 56 cm; efektivní délka 47,5 cm; nástřik - 3 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda=500$  nm; BGE - SDS 1,2%, n-hexan 1,2%, butan-1-ol 15%, ACN 18%, 30mM fosfátový pufr o pH=7,5; vzorek - směs barviv c = 20  $\mu\text{g/ml}$

Identifikace: 1+2 - komigrace Sudan I a Sudan Red G; 3 - Sudan II; 4 - Sudan III; 5 - Sudan Red 7B; 6 - Sudan Orange G; 7 - Methyl Red

#### 4.5.1.7. Optimalizace koncentrace acetonitrilu (ACN)

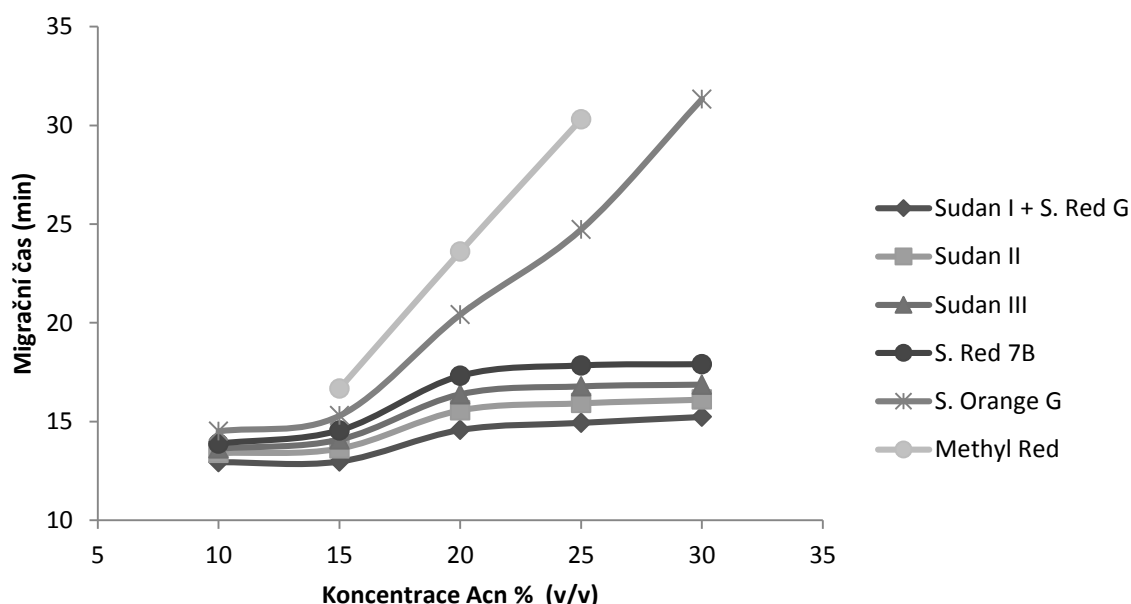
Organické rozpouštědlo přidané k mikroemulzi má vliv na EOF, rozdělení analytů mezi olejovou a vodnou fází a zlepšuje rozlišení analytů. Přidáním organického rozpouštědla se prodlouží migrační čas, což je způsobeno pravděpodobně tím, že ovlivňuje elektrolytickou viskozitu a zpomaluje EOF [1]. Přidáním organického rozpouštědla se také sníží hydrofobní interakce mezi micelou a rozpouštědlem [28].

Cílem měření bylo zjistit závislost migračních časů standardů na koncentraci ACN v BGE a zvolit koncentraci, při které bude rozlišení jednotlivých píků nejlepší.

Koncentrace ACN byla optimalizována v rozmezí od 10 % do 30 % (v/v). Byly analyzovány koncentrace 10; 15; 20; 25 a 30 % (v/v). Výsledky jsou popsány v tabulce (Tabulka 10).

Tabulka 10: Migrační časy analytů odpovídající BGE o příslušné koncentraci ACN , N - nedostupné výsledky

Koncentrace ACN % (v/v)	Migrační čas (min)						Rs mezi píky 1-4
	Sudan I + S. Red G	Sudan II	Sudan III	S. Red 7B	S. Orange G	Methyl Red	
10	12,94	13,40	13,63	13,88	14,51	N	0,77-1,17
15	12,97	13,63	14,09	14,55	15,30	16,66	1,43-1-64
20	14,58	15,57	16,38	17,32	20,42	23,60	1,86-2,80
25	14,94	15,93	16,78	17,84	24,73	30,30	2,00-2,75
30	15,24	16,12	16,87	17,90	31,33	N	1,95-2,30

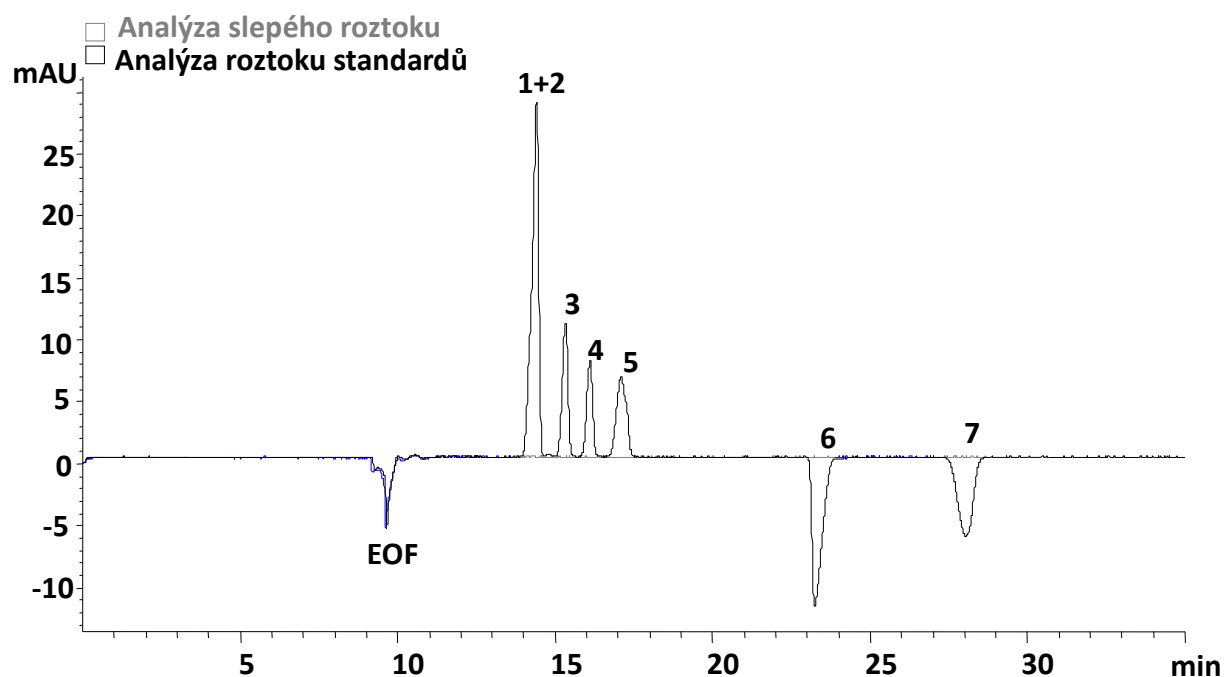


Graf 4: Zavislost migračních časů analytů na koncentraci ACN v BGE

Se zvyšující koncentrací se prodlužovaly migrační časy analytů (Graf 4), nejvíce byly ovlivněny analyty migrující jako poslední (Sudan Orange G a Methyl Red). Při koncentraci 30 % (v/v) byl migrační čas posledního analytu větší než 35 min, tedy delší než nastavený čas analýzy. Rozlišení mezi píky se zvyšovalo s koncentrací ACN.

Při koncentraci nad 20 % (v/v) se čas analýzy zbytečně prodlužoval. U BGE s 15 % ACN byla sice analýza časově méně náročná, avšak rozlišení mezi analyty bylo nižší a při stanovení ve složitější matrici (např. v potravinách) by se nemusely píky dostatečně rozdělit. Při koncentraci

20 % (v/v) bylo rozlišení píků dostačující a čas analýzy do 25 minut, proto byla zvolena tato koncentrace jako optimální (Obr. 22).



Obr. 22: Elektroferogram analýzy barviv při optimální koncentraci ACN v BGE

Experimentální podmínky: kapilára- vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 56 cm; efektivní délka 47,5 cm; nástřik - 3 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda = 500 \text{ nm}$ ; BGE - SDS 1,2%, n-hexan 1,2 %, butan-1-ol 15 %, ACN 20 %, 30mM fosfátový pufr o pH=7,5; vzorek - směs barviv  $c = 20 \mu\text{g/ml}$

Identifikace: 1+2 - komigrace Sudan I a Sudan Red G; 3 - Sudan II; 4 - Sudan III; 5 - Sudan Red 7B; 6 - Sudan Orange G; 7 - Methyl Red

#### 4.5.1.8. Optimalizace n-hexanu v BGE

Na základě dosažených výsledků a poznatků popsaných autory publikace [1] vyplývá, že typ a koncentrace olejové fáze nemá na analýzu významný vliv. V této studii byl použit n-hexan s konstantní koncentrací 1,2 % (v/v).

#### 4.5.1.9. Optimalizace délky kapiláry

Cílem změny efektivní délky kapiláry bylo zkrácení doby analýzy při zachování účinnosti separace.

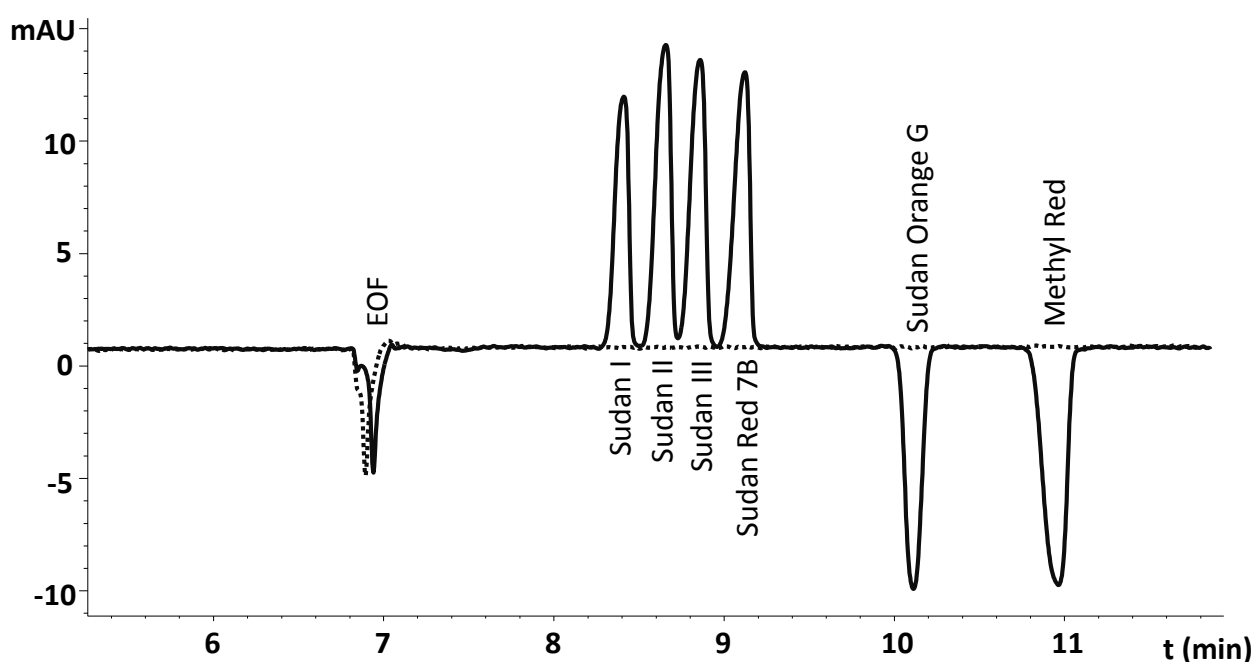
Délka analýzy může být ovlivněna několika faktory. Jedním z faktorů je způsob nástřiku vzorku a vkládané napětí. Při nástřiku vzorku na „krátký konec“ kapiláry a vloženém napětí -30 kV se zkrátila doba analýzy asi 10x, to mělo ovšem negativní vliv na rozlišení píků. Při vloženém napětí -20 a -15 kV se časy analýz zkrátily 6x - 5x a došlo k částečnému rozlišení, které ale nedosahovalo požadovaných parametrů.

Při nástřiku na „dlouhý konec“ a vloženém napětí 20 kV byla průměrná délka analýzy okolo 25 minut. S vloženým napětím 30 kV se analýza zrychlila asi 2x a analyty zůstaly rozdělené na základní linii. Se zvýšením napětí se však zvýšil i generovaný proud, který dosahoval hodnot až 130  $\mu\text{A}$  a byl velmi nestálý. Při vysokém proudu by mohlo docházet k rozkladu analytů, proto byl tento postup zamítnut.

Další možností bylo zkrácení kapiláry. Původní celková délka kapiláry 56 cm byla postupně zkrácena na 45 cm. Nástřik vzorku byl proveden na „dlouhý konec“ a analýza probíhala při napětí 20 kV. Proud se pohyboval okolo 80  $\mu\text{A}$ . Doba trvání analýzy byla okolo 11 minut a rozlišení analytů bylo větší než 1,5. Toto řešení bylo zvoleno jako optimální.

#### 4.5.2. Optimální podmínky

Optimalizací byly definovány následující podmínky analýzy. Celková délka kapiláry byla upravena na 45 cm (tzn. 36,5 cm efektivní délky). Standardy byly připravovány rozpuštěním v DMSO a následným ředěním BGE. Výsledný roztok BGE v 30mM fosfátovém pufru o pH 7,5 byl složen z 1,2 % (w/v) SDS, 1,2 % (v/v) n-hexanu, 15 % (v/v) butan-1-olu a 20 % (v/v) ACN. Celkový čas analýzy byl menší než 12 minut. Při těchto podmínkách došlo k rozdělení 6 barviv - Sudanu I, Sudanu II, Sudanu III, Sudanu Red 7B, Sudanu Orange G a Methyl Red (Obr. 23).



Obr. 23: Elektroferogram analýzy standardů barviv při optimálních podmínkách

Experimentální podmínky: kapilára- vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 45 cm; efektivní délka 36,5 cm; nástřik - 6 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda=500\text{ nm}$ ; BGE - SDS 1,2%, n-hexan 1,2%, butan-1-ol 15%, ACN 20%, 30mM fosfátový pufr o pH=7,5

### 4.5.3. Charakterizace metody

Pro validaci byly použity standardy 6 barviv, které se podařilo ze směsi rozdělit, a to: Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan Red 7B, Sudan Orange G a Methyl Red (*Obr. 23*). Z těchto standardů byly připraveny kalibrační roztoky v 7 různých koncentracích. Postup přípravy je popsán v *kapitole 4.3.3. str. 35*. Každý roztok byl měřen v 6 opakováních za optimalizovaných podmínek.

Výsledky měření byly použity k vyhodnocení způsobilosti systému, linearity, rozsahu, limitu detekce, limitu stanovitelnosti. Rovnice a způsob vyhodnocení jsou uvedeny v *kapitole 4.4. na str. 38*.

#### 4.5.3.1. Testy vhodnosti systému (SST)

Účinnost separace, rozlišení, faktor symetrie jsou lékopisné parametry [57]. Pro srovnání jsou uvedeny i kritéria validace pro HPLC vydané FDA (Food and Drug Administration) [59].

#### Účinnost separace (počet teoretických pater N)

Český lékopis (ČL 2009) udává limit účinnosti separace vyšší než 2000, což odpovídá i kritériím FDA.

*Tabulka 11: Vyhodnocení účinnosti separace pro střední koncentrační hladinu (roztok 4)*

Analyt	N (n=5)
Sudan I	20885
Sudan II	18632
Sudan III	17565
Sudan Red 7B	16105
Sudan Orange G	9424
Methyl Red	6085

Účinnost se pohybovala od 6017 (Methyl Red) do 20885 (Sudan I) viz *Tabulka 11*. Všechny výsledky odpovídají normě.

### Rozlišení (Rs)

ČL 2009 udává hodnotu rozlišení větší než 1,5, podle FDA musí být hodnota vyšší nebo rovno 2.

*Tabulka 12: Vyhodnocení rozlišení pro střední koncentrační hladinu (roztok 4)*

Analyty	Rs (n=5)
Sudan I / Sudan II	1,99
Sudan II / Sudan III	1,50
Sudan III / Sudan Red 7B	1,73
Sudan Red 7B / Sudan Orange G	7,48
Sudan Orange G / Methyl Red	2,22

Rozlišení se pohybovalo od 1,50 do 7,48 viz *Tabulka 12*. Českému lékopisu vyhovují všechny standardy, FDA pouze 2.

### Faktor symetrie (As)

ČL 2009 udává rozmezí faktoru symetrie od 0,8 - 1,5, FDA větší než 2.

*Tabulka 13: Vyhodnocení faktoru symetrie pro střední koncentrační hladinu (roztok 4)*

Analyt	As (n=5)
Sudan I	0,83
Sudan II	0,83
Sudan III	0,81
Sudan Red 7B	0,81
Sudan Orange G	0,79
Methyl Red	0,99

Faktor symetrie se pohyboval od 0,79 do 0,99 (viz *Tabulka 13*), což vyhovuje požadavkům ČL.



#### Opakovatelnost migračních časů a ploch píků

Relativní směrodatná odchylka by pro HPLC neměla být vyšší než 1% (ČL 2009). Pro CE je stanoven limit do 3 % podle Amerického lékopisu (USP 2009) [60].

*Tabulka 14: Vyhodnocení opakovatelnosti migračních časů pro střední koncentrační hladinu (roztok 5)*

Analyt	Migrační čas (min) (n=5)	SD	RSD (%)
Sudan I	7,66	0,03	0,35
Sudan II	8,08	0,03	0,34
Sudan III	8,42	0,03	0,35
Sudan Red 7B	8,85	0,04	0,40
Sudan Orange G	10,13	0,09	0,91
Methyl Red	11,04	0,09	0,81

*Tabulka 15: Vyhodnocení opakovatelnosti ploch píků pro střední koncentrační hladinu (roztok 5)*

Analyt	Plocha píků (n=5)	SD	RSD (%)
Sudan I	36,70	0,69	1,89
Sudan II	49,10	0,83	1,70
Sudan III	45,14	0,80	1,77
Sudan Red 7B	43,26	0,90	2,09
Sudan Orange G	42,14	1,14	2,71
Methyl Red	90,10	1,21	1,34

U opakovatelnosti migračních časů se RSD pohybovala v rozmezí od 0,35 - 0,91 %, což vyhovuje požadovaným kritériím.

U opakovatelnosti ploch píků byla RSD od 1,34 do 2,71 %, takže opakovatelnost analýzy vyhovuje požadavkům USP 2009.

#### **4.5.3.2. Kvantitativní analýza**

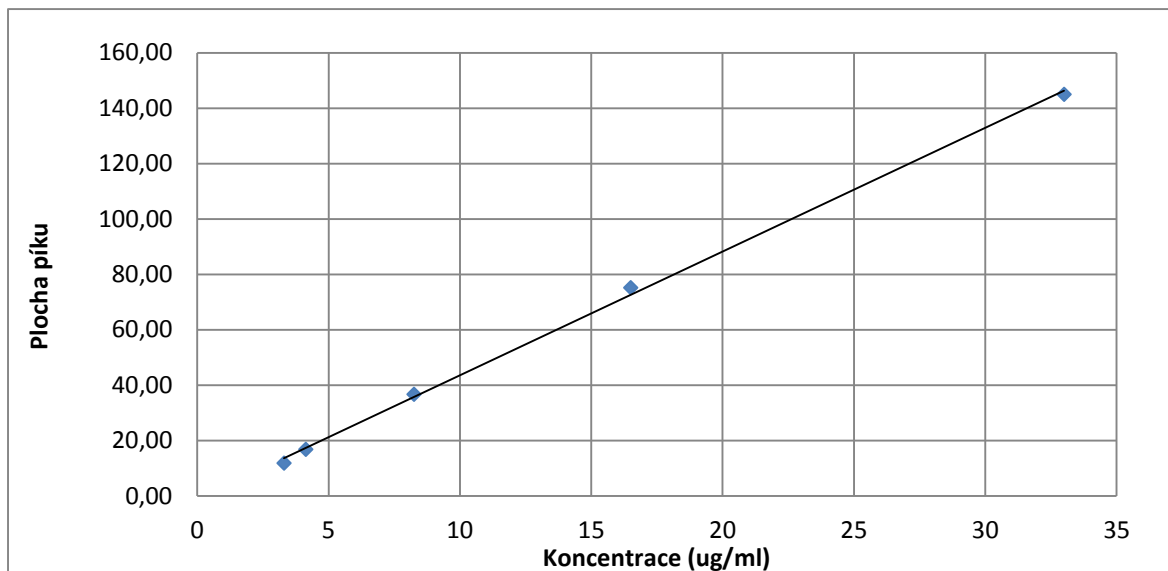
Hodnoty pro stanovení linearitu jsou uvedeny v tabulkách (*Tabulka 16 - 21*), sestavené přímky lineární regrese pro jednotlivé analyty jsou zobrazeny v grafech (*Graf 5 - 10*).

Výsledky vyhodnocení linearitu, rozsahu, limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) pro jednotlivé analyty jsou shrnuty v tabulce (*Tabulka 22*).

## Sudan I

Tabulka 16 Vyhodnocení linearity - Sudan I

Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	3,3	4,13	8,25	16,5	33
Průměrná plocha píku	11,88	16,82	36,70	75,20	145,05

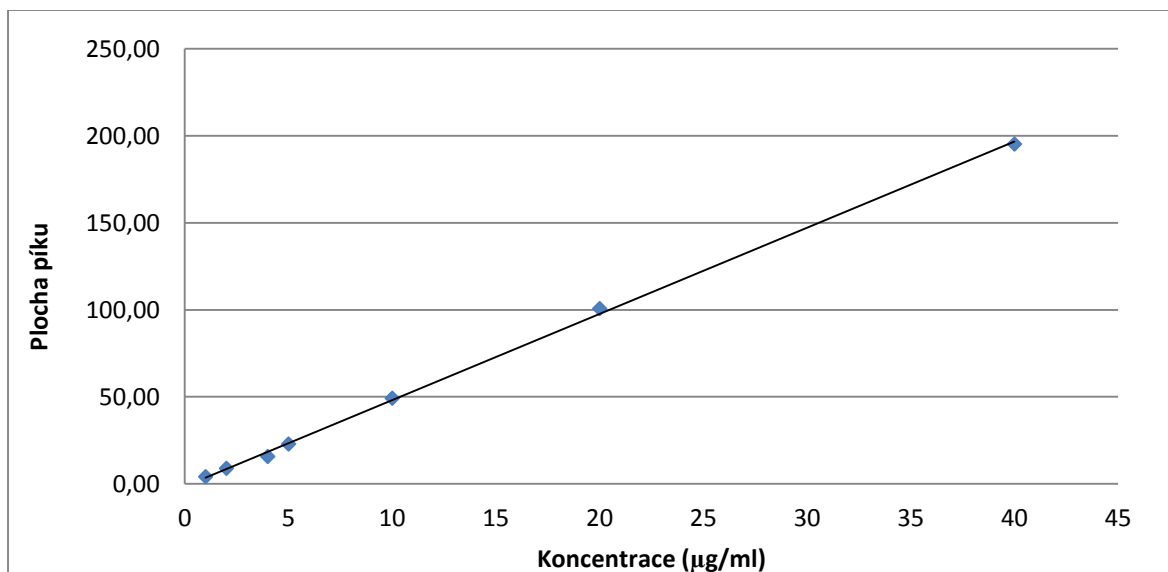


Graf 5: Lineární regrese - Sudan I

## Sudan II

Tabulka 17: Vyhodnocení linearity Sudan II

Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	1	2	4	5	10	20	40
Průměrná plocha píku	4,03	8,80	15,67	22,92	49,10	100,65	195,27

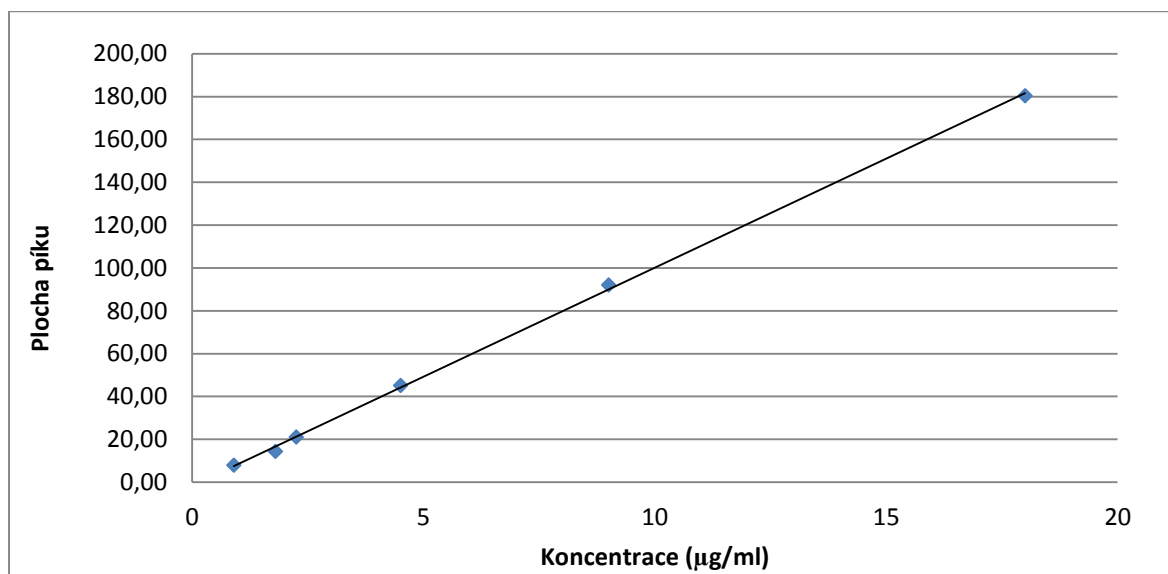


Graf 6: Lineární regrese - Sudan II

## Sudan III

Tabulka 18: Vyhodnocení linearity - Sudan III

Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,9	1,8	2,25	4,5	9	18
Průměrná plocha píku	7,95	14,30	21,03	45,14	92,13	180,40

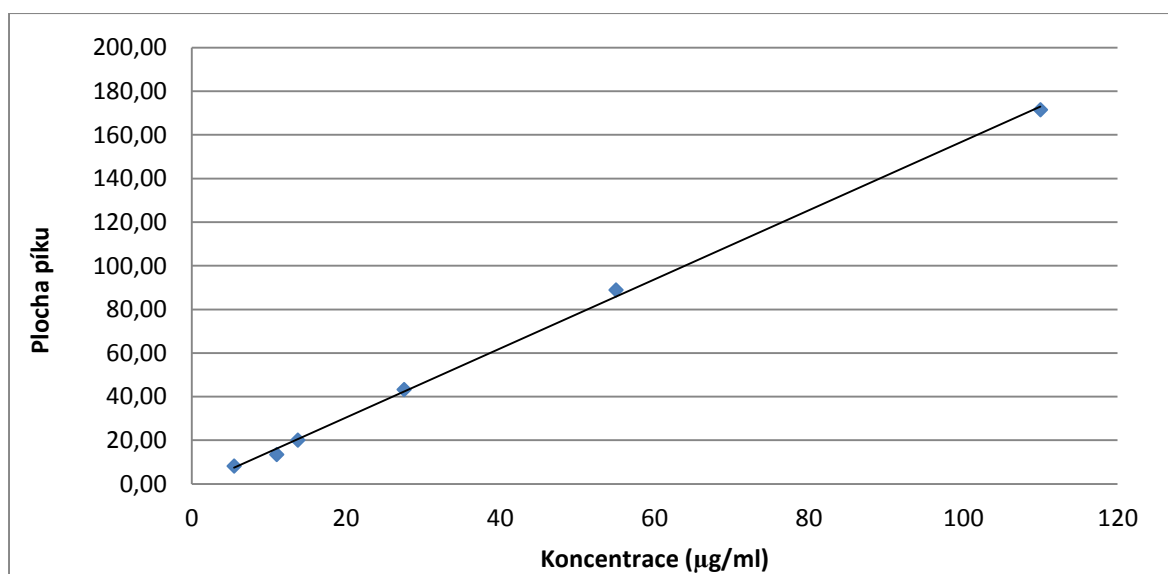


Graf 7: Lineární regrese - Sudan III

## Sudan Red 7B

Tabulka 19: Vyhodnocení linearity - Suda Red 7B

Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	5,5	11	13,75	27,5	55	110
Průměrná plocha píku	8,17	13,52	20,03	43,26	88,95	171,47

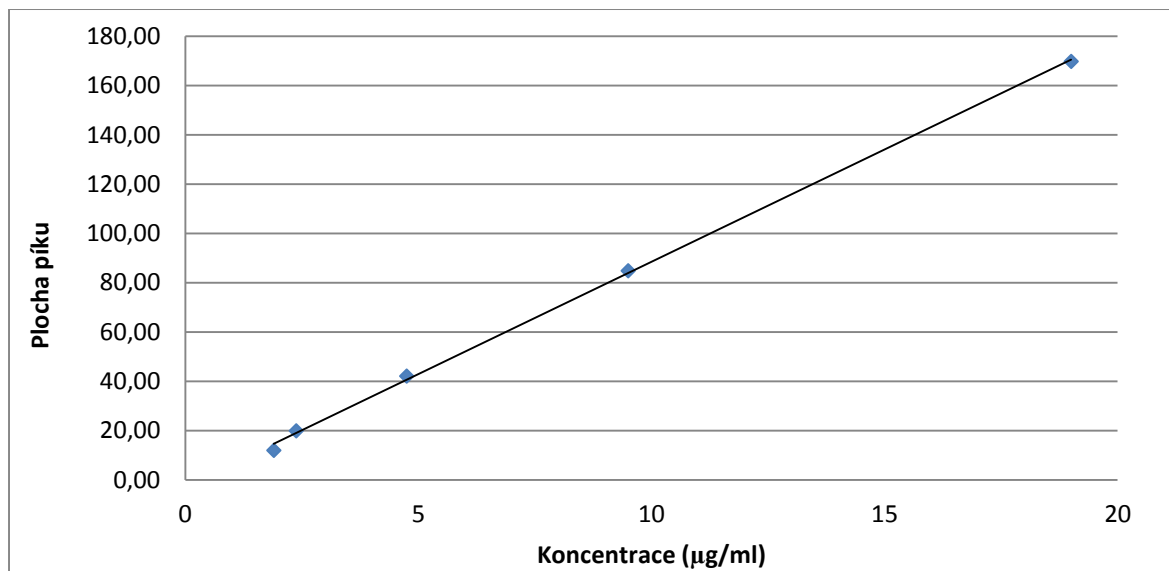


Graf 8: Lineární regrese - Sudan Red 7B

## Sudan Orange G

Tabulka 20: Vyhodnocení linearity - Sudan Orange G

Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,9	2,38	4,75	9,5	19
Průměrná plocha píku	11,94	19,92	42,14	84,88	169,80

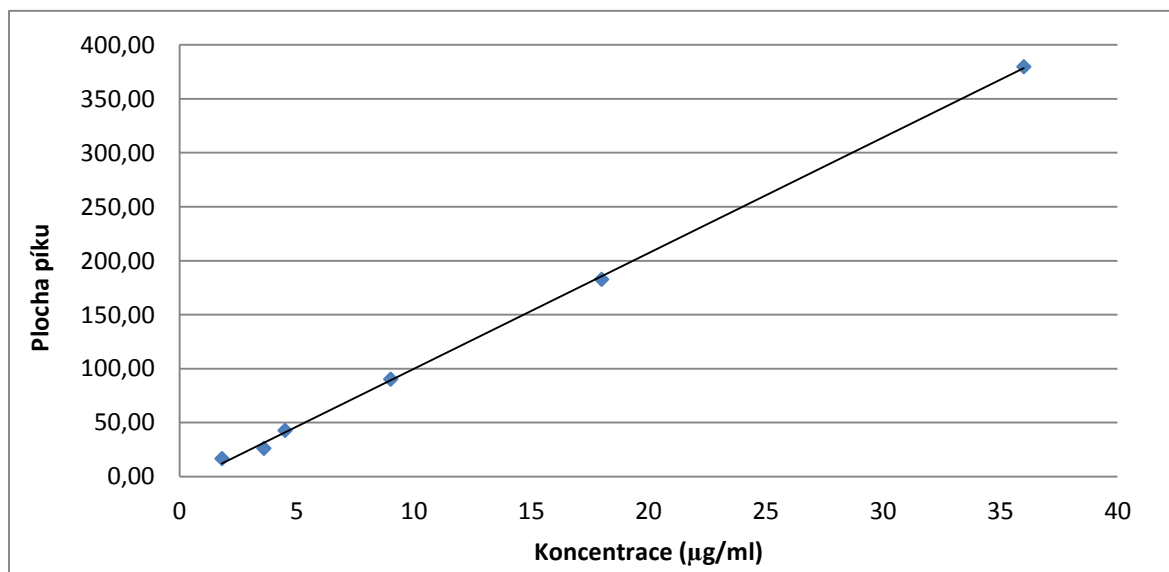


Graf 9: Lineární regrese Sudan Orange G

## Methyl Red

Tabulka 21: Vyhodnocení linearity - Methyl Red

Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,8	3,6	4,5	9	18	36
Průměrná plocha píku	16,72	26,08	42,55	90,10	182,75	379,63



Graf 10: Lineární regrese - Methyl Red

Tabulka 22: Vyhodnocení linearity, rozsahu, LOD a LOQ

Analyty	Rozsah (µg/ml)	LOD/LOQ (µg/ml)	Rovnice přímky lineární regrese	Hodnota spolehlivosti R <sup>2</sup>
Sudan I	3,3-33,0	0,92/2,79	$y = 4,4685x - 1,1174$	0,9990
Sudan II	1,0-40,0	0,33/1,01	$y = 4,9515x - 1,3696$	0,9993
Sudan III	0,9-18,0	0,19/0,57	$y = 10,1767x - 1,6655$	0,9994
Sudan Red 7B	5,5-110,0	1,27/3,86	$y = 1,5832x - 1,2108$	0,9990
Sudan Orange G	1,9-19,0	0,51/1,55	$y = 9,1155x - 2,6859$	0,9993
Methyl Red	1,8-36,0	0,53/1,60	$y = 10,7054x - 7,0990$	0,9994

Kalibrační závislost byla u všech analytů lineární, s hodnotou korelačního koeficientu  $\geq 0,9990$ . Rozsah koncentrací byl od 0,90 µg/ml (Sudan III) do 110 µg/ml (Sudan Red 7B), nejnižší LOD a LOQ byl stanoven pro Sudan III (0,19 µg/ml a 0,57 µg/ml). Naopak nejvyšší LOD a LOQ byl naměřen u Sudanu Red 7B, který měl nejnižší odezvu ze všech stanovovaných analytů (1,27 µg/ml a 3,86 µg/ml). Ostatní hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 22).

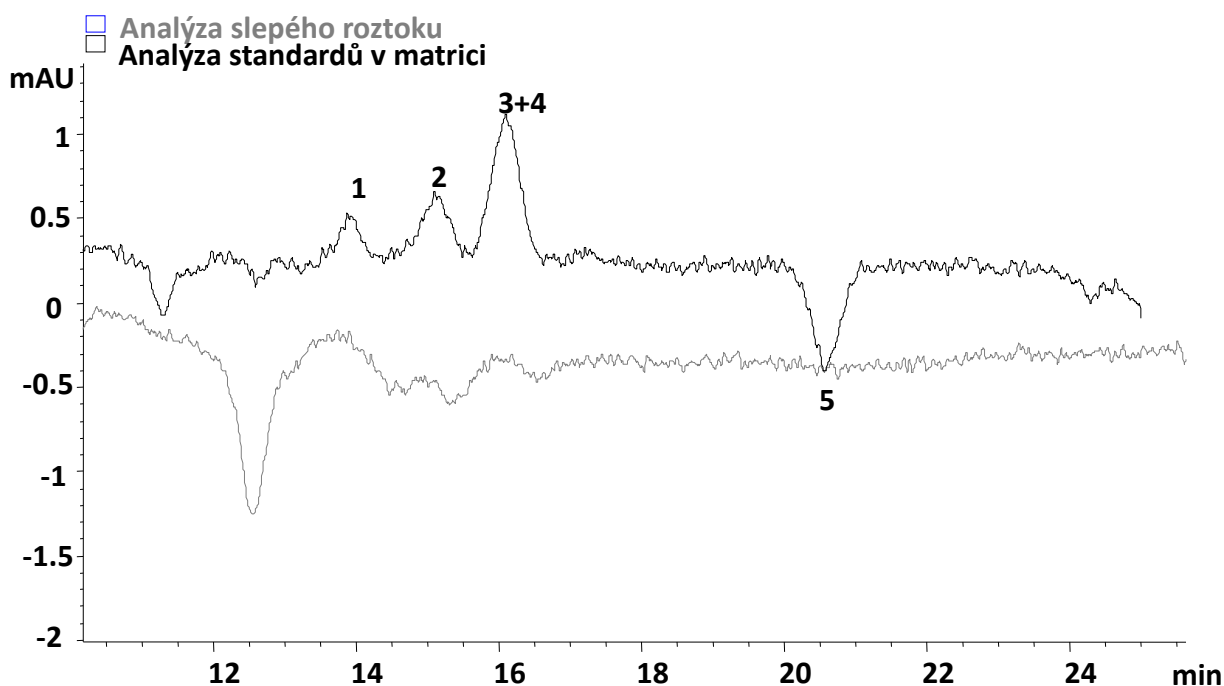
#### 4.5.4. Předběžná studie aplikace metody na reálný vzorek

Pro ověření metody analýzy v praxi byla na základě rešerše článku [41] provedena extrakce barviv ze vzorku chilli Mojo. Výsledná příprava vzorku je popsána v kapitole 4.3.5. *na str. 36*. Není-li uvedeno jinak, analýzy probíhaly za validovaných podmínek. Jako rozpouštědla byly použity BGE, DMSO, DMSO/BGE v poměru 1:5 a tetrahydrofuran (THF).

Extrakt v BGE šel jen velmi špatně přefiltrovat přes 0,2 $\mu$ m PTFE filtr (Econofilter, Agilent Technologies, Německo), za daných podmínek nebylo možné získat celý objem extraktu. Použitím THF jako rozpouštědla se filtrace sice zlepšila a snížilo se i množství balastních látek ve filtrátu, avšak nepodařilo se jeho úplné odpaření. THF není doporučeno používat s CE Agilent, a též kvůli zachování odpovídajícího podílu vodné fáze, nebylo možné vzorek pro analýzu použít. U DMSO se též objevil problém s odpařením a následným rozpuštěním v BGE, a proto musel být kvůli zachování nízkého podílu organiky extrakt naředěn BGE 1:5. Pro další analýzu byl potom použit extrakt vzorku v DMSO/BGE v poměru 1:5, kde odpadá fáze odpařování. Pro částečné zlepšení výtěžnosti byl vzorek po extrakci v ultrazvukové lázni 5 minut centrifugován při 14,5 x 1000 otáčkách za minutu a poté filtrován přes 0,45 $\mu$ m nylonový filtr.

Do BGE nebyla extrahována jen barviva, ale i mnoho balastních látek. Standardy barviv bylo možné rozeznat jen velmi špatně. Při analýze extraktu v DMSO (a následném zředění BGE) byly detekovány pouze 4 barviva - Sudan I, Sudan II, Sudan III a Sudan Red 7B. Migrační čas Sudanu Orange G a Methyl Red byl delší než nastavený čas při analýze, byly však detekovány při nástřiku vzorku na krátký konec kapiláry. Při analýze extraktu DMSO/BGE se poměr balastu oproti extrakci do samotného DMSO zvýšil, zlepšila se ale standardnost přípravy. Podařilo se detekovat 5 standardů z 6, migrační čas posledního standardu byl delší než nastavený čas analýzy (*Obr. 24*). Analýzu se nepodařilo reprodukovat.

Ověření metody v praxi, celková úprava vzorku a extrakce by měla být předmětem dalšího zkoumání.



Obr. 24: Elektroferogram analýzy standardů barviv v matrici, extrakce do DMSO/BGE - 1:5

Experimentální podmínky: kapilára- vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 45 cm; efektivní délka 36,5 cm; nástřik - 6 s, tlak 50 mbar; napětí 20 kV; detekce při  $\lambda=500$  nm.

BGE: SDS 1,2 %, n-hexan 1,2 %, butan-1-ol 15 %, ACN 20 %, 30mM fosfátový pufr o pH=7,5.

Identifikace: 1 - Sudan I; 2 - Sudan II; 3 - Sudan III; 4 - Sudan Red 7B; 5 - Sudan Orange G

#### 4.5.4.1. Prekoncentrace vzorku

Jedna z možných cest pro extrakci sudanových barviv z matrice může být sweeping (nametení). Jedná se o on-line prekoncentrační techniku. Metodu lze použít pro nabitě i neutrální analyty. K zakoncentrování se využívá efekt micelárního činidla, které je přidáno k elektrolytu v zásobníku, na dávkovací straně kapiláry. Pro kationty a neutrální analyty se využívá SDS, anionty jsou koncentrovány pomocí kationických nebo neionogenních surfaktantů. Druhý zásobník ani vzorek micelárního činidla neobsahují. Micely, tvořící pseudostacionární fázi, pronikají do široké zóny vzorku. Pokud má vzorek stejnou vodivost jako pseudostacionární fáze a za využití homogenního elektrického pole, dojde na rozhraní této zóny k zakoncentrování (nametení). Rozsah prekoncentrace je dán součtem všech interakcí mezi analytem a pseudostacionární fází. Tato technika umožňuje odstranění matricových nečistot a poskytuje nízký detekční limit ( $10^{-9}$  mol/l)[61].

## 5. Závěr

Byla vyvinuta metoda MEEKC pro stanovení nelegálních lipofilních barviv Sudanu I-III, Sudanu Orange G, Sudanu Red 7B a Methyl Red. V rámci metody byla provedena optimalizace podmínek analýzy a identifikace píků podle pořadí migrace. Metoda byla charakterizována testy vhodnosti systému a kvantitativní analýzou. Účinnost separace, rozlišení mezi píky a faktor symetrie píku odpovídaly kritériím ČL 2009. Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti migračních časů a ploch píků splňovaly limit pro CE uvedený v USP 2009. Závislost plochy píku na koncentraci analytu byla lineární v rozsahu koncentrací 3,3 - 33 µg/ml pro Sudan I, 1,0 - 40 µg/ml pro Sudan II, 0,9 - 18 µg/ml pro Sudan III, 5,5 - 110 µg/ml pro Sudan Red 7B, 1,9 - 19,0 µg/ml pro Sudan Orange G a 1,8 - 36,0 µg/ml pro Methyl Red. Hodnota korelačního faktoru byla do 0,9990. Nejnižší limit detekce byl stanoven pro Sudan III (0,19 µg/ml), nejvyšší pro Sudan Red 7B (1,27 µg/ml) a Sudan I (0,92 µg/ml), střední hodnoty potom měly Sudan II (0,33 µg/ml), Sudan Orange G (0,51 µg/ml) a Methyl Red (0,53 µg/ml). Čas analýzy byl kratší než 12 minut. Byla provedena i předběžná aplikace metody na reálný vzorek.

Evropská komise udává limit detekce pro běžné HPLC metody 0,5 - 1 µg/g (500-1000 µg/kg). Jelikož je ale používání těchto barviv v potravinách zakázáno, neměla by být detekována v žádné koncentrační hladině [41].

Ve srovnání s HPLC metodami, kde se limity detekce pohybovaly přibližně od 0,2 - 10 µg/l [41-43] a 0,05 - 100 µg/kg [26, 44-50], dosahuje metoda MEEKC nižší citlivosti při stanovení lipofilních barviv, avšak při výrazně menším objemu nástřiku vzorku (v řádu nl) a kratší dráze detekce a menšímu detekčnímu oknu. Její předností je též nižší spotřeba organických rozpouštědel.

U prací, zaměřených na stanovení Sudanu I-IV z chilli koření a rajčatové chilli omáčky kapilárně elektroforetickými metodami se limit detekce pohyboval od 0,1 - 0,61 µg/ml [54], 0,57 - 0,71 µg/ml [53] a 0,05 - 0,2 µg/ml [52]. Rozmezí délky analýzy bylo 8 - 20 minut. Metodou MEEKC bylo dosaženo průměrně kratší doby analýzy při srovnatelné citlivosti.



Bylo prokázáno, že metodu MEEKC lze aplikovat na lipofilní sudanová barviva. Metoda MEEKC poskytuje, oproti metodě MECK, větší potenciál pro další optimalizaci s cílem zlepšit citlivost a zkrátit dobu analýzy. Také je šetrnější k životnímu prostředí než metoda HPLC. Získané poznatky mohou posloužit jako podklad pro navržení a optimalizování vhodné prekoncentrační metody přípravy vzorku, která by umožňovala zakoncentrování vzorku a zároveň odstranění vlivu matrice.

## 6. Zdroje

- [1] YIN, Changna, Yuhua CAO, Shaodong DING a Yun WANG. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1193**(1-2): 172-177.
- [2] ŠLAMPOVÁ, Andrea, Dana SMĚLÁ, Irena JANČÁŘOVÁ a Vlastimil KUBÁŇ. Stanovení syntetických barviv v potravinách separačními metodami. *Chemické listy*. 2001, **95**(3): 163-168.
- [3] *Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů*. In: Sbírka zákonů: Česká Republika. Praha: Ministerstvo zemědělství 1997, částka 2178. Dostupné také z: [portal.gov.cz/zakon/110/1997](http://portal.gov.cz/zakon/110/1997)
- [4] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/36/EC ze dne 30.6.1994 o barvivech pro použití v potravinách*. In: *Official Journal of the European Communities*. Dostupné také z: [http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit\\_flavor/flav08\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav08_en.pdf)
- [5] FONOVICH, Teresa M. 2013. Sudan dyes: are they dangerous for human health? *Drug and Chemical Toxicology*. **36**(3): 343-352.
- [6] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Sudan+I&source=calculate>.
- [7] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Sudan+II&source=calculate>.
- [8] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Sudan+III&source=calculate>.
- [9] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Sudan+IV&source=calculate>.
- [10] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Sudan+Red+7B&source=calculate>.
- [11] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=C1%3DCC%3DC%28C%3DC1%29%2FN%3DN%2FC2%3DC%28C%3DC%28C%3DC2%29O%29O&source=fp>.
- [12] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Sudan+Red+G&source=calculate>.
- [13] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Methyl+Red&source=calculate>.
- [14] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Para+Red&source=calculate>.
- [15] Chemicalize.org. *ChemAxon*. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Para+Red&source=calculate>.
- [16] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/07937?lang=en&region=CZ>.
- [17] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/68562?lang=en&region=CZ>.
- [18] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/67386?lang=en&region=CZ>.

- [19] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/100994?lang=en&region=CZ>.
- [20] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/53373?lang=en&region=CZ>.
- [21] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/43207?lang=en&region=CZ>.
- [22] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/91282?lang=en&region=CZ>.
- [23] Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/32654?lang=en&region=CZ>.
- [24] REBANE, Riin, Ivo LEITO, Sergei YURCHENKO a Koit HERODES. A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrixes. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(17): 2747-2757.
- [25] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.(ed.). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some aromatic azo compounds. Volume 8*. Lyon, 1975. Dostupné také z: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono8.pdf>.
- [26] BOTEK, Pert, Jan POUSTKA a Jana HAJŠLOVA. Determination of banned dyes in spices by liquid chromatography-mass spectrometry. *Czech Journal of Food Science*. 2007, **25**(1): 17-24.
- [27] *Rozhodnutí komise Evropských společenství 2003/460/EC ze dne 20.6.2003 o mimořádných opatřeních týkajících se chilli papriček a výrobků z chilli papriček. In: Official Journal of the European Union L 154/114*. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:154:0114:0115:EN:PDF>.
- [28] *High Performance Capillary Electrophoresis: A primer*. Henk H. Lauer. Germany: Agilent Technologies, 2000. Č. publikace 5968-9963E.
- [29] DOLNÍK, Vladislav. *Úvod do kapilární elektroforézy*. Brno: Ústav analytické chemie, 1994, 67 s.
- [30] Elektroforéza. *Biochemical web*. [online]. 29.1.2004 [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>.
- [31] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2. Dostupné také z: <http://knihy.pavko.cz/index/moderni-analyticke-metody>.
- [32] ALTRIA, K. D., M. A. KELLY a B. J. CLARK. The use of a short-end injection procedure to achieve improved performance in capillary electrophoresis. *Chromatographia*. 1996, **43**(3-4): 153-158.
- [33] TERABE, Shigeru, Koji OTSUKA, Kunimichi ICHIKAWA, Akihiro TSUCHIYA a Teiichi ANDO. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry*. 1984, **56**(1): 111-113.
- [34] OTSUKA, Koji a Shigeru TERABE. Micellar electrokinetic chromatography. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1998, **71**(11): 2465-2481.
- [35] HANCU, Gabriel, Aura RUSU, Brigitta SIMON, Georgiana BOIA a Árpád GYÉRESI. Simultaneous separation of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012, **23**(10): 1889-1894. Dostupné z: [http://www.scielo.br/img/revistas/jbchs/2012nahead/aop111\\_12fig05.jpg](http://www.scielo.br/img/revistas/jbchs/2012nahead/aop111_12fig05.jpg).
- [36] ALTRIA, Kevin D. Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, **892**(1-2): 171-186.

- [37] RYAN, Richie, Sheila DONEGAN, Joe POWER, Eamon MCEVOY a Kevin ALTRIA. Recent advances in the methodology, optimisation and application of MEEKC. *Electrophoresis*. 2009, **30**(1): 65-82.
- [38] Mikroemulze. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mikroemulze.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mikroemulze.html).
- [39] ALTRIA, Kevin D., Pierre-Etienne MAHUZIER a Brian J. CLARK. Background and operating parameters in microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*. 2003, **24**(3): 315-324.
- [40] RYAN, Richie, Sheila DONEGAN, Joe POWER a Kevin ALTRIA. Advances in the theory and application of MEEKC. *Electrophoresis*. 2010, **31**(5): 755-767.
- [41] KHALIKOVA, Maria A., Dalibor ŠATÍNSKÝ, Tereza ŠMIDRKALOVÁ a Petr SOLICH. On-line SPE-UHPLC method using fused core columns for extraction and separation of nine illegal dyes in chilli-containing spices. *Talanta*. 2014, **130**: 433-441.
- [42] CHEN, Jing, Zhao-Jin LIU, Bao-Chao AN, Qun XU a Xiang-Min ZHANG. Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography Combined with On-line Solid Phase Extraction and Mass Spectrometry for Determination of Sudan Dyes in Chili Oil. *CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY*. 2013, **41**(9): 1418-1422.
- [43] SUN, Shuo, Ying WANG, Wenzhi YU, Tianqi ZHAO, Shiqian GAO, Mingqin KANG, Yupu ZHANG, Hanqi ZHANG a Yong YU. Determination of sudan dyes in red wine and fruit juice using ionic liquid-based liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2011, **34**(14): 1730-1737.
- [44] LIU, Yao, Man-Man WANG, Lian-Feng AI, Chang-Kun ZHANG, Xin LI a Xue-Sheng WANG. Determination of Sudan dyes in chili pepper powder by online solid-phase extraction with a butyl methacrylate monolithic column coupled to liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2014, **37**(13): 1648-1655.
- [45] YU, Wei, Zhongling LIU, Qiang LI, Hanqi ZHANG a Yong YU. Determination of Sudan I-IV in candy using ionic liquid/anionic surfactant aqueous two-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2015, **173**: 815-820.
- [46] SIANGPROH, Weena, Kittima SONAMIT, Sudkate CHAIYO a Orawon CHAILAPAKUL. Fast Determination of Sudan I-IV in Chili Products Using Automated On-Line Solid Phase Extraction Coupled with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. 2013, **46**(11): 1705-1717.
- [47] HU, Xiaogang, Quanlin CAI, Yanan FAN, Tingting YE, Yujuan CAO a Changjuan GUO. Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fibers for determination of Sudan I-IV dyes in hot chili powder and poultry feed samples. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1219**: 39-46.
- [48] SUN, Han-wen, Feng-chi WANG a Lian-feng AI. Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1164**(1-2): 120-128.
- [49] LI, Juan, Xiao-Ming DING, Dan-Dan LIU, Fei GUO, Yu CHEN, Yan-Bing ZHANG a Hong-Min LIU. Simultaneous determination of eight illegal dyes in chili products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2013, **942-943**: 46-52.
- [50] QI, Ping, Tao ZENG, Zejun WEN, Xiaoyan LIANG a Xuewu ZHANG. Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC-DAD. *Food Chemistry*. 2011, **125**(4): 1462-1467.

- [51] BOYCE, Mary C. Determination of additives in food by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2001, **22**(8): 1447–1459.
- [52] FUKUJI, Tatiana S., María CASTRO-PUYANA, Marina F. M. TAVARES a Alejandro CIFUENTES. Sensitive and fast determination of Sudan dyes in chilli powder by partial-filling micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2012, **33**(4): 705-712.
- [53] FUKUJI, Tatiana S., María CASTRO-PUYANA, Marina F. M. TAVARES a Alejandro CIFUENTES. Fast Determination of Sudan Dyes in Chilli Tomato Sauces Using Partial Filling Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(22): 11903-11909.
- [54] MEJIA, Eric, Yongsheng DING, Maria F. MORA a Carlos D. GARCIA. Determination of banned sudan dyes in chili powder by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*. 2007, **102**(4): 1027-1033.
- [55] MA, Yanhua, Huige ZHANG, Zia ur RAHMAN, Weifeng WANG, Xi LI, Hongli CHEN a Xingguo CHEN. Sensitive enantioanalysis of  $\beta$ -blockers via field-amplified sample injection combined with water removal in microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*. 2014, **35**(19): 2772-2777.
- [56] ALVES DA SILVA, Claudinei, Maria SEGUNDA AURORA-PRADO a Marina FRANCO MAGGI TAVARES. Determination of Ethinylestradiol and Levo-Norgestrel Using Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *Current Analytical Chemistry*. 2014, **10**(2): 216-224.
- [57] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
- [58] SHABIR, Ghulam A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*. 2003, **987**(1-2): 57-66.
- [59] *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Food and Drug Administration, Washington, 1994. Dostupné také z: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>.
- [60] *The United States Pharmacopoeia and The National Formulary 2009*. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention, 2008. ISBN 978-188-9788-692.
- [61] HORÁKOVÁ, Jana, Vítězslav MAIER a Juraj ŠEVČÍK. On-line preconcentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chemické listy*. 2006, **100**: 163 – 168.

